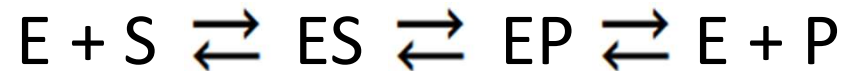




Previously...

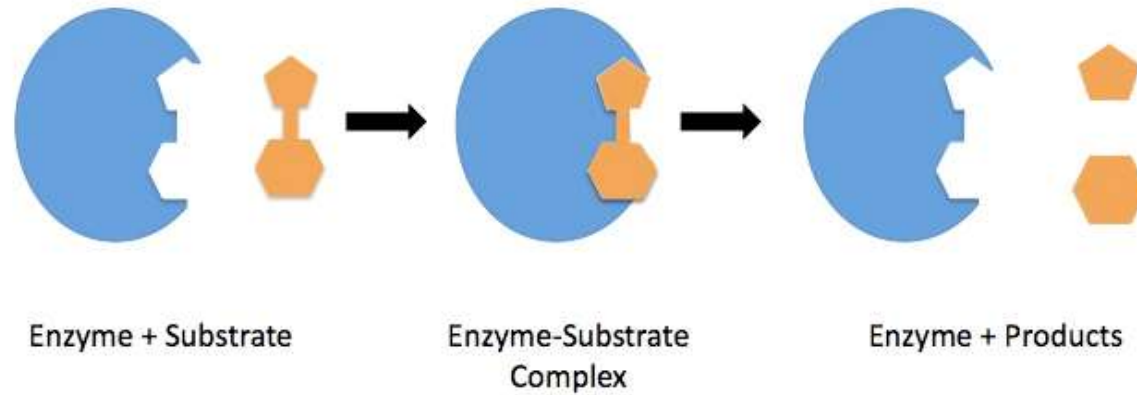
As enzimas (E) se ligam aos substratos (S) e catalisam sua transformação em produtos (P)



Os substratos se ligam a enzimas no sítio de ativo

Mudanças na conformação das enzimas são essenciais para o seu funcionamento, reduzindo a energia de ligação para que a reação ocorra

Cinética enzimática é o estudo das taxas na quais reações enzimáticas ocorrem



Por quê estudar cinética enzimática?

Por quê estudar cinética enzimática?

Comparar as características de enzimas diferentes que catalizem a mesma reação

Comparar a atividade de uma enzima ao catalisar substratos diferentes

Descrever o modo de ação de inibidores

Como estudar cinética enzimática?



Leonor Michaelis



Maud Menten

A maneira mais simples de se caracterizar a cinética de uma enzima é medir como a sua **velocidade de reação** varia em relação à **concentração de substrato**

