Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Aula de Bioquímica Avançada

Tema:

Cinética Enzimática

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

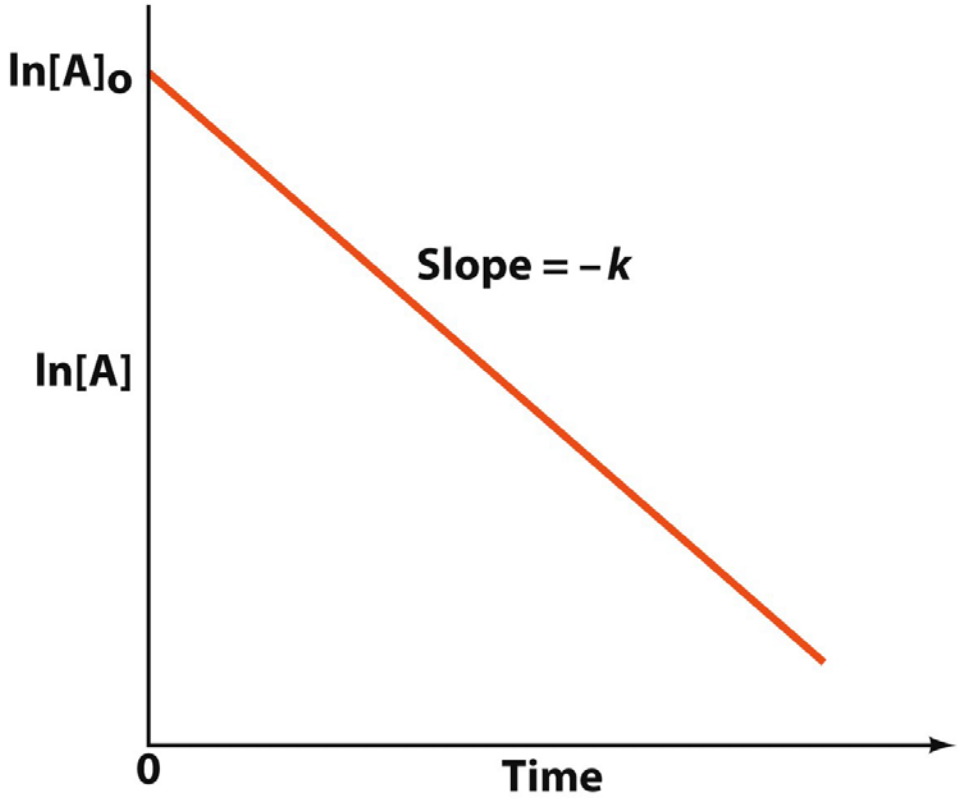
Cinética Química

- As reações químicas ocorrem em várias etapas através de intermediários com diferentes ET → Possibilidade de reações competitivas

- O intermediário que possuir maior $\Delta G^{\ddagger}$ do ET será a etapa determinante da reação.



$$A \rightleftharpoons P$$

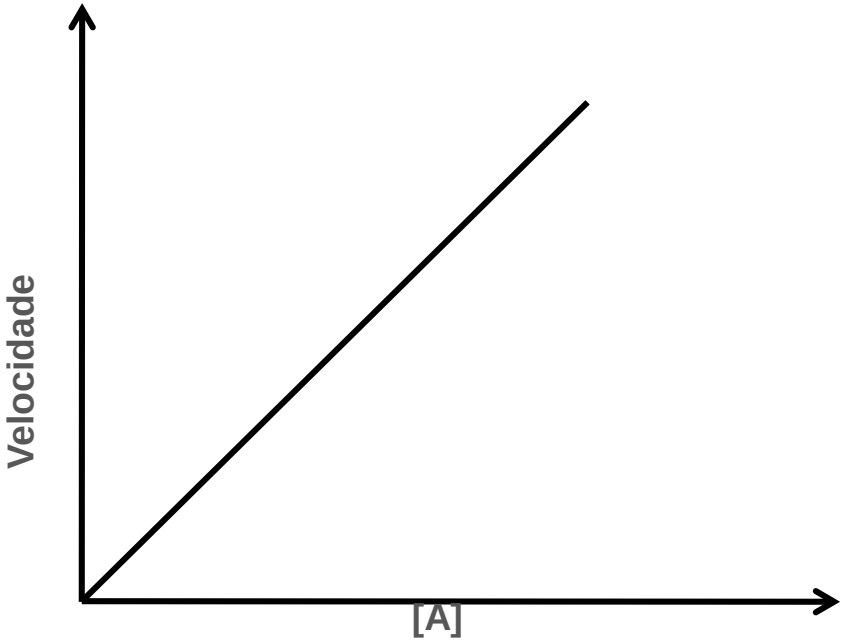


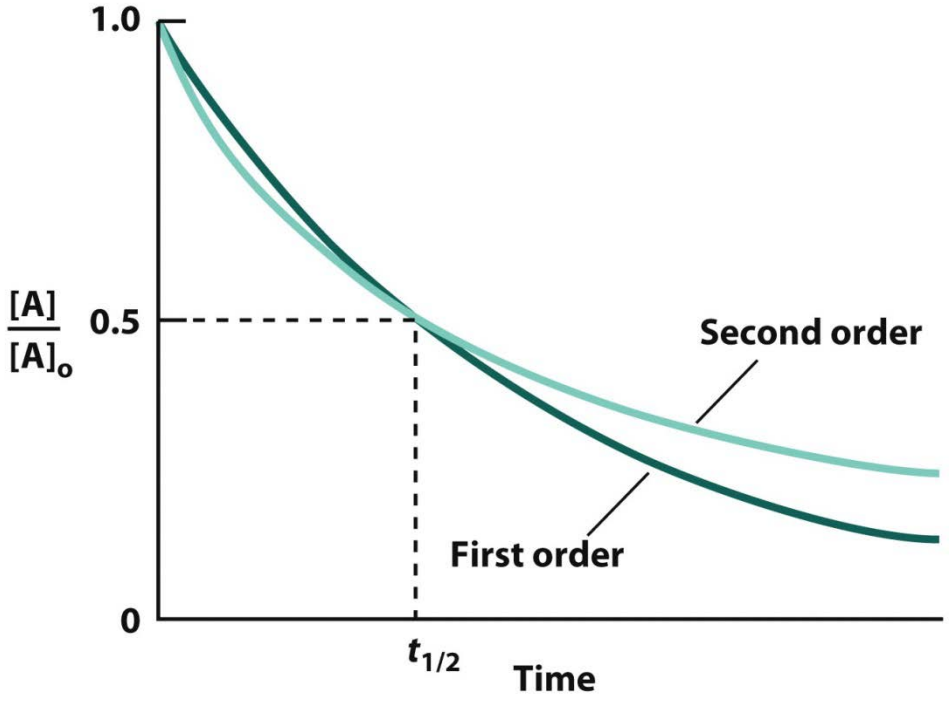
$$V = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A]$$

k= constante de velocidade (seg^{-1})

$$\ln k = -(\Delta G^{\ddagger} / RT) + \ln A$$

Cinética Química





- Se a reação depender da concentração de 1 substrato → unimolecular → um substrato participa no ET → **k = seg^{-1}.**

- Se a reação depender da concentração de 2 substratos → bimolecular → 2 substratos participam no ET ou existem mais de uma etapa determinante da reação.

2A → P $V = k[A]^2$

A + B → P $V=k[A][B]$ **k = M^{-1}seg^{-1}**

Reação Enzimática

Formação do complexo Enzima-Substrato — ES

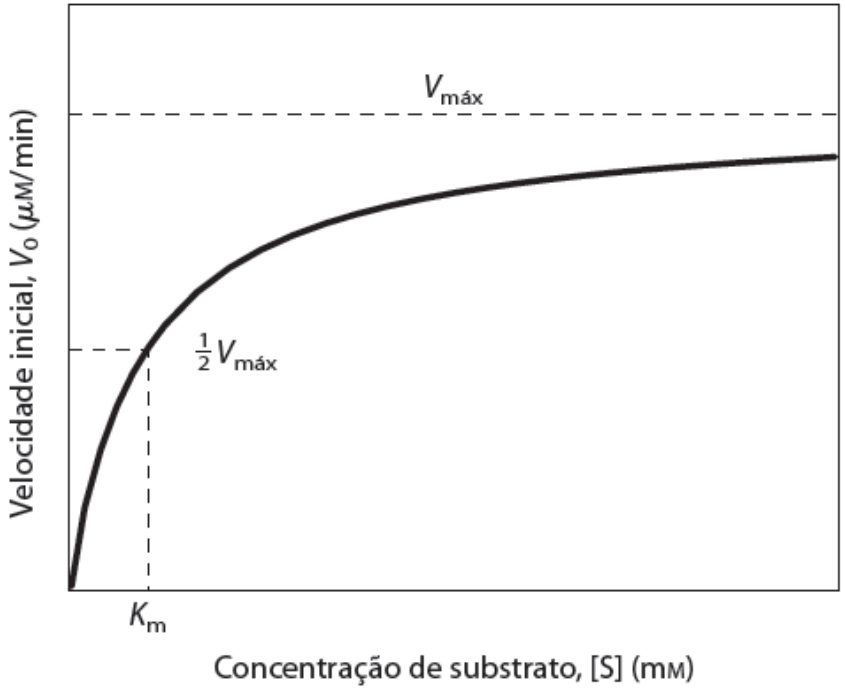
→ Limita a V em alta [S] devido à saturação dos sítios ativos da E

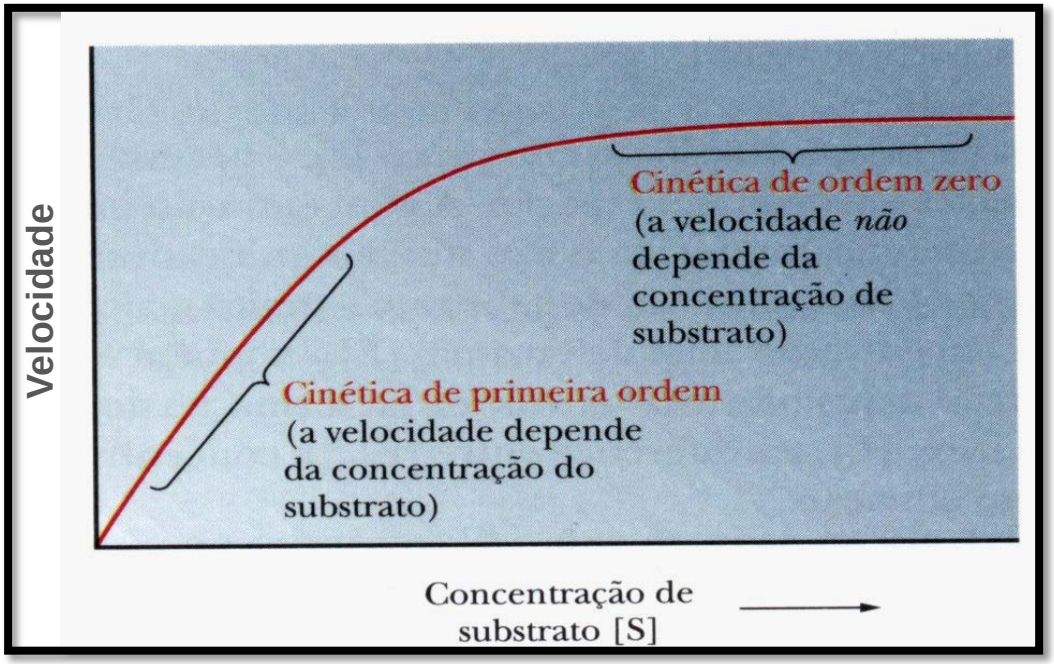
$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Evidência: Velocidade máxima (Vmax) → Saturação

Vmax não é observada numa reação química

Brown (1902) observou a "Vmax" para a *invertase* sobre a sacarose





Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Cinética Enzimática:

1) Suposição da formação rápida (em µseg) e reversível do complexo ES

2) Rompimento rápido do complexo ES em 2° etapa lenta em E + P

Modelo de Michaelis-Menten (1913)

Estudo comparativo das propriedades cinéticas de enzimas

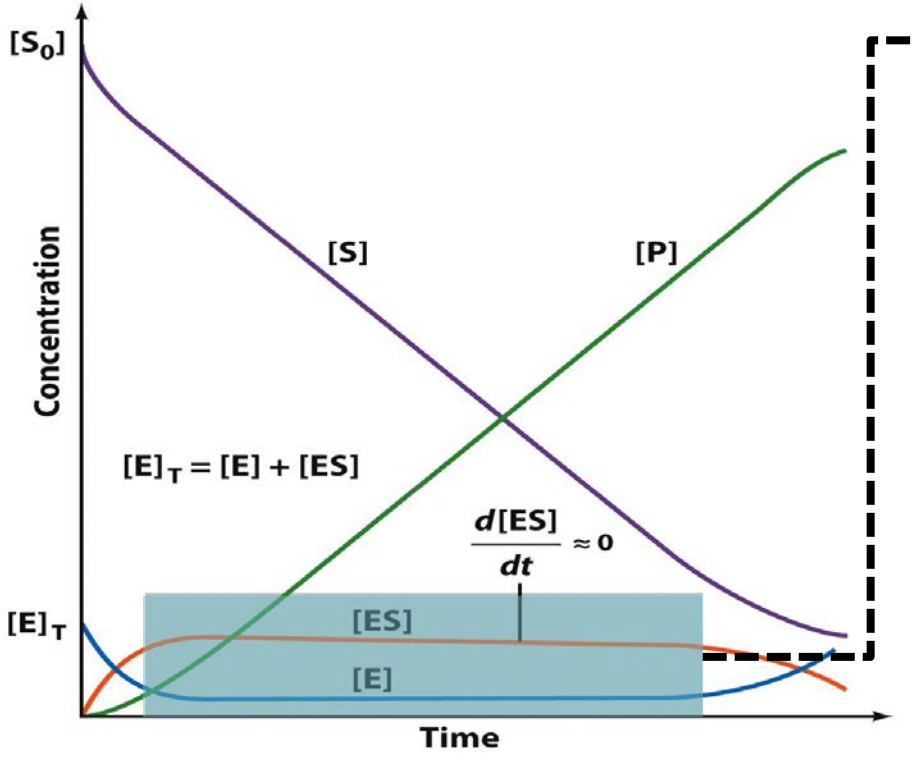


Leonor Michaelis (1875-1949)



Maud Leonora Menten (1879-1960)

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$



O Estado Estacionário

→ Consideração posta por Briggs e Haldane, 1925

→ Estado no qual se supõe que a concentração dos intermediários é constante – *ie*: [ES] – enquanto a concentração dos demais reagentes mudam

[S] >>> [E] → [ES] = Constante

→ Velocidade de Formação e Quebra de ES = 0

t → 0

Se [P] é desprezível → [P] <<< [S]

- Sem equilíbrio entre S e P

- Ignorar a reação reversa → sem k_4

Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

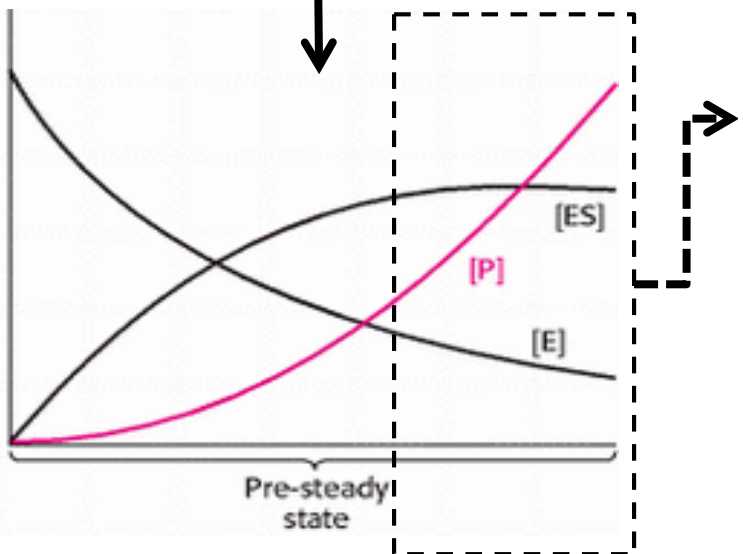
Cinética Enzimática:

Modelo de Michaelis-Menten (1913)

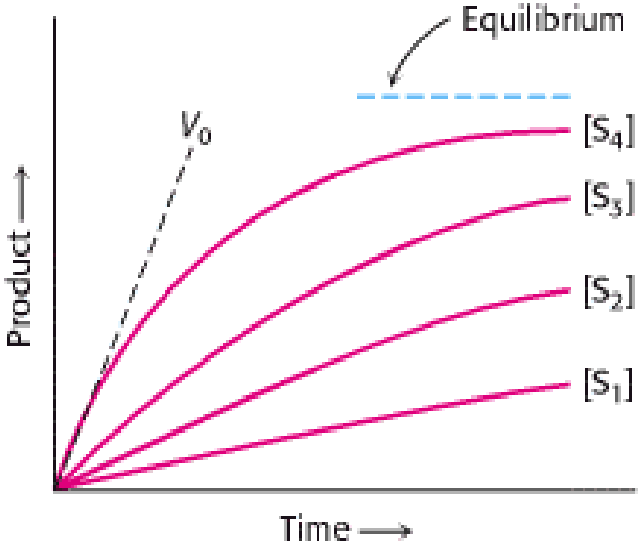
Estudo comparativo das propriedades cinéticas de enzimas

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

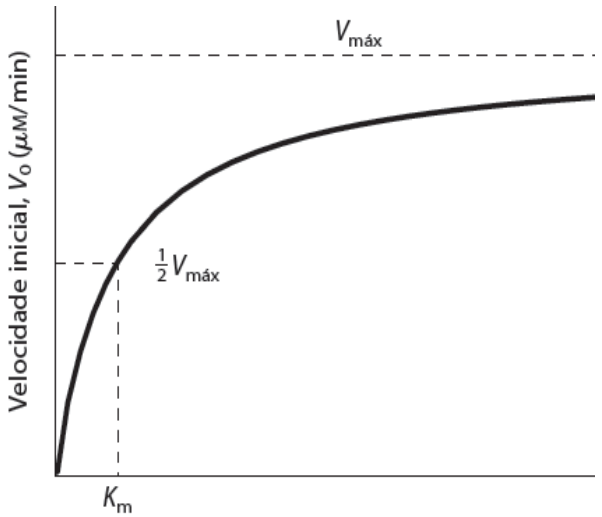
E + P → ES no estado Pré-estacionário é desprezível
→ [P] é baixa



Velocidade Inicial V_0



V_0 *versus* [S]



V_0 = velocidade inicial de formação de P em mol/seg.

Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Cinética Enzimática:

Modelo de Michaelis-Menten (1913)

Estudo comparativo das propriedades cinéticas de enzimas



Velocidade de formação do Produto P

- Depende da Constante de velocidade de formação de P

$$V_{forP} = V_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES]$$

Velocidade de formação do ES

- Depende da Constante de velocidade Associação E+S

$$V_{forES} = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]$$

Velocidade de dissociação do ES

- Depende da constante de velocidade de dissociação ES

$$V_{disES} = \frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES]$$

No Estado estacionário →

$$V_{forES} - V_{forP} - V_{disES} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] = 0$$

$$(k_2 + k_3)[ES] = k_1[E][S]$$

Reorganizando

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$$

Cinética Enzimática:

Modelo de Michaelis-Menten (1913)

Isolando as constantes de velocidade e definindo K_M = Constante de Michaelis (mol/L)

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} = K_M \xrightarrow{\text{Reorganizando}} [E][S] = [ES]K_M$$

Os Valores da [ES] e [E] não são diretamente mensuráveis, exceto [E_t]

Então ➔ $$[E_t] = [E] + [ES] \therefore [E] = [E_t] - [ES]$$

Substituindo o termo [E] ➔ $$([E_t] - [ES])[S] = K_M[ES]$$

Resolvendo para [ES] ➔ $$[E_t][S] - [ES][S] = K_M[ES]$$

$$[E_t][S] = K_M[ES] + [ES][S] \xrightarrow{\text{Reorganizando}} [E_t][S] = [ES](K_M + [S])$$

Então ➔ $$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]}$$

Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Cinética Enzimática:

Modelo de Michaelis-Menten (1913)

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]}$$

Se → $V_0 = k_3[ES] \therefore [ES] = \frac{V_0}{k_3}$ **Então →** $V_0 = k_3[E_t]\frac{[S]}{K_M + [S]}$

Condição reacional necessária

Como a [S] >>> [E_t], a E está saturada com o S e a [ES] = [E_t]

Nestas condições → Velocidade máxima de formação de P = Vmax

Então → $V_{max} = k_3[E_t]$

Como a [E_t] é constante, a Vmax é constante → Cinética de ordem Zero

Substituindo

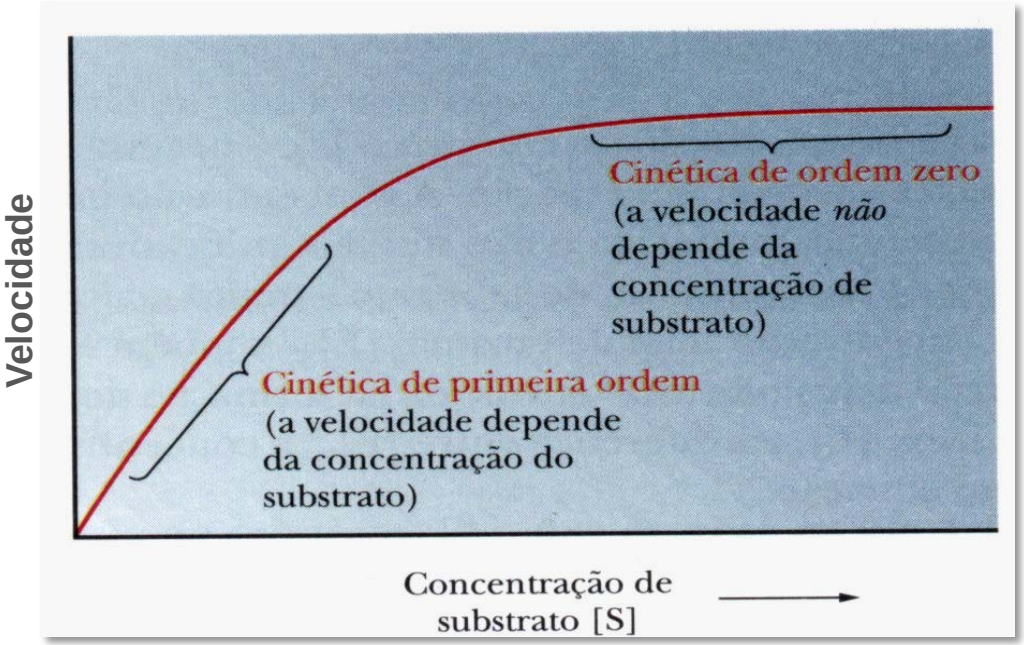
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Equação de Michaelis-Menten

Equação de Michaelis-Menten

Descreve a curva hiperbólica da velocidade de reação versus [S]

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$



$Se\,[S] << K_M \rightarrow V\ \alpha\ [S]$ → $V_0 = \left(V_{max} / K_M \right)[S]$ → **Cinética de Primeira ordem**

$Se\,[S] >> K_M$ → $V_0 = V_{max} \frac{[S]}{\sim [S]} = \sim V_{max}$ → **Cinética de ordem Zero**

1º Significado do K_M

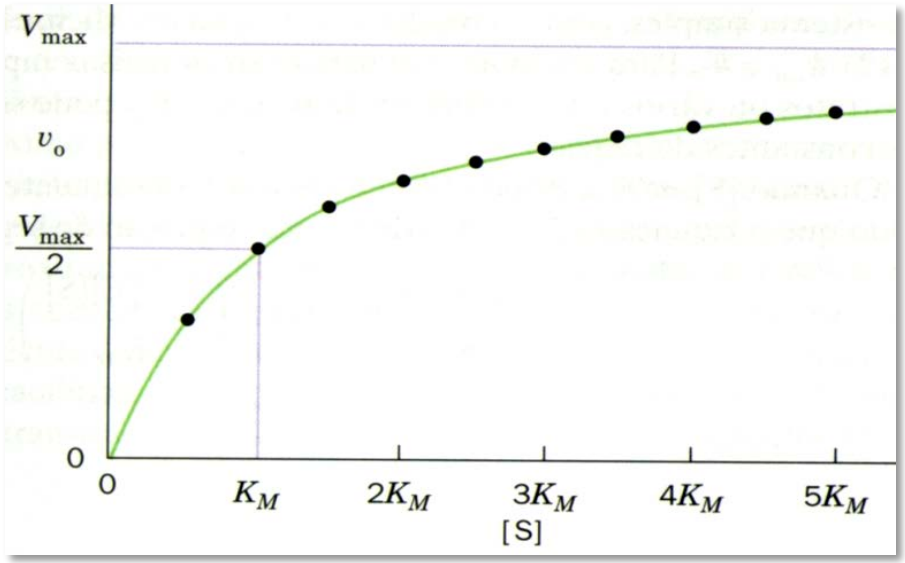
➔ Importante parâmetro da reação enzimática e da função biológica

➔ Fornece uma medida da [S] para que ocorra uma catálise significativa

Enzimas diferem muito no K_M ➔ Depende do substrato e das condições experimentais: Temperatura, sais, pH, etc

Se [S] = K_M ➔

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}$$



Então K_M é a [S] na qual a V é a metade da V_{max}, é a [S] na qual 50% dos sítios ativos estão ocupados

QUADRO 8.5 Valores de K_M de Algumas Enzimas

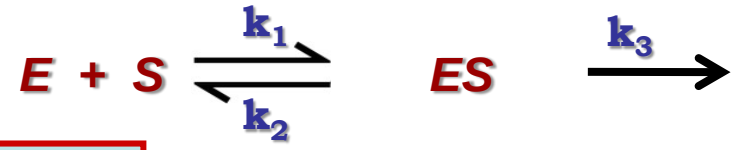
Enzima	Substrato	K_M (μM)
Quimotripsina	Acetil-L-triptofanamida	5.000
Lisozima	Hexa-*N*-acetilglicosamina	6
β-Galactosidase	Lactose	4.000
Treonina desaminase	Treonina	5.000
Anidrase carbônica	CO_2	8.000
Penicilinase	Benzilpenicilina	50
Piruvato carboxilase	Piruvato	400
	HCO_3^-	1.000
	ATP	60
Arginina-tRNA sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

Se K_M é conhecido, a fração de sítios ativos ocupados em uma dada [S] pode ser definida

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

2º Significado do K_M

K_M está relacionado às constantes de velocidade de cada etapa da reação



$$K_M = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$$

Se $k_2 >>> k_3$ ➔

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} = K_D$$

Se $k_2 >>> k_3$, a quebra de ES em E + S é mais rápida do que a formação de E + P

Nesta condição: K_M é um parâmetro da afinidade entre E e S,

➔ Somente se a prerrogativa $k_2 >>> k_3$ for obedecida

K_M alto ➔ Baixa afinidade

K_M baixo ➔ Alta afinidade

Se $k_2 <<< k_3$, a formação de ES em E + P é mais rápida do que a quebra em E + S

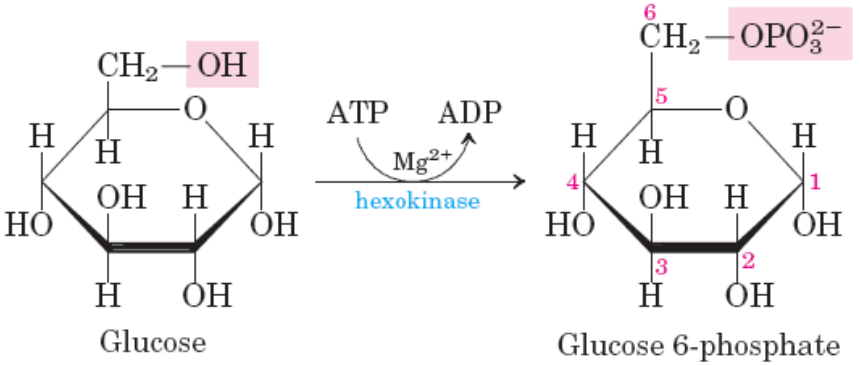
$$K_M = \frac{k_3}{k_1}$$

Se $k_2 \sim k_3$, a K_M depende de todas as etapas reacionais

2º Significado do K_M

K_M está relacionado às constantes de velocidade de cada etapa da reação

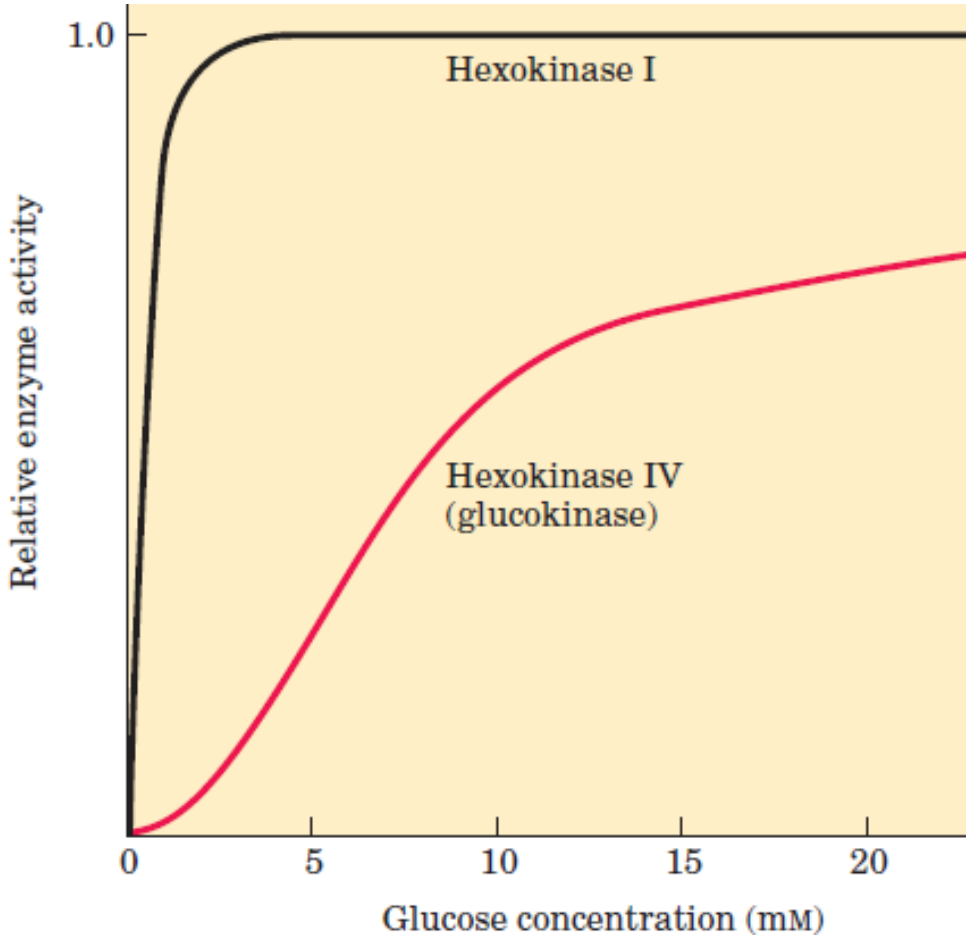
Ex: Hexoquinase (Músculo) *versus* Glicoquinase (Fígado) → Fosforilação da Glicose



Glucose

Glucose 6-phosphate

$\Delta G'^{\circ} = -16.7$ kJ/mol



2º Significado do K_M

Ex: Acetaldeído Desidrogenase participa do metabolismo do Etanol

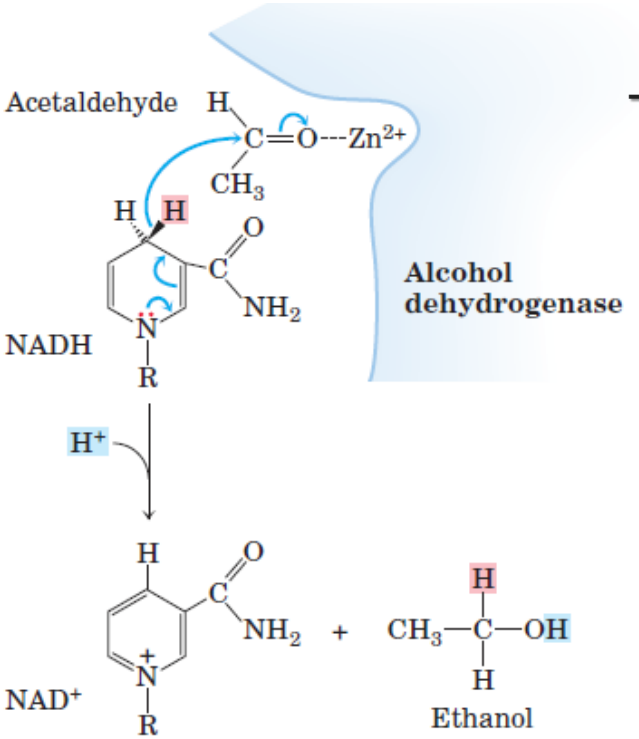
→ 2 isoenzimas: mitochondrial e citoplasmática

- A enzima mitocondrial tem K_M baixo por acetaldeído

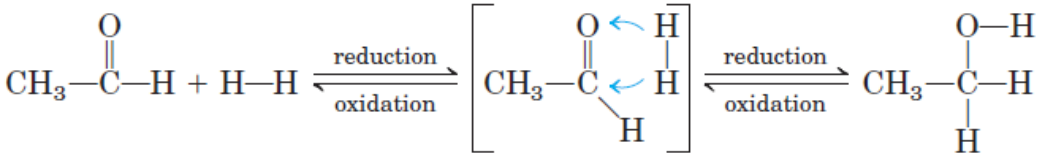
- A enzima citoplasmática tem K_M alto por acetaldeído

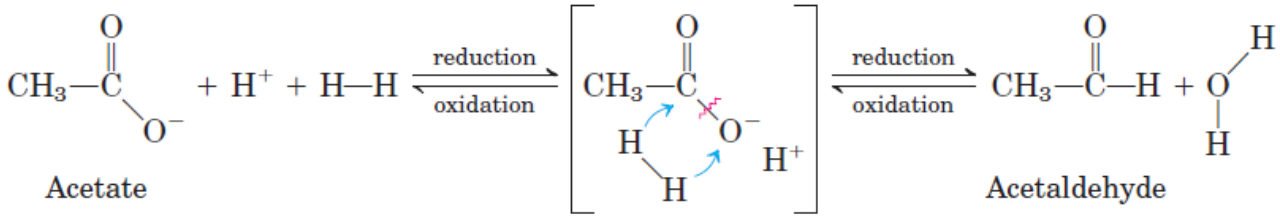
→ Devido a uma mutação, a enzima mitodondrial de pessoas com rubor devido ao Etanol apresenta um K_M alto por acetaldeído

→ O excesso de acetaldeído deve ser metabolizado pela enzima citoplasmática que normalmente tem K_M alto por acetaldeído



→ acúmulo de Acetaldeído → efeitos fisiológicos: rubor facial, taquicardia, ressaca, etc.





Significado do Vmax

Se a [S] >>> [E_t], a E está saturada com o S e a [ES] = [E_t]

Nestas condições → Velocidade máxima de formação de P = Vmax

Vmax está relacionado ao número de renovação da E

(*turnover number* = k_3 = k_{cat})

→Número de moléculas de S transformadas em P, por uma molécula de E, na unidade de tempo, quando a E está saturada com S

→ Representa a eficiência catalítica da E

Número de reações enzimáticas por unidade de tempo

$$V_{max} = k_3[E_t]$$

$$k_3 = k_{cat} \rightarrow k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]}$$

$1/k_{cat}$ = tempo gasto pela E para realizar 1 ciclo catalítico

Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

Significado do k_{cat}/K_M: A Eficiência Catalítica

Em condições fisiológicas as Enzimas não estão saturadas com o S → $[S]/K_M$ = 0,01-10

$$Se\ [S] <<< K_M \rightarrow V\,\alpha\,[E][S]$$
$$[E] = [E_t]$$

$$\longrightarrow \quad V_0 = k_{cat}[E_t]\frac{[S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat}}{K_M}[E_t][S]$$

Então, a velocidade da reação depende de k_{cat}/K_M, [S] e $[E_t]$

→ k_{cat}/K_M é a Constante de Velocidade nestas condições

k_{cat}/K_M

→ É uma medida de eficiência da Enzima

→ Permite comparar a preferência de uma Enzima para diferentes Substratos

→ Constante de especificidade

Preferências de Substrato da Quimotripsina

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($s^{-1}\ M^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	—CH(CH$_3$)$_2$	2.0
Norvaline	—$CH_2CH_2CH_3$	3.6×10^{2}
Norleucine	—$CH_2CH_2CH_2CH_3$	3.0×10^{3}
Phenylalanine	—CH_2—C$_6$H$_5$	1.0×10^{5}

Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Significado do k_{cat}/K_M: A Perfeição Cinética

Até onde vai a Eficiência de uma Enzima??? Existe limite físico para o k_{cat}/K_M?

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{cat}}{\frac{k_2 + k_{cat}}{k_1}} = \frac{k_{cat}}{k_2 + k_{cat}} k_1 < k_1$$

Se k_{cat} >>> k_2 ➔

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{cat}}{k_{cat}} k_1 \cong k_1$$

O Limite para k_{cat}/K_M é k_1 ➔ que é o encontro entre E e S.

O encontro de E e S NÃO pode ser mais rápido do que o aquele controlado pela difusão →.

Assim, quando o k_{cat}/K_M está próximo a valores de 10^8 e 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, pode-se dizer que a enzima atingiu a perfeição cinética, pois a catalise depende apenas da E encontrar o S.

Todo encontro entre E e S resulta em P!!!!

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H_2O_2	4×10^7	$1,1 \times 10^0$	4×10^7
Crotonase	Crotonil-CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β-Lactamase	Benzoilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

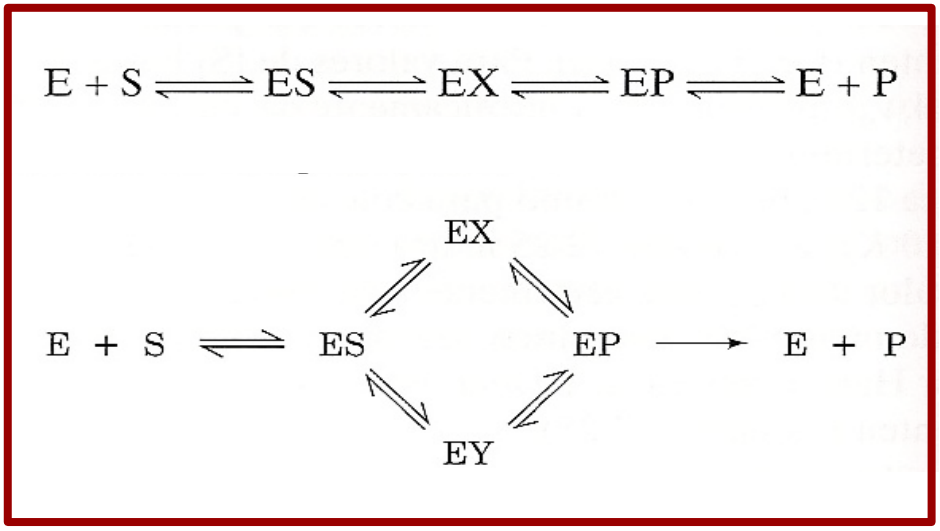
→ Complexos Multi-enzimáticos são exceção → Funcionam como linha de montagem enzimática!!!

Cinética e Mecanismo de Catálise

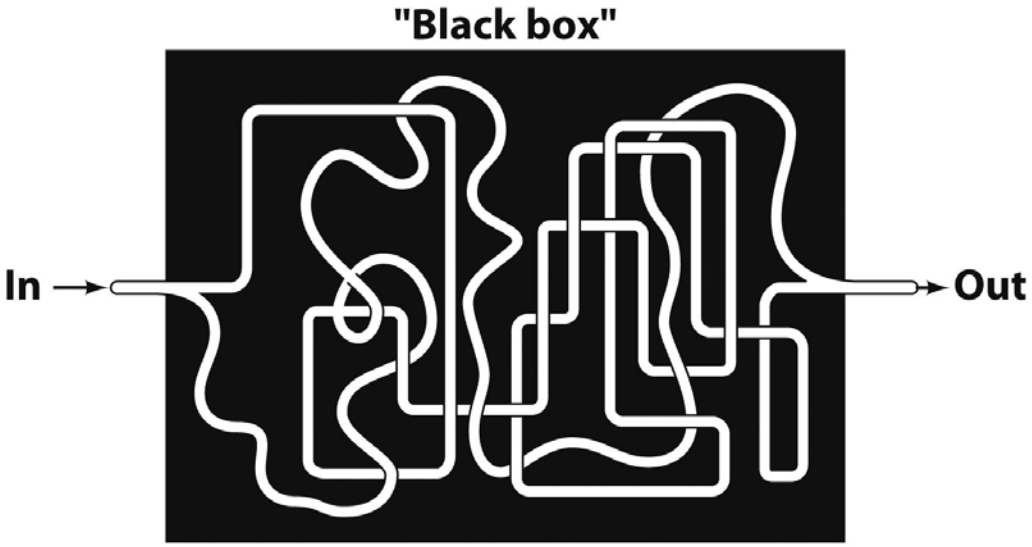
Cinética enzimática → informações sobre V de formação e decomposição de ES

Sem informações diretas sobre a natureza do ES ou mecanismo de catálise

- Reações com muitos intermediários



Mecanismo de Catálise



→ Validação do Mecanismo de catálise

- Identificação de intermediários por outras técnicas

Reações com Substratos múltiplos

1= Uni **2= Bi** **3= Ter** **4= Quad**

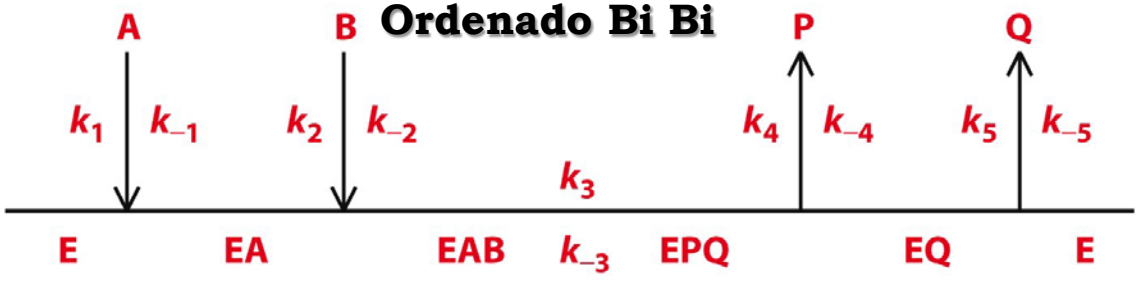
$$E + S + R \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ESR \xrightarrow{k_{cat}} E + P + Q$$

