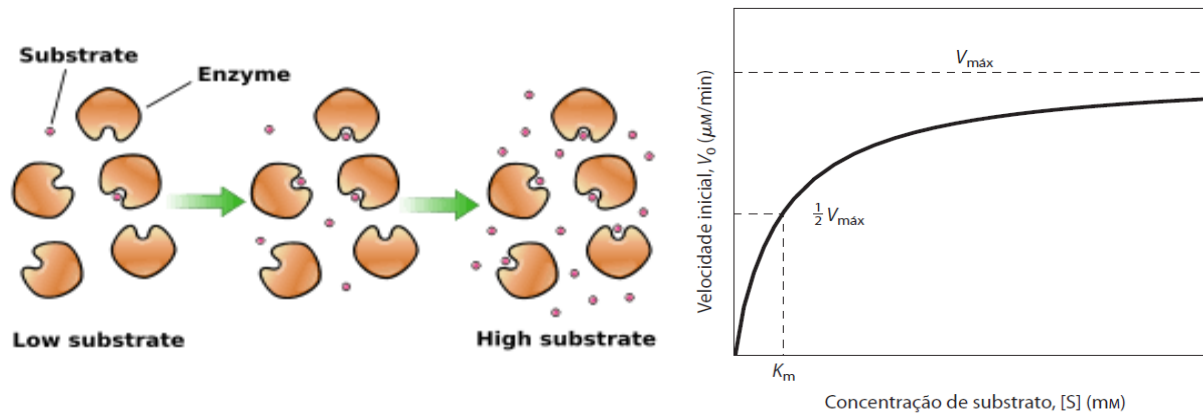
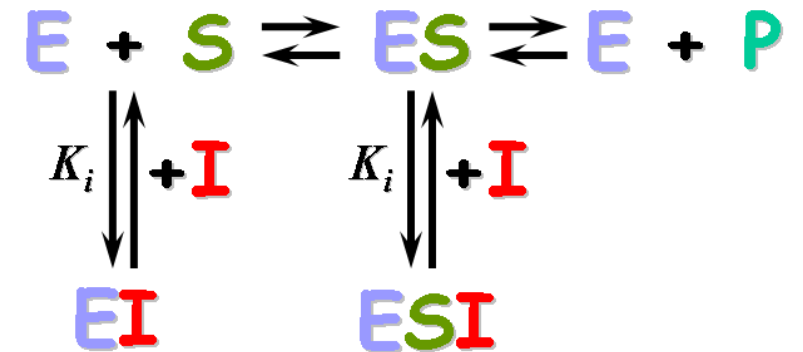




Cinética enzimática

Daniela Ramos Truzzi
dtruzzi@iq.usp.br



Cinética Enzimática

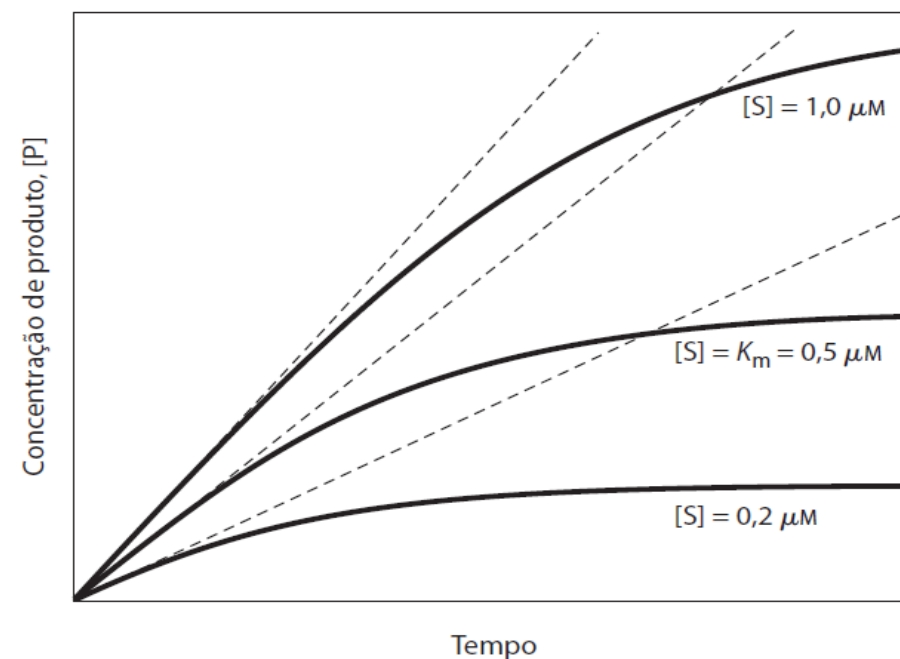
- ✓ Estudo da **velocidade** das reações catalisadas por enzimas e como ela se altera **em função de diferentes parâmetros**
- ✓ Usada para a **compreensão do mecanismo de ação** das enzimas

Enzima purificadas → determinação da velocidade de reação

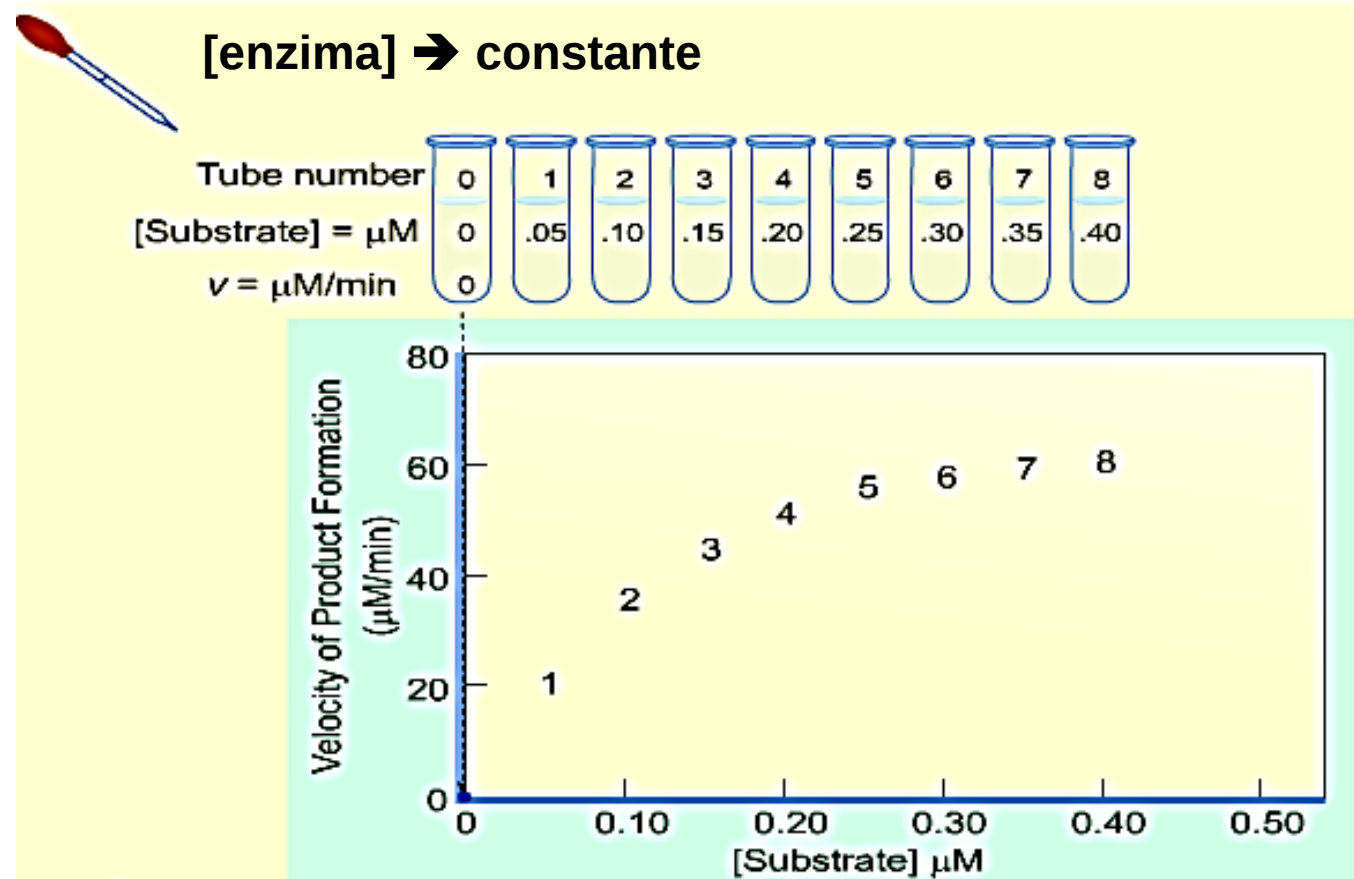
A concentração de substrato influencia na velocidade das reações catalisadas por enzimas

- ✓ Estudar o efeito da $[S]$ é complicado $\rightarrow [S]$ se modifica no curso da reação
- ✓ Velocidade Inicial (V_0)
Reação típica: $[S] \gg [E]$
- ✓ Monitorando apenas o início da reação (consumo da $[S] < 5\%$) $\rightarrow [S]$ pode ser considerada constante
- ✓ Isso permite que V_0 seja explorada em função da $[S]$

$$V_0 = \Delta[P]/\Delta t$$

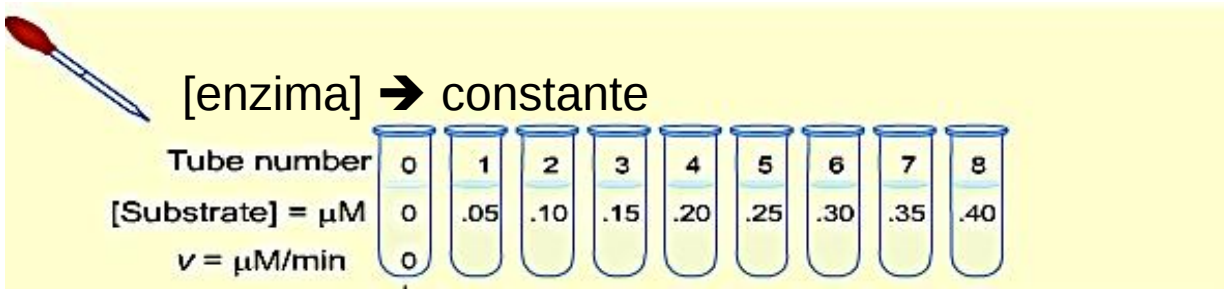


A concentração de **substrato** influencia na **velocidade** das reações catalisadas por enzimas