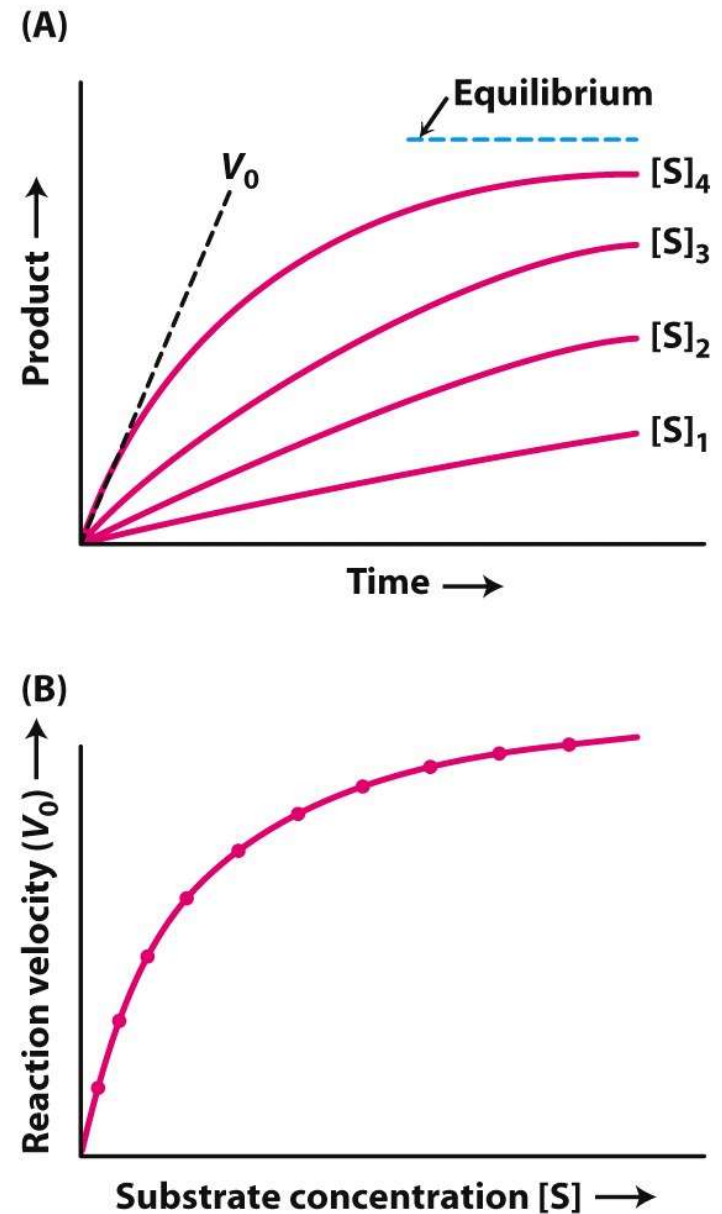
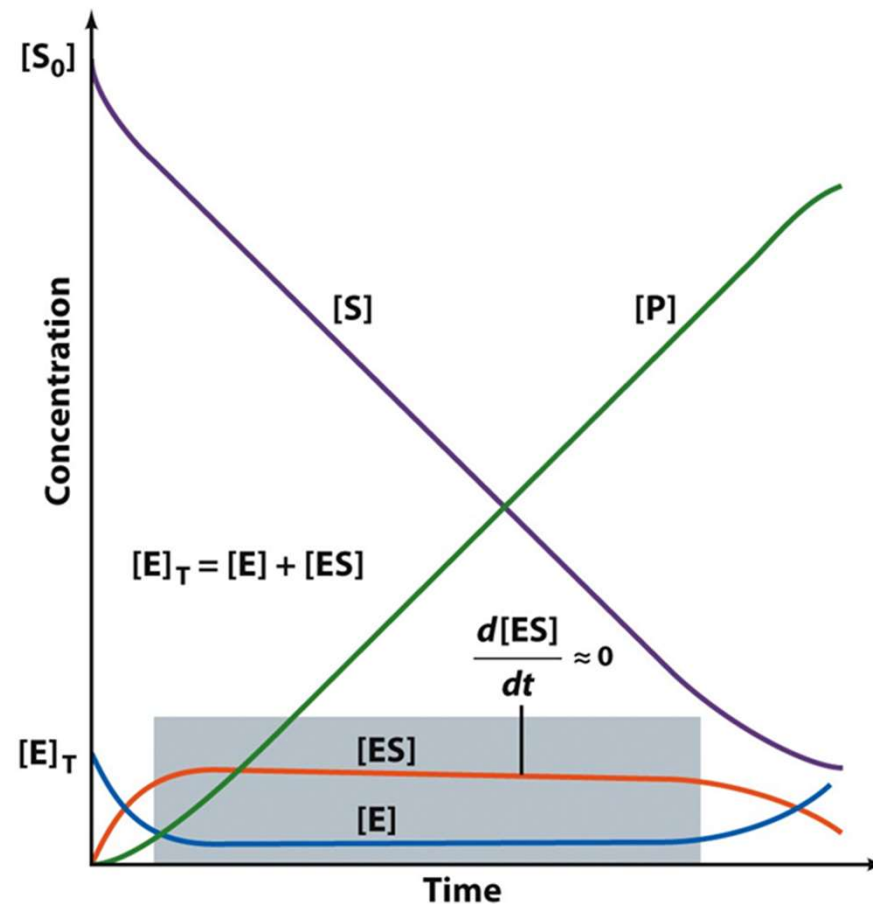
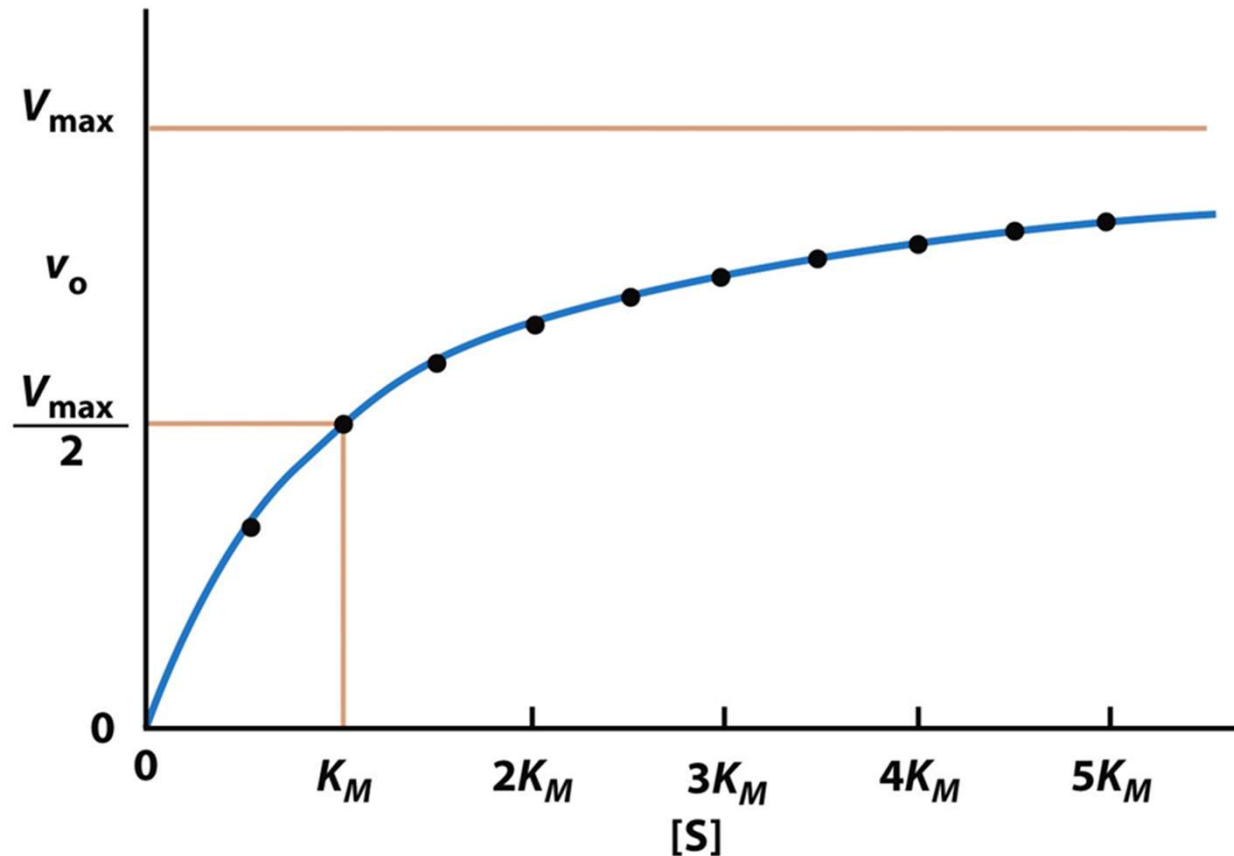


Figure 8.10
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

A **velocidade de reação (v_0)** é medida enquanto menos de 5% do substrato é utilizado e a $[P]$ é baixa. Assume-se que $[ES]$ está em *steady-state*