→ **Ordem ligação dos Substratos para a formação do ES influencia a V**

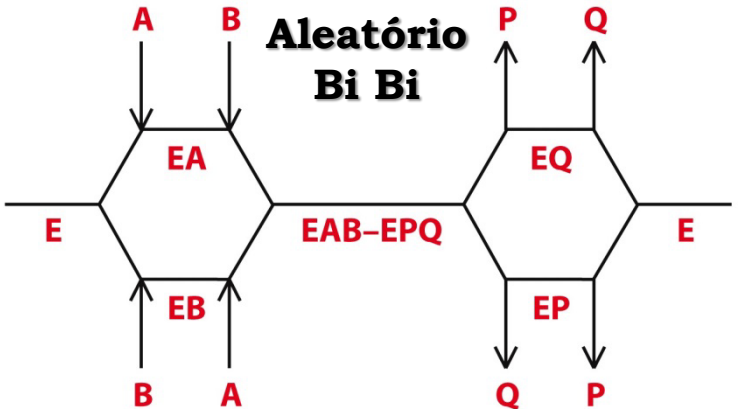
→ **Deslocamento Sequencial**

- Formação de complexos ternário ESR e EPQ

Ordenado Bi Bi



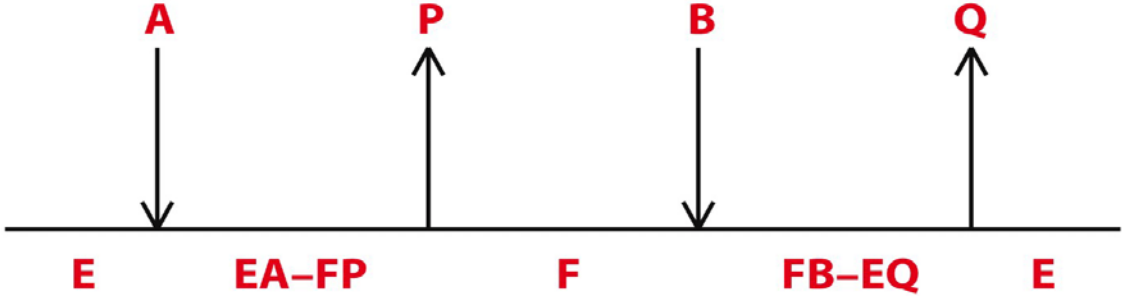
Aleatório Bi Bi



→ **Duplo Deslocamento - em Pingue-pongue Bi Bi**

→ **O 1º produto se desliga da enzima antes da entrada do 2º Substrato**

→ **Sem encontro dos Substratos no sítio ativo**



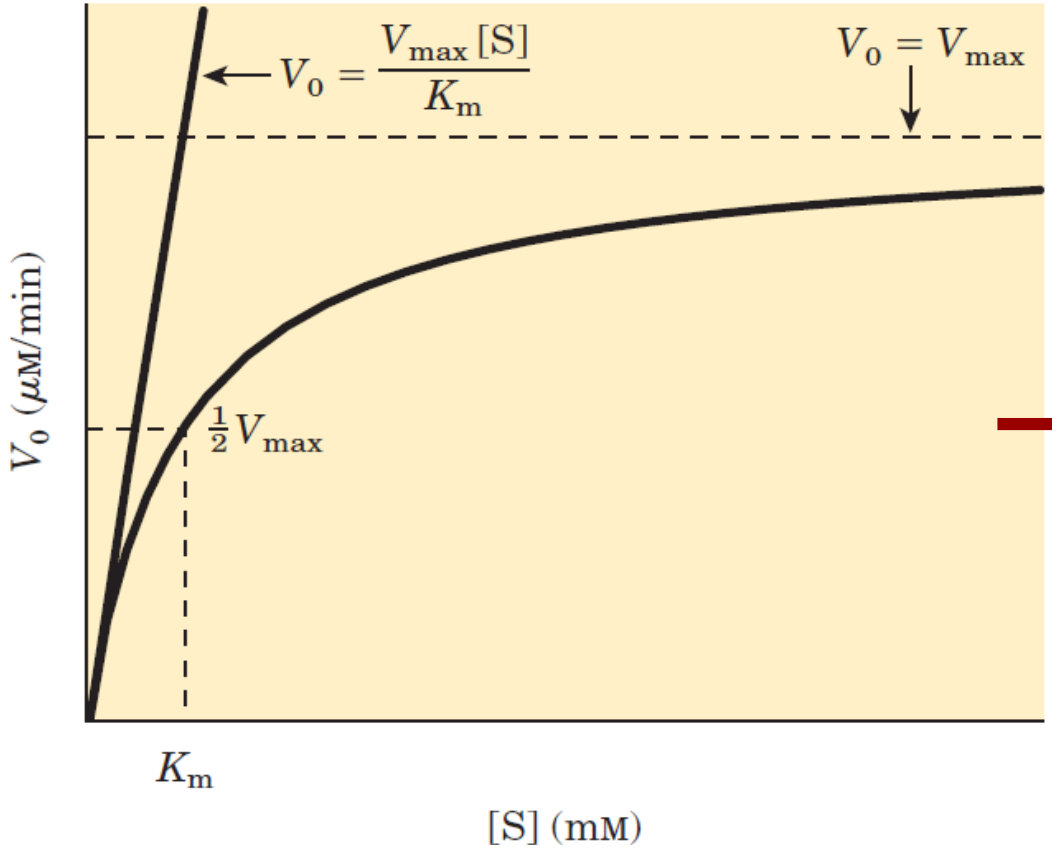
Determinando V_{max} e K_M

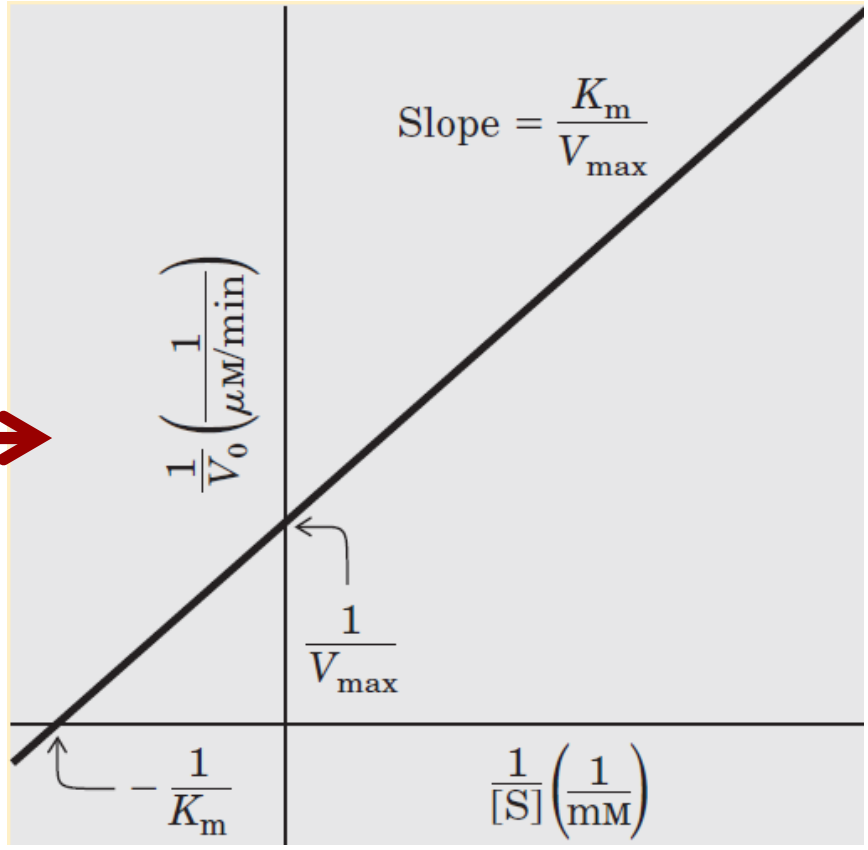
Gráfico do duplo recíproco ou Linewever-Burk

$$\frac{1}{V} \text{ versus } \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = ax + b$$





Reações com Substratos múltiplos

A cinética do estado estacionário ajuda a determinar se há a formação de complexo ternário ou duplo deslocamento

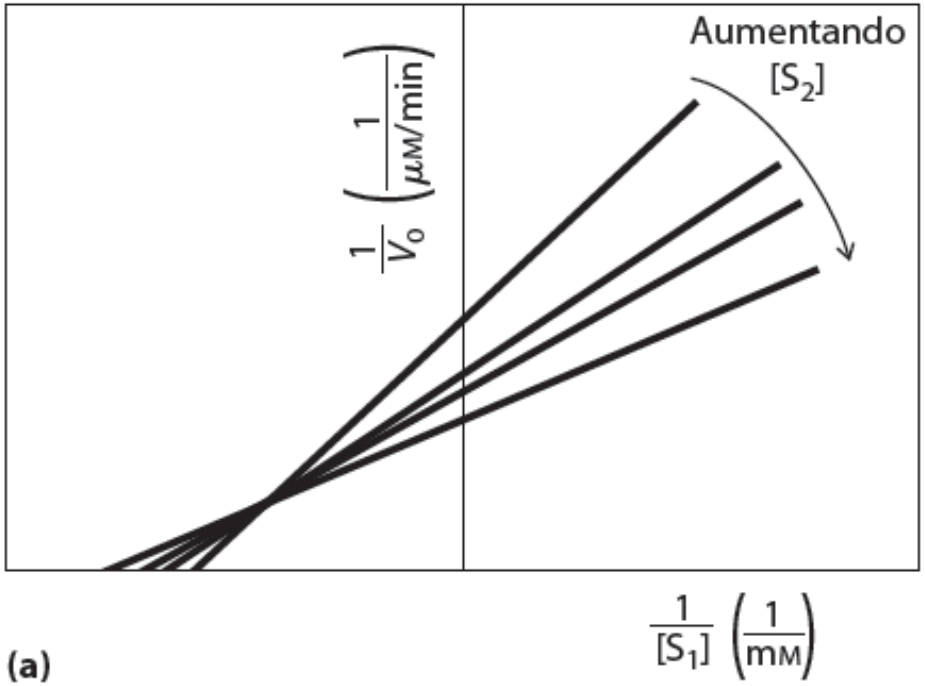
A equação de Michaelis-Menten é aplicável a reações Bi substratos

Cada substrato tem um Km característico

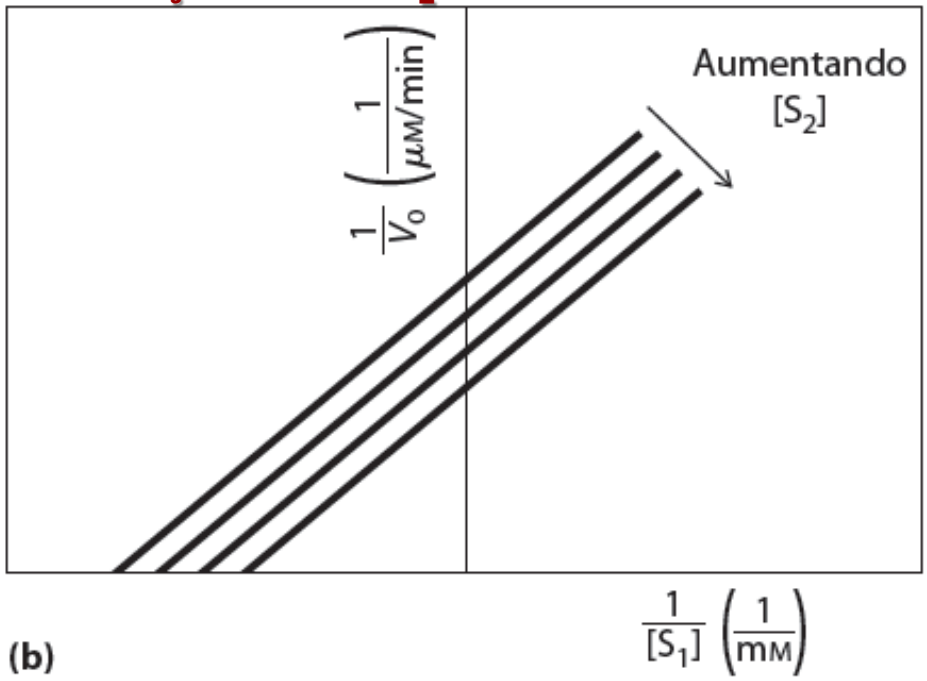
→ Experimentalmente fixa-se a [S_1] e varia-se a [S_2]

Análise pelo perfil dos Duplos-recíprocos

Complexo ternário formado



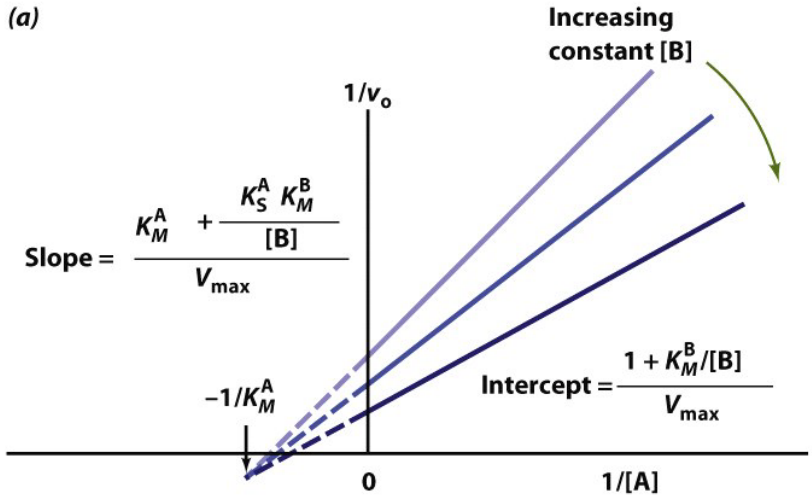
Reação em duplo deslocamento

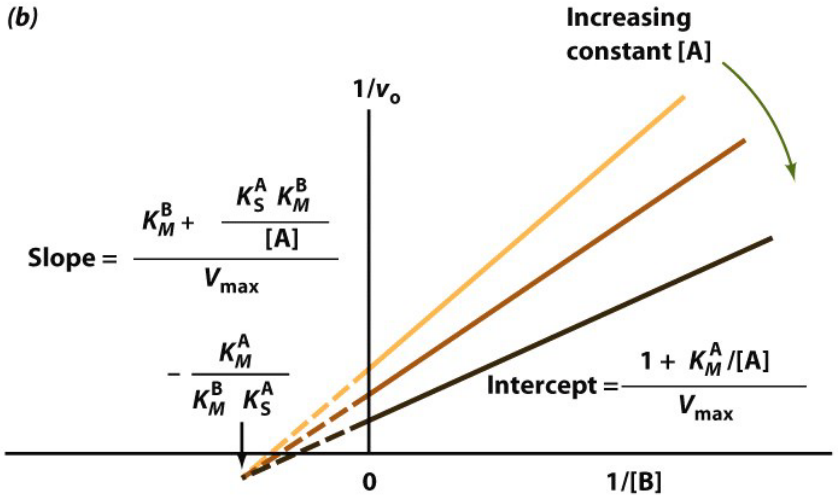


Reações com Substratos múltiplos

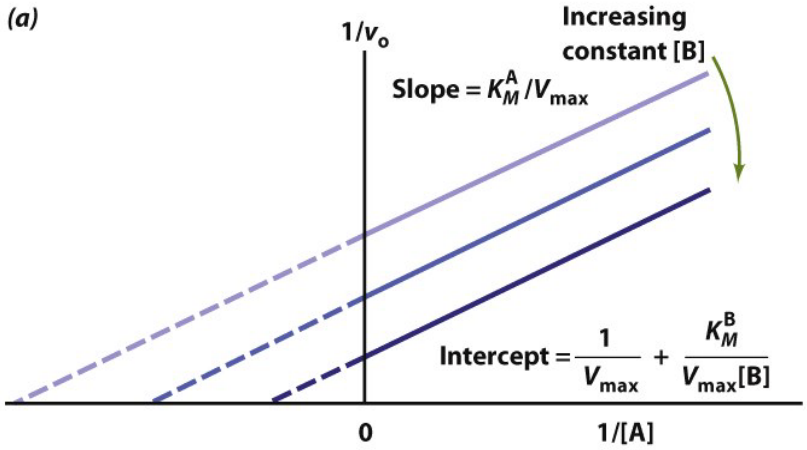
Reação em deslocamento sequencial

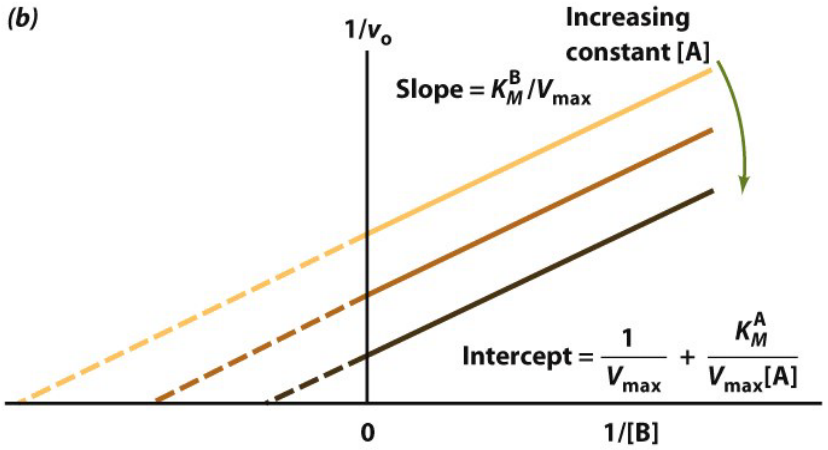
Os efeitos inibitórios dos produtos ajudam a definir o tipo de deslocamento





Reação em duplo deslocamento





As enzimas podem ser Inibidas

Moléculas específicas podem interagir com a enzima inibindo-a

Inibidores Irreversíveis

→ Dissociação muito lenta do Inibidor da Enzima

- ligação covalente ou não covalente estável ou destroem grupo funcional da enzima

- Podem "marcar" os aminoácidos catalíticos

→ Ferramenta útil para estudar mecanismo de reação.

1) Reagentes específicos → reagem com o sítio ativo

2) Análogos do estado de transição

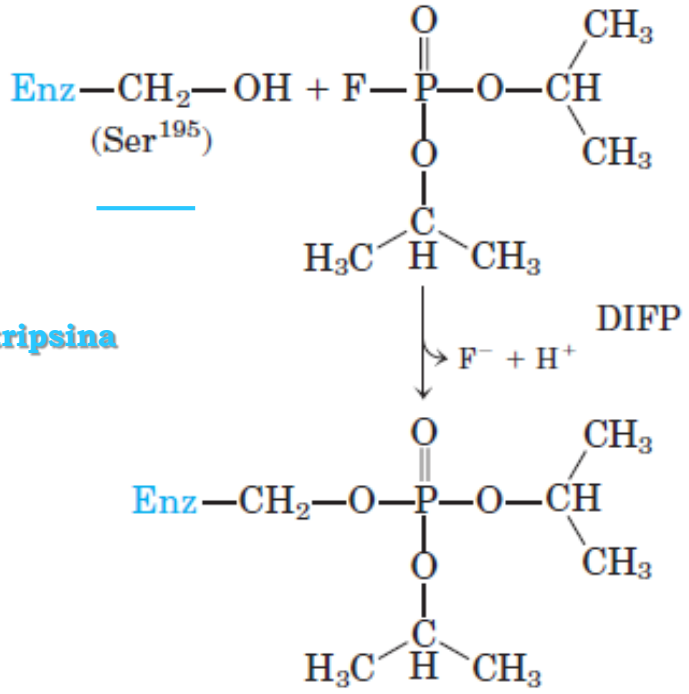
3) Inibidores suicidas ou com base no mecanismo

As enzimas podem ser Inibidas

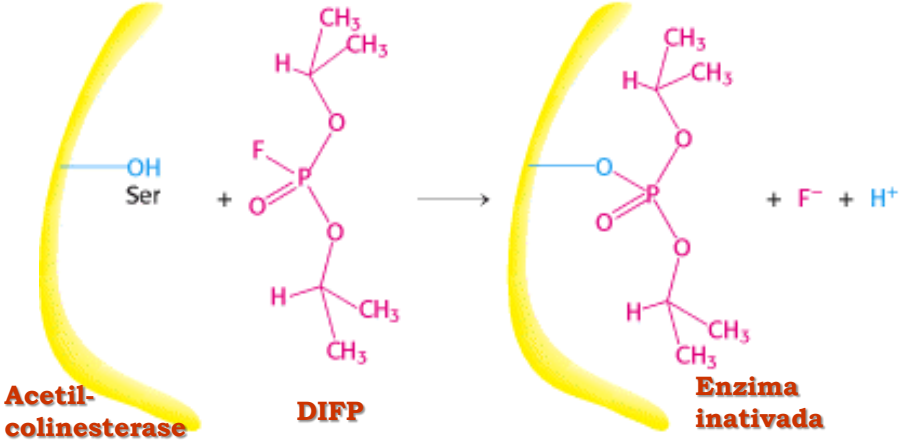
1) Reagentes específicos → reagem com o sítio ativo

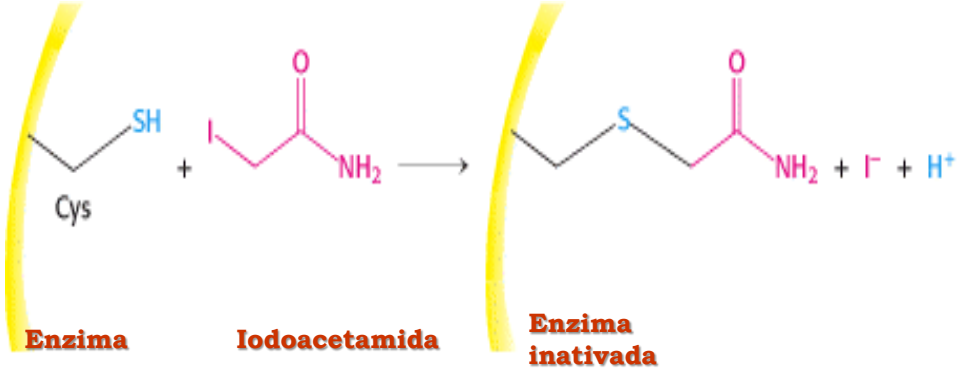
Reagem com grupamentos específicos das cadeias laterais de aminoácidos

→ marcar os resíduos catalíticos.



