

# Enzimas

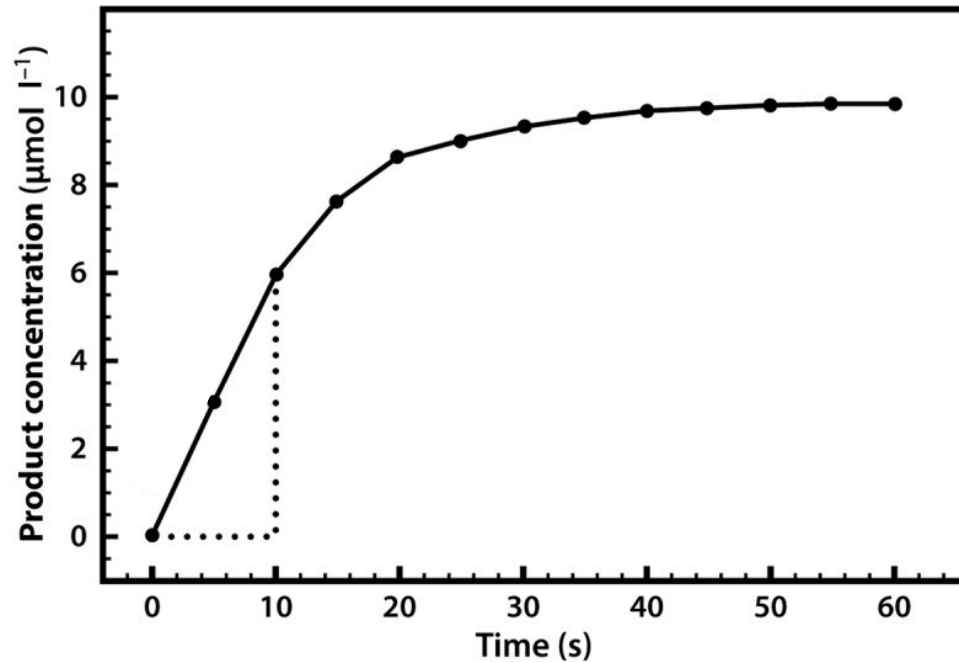



Cinética enzimática

Carlos Hotta

# Como estudamos enzimas?

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



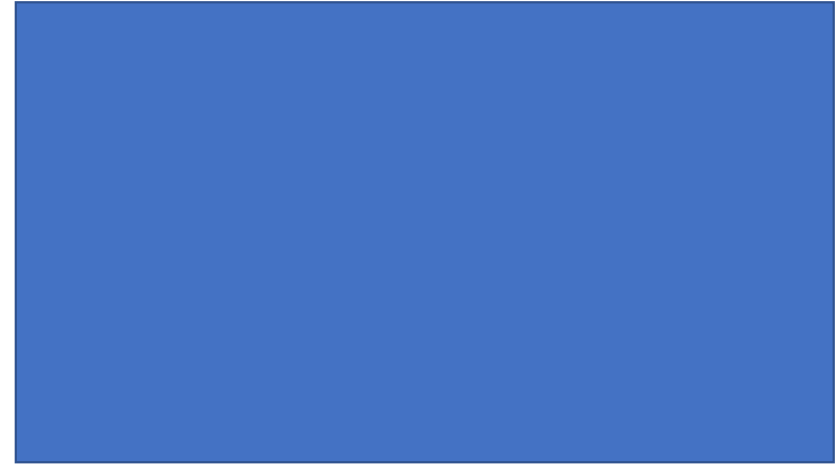


**Cinética enzimática** é o estudo das taxas na quais reações enzimáticas ocorrem