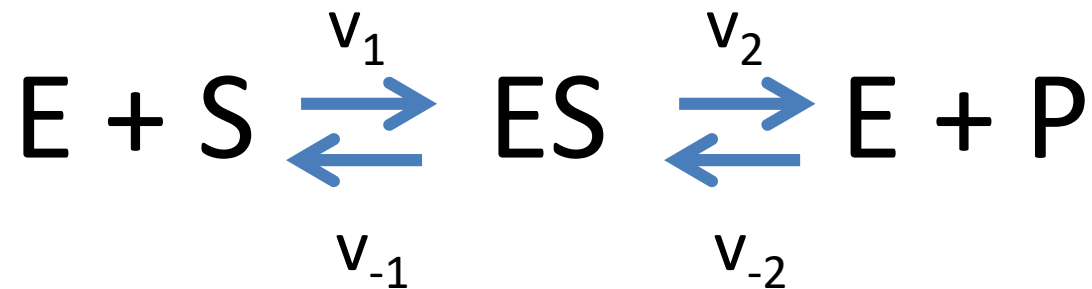
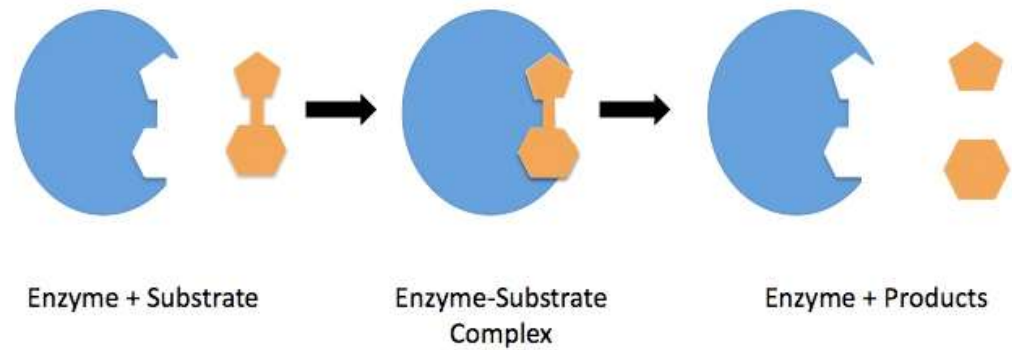


Uma curva hiperbólica é geralmente encontrada ao se plotar $V_0 \times [S]$



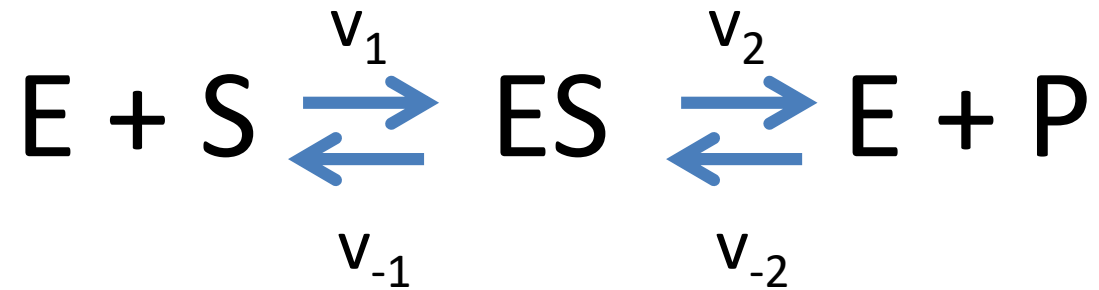
Esta curva é descrita pela equação de Michaelis-Menten

A equação de Michaelis-Menten assume que:



1. Estamos medindo v_0 (ES está em *steady-state*)
2. v_{-2} é desprezível ($v_{-2} = 0$)
3. $K_{-1} \gg \gg \gg K_2$

A equação de Michaelis-Menten assume que:



4. $S \ggggg P$ de modo que v_1 não seja limitante

5. $v_1 \lllll v_2$

6. $[E_{\text{total}}] = [E] + [ES]$

A equação de Michaelis-Menten:

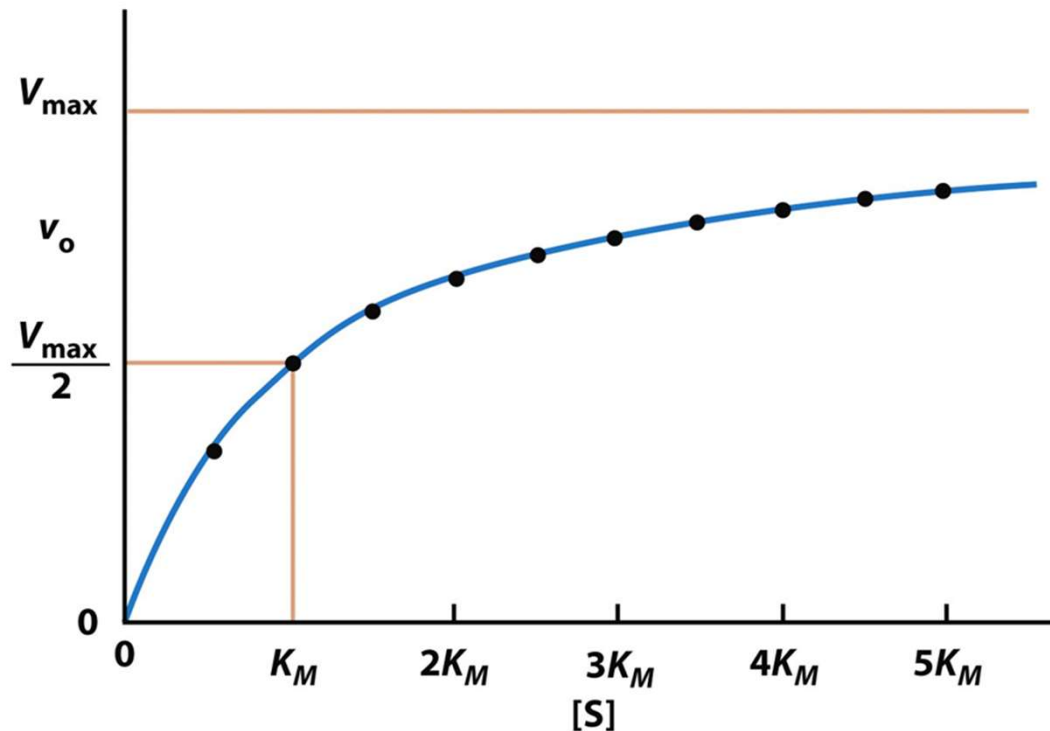
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Se $[S] \gg \gg K_M$, então $v_0 = V_{\max}$

Se $[S] = K_M$, então $v_0 = V_{\max}/2$

K_M é a concentração de substrato onde obtemos metade da velocidade máxima

K_M e V_{max} são parâmetros que descrevem o comportamento das enzimas



- K_M é inversamente proporcional à **afinidade** que uma enzima tem a um substrato
- V_{max} depende da **[E]** no experimento

A constante catalítica (K_{cat}) equivale ao número de moléculas que um centro ativo consegue converter por segundo

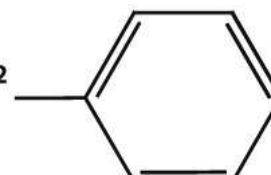
$$K_{cat} = V_{max} / [E_{total}]$$

Table 8.5 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

A relação K_{cat}/K_M indica a **eficiência catalítica** de uma enzima e indica se o fator limitante em uma reação é quantidade de substrato ou a velocidade de formação de P

Table 8.6 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{—CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	2.0
Norvaline	—CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.6×10^2
Norleucine	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3.0×10^3
Phenylalanine	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{—C} \end{array}$ 	1.0×10^5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.