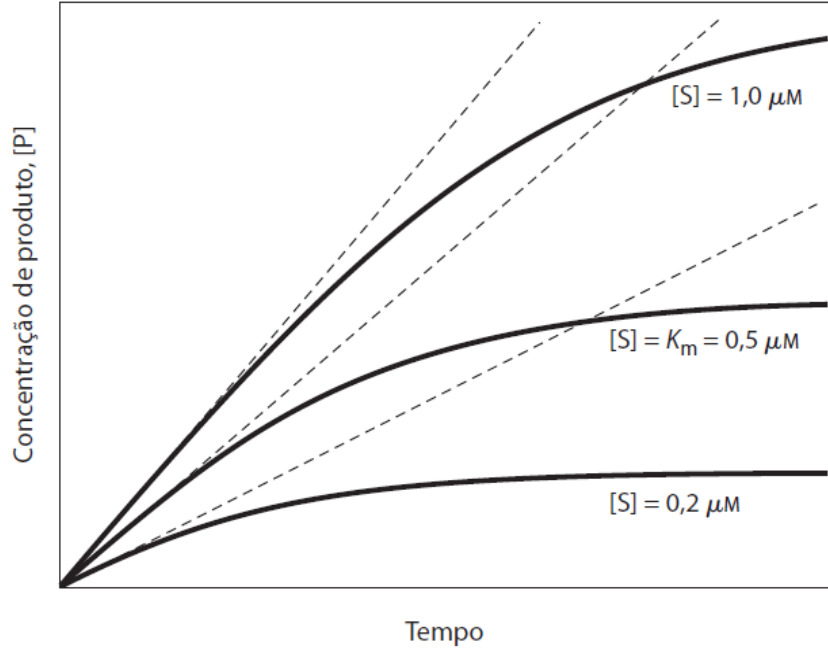


Observações: ↓ [S] → aumento linear de V_0

↑ [S] → aumento de V_0 é insignificante → Platô → V_{max}

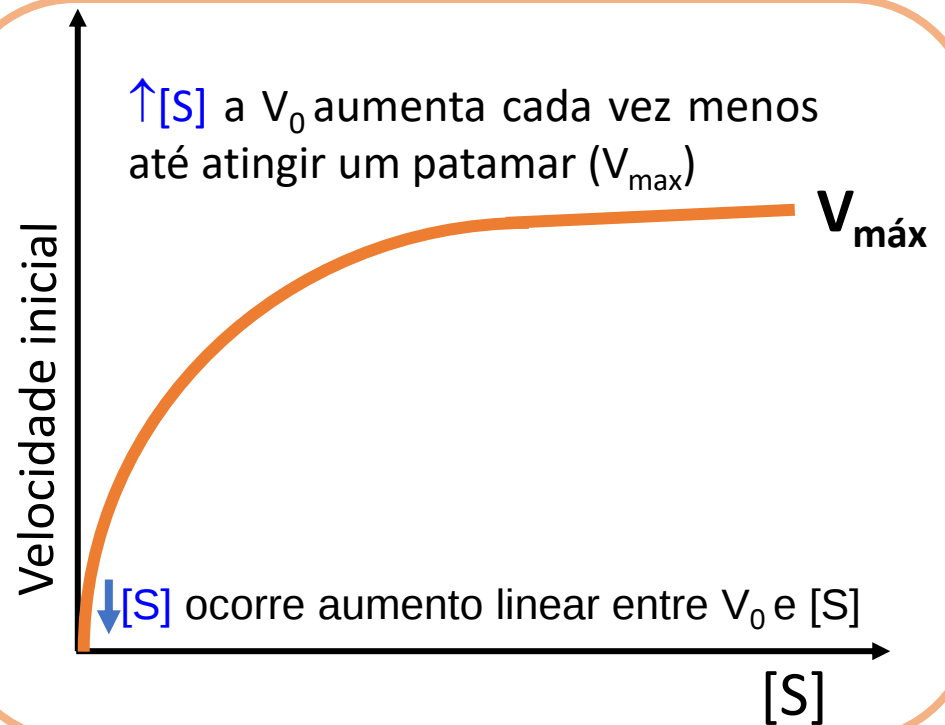
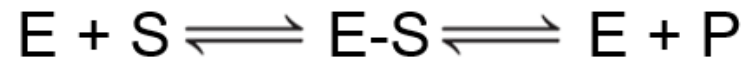


$$V_0 = \Delta[P]/\Delta t$$



Princípios de bioquímica de Lehninger; David L. Nelson, Michael M. Cox; 6. ed, Artmed, 2014.

A concentração do substrato interfere na atividade enzimática



Por que a curva da velocidade da reação é hiperbólica?

Cinética da reação enzimática

1913 – Leonor Michaelis e Maud Menten postulam:

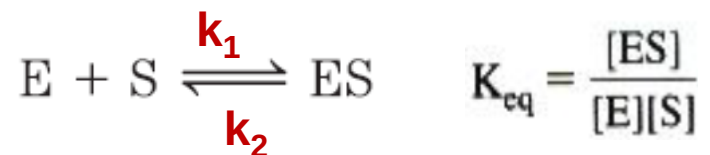


Leonor Michaelis, 1875-1949

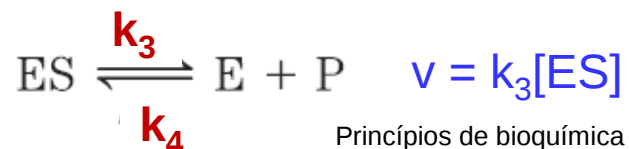


Maud Menten, 1879-1960

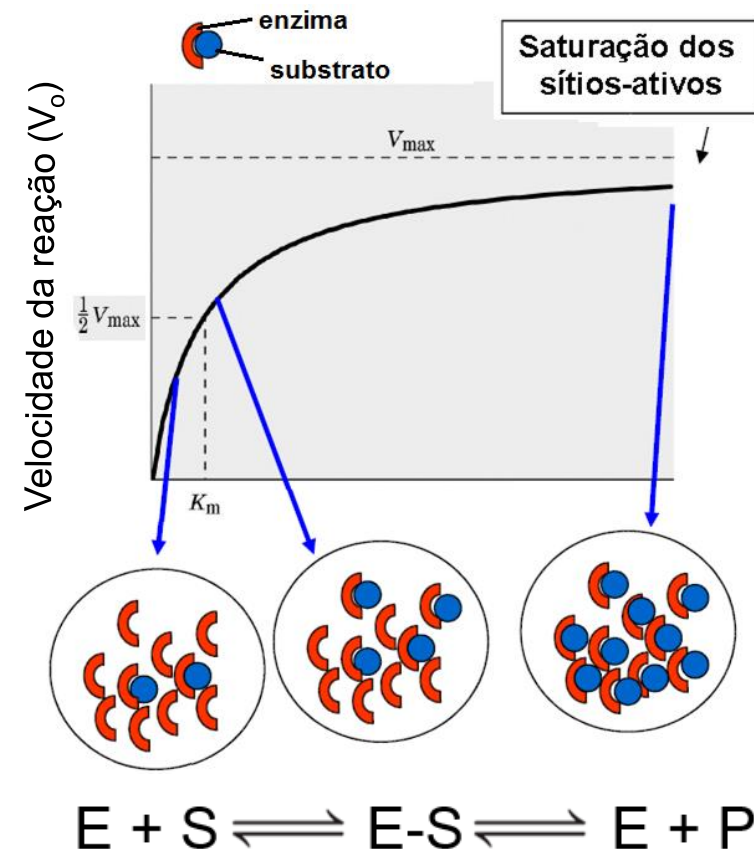
- 1) Enzima e substrato combinam-se formando o complexo enzima-substrato, [ES] → **associação rápida e reversível**



- 2) A formação de produto é a etapa **limitante da reação** → **velocidade proporcional a [ES]**



Princípios de bioquímica de Lehninger; David L. Nelson, Michael M. Cox; 6. ed, Artmed, 2014.