DIFP = Diisopropilfluorofosfato





As enzimas podem ser Inibidas

2) Análogos do estado de transição

→ Moléculas semelhantes ao estado de transição da reação catalisada

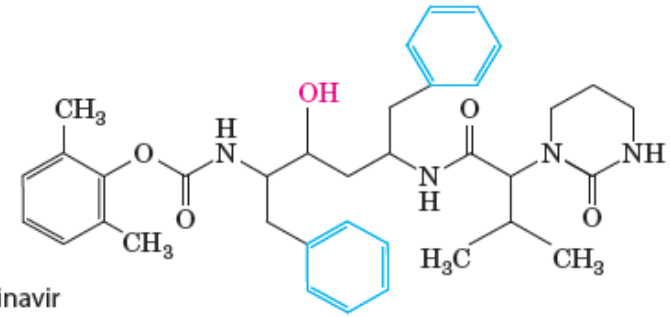
- Interação muito forte com a enzima

10^2-10^8 maior do que o S

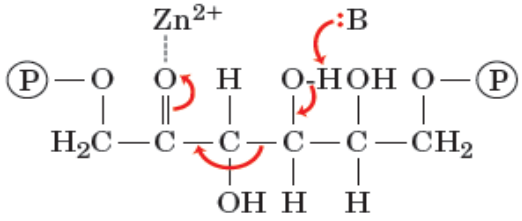
- Baseia-se a premissa de que a enzima atua para estabilizam o ET

- As Enzimas apresentam Alta afinidade pelo Estado de Transição Reacional

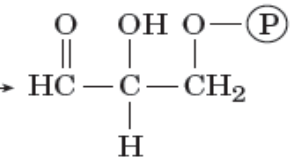
Ex: inibidores da protease do HIV



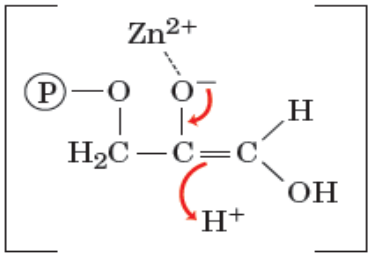
Lopinavir



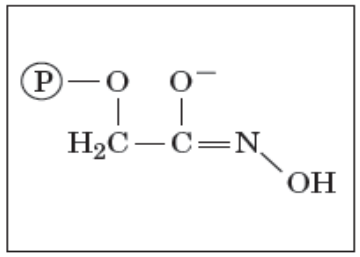
Frutose 1,6-bifosfato



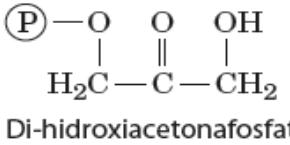
Gliceraldeído 3-fosfato



Estado de transição proposto



Análogo ao estado de transição, fosfoglicolo-hidroxamato



Di-hidroxiacetonafosfato

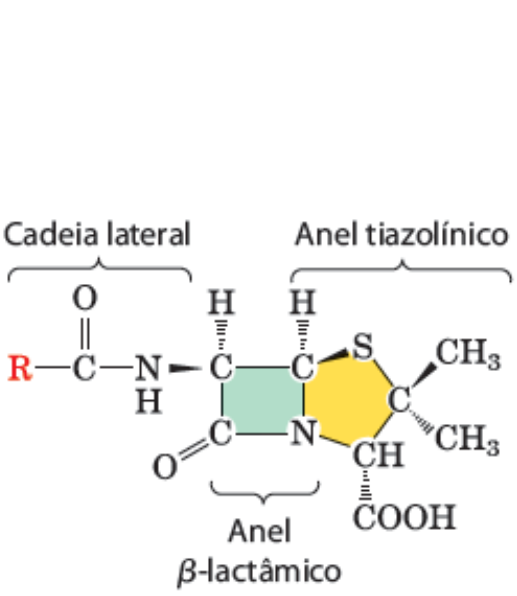
Afinidade 10 mil maior do que pelo substrato

As enzimas podem ser Inibidas

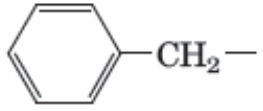
3) Inibidores suicidas ou com base no mecanismo

- Compostos pouco reativos até que se liguem ao sítio ativo de uma enzima específica;
- Simulam o mecanismo da reação para inativar a enzima → "com base no mecanismo";
- Importante para o planejamento racional de drogas.

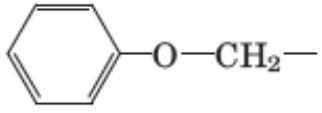
Penicilinas



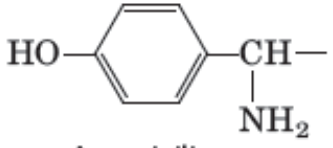
Grupos R



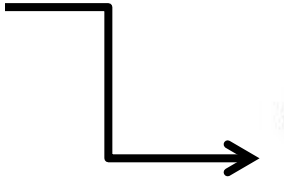
Penicilina G
(benzilpenicilina)

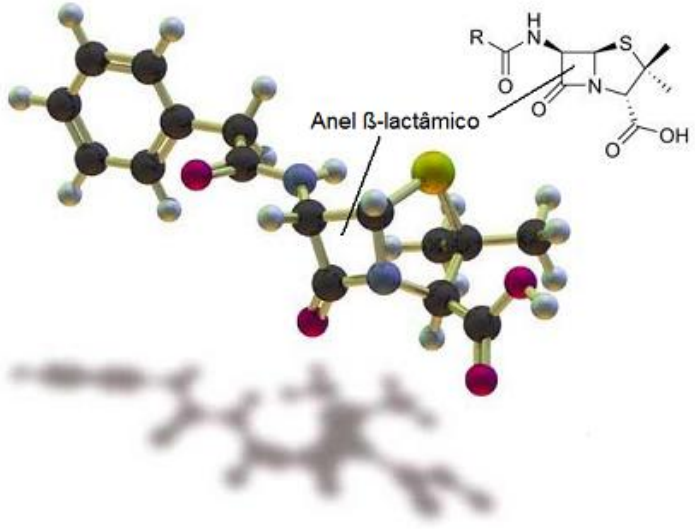


Penicilina V



Amoxicilina



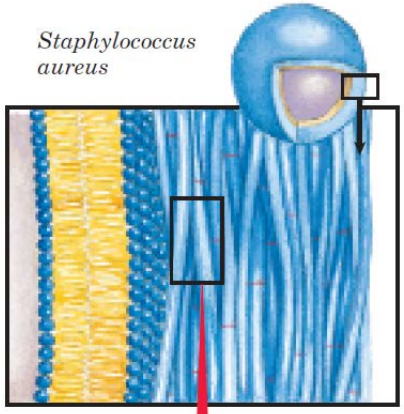


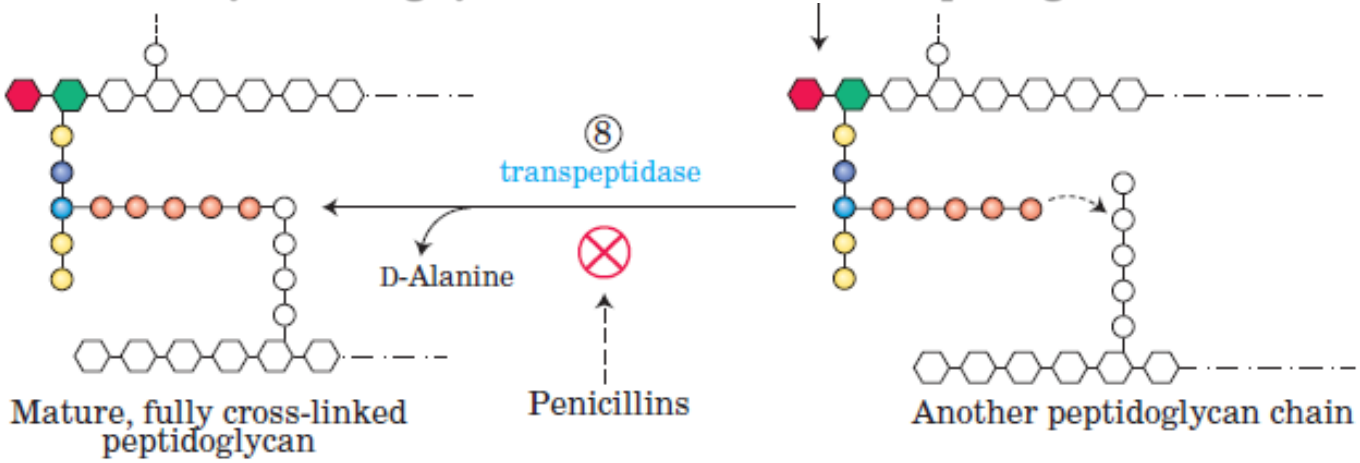
Estrutura geral das penicilinas

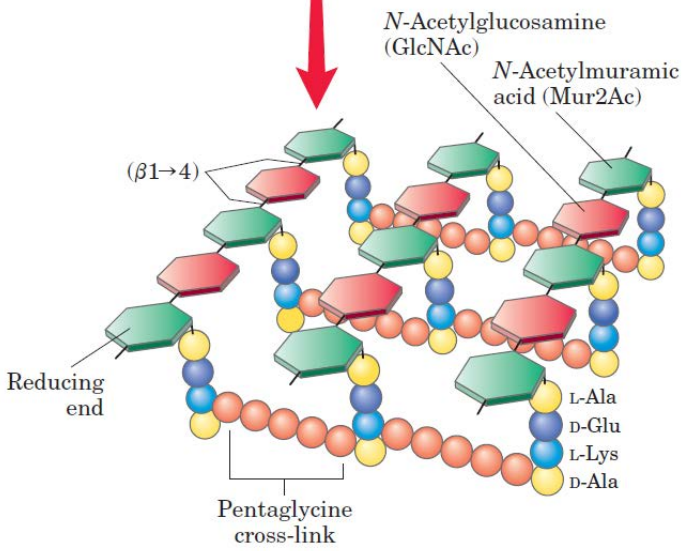
As enzimas podem ser Inibidas

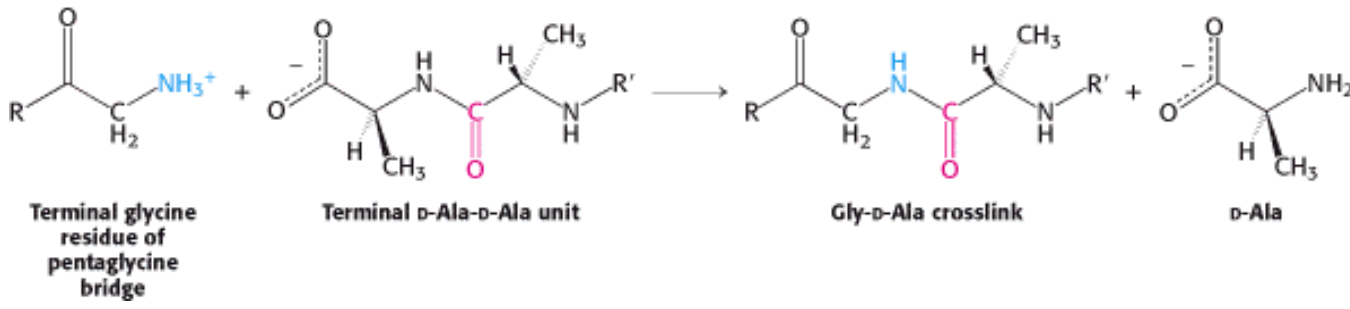
3) inibidores suicidas ou com base no mecanismo: penicilinas

Formação das ligações entrecruzadas no Peptidoglicano.







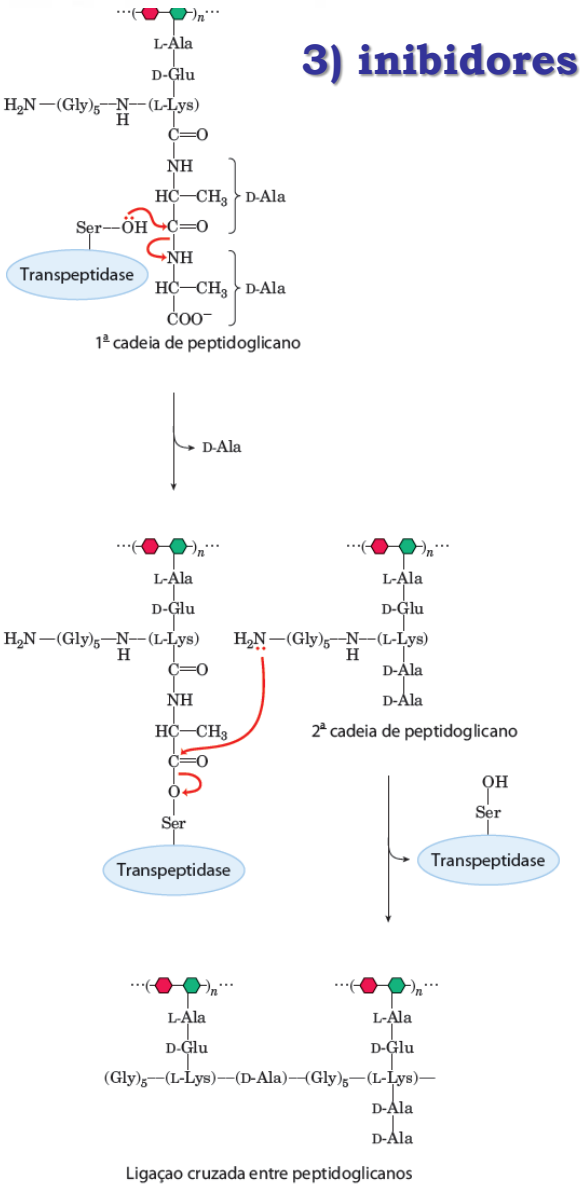


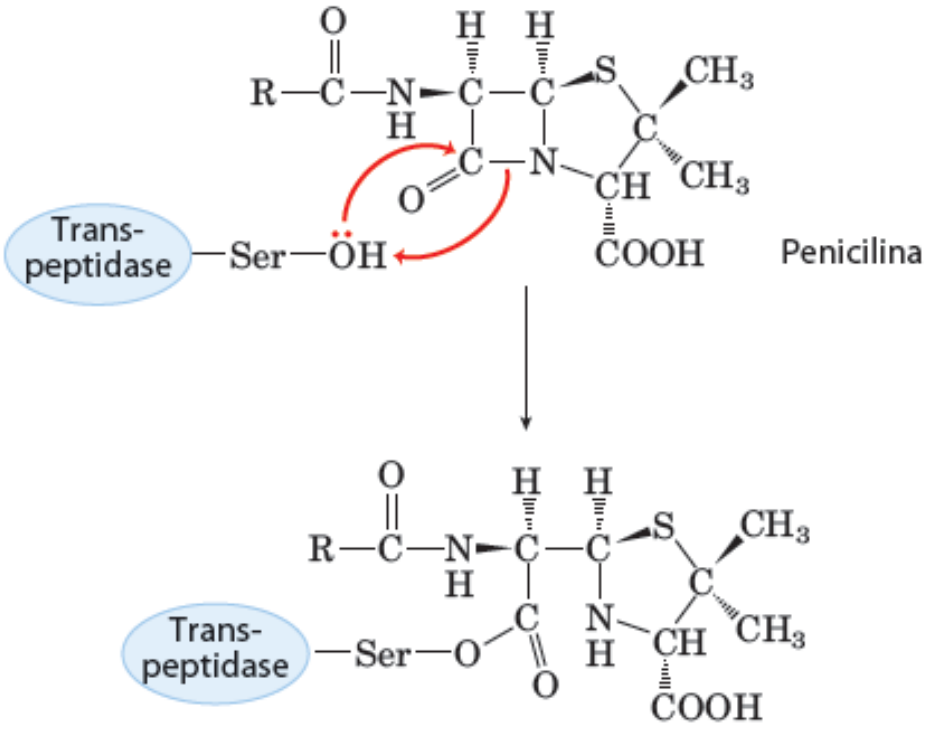
Estrutura do peptidoglycano

As enzimas podem ser Inibidas

3) inibidores suicidas ou com base no mecanismo: penicilinas

Formação das ligações entrecruzadas no Peptidoglicano.





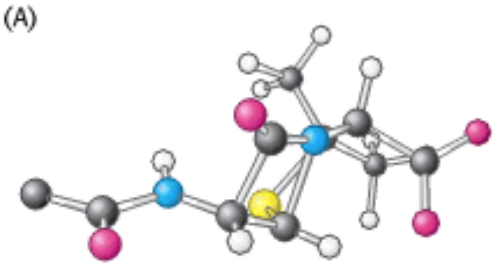
Transpeptidase alterada de forma estável, inativa

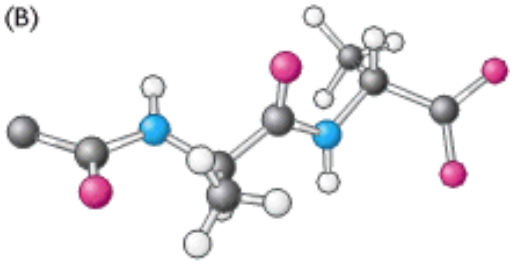
As enzimas podem ser Inibidas

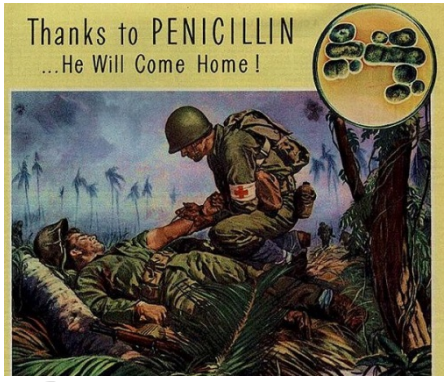
3) inibidores suicidas ou com base no mecanismo: penicilinas



Prof. Alexander Fleming
Nobel Prize winner for Medicine in 1945







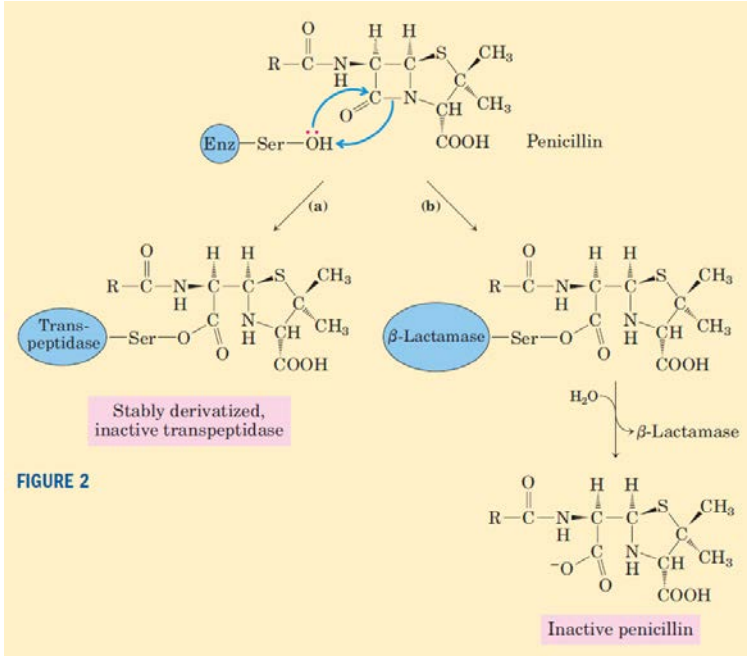
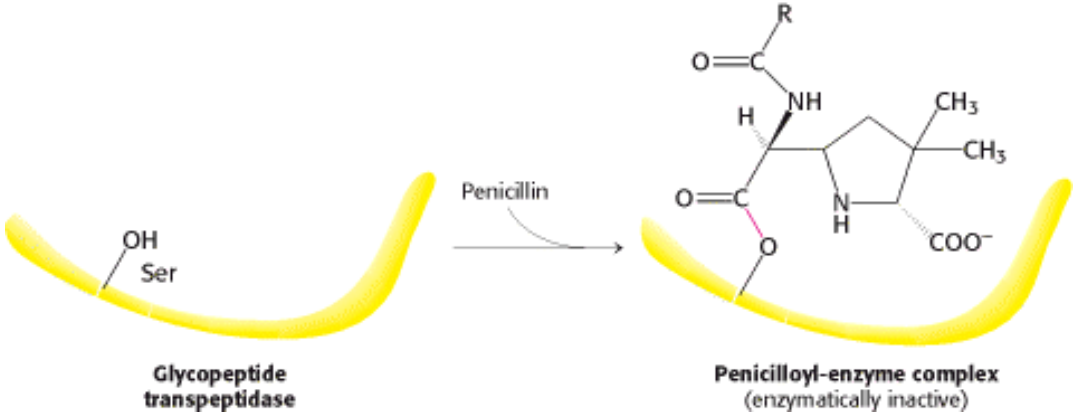


FIGURE 2

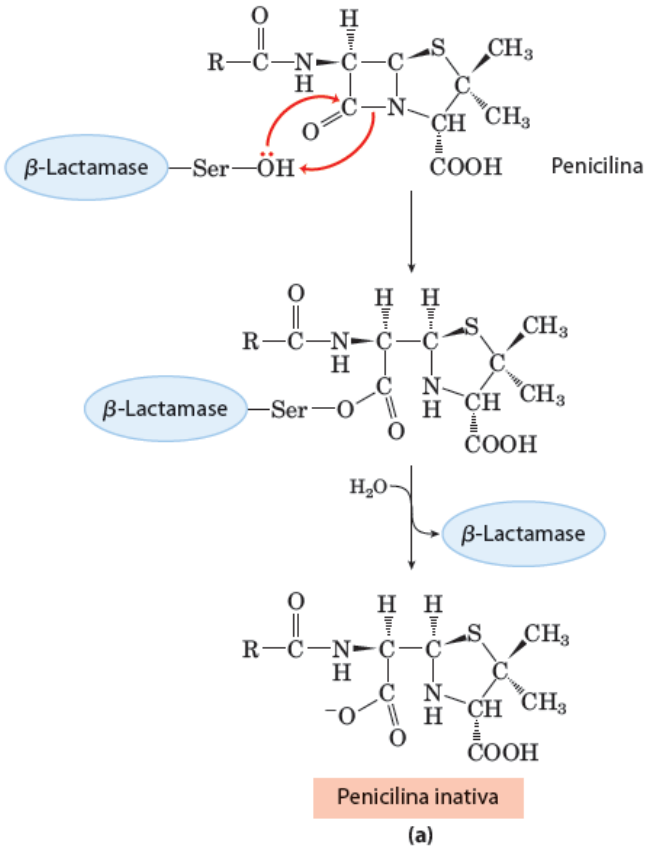


As penicilinas são consideradas bactericidas pois como o interior da bactéria é hiperosmótico, sem a parede rígida há afluxo de água do exterior e a bactéria lisa.

