

Artigo

Mecanismo Catalítico e Estado de Protonação do Sítio Ativo de Aspartil Proteases Pepsina-Símiles

Sodero, A. C. R.; De Simone, S. G.; Silva-Jr, F. P.*

Rev. Virtual Quim., 2009, 1 (2), 128-137. Data de publicação na Web: 8 de abril de 2009

<http://www.uff.br/rvq>

Catalytic Mechanism and Protonation State of Pepsin-Like Aspartyl Protease Active Site

Abstract: Aspartyl proteases (APs) comprise a family of enzymes involved in numerous of biological processes, such as: regulation of blood pressure, amyloidosis, fungi sporulation and hemoglobin digestion by the parasites responsible for malaria and schistosomiasis. Generally, eukaryotic APs are monomeric and consist of a single polypeptide chain which forms two similar lobes, with the active site localized between them. This active site is composed by two conserved Asp-Thr-Gly sequences in all APs. The catalytic mechanisms current accepted for eukaryotic APs and some experimental evidences about the aspartate protonation, based on X-ray structures, NMR and neutron diffraction studies, are described in this review.

Keywords: aspartyl protease; catalytic mechanism; catalytic site

Resumo

As aspartil proteases (APs) compreendem uma família de enzimas envolvidas em numerosos processos biológicos, tais como: regulação da pressão arterial, doença amilóide, esporulação de fungos e digestão de hemoglobina pelos parasitos causadores da malária e da esquistossomose. Em geral, as APs de organismos eucarióticos são monoméricas e consistem de uma única cadeia polipeptídica que forma dois domínios semelhantes, com o sítio ativo localizado entre eles. Em todas as APs, este sítio ativo encontra-se como duas seqüências conservadas de Asp-Thr-Gly. Os mecanismos catalíticos atualmente aceitos para APs de eucariotos e algumas evidências experimentais sobre a protonação dos resíduos de aspartato catalítico, baseadas em estruturas de raios-X e estudos de RMN e de difração de nêutrons, estão descritos nesta revisão.



Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro - RJ

palavras-chave: aspartil protease; mecanismo catalítico; sítio catalítico

*Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365, Pavilhão Leonidas Deane, Sala 309, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

E-mail para correspondência: floriano@ioc.fiocruz.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20090015](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090015)

Mecanismo Catalítico e Estado de Protonação do Sítio Ativo de Aspartil Proteases Pepsina-Símiles

Ana C. R. Sodero, Salvatore G. De Simone, Floriano P. Silva-Jr*

Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Leonidas Deanne, Sala 319, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
* floriano@ioc.fiocruz.br

Recebido em 10 de fevereiro de 2009

1. Introdução
2. Estudos de reatividade e difração de raios-X de complexos enzima-inibidor
3. Estruturas de raios-X de alta resolução atômica
4. Evidências experimentais baseadas em estudos de RMN
5. Estudos de difração de nêutrons
6. Ligações de hidrogênio de baixa barreira
7. Conclusões

1. Introdução

Aspartil proteases (APs) pertencem ao clã AA das peptidases,¹ sendo caracterizadas por empregarem uma molécula de água, ativada por dois resíduos de aspartato, como nucleófilo no ataque à ligação peptídica. São todas endopeptidases e são encontradas em organismos tão diversos quanto vertebrados, plantas e vírus. As APs da família A1 do clã AA são homólogas à pepsina, a qual é amplamente conhecida por seu papel na digestão de proteínas de alimentos no estômago de vertebrados e por ser a segunda enzima a ter sido cristalizada.² A grande maioria das APs pepsina-símile apresenta melhor atividade catalítica em pH ácido, com exceção da renina.^{1,3} As enzimas pepsina-símile estão envolvidas em um grande número de processos biológicos, como na regulação da pressão arterial, doença amilóide, esporulação de fungos e na digestão de hemoglobina pelos parasitos causadores da malária e da esquistossomose. Por este motivo, muitas destas enzimas são atualmente consideradas alvos de desenho de fármacos.

Grande parte das aspartil proteases de eucariotos apresenta uma única cadeia polipeptídica que forma dois domínios com enovelamentos semelhantes. O sítio catalítico está localizado na junção dos dois domínios e contém dois resíduos de ácido aspártico (Asp33 e 215, numeração da pepsina), um em cada domínio da proteína, que são mantidos coplanares por uma rede de ligações de hidrogênio conhecida como *fireman's grip*, envolvendo as cadeias principais e laterais de resíduos vizinhos bastante conservados através da família A1.

Já é bem estabelecido que outro membro essencial do sítio ativo é uma molécula de água ligada às carboxilas ativas, sendo uma característica fundamental de todas as enzimas semelhantes à pepsina, seus complexos com inibidores e zimogênios.^{3,4} Por outro lado, o estado de protonação dos resíduos catalíticos ainda é controverso, apesar de seu conhecimento ser essencial para um melhor entendimento do mecanismo catalítico desta importante classe de enzimas.

Nesta revisão, faremos inicialmente um breve resumo dos estudos de cristalografia de raios-X que

levaram à proposta atualmente aceita para o mecanismo catalítico de APs de organismos eucariotos. Em seguida, aprofundaremos a discussão sobre a protonação dos resíduos de aspartato

catalíticos, baseados em estruturas de raios-X de alta resolução e RMN, incluindo evidências experimentais mais recentes provenientes de estudos de difração de nêutrons.

