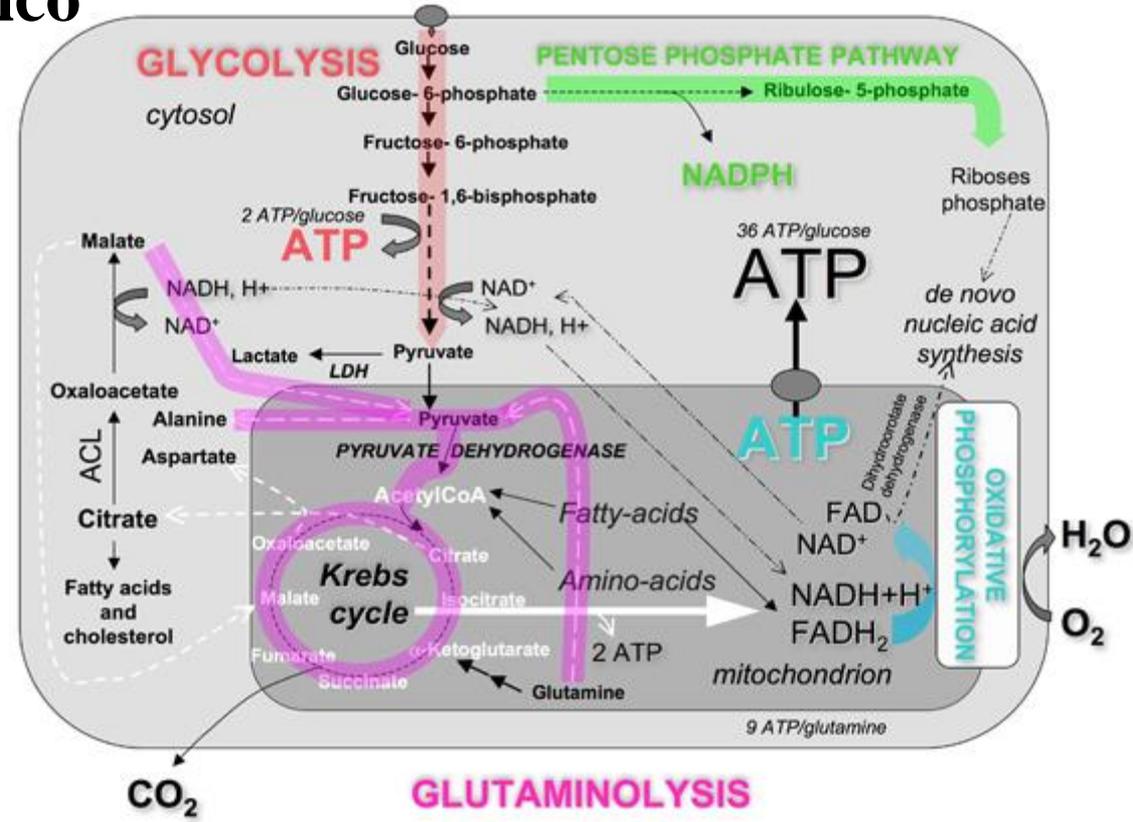


Enzimas

- catalisadores
- classificação
- especificidade e mecanismos de ação
- regulação enzimática
- inibidores e aplicações

Participam das vias bioquímicas

- **Enzimas** realizam o controle preciso do metabolismo celular
- O **metabolismo energético** é um dos principais temas de estudo da bioquímica
- Permitem resposta e adaptação a um meio em mudança



LOUIS PASTEUR



Louis Pasteur
1822-1895

- ✓ 1835: Berzelius, conceito de **catálise**
- ✓ 1885: fermentação do açúcar por lêvedos, gerando álcool
- ✓ **Vitalismo**: o mágico élan vital
- ✓ 1896: **Edward Buchner** consegue fermentar o açúcar num extrato de lêvedo **sem vida!**
- ✓ Fermentos, portanto, catalisavam reações químicas (açúcar a álcool) – biocatalisadores
- ✓ 1878: Friedrich Wilhelm Kühne Enzima vem do grego εν ζυμη, cuja tradução é "**no lêvedo**"

EMIL FISCHER

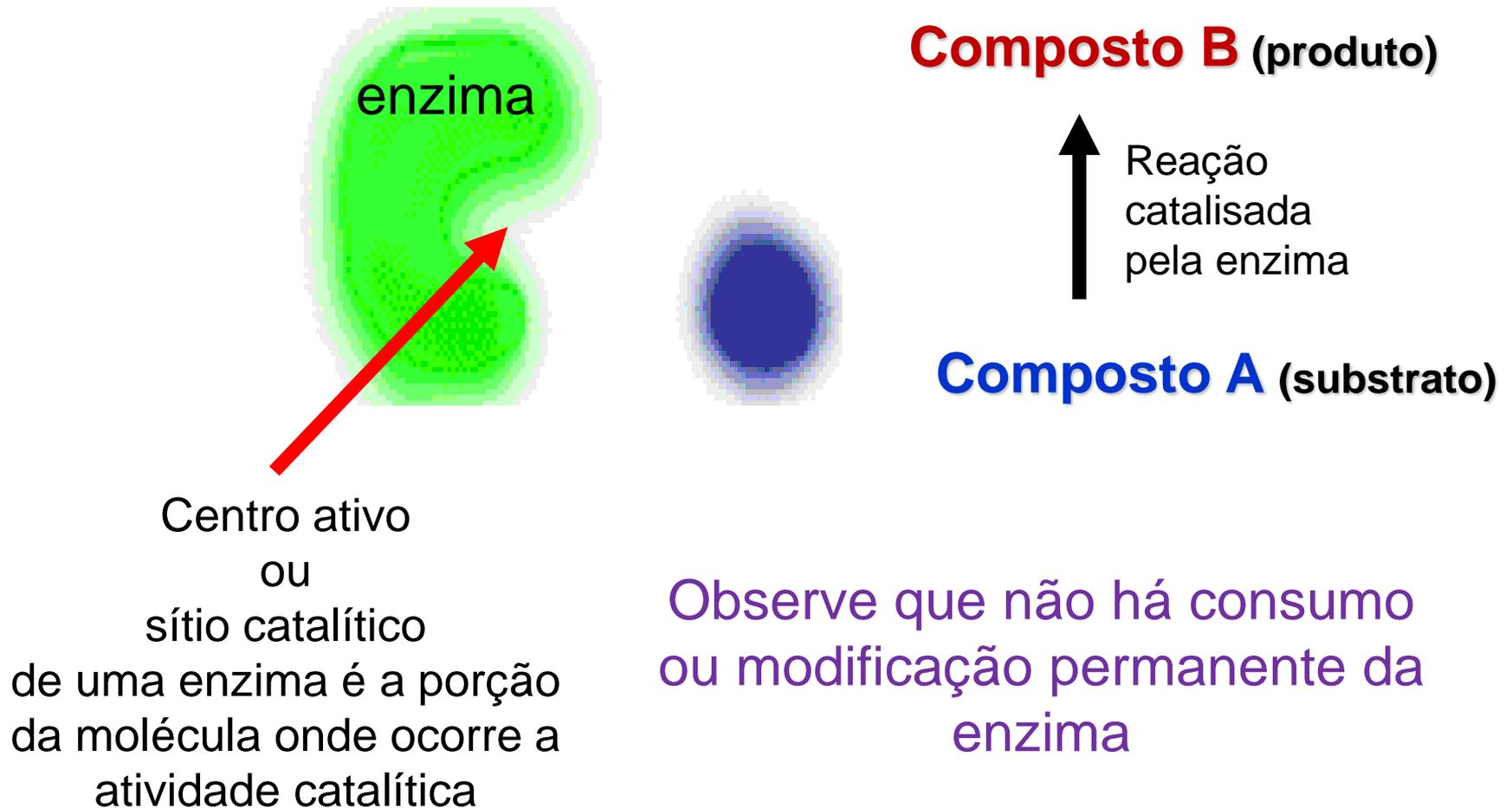


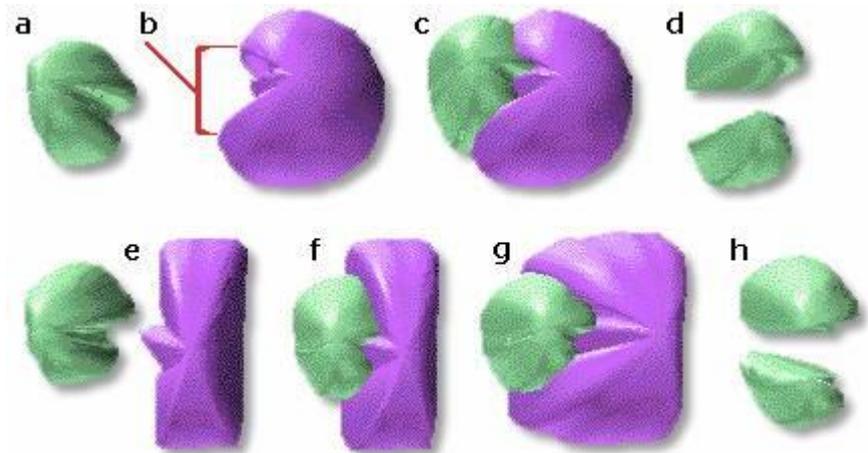
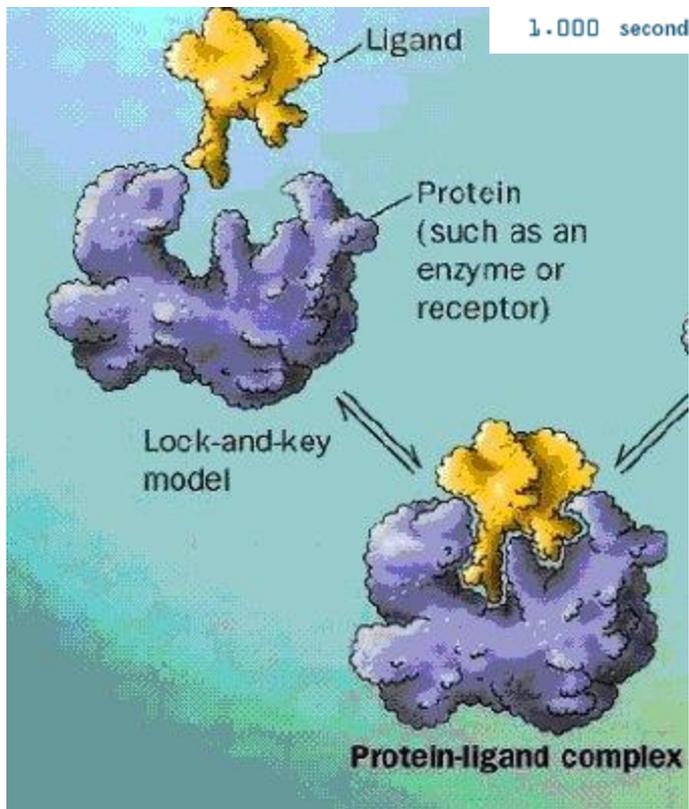
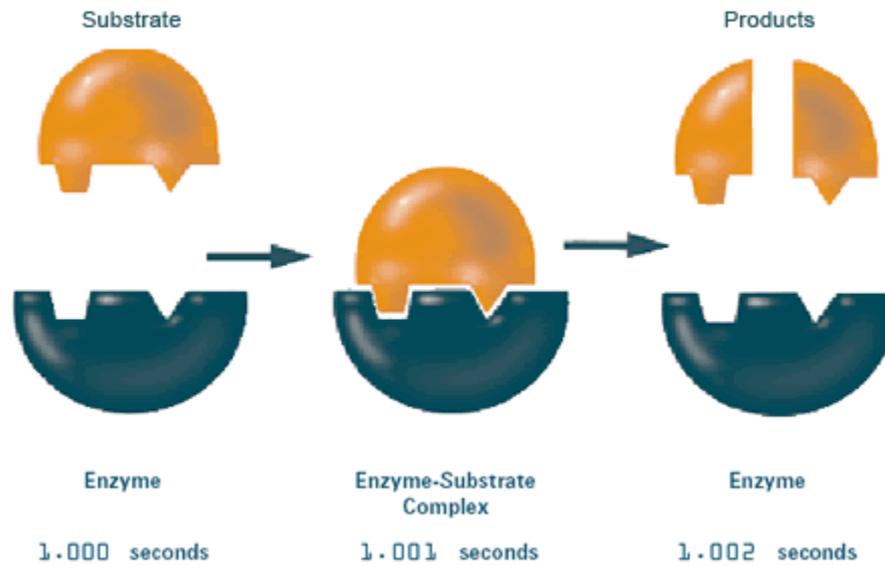
Hermann Emil Fischer
1852 - 1919

- ✓ Sacarase
 - ✓ Quebra da sacarose em glicose e frutose
- ✓ Produziu diversos análogos de sacarose para testar se a enzima funcionava
- ✓ Determinadas mutações tornavam os análogos resistentes à sacarase
- ✓ Modelo de ação enzimática **chave-e-fechadura**
- ✓ 1926 J.B.Sumner cristaliza a primeira proteína, urease, e demonstra que a atividade enzimática é uma característica de moléculas definidas



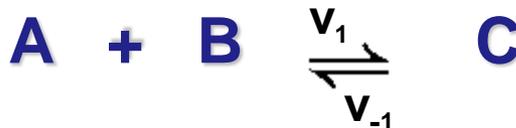
Enzimas são proteínas que agem como catalizadores biológicos:





Teoria da catálise

Considere as reações:



No **equilíbrio** da reação, as velocidades das reações se igualam: $v_1 = v_{-1}$



- concentrações de todos os reagentes não se alteram mais
- pode se dizer que a reação *terminou*

Catalisador **acelera** as velocidades de **ambos os lados da reação**



- o ponto do equilíbrio é atingido mais rápido
- o ponto do **equilíbrio não se altera**, ou seja [reagentes] e de [produtos] no “final” da reação” são as mesmas da reação não catalisada

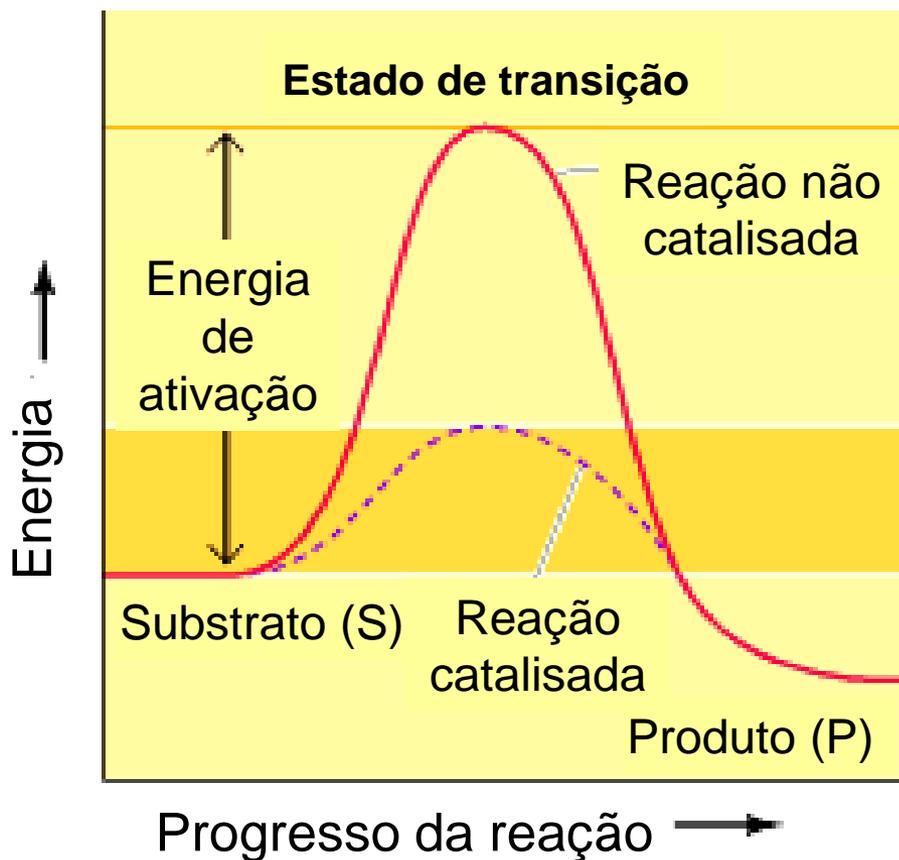


- termodinâmica da reação não se altera

Catalisador **não** é consumido na reação → pode atuar em [] baixas

Teoria da catálise

O gráfico mostra a variação de energia ao longo de uma reação.



Energia de ativação ou barreira energética:

↪ quantidade de energia que é preciso fornecer aos reagentes para a reação ocorrer

Estado de transição ou complexo ativado:

↪ forma molecular intermediária entre o reagente e o produto, existe somente no alto da barreira energética.