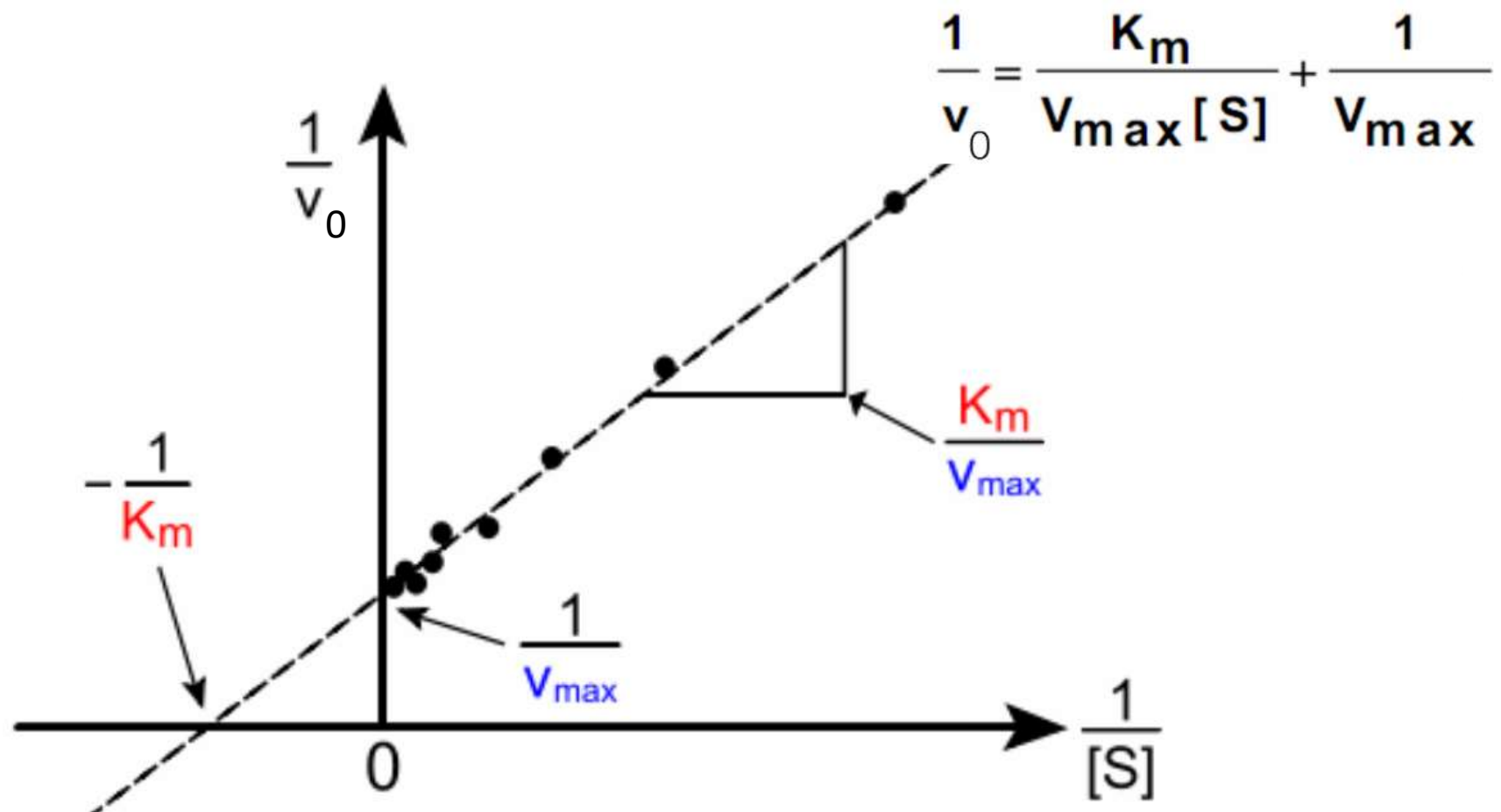
Um k_{cat}/K_M na ordem de 10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ indica que a enzima é “cineticamente perfeita”

Enzyme	Substrate	$k_{cat}/K_m (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
Catalase	H_2O_2	4×10^7
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	2×10^8
Triose phosphate isomerase	D-Glyceraldehyde 3-phosphate	4×10^8
Fumarase	Fumarate	10^9
Superoxide dismutase	$\cdot\text{O}_2^-$	2×10^9

A SOD tem sítios ativos carregados eletricamente que atraem os substratos de cargas opostas

Mas isso não quer dizer que essas enzimas são as mais rápidas possíveis...

O gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk é uma maneira de se obter V_{\max} e K_M na prática

