Logo USP

**QBQ0250 – Bioquímica: Estrutura e Metabolismo de Biomoléculas** **2023**

**Ciências Biomédicas**

**Apostila Parte II**

Terças-feiras 8-12h

Sextas-feiras 14-18h

**Locais**:

Aulas teóricas: sala 1, bloco 6 inferior

Aulas práticas: Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM)

Bloco 7 superior

**Professores responsáveis**

Flavia Carla Meotti ([flaviam@iq.usp.br](mailto:flaviam@iq.usp.br))

Shaker Chuck Farah ([chsfarah@iq.usp.br](mailto:chsfarah@iq.usp.br))

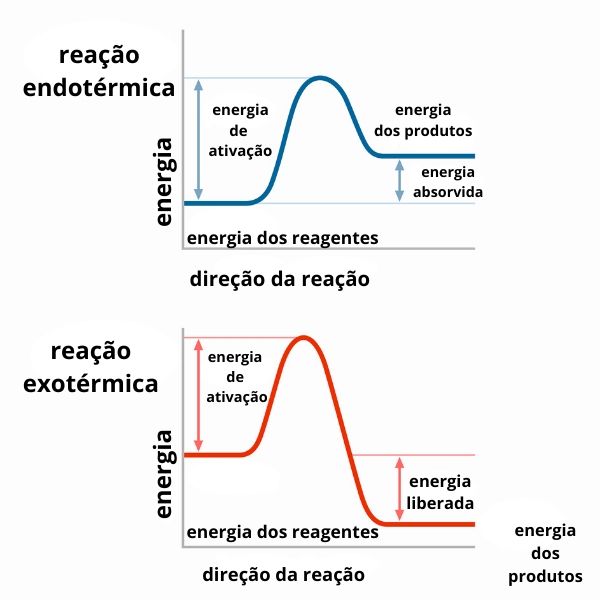
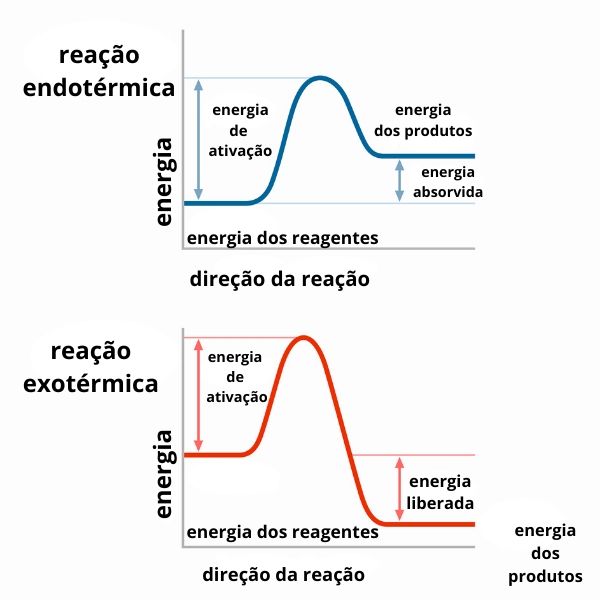
**Monitores**

Samuel Guimarães (samuelguimaraes322@gmail.com)

Litiele Cezar Cruz (litieleccruz@gmail.com)

**AULAS 6, 7 e 8 - ENZIMAS**

1. **Questões para estudo/discussão**
   1. Analise os dois gráficos abaixo e discuta se em ambos os casos a reação pode ocorrer. Perceba que o eixo *y* refere-se à energia e não temperatura.



1.2. O que significa dizer que as enzimas são catalisadores biológicos? O que faz um catalisador? Explique com base no gráfico que mostra o curso de reação (eixo *x*) *versus* energia livre (eixo *y*).

1.3. Aponte neste mesmo gráfico onde está o estado de transição.

1.4. Definir velocidade de reação. Escrever a equação de velocidade da reação A → B em função da concentração de A.

1.5. Com base na resposta ao item anterior, discuta o que seria mais apropriado, mediar a velocidade da reação em um tempo longo ou em um tempo mais próximo ao início. Explique sua conclusão.

