

Gabarito

4. A hidrólise de pirofosfato a ortofosfato é uma reação acoplada importante para deslocar o equilíbrio de reações biossintéticas, por exemplo a síntese de DNA. Esta reação de hidrólise é catalisada por uma pirofosfatase que possui massa de 120 kDa e consiste de seis subunidades idênticas. Para esta enzima, a unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 μmol de pirofosfato em 15 minutos a 37 °C. A enzima purificada possui $V_{\text{max}} = 2800$ unidades por miligrama de enzima.

- a) Quantos mols de substrato são hidrolisados por segundo por miligrama de enzima quando a concentração do substrato for muito maior do que o K_m ?

Sendo a concentração de substrato muito maior que do que o K_m , temos que: $v_0 \rightarrow V_{\text{max}}$, e como já sabemos que $V_{\text{max}} = 2800 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, para respondermos a questão precisamos converter a unidade em que V_{max} foi expressa para $\text{mols} \cdot \text{s}^{-1}$, logo podemos afirmar:

$$V_{\text{max}} = 2800 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} = \frac{2800 \times (10^{-5} \text{ mol})}{15 \times 60 \text{ s} \times \text{mg}} = 31.11 \mu\text{mol/s} \times \text{mg}^{-1}$$

- b) Quantos mols de sítios ativos existem em 1 mg de enzima? Assuma que cada subunidade possui um sítio ativo.

Sabendo-se que a massa da enzima é de 120kDa, e assumindo-se que cada subunidade da enzima possui um sítio catalítico ativo, basta calcularmos quantos moles de enzimas existem em 1mg, e depois multiplicarmos pelo número de subunidades, vejamos. Primeiramente convertermos 120 KDa, para 120000g/mol, e calculamos:

$$\begin{aligned} n^\circ \text{ de sítio catalíticos} &= n^\circ \text{ moles de enzima} \times n^\circ \text{ de subunidades} \\ &= \frac{1 \text{ mg}}{120000 \text{ g/mol}} \times 6 = 50 \eta \text{ Mol/mg} \end{aligned}$$

- c) Qual é o *turnover* da enzima?

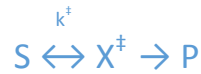
k_{cat} ou *turnover*, é o número de moléculas do substrato transformado por uma única molécula de enzima ou único sítio em função do tempo. Nos exercícios acima calculamos a velocidade máxima por miligrama de enzima em (a) e calculamos o número de sítios ativos em um miligrama de enzima. Dessa forma, o k_{cat} é a razão entre estes dois números:

$$\begin{aligned} V_{\text{max}} &= k_{\text{cat}} [E]_t \\ k_{\text{cat}} &= \frac{V_{\text{max}}}{[E]_t} \quad (\text{equação 1}) \end{aligned}$$

Substituindo-se os valores de V_{max} (item a) e $[E]_t$ (item b), temos:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_t} = \frac{31.11 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s} \times \text{mg}}}{0.05 \mu\text{mol}} = 622.2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

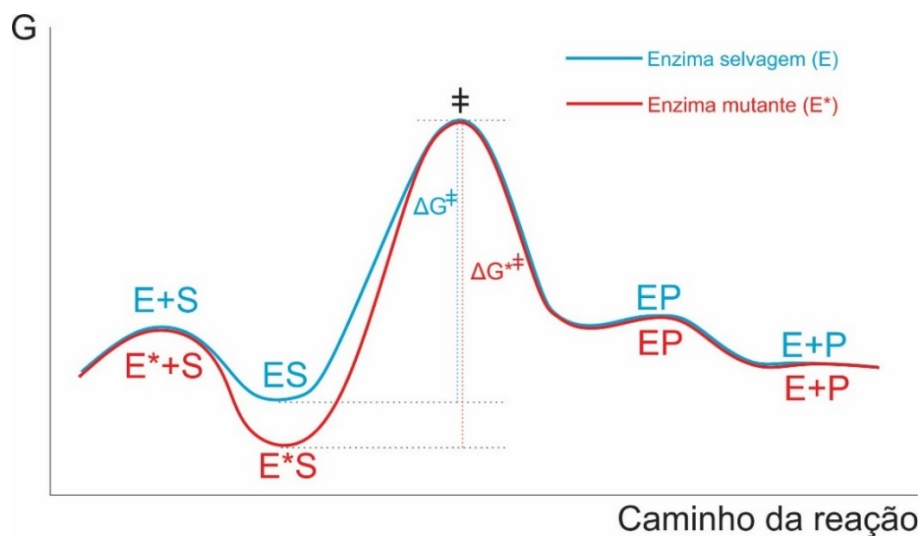
5. Suponha que uma enzima mutante se ligue com o substrato com uma afinidade 100x maior do que a enzima selvagem. Qual é o efeito desta mutação sobre o turnover (k_{cat}) considerando-se que a interação com o estado de transição não foi afetada? Uma abordagem para compreender o aumento da velocidade de reação obtido pelas enzimas consiste em supor que o estado de transição ($X^\ddagger$) e o substrato (S) estejam em equilíbrio,



