

FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS DA HEREDITARIEDADE

III — Modo de ação do Material Hereditário

Paulo A. Otto

a) Enzimas

Enquanto nos seres inanimados do meio ambiente são encontradas substâncias de organização relativamente simples, os seres vivos caracterizam-se fundamentalmente por uma composição química complexa, com substâncias estruturalmente muito diferenciadas.

Parte dessas substâncias recebem os seres vivos de outros seres vivos anteriores e semelhantes e parte do meio ambiente.

A integração de substâncias do meio ambiente exige uma série de transformações de natureza química, e essas transformações são conseguidas através da intervenção de biocatalizadores de natureza protéica, as enzimas.

O organismo ou a célula, tendo, através do seu DNA, um controle sobre as enzimas, teria um controle sobre si mesmo, já que com elas guiaria as diversas substâncias nas direções desejadas (metabolismo).

A importância da relação entre os gens e as enzimas é um fato estabelecido já há mais de 25 anos, quando Beadle & Tatum, em 1941, propuseram a célebre teoria "one gene — one enzyme", na qual admitiam, baseados em estudos com o fungo *Neurospora crassa*, que cada gen tem a função de determinar o aparecimento de uma enzima específica. Este fato, aliás, já tinha sido sugerido pelos trabalhos de vários autores (Garrod, 1908; Troland, 1917; Wright, 1927; Haldane, 1937). No entanto como será visto na presente revisão nem todas as proteínas determinadas pelos gens são enzimas (fato reconhecido pelos autores da teoria "um gen — uma enzima" não muito tempo após o seu enunciado).

Apesar de a finalidade dos gens não ser unicamente a direção da síntese das enzimas, não há dúvida de que estas são as substâncias que, juntamente com o DNA, melhor servem para caracterizar o organismo vivo (Fig. 16):

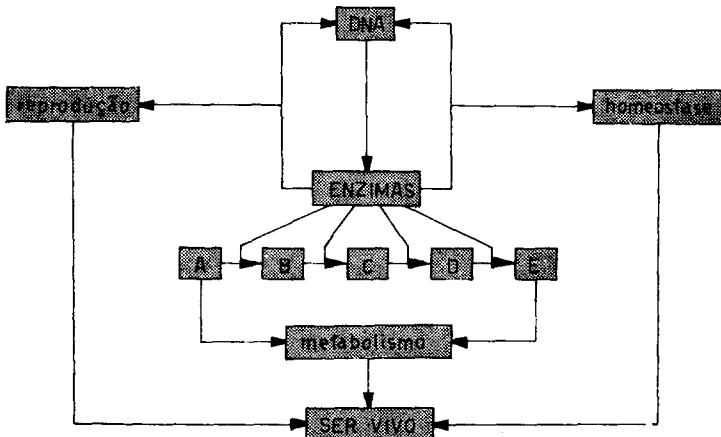


Fig. 16

(*) — Trabalho do Serviço de Pesquisas e Experimentação do Instituto Nacional do Câncer — Seção de Imunologia e Seleção de Animais de Laboratório (Chefe: Dr. Sylvio Thales Tôrres).

(**) — Professor Conferencista de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.G. — Médico do Serviço de Pediatria do Hospital de Aeronáutica do Galeão.

As enzimas, como tôdas as proteínas, podem ser consideradas copolímeros resultantes da condensação de aminoácidos nos organismos vivos (Fig. 17):