As enzimas podem ser Inibidas

3) Inibidores suicidas ou com base no mecanismo: penicilinas

Existem mecanismos de resistência: β-lactamases



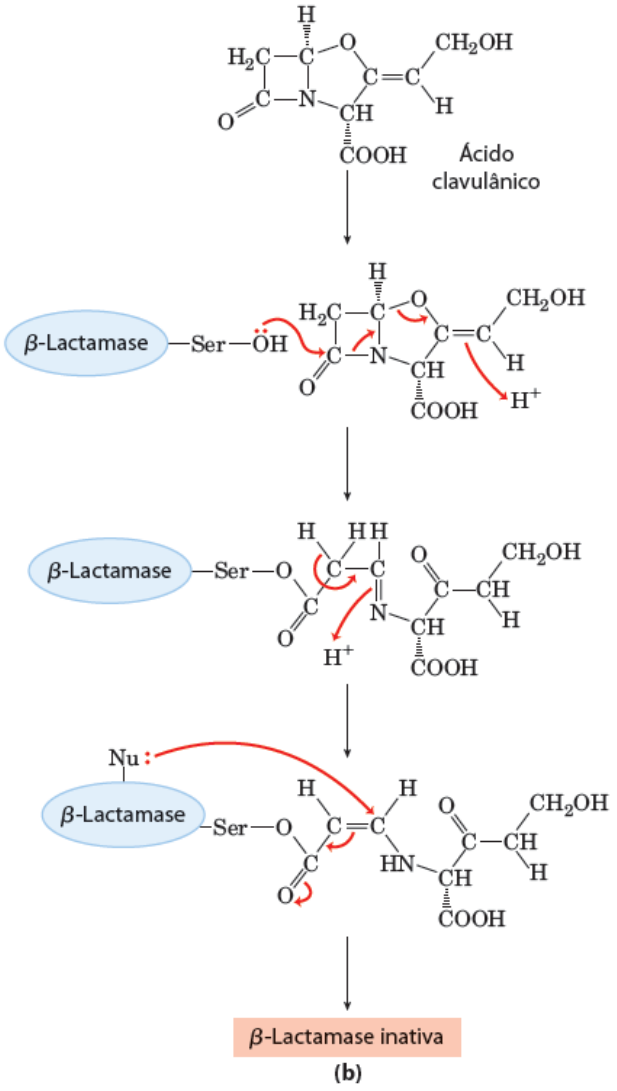


FIGURA 6-31 **β-Lactamases e inibição de β-lactamases.** **(a)** As β-lactamases promovem a clivagem do anel β-lactâmico dos antibióticos β-lactâmicos, inativando-os. **(b)** O ácido clavulânico é um inibidor suicida que usa o mecanismo químico normal das β-lactamases para formar uma espécie reativa no sítio ativo. Esta espécie reativa é atacada por um grupo nucleofílico (Nu:) no sítio ativo que acila irreversivelmente a enzima.

As enzimas podem ser Inibidas

Inibidores Reversíveis

→ Dissociação rápida do Inibidor da Enzima

- Ligam-se à Enzima por múltiplas ligações não-covalentes

- Importante mecanismo de regulação da atividade de Enzimas Alostéricas

Inibidores competitivos: São similares aos substratos

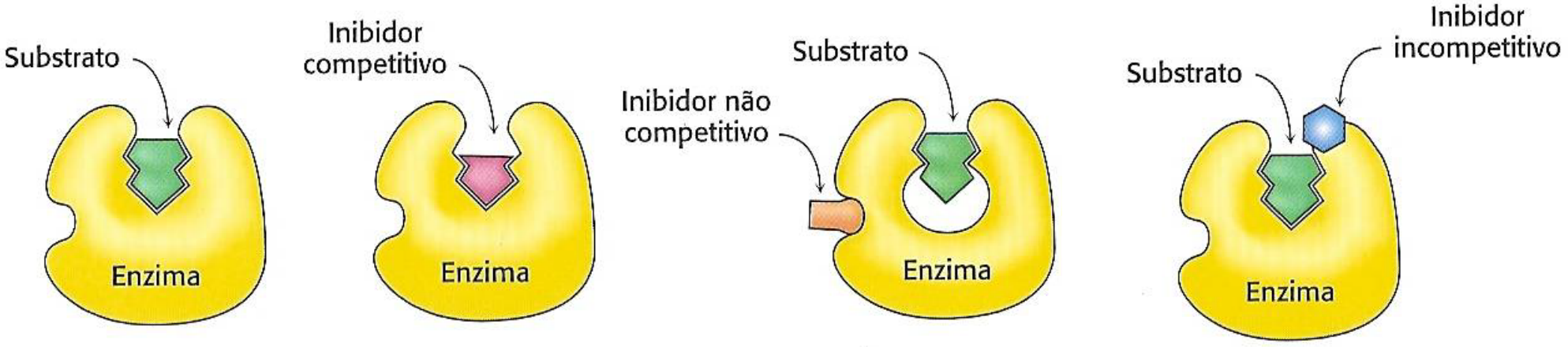
Interagem no sítio ativo → sem formação do complexo **ESI**

Inibidores não-competitivos: São diferentes aos substratos

Interagem numa região diferente do sítio ativo → com a formação do complexo **ESI**

Inibidores Incompetitivos → Interage somente com o complexo **ES**

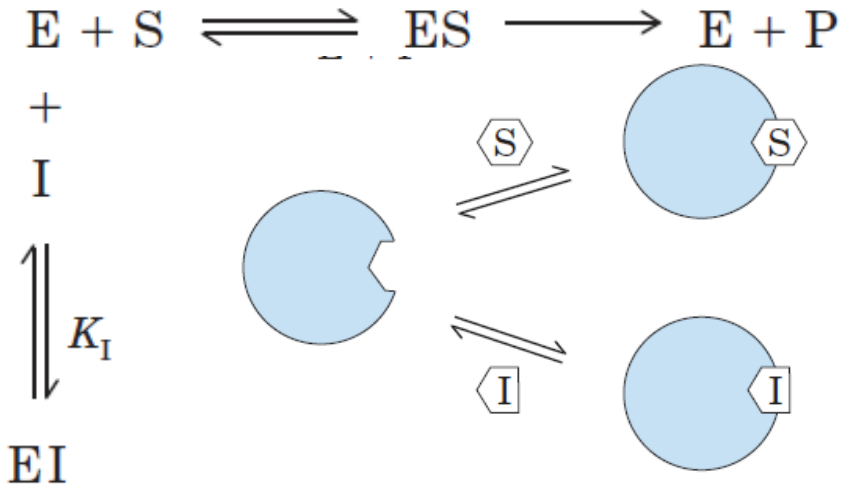
Inibidores mistos → Interage tanto com o complexo **ES** como com a **E**



Inibidores Competitivos

Reduzem a V da Reação por reduzir a proporção de E ligadas ao S

- → Modificam a K_M por um fator **α**
- → Não Modificam a V_{max}
- → Competem com o **S** pelo sítio ativo da **E**
- → Pode ser deslocado pelo aumento da **[S]**

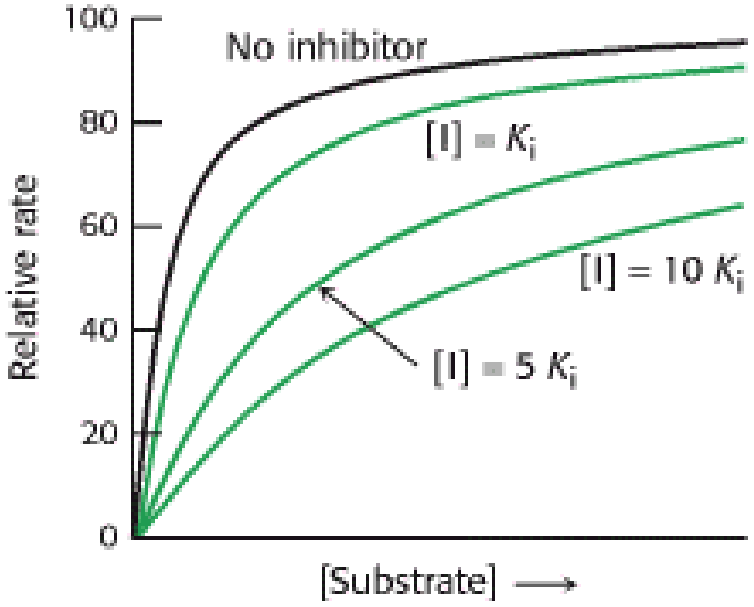


$$K_M^{Ap} = K_M.\alpha$$

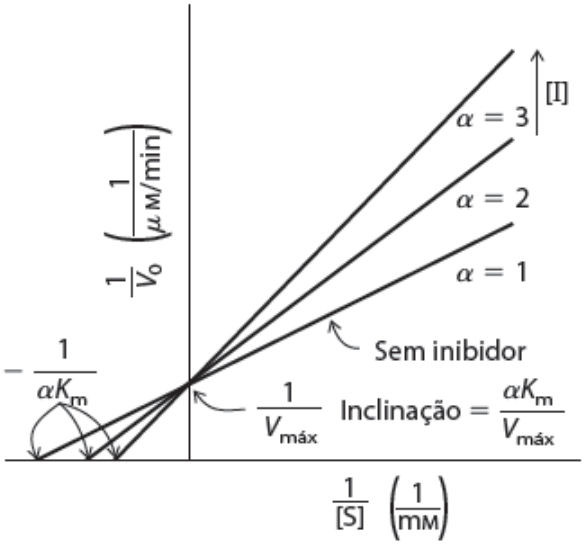
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M\alpha + [S]}$$



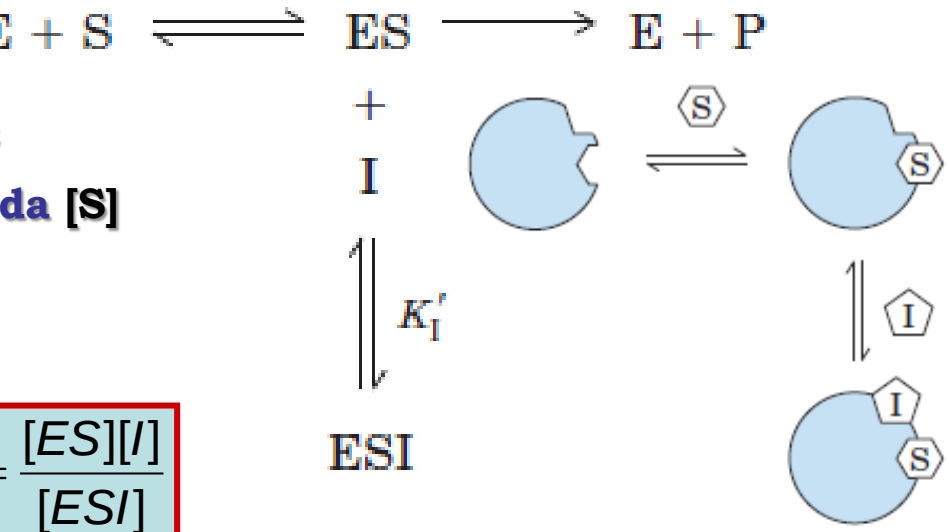
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

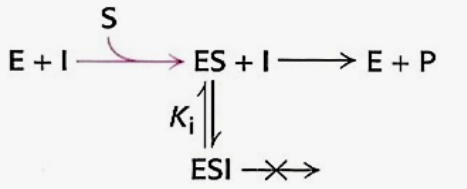


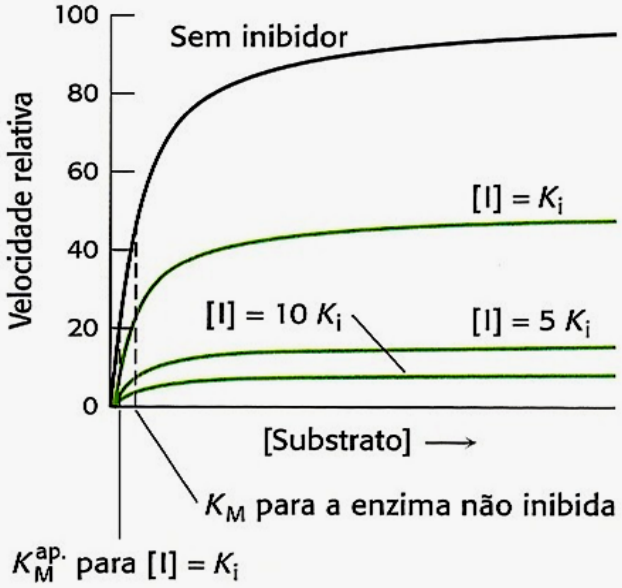
Inibidores Incompetitivos

Inibidor liga somente no Complexo ES pré-formado

- → Modificam a K_M e a V_{max} por α'
- → Reduzem o valor de K_M
- → Reduzem o número de renovação da E
- → Não pode ser deslocado pelo aumento da [S]





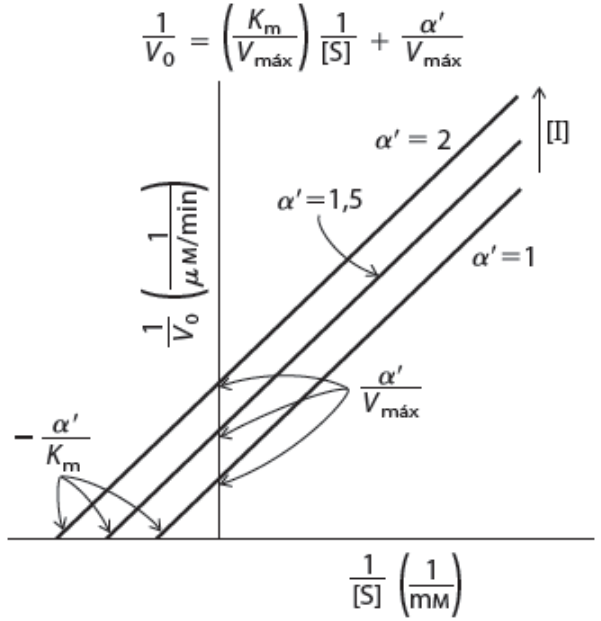


$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S].\alpha'}$$

Em alta [S]

$$V_0 = \frac{V_{max}}{\alpha'}$$



Inibidores mistos

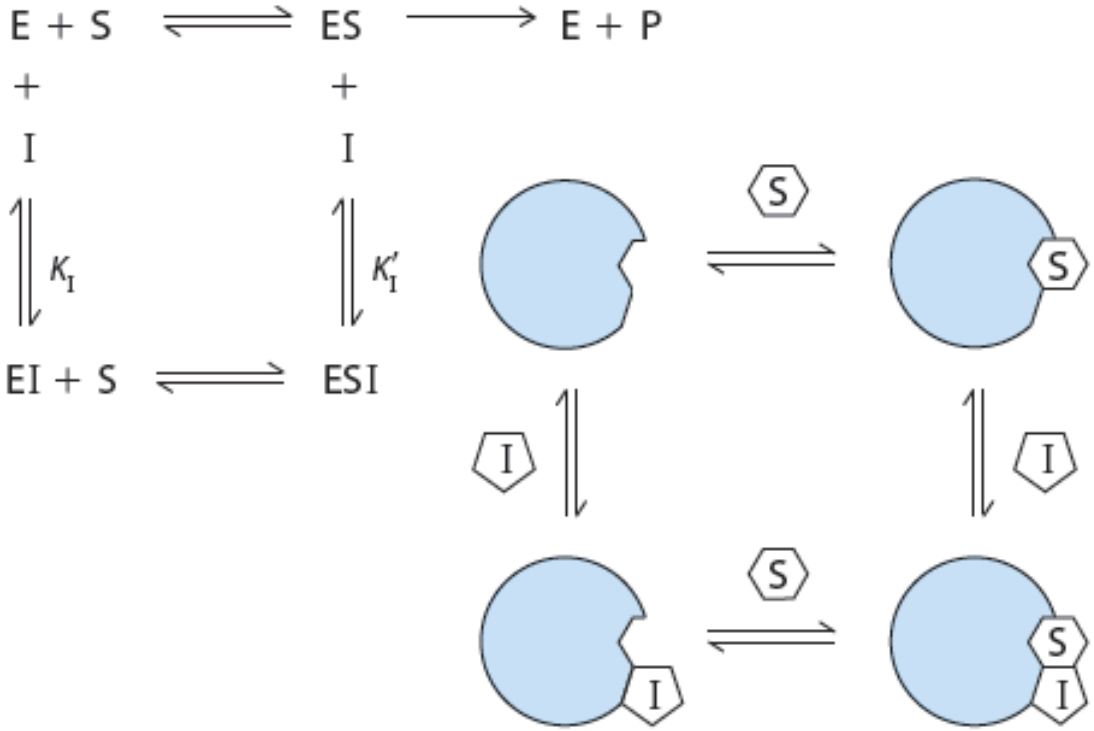
Inibidor liga num sítio distinto do Sítio ativo tanto na E como no complexo ES pré-formado

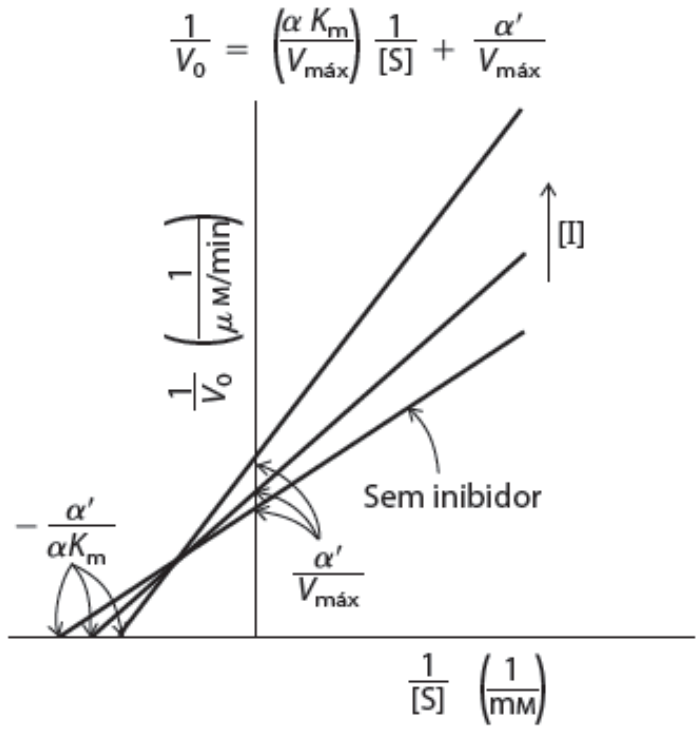
- → Modificam ambos K_M e a V_{max} por fator dependente de α e α'
- → Reduzem o número de renovação da E
- → Não pode ser deslocado pelo aumento da [S]

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M\alpha + [S]\alpha'}$$

$$\alpha = 1\frac{[I]}{K_I} \qquad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$





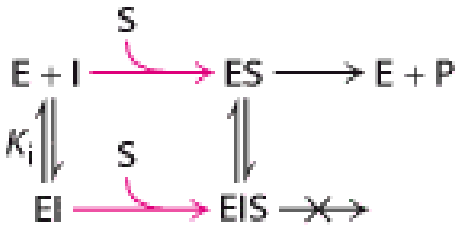
Inibidores Não-competitivos

Raramente encontrados → pode ser tratado como tipo especial de inibidor misto

Inibidor liga num sítio distinto do Sítio ativo tanto na E como no complexo ES pré-formado

- → Não Modificam a K_M
- → Modificam a V_{max} por fator de α
- → Reduzem o número de renovação da E
- → Não pode ser deslocado pelo aumento da [S]

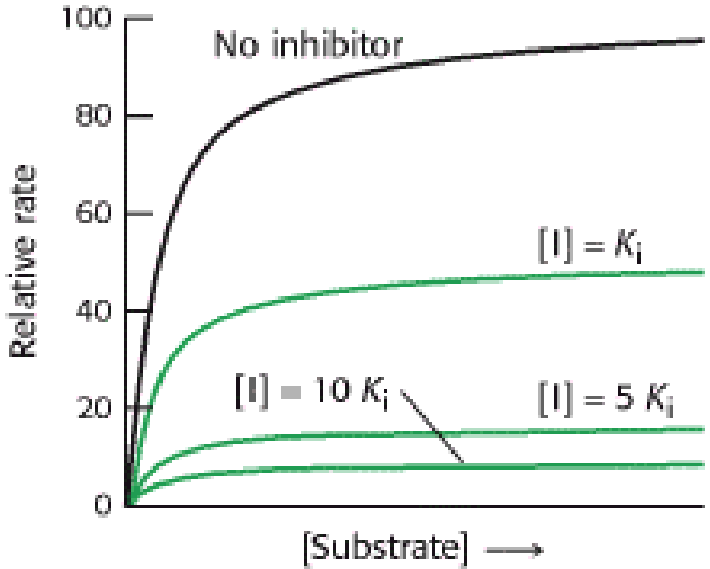
$$V_{max}^{Ap} = \frac{V_{max}}{\alpha} \therefore V_{max} = V_{max}^{Ap}.\alpha$$