# 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?



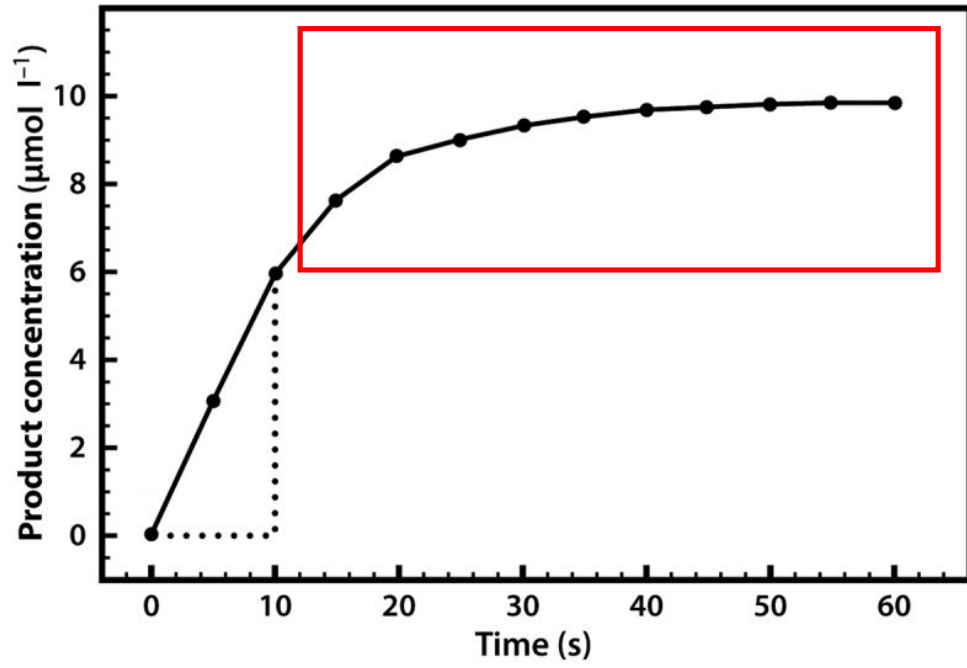
Leonor Michaelis



Maud Menten

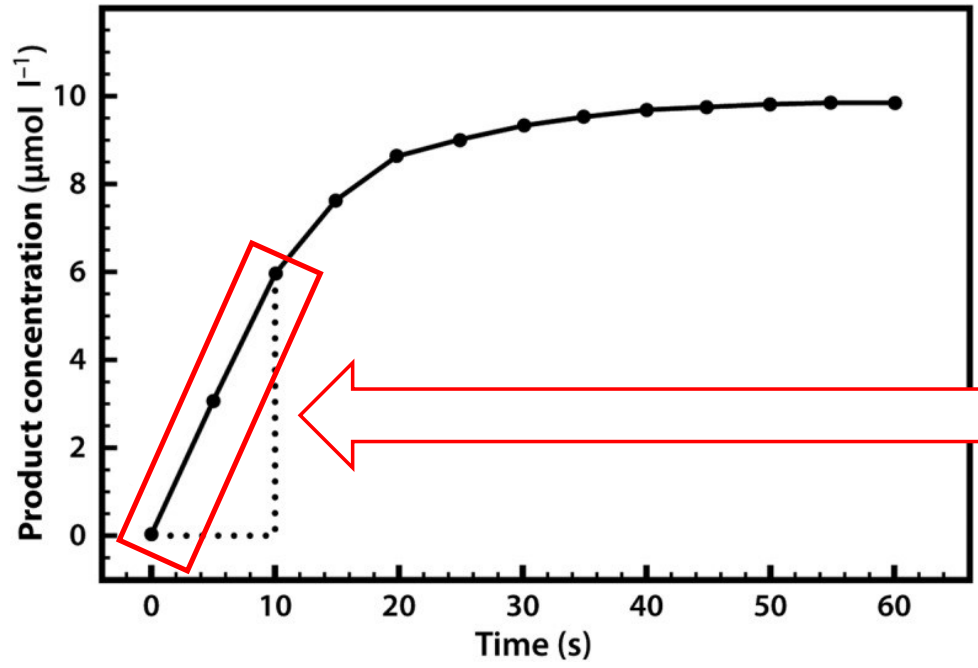
- Michaelis e Menten descreveram matematicamente o comportamento das enzimas

Qual é o melhor momento de se estudar uma enzima?