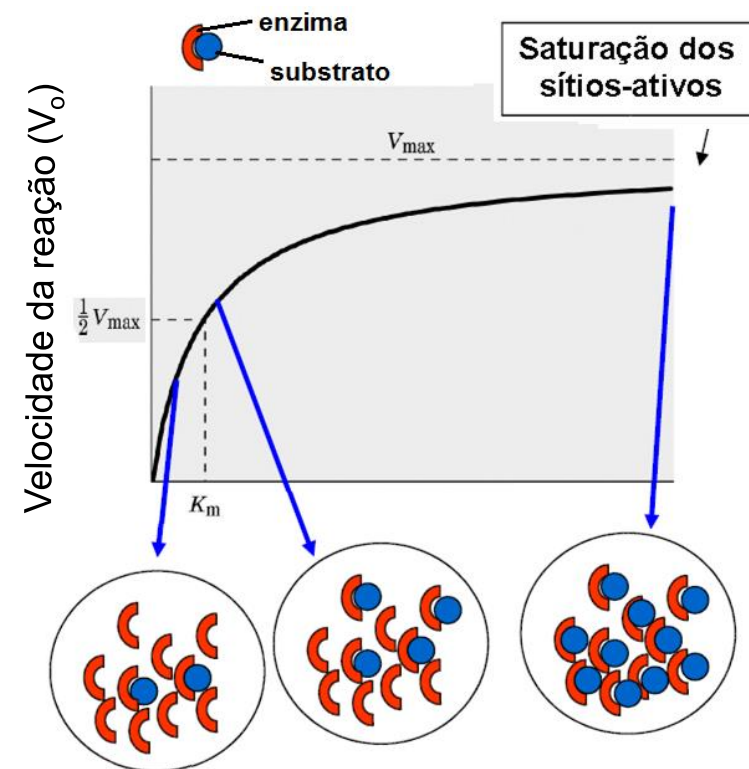
Cinética da reação enzimática

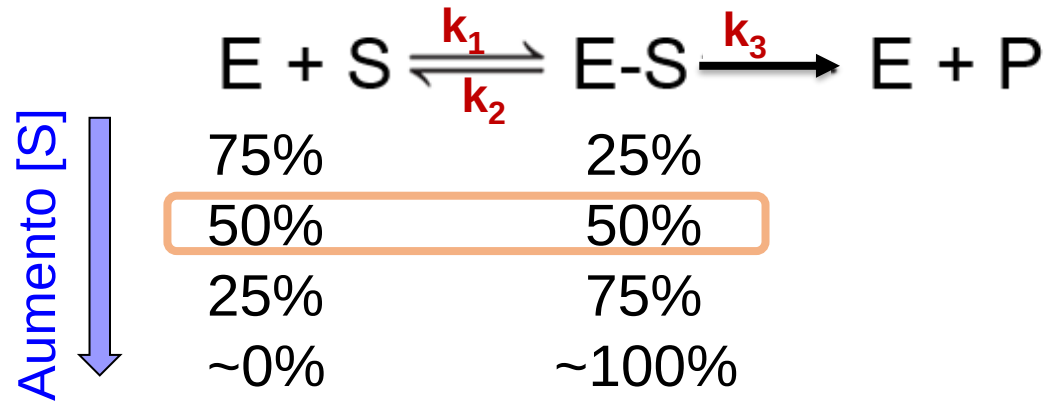


Enzima pode estar presente em solução na formas E e ES

Em baixa [S] → maior parte da enzima está na forma E → aumento de V_0 é proporcional a [S], pois ele desloca o equilíbrio para a formação de ES

Em alta [S] → maior parte da enzima está convertida em ES → o aumento da [S] já não influencia no equilíbrio (não há o que deslocar) → Enzima “saturada” → $V_{\max}$

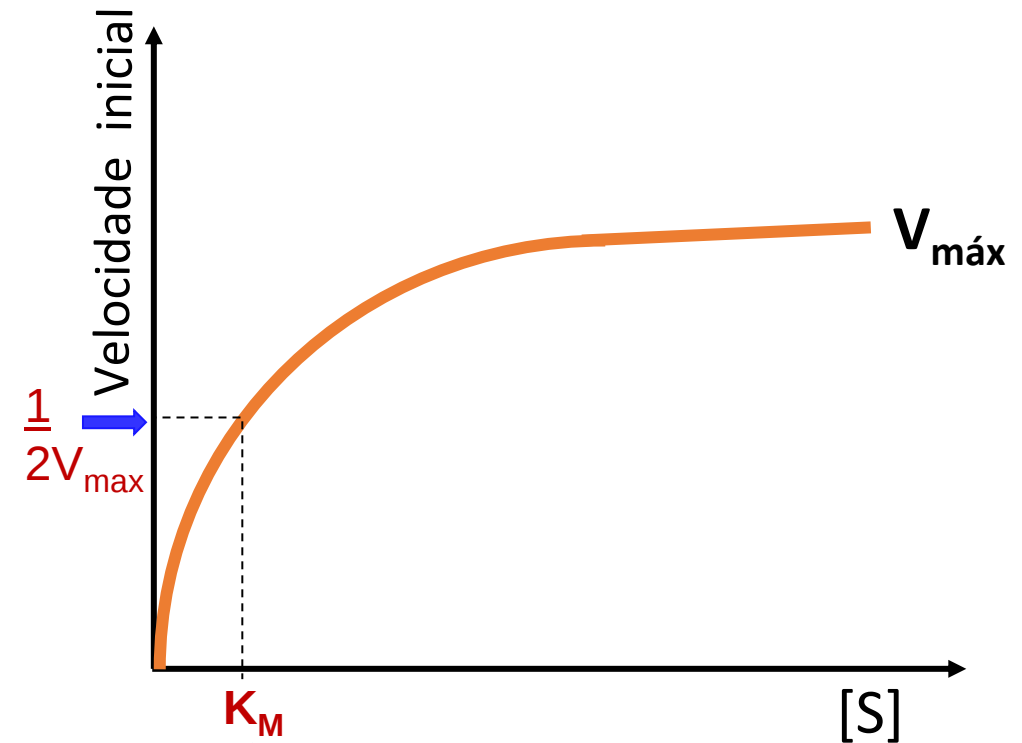




$K_M \rightarrow$ indica a **afinidade** da enzima pelo seu substrato

Hexoquinase: $K_M = 0,15\text{mM}$ para glicose
 $K_M = 1,50\text{mM}$ para frutose

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_d$$

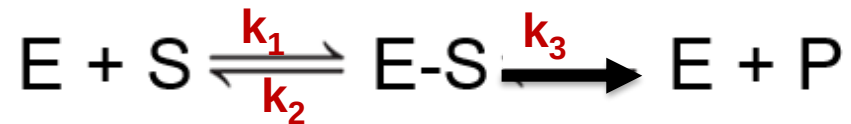


constante de *Michaelis-Menten*

Relação entre $[S]$ e V_0 pode ser expressa quantitativamente



Equação de Michaelis-Menten



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

velocidade inicial - V_0

velocidade máxima - $V_{\max}$

constante de Michaelis - K_M

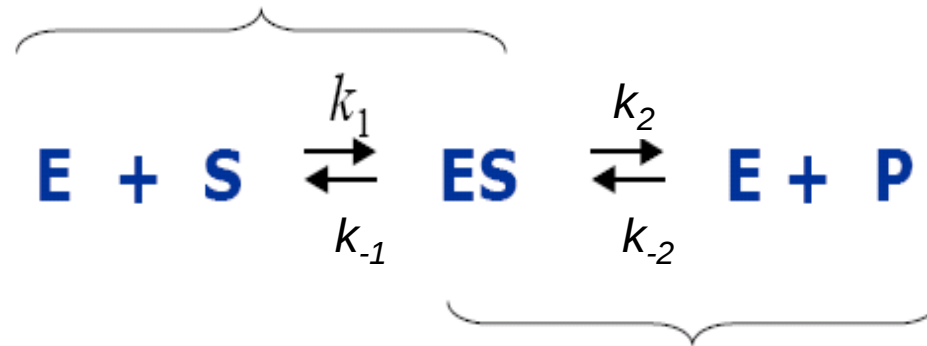
Todos os termos são determinados experimentalmente → fácil determinação de K_M

Dedução da equação de Michaelis-Menten

O modelo de Michaelis-Menten considera que uma reação enzimática ocorre em 2 etapas:

ETAPA 1. Ligação de um substrato (S) a uma enzima (E), formando um complexo intermediário (ES)

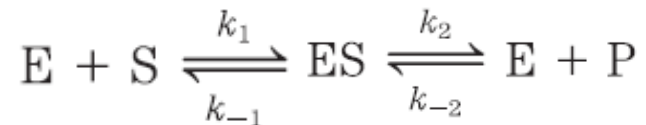
Etapa 1



Etapa 2

ETAPA 2. Formação do produto (P) a partir do complexo ES, com recuperação da forma livre da enzima (E)

Dedução da equação de Michaelis-Menten



✓ **Simplificação:** no início da reação, [P] é desprezível → k_{-2} pode ser ignorada: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$
Etapa rápida Etapa lenta

✓ V_0 é determinada pela quebra de ES para formar

$$V_0 = k_2[ES]$$

✓ É simples determinar a [ES]??? → Solução: encontrar expressões alternativas para esse termo

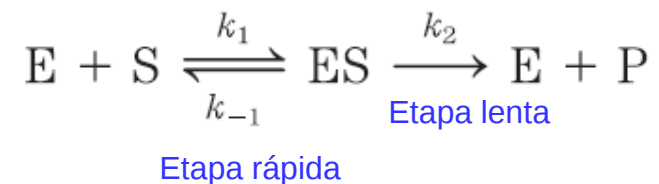
✓ Quais parâmetros podem ser determinados facilmente?

[Et] → concentração total de enzima

$$[Et] = [E] + [ES]$$

[S] → concentração de substrato → $[S] \gg [Et]$, portanto sua variação durante a reação é desprezível

Dedução da equação de Michaelis-Menten



- ✓ Determinar a velocidade de formação e quebra de ES

Velocidade de formação de ES = $k_1[\text{E}][\text{S}]$

como $[\text{E}_t] = [\text{E}] + [\text{ES}]$, então $[\text{E}] = [\text{E}_t] - [\text{ES}]$

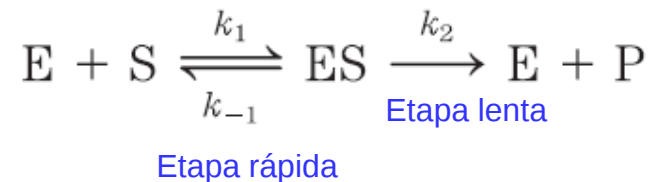
Substituindo tenho que → Velocidade de formação de ES = $k_1([\text{E}_t] - [\text{ES}])[\text{S}]$

Velocidade de quebra de ES = $k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$

- ✓ Hipótese do estado estacionário → $[\text{ES}]$ constante, portanto as velocidade de formação e consumo de ES são iguais

$$k_1([\text{E}_t] - [\text{ES}])[\text{S}] = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$$

Dedução da equação de Michaelis-Menten



$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

✓ Resolver a equação para [ES] (isolar [ES])

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

✓ Combinar as constantes de velocidade

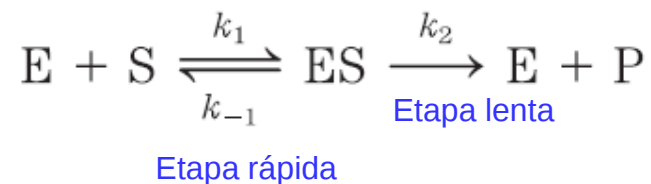
$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1}$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

Constante de Michaelis-Menten

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Dedução da equação de Michaelis-Menten



$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_t][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