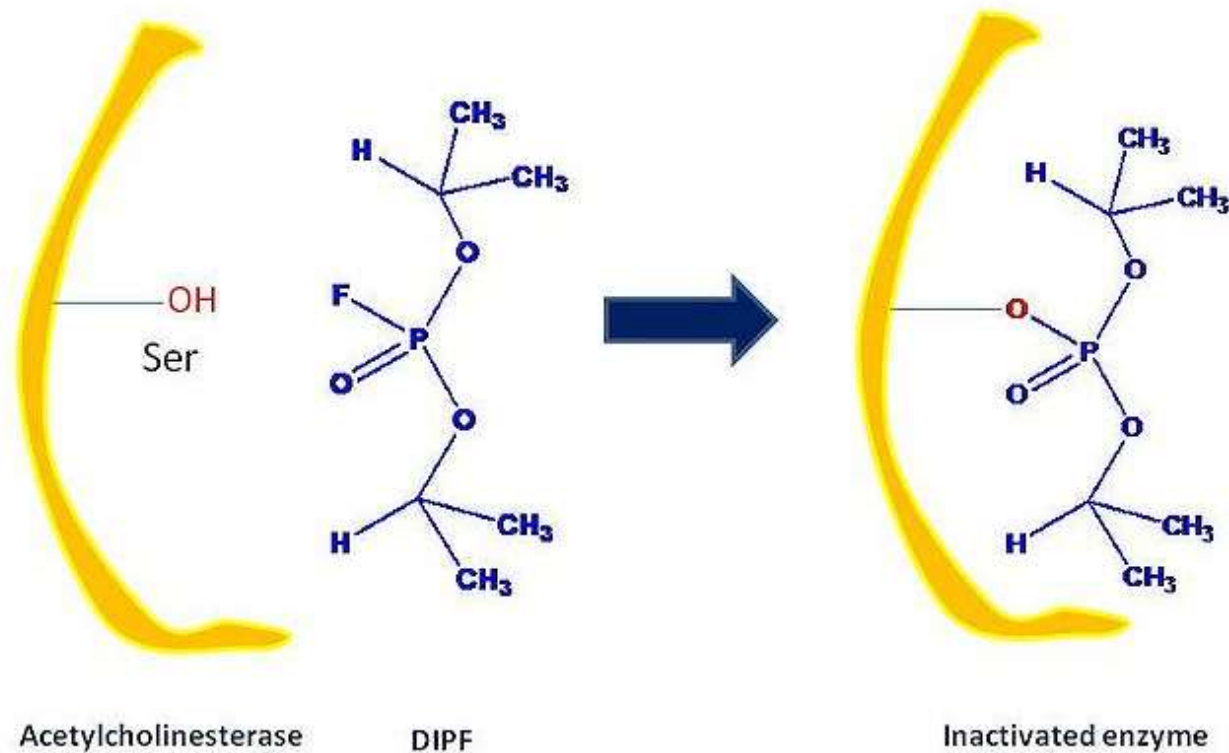


Inibidores são substâncias que interferem na atividade enzimática

Existem dois tipos de inibidores: **reversíveis** e os **irreversíveis**

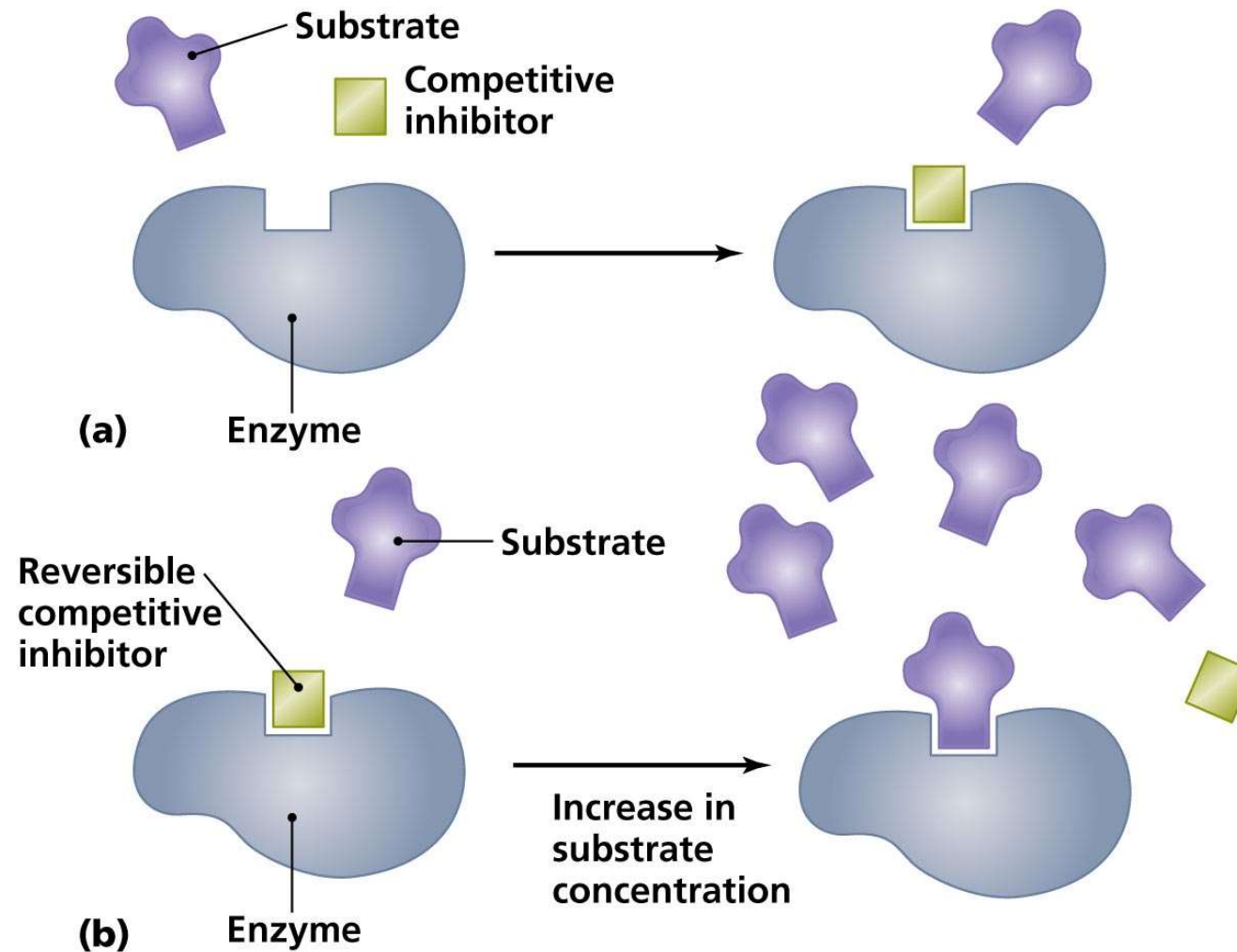
Entre os inibidores reversíveis, duas classes se destacam: os **competitivos** e os **não competitivos**

Inibidores irreversíveis inativam as enzimas de forma definitiva ou por um longo período



Inibidores irreversíveis inativam as enzimas de forma definitiva ou por um longo período