1.6. Levante uma hipótese de como as enzimas aceleram a transformação de um substrato em produto.

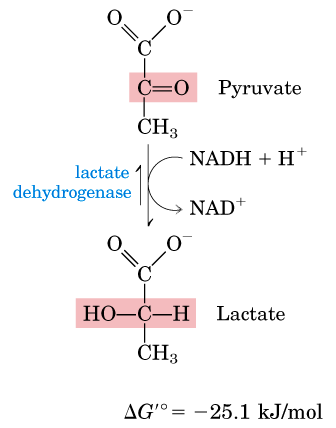
1.7. A ligação de uma enzima ao seu substrato é uma reação irreversível?

1.8. Descreva a equação da transformação de um substrato em produto na reação catalisada por enzima

**2) Contextualização do problema e meios para resposta**

Em organismos multicelulares e com tecidos que têm funções especializadas, enzimas que catalisam a mesma reação (isoenzimas) podem apresentar cinéticas diferentes, dependendo da especialidade de cada tecido.

Como exemplo, temos a enzima lactato desidrogenase (LDH), que catalisa a reação abaixo. A isoenzima LDH1 é expressa no músculo cardíaco, enquanto a LDH5 no músculo esquelético:



O objetivo da aula prática é comparar as cinéticas da reação da LDH1 e LDH5 com o substrato lactato, a fim de entender o papel fisiológico/metabólico destas enzimas no coração e no músculo esquelético (a discussão sobre esses efeitos será feita após obtenção dos resultados).

2.1. Que reagentes são necessários para medir a velocidade da reação destas duas enzimas com o substrato lactato?

2.2. Colocaremos as duas enzimas e o substrato (lactato) no mesmo tubo

2.3. Podemos deixar a reação acontecer por tempo indeterminado?

2.5. Enzimas são proteínas, que condições do meio podem afetar sua atividade?

2.6. Como se pode avaliar a transformação de um reagente em produto?

**Roteiro para aula prática (fornecido separadamente)**

1. **Atividade, cinética e inibição enzimática**

3.1. A atividade de algumas enzimas pode ser medida no plasma de pacientes como método diagnóstico de doenças, pois o aumento delas no plasma indica lesão dos tecidos com liberação do seu conteúdo celular para o plasma. A atividade das enzimas nestes casos é apresentada em Unidades Internacionais (U) por volume do fluído, podendo ser em mL ou L (U/mL ou U/L). Em um ensaio clínico para a atividade das transaminases no plasma, usadas para detectar lesão hepática, de um paciente que realiza tratamento com Roacutan (Isotretinoína) obtiveram-se os seguintes resultados:

3.1.1. Formação de produto pela aspartato aminotransferase (AST) igual a 4,2 μmol de produto em 1 mL por 10 min de reação. Formação de produto pela alanina aminotransferase (ALT) igual a 7,3 μmol de produto em 1 mL por 10 min de reação. Calcule as Unidades internacionais por litro de plasma (U/L) para ambas as enzimas.

3.1.2. Os valores de referência para estas enzimas no plasma é até 18 e até 21 U/L para AST e ALT, respectivamente. A partir desta comparação conclua se o uso de Roacutan está causando alteração hepática no paciente.

3.2. A atividade de uma enzima também pode ser utilizada para estimar quanto desta enzima foi obtida a partir de um processo de purificação de proteínas. Neste caso, a atividade da enzima, representada pela Unidade Internacional (U), precisa ser distinguida do conteúdo total de proteína daquela amostra. Neste caso, teremos o que é denominado *atividade específica da enzima*. Assim, a Unidade Internacional (U) encontrada será descrita em função de que?

3.3. Defina inibidores enzimáticos irreversíveis e reversíveis. Quais aplicações tecnológicas possíveis para inibidores enzimáticos?