✓ Substituir em V_0

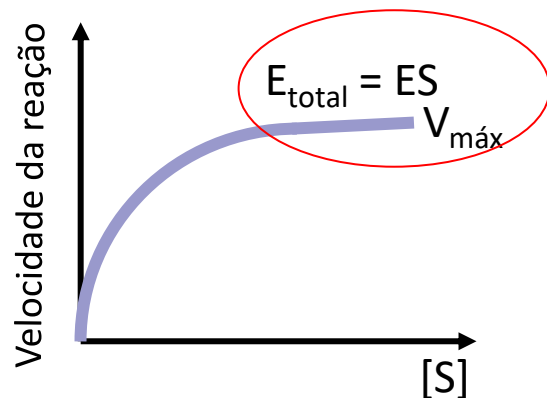
$$V_0 = k_2[\text{ES}]$$

$$[\text{ES}] = V_0/k_2$$

$$V_0 = \frac{k_2[\text{E}_t][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

✓ Simplificação → Na V_{max} : $[\text{E}_t] = [\text{ES}]$

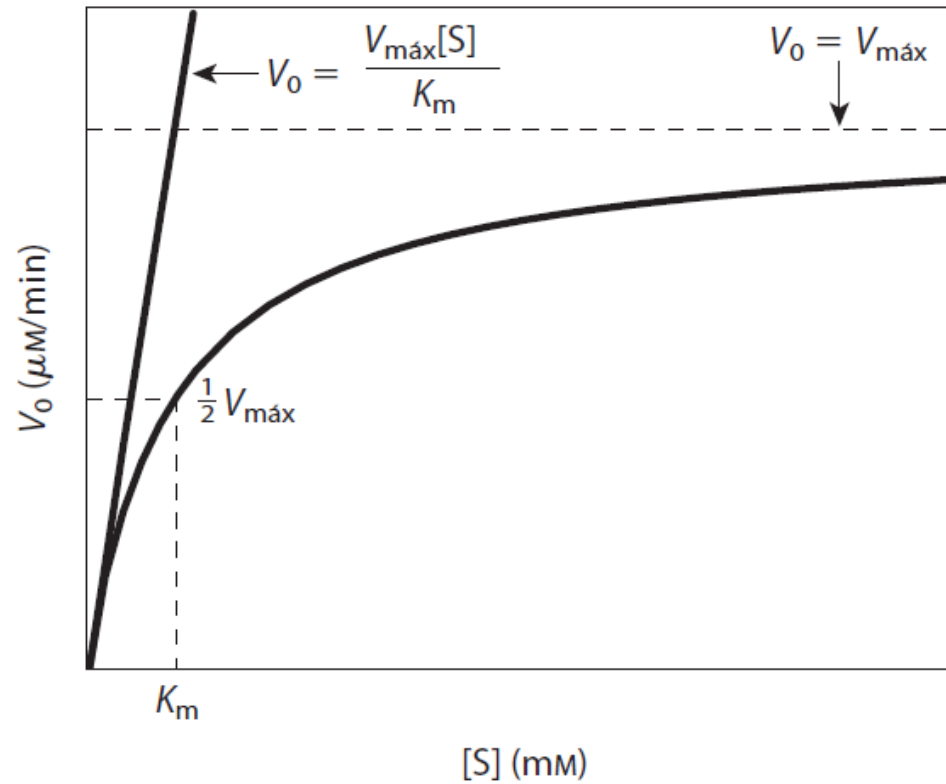
$$V_{\text{max}} = k_2[\text{E}_t]$$



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

Equação de Michaelis-Menten

Vantagens da equação → parâmetros podem ser obtidos experimentalmente



1. Em baixa $[S]$: $K_m \gg [S]$

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

2. Em alta $[S]$: $K_m \ll [S]$

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

3. $V_0 = 1/2 V_{\text{max}}$ $K_m = [S]$

Quando $V_0 = 1/2V_{\max}$

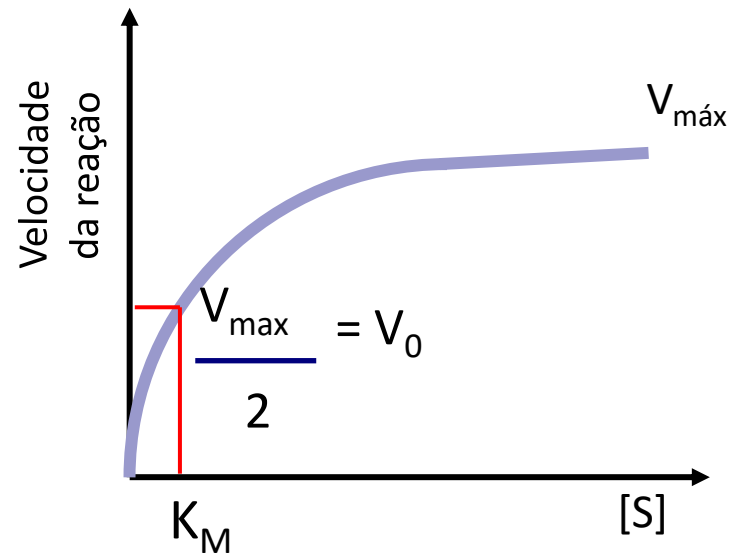
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{1 [S]}{K_M + [S]}$$

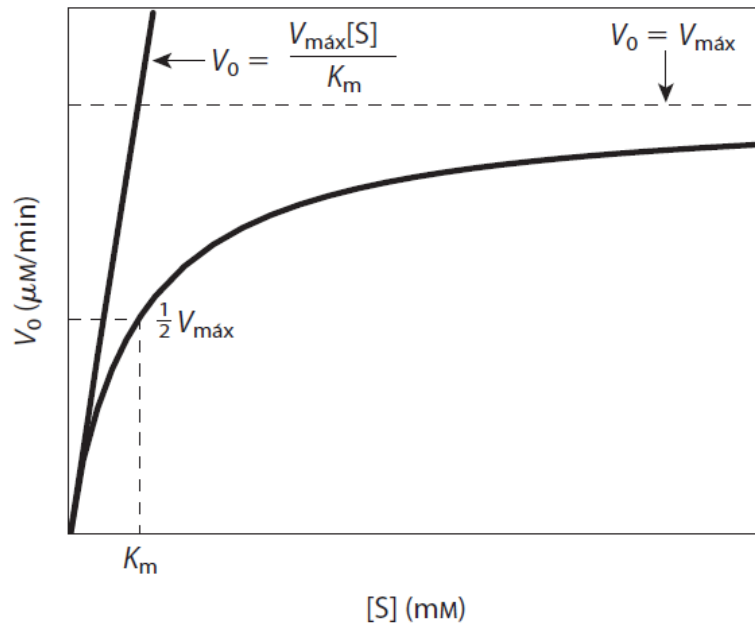
$$\cancel{K_M + [S]} = \cancel{2 [S]}$$

$$K_M = [S]$$



Transformação da Equação de Michaelis-Menten: gráfico duplo-recíproco

- ✓ A dificuldade de atingir a $V_{\max}$ em reações enzimáticas impossibilita determinações de $K_M \rightarrow$ o gráfico duplo-recíproco possibilita a determinação $V_{\max}$ e K_M



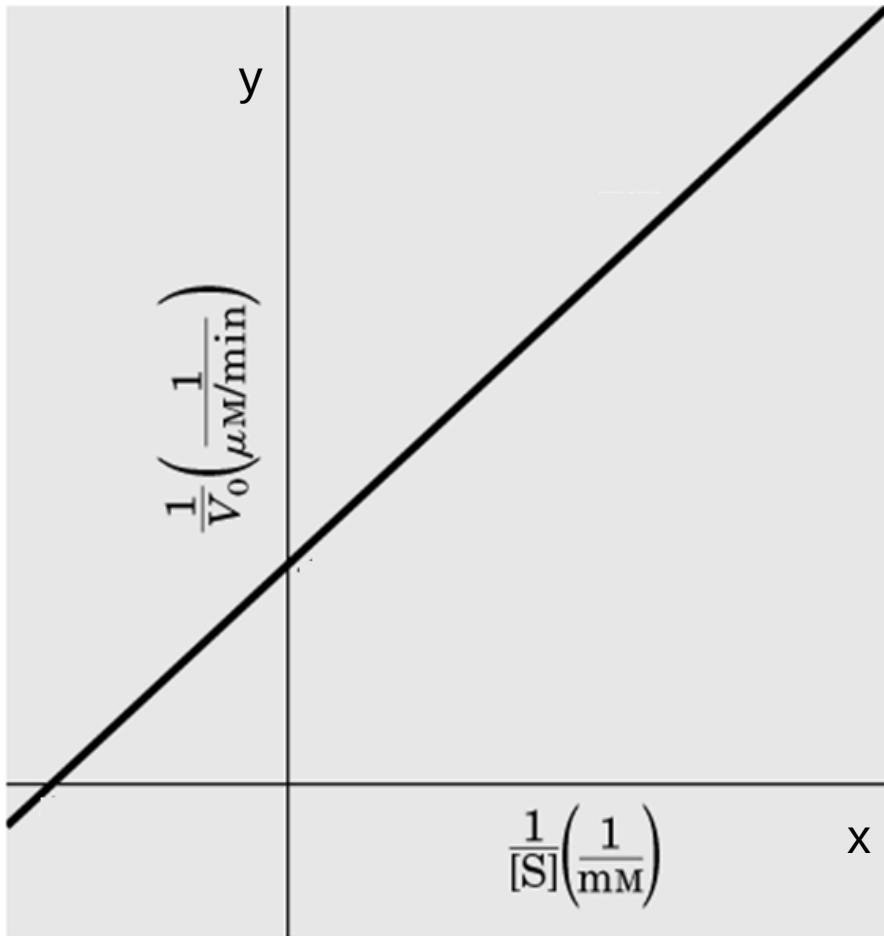
$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{inverter} \quad \frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]}$$

Separar
componentes e
resolver

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{\cancel{[S]}}{V_{\max}\cancel{[S]}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