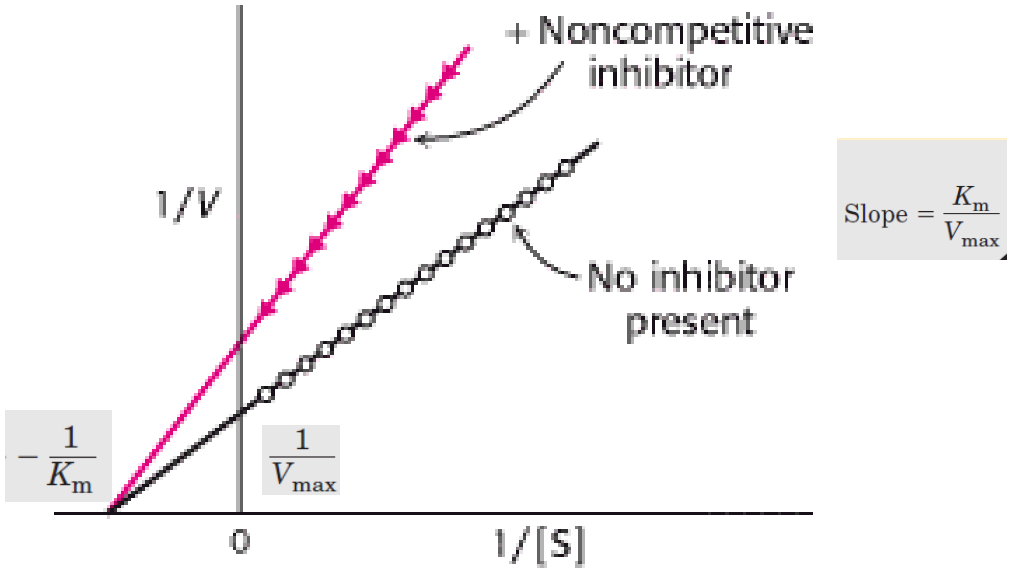


$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$V_0 = \frac{V_{max}^{Ap}\left(\frac{1+[I]}{K_i}\right)[S]}{K_M + [S]}$$





Enzimas Alostéricas

→ Não obedecem a Cinética de Michaelis-Menten

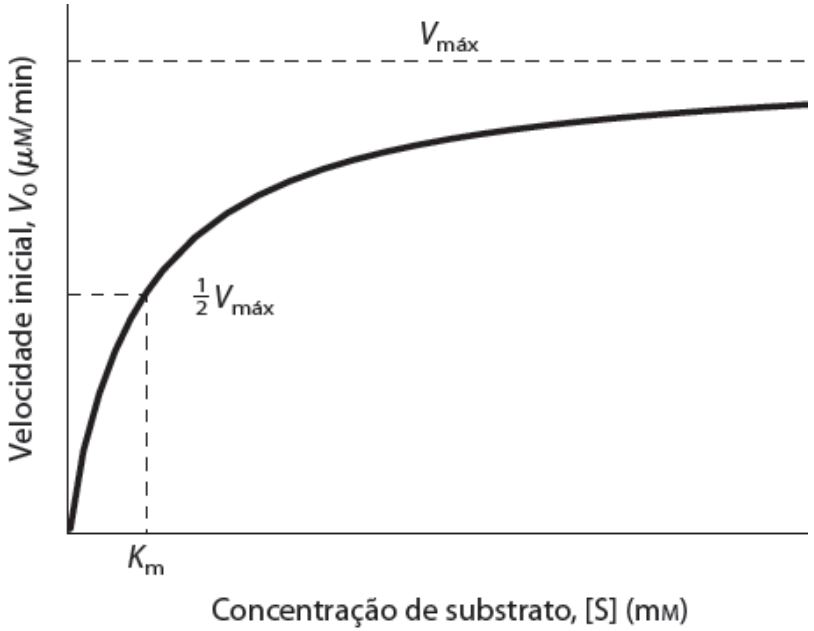
→ Quanto maior a [S] maior (ou menor) será a atividade da E até esta alcançar o V_{max}

→ A curva da V *versus* [S] é sigmóide

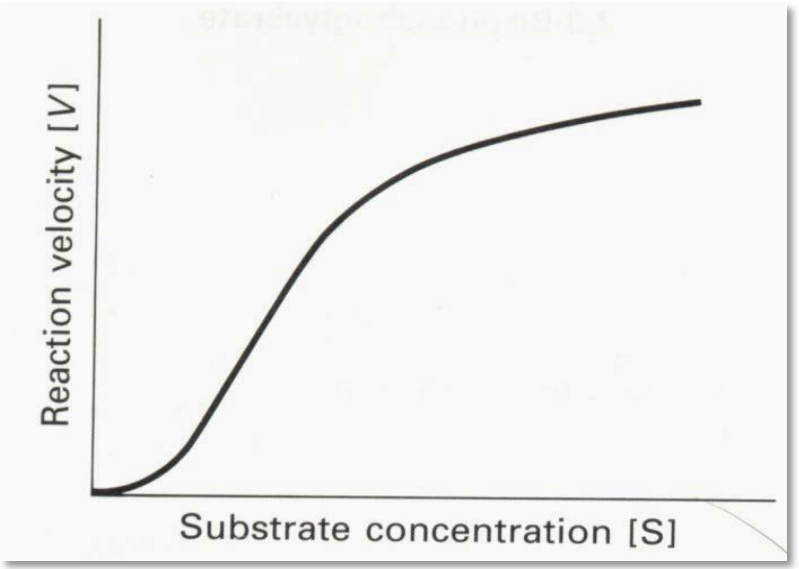
- Segue modelo da curva de saturação da Hemoglobina com O_2

→ Sistema cooperativo → responde a presença de um modulador

Cinética de Michaelis-Menten



Cinética de enzimas Alostéricas



Enzimas Alostéricas

→ Tipos de enzimas e reguladores

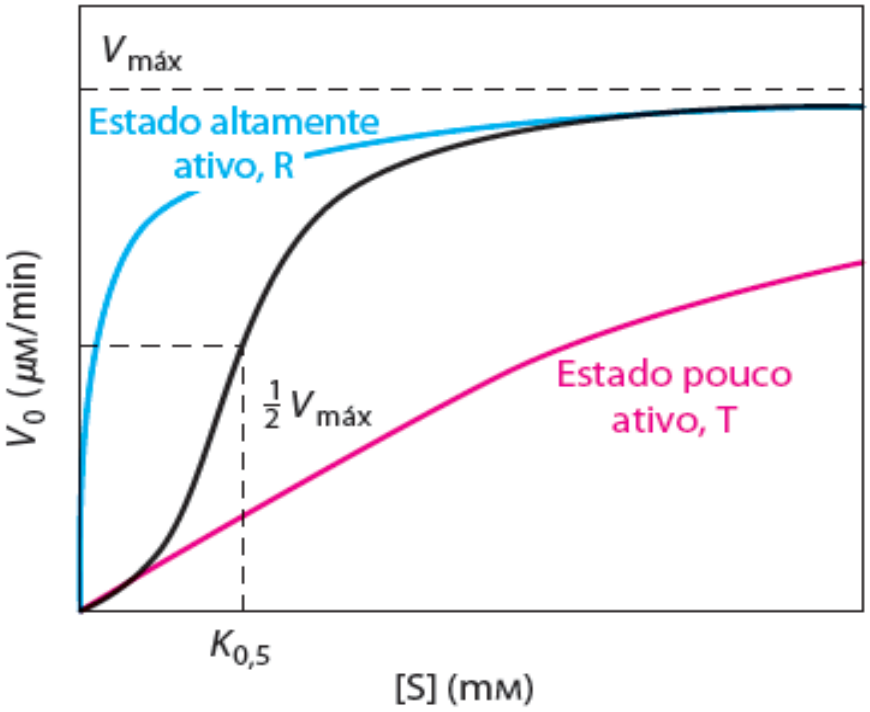
Enzima hemeotrópica
O substrato é o modulador
Sítio ativo = regulador

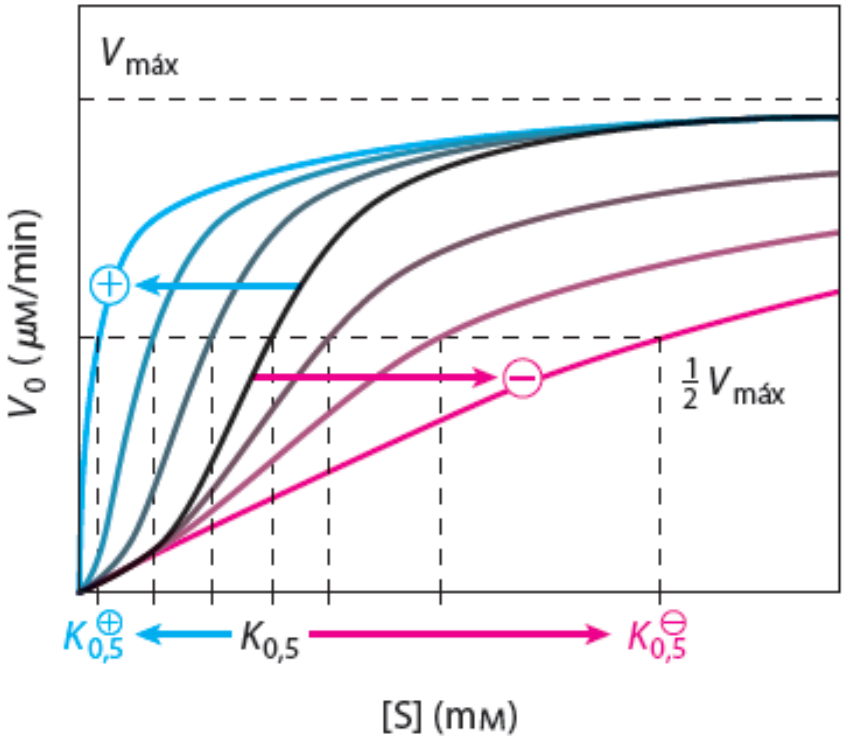
Enzima heterotrópica
Outra molécula é o modulador
Sítio ativo # regulador

Existem modelos matemáticos que ajustam as curvas!

K_M → $K_{0,5}$

Modulação positiva e negativa são possíveis



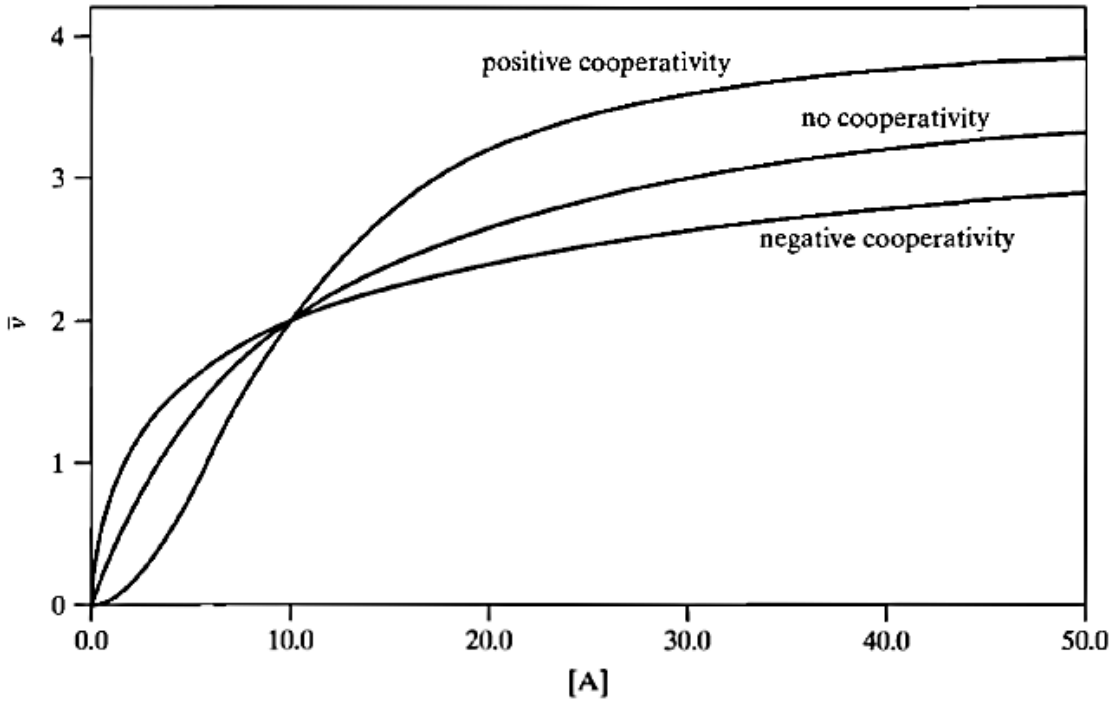


Enzimas Alostéricas

O grau de cooperatividade pode ser avaliada pelo

Coeficiente de Hill = n_H

- **n_H = 1 → interação não cooperativa**
- **n_H > 1 → cooperatividade positiva**
- **n_H < 1 → cooperatividade negativa**



Relação entre o coeficiente de Hill e o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação de enzimas alostéricas

Coeficiente de Hill (n_H)	Mudança requerida na [S] para aumentar a V_0 de 10% para 99% da $V_{máx}$
0,5	× 6.600
1,0	× 81
2,0	× 9
3,0	× 4,3
4,0	× 3

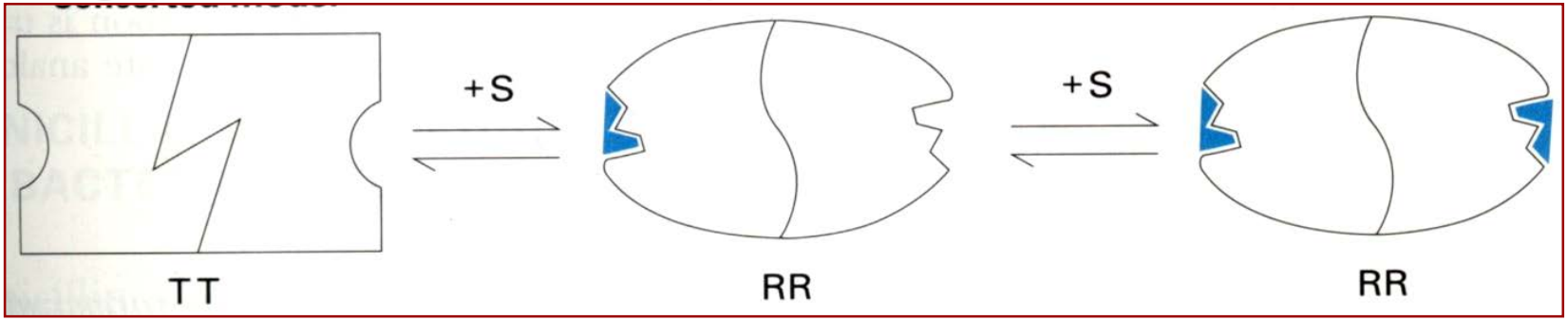
Enzimas Alostéricas

Modelos de interação entre E alostéricas e S

O S desloca o equilíbrio da enzima alostérica de uma conformação Tensa T para uma relaxada R

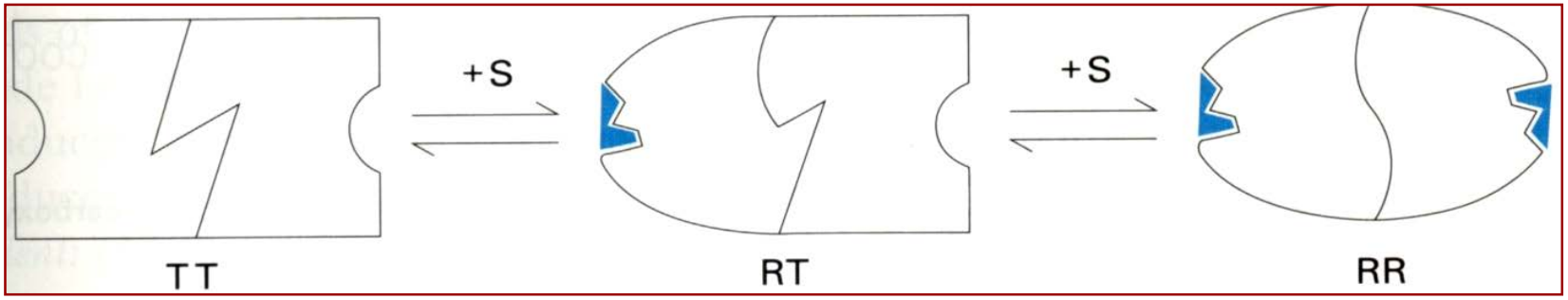
Modelo em Concerto ou simultâneo:

→ **A ligação de S muda a conformação das subunidades da E simultaneamente**



Modelo Sequencial (envolve o conceito de ajuste induzido):

→ **A ligação de S não muda a conformação das subunidades da E simultaneamente**



Enzimas Alostéricas

São pontos importantes de regulação

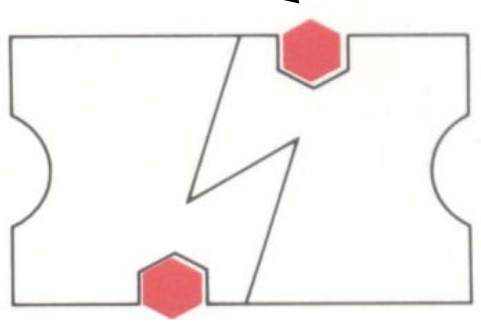
- A velocidade de uma enzima regula a velocidade de via

Permite um ajuste fino das vias catalíticas

➔ **Muitas enzimas alostéricas possuem estrutura quaternária**

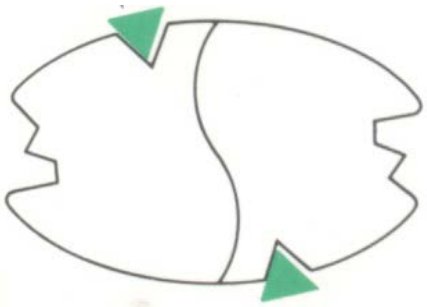
Modulador negativo

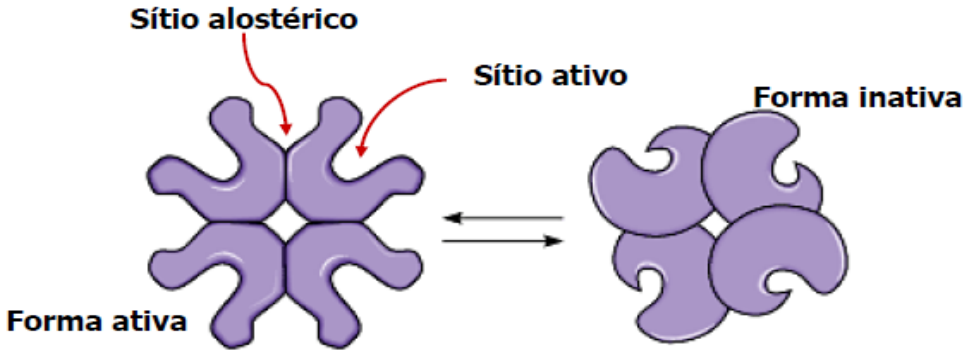
Desloca o equilíbrio para a forma T



Modulador positivo

Desloca o equilíbrio para a forma R





Modificações conformacionais – E alostérica



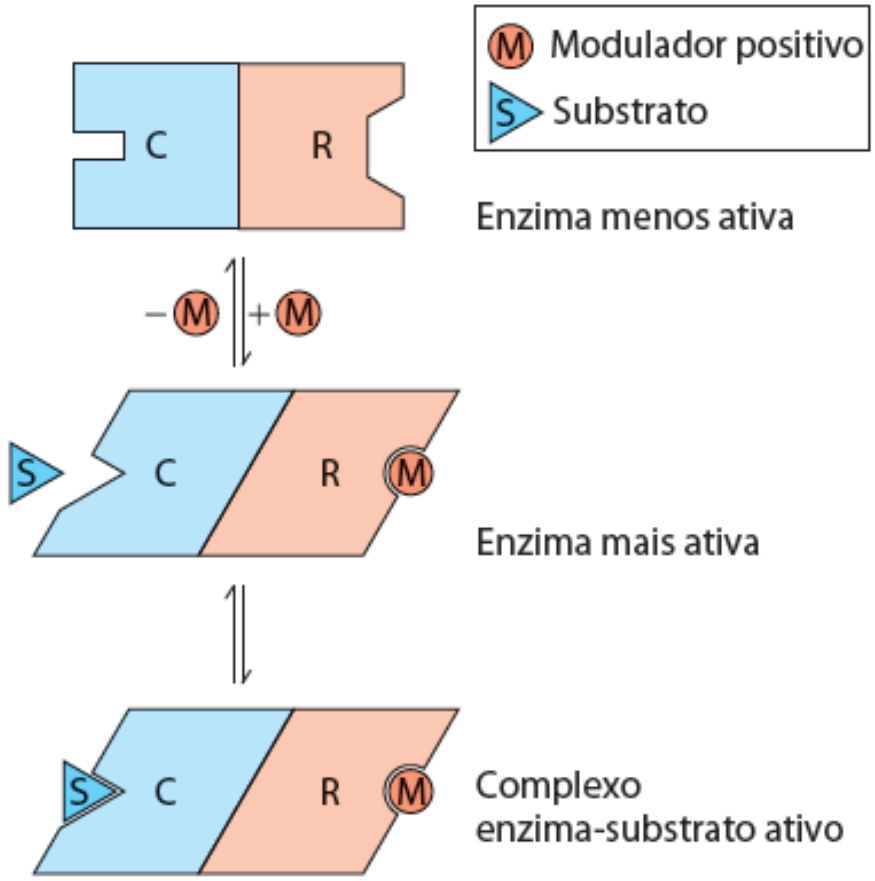


Enzimas Alostéricas

São pontos importantes de regulação

➔ **Enzimas alostéricas podem contar com subunidades regulatórias sem atividade enzimática**