3.4. O que o KI de um inibidor mede?

3.5. Fazer o gráfico V0 *versus* [S] na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e na presença de duas concentrações de inibidor incompetitivo.

3.6. Compare quais seriam os valores de KM e VMax se fosse adicionado inibidor competitivo na concentração de 1 KI na reação. E se fosse adicionado de inibidor incompetitivo, também na concentração equivalente a 1 KI?

3.7. Como se faz para determinar com precisão o KI de uma enzima? Faça esse gráfico na ausência de inibidor, na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e na presença de duas concentrações de inibidor incompetitivo.

3.8. Classifique as afirmações abaixo como verdadeiras ou falsas:

* + 1. Sempre que o número de moléculas de substrato for maior que o número de moléculas de enzimas, todas as moléculas de enzimas estarão ligadas a uma molécula de substrato. **( )**
    2. A velocidade da reação é proporcional ao tempo da reação. **( )**
    3. A velocidade da reação é proporcional à concentração de substrato.**( )**
    4. A velocidade da reação é proporcional à concentração de enzima, desde que a concentração de substrato não seja limitante. **( )**
    5. A velocidade da reação é proporcional à concentração do complexo enzima-substrato. **( )**
    6. A quantidade de produto formado depende do tempo da reação. **( )**

1. **Regulação da atividade das enzimas** 
   1. Qual a importância da regulação enzimática no metabolismo?
   2. Por que a cinética de algumas enzimas alostéricas tem aspecto sigmoidal enquanto as enzimas michaelianas têm cinéticas hiperbólicas? É possível a formação de um complexo ternário [enzima-substrato-outro composto] com as enzimas alostéricas?
   3. Fazer o gráfico V0 x [S] para uma reação catalisada por uma enzima alostérica com curva sigmoidal e que tem seu “KM” afetado, na ausência de efetuadores e na presença de efetuador positivo e negativo.
   4. É possível estabelecer uma ligação covalente entre o grupo fosfato e a hidroxila da serina ou da treonina? Se isto fosse possível, quais seriam as consequências para a atividade da enzima?
2. **Cofatores enzimáticos**
   1. Explique porque há enzimas que só são ativas na presença de íons inorgânicos.
   2. As necessidades nutricionais de vitaminas são quantitativamente muito menores do que as dos macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios). Explicar a razão, verificando a estrutura química da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD+) e da flavina adenina dinucleotídio (FAD) nas suas formas oxidada e reduzida.

**AULAS 8 e 9 – GRUPO DE DISCUSSÃO - ENZIMAS**

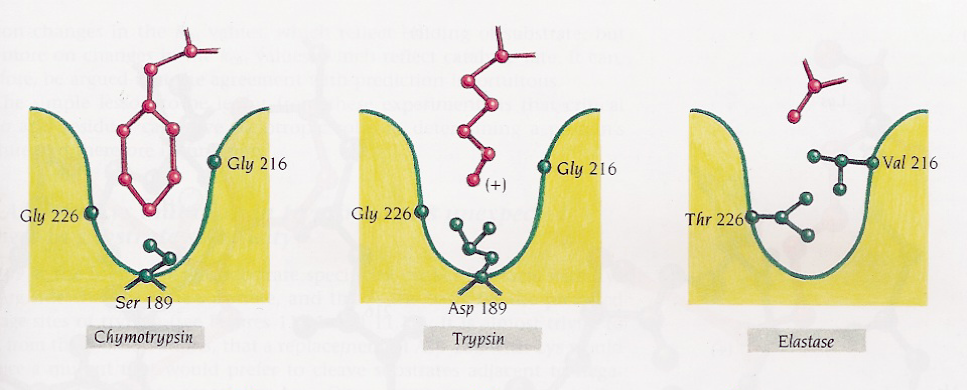
**ESTRUTURA E FUNÇÃO DE ENZIMAS: MECANISMO E ESPECIFICIDADE DE SERINA-PROTEINASES.**

