

Enzimas

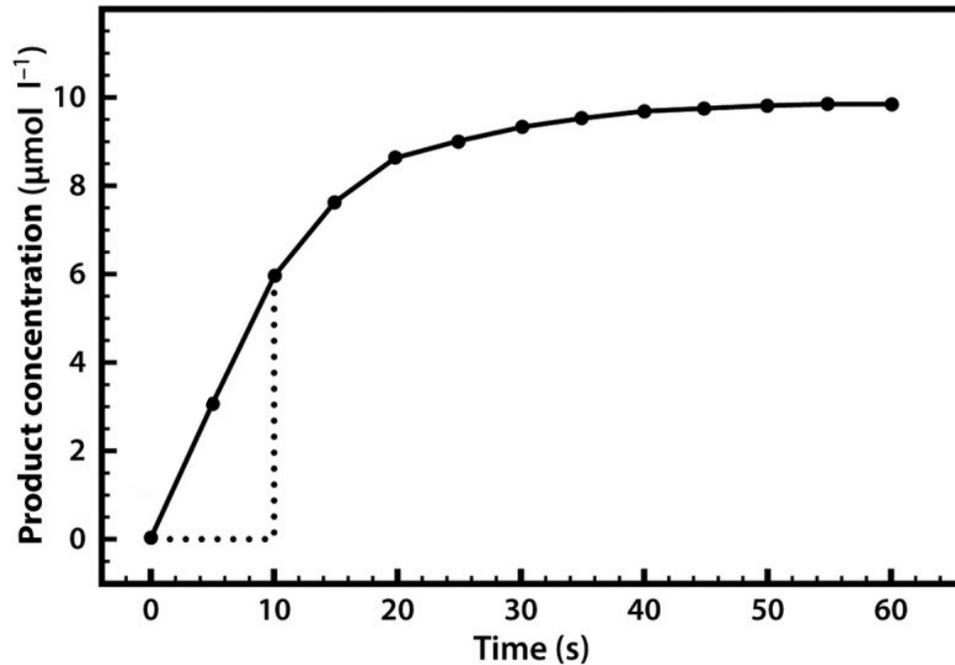


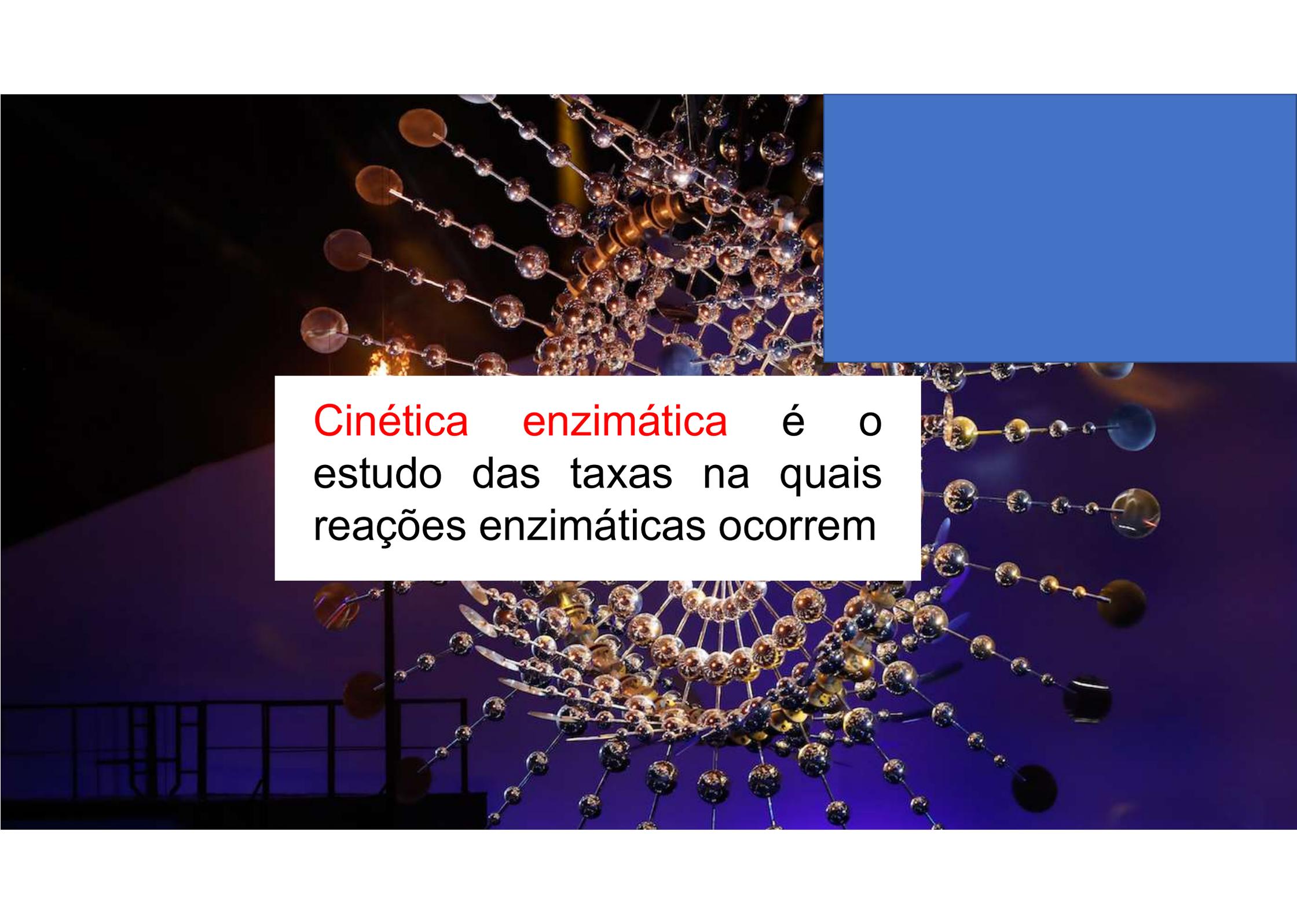
Cinética enzimática

Carlos Hotta

Como estudamos enzimas?

- Podemos estudar uma enzima pela sua estrutura
- Podemos estudar uma enzima através de seu funcionamento

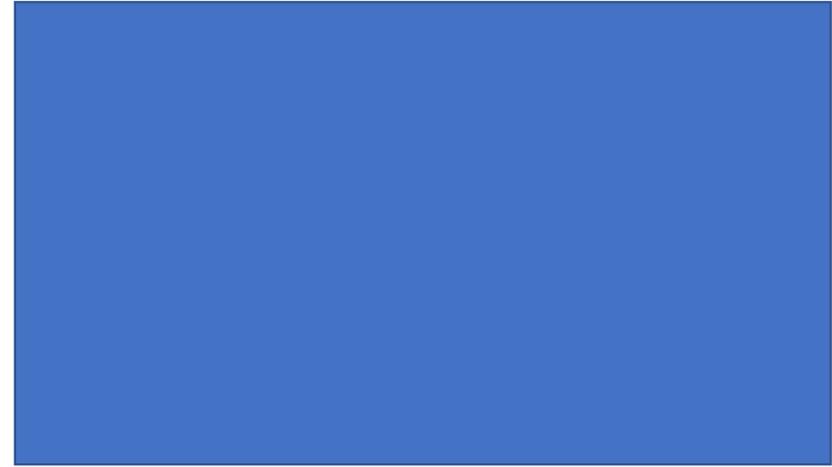




Cinética enzimática é o estudo das taxas na quais reações enzimáticas ocorrem

Por quê estudar cinética enzimática?

- Comparar as características de enzimas diferentes que catalisem a mesma reação
- Comparar a atividade de uma enzima ao catalisar substratos diferentes
- Descrever o modo de ação de inibidores



Como estudar cinética enzimática?



