

UMA PERSPECTIVA COMPUTACIONAL SOBRE CATÁLISE ENZIMÁTICA

Guilherme M. Arantes*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes 748, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 24/11/06; aceito em 18/5/07; publicado na web em 19/12/07

A COMPUTATIONAL PERSPECTIVE ON ENZYMATIc CATALYSIS. Enzymes are extremely efficient catalysts. Here, part of the mechanisms proposed to explain this catalytic power will be compared to quantitative experimental results and computer simulations. Influence of the enzymatic environment over species along the reaction coordinate will be analysed. Concepts of transition state stabilisation and reactant destabilisation will be confronted. Divided site model and near-attack conformation hypotheses will also be discussed. Molecular interactions such as covalent catalysis, general acid-base catalysis, electrostatics, entropic effects, steric hindrance, quantum and dynamical effects will also be analysed as sources of catalysis. Reaction mechanisms, in particular that catalysed by protein tyrosine phosphatases, illustrate the concepts.

Keywords: enzymatic catalysis; computer simulation; reaction mechanism.

INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de extraordinária eficiência. Os aumentos de velocidade de reações alcançados por enzimas podem chegar a vinte ordens de magnitude¹! Por outro lado, enzimas possuem uma grande especificidade pelos substratos, sua atividade é controlável e totalmente seletiva.

Sob uma perspectiva teórica, a sugestão de Fischer², conhecida como a hipótese da “chave e fechadura”, foi a primeira proposta para explicar o poder catalítico das enzimas. Com o advento da teoria do estado de transição³ nos anos 1930, Pauling⁴ propôs que esta espécie seria preferencialmente ligada pelo sítio ativo enzimático. Já em 1969, Jencks⁵ escreveu que “o estudo dos mecanismos moleculares de catálise enzimática é necessariamente empírico e qualitativo”. No entanto, nos últimos 30 anos, simulações computacionais que permitem determinações quantitativas de propriedades termodinâmicas têm alterado este panorama, apontando e quantificando os mecanismos catalíticos empregados por enzimas.

Cabem aqui duas definições. O termo “mecanismo catalítico” é usado para descrever as forças ou interações microscópicas utilizadas pelas enzimas para amplificar a velocidade de reações. Já “mecanismo de reação” é a seqüência de transformações (quebra e formação de ligações químicas) e mudanças de estrutura do complexo enzimático observadas ao longo do progresso da reação.

Diversos mecanismos catalíticos já foram propostos para explicar as acelerações enzimáticas em nível microscópico. Por exemplo, Menger contabilizou 21 teorias sobre catálise enzimática⁶. Este número é elevado em consequência de diferentes interpretações semânticas e imprecisas definições de quantidades termodinâmicas nas teorias propostas, e também porque a maior parte destas teorias não foi (ou não pode ser) testada quantitativamente. Portanto, há muita controvérsia sobre a importância de cada um dos diferentes mecanismos e teorias propostos para explicar o poder catalítico das enzimas⁷⁻⁹.

Sem dúvida, cada enzima possui sua própria “receita”⁶ para catálise, em que uma combinação das interações propostas pode estar atuando. O principal objetivo deste texto é analisar e

quantificar a contribuição de cada uma destas interações para o aumento da velocidade de reações no ambiente enzimático. Inicialmente apresentaremos o modelo básico e suas equações macroscópicas para a atividade enzimática, e a definição de reação de referência em solução aquosa, que deve ser usada na comparação com a reação enzimática. Em seguida, discutiremos qual espécie ao longo da coordenada de reação sofre influência determinante do ambiente enzimático. A hipótese de desestabilização do estado reagente (complexo enzima-substrato ou complexo de Michaelis) será confrontada com a hipótese de estabilização do estado de transição (TS)³. Propostas relacionadas como as conformações próximas ao ataque¹⁰ e do sítio dividido⁶ também serão analisadas.

As interações moleculares usadas para explicar os mecanismos catalíticos, incluindo catálise covalente, catálise ácido-base geral, interação eletrostática, efeitos entrópicos, impedimento estérico e, efeitos quânticos e dinâmicos serão discutidas. Esta lista de interações pode ser incompleta, dada a limitação de tamanho para este texto, e parcial, pois reflete as propostas que foram testadas e quantificadas por simulações computacionais. Mecanismos de reação de algumas enzimas, em particular as proteínas tirosinafosfatases, serão usados para ilustrar os conceitos discutidos¹¹.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

As Equações de Michaelis-Mentem^{12,13} são o modelo básico usado para descrever cinética enzimática para um único substrato, S:



$$K_S = \frac{[E][S]}{[E \cdot S]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (3)$$

onde E denota enzima, P é o produto, K_S é a constante de equilíbrio para dissociação do complexo E.S, k_{cat} é a constante de velocidade de reação observada e K_M é a constante de Michaelis. Na maioria dos casos, $k_{-1} \gg k_{cat}$, portanto, $K_S \approx K_M$. Neste modelo, a velocidade

*e-mail: garantes@iq.usp.br

de inicial de formação do produto, $v = k_{cat} [E.S]$, também pode ser escrita como:

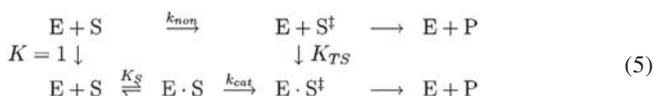
$$v = \frac{k_{cat}[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

onde definimos a concentração total de enzima, $[E]_T = [E] + [E.S]$. Equações semelhantes também são válidas para sistemas mais complexos como, por exemplo, na presença de dois ou mais substratos diferentes. Nestes casos, a definição da constante K_S é alterada.

Considerando este modelo, existem três maneiras da evolução maximizar a constante de velocidade de catálise aparente, definida como k_{cat}/K_M . Alteração somente de K_S para um determinado substrato pode amplificar a velocidade de catálise aparente pelo aumento da $[E.S]$, além de modificar a seletividade por este substrato. Um dos possíveis mecanismos empregados neste caso é o encaminhamento, em que o volume livre para difusão do substrato é reduzido ou por mudanças estruturais na enzima (como em complexos enzimáticos multi-unidades) ou por interações eletrostáticas que guiam o substrato para o sítio ativo¹⁴. A velocidade de catálise também pode ser amplificada pelo aumento da k_{cat} sem alteração da seletividade pelo substrato, ou seja, apenas aumentando a velocidade da etapa de transformação química na enzima. Finalmente, a velocidade de catálise pode ser aumentada pela modificação simultânea de k_{cat} e K_S . Não discutiremos aqui processos que alterem apenas a associação entre enzima e substrato (K_S). Este texto focaliza os processos que aumentam a velocidade de catálise principalmente pelo aumento de k_{cat} .