É altamente instável.

Um Catalisador diminui a barreira energética criando percursos alternativos da reação para formação do estado de transição.

Enzimas são catalisadores biológicos:

Equação geral
de uma reação
enzimática



representa o
estado de
transição

Que diferenças existem entre catalisadores inorgânicos, como íons metálicos, e as enzimas ?

- enzimas são **mais eficientes**: podem acelerar reações até 10^{14} vezes contra $10^2 - 10^3$ vezes dos catalisadores inorgânicos;
- enzimas **são específicas**: catalisam reações envolvendo às vezes apenas um único tipo de reagente;
- enzimas são **estereo-específicas** e não produzem sub-produtos reacionais;
- enzimas operam em **condições amenas** de temperatura, pressão e pH;
- enzimas podem ser **altamente reguladas** através de fatores extrínsecos à reação, tanto por ativadores como por inibidores.

Enzimas aceleram reações várias ordens de grandeza



Enzima	Velocidade na ausência de enzima "Reações/segundo"	Velocidade da reação catalisada "Reações/segundo"	Poder catalítico
Anidrase carbônica $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	1.3×10^{-1}	1.0×10^6	7.7×10^6
Triosefosfato isomerase	4.3×10^{-6}	4.300	1.0×10^9
Carboxipeptidase A	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
AMP nucleosidase	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Nuclease de estafilococos	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}

Número de "turnover" ou de renovação: quantas vezes a enzima completa o ciclo da reação em um segundo



$$\text{Número de turnover} = \frac{\text{moles de S catalisado por segundo}}{\text{moles de enzima}}$$

Reação enzimática

- Reação se dá em fases: $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$
- Enzima **umenta a velocidade** das reações
- Os catalisadores aumentam a velocidade das reações por que diminuem a energia de ativação

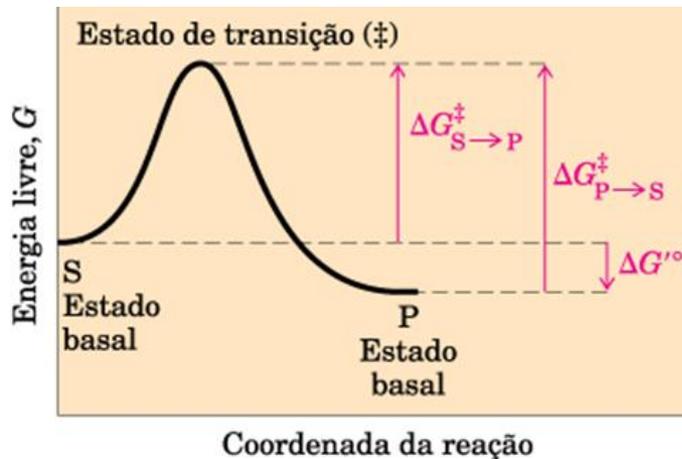


Diagrama da coordenada da reação.

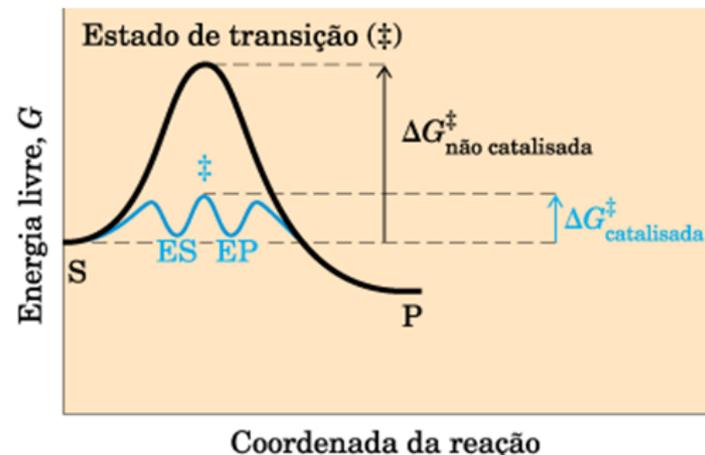


Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada.

Equilíbrio químico

- As enzimas realizam, muitas vezes, as reações nos dois sentidos $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$
- A concentração de substratos e produtos é o que define a velocidade das reações $K_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$
- Poder catalítico das enzimas vem da **energia livre liberada** na formação de ligações fracas quando da interação enzima-substrato
 - Interações fracas entre ES são otimizadas no estado de transição

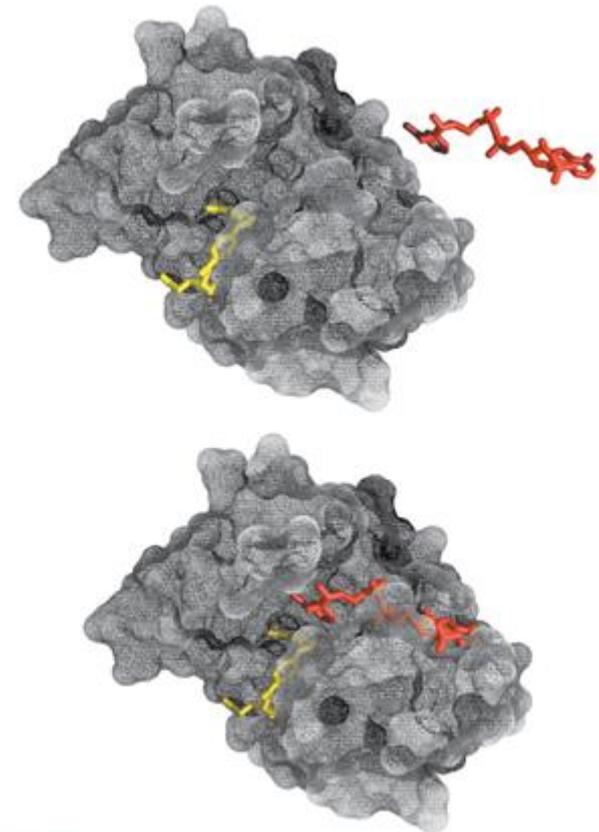
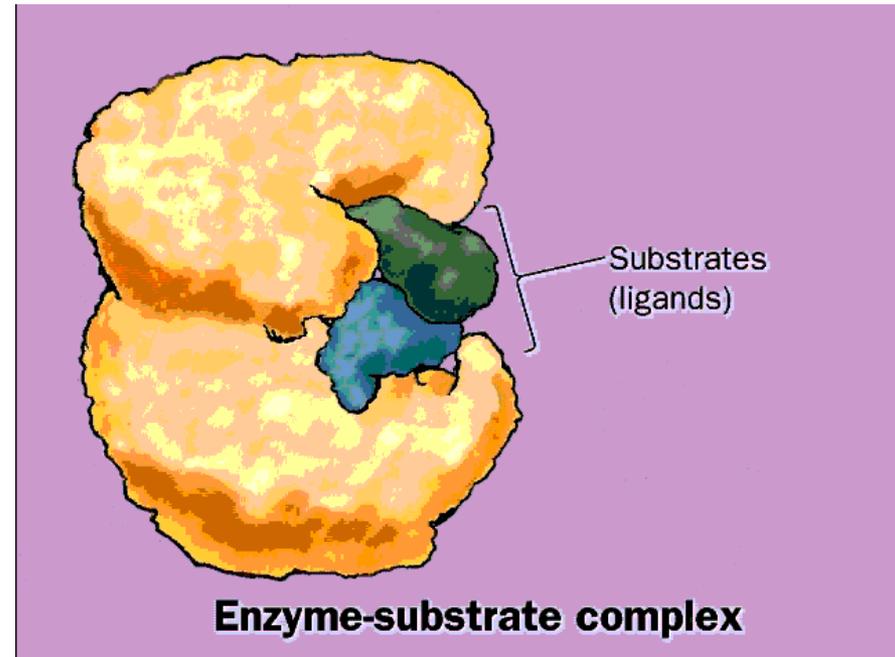


FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima.

Especificidade enzimática

- Deriva da formação de múltiplas **interações fracas** entre a enzima e a molécula do substrato específico
- Redução da entropia pela ligação
 - Dessolvatação do substrato
 - **Ajuste induzido**, proteína tbm muda de conformação



Reação Hipotética (Exemplo)

- Pauling (1946): Enzima deve ser complementar ao **Estado de transição (ET)**, não ao substrato

- ET não é forma estável

- Interações fracas entre a enzima e o substrato propulsionam a catálise enzimática

- Necessidade de múltiplas interações fracas explica pq alguns prots são tão grandes

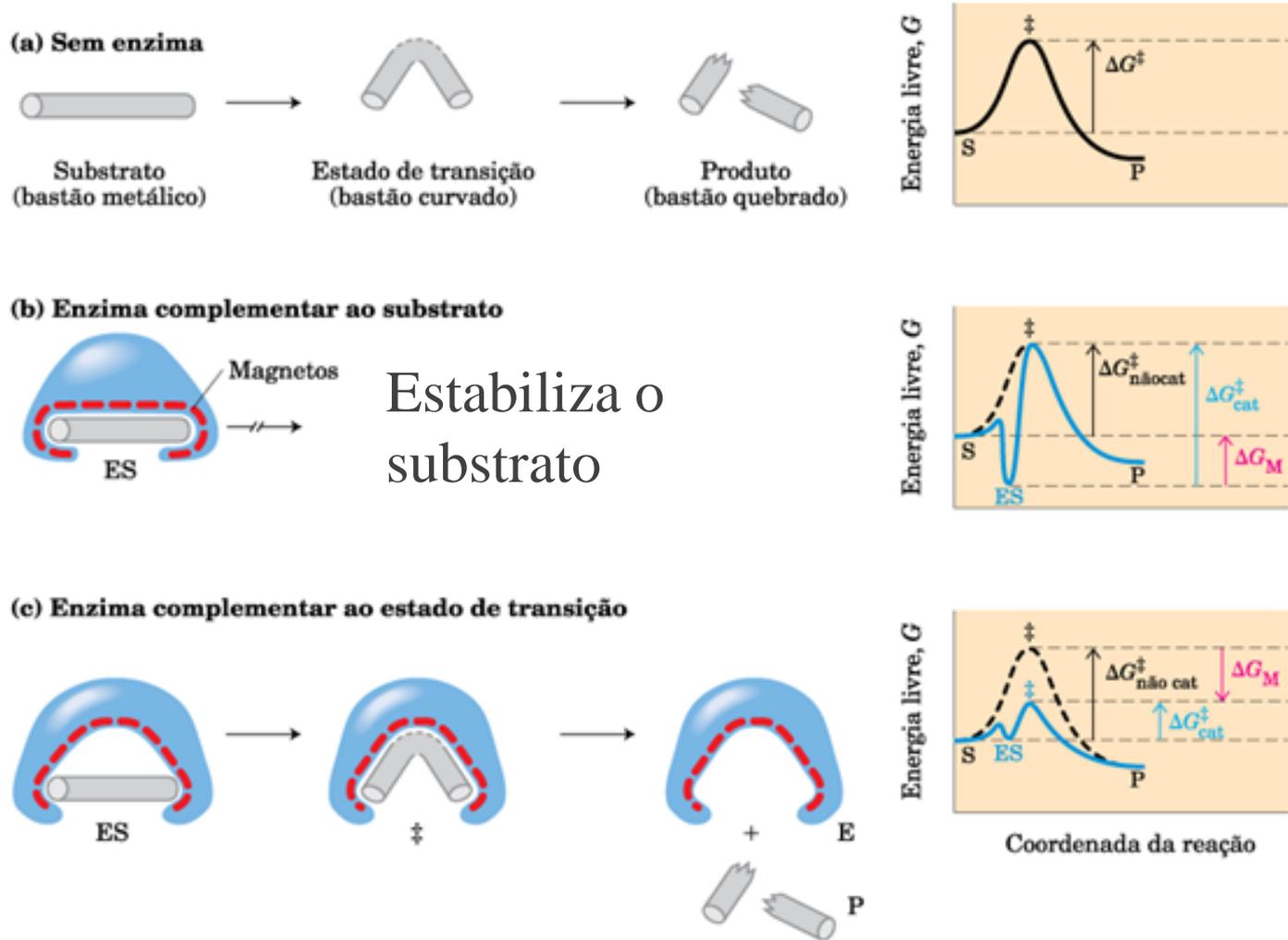
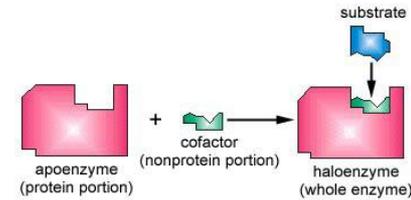
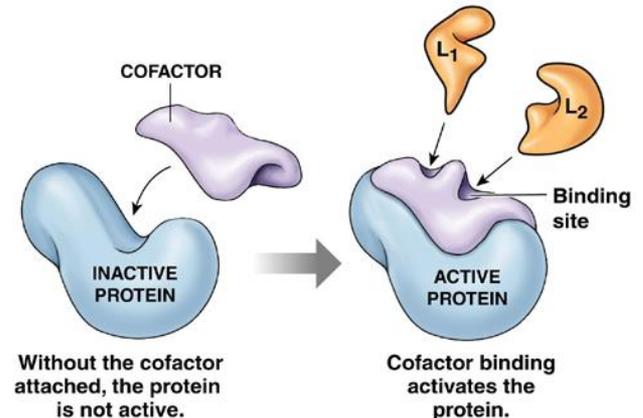


FIGURA 6-5 Uma enzima imaginária (bastonase) que catalisa a quebra de um bastão metálico.

Toda enzima é proteína?!



- Não! há alguns **RNAs** que funcionam enquanto enzimas também
- Componente químico adicional necessário para a função
 - **Cofator**: íons inorgânicos
 - **Coenzima**: moléculas orgânicas complexas
 - Se liga muito firmemente: **grupo prostético**
- Enzima completa: **holoenzima**
 - Parte protéica: apoenzima ou apoproteína



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 2-18

table 8-2

Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biotin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

*The structure and mode of action of these coenzymes are described in Part III of this book.

Grupos catalíticos

- Catálise geral **ácido-base**
 - Transferência de prótons
- Catálise **covalente**
 - Formação de lig. covalente transitória entre E e S
 - Ativação do substrato
- Catálise por **íons metálicos**
 - Estabilizam estados de transição
 - 1/3 das enzimas conhecidas usam íons metálicos nas reações catalíticas
- Enzimas muitas vezes usam as três estratégias de catálise em conjunto -- quimiotripsina

Resíduo de aminoácido	Forma geral ácida (doador de próton)	Forma geral básica (aceptor de próton)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$R-C(=NH^+)N$	$R-C(=N)N:$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-C_6H_4-OH$	$R-C_6H_4-O^-$

FIGURA 6-9 Aminoácidos na catálise geral ácido-básica.

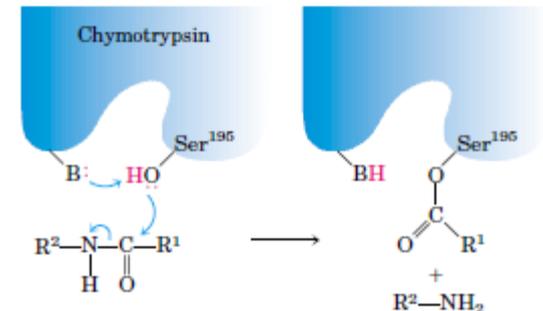
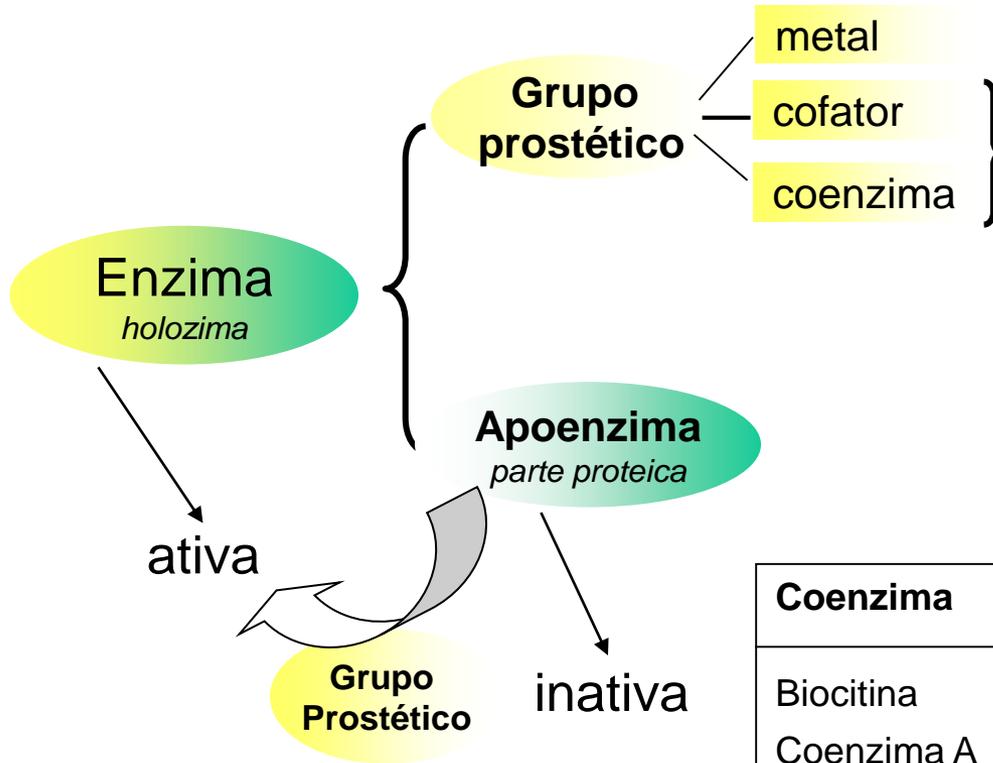


figure 8-10

Covalent and general acid-base catalysis. The first step in the reaction catalyzed by chymotrypsin is the acylation step. The hydroxyl group of Ser¹⁹⁵ is the nucleophile in a reaction aided by general base catalysis (the base is the side chain of His⁵⁷). This provides a new pathway for the hydrolytic cleavage of a peptide bond. Catalysis occurs only if each step in the new pathway is faster than the uncatalyzed reaction. The chymotrypsin reaction is described in more detail in Figure 8-19.