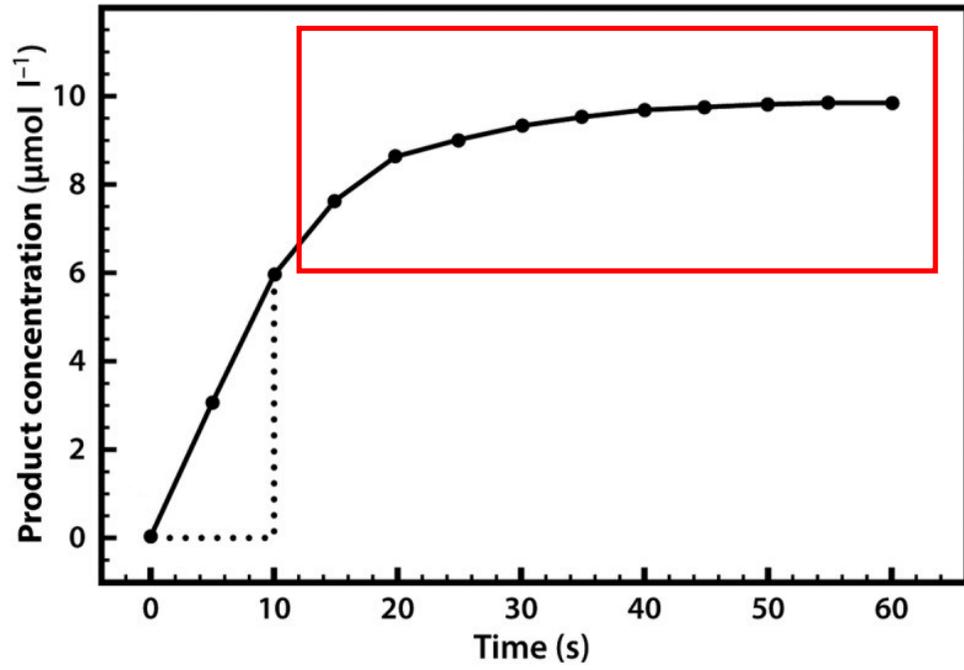
Leonor Michaelis



Maud Menten

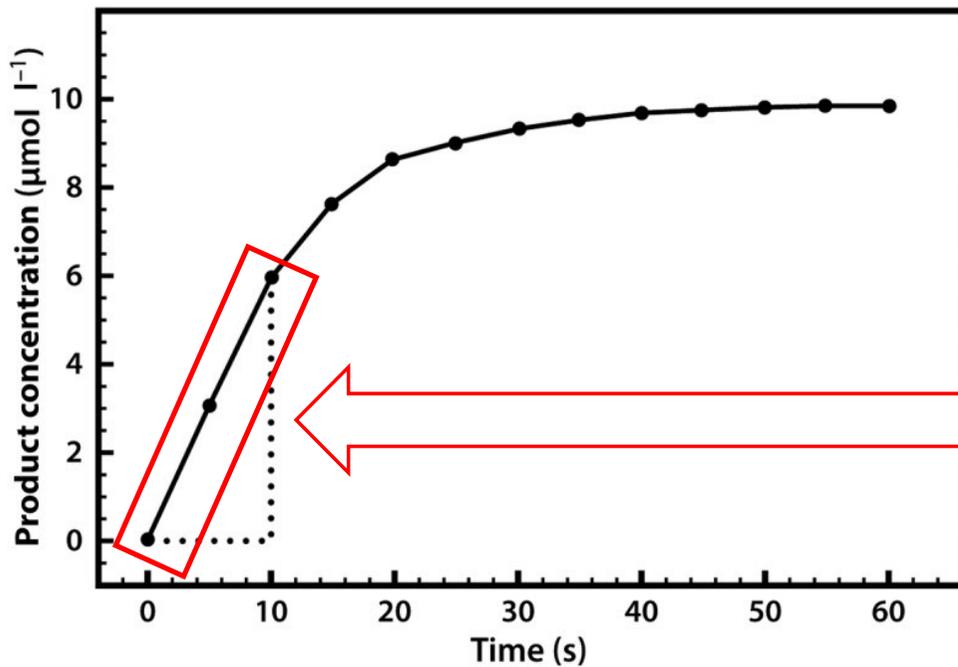
- Michaelis e Menten descreveram matematicamente o comportamento das enzimas

Qual é o melhor momento de se estudar uma enzima?