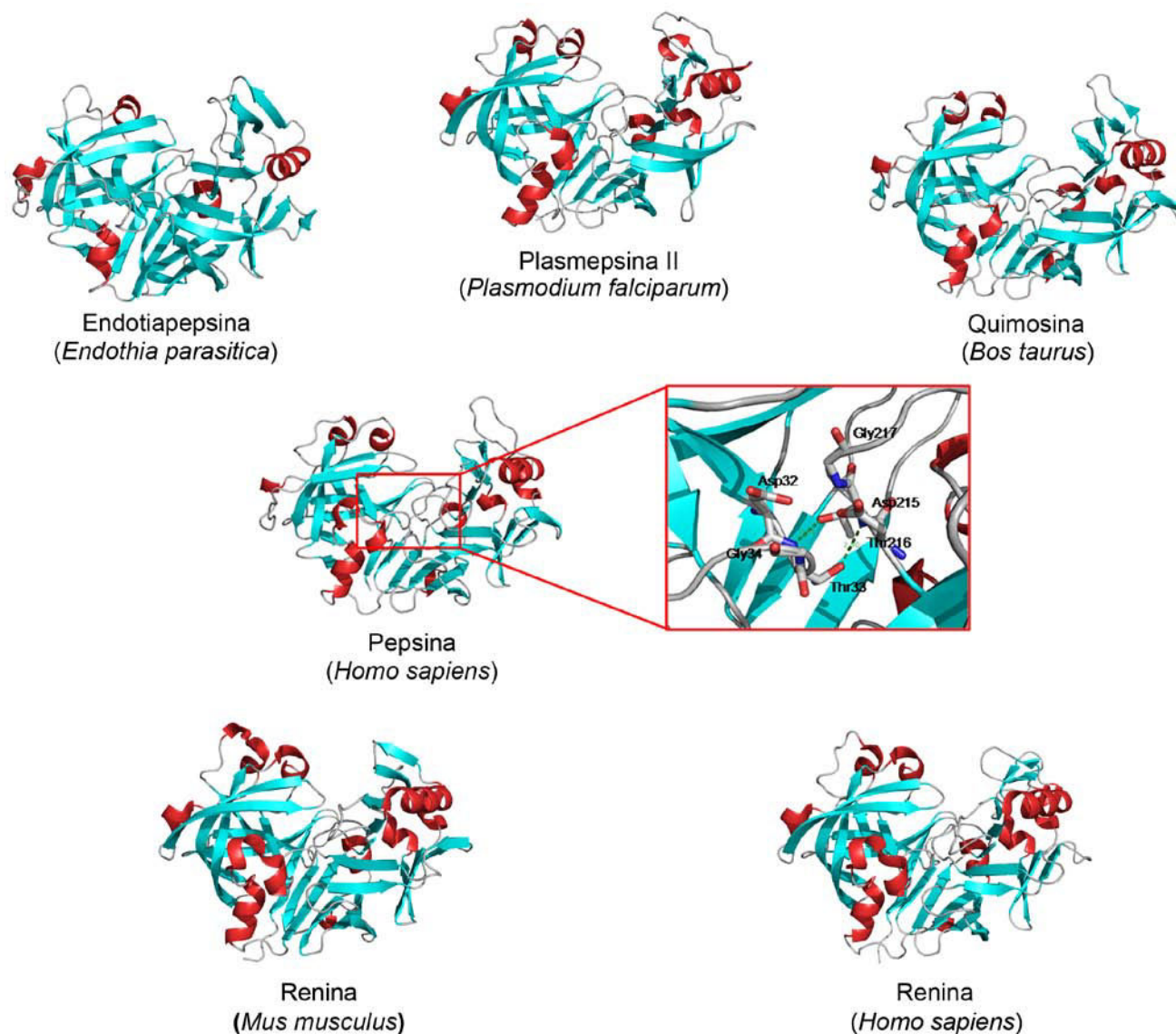


Figura 1. Exemplos de estruturas obtidas por difração de raios-X de aspartil proteases de eucariotos: endotiapepsina (código PDB 1GVU), plasmepsina II (código PDB 1LF3), quimosina (código PDB 3CMS), renina de camundongo (código PDB 2SMR) e renina humana (código PDB 2I4Q). Em destaque na estrutura da pepsina humana (código PDB 1PSO), o sítio catalítico conservado dessa família de enzimas (fonte: PDB, *Protein Data Bank*)