Algumas proteínas, enzimas em especial, contêm em sua molécula uma porção não proteica, que é essencial para atividade biológica.



Distinção entre cofator e coenzima depende da força de ligação com a apoproteína. Ex: o NAD⁺ pode ser cofator de uma enzima (ligação fraca) e ser coenzima de outra (ligação forte). O mesmo ocorre com as metais.

Coenzimas participam do ciclo catalítico das enzimas recebendo ou fornecendo grupos químicos para a reação

Coenzima	Reação com	Vitamina
Biocitina	CO ₂	Biotina
Coenzima A	Grupos acil	Ác. Pantotênico
Coenzima B12	H e grupos alquil	Vitamina B12
FAD, FMN	óxido-redução	Riboflavina
NAD, NADP	óxido-redução	Niacina
Fosfato de piridoxal	Grupos aminos	Piridoxina
Pirofosfato Tiamina	Grupos aldeídos	Tiamina
Tetrahydrofolato	unidades C	Ácido fólico

Algumas enzimas formam intermediários covalentes com seus substratos

Enzimas	Grupo reativo no sítio ativo	Intermediário covalente
Quimotripsina Elastase Esterases Trombina Tripsina	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array}$ (Ser)	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{O} \\ \quad \\ \quad \text{C} - \text{R} \\ \quad \parallel \\ \quad \text{O} \end{array}$ (Acyl-Ser)
Papaína Gliceraldeído-3-PO ₄ desidrogenase	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{SH} \end{array}$ (Cys)	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{C} - \text{R} \\ \quad \parallel \\ \quad \text{O} \end{array}$ (Acyl Cys)
Fosfatase alcalina Fosfoglicomutase	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{OH} \end{array}$ (Ser)	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{O} - \text{PO}_3^{2-} \end{array}$ (Phosphoserine)
Fosfoglicerato mutase Succinil-CoA sintase	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2 \\ \\ \text{HN} \quad \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \end{array}$ (His)	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- - \text{P} - \text{N} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O}^- \quad \text{C} \end{array}$ (Phosphohistidine)
Aldolase Descarboxilases Enzimas dependentes de piridoxal fosfato	$\text{R} - \text{NH}_3^+$ (Amino)	$\text{R} - \text{N} = \text{C}$ (Schiff base)

Enzimas com o mesmo tipo de mecanismo catalítico, ou seja, possuem o mesmo grupo de aminoácidos no sítio ativo, formam intermediários covalentes similares

Nomenclatura

- Normalmente se adiciona o sufixo **ase** ao nome do substrato ou à atividade realizada
 - **Urease** – hidrolisa a uréia
 - **DNA-polimerase** – polimeriza DNA
 - **Pepsina** – *pepsis* vem do grego (digestão)

Classificação das Enzimas:

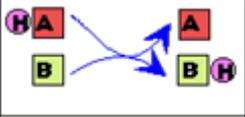
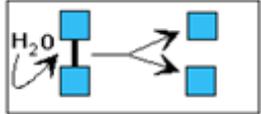
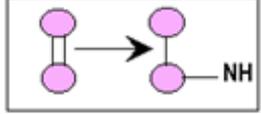
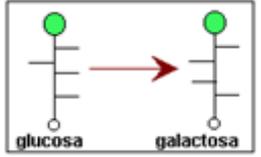
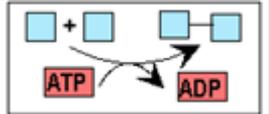


considera tipo de reação e substratos

Nomenclatura oficial das enzimas é dada pela *Enzyme Commission* da International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) :

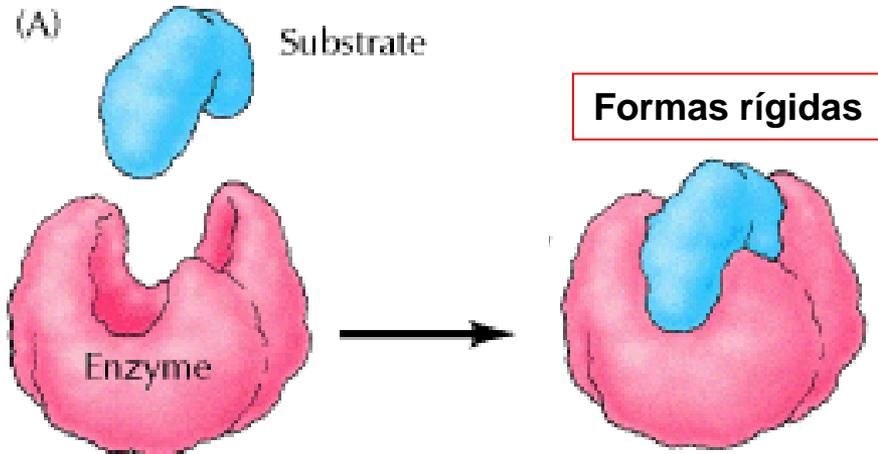
- ATPase (Adenosinatrifosfatase): EC 3.6.1.3
- é uma hidrolase.....3
 - atua num anidrido.....3.6
 - o anidrido contém fosfato.....3.6.1
 - esse anidrido é ATP.....3.6.1.3

Números identificam o tipo de reação e o tipo de substrato alvo

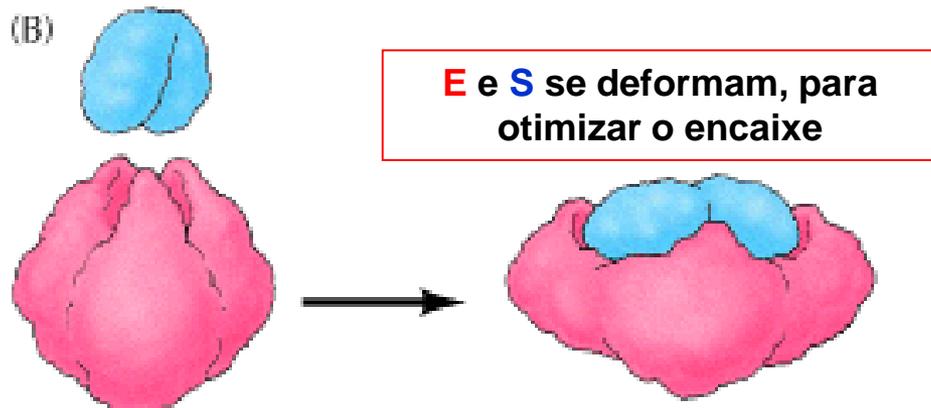
<p>1. Óxido-redutases (Reações de óxido-redução).</p>	<p>Transferência de elétrons Se uma molécula se reduz, há outra que se oxida.</p> 
<p>2. Transferases (Transferência de grupos funcionais)</p>	<ul style="list-style-type: none"> •grupos aldeído •gupos acila •grupos glucosil •grupos fosfatos (quinases) 
<p>3. Hidrolases (Reações de hidrólise)</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Transformam polímeros em monômeros. <p>Atuam sobre:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Ligações éster •Ligações glicosídicas •Ligações peptídicas •Ligações C-N 
<p>4. Liases (Adição a ligações duplas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Entre C e C •Entre C e O •Entre C e N 
<p>5. Isomerases (Reações de isomerização)</p>	
<p>6. Ligases (Formação de laços covalentes com gasto de ATP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Entre C e O •Entre C e S •Entre C e N •Entre C e C 

Enzimas são específicas para o reconhecimento de seus substratos.

Modelo Chave-Fechadura



Modelo Chave-Fechadura



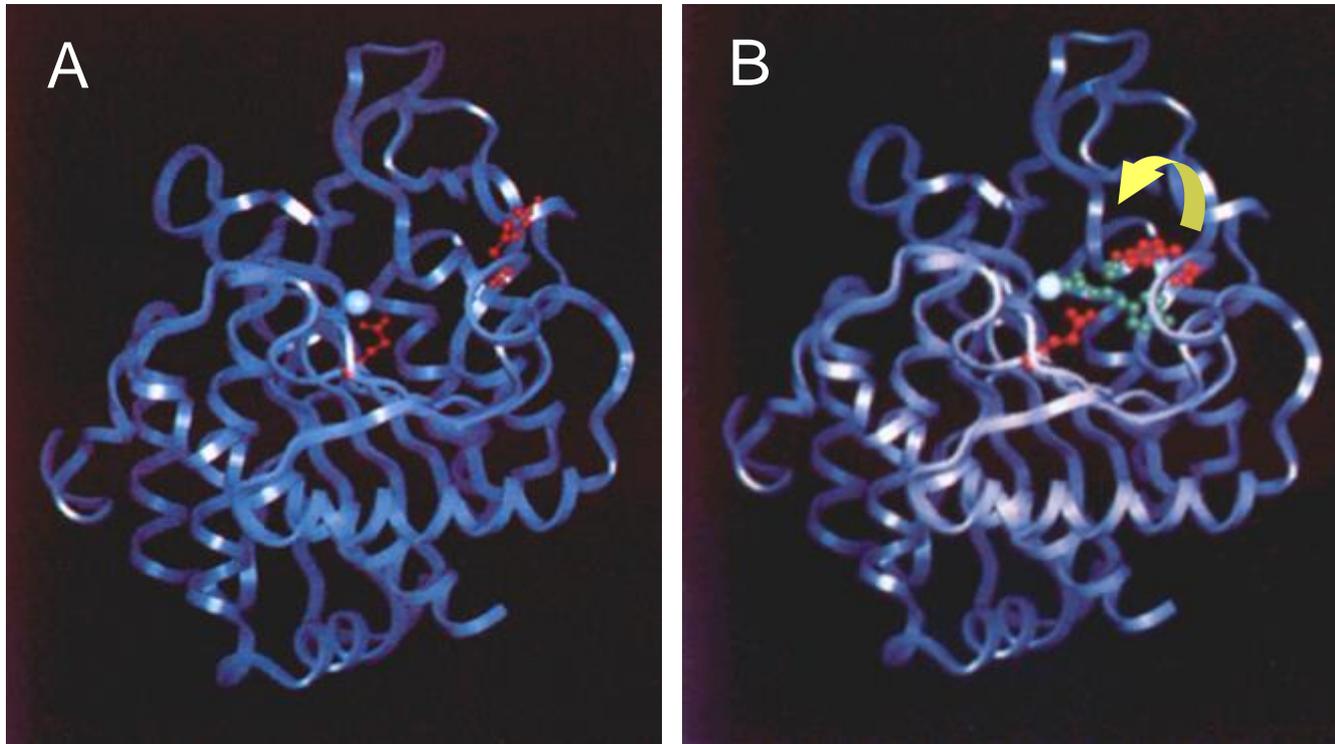
Emil Fisher, na década de 1950, propôs o **modelo chave-fechadura** para explicar o reconhecimento (especificidade) do substrato pela enzima. Nesse modelo, o sítio ativo da enzima é pre-formado e tem a forma complementar à molécula do Substrato, de modo que outras moléculas não teriam acesso a ela.

No entanto, o modelo chave-fechadura não explica a interação das enzimas com inibidores e análogos dos substratos.

Na década de 1970, Daniel Kosland propôs o **modelo de encaixe induzido**, no qual o contacto com a molécula do substrato induz mudanças conformacionais na enzima, que otimizam as interações com os resíduos do sítio ativo. Esse é o modelo aceito hoje em dia.

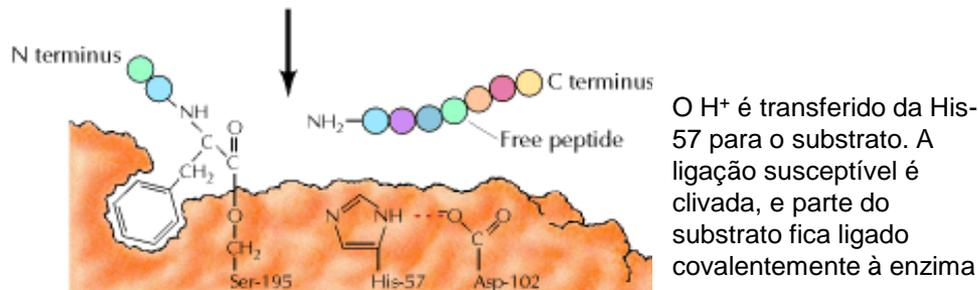
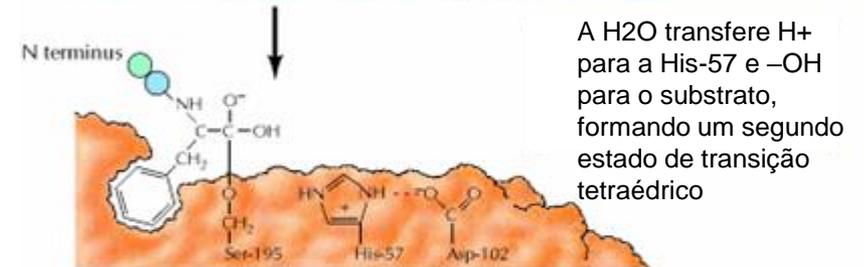
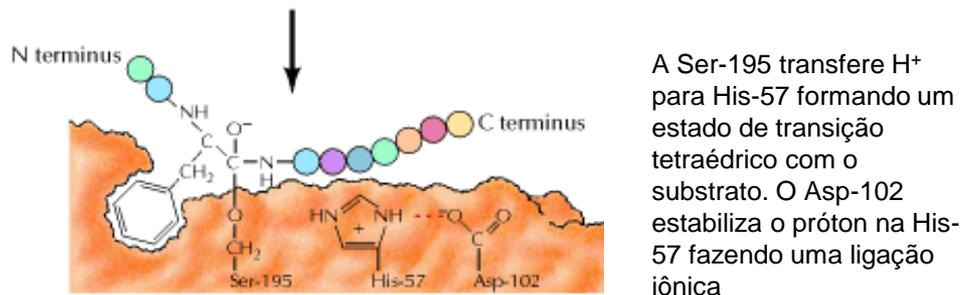
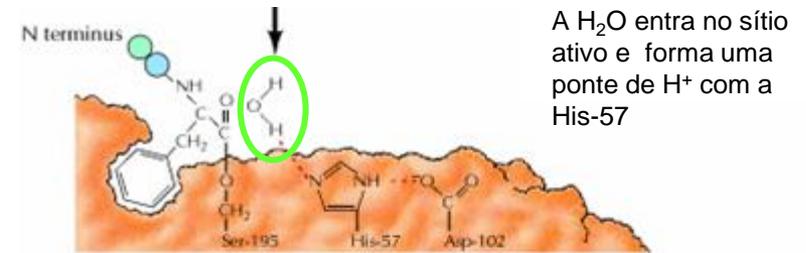
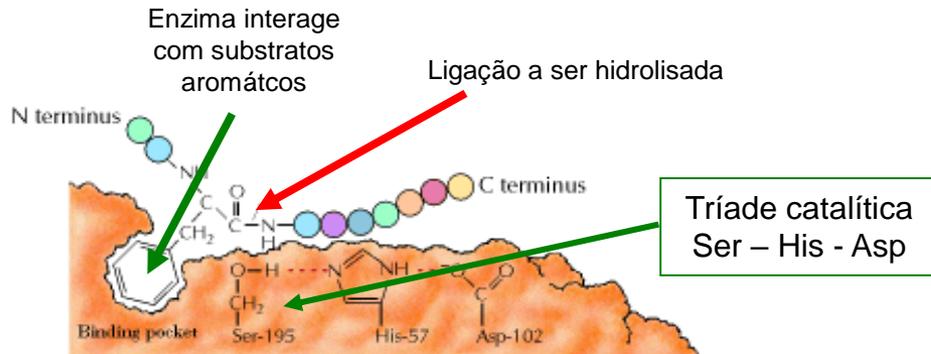
Carboxipeptidase A é uma enzima digestiva da classe das metaloproteinases.