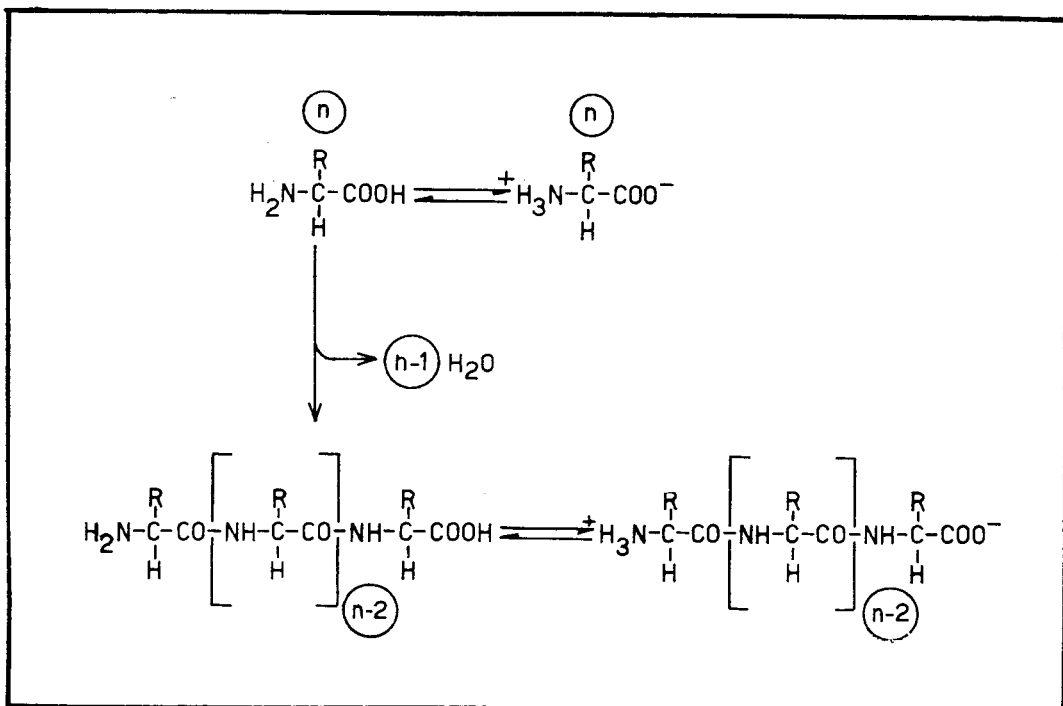


Fig. 17

Nesse esquema que representa a condensação de aminoácidos resultando na formação de uma cadeia polipeptídica, $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$ é um resíduo de aminoácido e o resíduo 1 ($\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{CO}-$) é, por convenção, o resíduo N-terminal (grupoamínico livre), enquanto o resíduo n ($-\text{NH}-\text{CHR}-\text{COOH}$) é o resíduo C-terminal (grupoamínico livre). Em algumas proteínas, como a ovoalbumina, a cadeia polipeptídica pode ser fechada (cíclica) devido à condensação do aminoácido N-terminal com o aminoácido C-terminal. Nesse mesmo esquema, $-\text{CO}-\text{NH}-$ representa a ligação carbamínica ou peptídica, que resulta da condensação de um grupoamínico de um aminoácido com um grupoamínico de outro aminoácido, e que constitui uma das principais características das cadeias protéicas.

O peso molecular das proteínas, se bem que variado, mostra-se geralmente muito elevado: a enzima ribonuclease pancreática bovina apresenta um peso molecular de 13.683 (equivale a 124 resíduos de ami-

noácidos); a enzima triptofa-sintetase do fungo *Neurospora crassa* possui um peso molecular de aproximadamente 105.000 (contém cerca de 950 resíduos de aminoácidos).

Numerosos aminoácidos têm sido isolados de diversos seres vivos, porém somente cerca de 20 deles são encontrados na maioria das proteínas animais e vegetais:

I) Monoamino-monocarboxílicos

a) Alifáticos simples

Glicina ou ácido amino-acético (gly)

L-alanina ou ácido alfa-amino-propiónico (ala)

L-valina ou ácido alfa-amino-isovalérico (val)

L-isoleucina ou ácido alfa-amino-beta-metil-n-valérico (ileu)

L-leucina ou ácido alfa-amino-isocapróico (leu)

L-serina ou ácido alfa-amino-beta-hidroxi-propiónico (ser)

L-treonina ou ácido alfa-amino-beta hidroxi-butírico (thr)