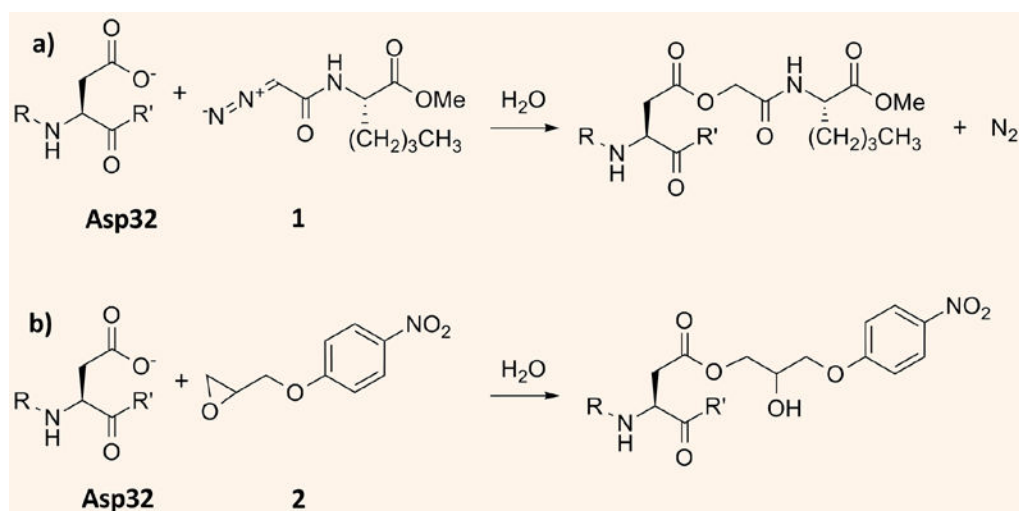
2. Estudos de reatividade e difração de raios-X de complexos enzima-inibidor

Os resíduos de ácido aspártico pertencentes ao sítio catalítico de aspartil proteases foram originalmente identificados pela reação com éster metílico de diazoacetilnorleucina ou DAN⁵ (**1**, Esquema 1) e com 1,2-epóxi-3-(*p*-nitrofenoxi)propano ou EPNP⁶ (**2**, Esquema 1).

Todas as enzimas da família A1 são inibidas por um peptídeo microbiano denominado pepstatina.^{7,9} Este inibidor, inicialmente isolado de actinomicetos por Umezawa e colaboradores em 1970,¹⁰ consiste de um pentapeptídeo hidrofóbico que contém duas cópias de um aminoácido não natural, denominado estatina (Sta). Este β -hidróxi- γ -aminoácido foi identificado como a porção estrutural responsável pela ação biológica da pepstatina.^{11,12} A hidroxila do primeiro resíduo de estatina liga-se entre os átomos de

oxigênio $\delta 2$ de ambos resíduos de aspartato (33 e 215), substituindo efetivamente a molécula de água

observada nesta posição das enzimas nativas.



Esquema 1. Identificação dos resíduos de ácido aspártico do sítio catalítico de aspartil proteases: a) reação com éster metílico de diazoacetilnorleucina ou DAN (**1**)⁵ e b) reação com 1,2-epóxi-3-(*p*-nitrofenóxi)propano ou EPNP (**2**)⁶

Sabe-se também que inibidores oligopeptídicos de aspartil proteases se ligam ao sítio ativo em conformações estendidas com 8-10 resíduos de aminoácidos ocupando o sítio ativo.¹³ Os inibidores que apresentam maior afinidade pelo sítio ativo são aqueles que possuem uma ou duas hidroxilas capazes de mimetizar o arranjo tetraédrico do estado de transição (Figura 2). Uma das hidroxilas interage através de uma ligação de hidrogênio com ambos os aspartatos catalíticos na mesma posição que uma molécula de solvente na enzima nativa,¹⁴⁻¹⁶ e a maioria dos análogos do estado de transição (*e.g.* estatina) mimetiza este arranjo.¹⁷

Diversos trabalhos utilizaram a ligação deste tipo de inibidor, também conhecido como isóstero do estado de transição (IET), para uma variedade de aspartil proteases como modelo para o estado de transição tetraédrico e para auxiliar na elucidação do mecanismo catalítico.^{9,17-24} Alguns exemplos clássicos de IETs que foram desenvolvidos como inibidores da renina estão ilustrados na Figura 2. Todas as estruturas mimetizam o intermediário tetraédrico que ocorre durante a hidrólise de um dipeptídeo. No caso da estatina, há um encurtamento de um átomo de carbono na cadeia principal em relação ao estado de transição. Isto faz com que as demais cadeias laterais do inibidor sofram um deslocamento de aproximadamente 1,5-2,0 Å em relação às posições esperadas para a porção C-terminal do inibidor (*e.g.*, P1'-P4').

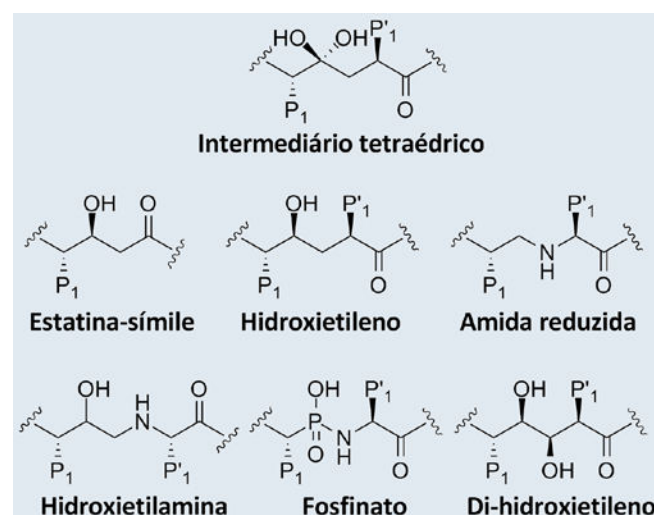


Figura 2. Exemplos de isósteros de estado de transição (IET), que mimetizam o intermediário tetraédrico formado na hidrólise da ligação peptídica por aspartil proteases