Em A: o sítio catalítico dessa enzima é formado pelos resíduos (em vermelho) de Tyr²⁴⁸ (acima, à direita) e de Glu²⁷⁰ (centro), e um átomo de Zn²⁺, que está acima do Glu²⁷⁰.



Em B: A ligação do substrato dipeptídico **glicil-L-tirosina** (em verde) causa uma profunda mudança conformacional nas vizinhanças do sítio ativo da carboxipeptidase A. Clique com o mouse para observar a re-orientação da posição da Tyr²⁴⁸ em relação à outra figura.

Mecanismo de ação da **quimotripsina**, um exemplo típico de uma serino proteinase



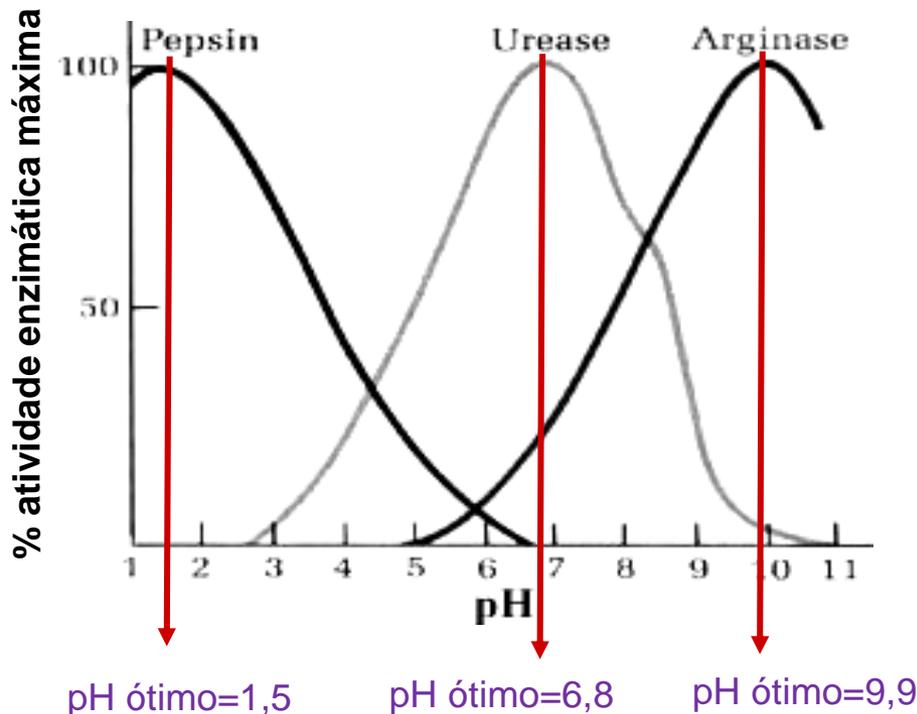
Fatores que afetam a atividade enzimática:

1. Condições do meio que afetam estabilidade protéica
 - pH
 - temperatura
2. Tempo da reação
3. Concentração dos reagentes
 - a enzima
 - o substrato
 - co-fator(s)

Vários são os fatores que afetam o funcionamento das enzimas como catalisadores. Alguns desses fatores são decorrentes da natureza proteica das enzimas, como o efeito do pH e da temperatura. Para se estudar o efeito isolado de um dos fatores acima, é necessário que todos os outros fatores sejam mantidos fixos.

Fatores que controlam a atividade enzimática:

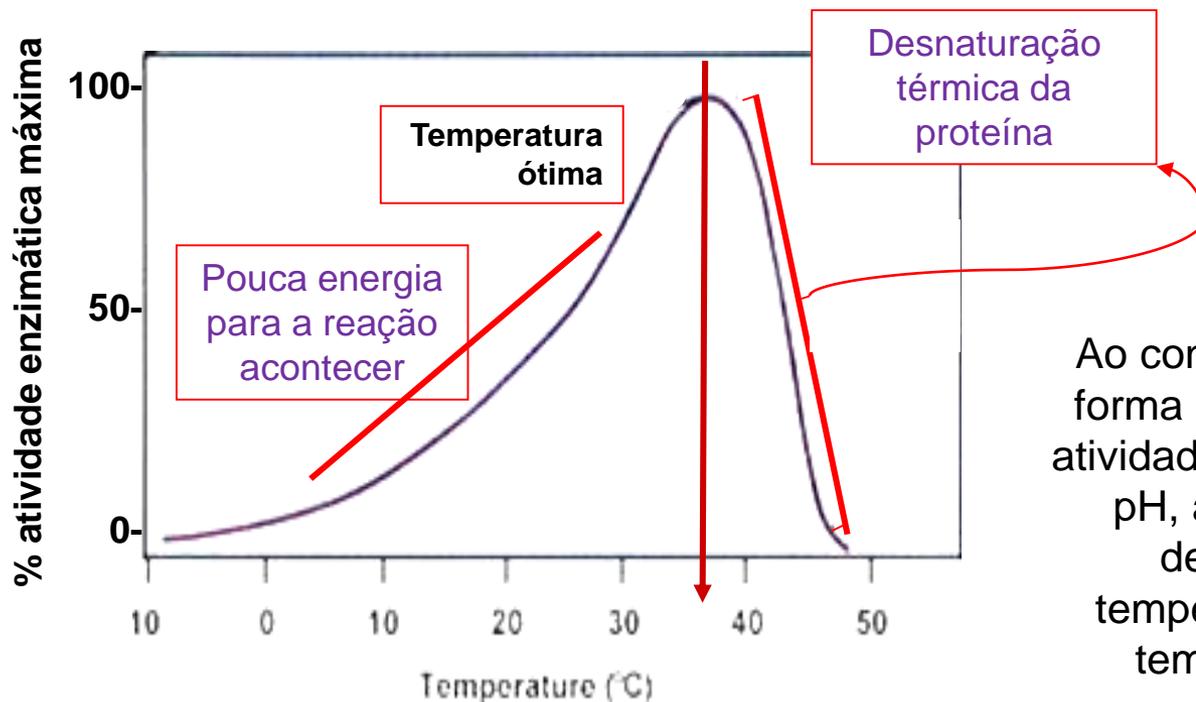
1. Fatores que afetam a estabilidade proteica das enzimas
 - Variações de pH: pH ótimo



O pH ótimo de uma enzima reflete variações no estado de ionização de resíduos de aminoácidos do sítio ativo. A enzima está pelo menos parcialmente desnaturada em pHs afastados do pH ótimo. Quando o substrato é uma molécula ionizável, o pH ótimo da enzima também reflete o seu estado de ionização .

Fatores que controlam a atividade enzimática:

1. Fatores que afetam a estabilidade proteica das enzimas
 - Variações de pH: pH ótimo
 - Variações de temperatura: temperatura ótima



Ao contrário da curva em forma de sino no caso da atividade enzimática *versus* pH, a enzima só está desnaturada em temperaturas acima da temperatura ótima.

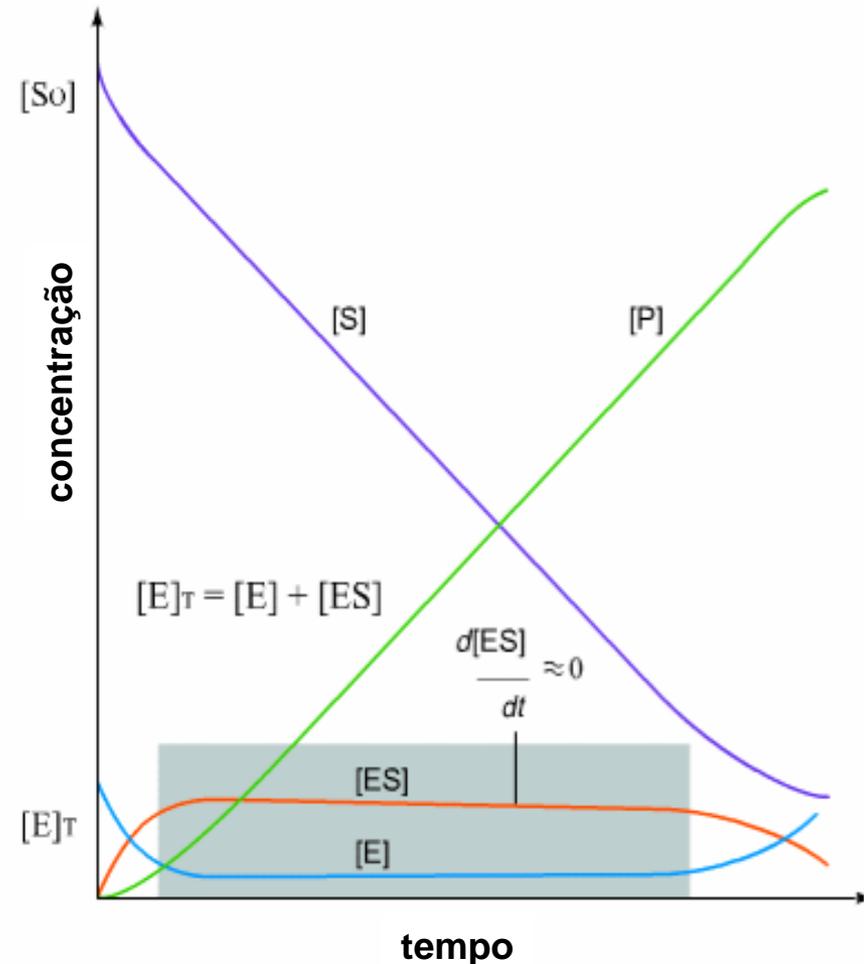
Fatores que controlam a atividade enzimática:

2. Tempo da reação
3. Concentração:
 - da enzima
 - do substrato
 - de co-fator(s)

A [substrato] cai na mesma razão em que a [produto] aumenta em função do tempo.

A enzima existe sob duas formas: enzima livre E e complexo enzima-substrato ES. No início da reação, a [E] livre cai e a do complexo [ES] aumenta e atinge um máximo, em que não há mais [E] livre no meio. Nessa situação (indicada no retângulo cinza), diz-se que a enzima está saturada (só existe no complexo ES). A velocidade da reação é a máxima.

O gráfico abaixo ilustra como as concentrações de E, S e P variam ao longo do tempo da reação.



Cinética enzimática

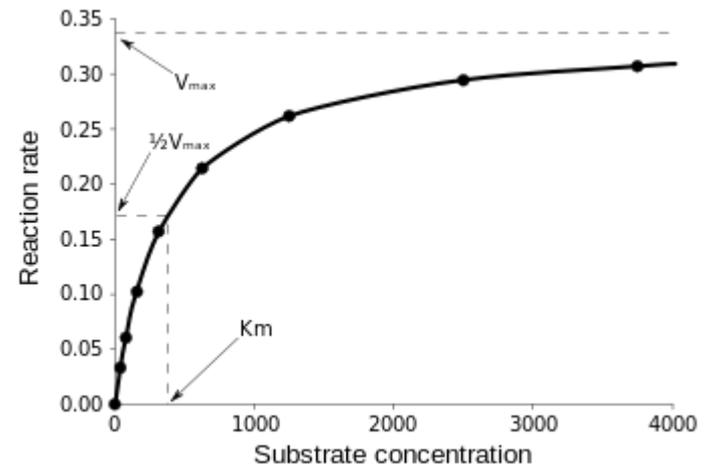
Em 1913, Michaelis e Menten formularam as bases da cinética enzimática, para explicar como a concentração do substrato $[S]$ afeta a velocidade da reação v



Leonor Michaelis
1875–1949

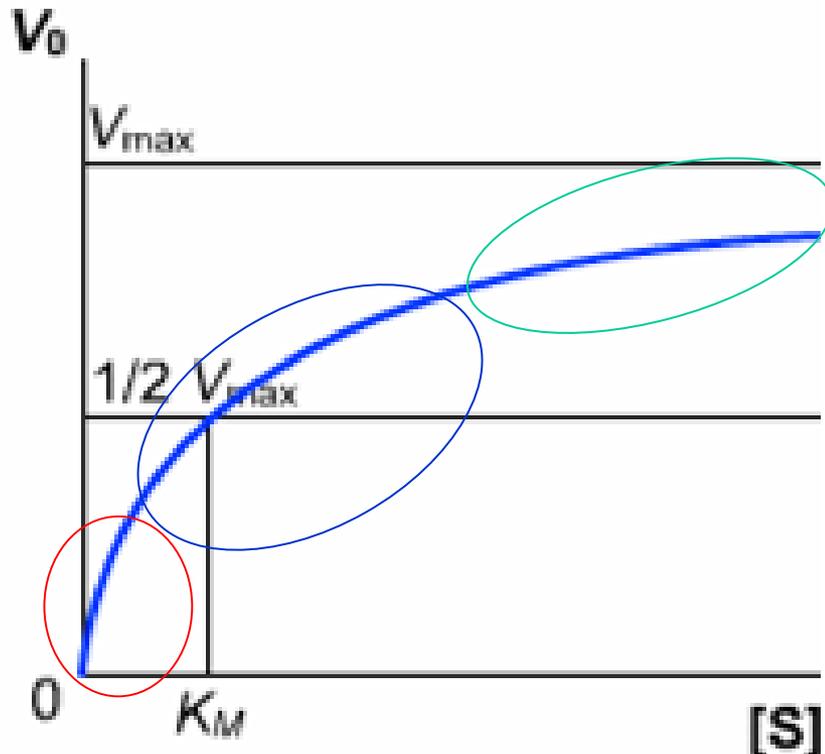


Maud Menten
1879–1960



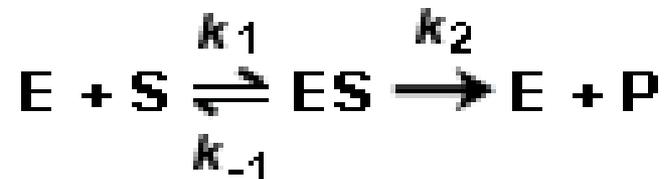
Cinética enzimática

A velocidade da reação apresenta três regiões de comportamento diferente, a medida que se aumenta a concentração do substrato:

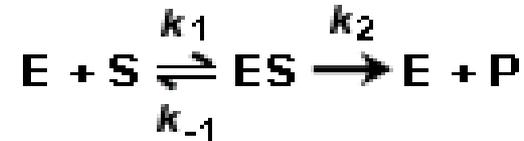
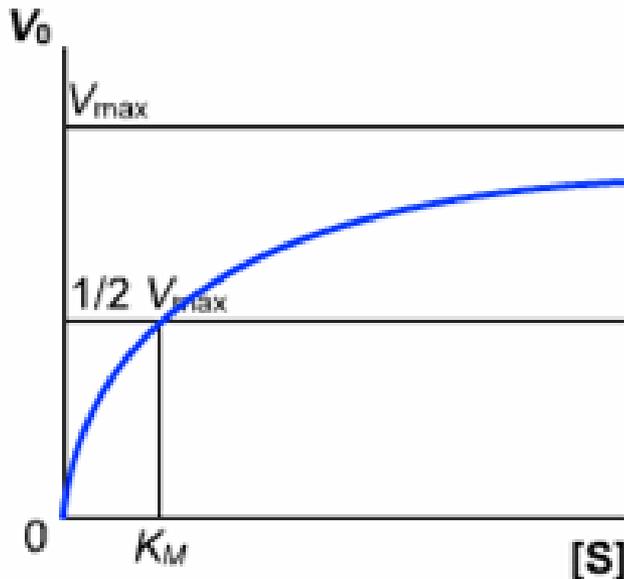


- parte a**: v aumenta proporcionalmente com aumentos de S .
- parte b**: v aumenta não proporcionalmente com aumentos de S .
- parte c**: v não aumenta mais, tendendo a um valor máximo (V_{\max}), sendo independente da $[S]$

O gráfico mostra **um conjunto de reações** que estão acontecendo simultaneamente, conforme as equações abaixo:



Para se chegar à equação da hipérbole quadrada do gráfico $V \times S$, o gráfico de Michaelis Menten, considera-se que o conjunto de reações está em equilíbrio, ou seja, a $[ES]$ é constante e o sistema tem a sua velocidade máxima, V_{max} .