➔ **Heteroligômeros**

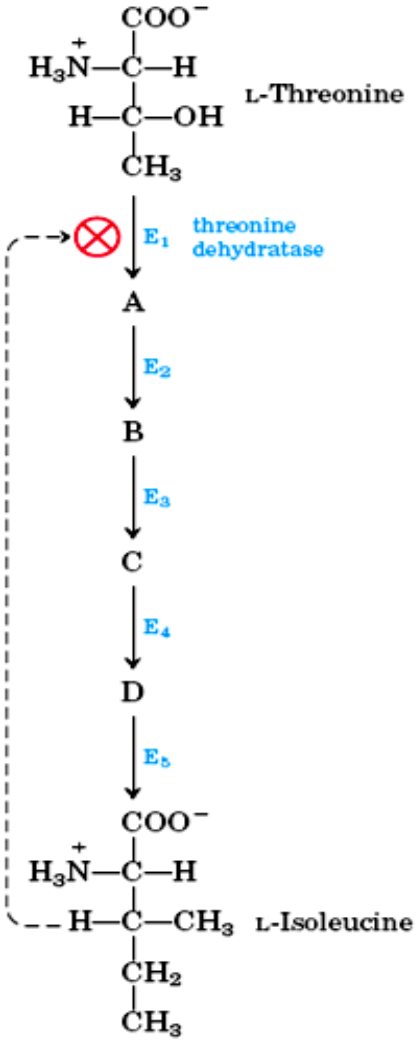


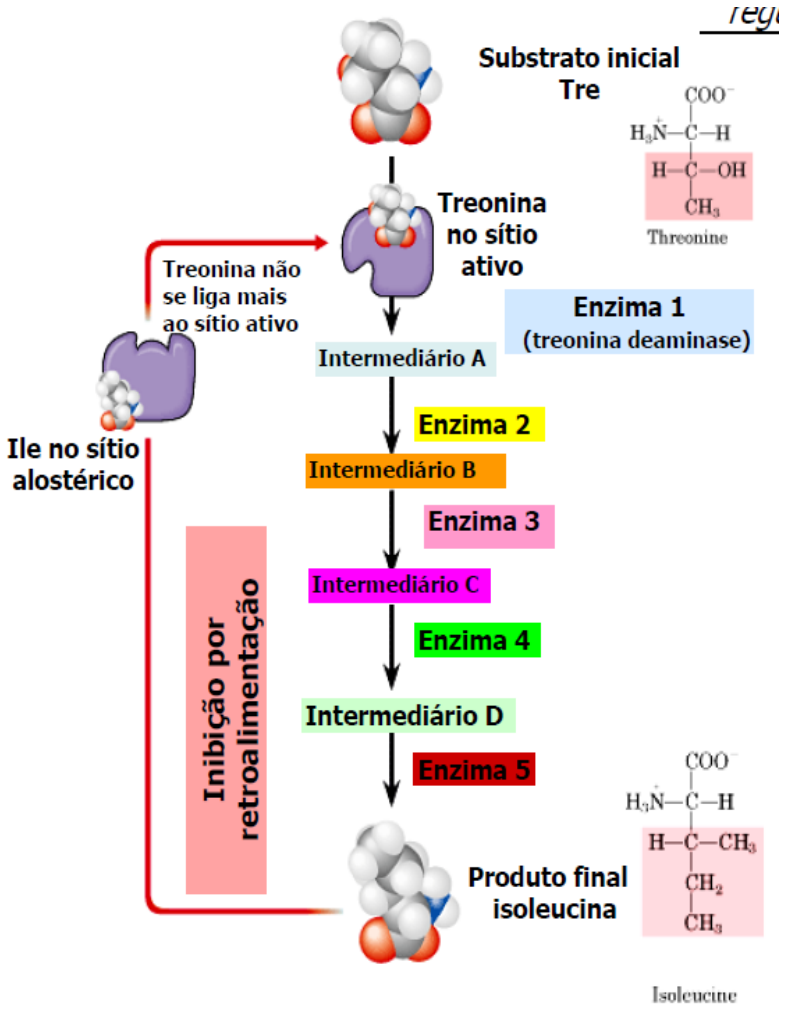
Regulação da atividade enzimática

→ Regulação Alostérica → Feedback inhibition – retroalimentação negativa

-O produto final de uma cascata reacional inibe uma enzima chave anterior na cascata

- Ajuste fino constante





Regulação da atividade enzimática

→ **Intimamente relacionado com o balanço de síntese e degradação**

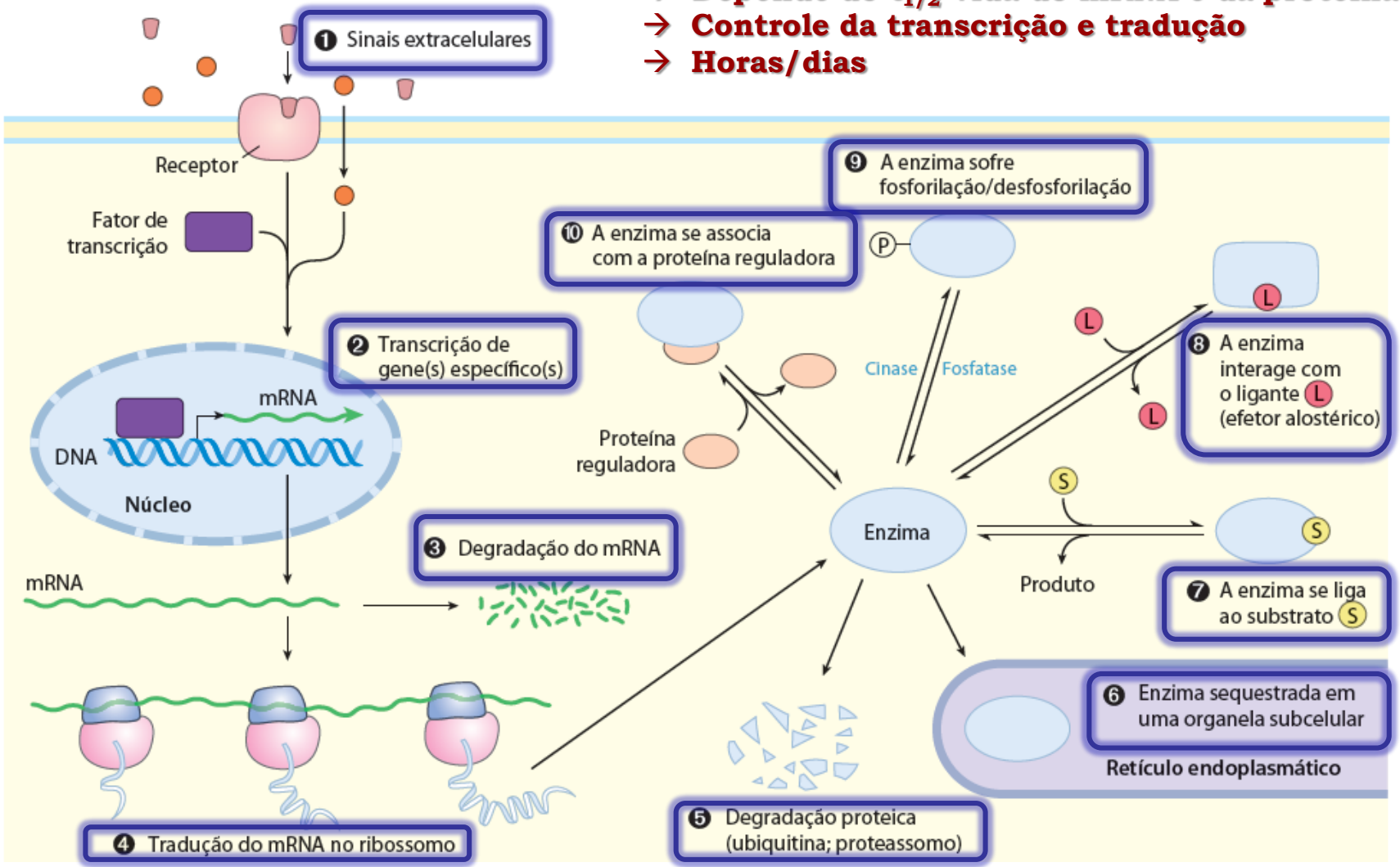
→ **Regulação é tempo-dependente**

1-5: Indução, síntese e degradação

→ **Depende do $t_{1/2}$-vida do mRNA e da proteína**

→ **Controle da transcrição e tradução**

→ **Horas/dias**



6- sequestro celular
→ **minutos**

7- Isoenzimas e relação $[S]/K_M$
→ **<seg**

8- controle alostérico
→ **< seg**

9- modificação covalente
→ **seg/min**

10- interação com regulador
→ **Variável**
→ **Depende dos demais**

Regulação da atividade enzimática

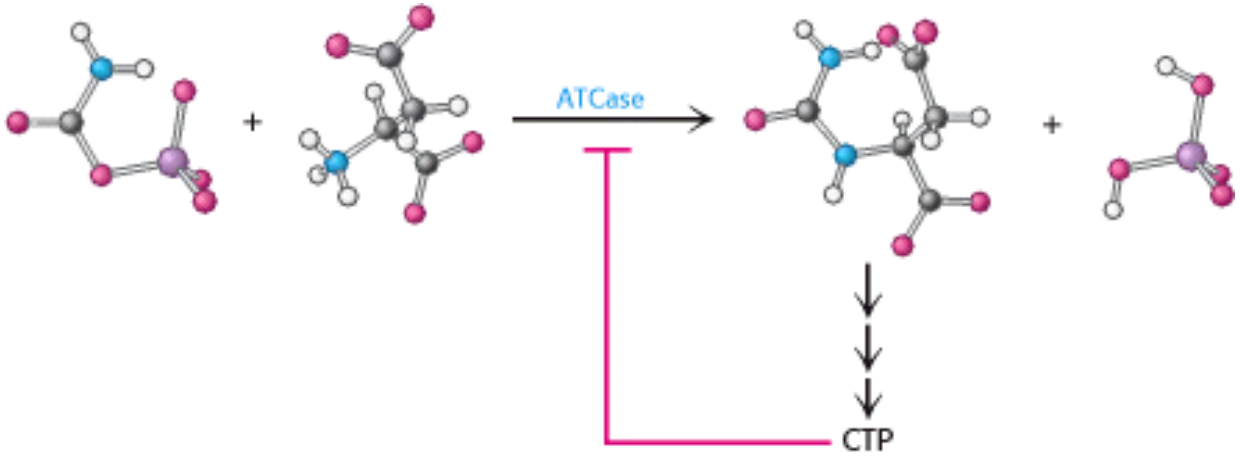
Aspartato Transcarbamoilase – ATCase

Catalisa a condensação de Asp com Carbamoil-fosfato

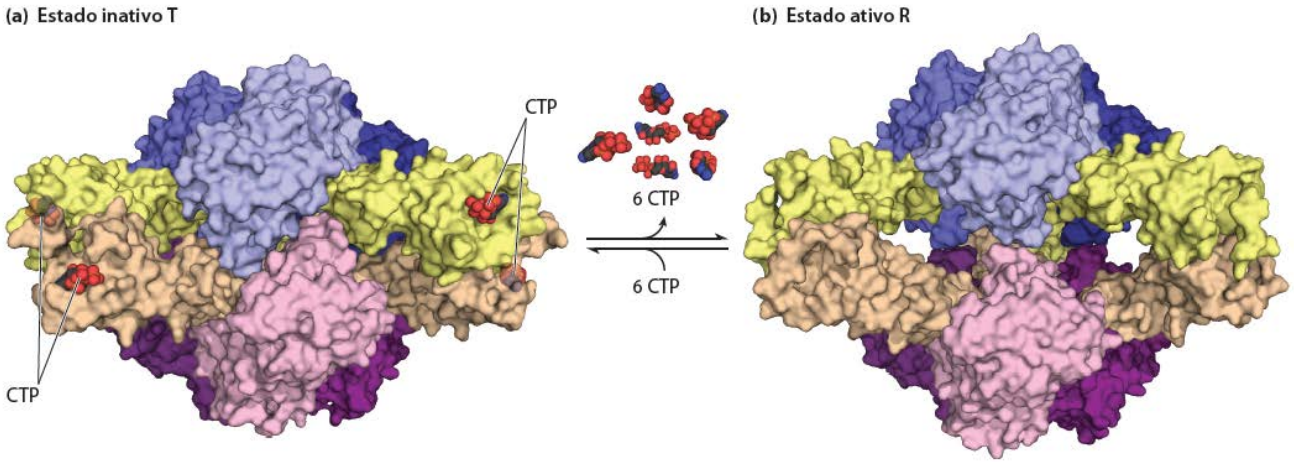
→ 1º passo da cascata de síntese de CTP – Citidina trifosfato

- Sofre inibição por retroalimentação negativa pelo CTP

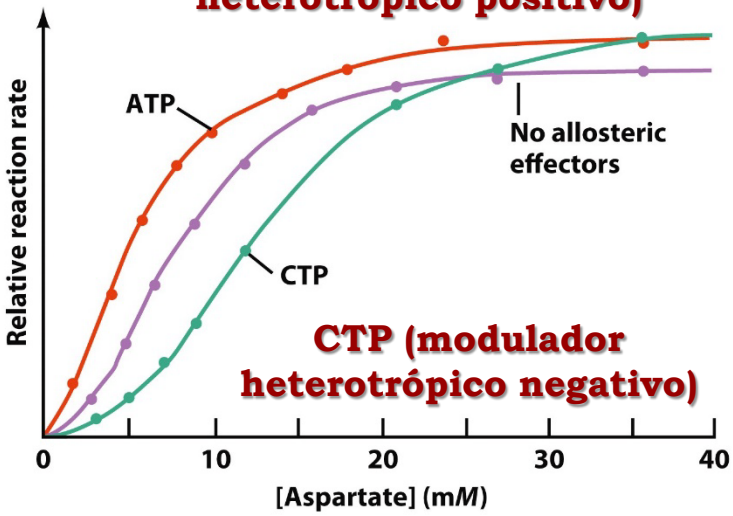
- Sofre ativação por interação com ATP







ATP (modulador heterotrópico positivo)



CTP (modulador heterotrópico negativo)

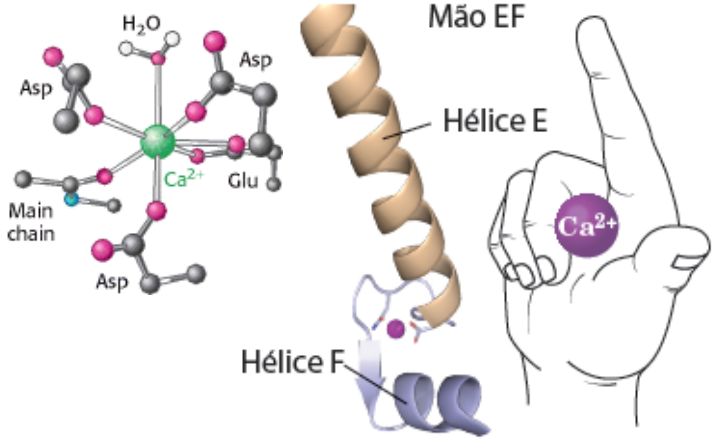
Regulação da atividade enzimática

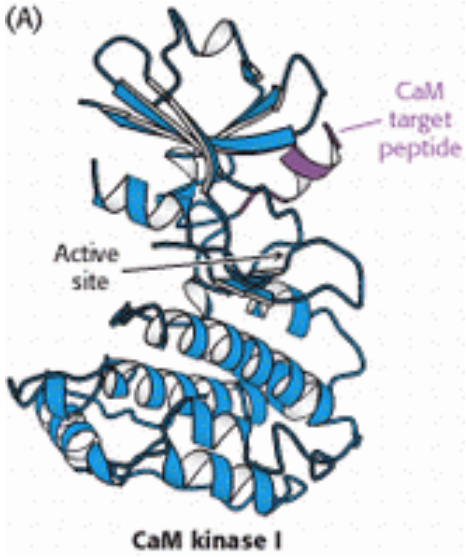
→Proteínas regulatórias → Calmodulina

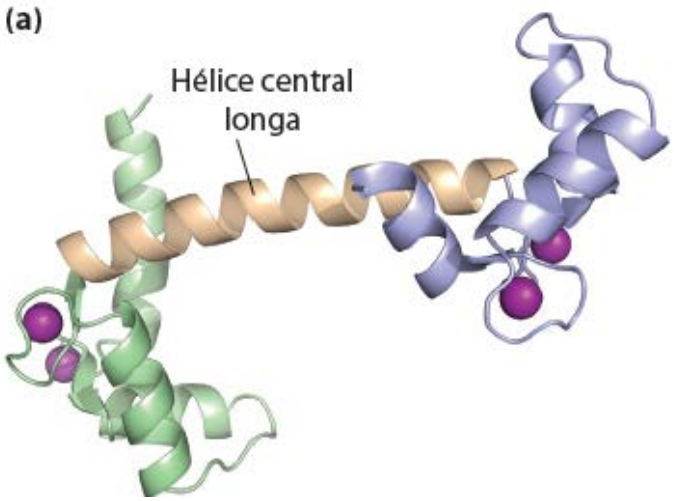
- Proteína ubíqua sensor de Cálcio

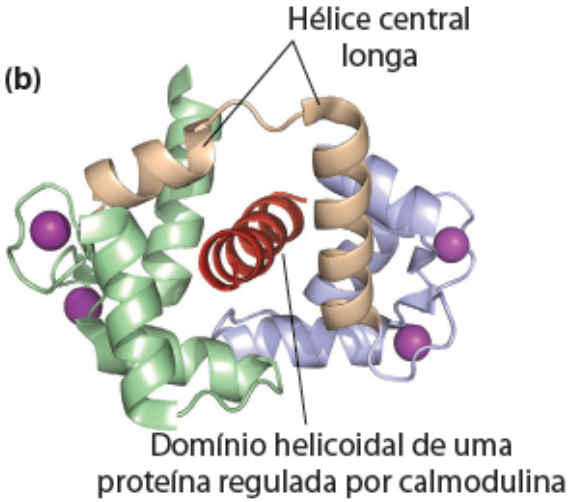
- Ca^{++} é um importante sinalizador intracelular – segundo mensageiro