Inibidores competitivos se ligam ao mesmo sítio ativo que o substrato



Em altas concentrações de substrato, o inibidor competitivo quase não se liga à enzima, logo a V_{\max} não se altera mas o K_M aumenta

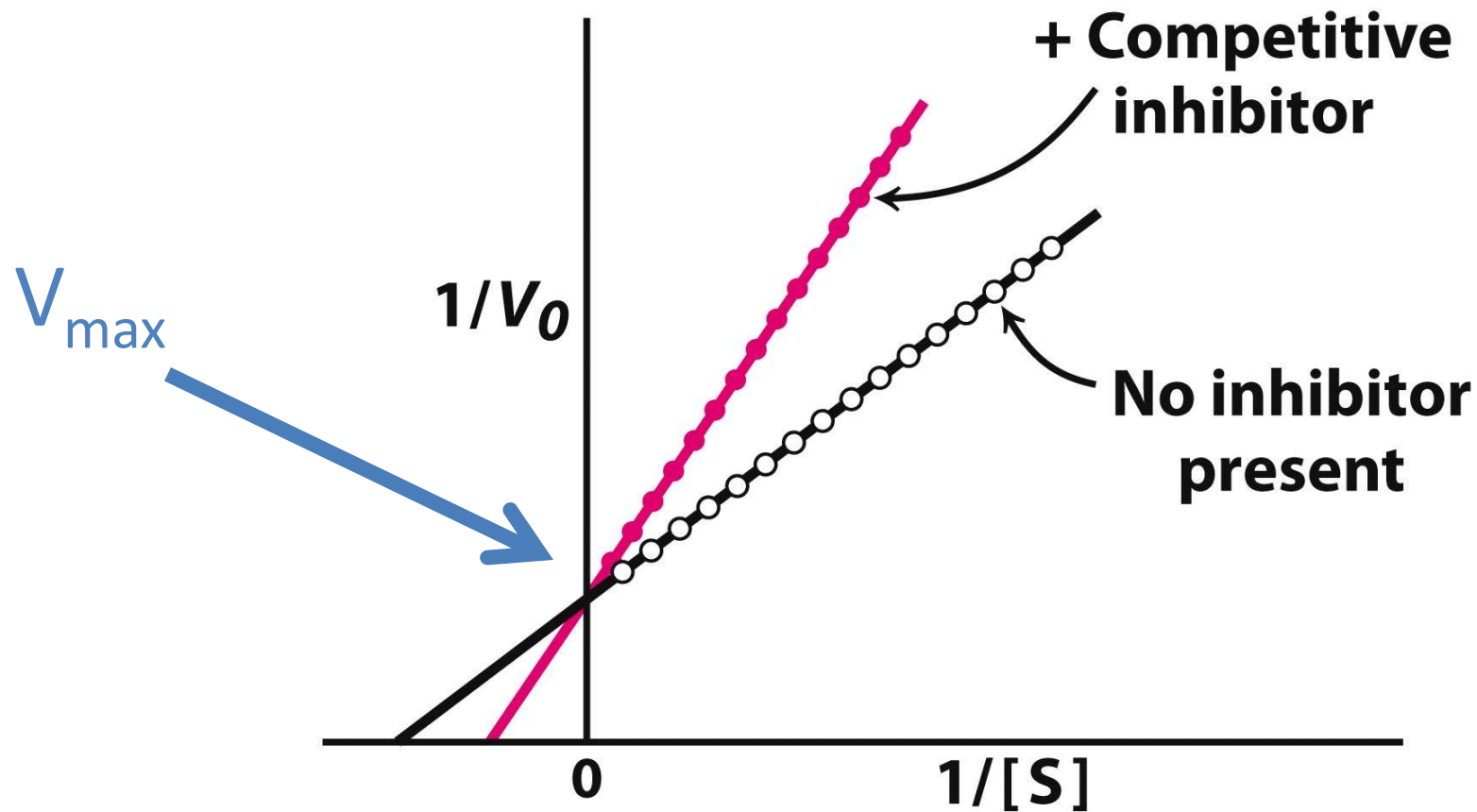
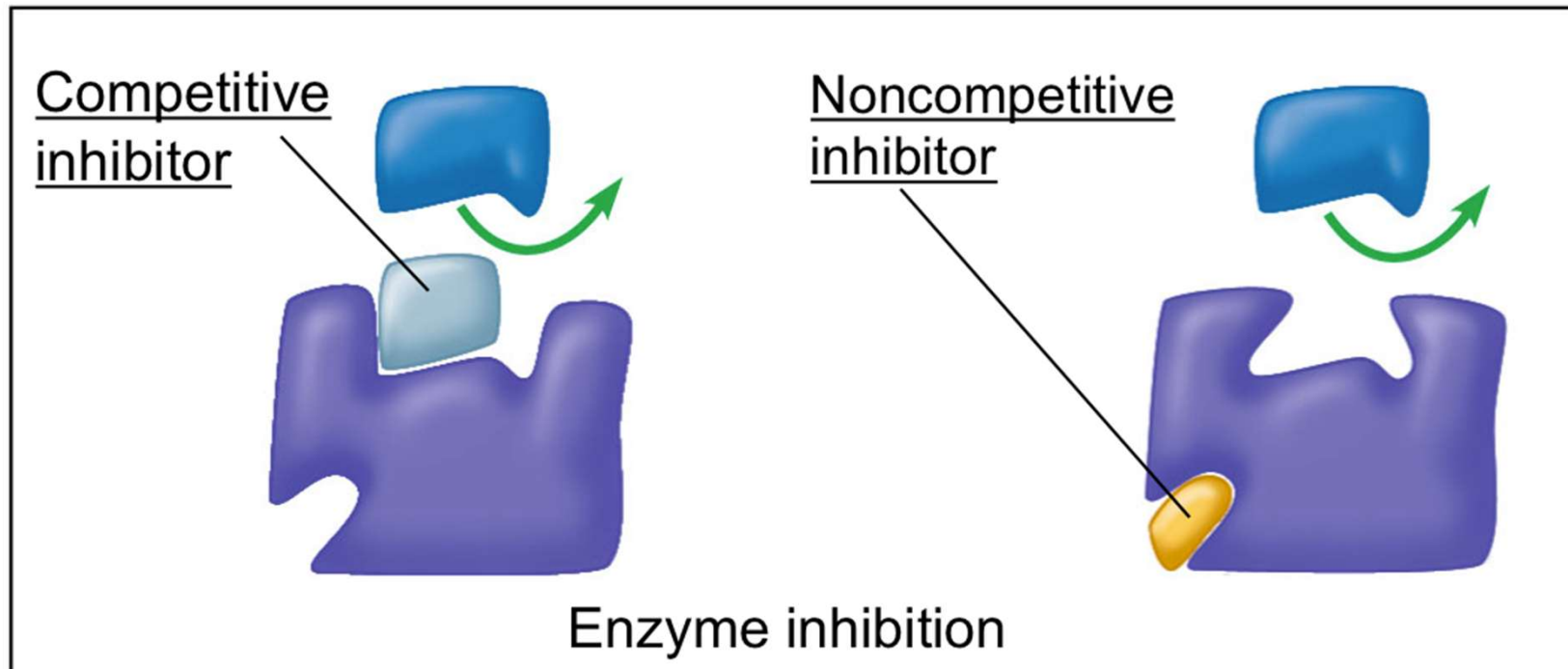