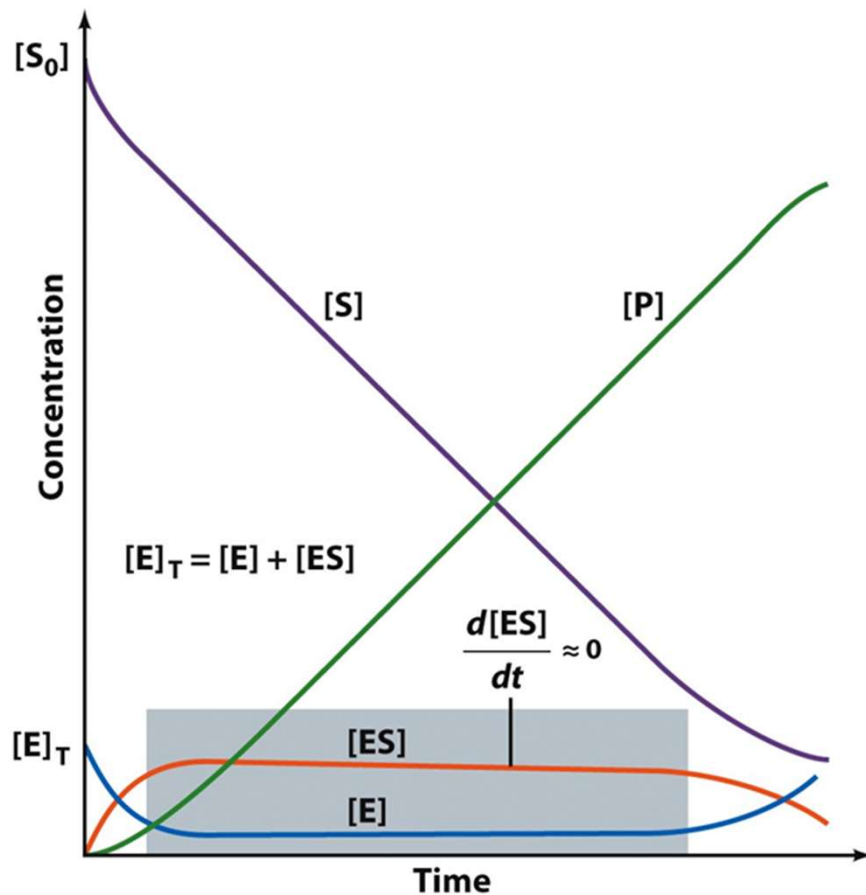
Com o uso do substrato na reação, a velocidade começa a diminuir até chegar a zero