Quando $[ES]$ é constante, as velocidades de formação (V_f) e de desdobraimento (V_d) do complexo ES são iguais:

$$V_f \text{ formação } ES = V_d \text{ desdobraimento } ES$$

Aplicando a Lei de Ação das Massas para definir V_f e V_d , temos:

$$V_f = k_1 \frac{[E][S]}{[E]+[S]}$$



Igualando-se $V_f = V_d$ e resolvendo para V , chega-se à Equação de Michaelis-Menten:

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

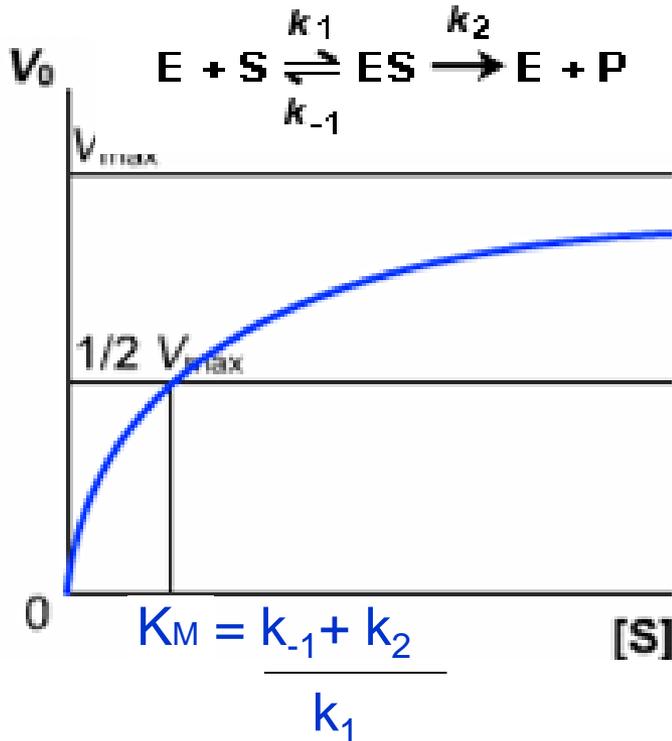
$$\text{sendo } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$



Constante de Michaelis-Menten

$$V_d = k_{-1} \frac{[E]+[S]}{[ES]} + k_2 \frac{[E]+[P]}{[ES]}$$

A constante de Michaelis-Menten (K_M) é um parâmetro cinético que traz informações sobre a afinidade que a enzima tem pelo substrato.



O K_M é numericamente igual à [substrato] que produz metade da V_{max} .
 Substituindo na equação v por $V_{max}/2$, vemos:

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

$$V_o = \frac{V_{max}}{2} \quad \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max} \cdot K_m + V_{max} \cdot [S] = 2V_{max} \cdot [S]$$

$$V_{max} \cdot K_m = V_{max} \cdot [S] \quad \curvearrowright \quad K_m = [S]$$

Considerando a afinidade da E pelo seu S, temos 2 casos:

1. E tem baixa afinidade por S
 Quando V_d é mais alta do que V_f

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \text{grande} \quad \text{Km alto}$$

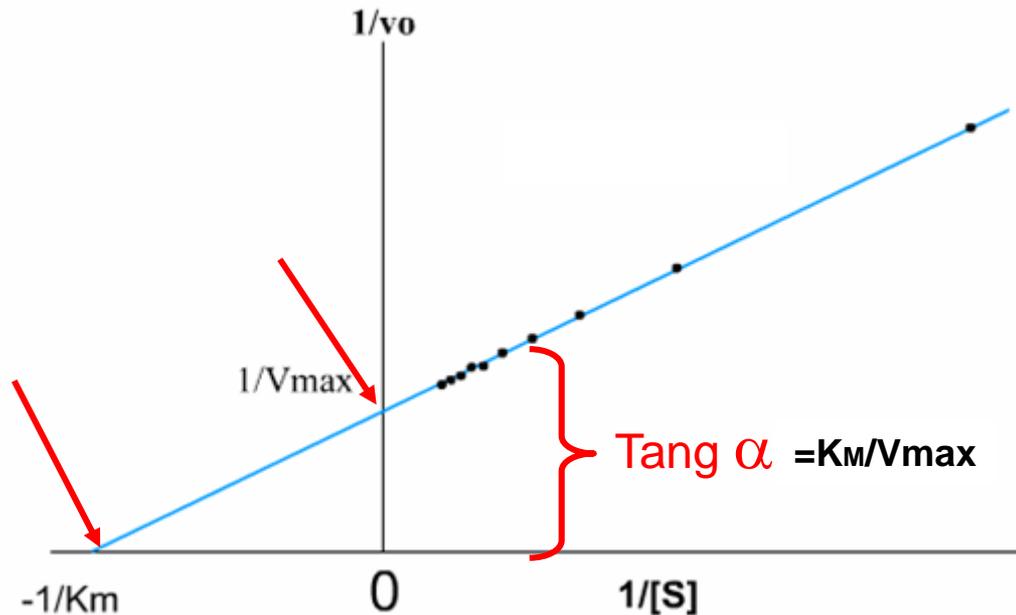
$$= \text{pequeno}$$

2. E tem alta afinidade por S
 Quando V_f é mais alta do que V_d

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \text{pequeno} \quad \text{Km baixo}$$

$$= \text{grande}$$

Uma outra forma de se obter os valores de K_M e de V_{max} é através do gráfico dos duplos recíprocos ($1/V \times 1/S$), e da equação de Lineweaver-Burk.



O intercepto da reta no eixo x é igual a $-1/K_M$

substituindo $y = 0$ na equação, temos:

$$0 = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \frac{-1}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{-1}{[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \rightarrow \quad \frac{-1}{K_m} = \frac{1}{[S]}$$

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



Aplicando-se o inverso a ambos os lados da equação de Michaelis-Mentem, obtem-se a equação de Lineweaver-Burk, que é uma função linear (uma reta):

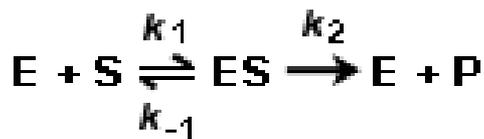
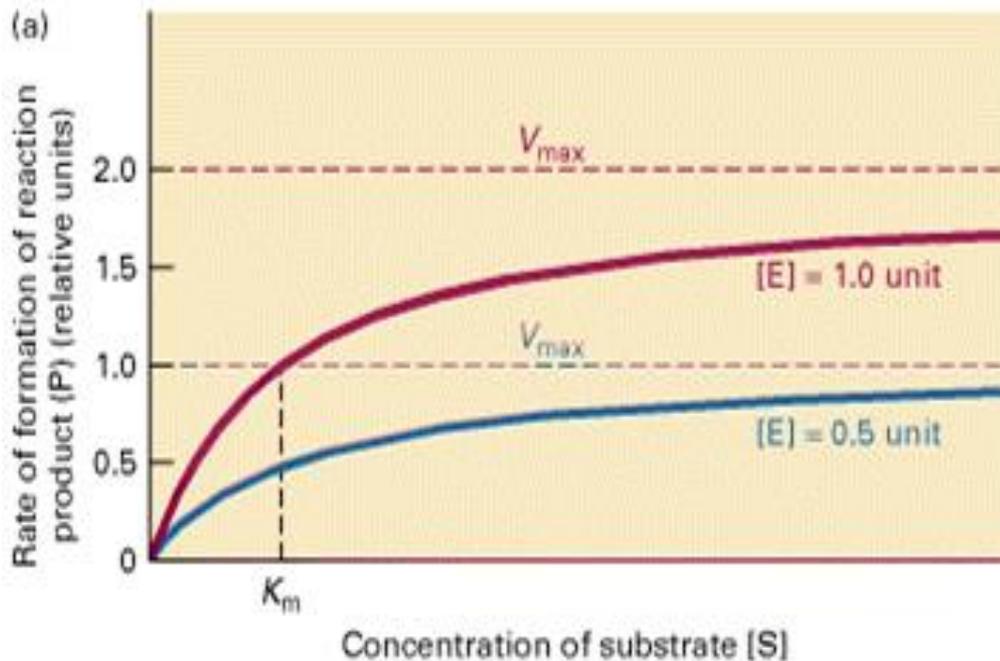
$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = a \cdot x + b \quad \text{equação de reta}$$

Onde:

a = coef. angular = K_m/V_{max}
(tangente ângulo alfa)

b = coef. linear = $1/V_{max}$
(intercepto no eixo y)



- k_2 ou k_{cat} (constante catalítica) mede o “poder catalítico” da enzima

$$v = k_2 \frac{E_{total} + [P]}{[ES]} \quad k_2 = \frac{V_{max} (s^{-1})}{[E_{total}]}$$

Para calcular k_{cat} considera-se que toda a E existe como ES, e que $v=V_{max}$

A **velocidade** da reação somente é **proporcional** à **[E]**

quando a enzima está **saturada**, ou seja, reação é de ordem zero (independe) em relação a [S]

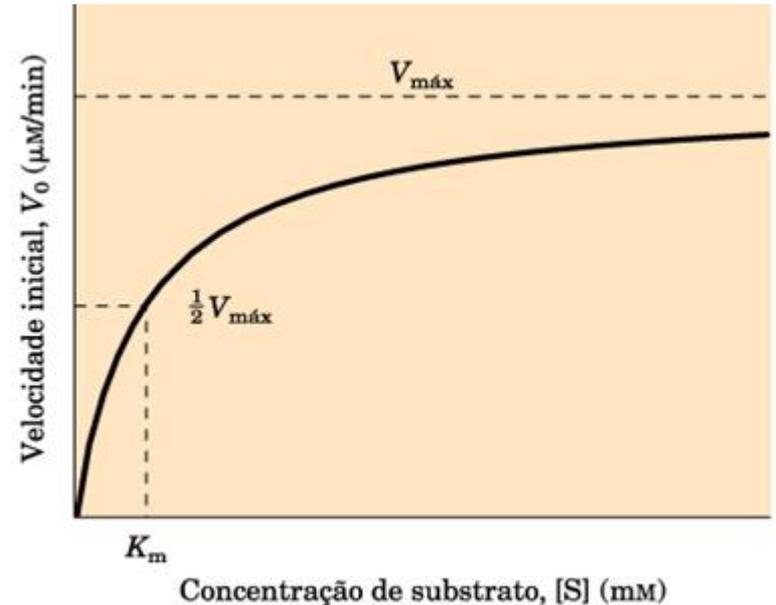
Eficiência catalítica

K_{cat}/K_m

Parâmetro mais adequado para comparações cinéticas

Cinética enzimática

- Experimentos **de mutagênese sítio-dirigida** permite que os pesquisadores investiguem o papel de cada aminoácido na função protéica
- A concentração do substrato **[S]** influi na velocidade das reações catalisadas por enzimas
- **Velocidade máxima** é abstraída para concentrações excessivas de Substrato
- Constante de **Michaelis**
 - $kM = [S]$ correspondente a $\frac{1}{2} V_{max}$;



Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas.

Interações secundárias de proteinases com seus substratos

Enzima	Substratos	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_M (mM)	Razão k_{cat}/K_M
Tripsina (pH 7.5)	Z-Lys-OMe	101	0.23	1
	Z-(Ala) ₂ -Tyr-Lys-OMe	106	0.08	3
Quimotripsina (pH 7.9)	Z-Tyr-Gly-OMe	0.6	23	1
	Z-(Ala) ₂ -Ala-OMe	10	2	190
Elastase (pH 8.0)	Z-Ala-OMe	6.7	153	1
	Z-(Ala) ₂ -Ala-OMe	73	0.43	3900

A tabela ilustra como interpretar K_{cat} , K_M e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M), comparando a ação de enzimas proteolíticas sobre diferentes substratos sintéticos. O ponto de clivagem dos substratos está indicado pela **flecha**. Conforme o número de resíduos de aminoácidos aumenta à esquerda do ponto de clivagem, a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) das enzimas melhora (considerando-se como 1 o valor obtido com o substrato mais curto).

No caso da **tripsina**, o K_M diminui 3X, sem alterar o k_{cat} , ou seja a formação do complexo ES com o substrato maior é facilitado, mas não foi afetada a sua transformação em produto.

No caso da **elastase**, o K_M diminui ~300 X e o k_{cat} aumenta ~10x, ou seja todas as etapas da reação são facilitadas com o substrato mais longo. Como resultado, a eficiência catalítica aumentou 3.900 vezes.

Como são controladas as enzimas *in vivo*, além de alterações na disponibilidade de S e da própria E ?

A atividade enzimática pode ser regulada por diferentes mecanismos, que muitas vezes atuam em conjunto na mesma enzima.

Entre estes mecanismos, destacam-se:

1. Inibidores:

- irreversíveis: não protéicos e protéicos
- reversíveis: competitivo, não competitivo ou misto, incompetitivo

2. Alosteria:

- ativadores e inibidores
- cooperatividade

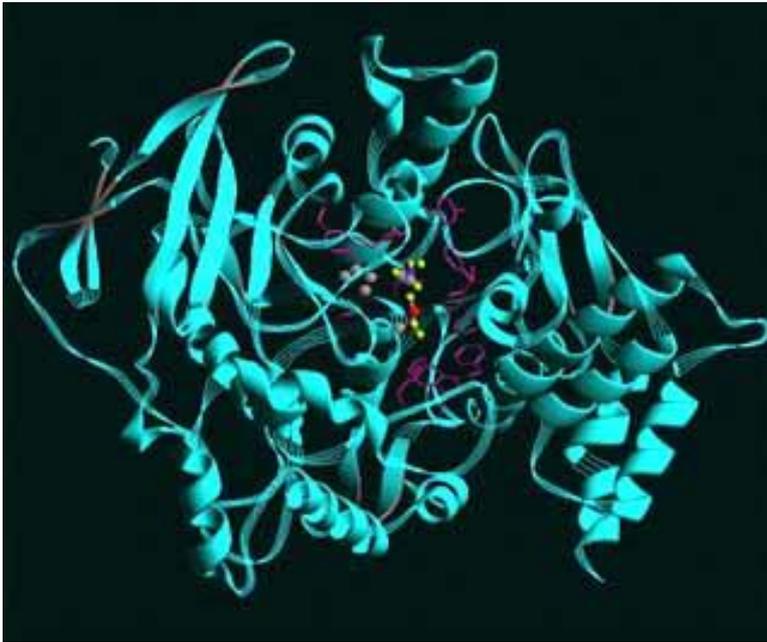
3. Modulação covalente

- Ativação de zimogênios
- Fosforilação e defosforilação

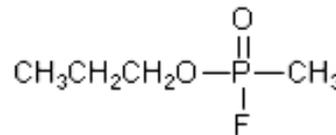
Inibidores irreversíveis:

Compostos orgânicos clorados ou fosforados são bons exemplos de inibidores enzimáticos irreversíveis, pois reagem com o resíduo S1 de serino-enzimas, formando um complexo irreversível. Uma das enzimas altamente sensível a esses compostos é a acetilcolinesterase, responsável pela metabolização do neurotransmissor acetilcolina em neurônios centrais e periféricos.

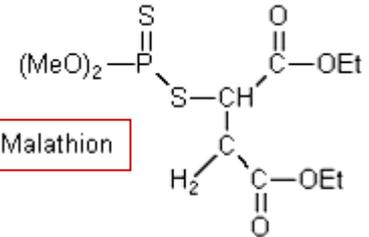
Este é o mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados, como o malathion e o parathion. Tanto a acetilcolinesterase de insetos como de mamíferos são igualmente inibidas por essas drogas. Contribui para a toxicidade desses inseticidas a longa meia vida que esses apresentam no ambiente.