Calmodulina liga Ca++ pelo motivo Hélice-Volta-Hélice





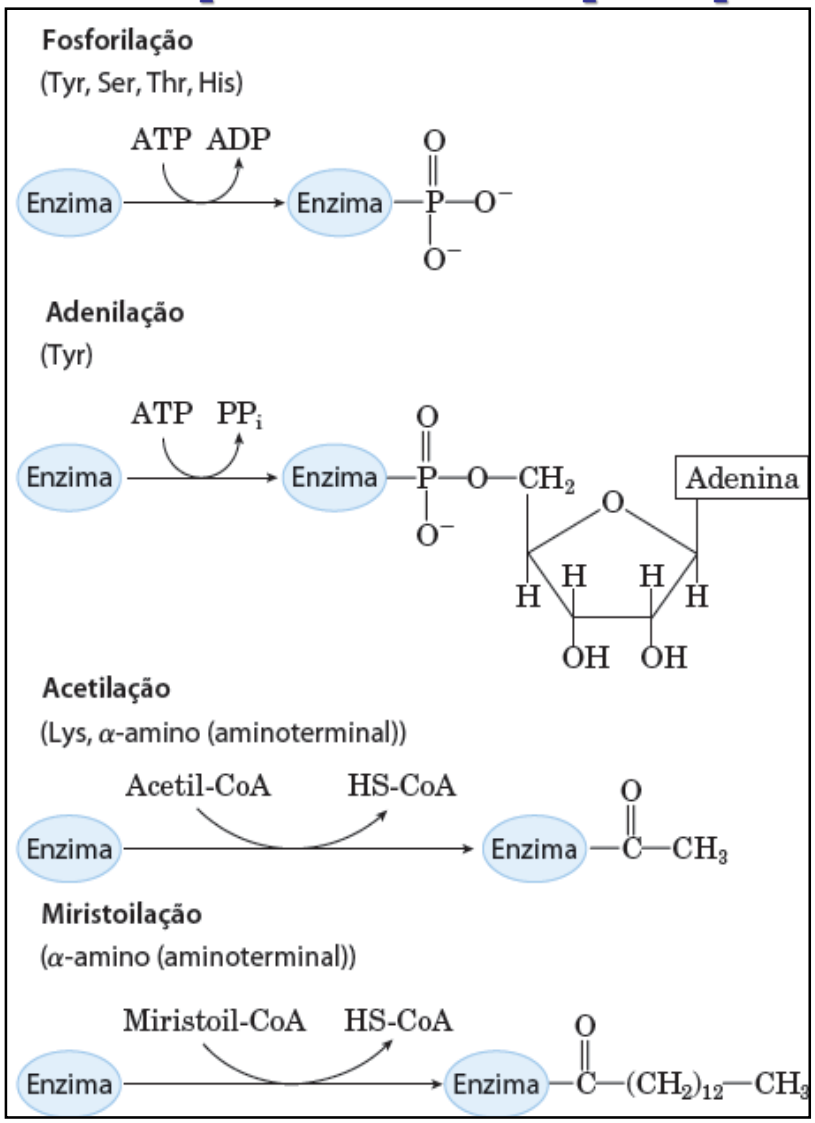


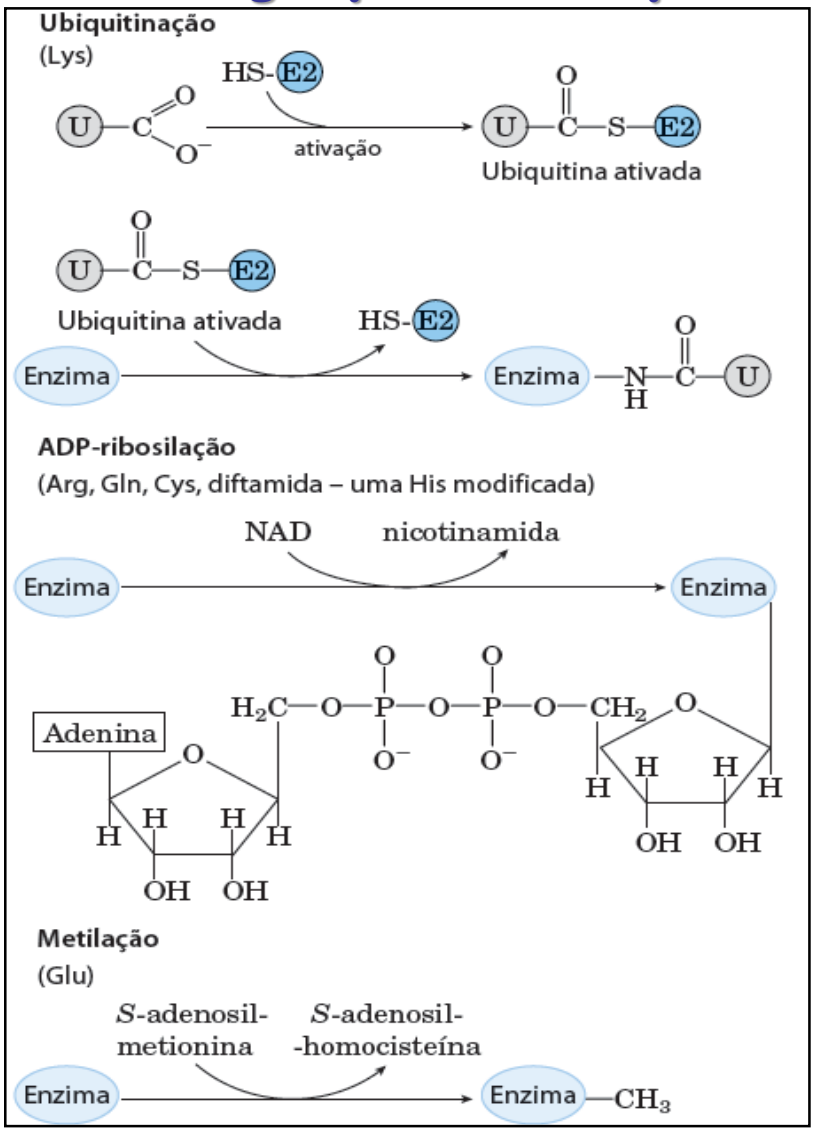


Regulação da atividade enzimática

→Modificações covalentes reversíveis

→ Representa um dos principais mecanismos de regulação e sinalização



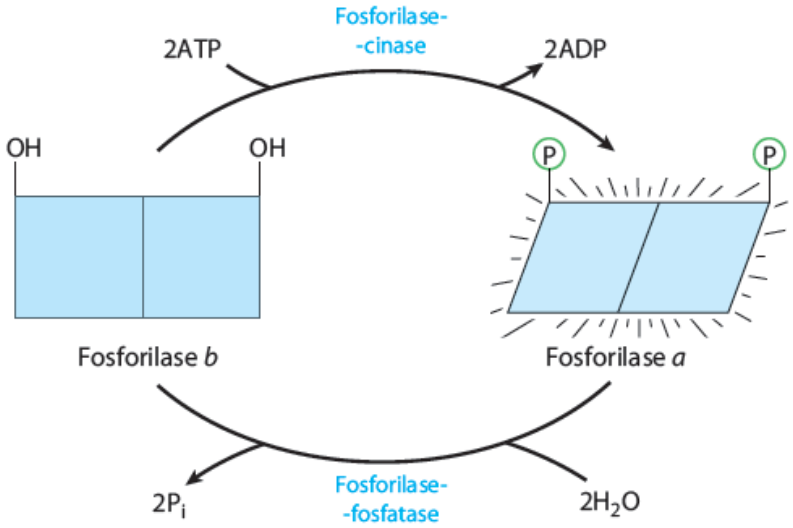


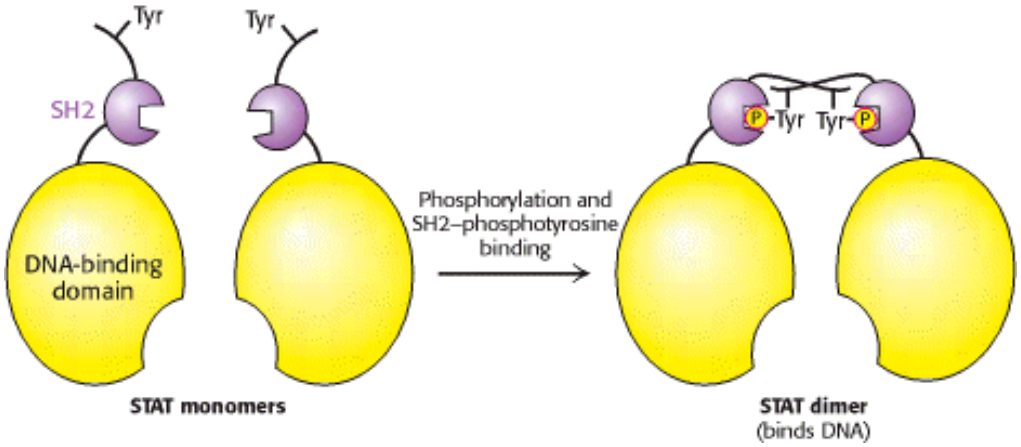
Regulação da atividade enzimática

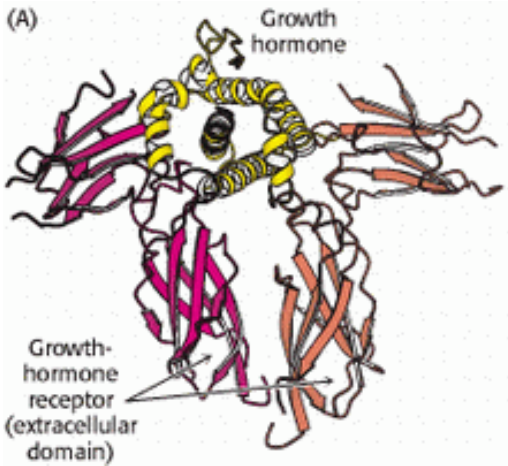
→ Modificações covalentes reversíveis

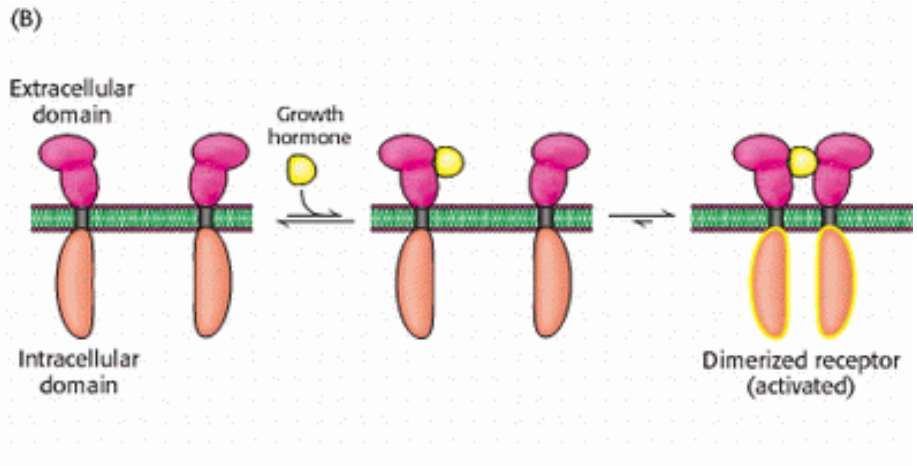
→ fosforilação/desfosforilação → Quinases/fosfatases

- Modifica a polaridade da proteína → mudança conformacional → efeitos secundários









Universidade de São Paulo
Brasil

Instituto de Química de São Carlos

Regulação da atividade enzimática

→ Múltiplas fosforilações

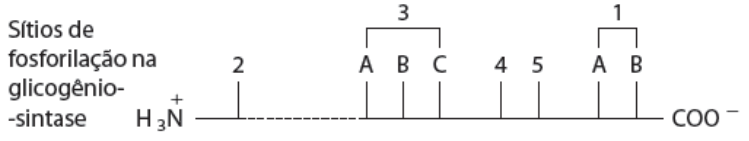
São sítio específicas → Podem ativar ou inibir

- Fosforilação específica em resíduos de Ser, Thr e Tyr → forma sítios de ligação

→ Hierarquia de fosforilação → uma acontece se outra já tiver acontecido

TABELA 6-10 Sequências de consenso das proteínas-cinases

Proteína-cinase	Sequência de consenso e resíduos fosforilados
Proteína-cinase A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B
Proteína-cinase G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Proteína-cinase C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Proteína-cinase B	-x-R-x-[ST]-x-K
Ca^{2+}/calmodulina-cinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B
Ca^{2+}/calmodulina-cinase II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Cinase da cadeia leve da miosina (músculo liso)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Fosforilase-*b*-cinase	*-K-R-K-Q-I-S-V-R*
Cinase regulada por sinal extracelular (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Proteína-cinase dependente de ciclina (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Caseína-cinase I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B*
Caseína-cinase II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
Cinase do receptor β-adrenérgico	-[DE](*n*)-[ST]-x(3)
Rodopsina-cinase	-x(2)-[ST]-E(*n*)-
Cinase do receptor de insulina	-x-E(3)-Y-M(4)-*K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G*-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D
Cinase do receptor do fator de crescimento do epitélio (EGF)	*-E(4)-Y-F-E-L-V*



Cinase	Sítios de fosforilação	Grau de inativação da síntese
Proteína-cinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína-cinase G	1A, 1B, 2	+
Proteína-cinase C	1A	+
Ca^{2+}/calmodulina-cinase	1B, 2	+
Fosforilase *b* cinase	2	+
Caseína-cinase I	Pelo menos nove	+ + + +
Caseína-cinase II	5	0
Glicogênio-sintase-cinase 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glicogênio-sintase-cinase 4	2	+

FIGURA 6-37 **Múltiplas fosforilações regulatórias.** A enzima glicogênio-sintase tem pelo menos nove sítios separados, localizados em cinco regiões, suscetíveis à fosforilação por uma das proteínas-cinases celulares. Portanto, a regulação dessa enzima não é binária (liga/desliga), mas é modulada finamente com uma grande amplitude em resposta a uma gama de sinais.

Regulação da atividade enzimática

Expressão diferencial de Isoenzimas

→Enzimas que catalisam a mesma reação mas com diferentes atividades expressas em diferentes tecidos/orgãos ou período

- São similares em Estrutura 1º, 2º, 3º e 4º

- Possuem o mesmo mecanismo de catálise

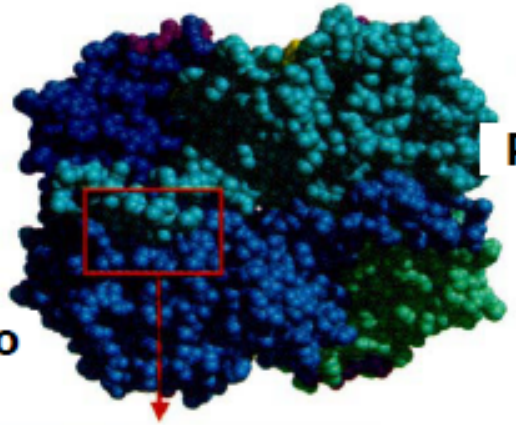
- Podem diferir nos parâmetros cinéticos (K_M) e nos mecanismos de regulação

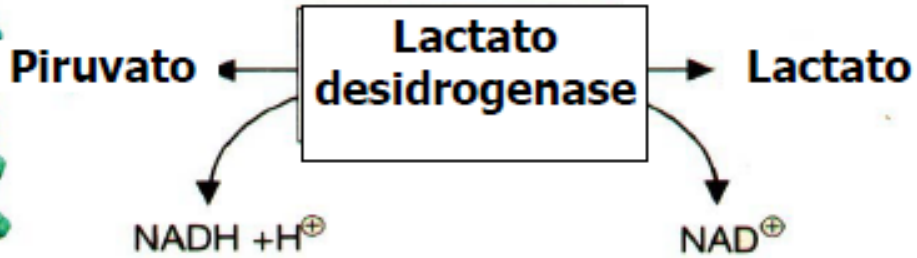
→ Lactato Desidrogenase – Isoenzima H (coração) e M (muscular) → 75% idênticas

- H → apresenta K_M por piruvato mais alto do que M e é inibida por piruvato

- Não deve usar piruvato para regenerar NAD+

- M → pode usar Piruvato para regenerar NAD+ e gerar lactato



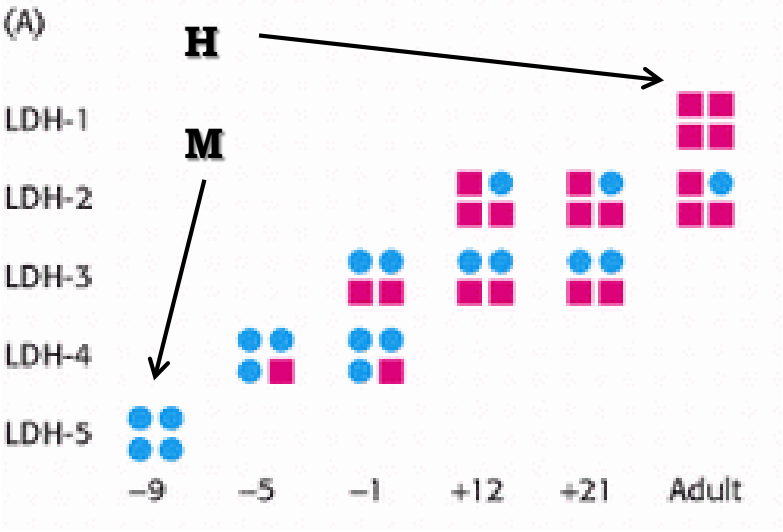


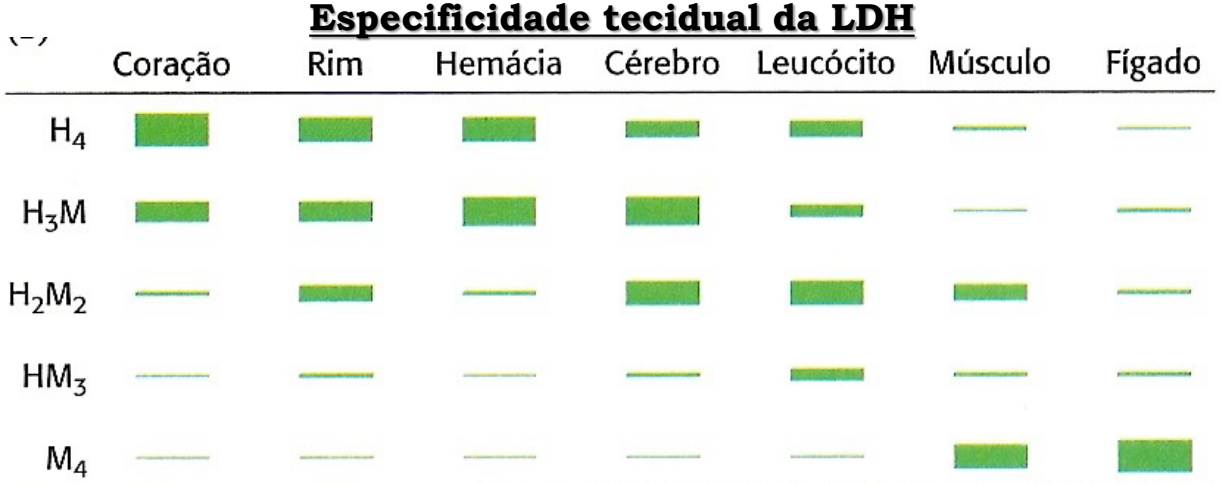
Regulação da atividade enzimática

Expressão diferencial de Isoenzimas

→Enzimas que catalisam a mesma reação mas com diferentes atividades expressas em diferentes tecidos/orgãos ou período

→ Permitem um ajuste fino do metabolismo por satisfazer as necessidades de um tecido/orgão ou estágio de desenvolvimento

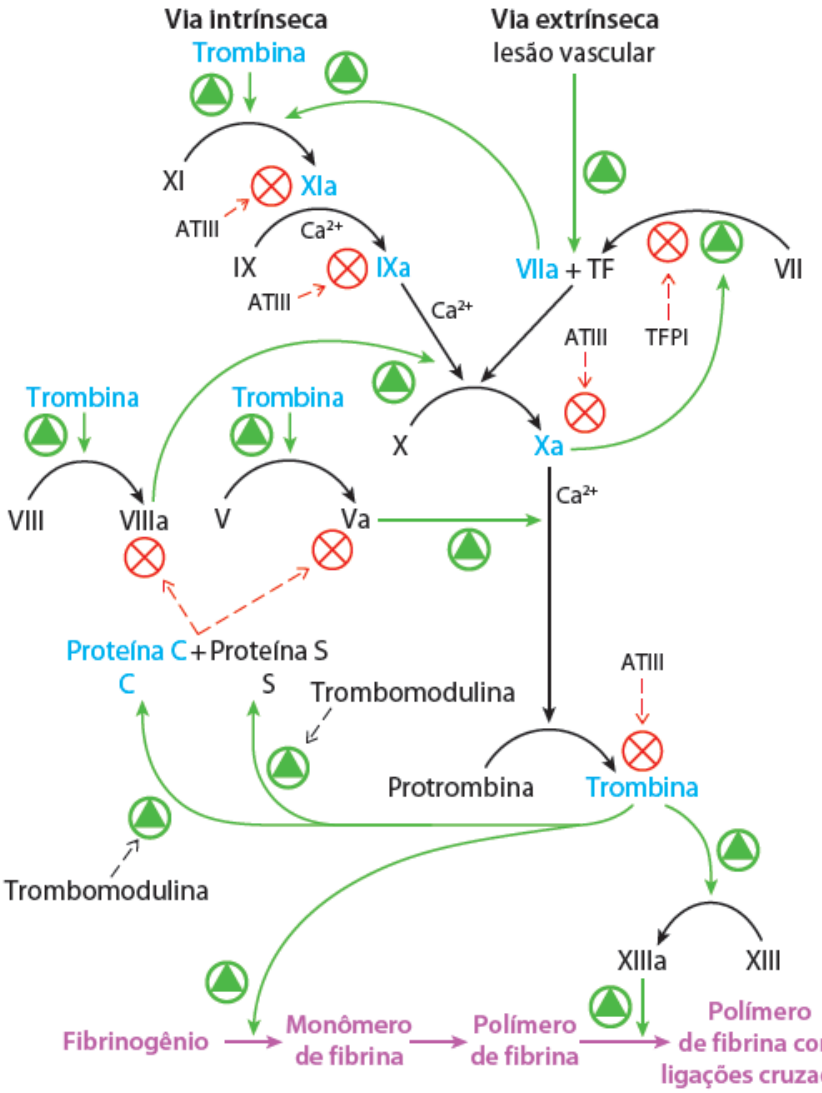


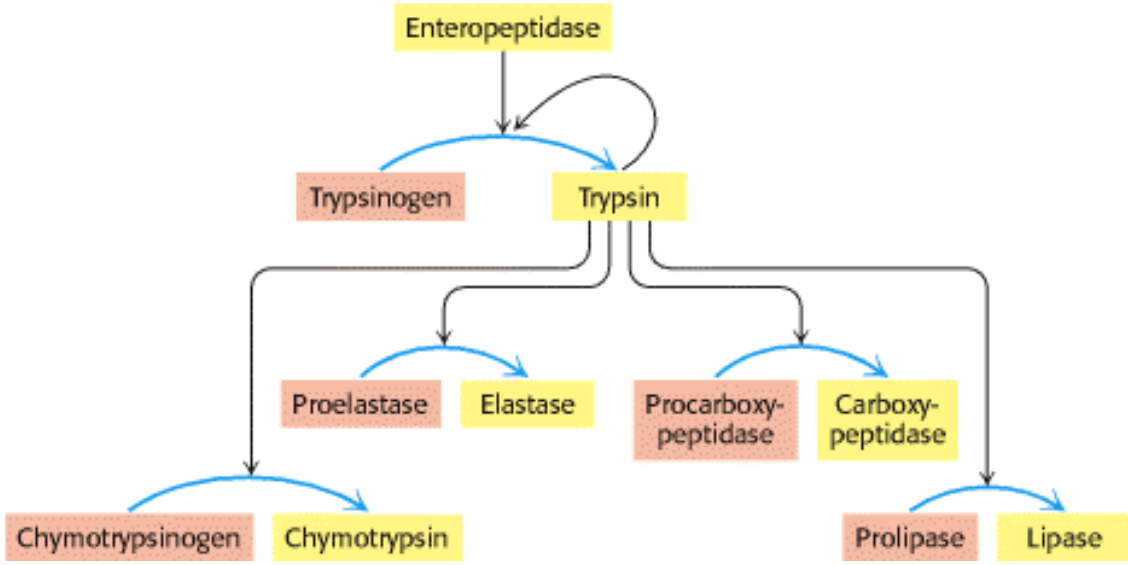


Regulação da atividade enzimática

→ Ativação proteolítica → Zimogênios

Vias da coagulação





→ Biosíntese de enzimas → Indução enzimática

Regulação da atividade enzimática

Múltiplos efeitos regulatórios

Ação coordenada

Alosteria

Modificação covalente

Hormônios
- via 2nds mensageiros
- Indução enzimática