# 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

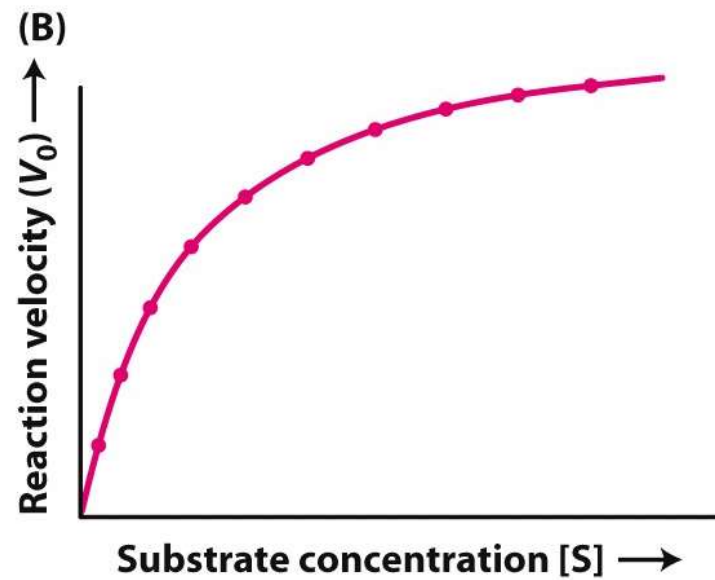
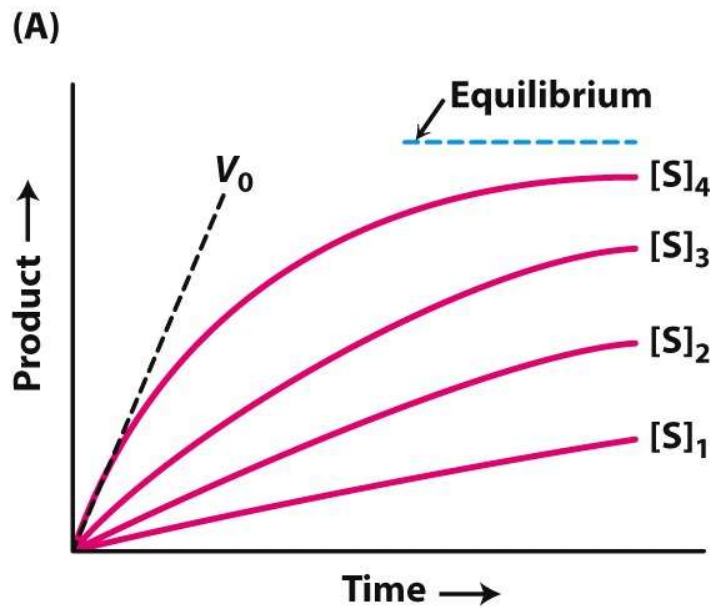
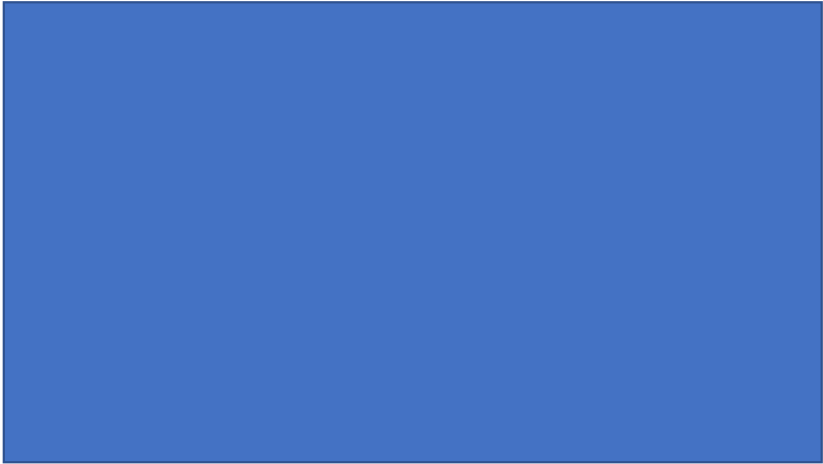
A **velocidade de reação** ( $v_0$ ) é medida enquanto menos de 5% do substrato é utilizado e a  $[P]$  é baixa. Assume-se que  $[ES]$  está em *steady-state*