Para discutirmos as relações entre estrutura, mecanismo de catálise e especificidade de enzimas, tomaremos como modelo as proteinases que têm uma Ser muito reativa no sítio ativo (por isso chamadas de serina-proteinases) e um mecanismo catalítico comum. Estas enzimas têm a função de degradar outras proteínas, daí o nome proteinase. Entre essas, as melhor caracterizadas são a quimotripsina, a tripsina e a elastase. A última tem esse nome porque é capaz de rapidamente digerir a proteína de tecido conjuntivo chamada elastina, que praticamente não é clivada por outras proteinases, porque possui grande quantidade de Gly, Ala e Val. As três enzimas são proteinases digestivas produzidas pelo pâncreas e secretadas para o duodeno.

**Bolso de especificidade:**

As três enzimas clivam ligações internas de cadeias polipeptídicas do substrato e essa clivagem é feita na amida que forma a ligação peptídica. A ligação é muito estável e, na ausência de um catalisador, sua meia vida de hidrólise em pH neutro é de 10 a 1000 anos. A especificidade das proteinases difere no tipo de resíduo de aminoácido que contribuiu com a carboxila na formação da ligação peptídica clivada. Esses resíduos devem ser volumosos e hidrofóbicos para que a quimotripsina tenha atividade; carregados positivamente para sofrer ação da tripsina e pequenos e neutros para que a ligação seja clivada pela elastase.

Essas preferências são um reflexo dos aminoácidos que compõem o bolso de especificidade, localizado próximo aos resíduos catalíticos. Na quimotripsina, no fundo de um desses bolsos, há um resíduo de Ser, que é substituído por um resíduo de Asp na tripsina. Já na elastase, as paredes laterais possuem aminoácidos volumosos no lugar das Gly presentes nas outras duas enzimas, permitindo somente a entrada de aminoácidos com cadeias laterais pequenas (Fig 1).