REAÇÃO DE REFERÊNCIA

Para identificação das fontes de aceleração enzimática, a reação catalisada deve ser comparada com uma reação de referência em solução aquosa sem catálise. Caso a reação enzimática e a reação observada em solução ocorrem segundo o mesmo mecanismo, ou seja, possuam um estado de transição semelhante, o seguinte ciclo termodinâmico pode ser usado para comparação:



A velocidade de reação na enzima será maior que a reação não catalisada em solução se $k_{cat}/K_S > k_{non}$. Neste caso, a afinidade da enzima pelo TS ou complexo ativado, S^\ddagger , é $K_{TS} = (k_{cat}/K_S)/k_{non} > 0$, ou seja, o complexo ativado é mais estável quando ligado à enzima que quando em solução.

No entanto, o mecanismo de reação atuante no sítio enzimático pode ser diferente do mecanismo de reação observado em solução aquosa na ausência do catalisador. Por exemplo, a hidrólise de ésteres de fosfato em solução aquosa ocorre diretamente num ataque nucleofílico por uma molécula de água. Porém, a mesma reação catalisada pelas proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) ocorre em duas etapas: uma tiólise do éster de fosfato, seguida de uma hidrólise do intermediário tiosforilado (Figura 1)^{15,16}.

Nestes casos, o mecanismo de reação na enzima não deve ser

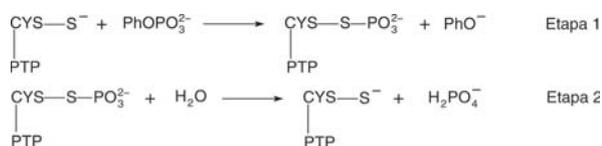


Figura 1. Esquema da reação de hidrólise catalisada pelas proteínas tirosina-fosfatases (PTP). Ph indica um grupo fenil e CYS, o resíduo de cisteína

diretamente comparado com o mecanismo observado em solução via um ciclo termodinâmico como o da Equação 5. A análise do efeito enzimático deve ser feita em comparação com uma reação de referência em solução aquosa (caracterizada por k_{non}), constituída pelos mesmos grupos reativos (R e S na Figura 2) e o mesmo mecanismo de reação na enzima, mas solvatados por água. (Figura 2)^{9,17}. Simulações computacionais podem ser usadas para calcular o perfil energético das reações de referência que são inacessíveis experimentalmente¹⁸⁻²⁰.

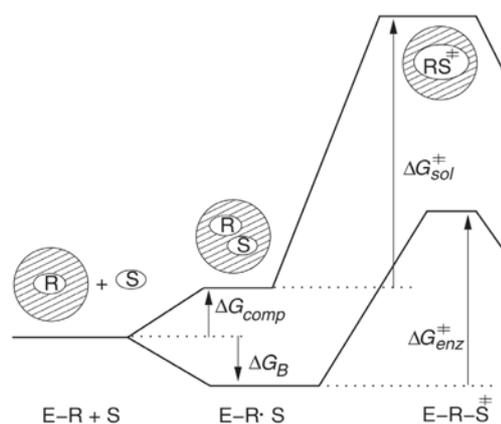


Figura 2. Esquema do perfil energético de uma reação enzimática e sua referência em solução. ΔG_B , ΔG_{comp} , ΔG_{enz}^\ddagger e ΔG_{sol}^\ddagger são, respectivamente, a energia livre de formação do complexo entre a enzima E-R e o substrato S, de complexação entre os reagentes R e S em solução, de ativação da reação no ambiente enzimático e de ativação da reação no complexo de encontro R.S dos reagentes em solução. A região com linhas diagonais indica o solvente aquoso

ESPÉCIE CATALISADA

Estabilização do TS ou desestabilização do reagente?

A hipótese da “chave e fechadura” proposta inicialmente por Fischer para racionalizar o poder catalítico das enzimas foi estendida pela proposta de Haldane², em que o substrato não “encaixa” exatamente na enzima, mas sofre uma distorção após a formação do complexo E.S, e pela proposta de Pauling⁴, em que a enzima se liga mais fortemente ao TS que ao substrato.

A hipótese de Pauling apóia-se no conceito de estado de transição³ e diz que este é mais estabilizado no sítio ativo da enzima em relação a mesma espécie numa reação de referência em solução aquosa. Esta hipótese é amplamente aceita como principal fonte de catálise e parece válida em todas enzimas já analisadas quantitativamente^{2,10,18,19,21,22}.

Centenas de estruturas tridimensionais determinadas para enzimas complexadas a análogos de TS apóiam a noção de complementaridade entre as estruturas do sítio ativo e do TS. Estes complexos são de grande utilidade prática no desenho de drogas que funcionam como inibidores enzimáticos competitivos¹³. No entanto, comprovar a hipótese de Pauling por experimentos não é diretamente possível, já que um TS é um objeto transiente. Simulações computacionais de reações enzimáticas mostram repetidamente^{8,21-24} que a interação eletrostática entre o ambiente enzimático e o TS é a maior responsável pela diminuição de ΔG_{enz}^\ddagger em relação a ΔG_{sol}^\ddagger (Figura 2), demonstrando que o TS é a principal espécie que sofre catálise ao longo da coordenada de reação na enzima.

A afirmação de “maior ligação ou afinidade da enzima pelo TS” é por vezes interpretada literalmente, como se o TS fosse atin-

gado em solução e, depois, ligado e estabilizado pela enzima. Esta interpretação é equivocada porque o TS tem um tempo de vida muito pequeno em solução, da ordem de 10^{-15} s e, portanto, não existe por um tempo suficiente para que difusão e ligação à enzima ocorram. Na interpretação correta, a enzima complexa o substrato no estado fundamental e a ativação ocorre a partir deste complexo. O TS formado possui melhores contatos com a enzima que o substrato, maximizando a estabilização apenas quando o complexo é ativado. Assim, o TS tem maior estabilidade no sítio ativo que em solução.