Importantes contribuições para a elucidação do mecanismo catalítico de APs surgiram da série de inibidores baseados no cerne difluoroestatonato [StoF₂ = ácido (*S*)-4-amino-2,2-difluoro-3-oxo-6-metil-heptanóico] sintetizados pelo grupo de Daniel H. Rich.²⁵ Previamente, Rich e seus colaboradores haviam observado que a estatona **4** é menos potente que o derivado de estatina **3** na inibição da pepsina suína (Figura 3). Posteriormente, através da elucidação estrutural da ligação de difluoroestatonatos com a penicilopepsina²⁶ foi demonstrado que a causa

destes inibidores (e.g. **7**) serem cerca de 50 vezes mais potentes do que estatonas e dez vezes mais potentes que a respectiva estatina, residia na maior facilidade de formação do hidrato **8**. Estes hidratos (**5** e **8**) funcionam como perfeitos análogos do estado de transição, proporcionando alta afinidade de ligação às APs.

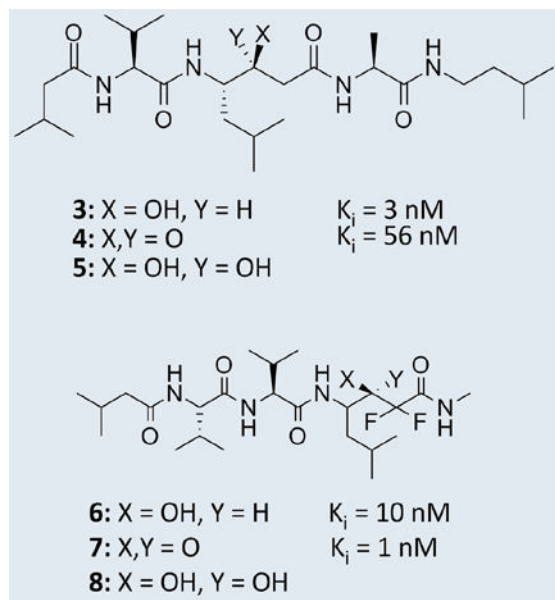


Figura 3. Estatinas, estatonas e derivados fluorados com suas respectivas constantes de inibição (K_i) contra pepsina suína (**3** e **4**) e penicilopepsina (**6** e **7**)^{25,26}

Em 1992, Veerapandian e colaboradores¹⁸ propuseram um mecanismo de ação de aspartil proteases (Figura 5), baseando-se na estrutura cristalográfica da endotiapepsina complexada a IETs, como a substância CP-81292 (**9**, Figura 4).

Tanto Veerapandian e colaboradores¹⁸ quanto Bailey & Cooper (1994)²⁷ demonstraram que a hidroxila presente neste inibidor e em inibidores semelhantes substitui a molécula de água encontrada no sítio catalítico da enzima livre.

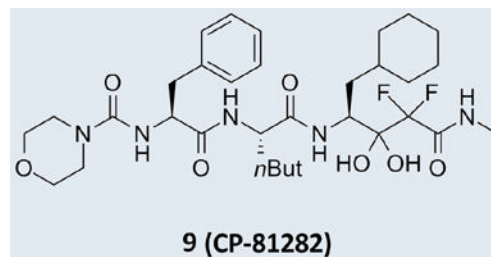


Figura 4. Estrutura de CP-81292

A primeira etapa do mecanismo proposto inicia-se com o ataque nucleofílico da água à carbonila da ligação peptídica do substrato (Figura 5). Este ataque é acompanhado por um rearranjo do próton carboxílico do Asp33 com o oxigênio da carbonila do substrato e do ataque ao próton da água pelo oxigênio da carboxila do resíduo Asp215, formando um intermediário tetraédrico.

Na segunda etapa, o intermediário *gem*-diolamina é formado pela inversão do nitrogênio e rotação de 60° da ligação C–N, para que o mesmo fique exposto para a subsequente protonação pelo Asp215 agora protonado. Este mecanismo¹⁸ sugere que o estado de transição é estabilizado pela carga negativa do resíduo de Asp33, baseando-se na capacidade em formar ligação hidrogênio quando comparado ao resíduo de Asp215 em complexo com o intermediário *gem*-diolamina.