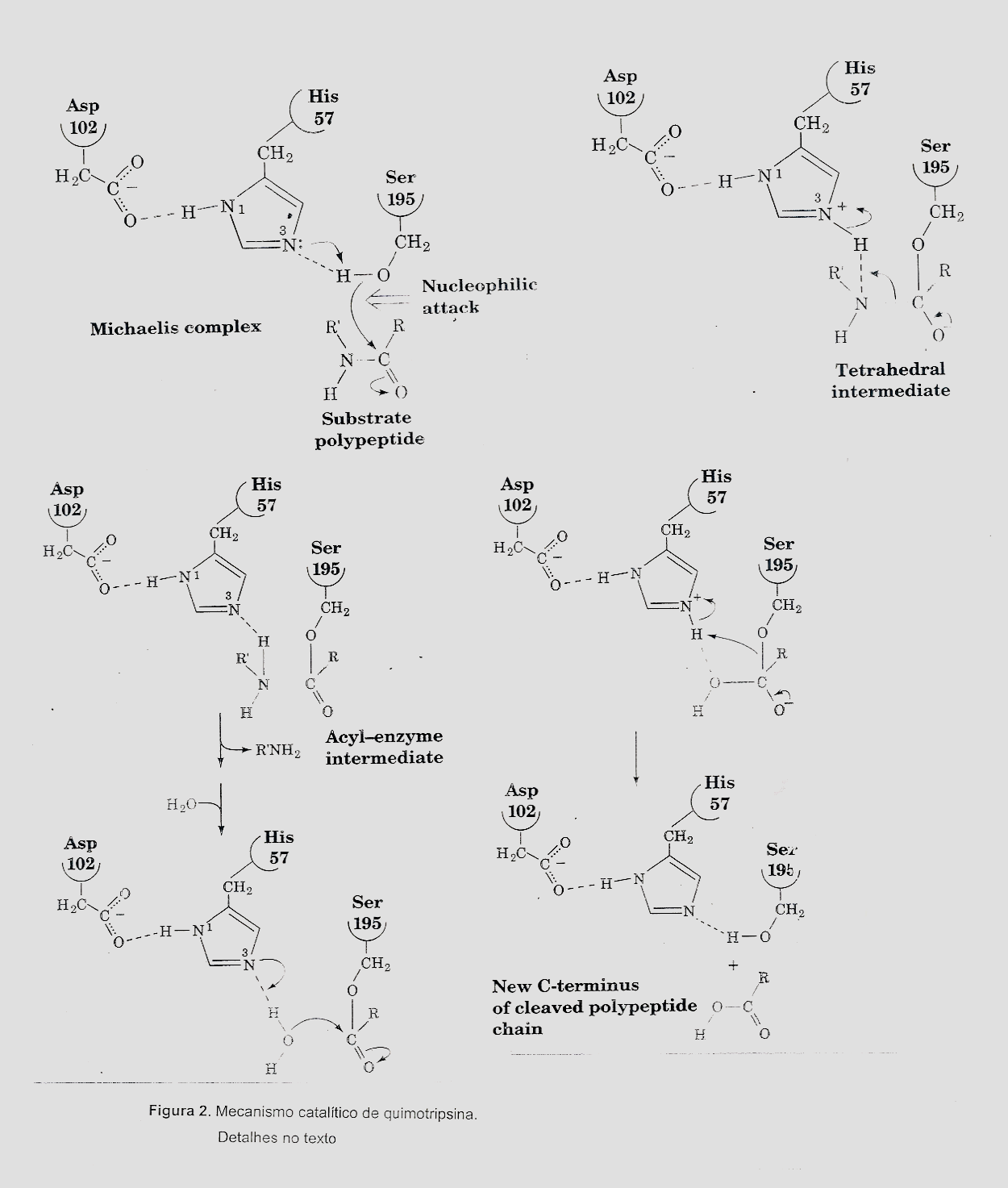
**Fig. 1.** Sítios que conferem especificidade a diferentes serina-proteinases. Reproduzido de Branden, C., Tooze, J. (1999) Introduction to Protein Structure. 2nd ed. Garland, New York.

**Mecanismo de ação da quimotripsina**

Um esquema do mecanismo de ação da quimotripsina está apresentado na Fig. 2, que deve ser analisada enquanto se lê o texto abaixo.

**MULTIMÍDIA – *Catalytic mechanism of serine proteases***

<http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/voet/0470570954/guided_exps/4e_ch15_gex_12/serine_proteases_4e.html>



**Fig. 2.** Mecanismo catalítico da quimotripsina. Detalhes no texto.

Quando o substrato se liga ao sítio ativo, a serina da posição 195 (Ser195), que é o principal grupo catalítico, faz um ataque nucleofílico na carbonila da ligação peptídica a ser clivada. Isso é facilitado pelo fato do imidazol da His ligar o H+ que é liberado. Essa tomada do H+ pela His é, por sua vez, auxiliada pela presença do resíduo de Asp que faz uma ponte de H com a His. Esses três resíduos são chamados de tríade catalítica, pois, embora só a Ser seja essencial para a catálise, a constante catalítica decresce algumas ordens de grandeza se não houver a His ou Asp nessas posições.

Após o ataque nucleofílico e a transferência do H+**,** o C da carbonila da ligação a ser clivada torna-se tetraédrico eháuma distorção na molécula de substrato, que faz com que o oxigênio dessa carbonila ocupe uma região mais no interior do sítio ativo, ocupando a região conhecida como “cavidade do oxiânion”. Nessa região, ele forma duas pontes de H com a enzima que não podem ser formadas quando o grupo está na sua forma normal (estado fundamental do substrato). Além disso, forma-se mais uma ponte de H entre o grupo NH da ligação que será clivada. Desse modo é formado um intermediário tetraédrico, que é o estado de transição da reação. A enzima liga melhor o intermediário tetraédrico do que o substrato. Esse intermediário se decompõe formando uma acil-enzima (cadeia do substrato ligada a Ser covalentemente pela carboxila). A nova porção N-terminal da proteína, que estava interagindo com o imidazol da His é liberada para a solução e substituída por uma água.