em que $K^\ddagger$ é a constante de equilíbrio para a formação de $X^\ddagger$, e v é a velocidade de formação do produto a partir do estado de transição ($X^\ddagger$). A velocidade da reação v é proporcional à concentração de $X^\ddagger$; sendo que a velocidade global da reação V depende de $\Delta G^\ddagger$ da seguinte forma:

$$V = v[X^\ddagger] = \frac{kT}{h} [S] e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Neste exercício tratamos da hipótese de introduzir uma mutação que aumente em 100x a afinidade da enzima pelo substrato, conseqüentemente o complexo Enzima*-Substrato (E^*S) terá menor energia do que o complexo ES selvagem e, finalmente, a energia de ativação da reação será maior. Portanto, qualquer mutação que estabilize o complexo ES tornará a cinética de catálise mais lenta.



Caminho de reação da enzima selvagem (wt) em comparação com a enzima mutante (E^*). A barreira da energia de ativação é expressa por $\Delta G^\ddagger$

6. Para uma enzima que segue a equação de Michaelis-Menten, qual é o valor de V_{max} considerando-se que $v_0=1\mu M/min$ a $1/10 K_M$? Com base na equação de Michaelis-Menten podemos fazer:

$$v_0 = V_{max} \frac{\frac{1}{10K_M}}{K_M + \frac{1}{10K_M}} \quad (\text{equação 1})$$

Resolvendo-se esta equação para V_{max} , chegamos a:

$$V_{max} = 11 \times v_0 = 11 \times \frac{1\mu mol}{min} = 11\mu mol/min$$

7. A penicilina é hidrolisada por uma enzima beta-lactamase que está presente em algumas cepas de bactérias resistentes a antibióticos. A massa desta enzima é 29.6 kDa. A quantidade de enzima

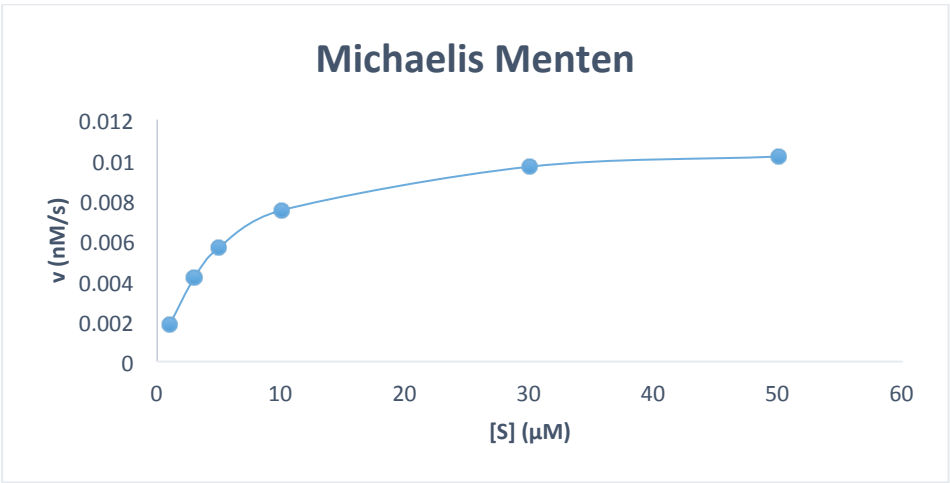
hidrolisada em 1 minuto em uma solução de 10 ml contendo 10^{-9} gramas de beta-lactamase purificada foi medida em função da concentração de penicilina (tabela abaixo). Assuma que a concentração de penicilina não se altera apreciavelmente durante o ensaio.

- a) Faça um gráfico de V_0 em função de $[S]$ e de $1/V_0$ em função de $1/[S]$. Responda: a beta-lactamase parece seguir a cinética de Michaelis-Menten? Neste caso, qual é o valor do K_M ?

Inicialmente, vamos calcular as velocidades iniciais em cada concentração de substrato:

[S]	[P]	$v=[P] / 60 \text{ segundos}$
1	0.11	0.0018
3	0.25	0.0042
5	0.34	0.0057
10	0.45	0.0075
30	0.58	0.0097
50	0.61	0.0102