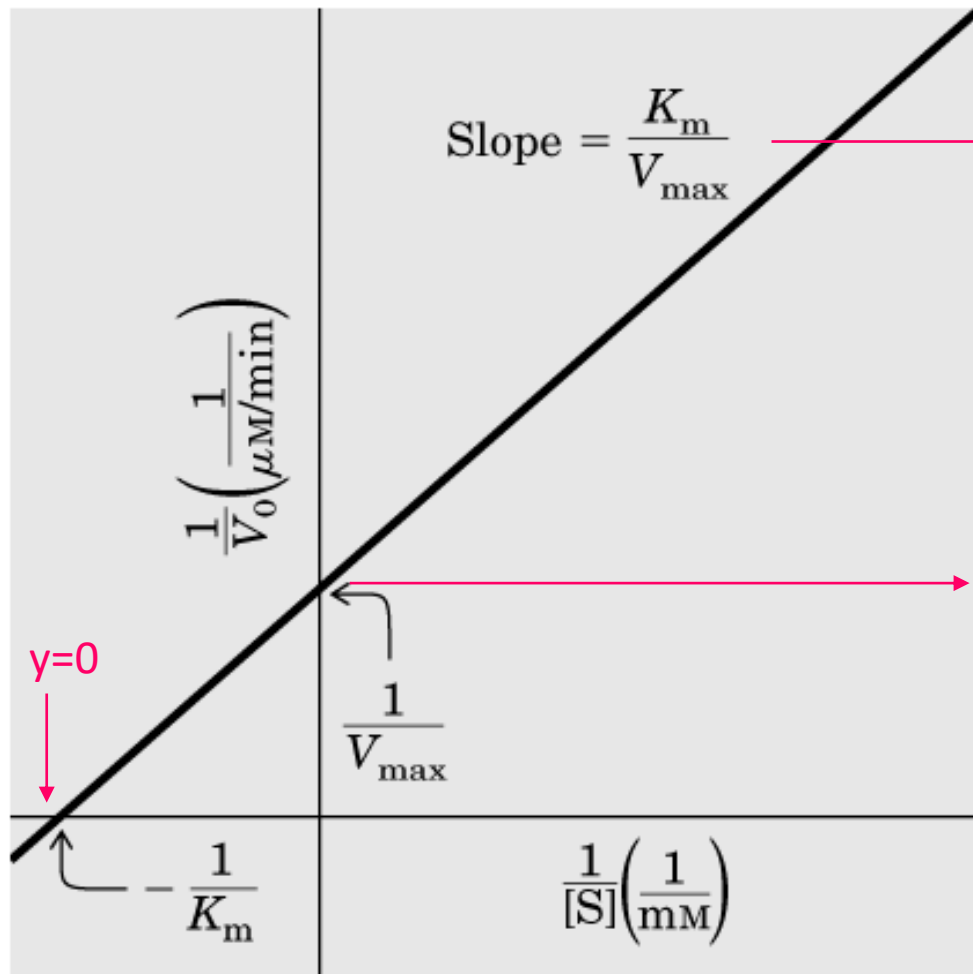
Com essa transformação matemática, plotando $1/V_0$ em função de $1/[S]$ passa-se a trabalhar com uma reta e não com uma hipérbole → mais fácil



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = ax + b$$



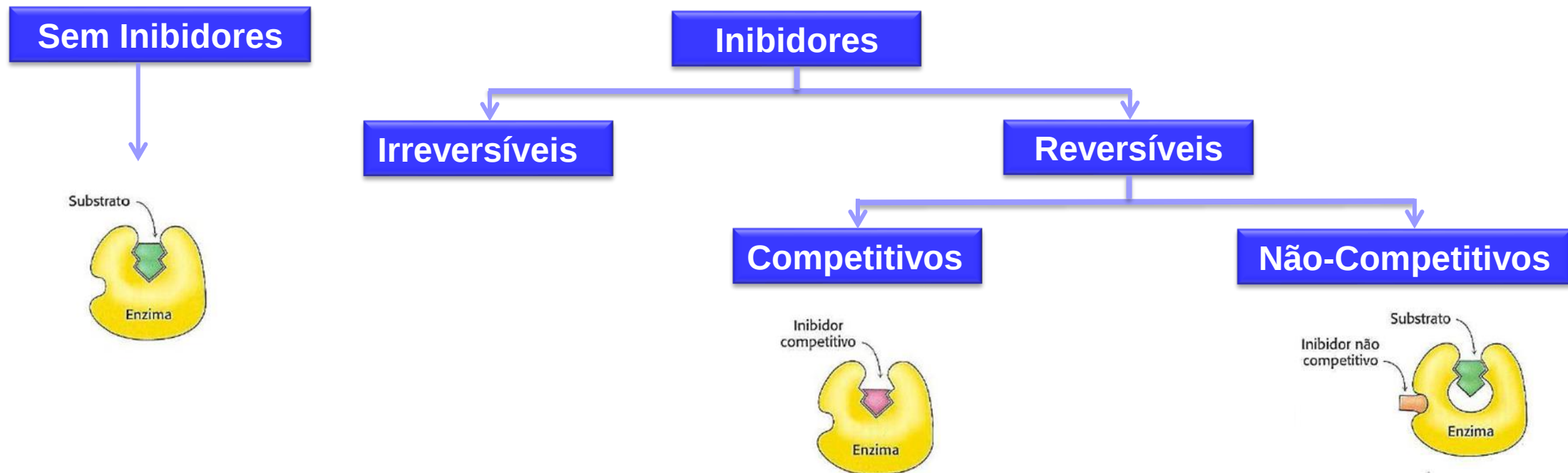
$a =$ coeficiente angular
(inclinação da reta)

$b =$ onde a reta intercepta y

- ✓ A **equação de Michaelis-Menten** descreve o **comportamento cinético** da maioria das enzimas
- ✓ Entretanto, a equação de Michaelis-Menten **não depende do mecanismo de reação** em duas etapas proposto → Muitas enzimas seguem a cinética de Michaelis-Menten mesmo apresentando mecanismos de reação muito diferentes
- ✓ Ou seja, os parâmetros $V_{\max}$ e K_m podem ser obtidos experimentalmente para qualquer enzima, mas **a interpretação desses parâmetros exige cuidado!!!**

Inibição da atividade enzimática

- ✓ As enzimas podem ter sua **atividade reduzida** pela ação de inibidores.
- ✓ **Inibidores** → podem ser constituintes normais das células ou estranhos a elas.
- ✓ **Importância:** mecanismo de controle da velocidade das reações enzimáticas (regulação), desenvolvimento de fármacos.



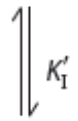
Inibição reversível e COMPETITIVA

(a) Inibição competitiva

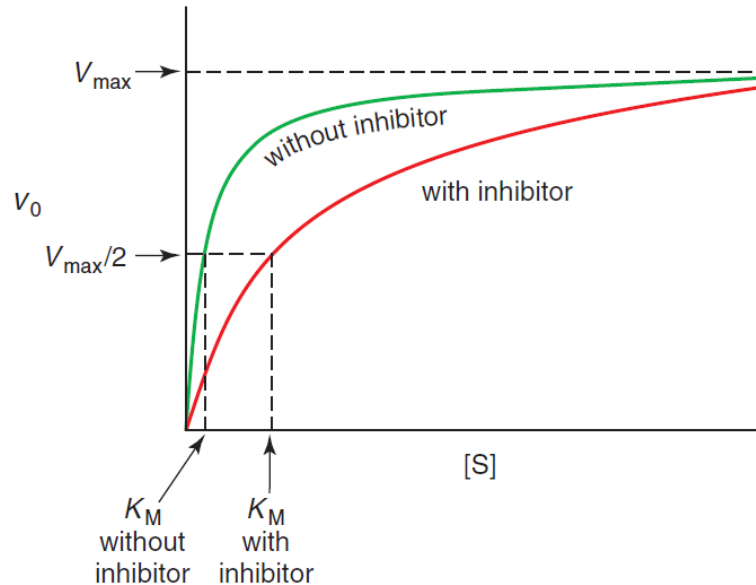
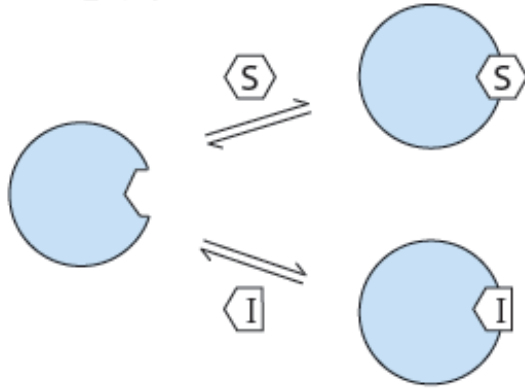