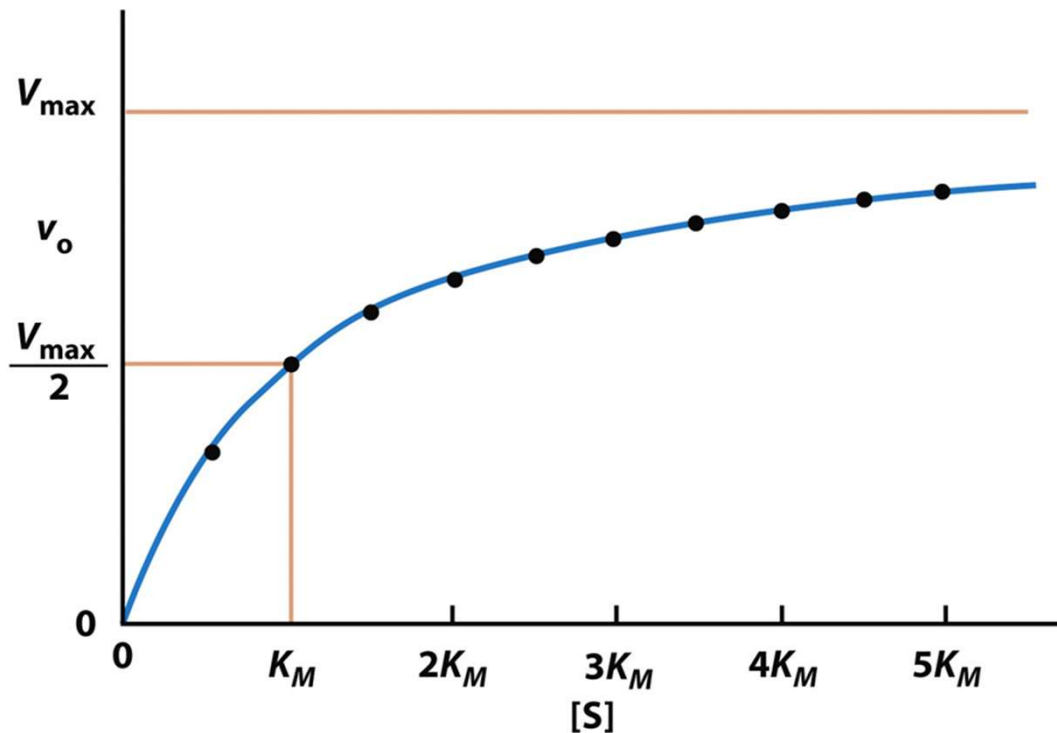


# Qual é a melhor maneira de se estudar uma enzima?

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**



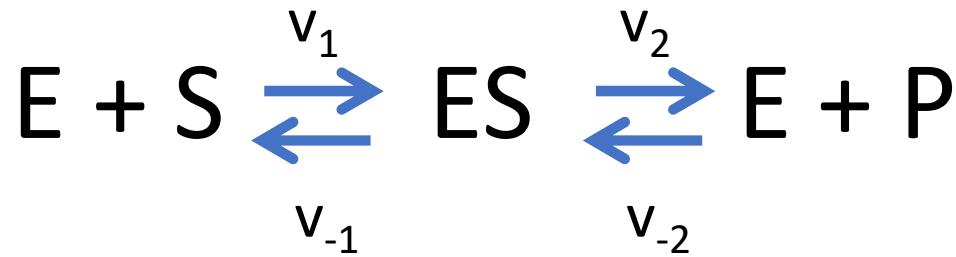
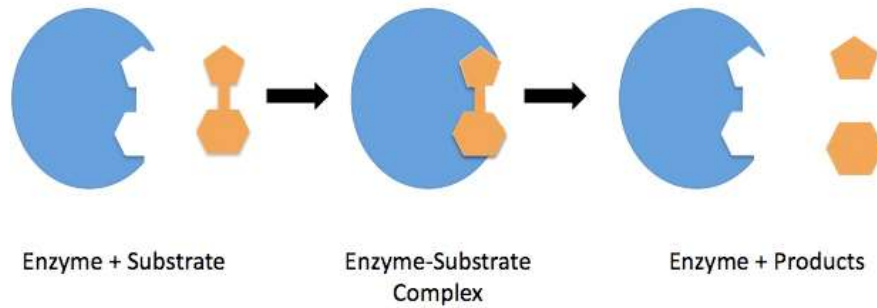
Uma curva hiperbólica é geralmente encontrada ao se plotar  $V_0$  x  $[S]$