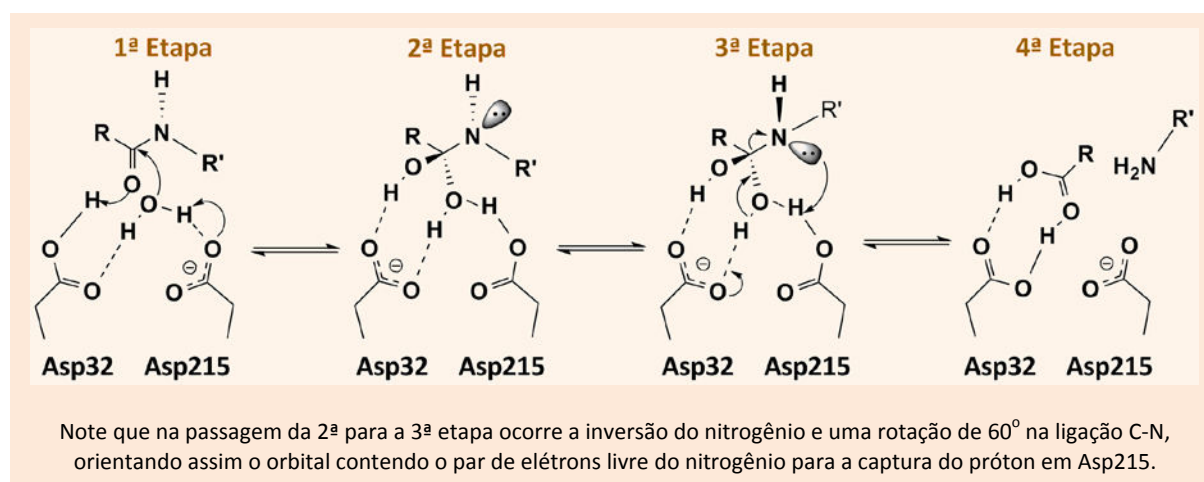


Figura 5. Mecanismo catalítico de aspartil proteases proposto por Veerapandian et al. (1992)¹⁸

O último passo consiste na protonação do nitrogênio do substrato, acompanhada pelo rearranjo de um dos prótons da hidroxila do intermediário *gem*-diolamina para o carboxilato do Asp33 e quebra da ligação C–N do intermediário. O produto ácido e a amina são formados e a configuração inicial do centro catalítico é restaurada, onde o Asp33 está protonado e o Asp215 está dissociado.

Na faixa de pH ótimo dessas enzimas é esperado que os resíduos de aspartato compartilhem uma única carga negativa.²⁸ O mecanismo apresentado acima pressupõe que o resíduo Asp215 (que age como uma base) deve estar carregado negativamente, enquanto o Asp33 (que age como um ácido) deve estar protonado.¹⁸ Adicionalmente, um importante papel dos resíduos adjacentes ao centro catalítico é preservar este estado dos ácidos aspárticos.⁴

Rodriguez e colaboradores²⁹ realizaram um estudo com um substrato peptídico de HIV-1 protease (Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂) e propuseram um mecanismo químico semelhante ao descrito por Veerapandian e colaboradores.¹⁸ Os resultados mostraram coerência com os dados de cristalografia e dados cinéticos da enzima.^{30,31} Durante a ligação do substrato, o resíduo de Asp25 interage por ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila do substrato, tornando o nitrogênio da prolina carregado. Com isso, o carbono da carbonila estará acentuadamente eletrofílico para então sofrer o ataque da molécula de água. Ou seja, a transferência do próton ocorre do aspartato protonado para o oxigênio da carbonila antes do ataque nucleofílico da água, gerando uma amida *O*-protonada.²⁹ Além disso, os autores sugerem a existência de uma ligação de hidrogênio de baixa barreira (LBHB, do inglês *Low Barrier Hydrogen Bond*; ver item 6) para a ligação O–H–O entre a carbonila e o Asp25.

Também foi proposto por Pearl & Blundell (1984),³ através de estudos de cristalografia da endotiapepsina, que um próton é partilhado entre os ácidos aspárticos catalíticos, com a carga negativa deslocalizada em ambos os carboxilatos. Contudo, quando o substrato se liga à enzima, a simetria local é quebrada, causando a localização preferencial do próton em um dos aspartatos catalíticos, o qual sofre uma rotação e produz uma ligação hidrogênio com a carbonila do substrato peptídico durante a reação.²⁴

Entretanto, os átomos de hidrogênio não podem ser localizados por análises ordinárias de estruturas obtidas por difração raios-X de proteínas. Dessa forma, embora os mecanismos descritos baseados em estruturas cristalográficas fossem consistentes em termos gerais, faltavam evidências experimentais que

comprovassem o estado de protonação dos grupos do sítio ativo. Contudo, como veremos a seguir, a localização dos átomos de hidrogênio no sítio catalítico de APs pôde ser inferida por estudos de criocristalografia de raios-X para regiões particularmente bem ordenadas das cadeias principais e das cadeias laterais.¹⁷

3. Estruturas de raios-X de alta resolução

Uma das características principais do mecanismo proposto por Veerapandian *et al.* (1992)¹⁸ é o estado de protonação dos resíduos de ácido aspártico do sítio catalítico ligados ao intermediário tetraédrico. A cristalografia de raios-X de alta resolução fornece uma alternativa para a definição dos estados de protonação de carboxilatos. Grupos carboxílicos neutros apresentam diferenças entre os comprimentos de ligação C–OH e C=O (1,33 e 1,21Å, respectivamente) enquanto carboxilatos ionizados apresentam comprimentos de ligação C–O iguais (1,28Å) devido à simetria deste grupo.^{13,17,28} Contudo, esta análise é complicada quando as regiões são desordenadas e apresentam altos fatores de temperatura. Além disso, os átomos de hidrogênio envolvidos em LBHBs estarão distribuídos entre duas posições, distantes *c.a.* 0,5 Å, podendo apresentar fatores de temperaturas aparentes altos.