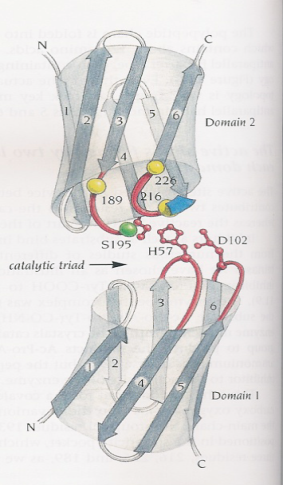
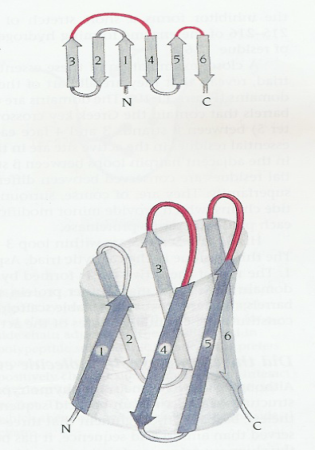
Os passos anteriores praticamente se repetem agora. A água é desprotonada pelo imidazol, adiciona-se ao carbono carbonílico gerando o mesmo intermediário tetraédrico. Esse se decompõe formando o outro fragmento peptídico e a Ser é re-protonada.

A Ser presente na quimotripsina é extremamente reativa e para isso a cadeia lateral precisa perder um H+. Em solução, a cadeia lateral da Ser não desprotona. Desse modo, o arranjo próximo da Ser com His e Asp, que só é conseguido dentro do sítio ativo da enzima, permite essa reatividade.

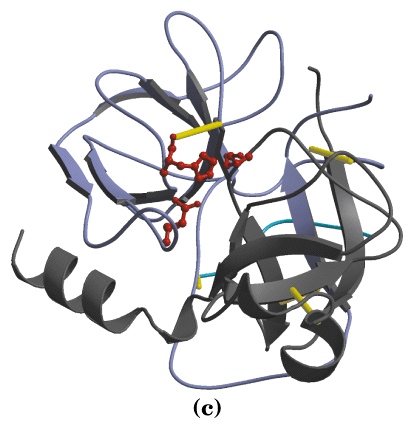
O fato do sítio ativo apresentar uma conformação tal que liga melhor o estado de transição que o estado fundamental do substrato é muito importante para a catálise. A quimotripsina nativa aumenta a velocidade da reação por um fator de cerca de 1010. Quando os três resíduos da tríade catalítica são mutados, a enzima ainda aumenta a velocidade da reação não catalisada em cerca de 104 vezes, aumento que é atribuído a maior ligação do estado de transição.

### Estrutura da quimotripsina

A cadeia da quimotripsina é formada por dois domínios do tipo -barril, cuja topologia é um motivo chave grega (fitas 1-4), seguido por um motivo grampo (fitas 5 e 6) (Fig. 8, pg26). O sítio ativo está situado em uma fenda entre os dois domínios. O domínio 1 contribui com dois resíduos da tríade catalítica, His 57 e Asp 102, enquanto que a Ser 195 é parte do segundo domínio (Fig. 4). Apesar dessa descrição simples, a estrutura real parece um pouco complicada, porque um barril está torcido em relação ao outro e eles estão um pouco distorcidos (Fig. 3).



**Fig. 3.** A figura da esquerda mostra o arcabouço de um dos domínios da quimotripsina como constituído de chave grega e grampo. A figura da direita mostra a disposição da tríade catalítica em relação aos dois domínios da quimotripsina. Reproduzido de Branden, C., Tooze, J. (1999) Introduction to Protein Structure. 2nd ed. Garland, New York.



**Fig. 4.** Estrutura 3D da quimotripsina.

No círculo, a tríade catalítica.