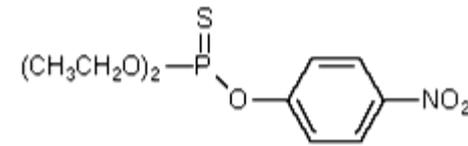
Inseticidas
organofosforados
dose letal: 3-13 mg/Kg, oral



Sarin



Malathion

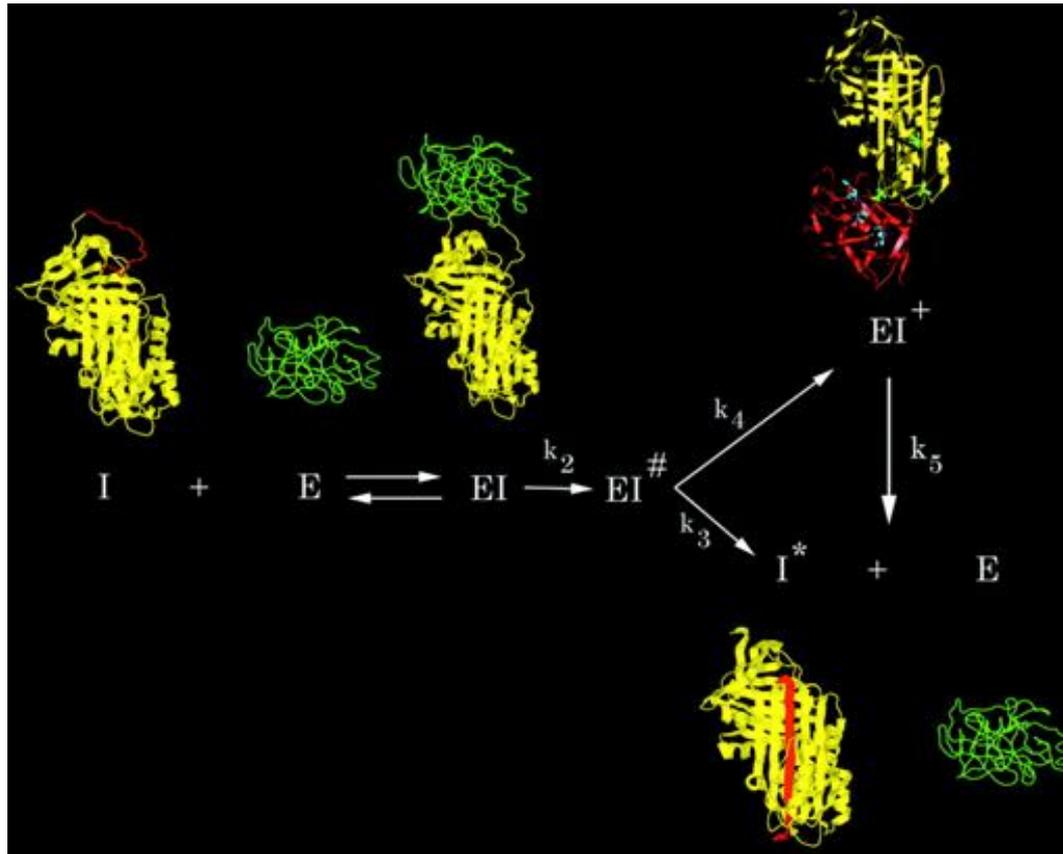


Parathion (Bayer 1947)

meia vida – 23 anos

Acetilcolinesterase complexada com sarin (dose letal 0,01 mg/kg, oral), um organofosforado altamente tóxico e volátil, que reage com o resíduo de Ser ativo da enzima.

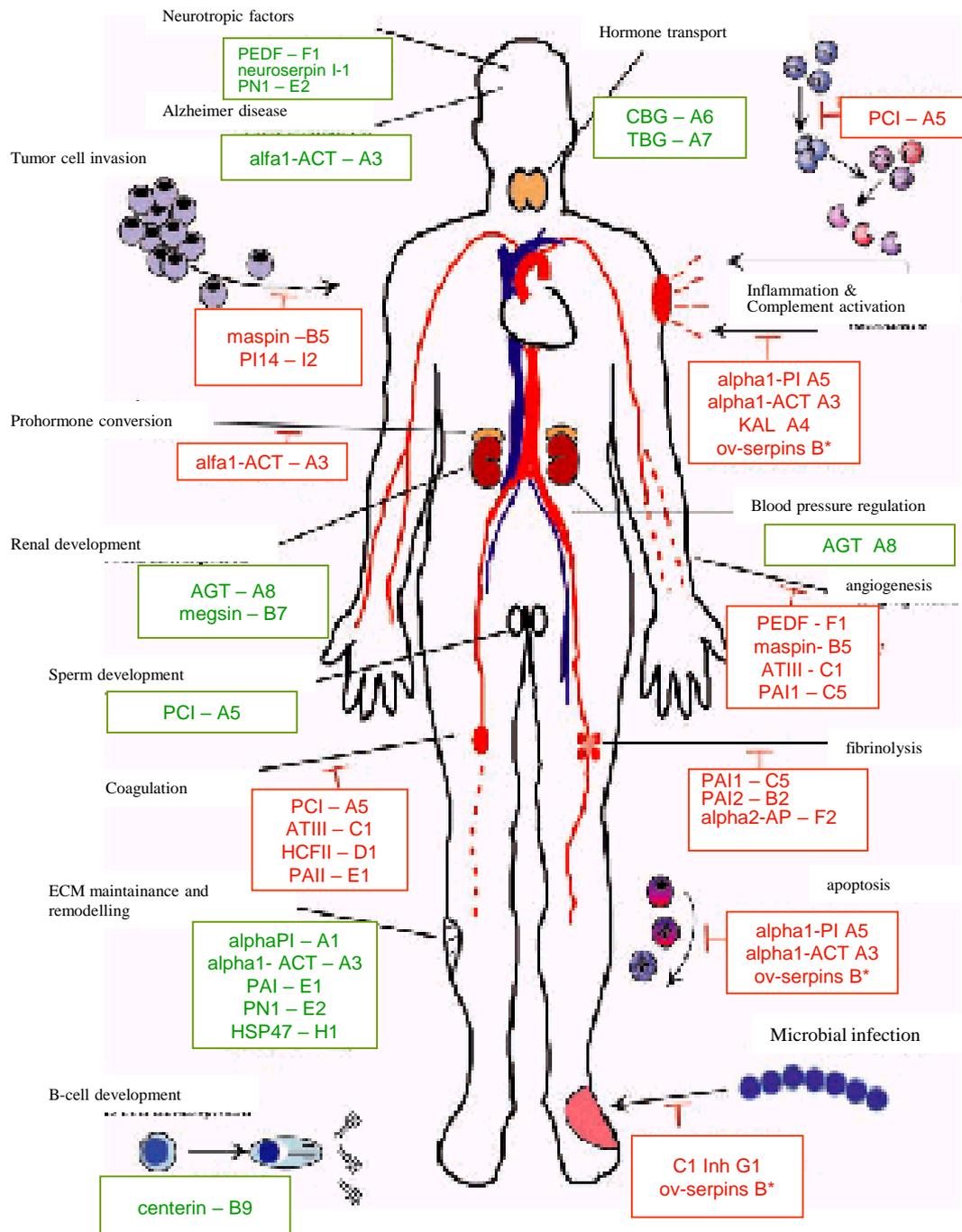
Inibidores proteicos de enzimas proteolíticas desempenham importantes papéis fisiológicos. Entre esses estão as serpinas, inibidores de serino-proteinases, e as cistatinas, inibidores de cisteíno-proteinases. Em ambos os casos, os inibidores funcionam como “falsos substratos”, sendo reconhecidos e clivados pelas enzimas, que ficam “aprisionadas” num complexo com o inibidor.



Modo de ação de serpinas:

A **serpina** e a **enzima** inicialmente formam um complexo não covalente (EI), complexo de Michaelis. Em seguida, a clivagem da ligação peptídica na alça reativa forma em um intermediário acil-enzima (EI*), que pode resultar em transposição e inserção da alça da serpina na enzima, bloqueando-a permanentemente, ou em certas circunstâncias, na liberação da serpina clivada e da enzima livre.

Serpinas: serine proteinase inhibitors



A Superfamília das Serpinas

- são conhecidas cerca de 500 serpinas (até set.2001)
- apresentam 1 cadeia com 350-500 aminoácidos
- filogeneticamente formam 16 clãs
- a maioria tem atividade como inibidor de serino proteinases
- existem serpinas não inibitórias
- a figura ao lado mostra vários processos fisiológicos e/ou patológicos nos quais existe participação de serpinas

serpinas inibitórias

serpinas não inibitórias

Como são controladas as enzimas in vivo, além de alterações na disponibilidade de S e da própria E ?

A atividade enzimática pode ser regulada por diferentes mecanismos, que muitas vezes atuam em conjunto na mesma enzima.

Entre estes mecanismos, destacam-se:

1. Inibidores:

- irreversíveis: não protéicos e protéicos
- reversíveis: competitivo, não competitivo ou misto, incompetitivo

2. Alosteria:

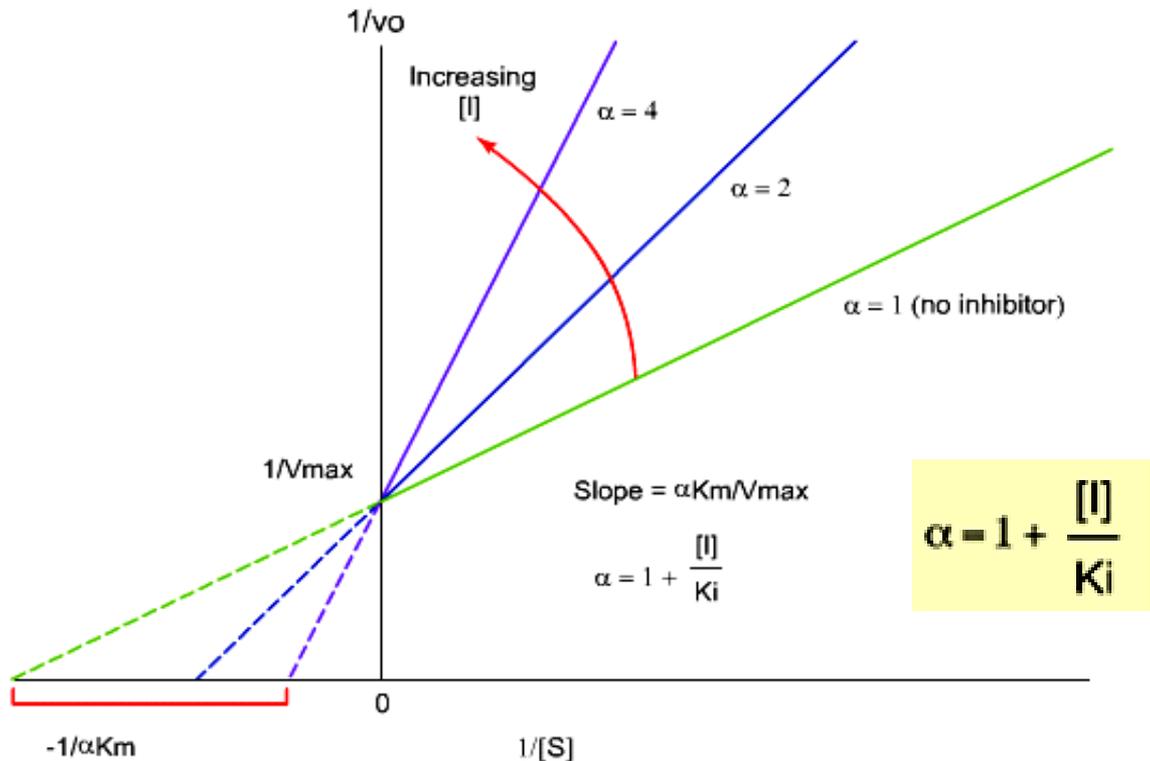
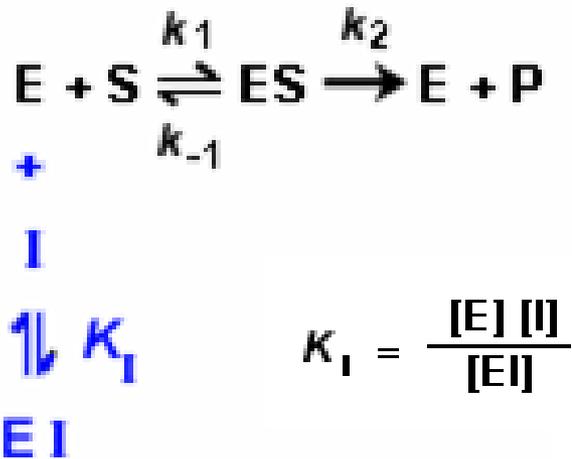
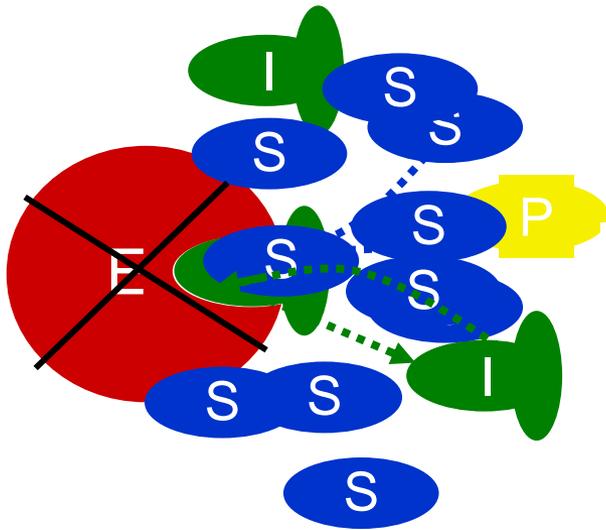
- ativadores e inibidores
- cooperatividade

3. Modulação covalente

- Ativação de zimogênios
- Fosforilação e defosforilação

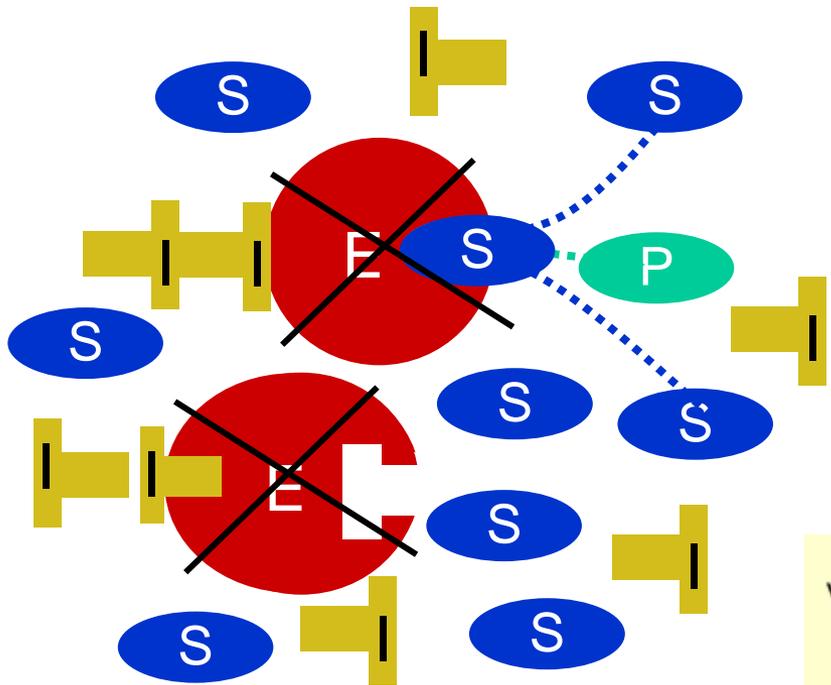
Inibição competitiva

- o inibidor é análogo estrutural do substrato e compete com ele pela ligação ao sítio ativo
- com aumento da [substrato], ocorre diminuição da inibição caracterizando uma competição entre S e I
- não há alteração da V_{max}
- há um aumento de K_m por um fator α , que permite o cálculo da constante de inibição, K_i

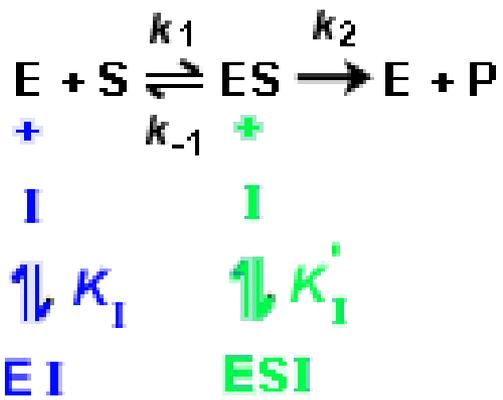


$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad \frac{1}{v_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Inibição não competitiva ou mista