+

I



EI

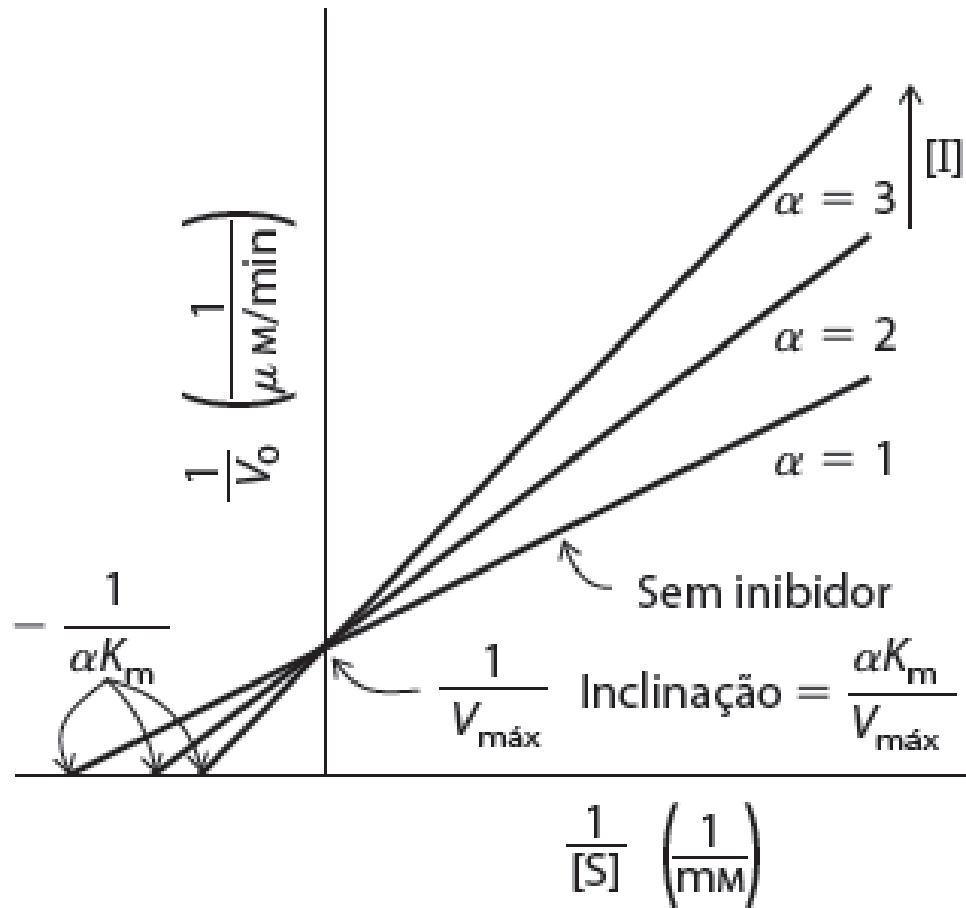


- ✓ Inibidor → tem configuração espacial semelhante à do substrato e **compete pelo sítio ativo** → impacta a formação de ES
- ✓ A $V_{\max}$ não altera
- ✓ K_M é alterado, pois é necessário uma maior $[S]$ para atingir a $V_{\max}$



Inibição reversível e COMPETITIVA

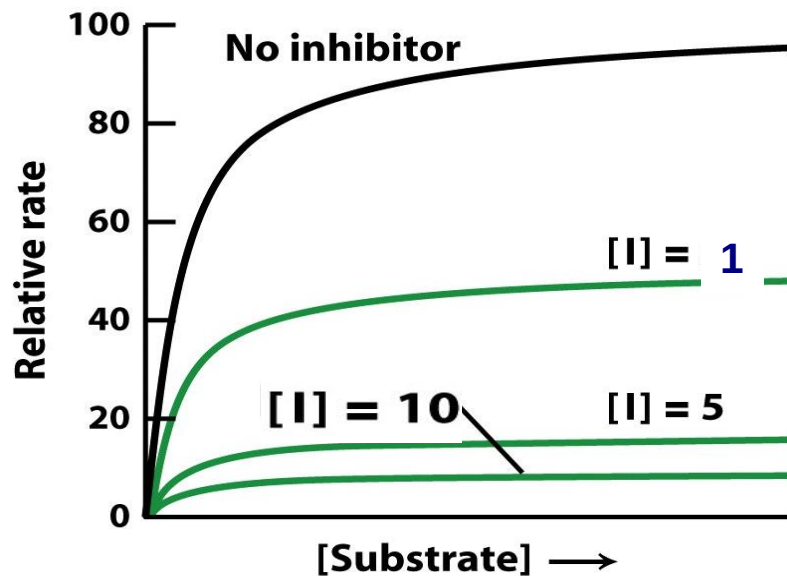
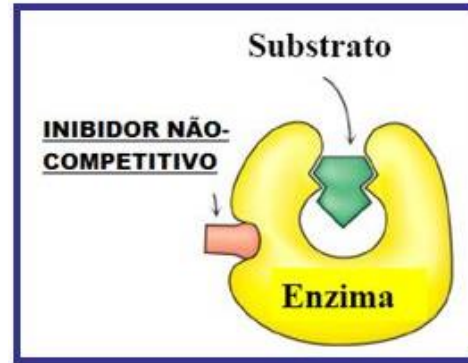
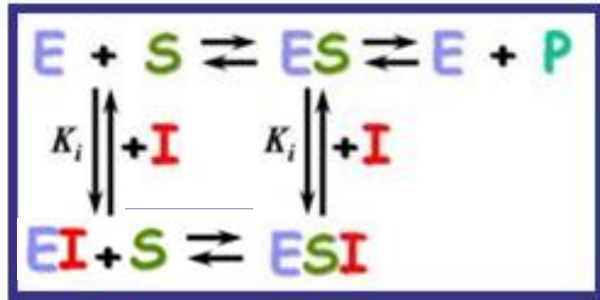
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Inclinação = $K_M/V_{\max}$ $\uparrow \rightarrow$ qto maior a $[I]$, maior $[S]$ necessária para atingir $1/2V_{\max}$

Intercepto $y = 1/V_{\max}$ não muda

Inibição reversível e NÃO COMPETITIVA



- ✓ Inibidor → não tem semelhança estrutural com o substrato e tem ação inespecífica.
- ✓ O inibidor se **liga a E ou ES**.
- ✓ A V_{max} diminui com o aumento [I]
- ✓ K_M é mantido

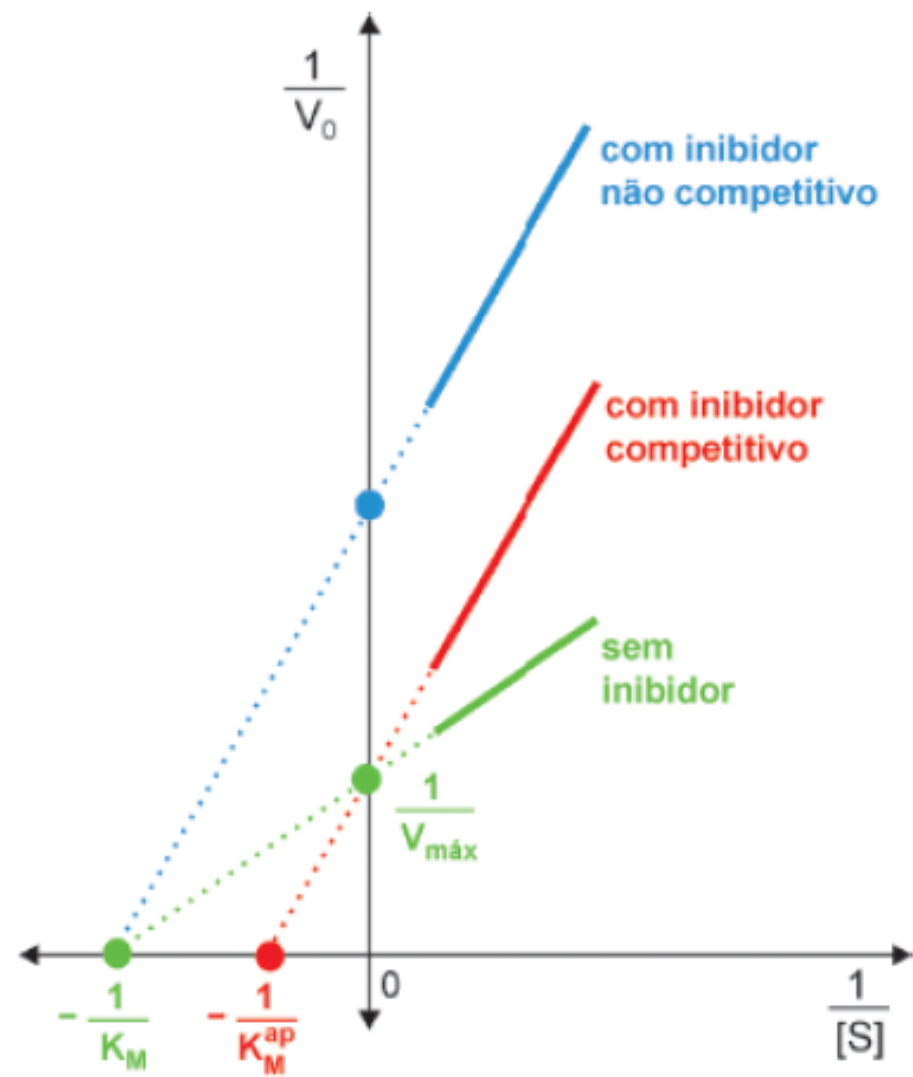


Figura 5.14 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não competitivo.

Inibição irreversível

- ✓ Inibidor se liga de forma permanente ao sítio ativo por meio de ligações covalentes ou interações não covalentes muito estáveis.
- ✓ Inativadores suicidas → relativamente não reativos até que se liguem ao sítio ativo da enzima específica → Inativadores com base no mecanismo

Exemplo do uso de inibição farmacologia:

Penicilina → ligação covalente enzima transpeptidase → inibe a síntese de parede celular bacteriana.