Figure 8.19
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Inibidores não-competitivos não se ligam ao mesmo sítio ativo que o substrato mas alteram a atividade da enzima mesmo assim



O inibidor não-competitivo altera a V_{\max} da enzima mas, como não mexe no sítio ativo, o K_M não se altera

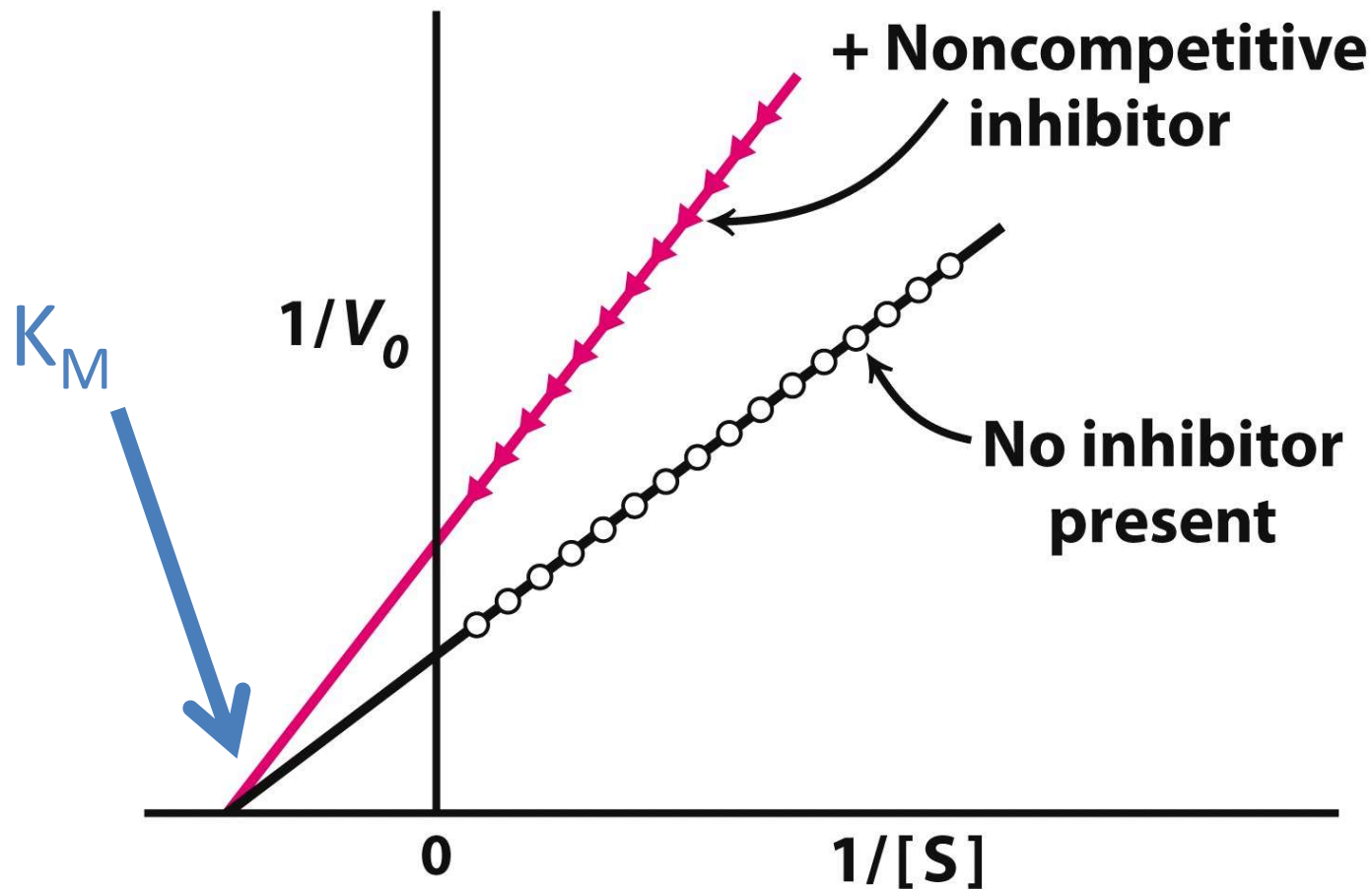
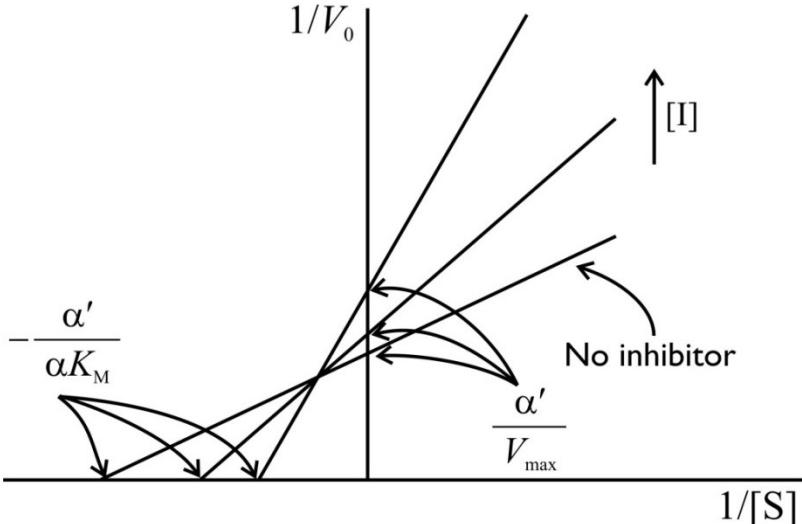