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

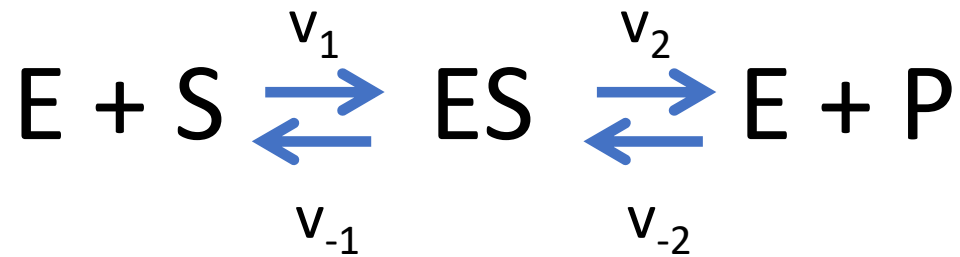
Esta curva é descrita pela **equação de Michaelis-Menten**

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:

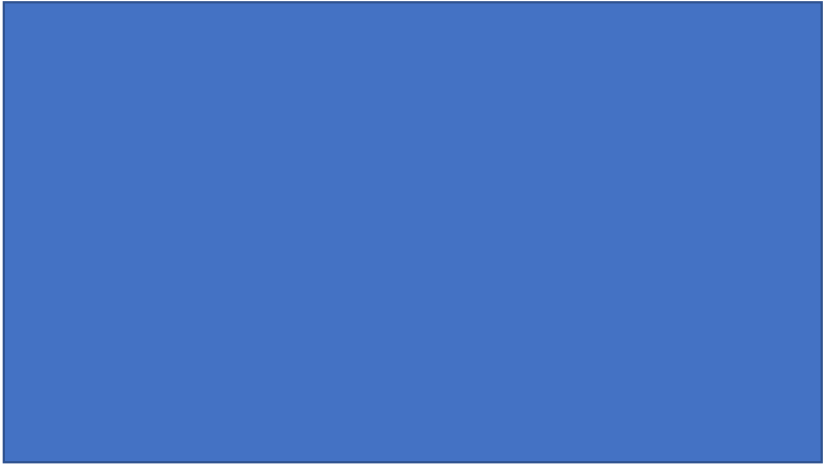


4.  $S \gg \gg \gg P$  de modo que  $v_1$  não seja limitante

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

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

Quando [S] é muito maior que o Km...



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

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

$$V_0 = V_{\max}$$

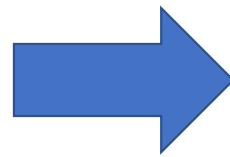


Quando [S] é igual a Km...

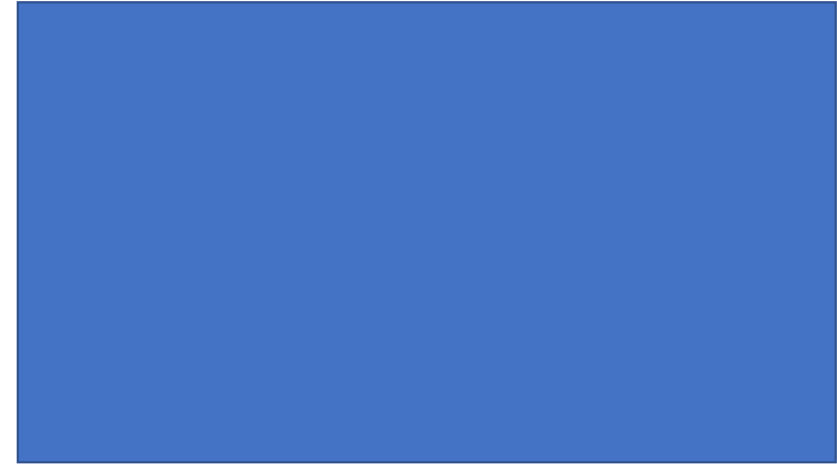
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

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

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



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



A equação de Michaelis-Menten:

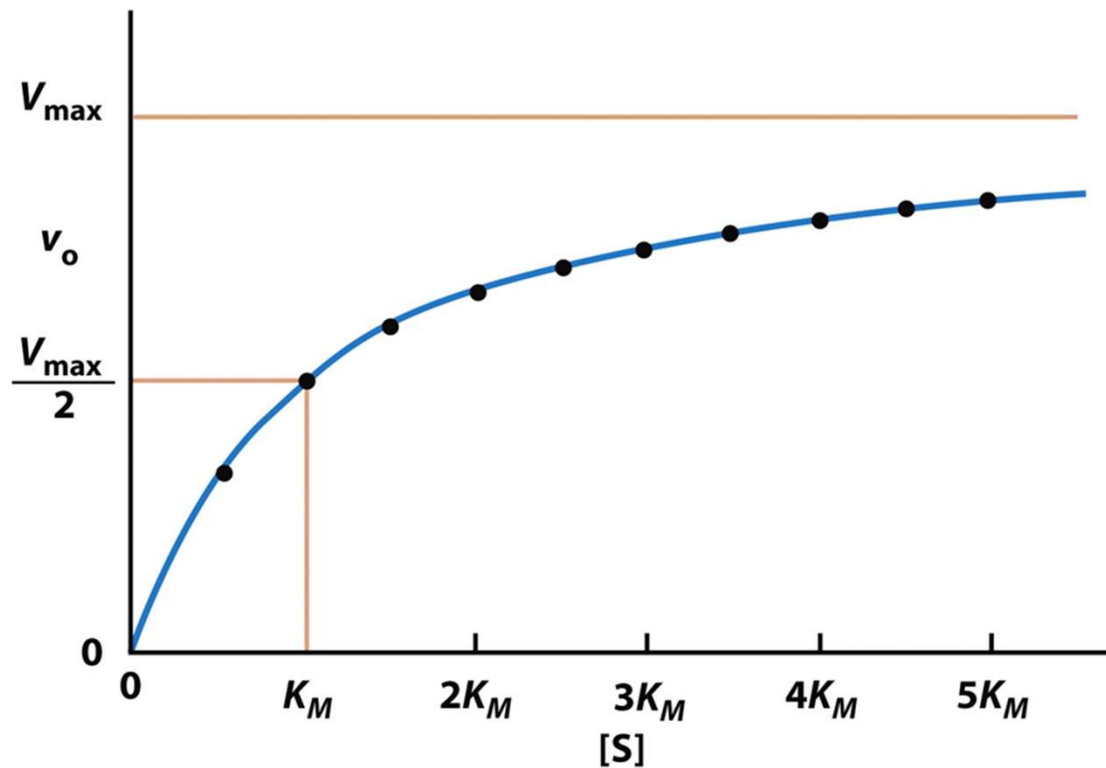
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

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

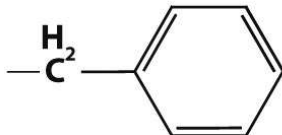
**Table 8.5** Turnover numbers of some enzymes

| 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  $K_{\text{cat}}/K_M$  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  | $k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) |
|---------------------|--|--|
| Glycine             | —H   | $1.3 \times 10^{-1}$                                   |
| Valine              | $\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\   \\ \text{—CH} \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$  | 2.0  |
| Norvaline           | —CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | $3.6 \times 10^2$                                      |
| Norleucine          | —CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | $3.0 \times 10^3$                                      |
| Phenylalanine       | $\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{—C} \end{array}$  | $1.0 \times 10^5$                                      |

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                   | $\text{H}_2\text{O}_2$       | $4 \times 10^7$                             |
| Acetylcholinesterase       | Acetylcholine                | $2 \times 10^8$                             |
| Triose phosphate isomerase | D-Glyceraldehyde 3-phosphate | $4 \times 10^8$                             |
| Fumarase                   | Fumarate                     | $10^9$                                      |
| Superoxide dismutase       | $\cdot\text{O}_2^-$          | $2 \times 10^9$                             |

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  $V_{max}$**