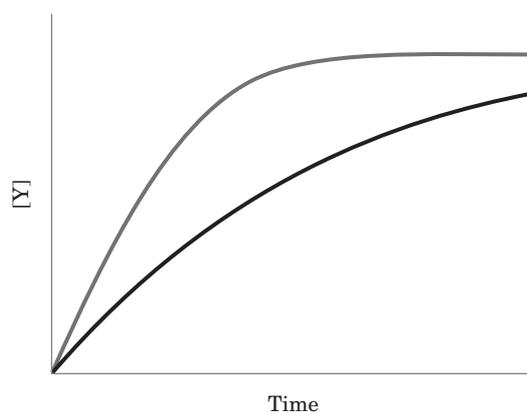
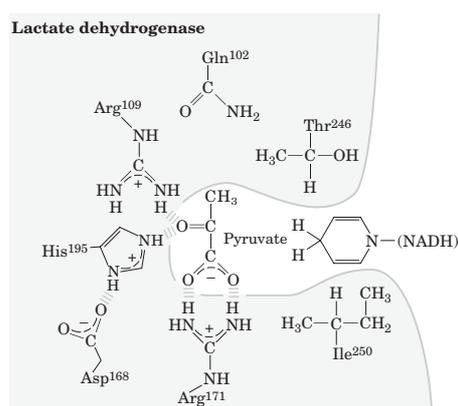


### Exercícios sobre cinética enzimática

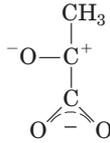
1. Uma enzima que catalisa a reação de conversão entre duas moléculas “X” e “Y” é isolada de duas espécies de bactérias. As enzimas possuem o mesmo  $V_{\max}$ , mas possuem valores de  $K_M$  diferentes. A enzima A possui  $K_M = 2.0 \mu\text{M}$ , enquanto que a enzima B possui  $K_M = 0.5 \mu\text{M}$ . O gráfico abaixo mostra a cinética de duas reações efetuadas com a mesma concentração de enzima e  $[X] = 1 \mu\text{M}$ . Qual curva corresponde a qual enzima?



2. O exame da estrutura de uma enzima permite formular hipóteses sobre a contribuição de cada aminoácido para a estrutura e para a atividade da enzima. Uma forma de testar essas hipóteses é usar técnicas de DNA recombinante para gerar mutantes, e examinar os efeitos das mutações sobre a estrutura e atividade da enzima. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que catalisa a redução de piruvato com NADH para formar lactato. Um esquema do sítio ativo da enzima, contendo piruvato e NADH ligados, está mostrado abaixo:



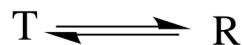
O mecanismo da reação é similar ao mecanismo de outras reduções por NADH. O estado de transição envolve o grupo carbonil do piruvato fortemente polarizado:



Pergunta-se:

- i) Um mutante da LDH no qual a Arg109 foi substituída por Gln mostra apenas 5 % de ligação a piruvato e 0.07 % da atividade da enzima selvagem. Proponha uma explicação para os efeitos desta mutação
- ii) Você espera que a substituição da Arg171 por uma lisina afete a afinidade da enzima pelo piruvato? Por quê?

3. Uma enzima recém descoberta catalisa a reação descrita abaixo.



O valor do *turnover* encontrado para esta enzima é  $600 \text{ s}^{-1}$ . Quando  $[E]_T = 20 \times 10^{-9} \text{ M}$  e  $[T] = 40 \text{ } \mu\text{M}$ , a velocidade da reação é  $v_0 = 9.6 \text{ } \mu\text{Ms}^{-1}$ . Calcule o  $K_M$  para o substrato.

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  $\mu\text{mol}$  de pirofosfato em 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . 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  $K_M$ ?
- b) Quantos mols de sítios ativos existem em 1 mg de enzima? Assuma que cada subunidade possui um sítio ativo.
- c) Qual é o *turnover* da enzima?

5. Suponha que uma enzima mutante ligue-se com o substrato com uma afinidade 100x maior do que a enzima selvagem. Qual é o efeito desta mutação sobre o *turnover* ( $k_{\text{cat}}$ ) considerando-se que a interação com o estado de transição não foi afetada?

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

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.

[Penicilina] $\mu\text{M}$	Quantidade hidrolisada (nanomols)
1	0.11
3	0.25
5	0.34
10	0.45
30	0.58
50	0.61

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  $K_M$ ?

b) Qual é o valor do  $V_{\max}$ ?

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

8. A cinética de uma enzima foi medida em função da concentração de substrato na presença e ausência de 2 mM do inibidor “I”.

[S] ( $\mu\text{M}$ )	Velocidade ( $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ )	
	Sem inibidor	Com inibidor
3	10.4	4.1
5	14.5	6.4
10	22.5	11.3
30	33.8	22.6
90	40.5	33.8

a) Quais são os valores de  $V_{\max}$  e  $K_M$  na ausência e presença de inibidor? São dadas as seguintes equações de reta:

b) Qual é o tipo de inibição?

c) Qual é a constante de afinidade do inibidor?

d) Se  $[S] = 10 \mu\text{M}$  e  $[I] = 2 \text{ mM}$ , qual é a fração de moléculas de enzima ligadas ao substrato? E com o inibidor?

e) Se  $[S] = 30 \mu\text{M}$ , qual é a fração de moléculas de enzima que estão ligadas com o substrato na presença e na ausência de 2 mM de inibidor?

Compare esta razão com a razão entre as velocidades nas mesmas condições.