Em 1987, foi proposto o envolvimento da transferência de um próton entre os oxigênios internos da carboxila da díade catalítica no mecanismo de catálise.³² Entretanto, estudos de estruturas de alta resolução da endotiapepsina complexada a análogos do estado de transição demonstraram que ambos os ácidos aspárticos catalíticos apresentam diferenças significativas no comprimento de ligação C–O, característico de grupos carboxílicos protonados. Este resultado indica apenas duas possíveis posições para o próton nos resíduos de ácido aspártico catalítico. Estes podem estar posicionados no oxigênio interno do Asp33 ou no oxigênio externo do Asp215. A presença do próton nas demais posições (*i.e.*, no oxigênio externo do Asp33 ou no oxigênio interno do Asp215) não é possível, pois estas estão muito distantes para formar ligações de hidrogênio com a hidroxila do inibidor.¹³

O refinamento da estrutura de três complexos com inibidores baseados na estrutura da estatina forneceram resultados sobre o comprimento de ligações muito semelhantes.¹³ Segundo os autores, o resíduo de Ser36 forma uma LBHB com o oxigênio externo de Asp33 (distância de *c.a.* 2,6 Å). Outra provável LBHB seria formada entre o oxigênio interno

de Asp33 e a hidroxila do grupo estatina do inibidor. Para uma maior discussão sobre LBHBs em aspartil proteases, ver item 6.

Além disso, outros estudos de resolução atômica da endotiapepsina sugeriram que a distribuição de carga no centro catalítico na ausência de substrato é simétrica - um efeito predito anteriormente por Pearl & Blundell em 1984,³ mas não demonstrado até então. Contudo, vale destacar que o comprimento de ligação pode ser influenciado pelos fatores de temperatura dos átomos envolvidos e, além disso, é improvável que ambos os ácidos aspárticos estejam protonados devido à proximidade entre os grupos carboxílicos.¹⁷ No complexo enzima-substrato, assume-se que os prótons da molécula de água são orientados em direção aos dois aspartatos de forma a que os pares de elétrons livres dos oxigênios da água estejam dirigidos para o substrato, favorecendo o ataque nucleofílico.²⁸

4. Evidências experimentais baseadas em estudos de RMN

Complementando os estudos de cristalografia de raios-X, importantes estudos de RMN foram realizados no intuito de elucidar o mecanismo catalítico de aspartil proteases. Em 1982, Rich *et al.*²³ utilizou um inibidor contendo uma função cetona como análoga do estado de transição e sugeriu que esta substância se liga à enzima de forma semelhante ao intermediário *gem*-diolamina. Além disso, outros estudos demonstraram que o mecanismo catalítico das aspartil proteases envolve um intermediário que se liga de forma não-covalente à enzima.³³

Em 1991, um estudo cinético utilizando RMN de ¹⁸O confirmou o mecanismo de múltiplas etapas e simultaneamente sugeriu que o último passo, isto é, a cisão da *gem*-diolamina seria a etapa lenta da reação.³¹

Cosgrove *et al.*³⁴ realizaram um estudo em 1997, envolvendo a pepsina e inibidores glioxais. Concluiu-se que o principal papel das ligações de hidrogênio para os intermediários tetraédricos em aspartil proteases é orientar corretamente este intermediário para que ocorra a reação. Os autores não encontraram evidências sobre a existência das LBHBs na formação dos complexos entre a enzima e os inibidores. Entretanto este assunto é bastante controverso. Coates *et al.*¹³ sugeriram a ocorrência de LBHBs através de estudos de ¹H-RMN. Para mais detalhes, ver item 6.

5. Estudos de difração de nêutrons

Cristalografia de proteínas por difração de nêutrons é realizada em amostras embebidas em D₂O para permitir a troca de hidrogênio por deutério. Este último pode ser observado na difração de nêutrons, indicando a posição do próton no complexo.¹⁵ Desta forma, esta técnica consiste em uma poderosa ferramenta na análise por raios-X, pois possibilita apontar detalhes nas posições dos átomos de hidrogênio, além de revelar a estrutura do solvente.^{17,35,36} Esta habilidade em visualizar e discriminar átomos de hidrogênio é de grande valor no estudo de mecanismos enzimáticos e o trabalho de Kossiakoff & Spencer (1980) foi pioneiro nesta área.³⁷

A primeira evidência experimental para o mecanismo de aspartil proteases surgiu através de estudos de difração de nêutrons com cristais de endotiapepsina ligada ao inibidor H271.^{17,38} Este inibidor apresenta um IET, o grupo hidróxietileno (-CH(OH)CH₂-), que mimetiza um dos grupamentos hidroxila do intermediário tetraédrico e substitui a molécula de água localizada no centro catalítico da enzima nativa.

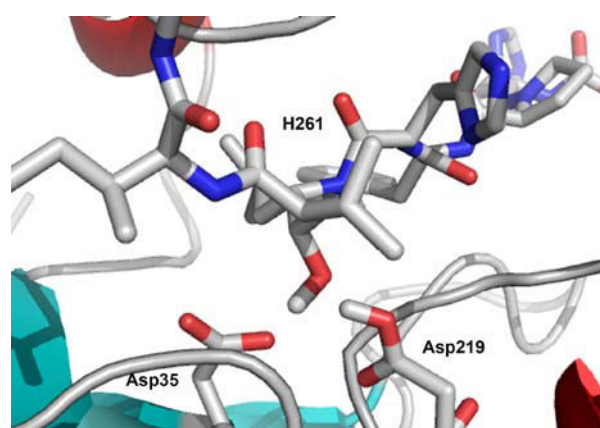


Figura 6. Estrutura do sítio catalítico da endotiapepsina complexada ao inibidor análogo ao estado de transição H271, obtida por difração de nêutrons (fonte: PDB, *Protein Data Bank*, código 1GKT)²⁸