- b) Alifáticos sulfurados
L-cisteína ou beta-tiol-alanina (cys)
L-metionina ou ácido alfa-amino-gama-metil-tiol-n-butírico (met)
- c) Homocíclicos aromáticos
L-fenilalanina ou ácido alfa-amino-beta-fenil-propiónico (phe)
L-tirosina ou para-hidroxi-fenilalanina (tyr)
- d) Heterocíclicos
L-triptofano ou indol-alanina (try)
L-histidina ou imidazol-alanina (his)
- II) Monoamino-dicarboxílicos alifáticos simples
Ácido L-aspartico ou ácido alfa-amino-succínico (asp)
Ácido L-glutâmico ou ácido alfa-amino-glutárico (glu)
- III) Amidas de monoamino-dicarboxílicos alifáticos simples
L-asparagina ou amida do ácido L-aspartico (aspN)
L-glutamina ou amida do ácido L-glutâmico (gluN)
- IV) Diamino-monocarboxílicos alifáticos simples
L-lisina ou ácido alfa, épsilon-diamino-n-capróico (lys)
L-arginina ou ácido alfa-amino-delta-guanidin-n-valérico (arg)
- V) Monoimino-monocarboxílico heterocíclico
L-prolina ou ácido pirrolidin-alfa-carboxílico (pro)

Não foram incluídos nessa lista os aminoácidos cistina e hidroxiprolina, pelo fato de resultarem de transformações de resíduos de cisteína e de prolina após a incorporação destes às cadeias polipeptídicas.

Quanto à composição das proteínas, em termos de resíduos de aminoácidos, esta é bastante variável: em algumas proteínas, alguns aminoácidos ocorrem com frequência baixa ou mesmo nula, em outras, os mesmos atingem cifras consideráveis.

As proteínas possuem uma organização complicada, que aqui somente será anali-

sada superficialmente. Essa organização pode ser distribuída em quatro níveis de complexificação estrutural crescente, as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária.

Dessas estruturas, a primeira (cadeia polipeptídica ou seqüência linear de aminoácidos) é a mais importante, já que é ela que, intrinsecamente, vai determinar todas as demais (extrinsecamente as estruturas secundária, terciária e quaternária podem ser modificadas por fatores físico-químicos ligados ao meio, como pH, temperatura, natureza do solvente, etc.). Além do mais é sobre a estrutura primária das proteínas que, segundo tudo indica, o organismo vivo exerce influência genética, pois, como será visto com detalhes posteriormente, os ácidos nucleicos determinam a seqüência dos aminoácidos nas cadeias polipeptídicas. Na figura 18 tem-se a representação da estrutura primária de um segmento de uma proteína hipotética, onde são vistos, condensados, os 20 aminoácidos descritos anteriormente.

O método de eleição para a determinação da seqüência de aminoácidos numa cadeia polipeptídica consiste na cisão desta através de enzimas proteolíticas que atuam eletivamente em determinadas ligações peptídicas (por exemplo: pepsina, quimotripsina, tripsina) e, a seguir, numa dedução da seqüência dos aminoácidos a partir da análise dos peptídios obtidos por digestão enzimática.

O aminoácido N-terminal é determinado através da reação com o 2,4-dinitroflúor-benzeno (reativo de Sanger) e desta maneira obtém-se o sentido da cadeia (1→n).

Inúmeras proteínas já possuem a sua estrutura primária completamente decifrada: a insulina (Sanger), com 51 resíduos de aminoácidos; a ribonuclease (Stein & Moore), com 124 resíduos; a proteína do vírus do mosaico do tabaco (Fraenkel-Conrat & cols., Schramm & cols.), com 158 resíduos, etc.

Além da seqüência linear de aminoácidos, a estrutura primária compreende também as pontes de dissulfeto, ligações covalentes que se estabelecem entre dois resíduos de cisteína (cys) devido à oxida-