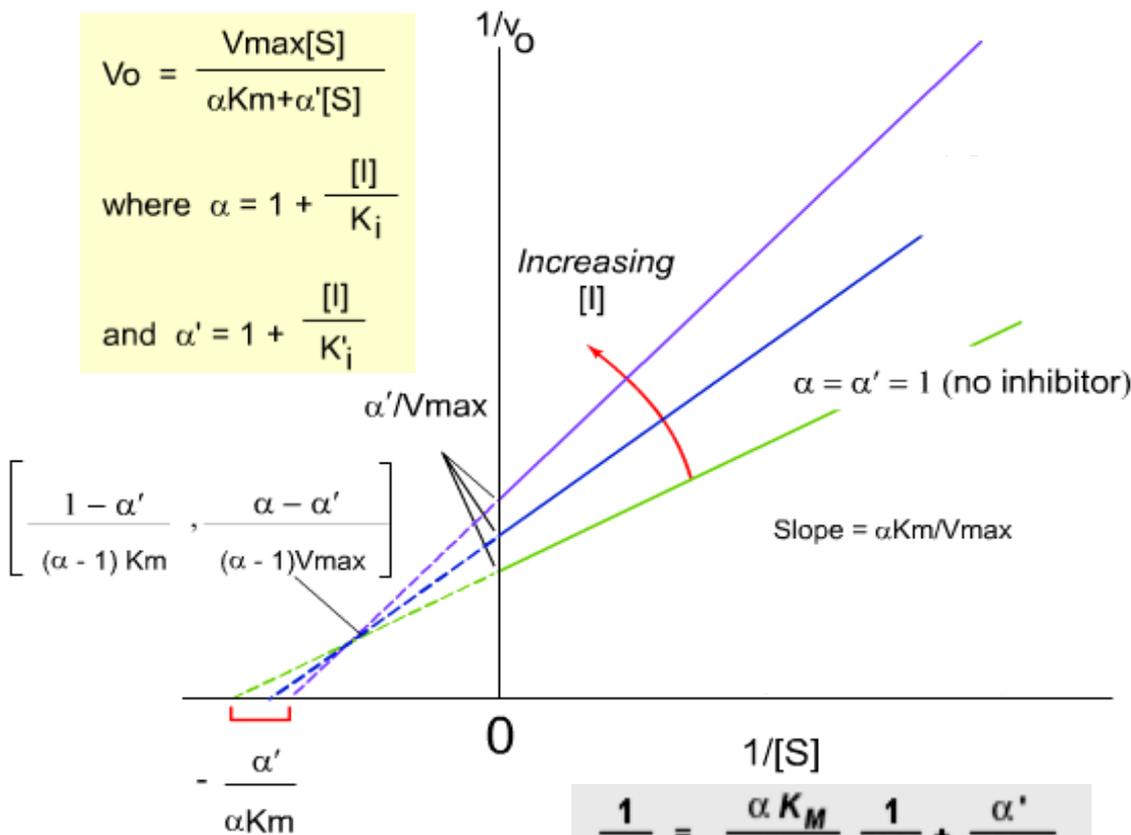
- inibidor **não** é análogo estrutural do substrato - **não** se liga ao sítio ativo
- inibidor se liga à E e ao ES
- aumento da [substrato] **não** diminui a inibição - **não** há competição
- K_m aumenta e V_{max} diminui



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

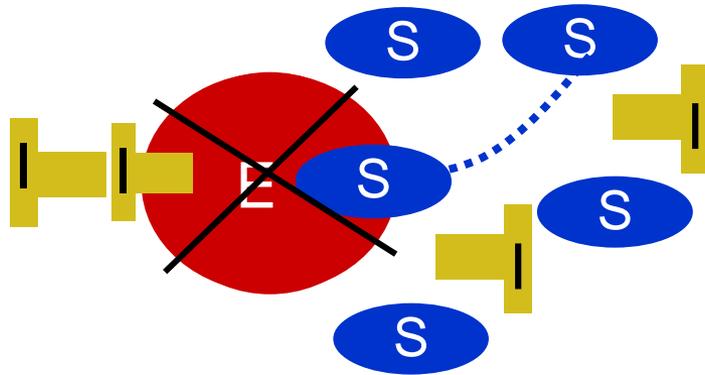
where $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$

and $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$



$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

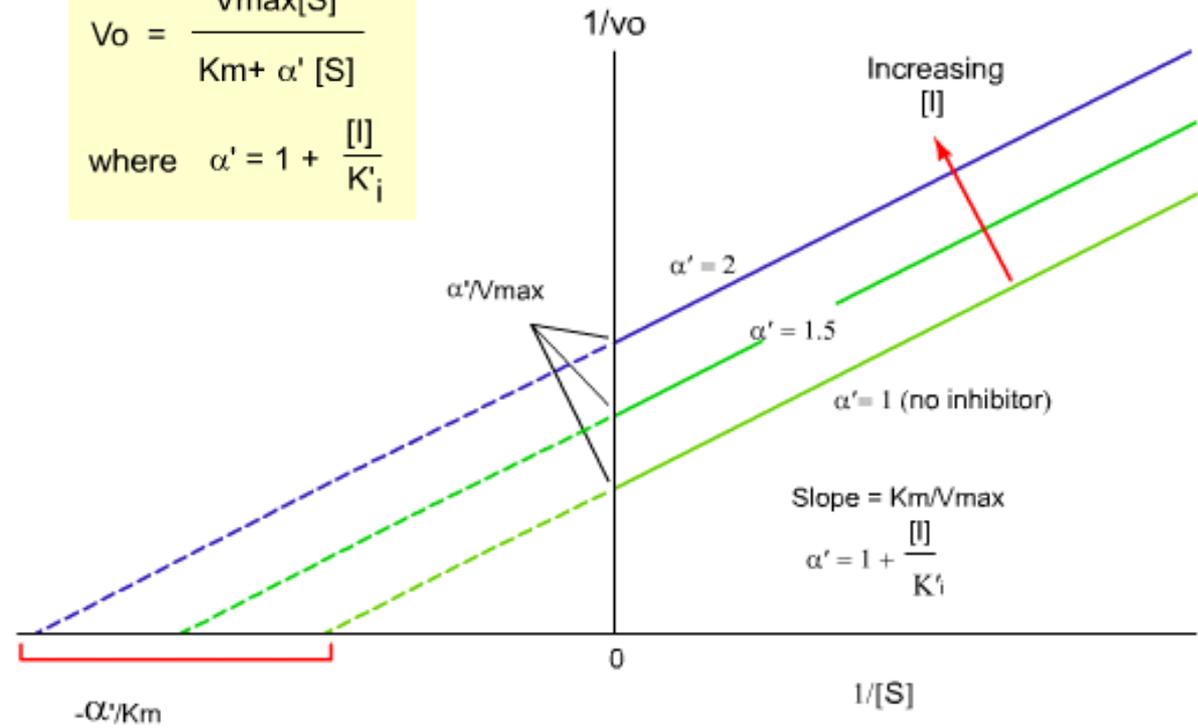
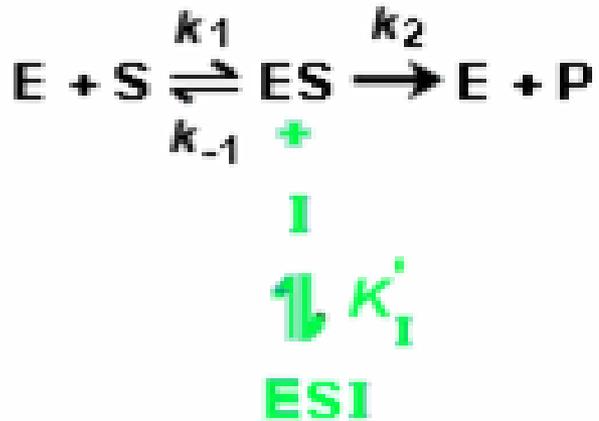
Inibição incompetitiva



- inibidor é análogo do estado de transição e se liga somente ao complexo ES
- K_m aumenta e V_{max} diminui

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \alpha' [S]}$$

where $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

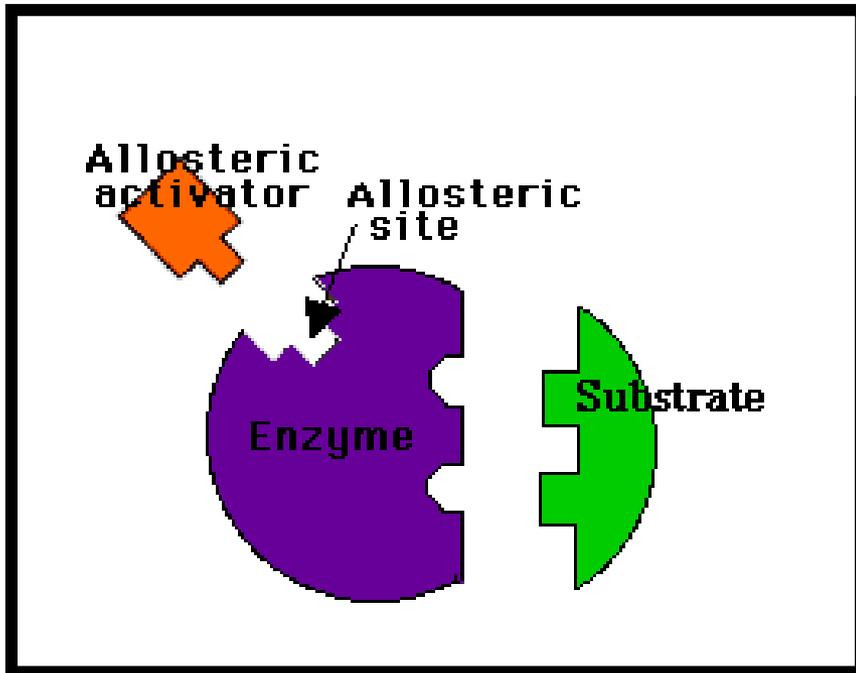
Como são controladas as enzimas *in vivo*, além de alterações na disponibilidade de S e da própria E ?

A atividade enzimática pode ser regulada por diferentes mecanismos, que muitas vezes atuam em conjunto na mesma enzima.

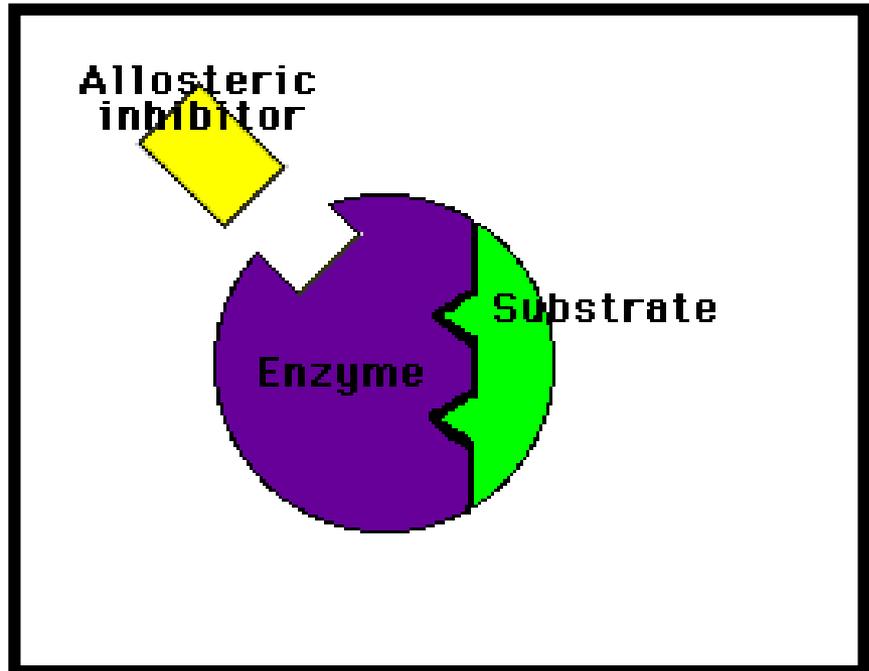
Entre estes mecanismos, destacam-se:

1. Inibidores:
 - irreversíveis: não protéicos e protéicos
 - reversíveis: competitivo, não competitivo ou misto, incompetitivo
2. Alostéria:
 - ativadores e inibidores
 - cooperatividade
3. Modulação covalente
 - Ativação de zimogênios
 - Fosforilação e defosforilação

Enzimas alostéricas possuem uma região diferente do sítio ativo ao se liga um efetor ou modulador alostérico. A mudança conformacional decorrente da ligação do efetor alostérico se propaga pela molécula e afeta o sítio ativo, ativando-o ou inibindo-o. Observe nas figuras.



Ativador alostérico



Inibidor alostérico

Enzimas tipo **K**: efetores alostéricos alteram o **K_m**
Enzimas tipo **V**: efetores alostéricos alteram a **V_{max}**

Gráfico V x S
(Michaelis-Menten) é
uma curva sigmóide

Como são controladas as enzimas in vivo, além de alterações na disponibilidade de S e da própria E ?

A atividade enzimática pode ser regulada por diferentes mecanismos, que muitas vezes atuam em conjunto na mesma enzima.

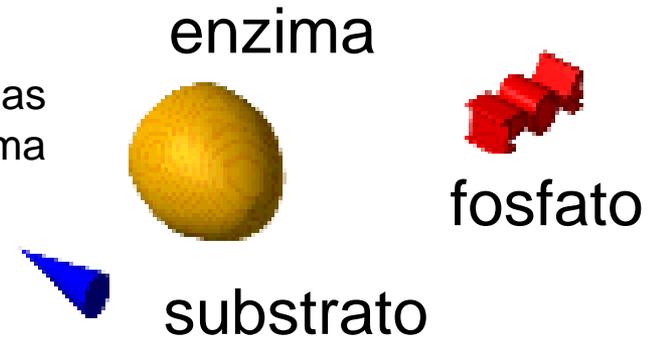
Entre estes mecanismos, destacam-se:

1. Inibidores:
 - irreversíveis: não protéicos e protéicos
 - reversíveis: competitivo, não competitivo ou misto, incompetitivo
2. Alosteria:
 - ativadores e inibidores
 - cooperatividade
3. Modulação covalente
 - Fosforilação e defosforilação
 - Ativação de zimogênios

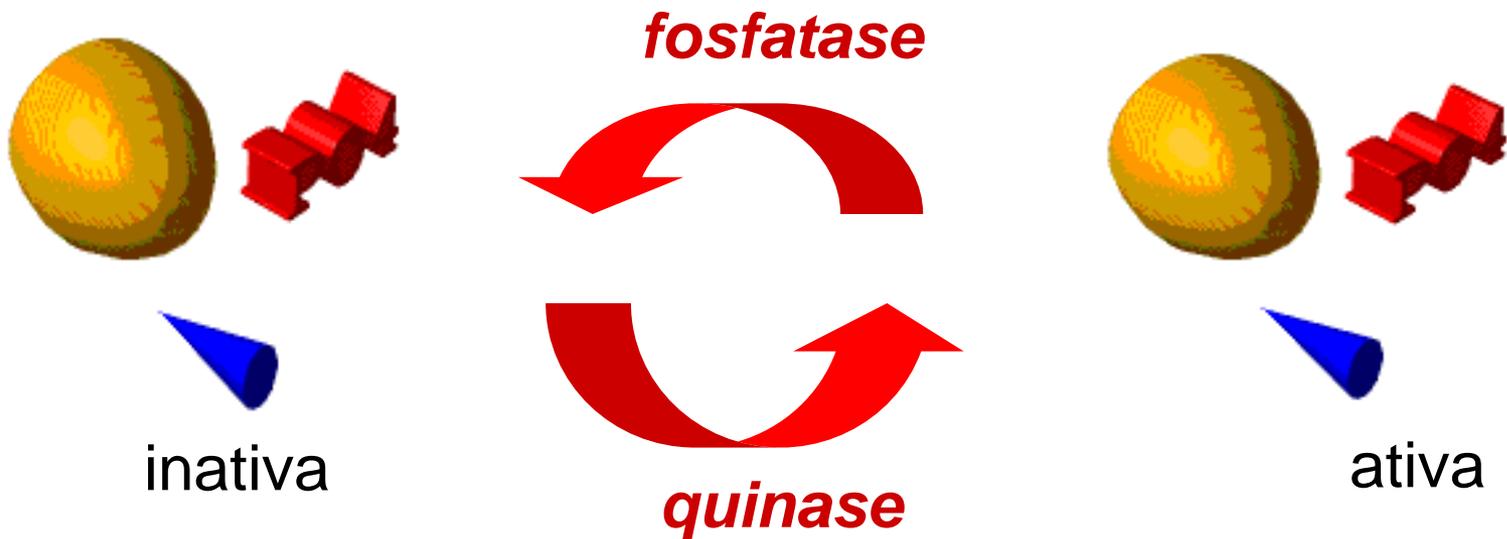
Ao contrário da alosteria, em que os efetores ligam-se à enzima apenas por ligações fracas, na **modulação covalente** a enzima é modificada covalentemente por duas outras enzimas: uma **cinase (quinase)** fosforila a enzima às custas de ATP, e uma **fosfatase** remove o grupo fosfato da enzima fosforilada.