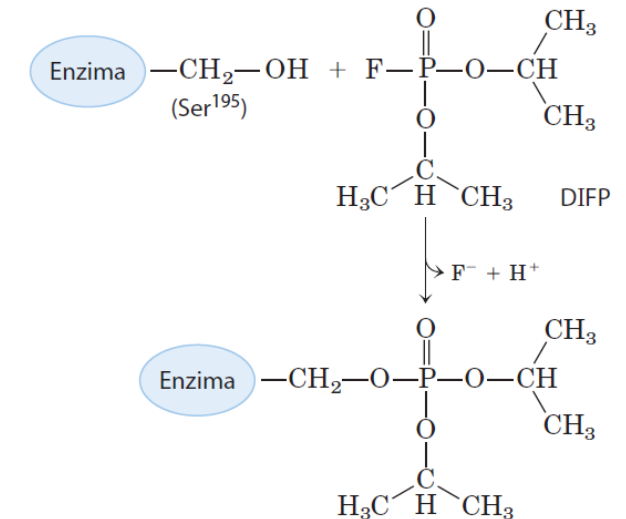
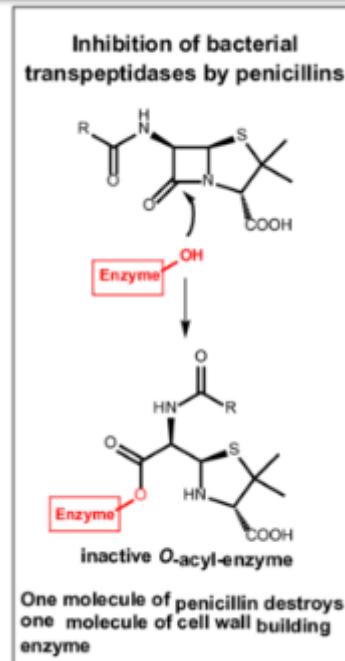
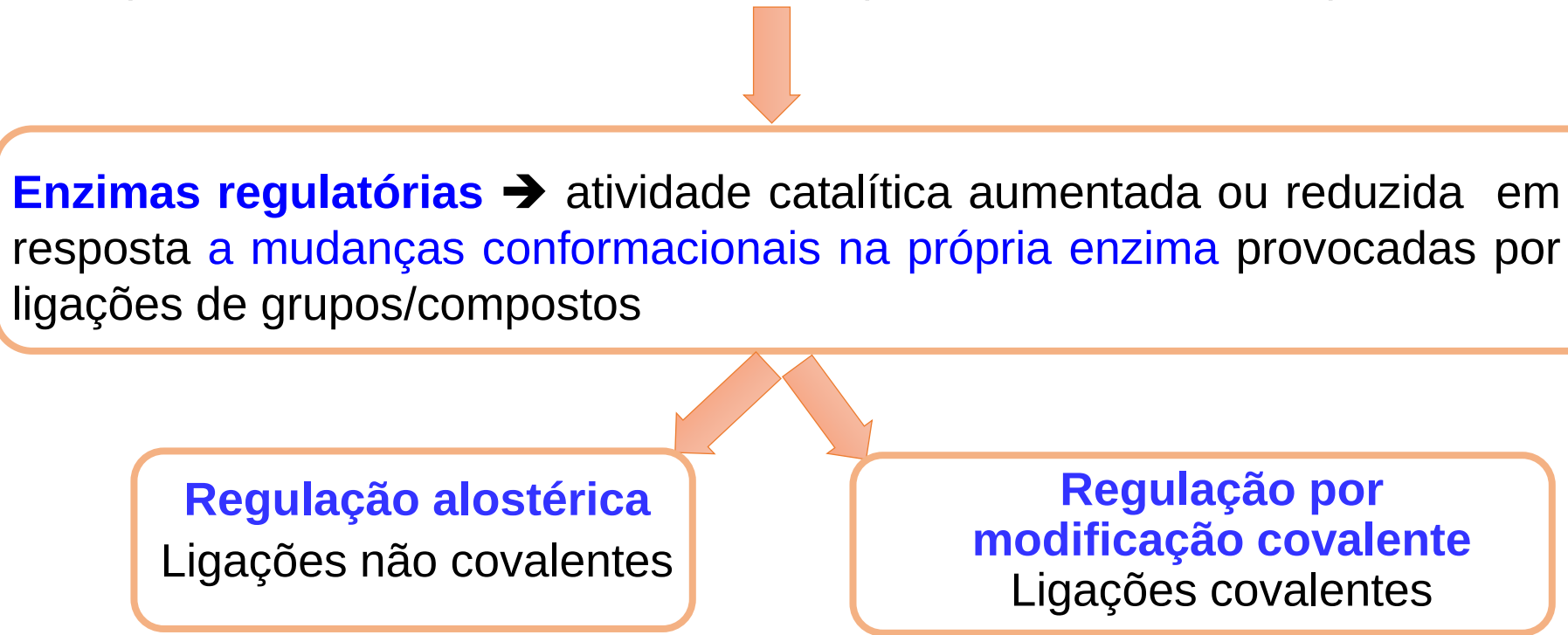


FIGURA 6-16 Inibição irreversível. A reação da quimotripsina com di-isopropilfluorofosfato (DIFP), que modifica a Ser¹⁹⁵, inibe a enzima irreversivelmente. Isso levou à conclusão de que a Ser¹⁹⁵ é o resíduo de serina chave na quimotripsina.

Regulação da atividade enzimática

Mecanismos de modulação da atividade enzimática:

- 1) Disponibilidade de enzimas (síntese e degradação)
- 2) Controle da atividade enzimática (velocidade de catálise)



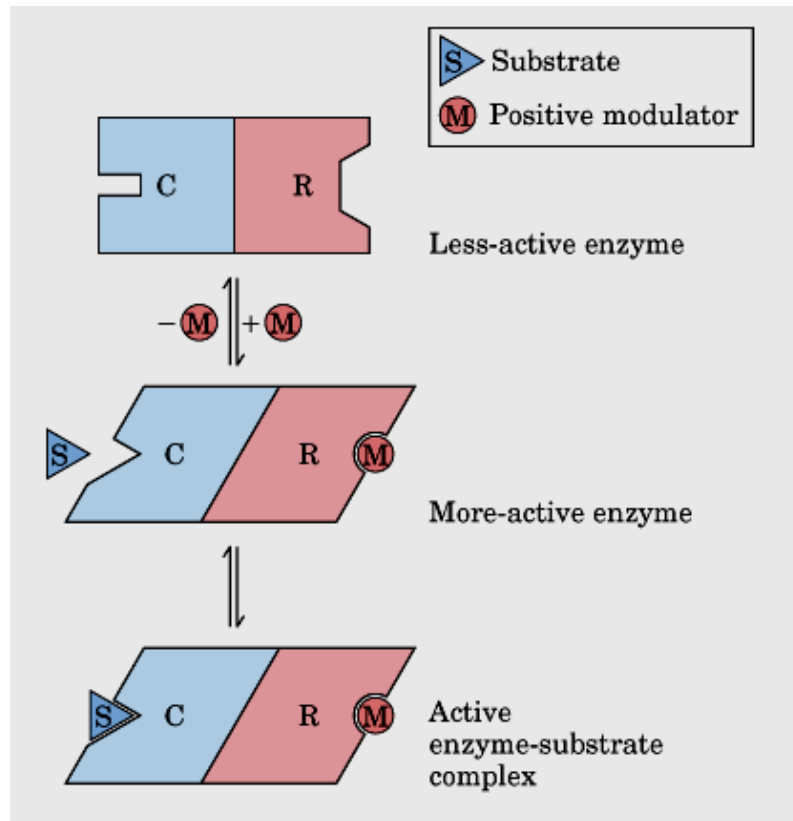
Enzimas regulatórias → atividade catalítica aumentada ou reduzida em resposta a mudanças conformacionais na própria enzima provocadas por ligações de grupos/compostos

Regulação alostérica
Ligações não covalentes

Regulação por modificação covalente
Ligações covalentes

Enzimas alostéricas

Enzimas alostéricas são aquelas que possuem “outras formas” ou conformações induzidas pela ligação de **efetadores/moduladores**.



Inibitórios
(negativos)

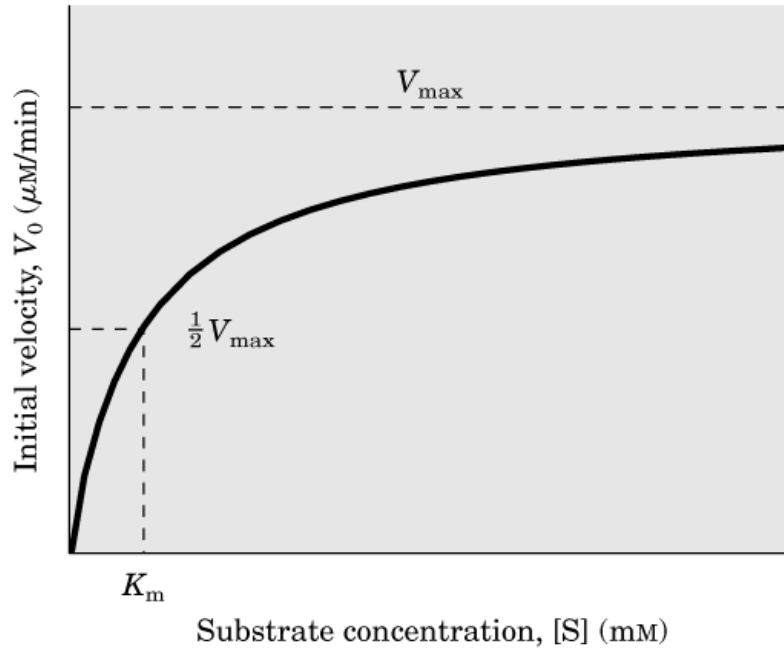
estimulatórios
(positivos)

- ✓ Possuem **sítios alostéricos** para a ligação do modulador específico
- ✓ Maiores e mais complexas que as não-alostéricas (mais que uma cadeia polipeptídica)

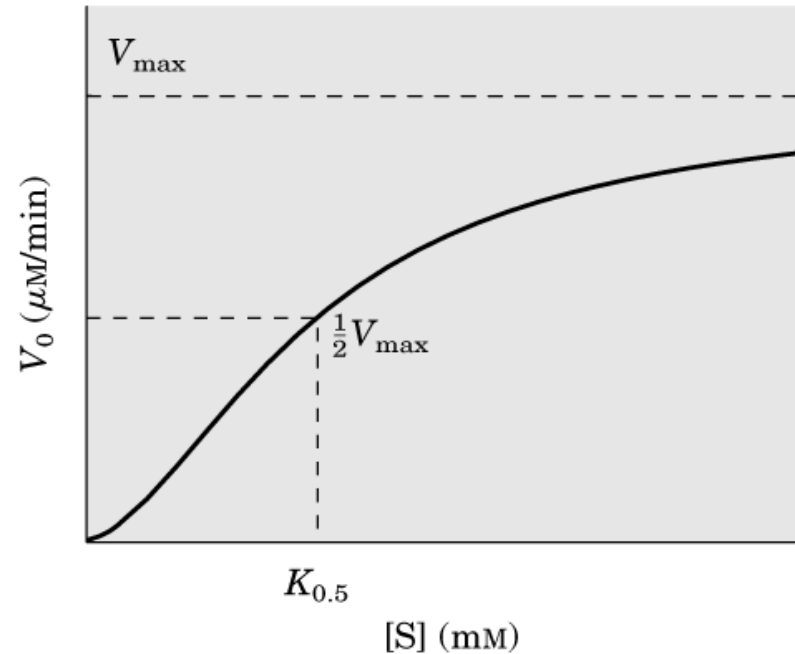
Homotrópicas: modulador é o próprio substrato