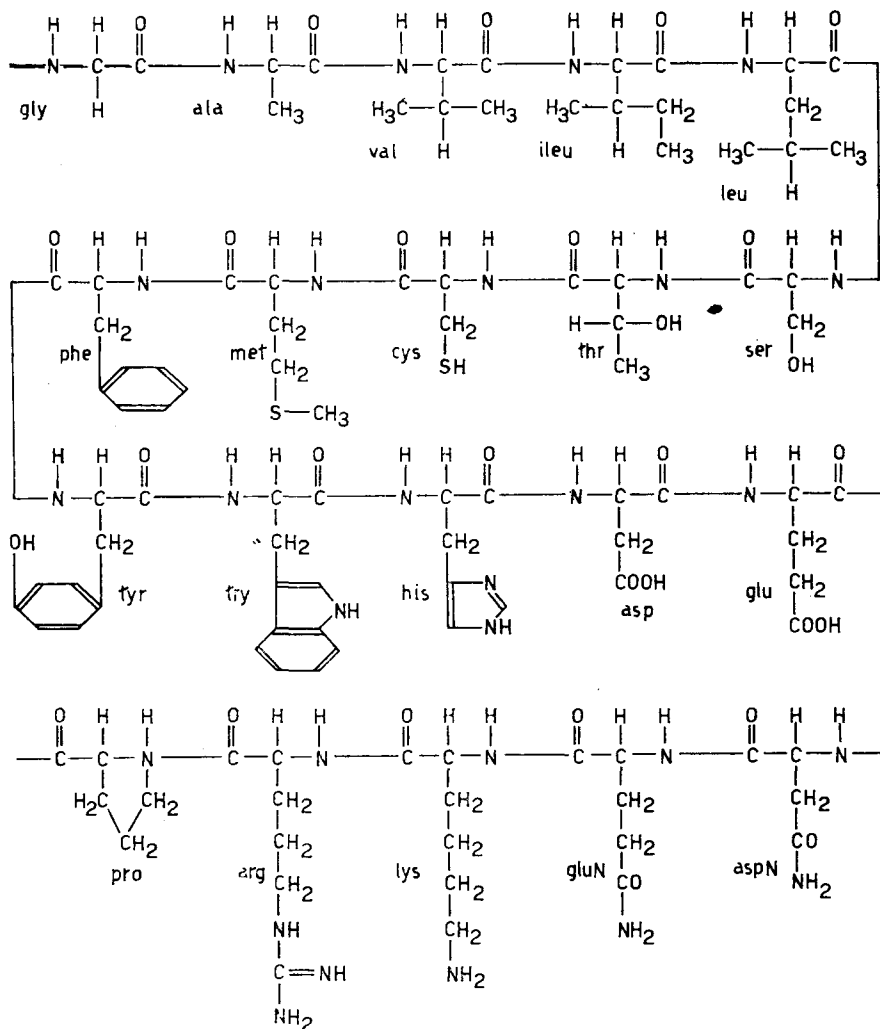


Fig. 18

ção (-2H) dos grupamentos sulfidrilicos dêstes.

As pontes de dissulfêto podem também se estabelecer entre dois resíduos de cisteína pertencentes cada um a uma ca-

deia polipeptídica. Assim, a estrutura primária da proteína insulina mostra que essa substância é formada por duas cadeias polipeptídicas (A e B) unidas por duas pontes de dissulfêto (Fig. 19):

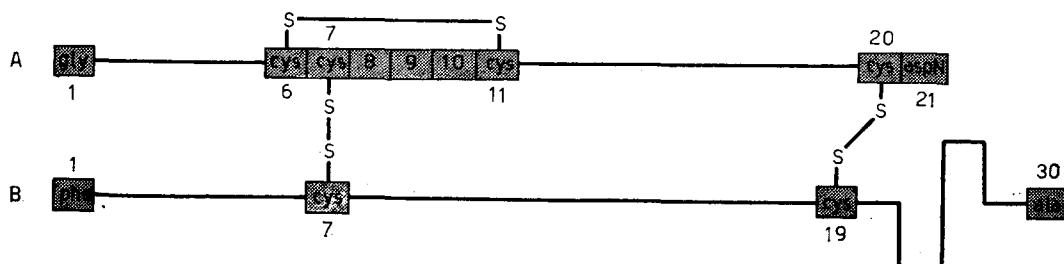


Fig. 19

A estrutura secundária das proteínas (Pauling & cols.) é a hélice alfa ("alpha-helix"), constituída fundamentalmente por ligações de ressonância que se estabelecem entre um átomo de hidrogênio de um grupamento amínico pertencente a um resíduo de aminoácido de posição (n) qualquer na cadeia polipeptídica com um átomo de oxigênio de um grupamento carboxílico de um resíduo de posição linear (n-4) e entre um átomo de oxigênio do grupamento carboxílico do resíduo (n) com um átomo de hidrogênio do grupamento amínico do resíduo (n+4).