A proposta de Haldane equivale à desestabilização do estado reagente em relação à mesma espécie livre em solução. A desestabilização contribui para amplificar a velocidade da reação enzimática ao reduzir a barreira de ativação ($\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$). No perfil de energia livre de ligação e reação representado pela curva A na Figura 3, ΔG_{B} indica a energia livre de ligação do substrato intrínseca, ou seja, sem nenhuma desestabilização do estado reagente. Uma alteração estrutural da proteína anterior à ligação do substrato, por exemplo, em consequência da ligação de um regulador alostérico ou de uma mutação no sítio ativo, pode resultar em aumento da K_M (perfil B, Figura 3). Uma alteração estrutural expressiva resultaria em grande desestabilização do complexo E.S e $K_M > 1$ (perfil C, Figura 3). A desestabilização também pode ser consequência de uma mudança estrutural na enzima⁵ após a formação de E.S, gerando o complexo E.S' (perfil D, Figura 3).

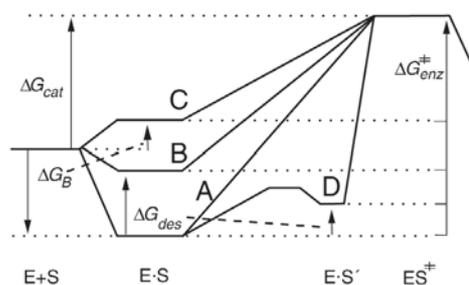


Figura 3. Esquema do perfil de energia livre de reações enzimáticas para complexos E.S com diferentes estabilidades. ΔG_{B} , ΔG_{des} , $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ e $\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$ são, respectivamente, a energia livre de formação do complexo E.S, de desestabilização de E.S, de ativação na enzima ($\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger} = -RT \ln[k_{\text{cat}}/A]$, onde A é o fator pré-exponencial) e de ativação aparente ($\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger} = -RT \ln[(k_{\text{cat}}/A) / K_M]$)

Jencks propôs que a energia de ligação do substrato observada nos processos representados pelos perfis B e D é $\Delta G_{\text{B}} - \Delta G_{\text{des}}$, ou seja, a diferença entre a energia de ligação intrínseca e a energia usada para desestabilizar o substrato. A desestabilização não (ou pouco) altera a energia do TS⁵ e ΔG_{des} seria usado como fonte de catálise, reduzindo a barreira para reação na enzima. Assim, a energia de ativação na enzima é modificada para cada perfil e $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ (A) $>$ $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ (D) $>$ $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ (B) $>$ $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ (C) (Figura 3). Esta proposta implica que enzimas têm alta afinidade intrínseca (ΔG_{B}) pelo substrato.

No entanto, a importância da desestabilização do substrato para catálise deve ser limitada, já que o aumento da energia do complexo E.S acima da energia de E+S (perfil C, Figura 3) não é catalítico. A velocidade máxima de uma reação reflete a diferença entre as energias livres do ponto mais alto (ES[‡]) e do mais baixo (E+S, no caso do perfil C) ao longo da coordenada de reação. A quantidade de energia livre disponível para catálise pela desestabilização do reagente (ΔG_{des}) também é pequena em comparação com a diferença entre as barreiras da reação catalisada e em solução ($\Delta G_{\text{sol}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$, Figura 2)¹⁷.

Nenhum experimento quantificou diretamente o efeito de desestabilização para reações no sítio enzimático, mas Jencks e

Menger defendem esta proposta baseados principalmente na interpretação da reatividade de compostos orgânicos em solução^{3,25}.

A análise do efeito da evolução separadamente sobre k_{cat} e K_M de diversas enzimas dentro do modelo de Michaelis-Menten (Equação 1) com a relação k_{cat}/K_M fixada indica que enzimas evoluíram para ligar o TS fortemente (baixo $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ ou alto k_{cat})¹² e os substratos fracamente (alto K_M). Esta conclusão está em desacordo com a proposta de Jencks (vide supra). A desestabilização do complexo E.S (perfis B e D, Figura 3) não muda $\Delta G_{\text{cat}} = -RT \ln[(k_{\text{cat}}/A) / K_M]$, portanto não é claro como esta proposta pode ser usada pela evolução para variar ou maximizar a velocidade de catálise aparente (k_{cat}/K_M)¹⁷.

Enzimas mutantes cujo ΔG_{cat} é significativamente diferente da enzima selvagem podem ser divididas em três classes: mutantes que sofrem alteração da energia do TS, resultando em diminuição apenas de k_{cat} e manutenção de K_M ²⁶ (ou seja, $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ é aumentado, pois o TS é desestabilizado); mutantes que sofrem modificação de um sítio de ligação distante dos grupos reativos do substrato, resultando em aumento do K_M , mas mantendo o valor de k_{cat} (ou seja, o TS e o complexo E.S têm suas energias aumentadas pela mesma quantidade, logo, $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ não muda)¹⁷. Não foram encontrados²⁷ mutantes em que ambos K_M e k_{cat} seriam modificados (ou seja, $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ e ΔG_{B} apresentariam aumentos da mesma magnitude). Este seria o resultado esperado para uma mutação que anule ou diminua a capacidade de desestabilização do substrato.

A desestabilização dos reagentes é frequentemente associada à seleção pelo sítio ativo de uma conformação do substrato instável em relação à conformação mais populada em solução aquosa. A corimato mutase²⁸ e a lisozima são dois exemplos em que o substrato ligado à enzima é forçado a adotar uma conformação diferente daquela mais estável em solução aquosa. A diferença de energia livre entre os conformêros pode chegar a 5 kcal/mol, mas esta energia não é necessariamente usada na diminuição de $\Delta G_{\text{enz}}^{\ddagger}$ ¹⁸. A seleção de conformações pela enzima está relacionada ao conceito de conformações próximas ao ataque, discutido na próxima seção.