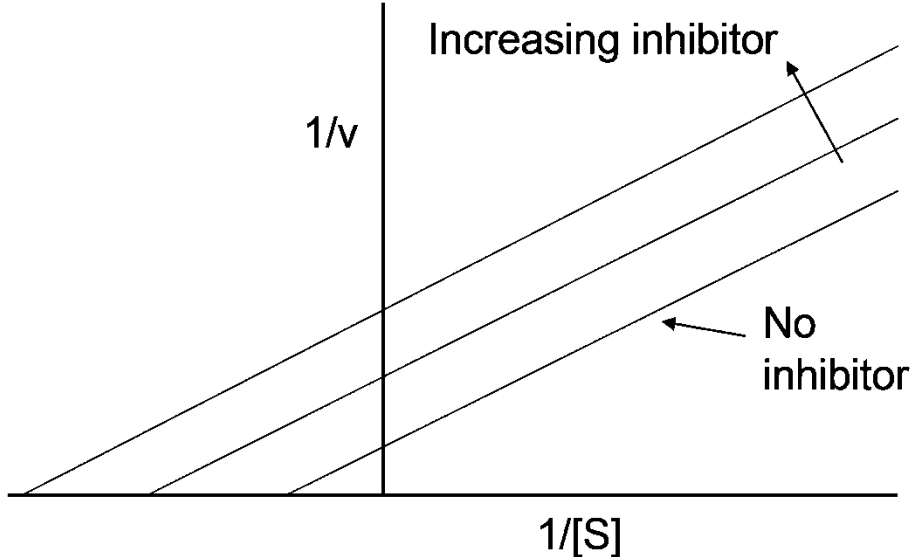
Figure 8.21
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Existem inibidores mistos e inibidores incompetitivos

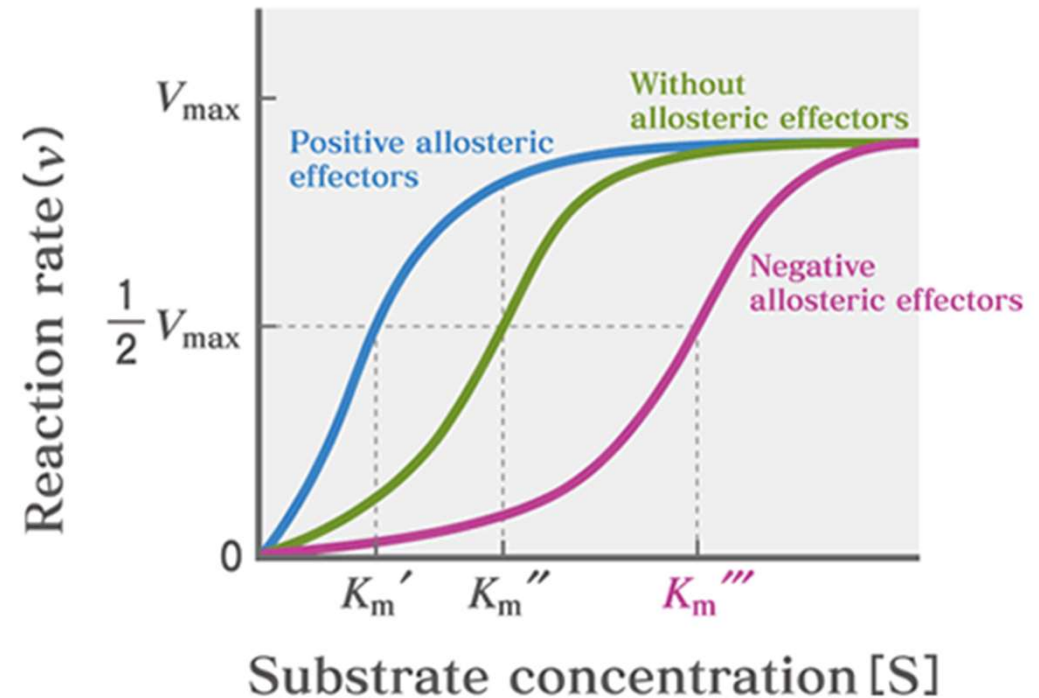
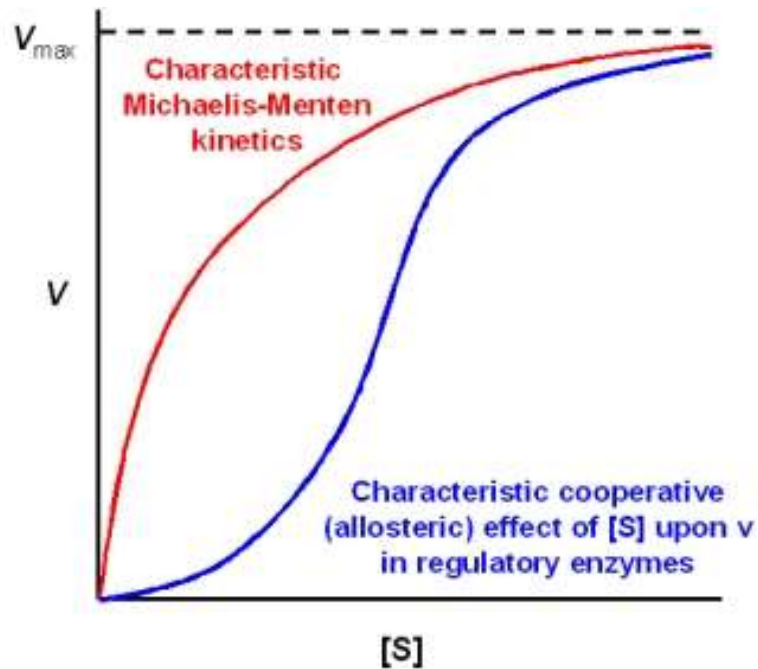


inibidores mistos

inibidores incompetitivos



Enzimas alostéricas não são michaelianas



Moduladores se ligam às enzimas de forma não-covalente

Modificações covalentes mudam a atividade enzimática