Estas pontes de hidrogênio conferem à molécula protéica uma estrutura helicoidal (cada passo completo da hélice alfa contém 3,6 resíduos de aminoácidos) capaz de desviar a luz polarizada: a poliglicina, polímero artificial, desvia a luz polarizada, enquanto cada resíduo isolado de glicina não possui atividade óptica.

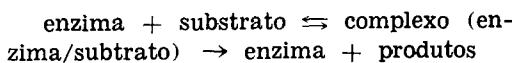
A estrutura terciária das proteínas é constituída por vários tipos de ligações, como, por exemplo, interações eletrostáticas (ligações iônicas), interações de Van der Waals (ligações de ressonância através de pontes de hidrogênio), interações hidrofóbicas apolares, etc., entre os resíduos de uma mesma cadeia polipeptídica.

A estrutura quaternária das proteínas compreende interações de vários tipos que se estabelecem entre duas ou mais cadeias polipeptídicas e que resultam, obviamente, num complexo ou agregado macromolecular de várias cadeias.

Além de sua função estrutural de estabilização, as estruturas secundária, terciária e quaternária, assim como as pontes de dissulfeto da estrutura primária, são de fundamental importância para a atividade biológica pois são elas que dispõem tridimensionalmente os centros ativos não só das enzimas como também de outras substâncias de natureza protéica com funções definidas e específicas.

Sem entrar em considerações sobre os inúmeros fatores de natureza física (temperatura, pH, etc.) ou de natureza química (cofatores como as vitaminas e as coenzimas, ativadores como ions metálicos Mg^{++} , controladores sistêmicos da atividade enzimática como os hormônios, etc.) que intervêm nos processos enzimáticos, só

será analisado rapidamente, na questão da especificidade catalítica das enzimas, o seu centro ativo, isto é, o conjunto de grupamentos essenciais de aminoácidos dispersos pela cadeia polipeptídica e dispostos numa ordem que é ditada pela estrutura tridimensional da molécula e que se ligam ao substrato, "enfraquecendo-o para que ele possa ser alterado", segundo a reação:



Têm sido apontados como elementos intimamente ligados aos processos de catalise os aminoácidos serina, lisina e histidina, sendo que a presença deste último como grupamento essencial dos centros ativos é fato indiscutível. Igualmente indispensáveis à atividade biológica das enzimas têm se revelado os resíduos de cisteína que, ligados dois a dois por pontes de dissulfeto, desempenham papel fundamental no dobramento funcional das moléculas protéicas.

Mutações de DNA, que se refletirão na molécula da proteína por alterações de sequência por meio de substituição, deleção ou acréscimo de aminoácidos, de uma maneira geral só terão importância (por exemplo, transformação de uma enzima em uma proteína desprovida de ação catalítica específica) quando incidirem sobre regiões correspondentes aos centros ativos ou quando, incidindo sobre regiões "inertes", provocarem um dobramento diferente da molécula em sua estrutura tridimensional (o que provocaria uma disposição espacial inoperante dos centros ativos). Alguns exemplos esclarecem sobremaneira este fato:

1) Smith & cols., já em 1957 (I.U.P.A.C., Paris) demonstraram que a enzima papaina do mamão (*Oarica papaya*) mantém ainda a sua atividade proteolítica característica mesmo após a retirada (por meio de hidrólise enzimática) de 70 dos 180 resíduos de aminoácidos que compõem a sua molécula.