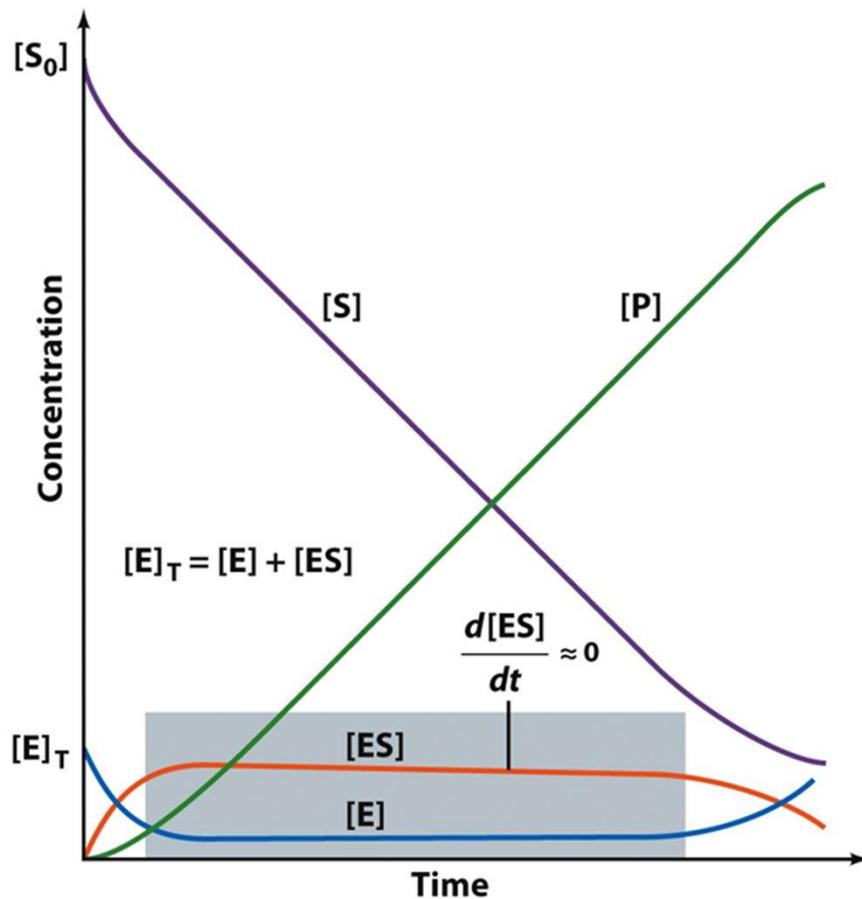
Com o uso do substrato na reação, a velocidade começa a diminuir até chegar a zero

Qual é o melhor momento de se estudar uma enzima?



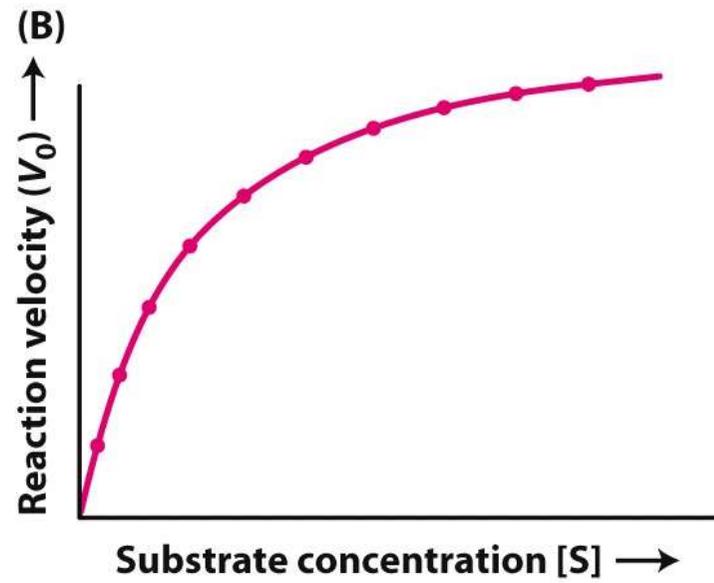
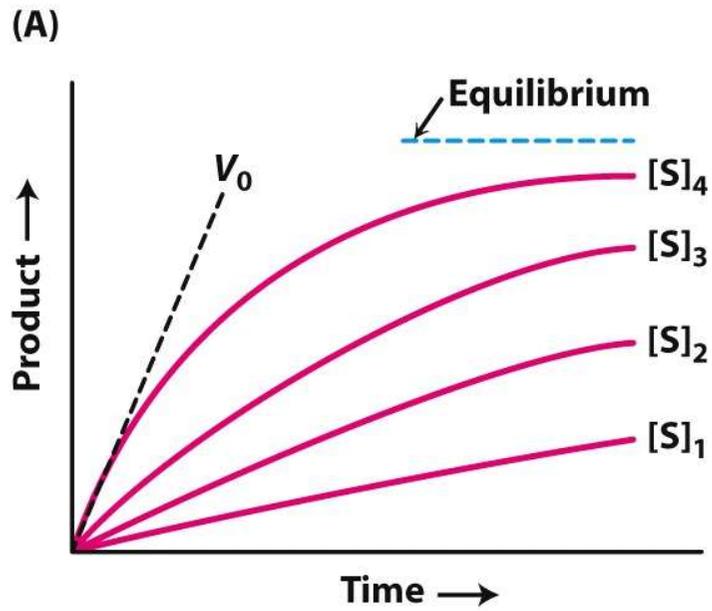
O **início da reação**, quando o substrato não é limitante, é o melhor momento para se estudar as reações enzimáticas