Conformação próxima ao ataque

Bruice²⁹ introduziu o conceito de conformação próxima ao ataque (NAC), definido como a configuração estrutural que os reagentes precisam assumir para chegar ao TS. A análise conformacional de uma série de reações intramoleculares de ciclização de ácidos dicarboxílicos indicou que a fração molar dos reagentes em NACs (definidas de acordo com critérios geométricos como distância e ângulo da ligação em formação) era diretamente proporcional à velocidade da ciclização intramolecular e formação de anidrido (Figura 4)²⁹. A distribuição de conformações dos substratos complexados aos sítios ativos em algumas reações enzimáticas que não envolvem a formação de intermediários covalentes (por exemplo, o rearranjo de corimato para perfenato, catalisado pela enzima corimato mutase) indicou que a proporção de NACs no sítio ativo enzimático era maior que na reação de referência em solução¹⁰.

No entanto, uma NAC não é uma espécie termodinamicamente estável e, portanto, sua definição não é única e depende dos critérios geométricos escolhidos. Assim, a presença de NACs não pode

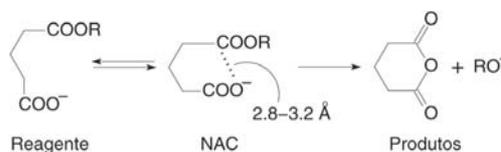


Figura 4. Esquema da reação de ciclização intramolecular passando por uma conformação próxima ao ataque (NAC), definida pela distância de 2,8 a 3,2 Å entre o oxigênio nucleofílico e o carbono esterificado

ser medida experimentalmente e sua contribuição energética para catálise é difícil de ser avaliada com precisão. Estimativas computacionais sugerem que contribuições entre 1 a 3 kcal/mol estão disponíveis para catálise através da estabilização ou seleção de NACs por enzimas, em relação à população normal de NACs observada em solução aquosa^{7,30}.

Também inspirado pela idéia de controle estereo-populacional em reações intramoleculares, Menger propôs sua hipótese espaço-temporal, postulando que a “velocidade da reação entre os grupos X e Y é proporcional ao tempo que X e Y residem a uma distância crítica”²⁵. Esta hipótese é equivalente ao aumento da fração molar de NACs.

Modelo do sítio dividido

Menger também propôs uma função catalítica para o complexo E.S⁶. No seu modelo de sítio dividido, a interação entre o substrato e a enzima pode ser dividida em sítios ou regiões de ligação (*lig*) e sítios ou regiões de reação (*reac*). A energia livre de cada espécie é descrita pela soma das energias de cada região, $\Delta G = \Delta G(\text{lig}) + \Delta G(\text{reac})$. As seguintes hipóteses estão no cerne do modelo:

1. a energia de formação do complexo E.S proveniente da região ligante, $\Delta G_B(\text{lig})$, é conservada quando o TS é alcançado, já o $\Delta G_B(\text{reac})$ não é conservado no TS, porque a estrutura molecular nesta região é modificada;

2. as forças atuantes são sempre estabilizantes (atrativas) na região de ligação, e desestabilizantes na região reativa.

Nesta proposta, a desestabilização da parte reativa é compensada pela estabilização na região ligante. Assim, a energia de ligação total (ΔG_B) é maior que num complexo E.S com apenas uma região (reativa) desestabilizada (como os exemplos da Figura 3), e a barreira de ativação para reação é reduzida. Este modelo é semelhante à proposta de ligação uniforme feita por Alberty e Knowles³¹.

No entanto, o ganho em energia livre neste modelo é limitado pela diferença entre a estabilização da região ligante e a desestabilização da região reativa. Estimativas computacionais¹⁷ e medidas cinéticas para catálise de substratos com diferentes regiões ligantes mas com a mesma região reativa¹² sugerem que aumentos de velocidade de apenas três ordens de magnitude podem ser obtidos pelo modelo de sítio dividido.

Por exemplo, este modelo pode explicar porque enzimas CDC25 da família das PTPs desfosforilam o substrato natural (a proteína CDK2) 10³ vezes mais rápido que substratos artificiais que possuem apenas uma região reativa e nenhuma região de ligação³².

Interações e mecanismos catalíticos microscópicos

Nesta seção, revisaremos possíveis forças e interações microscópicas que podem explicar como enzimas estabilizam o TS e aumentam a velocidade das reações catalisadas. Existe uma dificuldade intrínseca em particionar estas contribuições energéticas, porque muitas delas não são aditivas e independentes³³. Por exemplo, experimentos de mutação sítio-dirigida podem avaliar a contribuição de um determinado resíduo para abaixamento da energia de ativação. No entanto, estes experimentos são sempre cooperativos, pois alteram uma série de interações, como eletrostática, impedimento estérico, dinâmica, liberdade configuracional, entre outras. Simulações computacionais são bastante poderosas para lidar com esta limitação, pois permitem que as contribuições sejam separadas e avaliadas independentemente.

Cabe aqui uma explicação sobre as contribuições discutidas a seguir e sua relação com os resultados obtidos em uma simulação. A maioria das simulações computacionais de reações enzimáticas

discutidas aqui são obtidas por potenciais híbridos de mecânica quântica e mecânica molecular^{24,28}.

Nestas simulações, a parte de mecânica quântica descreve a quebra e a formação de ligações químicas dos grupos reativos (átomos do substrato e do sítio ativo que participam da reação química) e, portanto, descreve as contribuições discutidas nas seções “Catálise covalente” e “Catálise ácido-base geral”.

A parte de mecânica molecular é responsável pela descrição das forças intermoleculares, como as forças eletrostáticas e de van der Waals, e das interações ligantes, como estiramento de ligações e torções de ângulos diedrais. As contribuições da “Interação eletrostática” estão diretamente ligadas à força eletrostática presente nesta parte do potencial. Da mesma forma, “Tensão e impedimento estérico” são descritos pelas interações ligantes e de van der Waals (ver abaixo). Contribuições termodinâmicas para catálise, como descrito na seção “Efeitos entrópicos”, são obtidas através da amostragem do espaço configuracional disponível ao sistema enzimático durante a simulação^{18,22}. Finalmente, “Efeitos quânticos e dinâmicos” são observados numa simulação ou através de correções à dinâmica clássica, ou explicitamente se a dinâmica da parte reativa for tratada quanto-mecanicamente⁸.