Heterotrópicas: modulador $\neq$ substrato

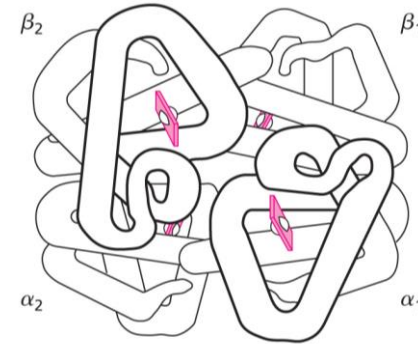
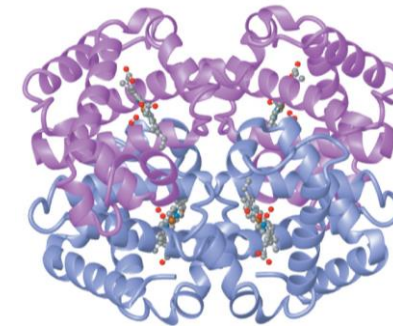
Enzimas alostéricas



Enzima michaeliana



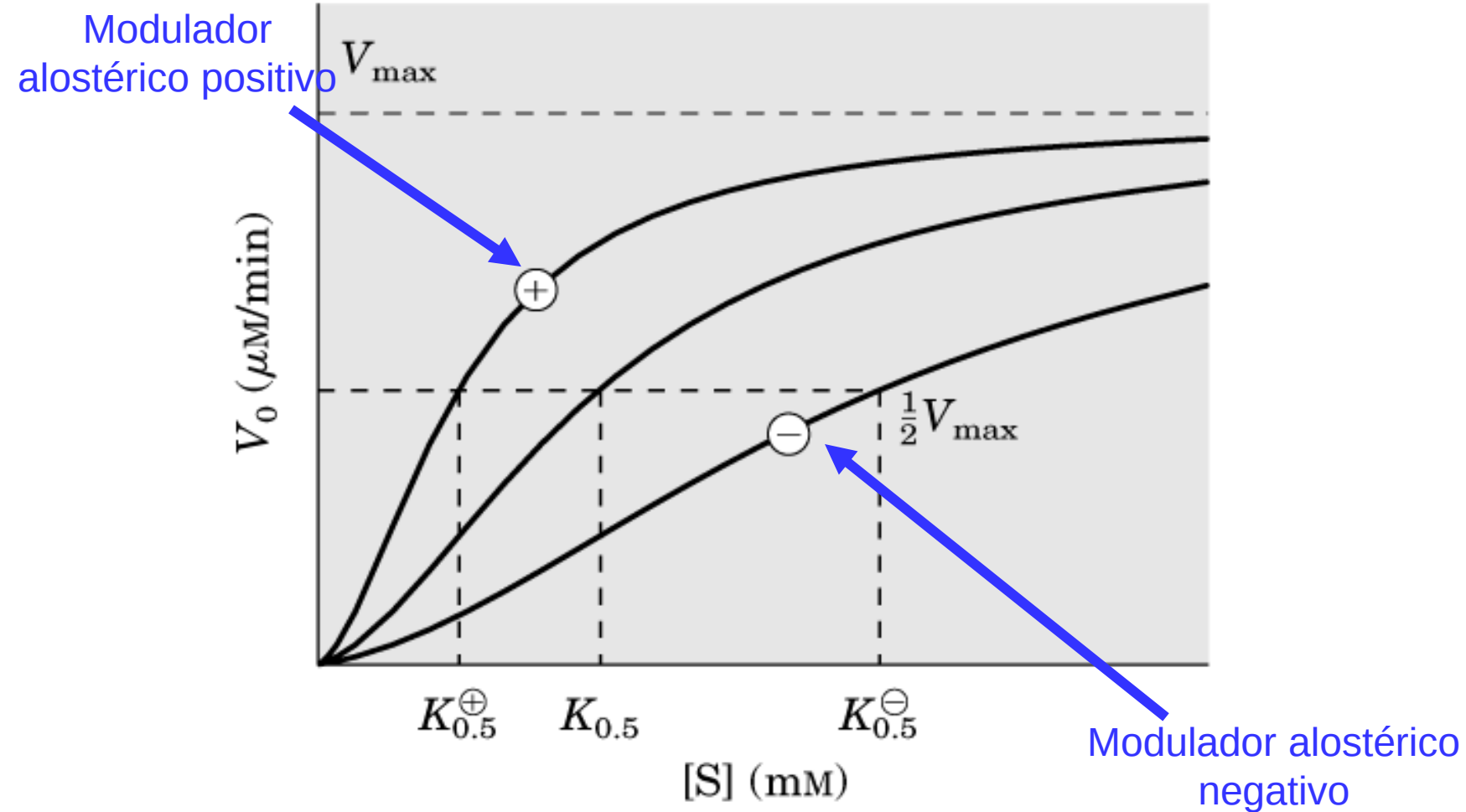
Enzima alostérica



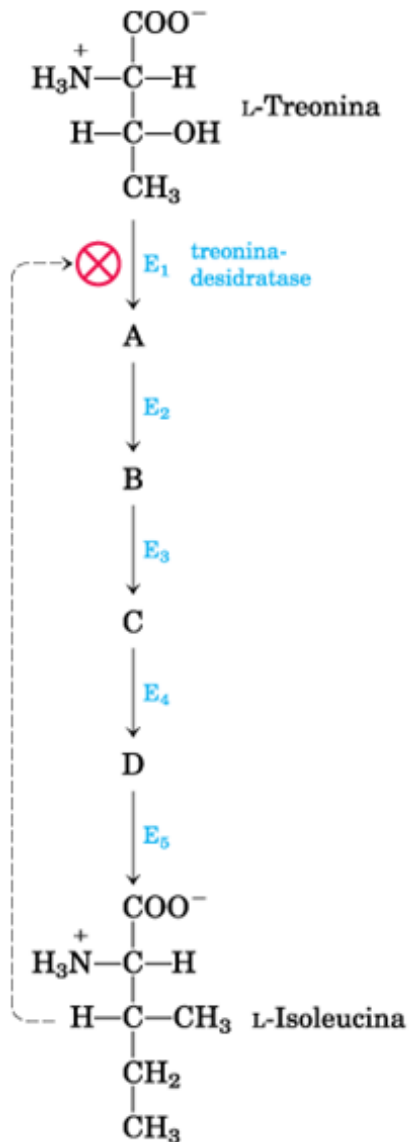
Ex. proteína alostérica: hemoglobina

Cinética sigmoide ➔ reflete interações cooperativas entre subunidades proteicas

Enzimas alostéricas



Enzimas alostéricas são consideradas regulatórias

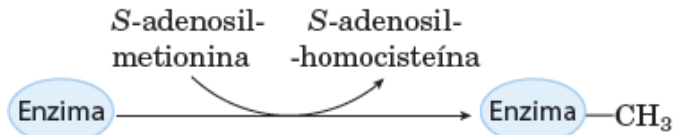


- ✓ Regulatórias de vias bioquímicas
- ✓ Normalmente são o primeiro passo da via “economiza” a execução das outras reações
- ✓ **Inibição** por (feedback negativo) **retroalimentação**: são inibidas pelo produto do último passo
- ✓ Inibição alostérica heterotrópica

Regulação por modificações covalentes

Metilação

(Glu)



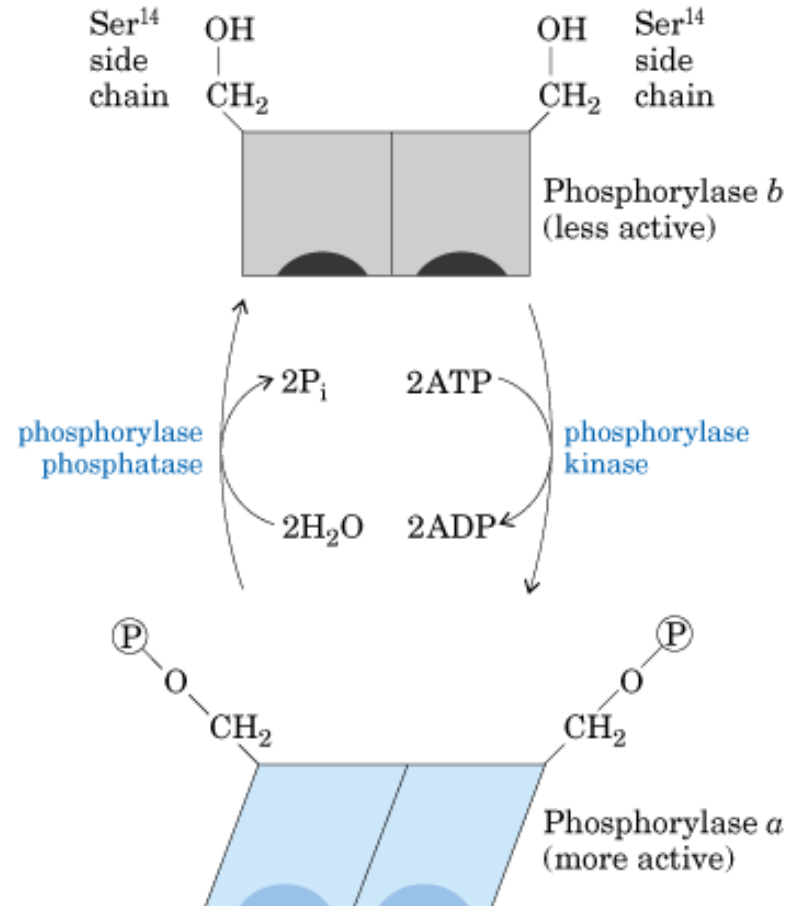
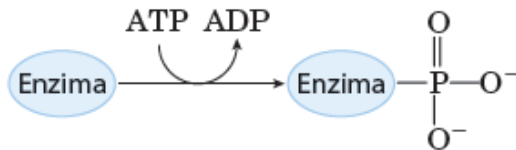
Acetilação

(Lys, α -amino (aminoterminal))



Fosforilação

(Tyr, Ser, Thr, His)



Ex.: regulação da enzima
glicogênio fosforilase