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*

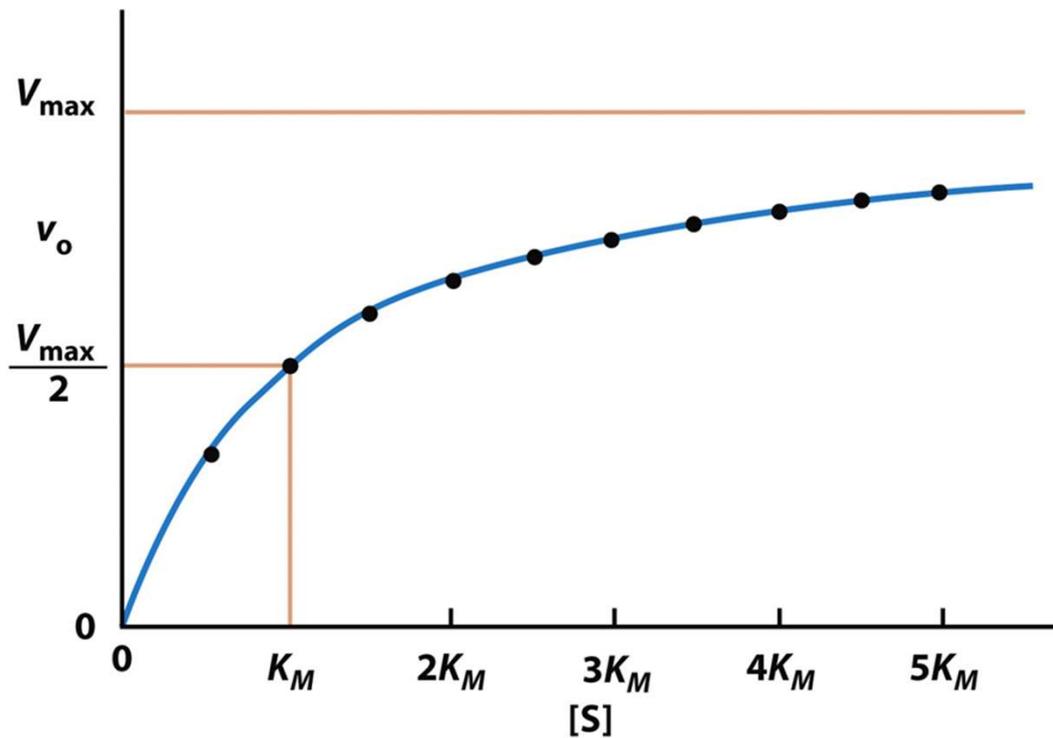


Qual é a melhor maneira de se estudar uma enzima?