Catálise covalente

Catálise covalente pode ser descrita como uma modificação química transiente na enzima que ativa o substrato ou transfere um grupo reativo do substrato para outro aceptor. Para a catálise covalente ser efetiva, as seguintes condições devem ser atingidas⁵: o catalisador deve ter uma maior reatividade frente ao substrato que o aceptor final; o intermediário formado entre o catalisador e o substrato deve ser mais reativo que o substrato; o intermediário deve ser termodinamicamente instável (maior energia livre) em relação ao produto final, de maneira que o intermediário não acumule.

Catalisadores como proteases, esterasas, descarboxilases, fosfatases (incluindo as PTPs), entre outras enzimas, formam intermediários covalentes e parecem seguir as condições acima. Por exemplo, fosfatases que utilizam um resíduo de cisteína para ataque nucleofílico sobre fósforo formam um intermediário tiofosforilado¹⁵ (Figura 1). A energia de ativação para alcoólise³⁴ ou hidrólise³⁵ de tioésteres de fosfato (quebra da ligação P-S) é 6 e 10 kcal/mol mais baixa que a respectiva reação de oxidésteres de fosfato (quebra da ligação P-O). Assim, a vantagem energética obtida pela catálise covalente é desta magnitude (5-10 kcal/mol).

Houk propôs recentemente³⁶ que a catálise covalente é um mecanismo fundamental para todas as enzimas de alta capacidade catalítica [com $(k_{cat}/K_M)/k_{non} > 10^{11}$]. Contudo, este argumento pode ser refutado já que algumas das enzimas de maior capacidade catalítica não apresentam intermediários covalentes⁷.

A formação de intermediários resulta na divisão do processo total em diversas etapas ou reações³⁷, portanto, o mecanismo de reação na enzima pode ser diferente do mecanismo de reação observado em solução. A análise do mecanismo catalítico deve ser feita entre cada etapa e a respectiva reação de referência não catalisada em solução (ver seção Reação de referência).

Catálise ácido-base geral

A catálise ácido-base geral, ou seja, doação (ou aceitação) de H⁺ por um grupo enzimático que funciona como um ácido (ou uma base), é uma das etapas envolvidas em diversas reações bioquímicas. A transferência pode ocorrer de três formas: um pré-equilíbrio rápido e anterior à etapa limitante da velocidade de reação; simul-

taneamente à reação ou, constituir a etapa limitante (por exemplo, na transferência de H^+ de carbonos alifáticos)⁵. No primeiro caso, as barreiras intrínsecas de transferência de H^+ são pequenas. Porém, a transferência pode formar intermediários de maior energia livre e, conseqüentemente, elevar a barreira total da reação. Estes intermediários são evitados nas reações enzimáticas⁵.

A transferência também pode neutralizar ou alterar a carga dos grupos reagentes, facilitando outras etapas do mecanismo de reação. Por exemplo, o ataque nucleofílico das PTPs sobre o substrato é facilitado pela doação de H^+ ao grupo de saída. Caso esta transferência de H^+ não aconteça (após uma mutação do resíduo que funciona como ácido geral), outras etapas do mecanismo de reação são energeticamente desestabilizadas ou até impedidas^{15,38}.

Avaliar a contribuição da catálise ácido-base geral para a diminuição da barreira de reação não é trivial, porque a transferência de H^+ pode influenciar diferentes etapas ou ocorrer em etapas não limitantes. Em solução aquosa, a catálise ácido-base geral propicia aumentos na constante de velocidade de cerca de 10^2 - 10^3 vezes⁵. Para as PTPs, cerca de 5 kcal/mol de estabilização do TS são atribuídos à catálise ácido-base geral, tanto por simulações computacionais¹⁵ como por mutações do resíduo envolvido na transferência de H^+ ³⁹.

Interação eletrostática

A importância das interações eletrostáticas foi rapidamente identificada para a ligação de substratos e para estabilidade e enovelamento de proteínas, através da formação de pares iônicos ou pontes salinas⁵. Porém, sua importância como mecanismo catalítico não foi comprovada até o advento de experimentos de mutação sítio-dirigida e de simulações computacionais^{26,40}.

Mutações em resíduos que estabilizam cargas formais ou parciais do TS resultam em diminuição de k_{cat} ⁴¹. Alterações no microambiente dielétrico de uma reação podem diminuir a altura da barreira em mais de 20 kcal/mol⁴². Assim, enzimas fornecem um microambiente altamente polar cujo potencial eletrostático complementa as mudanças de cargas observadas ao longo de uma reação¹⁸ (Figura 5).

A coordenação (não covalente) com íons metálicos e ligações de hidrogênio são normalmente consideradas interações eletrostáticas, pois são modeladas com razoável sucesso por esta força^{18,23}.

Simulações computacionais mostram repetidamente^{8,21,23,24} que a interação eletrostática entre o ambiente enzimático e o TS das reações catalisadas é a maior responsável pela diminuição de ΔG_{enz}^\ddagger em relação a ΔG_{sol}^\ddagger (Figura 2). Mesmo nos casos onde o TS é menos polar que o estado reagente, a estabilização eletrostática do TS na enzima é maior que em solução²⁰. O aumento médio de velocidade atribuído à interação eletrostática é calculado em 10^{11} vezes (equivalente a um abaixamento de 17 kcal/mol na energia de ativação)⁸.

Solventes polares, como a água, podem reorientar seus dipolos para estabilizar a distribuição de carga atingida no TS. Em uma enzima, no entanto, os dipolos que estabilizam o TS já estão *pré-orientados* no complexo E.S para estabilizar as cargas do TS. Em solução, a energia para *reorientar* os dipolos do solvente complementarmente às cargas do TS é elevada. Na enzima, a energia de orientação dos dipolos no sítio ativo já foi gasta durante o enovelamento e a formação da estrutura nativa. Portanto, enzimas são “supersolventes”, que funcionam por substituição de solvatação do TS, com pequena energia de reorganização¹⁸.