O resultado da cristalografia por difração de nêutrons¹⁷ mostrou uma densidade diferente para os átomos de deutério na hidroxila do inibidor e no oxigênio externo da carboxila de Asp219 (Figura 6). A hidroxila parece formar uma ligação de hidrogênio curta com o oxigênio externo do resíduo de Asp219, indicando que o próton (assinalado pela posição do deutério) deve se localizar entre estes átomos, o que permitiria a formação de uma ligação de hidrogênio.¹⁷

Este estudo forneceu a primeira evidência experimental direta apoiando a distribuição de átomos de hidrogênio presentes no sítio catalítico da enzima no estado ligado ao intermediário tetraédrico, tal como aparece no mecanismo proposto por Veerapandian *et al.* (1992).¹⁸

Recentemente, Coates e colaboradores³⁹ realizaram um estudo de difração de nêutrons da endotiapepsina complexada ao inibidor *gem*-diol PD-136041, demonstrando que o resíduo de Asp215 apresenta o oxigênio externo protonado e que o Asp33 se encontra carregado e possivelmente fazendo uma LBHB com a hidroxila mais externa do grupamento *gem*-diol do inibidor.¹⁹ Este resultado confirma aqueles obtidos pelo autor em 2001.¹⁷

6. Ligações de hidrogênio de baixa barreira

Ligações de hidrogênio com distâncias menores que 2,5 Å são denominadas “Ligações de Hidrogênio de Baixa Barreira” (LBHB). A proximidade entre os átomos doadores e aceptores reduz a barreira de energia que normalmente previne a transferência do átomo de hidrogênio do grupo doador para o grupo receptor, o que facilita a troca rápida do próton entre esses grupos.^{40,41} Duas características peculiares distinguem as LBHB das ligações de hidrogênio normais: a curta distância entre grupos doadores e aceptores, conforme determinada por cristalografia de raios-X⁴⁰ e o sinal típico detectado pelo ¹H-RMN entre 16 e 21ppm.^{13,28}

Com base no conceito de LBHB, Northrop⁴² propôs um mecanismo catalítico para APs cuja principal característica é a presença de estrutura cíclica de 10 membros envolvendo os oxigênios externos dos aspartatos catalíticos na etapa inicial de protólise da água.⁴² Acredita-se que a alta penalidade entrópica para a formação deste anel é compensada pela estabilização trazida pela formação da LBHB. Northrop também sugeriu uma etapa de isomerização final que retorna a enzima ao estado em que se forma a LBHB.⁴² Contudo, a estrutura proposta para a forma da enzima ligada ao intermediário tetraédrico neste mecanismo mostrou-se incompatível com os dados mais recentes de difração de nêutrons, conforme já descrito.

Rodriguez *et al.*²⁹ sugeriram a existência de LBHBs para a formação dos complexos enzima-intermediário durante o mecanismo de catálise.²⁹ Coates *et al.*¹³ também apresentaram a hipótese da ocorrência de LBHBs entre os carboxilatos catalíticos

da endotiapepsina complexada a diversos inibidores, devido à presença de inúmeros picos entre a região de 15,5 e 18,5 ppm no espectro de RMN-¹H.¹³ Contudo, estes resultados foram criticados por Cosgrove *et al.*³⁴, que não detectaram nenhum sinal acima de 15 ppm, sugerindo que este tipo de interação não é formado no complexo pepsina-pepstatina.³⁴ Segundo os autores, a ausência deste tipo de interação indica que a catálise pela pepsina ocorre por um mecanismo concertado envolvendo um intermediário neutro. Logo, o aduto tetraédrico neutro forma ligações de hidrogênio mais fracas que aquelas envolvendo grupos carregados.

7. Conclusões

Embora a pepsina tenha sido uma das primeiras proteínas cuja estrutura tridimensional foi desvendada ao nível atômico, os detalhes de seu mecanismo catalítico, e das aspartil proteases em geral, permanecem alvo de intensa investigação. Algumas evidências experimentais já foram alcançadas, mas muitas contradições ainda são encontradas, principalmente em relação à existência das LBHBs. Vale ressaltar que o mecanismo catalítico proposto por Veerapandian *et al.* em 1992,¹⁸ teve algumas de suas principais características confirmadas somente 10 anos mais tarde por Coates e colaboradores¹⁷ em um estudo de difração de nêutrons.^{17,18}

Conforme descrito brevemente nesta revisão, há uma quantidade razoável de dados experimentais que mostram que o estado de protonação da enzima livre é alterado mediante a ligação do substrato ou de IETs. Desta forma, o mecanismo de ação consistente com a maioria dos dados disponíveis é um em que um dos resíduos de aspartato catalíticos atua como ácido/base geral, ou seja, atuando num primeiro momento do ciclo catalítico como uma base e num segundo momento como um ácido (o termo "geral" é para distinguir de estratégias catalíticas que utilizam uma molécula de água, especificamente, como doador/aceptor de prótons). A característica chave deste mecanismo é a ativação da molécula de água por um dos aspartatos e subsequente protonação do nitrogênio do grupo de saída, enquanto que o outro aspartato, protonado, faz uma forte ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila do substrato, onde uma carga negativa se desenvolve.