A maneira mais simples de se caracterizar a cinética de uma enzima é medir como a sua **velocidade inicial** (V_0) varia em relação à **concentração de substrato**



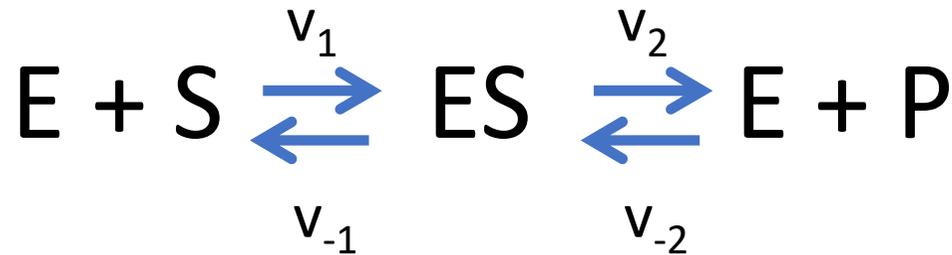
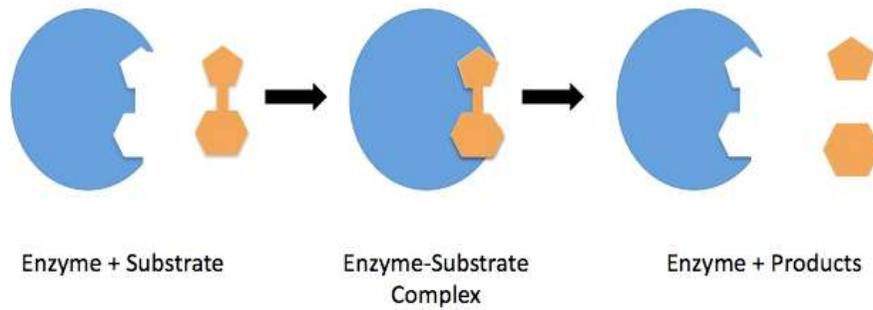
Uma curva hiperbólica é geralmente encontrada ao se plotar V_0 x $[S]$



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

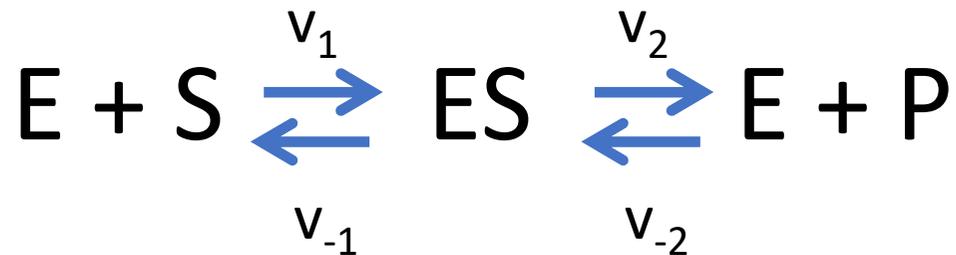
Esta curva é descrita pela **equação de Michaelis-Menten**

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

5. $v_1 \ll \ll \ll v_2$

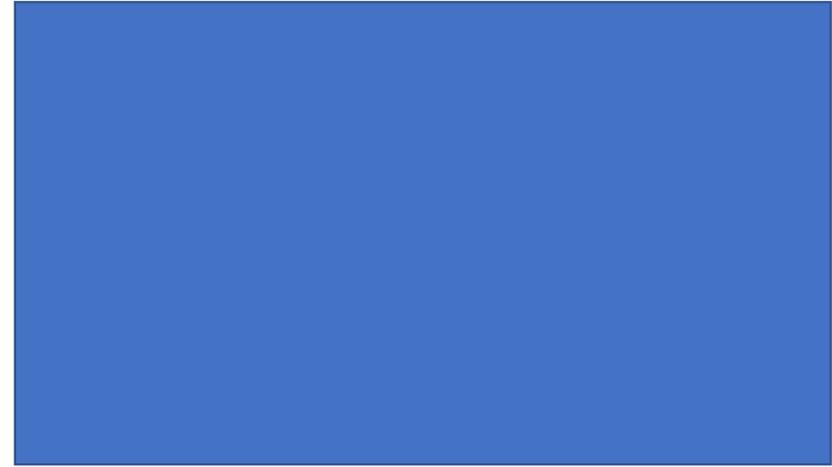
6. $[E_{\text{total}}] = [E] + [ES]$

Quando [S] é muito maior que o Km...