Uma proposta relacionada, em que enzimas propiciariam microambientes apolares que desestabilizam os reagentes por dessolvatação^{5,28} (vide supra), é baseada na observação que algumas reações em fase gasosa ou em solventes apolares ocorrem mais rapidamente que as mesmas reações em soluções polares⁴². Energias de

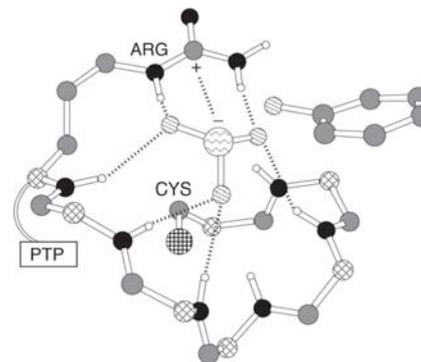


Figura 5. Exemplo de estabilização eletrostática do TS: estrutura do sítio ativo coordenado ao TS da primeira etapa de reação catalisada pelas PTPs (Figura 1). Interações eletrostáticas entre o grupo fosfato (PO_3^-) e a carga positiva da arginina (ARG) e as ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas tracejadas. A estrutura foi obtida a partir de uma simulação de dinâmica molecular¹⁵ e parte dos átomos foram apagados para facilitar a visualização. Legenda para os tipos atômicos: H (branco), C (cinza), C_α (linhas diagonais cruzadas), N (preto), O (linhas diagonais), P (ondulado) e S (linhas cruzadas)

solvatação do reagente por água e pelo sítio enzimático (solvatação assume um sentido generalizado aqui) podem ser calculadas em comparação com a reação em fase gasosa, ou seja, na ausência de qualquer solvente. Por exemplo, a energia de solvatação calculada para o estado reagente na enzima haloalcano desalogenase é cerca de 30 kcal/mol menor que em solução aquosa e, portanto, supôs-se que a enzima desestabilizaria o substrato ao diminuir sua solvatação²⁸. Entretanto, a energia de pré-organização do sítio ativo é incorretamente descartada neste cálculo (ao contrário da reorganização do solvente aquoso)⁹. A hipótese de dessolvatação também é refutada se um ciclo termodinâmico (como a Equação 5) inclui a transferência dos fragmentos reativos polares do solvente aquoso (referência) para o possível microambiente apolar. Esta transferência envolve uma alta energia, que não está disponível no processo de catálise¹⁸. Sítios ativos são ambientes altamente polares e heterogêneos, bastante diferentes de solventes apolares ou da fase gasosa.

Efeitos entrópicos

O aumento da velocidade de reações por efeitos entrópicos é freqüentemente considerado um importante mecanismo catalítico^{5,24,43}. Esta proposta já foi enunciada de diversas maneiras, mas em essência implica que o espaço configuracional disponível para os reagentes em solução é restringido no sítio ativo enzimático, resultando em significativas diferenças entrópicas entre as energias livres de ativação na enzima e na reação de referência em solução.

A definição do estado de referência em solução é crucial para correta estimativa dos efeitos entrópicos. O efeito de concentração em solução aquosa, referente à aproximação dos reagentes, é dado por $\approx -RT \ln 55$ para cada par de reagentes. Assim para uma reação bimolecular R+S em solução (Figura 2), esta contribuição (ΔG_{comp}) é 2.4 kcal/mol a 300 K. Descontando o efeito de concentração, a diferença entre as barreiras entrópicas (ΔS) para ativação da reação em solução e na enzima pode ser escrita por:

$$\begin{aligned} (\Delta \Delta S^\ddagger)_{sol \rightarrow enz} &= [\Delta S_{enz}^\ddagger - \Delta S_{sol}^\ddagger] \\ &= [(S_{enz}^{TS} - S_{enz}^{E,S}) - (S_{sol}^{TS} - S_{sol}^{R,S})] \\ &= [(S_{enz}^{TS} - S_{sol}^{TS}) - \Delta S_B] \end{aligned} \quad (6)$$

onde $\Delta S_B = S_{enz}^{E,S} - S_{sol}^{R,S}$ é a entropia de ligação do substrato, considerando os estados E.S e R.S (Figura 2).

As propostas que sustentam o efeito entrópico como mecanismo catalítico assumem *implicitamente* que os graus de liberdade do TS em solução e na enzima estão congelados, ou seja $S_{enz}^{TS} = S_{sol}^{TS} \approx 0$ e, portanto, superestimam $(\Delta\Delta S^\ddagger)_{sol \rightarrow enz} = -\Delta S_B^{19,24,41}$. Esta suposição é baseada num raciocínio para reações bimoleculares utilizando reagentes *esféricos*⁵ em que até -35 unidades entrópicas (cerca de 10 kcal/mol a 300 K) seriam obtidas pela restrição translacional no sítio ativo. Porém, este raciocínio não é válido para estruturas *moleculares*, porque parte da movimentação livre nos complexos R.S e E.S também está livre no TS (parte dos graus de liberdade translacionais e rotacionais tidos como “congelados” são, na verdade, transformados em vibrações de baixa frequência dos TS, cuja contribuição entrópica é bastante apreciável)^{18,41,44}.

Simulações computacionais das contribuições entrópicas ainda sofrem de problemas de convergência e, portanto, as estimativas não são totalmente seguras⁴⁵, mas simulações semiquantitativas^{18,45} indicam que $(\Delta\Delta S^\ddagger)_{sol \rightarrow enz} < 1$ kcal/mol.

Nenhum experimento demonstrou diretamente que a catálise enzimática estivesse associada à $(\Delta\Delta S^\ddagger)_{sol \rightarrow enz}$. A análise das contribuições para energia livre de reações enzimáticas e de sua referência em solução determinadas por gráficos de Arrhenius^{10,45} indica que a contribuição entrópica é equivalente nos dois ambientes. Dados experimentais obtidos em solução⁴⁶ sugerem que a água já impõe restrições à movimentação translacional e rotacional de solutos polares e, portanto, o ganho em termos destas contribuições pela transferência dos reagentes para o sítio ativo enzimático seria pequeno.