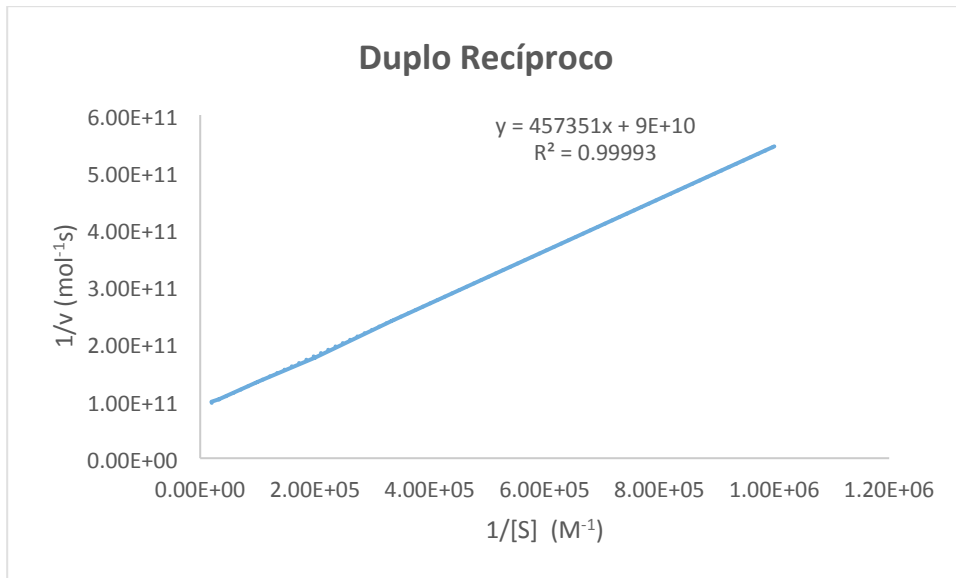
E agora podemos fazer um gráfico para verificar que a enzima segue a cinética de Michaelis-Menten:



Para calcularmos o valor de K_M e $V_{\max}$ é melhor linearizar este gráfico convertendo-o em um gráfico de Lineweaver-Burk e obter a equação da reta por uma simples regressão linear:

[S] (M)	v (mol/s)	$1/[S]$	$1/v$ (s/mol)
1.0e-06	1.83e-12	1000000	545454545454.545
3.0e-06	4.17e-12	333333.3333333333	240000000000.000
5.0e-06	5.67e-12	200000.0000000000	176470588235.294
1.0e-05	7.50e-12	100000.0000000000	133333333333.333
3.0e-05	9.67e-12	33333.3333333333	103448275862.069
5.0e-05	1.017e-11	20000	98360655737.7049

O gráfico de duplo-recíproco resultante está mostrado abaixo:



Uma simples regressão linear nos fornece a equação da reta a partir da qual podemos obter o $V_{\max}$ e o K_M com facilidade:

$$\frac{1}{v} = 4,6 \times 10^5 \cdot \frac{1}{[S]} + 8,8 \times 10^{10}$$

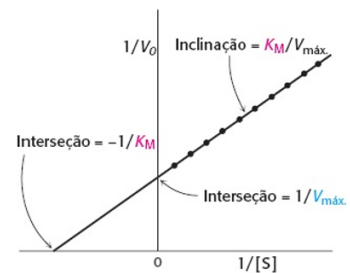
$$y = 4,6 \times 10^5 \cdot x + 8,8 \times 10^{10}$$

O K_M é dado pela interseção no eixo das abscissas:

$$0 = 4,6 \times 10^5 \cdot x + 8,8 \times 10^{10}$$

$$x = -1,967 \times 10^5 \text{ (Equação 2)}$$

Pelo gráfico de Lineweaver-Burk temos a seguinte relação para um enzima:



Quando $y = 0$; $x = -\frac{1}{K_m}$ (Equação 3)

Logo,

$$-1,967 \cdot 10^5 = -\frac{1}{K_m}$$

$$K_m = 5,08 \cdot 10^{-6} M$$

Pelo gráfico de Lineweaver-Burk também podemos obter o valor de $V_{\max}$ a partir da interseção no eixo das ordenadas:

$$x = 0; y = \frac{1}{V_{\max}} \text{ (Equação 4)}$$

Logo:

$$y = \frac{1}{V_{max}} \rightarrow 9 \cdot 10^{10} = \frac{1}{V_{max}} \rightarrow V_{max} = 1,13 \cdot 10^{-11} \text{ mol.s}^{-1}$$

- b) Qual é o *turnover* da enzima nestas condições experimentais? Assuma a presença de um sítio ativo por molécula de enzima.

Como já foi visto no item c do exercício 4, temos que $V_{max} = k_{cat} [E]_t$ e $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_t}$

Logo determinado o número de mols de enzima disponíveis podemos determinar o *turnover*:

$$\text{mols de } E = \frac{10^{-9} \text{ g}}{29,6 \text{ kDa}} = 3,3784 \times 10^{-14} \text{ mols} \quad k_{cat} = \frac{1,13 \times 10^{-11} \text{ mol.s}^{-1}}{3,3784 \cdot 10^{-14} \text{ mol}} = 334,5 \text{ s}^{-1}$$