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

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

$$V_0 = V_{\max}$$



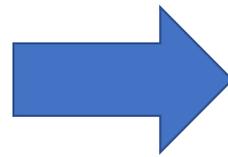
Quando [S] é igual a Km...



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

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

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



$$V_0 = \frac{V_{\max}}{2}$$

A equação de Michaelis-Menten:

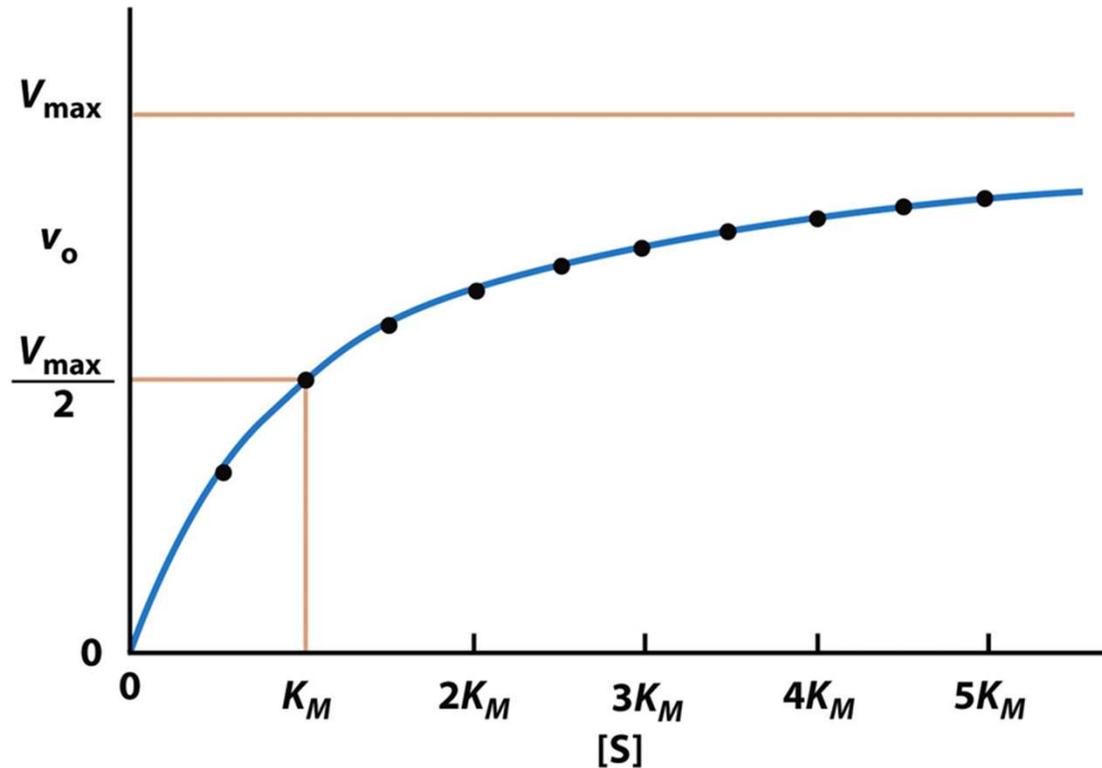
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

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

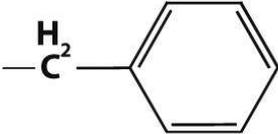
Table 8.5 Turnover numbers of some enzymes

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

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

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 $M^{-1} s^{-1}$ indica que a enzima é “cineticamente perfeita”

Enzyme	Substrate	$k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})$
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	$\cdot O_2^-$	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...



RESUMO DA AULA

- Estudamos enzimas caracterizando-se a sua **cinética enzimática**
- Para se estudar a cinética enzimática, medimos a **velocidade inicial** da reação em diferentes concentrações de substrato
- O $V_0 \times [S]$ de algumas enzimas segue a equação de **Michaelis-Menten**
- Enzimas michaelianas possuem dois parâmetros importantes: **K_M e V_{max}**