Os aumentos de velocidade observados em reações intramoleculares (ver seção Espécie catalisada), em que os reagentes estão covalentemente ligados e parcialmente imobilizados, são citados como evidência de catálise por efeitos entrópicos. Porém, a informação obtida destes modelos não é diretamente transferível para reações enzimáticas, porque a restrição das configurações disponíveis na reação intramolecular não está necessariamente ligada às possíveis restrições observadas no sítio ativo, em comparação com a reação intermolecular de referência em solução¹⁸. Simulações computacionais também indicam que o aumento da velocidade de reações intramoleculares não está necessariamente associado a contribuições entrópicas²⁹.

Portanto, embora efeitos entrópicos para catálise não possam ser totalmente ignorados, a magnitude destas contribuições é menor que o tradicionalmente proposto⁵.

Tensão e impedimento estérico

A tensão ou impedimento estérico resultante da aproximação espacial entre moléculas ou partes da mesma molécula foram sugeridos como um possível mecanismo catalítico ligado à desestabilização do substrato (ver seção Espécie catalisada)⁵.

Existem dois casos limites nessa hipótese. Se o sítio ativo for relativamente rígido e sua estrutura complementar ao TS, o reagente sofreria uma distorção geométrica para se acomodar no sítio ativo⁵, diminuindo a energia de ativação como mostrado no perfil B, Figura 3. Caso o sítio ativo seja flexível e o substrato rígido, a formação do complexo E.S seria acompanhada por uma mudança conformacional na enzima que tensionaria e desestabilizaria a geometria do substrato, aumentando a energia livre do sistema (perfil D, Figura 3)⁵.

Nenhuma observação experimental suporta diretamente ambas as propostas⁵ e as evidências existentes são consideradas ambíguas¹². A catálise na lisozima é tradicionalmente citada como evidência da tensão que pode ser exercida sobre o substrato, pois a estrutura do sítio ativo parece complementar à conformação “barco” do substrato (um sacarídeo, cuja conformação “cadeira” é cerca de 5 kcal/mol

mais estável em solução aquosa). No entanto, a diferença de energia livre associada à mudança da conformação cadeira para conformação sofá entre a solução aquosa e o ambiente enzimático é menor que 1 kcal/mol¹⁸. Portanto, esta diferença não é suficiente para explicar o abaixamento da energia de ativação no ambiente enzimático.

Medidas de RMN e simulações computacionais mostram que enzimas são moléculas bastante flexíveis, que podem acomodar mudanças na estrutura do substrato sem aumento significativo da energia livre^{8,37}. Mudanças geométricas do reagente associadas à formação do TS são menores que 1 Å, e deformações desta magnitude são facilmente acomodadas pelos modos vibracionais de baixa energia da proteína (que, pictoricamente, pode ser comparada a um conjunto de molas com baixa constante de força)¹⁸.

Numa simulação computacional, o impedimento estérico pode ser definido como o potencial repulsivo das interações de van der Waals e as contribuições da distorção de ligações, ângulos e diedrais. A contribuição total destas interações para diminuição de ΔG_{enz}^\ddagger foi calculada em menos que 2 kcal/mol para diferentes enzimas^{18,30}.

A proposta de “ajuste induzido”³⁵ é semelhante mas não está relacionada à catálise, porque a energia de ligação é utilizada na modificação da estrutura enzimática para regular a especificidade pelo substrato, ao invés de diminuir ΔG_{enz}^\ddagger .

Efeitos quânticos e dinâmicos

A dinâmica enzimática também foi proposta recentemente como um possível mecanismo catalítico^{2,8}.

Movimentações de larga escala na estrutura enzimática como torção de sub-unidades, modos vibracionais de baixa frequência e reposicionamento de grupos protéicos causados, por exemplo, pela ligação do substrato ou de um regulador alostérico, são alterações conformacionais na enzima responsáveis pelo correto posicionamento dos grupos catalíticos. Se a amostragem conformacional é feita corretamente durante as simulações computacionais, estes efeitos, chamados de reorganização da estrutura enzimática²³, são incorporados normalmente^{18,21,24} e não representam um mecanismo catalítico em particular^{8,41}.

A liberdade conformacional não deve ser confundida com as flutuações dinâmicas da estrutura protéica, principalmente as vibrações que amplificam efeitos quânticos como tunelamento^{47,48}. A teoria generalizada do estado de transição^{3,49} pode ser usada para racionalizar estes efeitos. Segundo a Equação:

$$k(T) = \tau(T) (k_B T/h) \exp [-\Delta G^\ddagger/RT] \quad (7)$$

onde R , h e k_B são constantes, e T é a temperatura, a constante de velocidade da reação, $k(T)$, pode ser elevada pelo aumento do coeficiente de transmissão, $\tau(T)$, ou pela diminuição da barreira de reação, ΔG^\ddagger .

As mudanças conformacionais descritas acima alteram apenas ΔG^\ddagger . Já o fator de transmissão pode ser alterado pela dinâmica do sistema reativo, onde $\tau(T) \leq 1$, ou seja, uma trajetória de reação pode ultrapassar o TS, mas ser improdutiva e retornar aos reagentes.

Além de um recruzamento não-reativo clássico, $\tau(T)$ pode ser alterado por efeitos de solvatação de não-equilíbrio (por exemplo, proveniente de uma distribuição configuracional dos reagentes fora do equilíbrio) e por efeitos quânticos como tunelamento^{2,8,41,43,50}. Os efeitos de recruzamento e de não-equilíbrio podem apenas tornar $\tau(T)$ menor que um e, usualmente, já são pequenos em solução aquosa. Neste meio, $\tau(T)$ é quase unitário². Assim, pouca ou nenhuma vantagem catalítica pode ser explorada por enzimas buscando minimizar estes efeitos, de acordo com resultados observados em simulações computacionais^{2,8}.

Já o tunelamento pode fenomenologicamente resultar em $\tau(T) > 1$, ou seja, pode amplificar a constante de velocidade sem alterar o termo exponencial na Equação 7. Contribuições de até 3 ordens de magnitude para o aumento da velocidade de reações enzimáticas foram atribuídas à dinâmica da proteína, ou seja, às vibrações que amplificam o tunelamento em comparação com a reação em solução, nos sistemas em que uma transferência de hidrogênio (tanto nas formas H^+ , H neutro e H^-) é determinante da velocidade de reação^{8,43,50}. As desidrogenases de álcool⁴⁷ e de lactato⁴⁸ são exemplos de sistemas em que este mecanismo catalítico é observado.