2) A enzima triptofano-sintetase da bactéria *Escherichia coli* e a do fungo bactéria *Escherichia coli* e a do fungo so molecular semelhante (cerca de 105.000) e desempenham a mesma atividade cata-

lítica específica. No entanto, enquanto a enzima do cogumelo é formada somente por uma cadeia polipeptídica dobrada funcionalmente, a enzima bacteriana é formada por duas cadeias polipeptídicas independentes que formam, devido a forças de coesão quaternárias, um complexo macromolecular de duas cadeias. Admitese, portanto, que na bactéria perdeu-se uma região de aminoácidos sem importância na atividade catalítica específica da enzima e que está presente na proteína do fungo, sob o controle genético de uma porção de DNA denominada "região profunda". Diga-se de passagem, numerosas substituições de aminoácidos têm sido registradas em moléculas da enzima, sem que se observe a perda da especificidade catalítica desta. Calcula-se que cerca de 75% da molécula desta enzima seja inoperante ou silenciosa no processo da catalise.

3) Na molécula da insulina (que, embora não sendo uma enzima, mas um hormônio, tem uma ação sistêmica hipoglicemiante característica e específica) têm sido registradas várias substituições numa

parte não-funcional da cadeia A em vários mamíferos (consultar a fig. 19):

	posições na cadeia A		
	8	9	10
baleia	thr	ser	ileu
boi	ala	ser	val
carneiro	ala	gly	val
cavalo	thr	gly	ileu
porco	thr	ser	ileu

Proteínas biologicamente inativas podem, inversamente, transformar-se, por meio de mutações, em proteínas com funções biológicas definidas: graças a uma técnica sensível ("replica-plating"), Lederberg conseguiu determinar a ocorrência natural de mutações em cepas de bactérias *Escherichia coli* sensíveis ao antibiótico estreptomícina; essas mutações ocorrem numa frequência baixíssima ($1:10^7$) e conferem às bactérias a capacidade de inativar o antibiótico mediante uma enzima; logo, tem-se o caso de mutação de uma proteína (presumivelmente) pré-existente não-catalítica em enzima específica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BEADLE, G. W., — "Genes and Chemical Reactions in Neurospora", Science, 129: 1715-1719, 1959.
- 2 — BEADLE, G. W., TATUM, E. L., — "Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora", Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 27: 499-506, 1941.
- 3 — BONNER, D. M., MILLS, S. E., — "Hereditiy", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1964.
- 4 — BONNER, D. M., SUYAMA, Y., DEMOSS, J. A., — "Genetic Fine Structure and Enzyme Formation", Fed. Proc., 19: 926-930, 1960.
- 5 — DESNUELLE, P., — "The General Chemistry of Amino Acids and Peptides", in Neurath, H., Bailey, K., "The Proteins", Academic Press, Inc., New York, 1953, Vol. I-A, Pp. 87-180.
- 6 — FRAENKEL-CONRAT, H., — "Vírus: Estrutura e Função no Limiar da Vida", Editora da Universidade de Brasília, 1966.
- 7 — HARTMAN, P. E., SUSKIND, S. R., — "Gene Action", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1965.
- 8 — HAUROWITZ, F., — "Chemistry and Biology of Proteins", Academic Press, Inc., New York, 1950.
- 9 — LEDERBERG, J., LEDERBERG, E. M., — "Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants", J. Bacteriol., 63: 399-406, 1952.
- 10 — LOW, B. W., — "The Structure and Configuration of Amino Acids, Peptides and Proteins", in Neurath, H., Bailey, K., "The Proteins", Academic Press, Inc., New York, 1953, Vol. I-A, Pp. 235-391.
- 11 — MCELROY, W. D., — "Cell Physiology and Biochemistry", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1965.
- 12 — RAW, I., COLLI, W., — "Fundamentos de Bioquímica", Editora da Universidade de Brasília, 1965, Vol. I.
- 13 — SMITH, E. L., HILL, R. L., KIMMEL, J. R., — "Some Studies on the Structure and Activity of Papain", in Neuberger, A., "Symposium on Protein Structure", Methuen & Co., Ltda., London, 1958, Pp. 182-207.
- 14 — TUPPY, H., — "Über die Artspezifität der Proteinstruktur", in Neuberger, A., "Symposium on Protein Structure", Methuen & Co., Ltda., London, 1958, Pp. 66-76.
- 15 — WEST, E. S., TODD, W. R., — "Textbook of Biochemistry", MacMillan, New York, 1953.