Entretanto, é cada vez mais clara a noção de que enzimas diferentes da família da pepsina podem apresentar pequenas, porém importantes variações deste mecanismo geral. Como se isso não fosse

motivo de controvérsia suficiente, há indicações de que diferentes ligantes podem induzir diferentes estados de protonação do sítio ativo.⁴³

Toda essa diversidade abre um campo fértil na fronteira da pesquisa em biologia estrutural e química medicinal, pois a elucidação detalhada da catálise realizada por APs pepsina-símile é de alta relevância para o desenvolvimento de inibidores, muitos dos quais podem ser potenciais fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, como malária e esquistossomose, ou doenças degenerativas, como Alzheimer.

Agradecimentos

Somos gratos às agências de fomento e a todos os funcionários, pesquisadores e alunos do Instituto Oswaldo Cruz, em especial aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, cuja convivência é excepcionalmente agradável.

Referências Bibliográficas

- ¹Rawlings, N. D.; Morton, F. R.; Kok, C. Y.; Kong, J.; Barrett, A. J. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²Northrop, J. H. *J. Gen. Physiol.* **1931**, *13*, 740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³Pearl, L.; Blundell, T. *FEBS Lett.* **1984**, *174*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴Andreeva, N. S.; Rumsh, L. D. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵Rajagopalan, T. G.; Stein, W. H.; Moore, S. *J. Biol. Chem.* **1966**, *242*, 4405. [[PubMed](#)]
- ⁶Chen, K. C. S.; Tang, J. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 2566. [[PubMed](#)]
- ⁷Aoyagi, T.; Kunimoto, S.; Morishim, H.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 687. [[PubMed](#)]
- ⁸Mckown, M. M.; Workman, R. J.; Gregerma, R. I. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7770. [[PubMed](#)]
- ⁹Schmidt, P. G.; Bernatowicz, M. S.; Rich, D. H. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishim, H.; Matsuzak, M.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 259. [[PubMed](#)]
- ¹¹Marciniszyn, J.; Hartsuck, J. A.; Tang, J. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7088. [[PubMed](#)]
- ¹²Rich, D. H.; Sun, E.; Singh, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *74*, 762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³Coates, L.; Erskine, P. T.; Crump, M. P.; Wood, S. P.; Cooper, J. B. *J. Mol. Biol.* **2002**, *329*, 1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴Bott, R.; Subramanian, E.; Davies, D. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵Dunn, B. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶James, M. N. G.; Sielecki, A.; Salituro, F.; Rich, D. H.; Hofmann, T. **1982**, *79*, 6138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷Coates, L.; Erskine, P. T.; Wood, S. P.; Myles, D. A. A.; Cooper, J. B. *Biochemistry* **2001**, *41*, 13249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸Veerapandian, B.; Cooper, J. B.; Sali, A.; Blundell, T. L.; Rosati, R. L.; Dominy, B. W.; Damon, D. B.; Hoover, D. J. *Protein Sci.* **1992**, *1*, 332. [[PubMed](#)]
- ¹⁹Coates, L.; Tuan, H. F.; Tomanicek, S.; Kovalevsky, A.; Mustyakimov, M.; Erskine, P.; Cooper, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *131*, 7236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰Erskine, P. T.; Coates, L.; Mall, S.; Gill, R. S.; Wood, S. P.; Myles, D. A. A.; Cooper, J. B. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹Rich, D. H.; Bernatowicz, M. S. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²²Rich, D. H.; Bernatowicz, M. S.; Agarwal, N. S.; Kawai, M.; Salituro, F. G.; Schmidt, P. G. *Biochemistry* **1985**, *24*, 3275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³Rich, D. H.; Bernatowicz, M. S.; Schmidt, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3636. [[CrossRef](#)]
- ²⁴Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶James, M. N. G.; Sielecki, A. R.; Hayakawa, K.; Gelbo, M. H. *Biochemistry* **1992**, *32*, 3972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷Bailey, D.; Cooper, J. B. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2130. [[PubMed](#)]
- ²⁸Coates, L.; Erskine, P. T.; Mall, S.; Gill, R.; Wood, S. P.; Myles, D. A. A.; Cooper, J. B. *Eur. Biophys. J.* **2006**, *36*, 559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹Rodriguez, E. J.; Angeles, T. S.; Meek, T. D.; *Biochemistry* **1993**, *33*, 12390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A.; and Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, *31*, 8454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³¹Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A.; Roberts, G. D.; Carr, S. A.; Magaard, V. W.; Bryan, H. L.; Fakhoury, S. A.; Moore, M. L.; Minnich, M. D.; Culp, J. S.; Desjarlais, R. L.; Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, *31*, 8441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³²Pearl, L. H. *FEBS Lett.* **1987**, *214*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³Hofmann, T.; Dunn, B. M.; Fink, A. L. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴Cosgrove, S.; Rogers, L.; Hewage, C. M.; Malthouse, J. P. G. *Biochemistry* **2007**, *46*, 11205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵Kossiakoff, A. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶Niimura, N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷Kossiakoff, A. A. Spencer, S. A., *Nature* **1980**, *298*, 424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸Cooper, J. B.; Myles, D. A. A. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹Tuan, H. F.; Erskine, P.; Langan, P.; Cooper, J.; Coates, L. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰Cleland, W. W.; Frey, P. A.; Gerlt, J. A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *283*, 25530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹Frey, P. A. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *40*, S190. [[CrossRef](#)]
- ⁴²Northrop, D. B. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *35*, 790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³Rajamani, R.; Reynolds, C. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]