CONCLUSÃO

Diversas teorias e hipóteses já foram propostas para explicar porque enzimas são catalisadores de extrema eficiência. Neste texto apresentamos uma perspectiva computacional destas propostas, principalmente daquelas que foram testadas quantitativamente e comparadas com experimentos.

A utilização de ciclos termodinâmicos e de corretas reações de referência é essencial para racionalização das interações e dos mecanismos catalíticos. Sem dúvida, cada enzima utiliza uma combinação das forças e interações revisadas aqui, dependendo da reação química catalisada. Contudo, a espécie que sofre influência determinante do ambiente enzimático é o estado de transição. Este é estabilizado principalmente por interações eletrostáticas geradas pelo sítio ativo e pela estrutura enzimática pré-organizados. Em média, reduções de cerca de 17 kcal/mol na energia de ativação podem ser obtidas por este mecanismo catalítico.

O aumento da fração molar de conformações próxima ao ataque (NACs) e a desestabilização do substrato contribuem em escala bem menor (no máximo 5 kcal/mol) para reduções na energia de ativação enzimática. A desestabilização é viável principalmente pelo modelo do sítio dividido. A catálise covalente, a catálise ácido-base geral e efeitos quânticos e dinâmicos também podem contribuir na mesma magnitude (5 kcal/mol cada) para o aumento da velocidade das reações enzimáticas em que intermediários são formados ou hidrogênio seja transferido, respectivamente.

Já efeitos entrópicos e impedimento estérico, antes postulados como importantes mecanismos catalíticos, contribuem, na verdade, com menos que 3 kcal/mol para reduções na energia de ativação enzimática e têm pouca influência sobre os aumentos de velocidade observados.

Simulações computacionais são, portanto, ferramentas bastante poderosas na investigação da atividade enzimática e na elucidação do poder catalítico destas macromoléculas biológicas.

AGRADECIMENTOS

O autor gostaria de agradecer as bolsas financiadas pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), nos projetos 99/07688-9 e 2005/03995-7.

REFERÊNCIAS

- Lad, C.; Williams, N. H.; Wolfenden, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5607.
- Benkovic, S. J.; Hammes-Schiffer, S.; *Science* **2003**, *301*, 1196.
- Billing, G. D.; Mikkelsen, V.; *Introduction to Molecular Dynamics and Chemical Kinetics*, Wiley: New York, 1st ed., 1996.
- Pauling, L.; *Nature* **1948**, *161*, 707.
- Jencks, W. P.; *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover: New York, 1st ed., 1987.
- Menger, F. M.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 5368.
- Bruice, T. C.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3119.
- Garcia-Viloca, M.; Gao, J.; Karplus, M.; Truhlar, D. G.; *Science* **2004**, *303*, 186.
- Warshel, A.; Sharma, P. K.; Kato, M.; Xiang, Y.; Liu, H.; Olsson, M. H. M.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3210.
- Bruice, T. C.; *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 139.
- Arantes, G. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2004.
- Fersht, A.; *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman: New York, 1st ed., 1999.
- Voet, D.; Voet, J.; *Biochemistry*, Wiley: New York, 2nd ed., 1995.
- Rauschel, F. M.; Thoden, J. B.; Holden, H. M.; *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 539.
- Arantes, G. M.; *Biochem. J.* **2006**, *399*, 343.
- Arantes, G. M.; Chaimovich, H.; *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5625.
- Warshel, A.; Florián, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 5950.
- Warshel, A.; *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*, Wiley: New York, 1st ed., 1991.
- Kollman, P. A.; Kuhn, B.; Donini, O.; Perakyla, M.; Stanton, R.; Bakowies, D.; *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 72.
- Roca, M.; Martí, S.; Andrés, J.; Moliner, V.; Tunón, I.; Bertrán, J.; Williams, I. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7726.
- Field, M. J.; *J. Comp. Chem.* **2002**, *23*, 48.
- Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Hellinga, H. W.; *Science* **2004**, *304*, 1967.
- Kollman, P. A.; Kuhn, B.; Perakyla, M.; *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1537.
- Åqvist, J.; Warshel, A.; *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2523.
- Menger, F. M.; *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 128.
- Leatherbarrow, R. J.; Fersht, A. R.; Winter, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 7840.
- Warshel, A.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27035.
- Gao, J.; Ma, S.; Major, D. T.; Nam, K.; Pu, J.; Truhlar, D. G.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3188.
- Bruice, T. C.; Lightstone, F. C.; *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 127.
- Kraut, D. A.; Strajbl, M.; Villá, J.; Warshel, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4097.
- Albery, W. J.; Knowles, J. R.; *Biochemistry* **1976**, *15*, 5631.
- Rudolph, J.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 14613.
- Kraut, D. A.; Carroll, K. S.; Herschlag, D.; *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 517.
- Gregersen, B. A.; Lopez, X.; York, D. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7178.
- Thain, E. M.; *J. Chem. Soc.* **1957**, 4694.
- Zhang, X.; Houk, K. N.; *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 379.
- Hammes, G. G.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 8221.
- Arantes, G. M.; Loos, M.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 347.
- Jackson, M. D.; Denu, J. M.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2313.
- Gilson, M. K.; Honig, B. H.; *Nature* **1987**, *330*, 84.
- Villá, J.; Warshel, A.; *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7887.
- Menegon, G.; Loos, M.; Chaimovich, H.; *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9078.
- Kohen, A.; Klinman, J. P.; *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 397.
- Ayala, P.; Schlegel, H. B.; *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 2314.
- Villá, J.; Strajbl, M.; Glennon, T. M.; Sham, Y. Y.; Chu, Z. T.; Warshel, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 11899.
- Yu, Y. B.; *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 1721.
- Nagel, Z. D.; Klinman, J. P.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3095.
- Antoniou, D.; Basner, J.; Nunez, S.; Schwartz, S. D.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3170.
- Truhlar, D. G.; Garrett, B. C.; Klippenstein, S. J.; *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12771.
- Bala, P.; Grochowski, P.; Nowinski, K.; Lesyng, B.; McCammon, J. A.; *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1253.