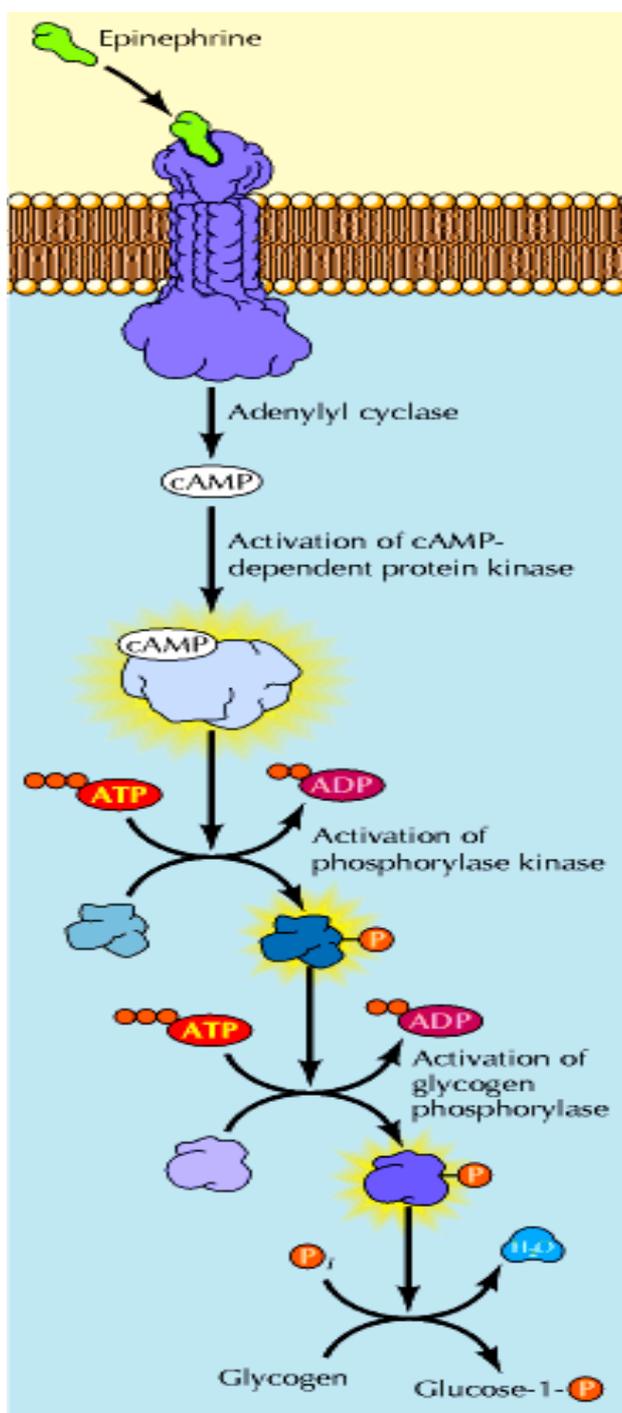
A modulação covalente é energeticamente cara, pois necessita duas outras proteínas e ATP para regular a atividade de uma enzima.

Ao contrário, na alosteria a enzima é controlada pelas concentrações relativas de seus efetores e a afinidade da enzima por estes.



Fosforilação - Defosforilação





A regulação do metabolismo intermediário, por exemplo, síntese e degradação de lipídeos e carboidratos envolve etapas de alosteria e modulação covalente

Em resposta ao hormônio adrenalina ou epenifrina, há um aumento da concentração de glicose circulante, preparando o organismo para luta ou fuga.

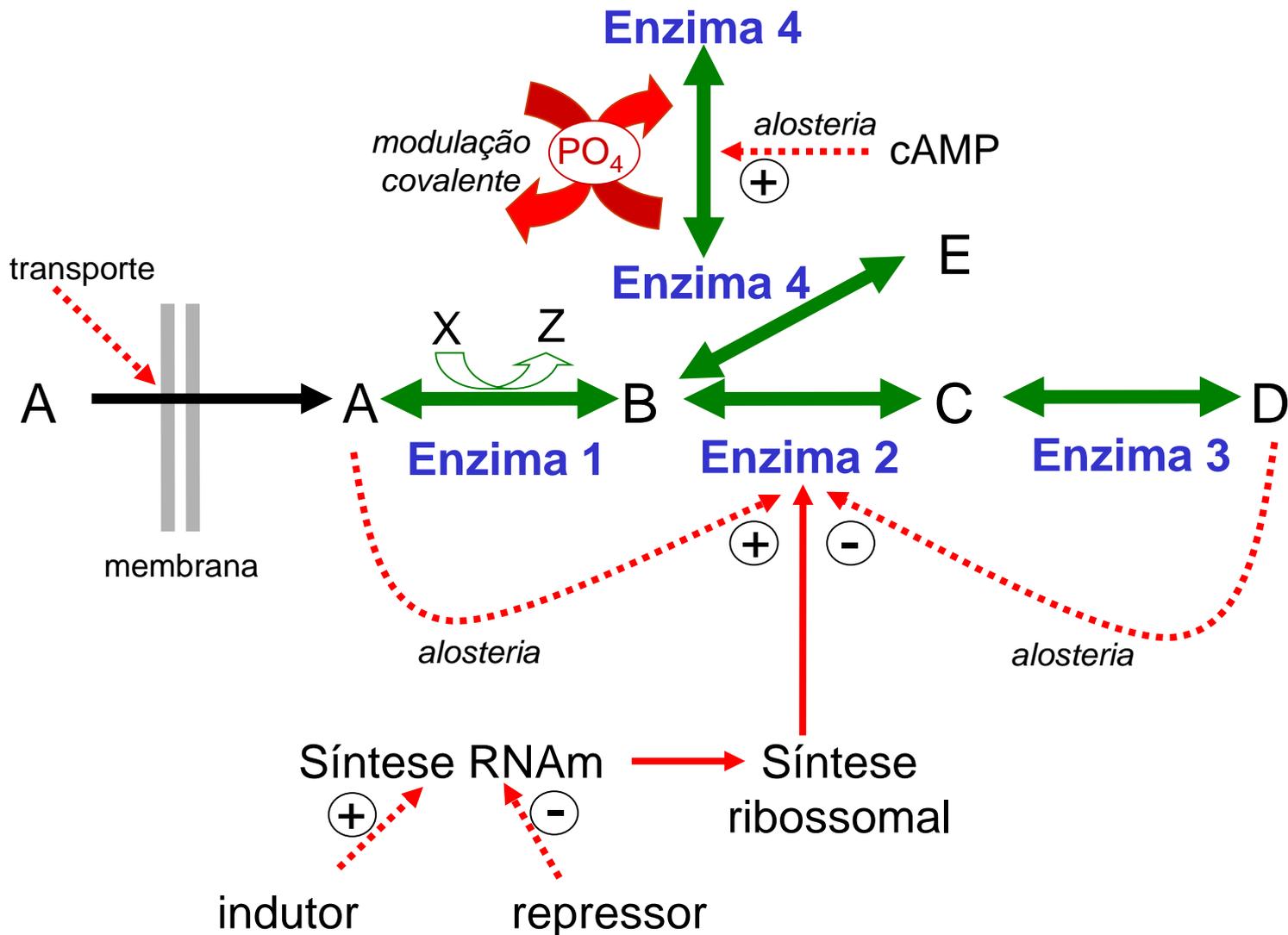
Na primeira etapa dessa resposta metabólica, a adrenalina ativa receptor acoplado a Proteína G e a subunidade αS por **alosteria** ativa a enzima de membrana adenilato ciclase, formando AMP cíclico.

Numa segunda etapa de **alosteria**, o AMP cíclico ativa a proteína quinase A (PKA), ligando-se à sua unidade regulatória e liberando a unidade catalítica ativa.

Na terceira etapa, ocorre **modulação covalente** em que a PKA fosforila a fosforilase quinase, tornando-a ativa.

Na quarta etapa, também por **modulação covalente**, a fosforilase quinase fosforila a glicogênio fosforilase, ativando-a. Por fim, esta hidrolisa diretamente o glicogênio liberando glicose-1-fosfato para a via glicolítica.

Mecanismos de regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos



Em vias metabólicas reguladas por alosteria, uma enzima inicial da rota é controlada por um dos produtos finais da mesma.

Como são controladas as enzimas in vivo, além de alterações na disponibilidade de S e da própria E ?

A atividade enzimática pode ser regulada por diferentes mecanismos, que muitas vezes atuam em conjunto na mesma enzima.

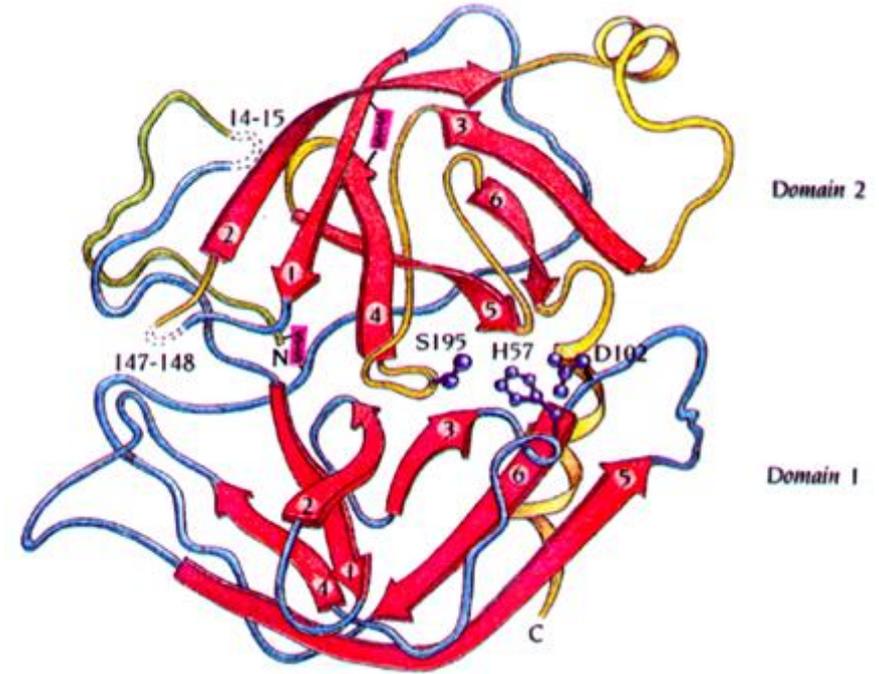
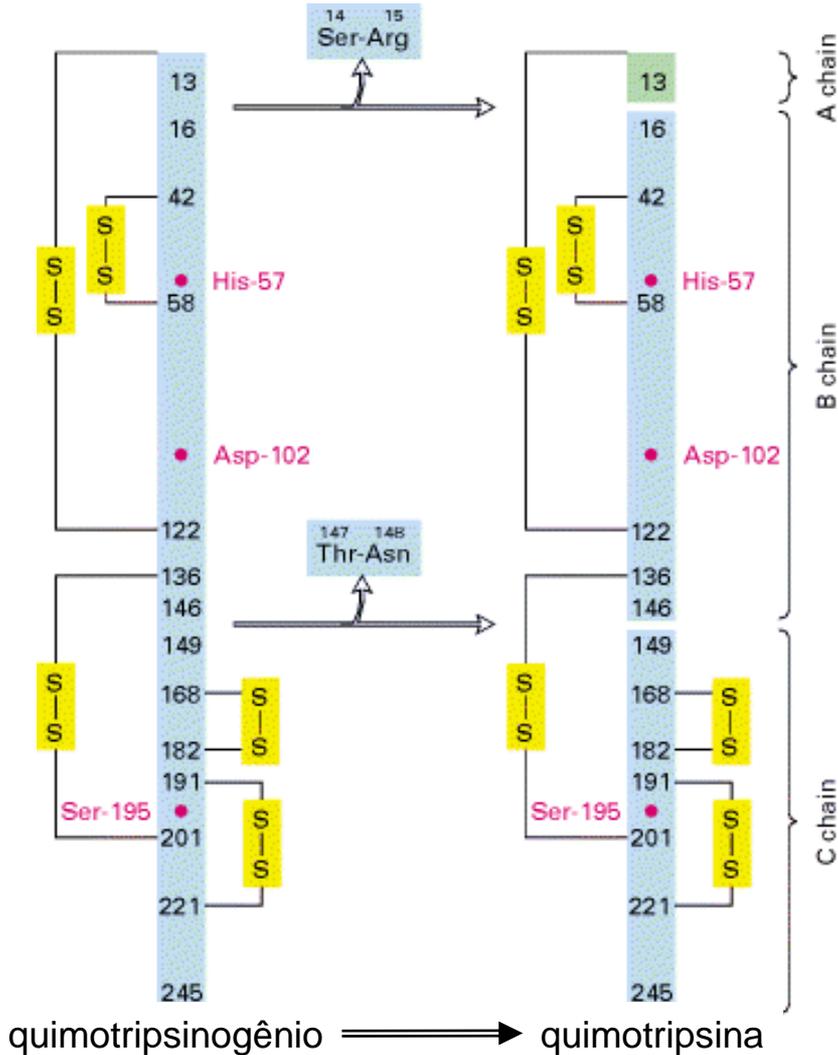
Entre estes mecanismos, destacam-se:

1. Inibidores:
 - irreversíveis: não protéicos e protéicos
 - reversíveis: competitivo, não competitivo ou misto, incompetitivo
2. Alosteria:
 - ativadores e inibidores
 - cooperatividade
3. Modulação covalente
 - Fosforilação e defosforilação
 - Ativação de zimogênios

Ativação de zimogênios é um caso específico de modulação covalente exclusivo de alguns tipos de **enzimas proteolíticas**.

- **zimogênios**: as proteases são sintetizadas numa forma inativa por estar em uma conformação desfavorável, com bloqueio ou desalinhamento dos resíduos do sítio catalítico.
- **conformação desfavorável** resulta de porções adicionais da cadeia polipeptídica, que devem ser retirados para que a proteína assuma a forma ativa.
- podem acontecer duas situações, combinadas ou não:
 - zimogênio tem uma **extensão N-terminal** (pro-segmeneto) que precisa ser retirada. Pro-segmentos podem ter de 2 a 150 resíduos a.a.
 - zimogênio tem cadeia polipeptídica única, que precisa ser clivada (**proteólise limitada**) para formar duas ou mais subunidades.
- **conversão do zimogênio à protease ativa** pode resultar da ação proteolítica de outra protease, ou de alteração do pH ou temperatura do meio, ou ainda, da adsorção do zimogênio à uma superfície negativa. Esses eventos determinam mudança conformacional e/ou auto-hidrólise pela própria protease.
- **ativação é irreversível**, e porisso, energeticamente cara para o organismo.

A enzima digestiva **quimotripsina** é sintetizada como quimotripsinogênio, com um cadeia única, impossibilitando a montagem do sítio ativo, formado pela His57, Asp102 e Ser195 (em rosa). No intestino, o quimotripsinogênio é clivado pela tripsina em dois pontos, retirando dois dipeptídeos. A **quimotripsina** ativa possui três subunidades, cadeias A, B e C, unidas por 5 pontes S-S.

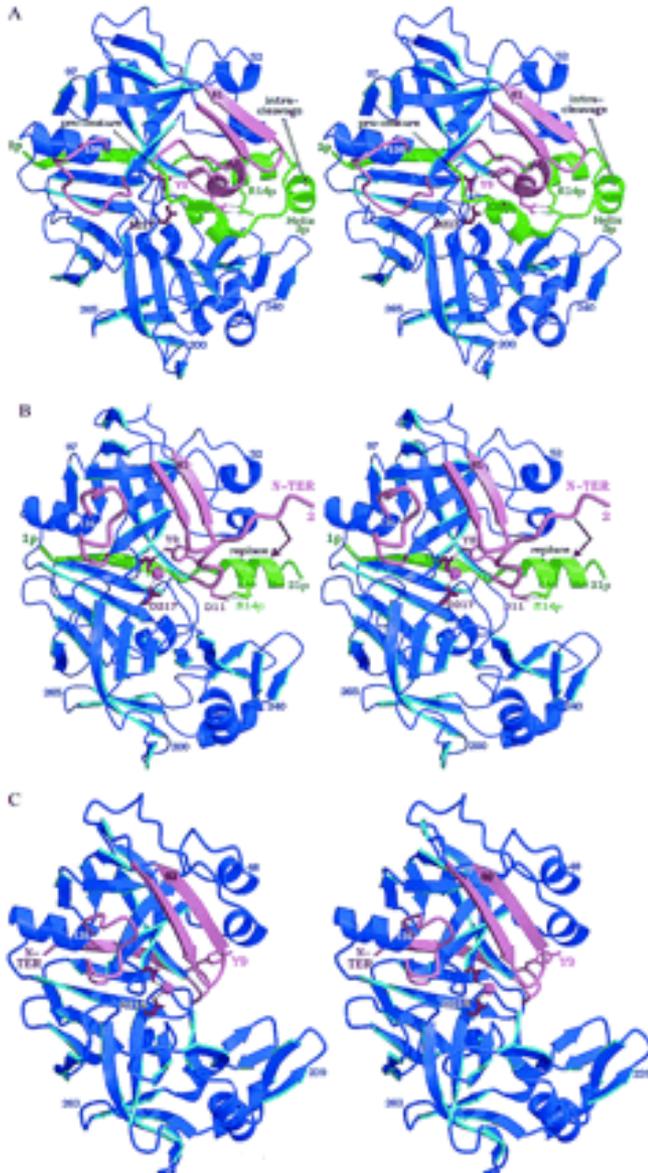


A **Quimotripsina** é formada por dois domínios, com 6 folhas β antiparalelas (vermelho) cada.

O sítio ativo contendo a tríade catalítica (Ser195, Asp102, His57, as cadeias laterais estão destacadas) localiza-se entre os dois domínios. As pontes S-S aparecem em violeta.

Linhas pontilhadas indicam os resíduos 14-15 e 147-148 presentes no precursor inativo, quimotripsinogênio.

As aspártico-proteases gástricas, como a pepsina, são sintetizadas como zimogênios



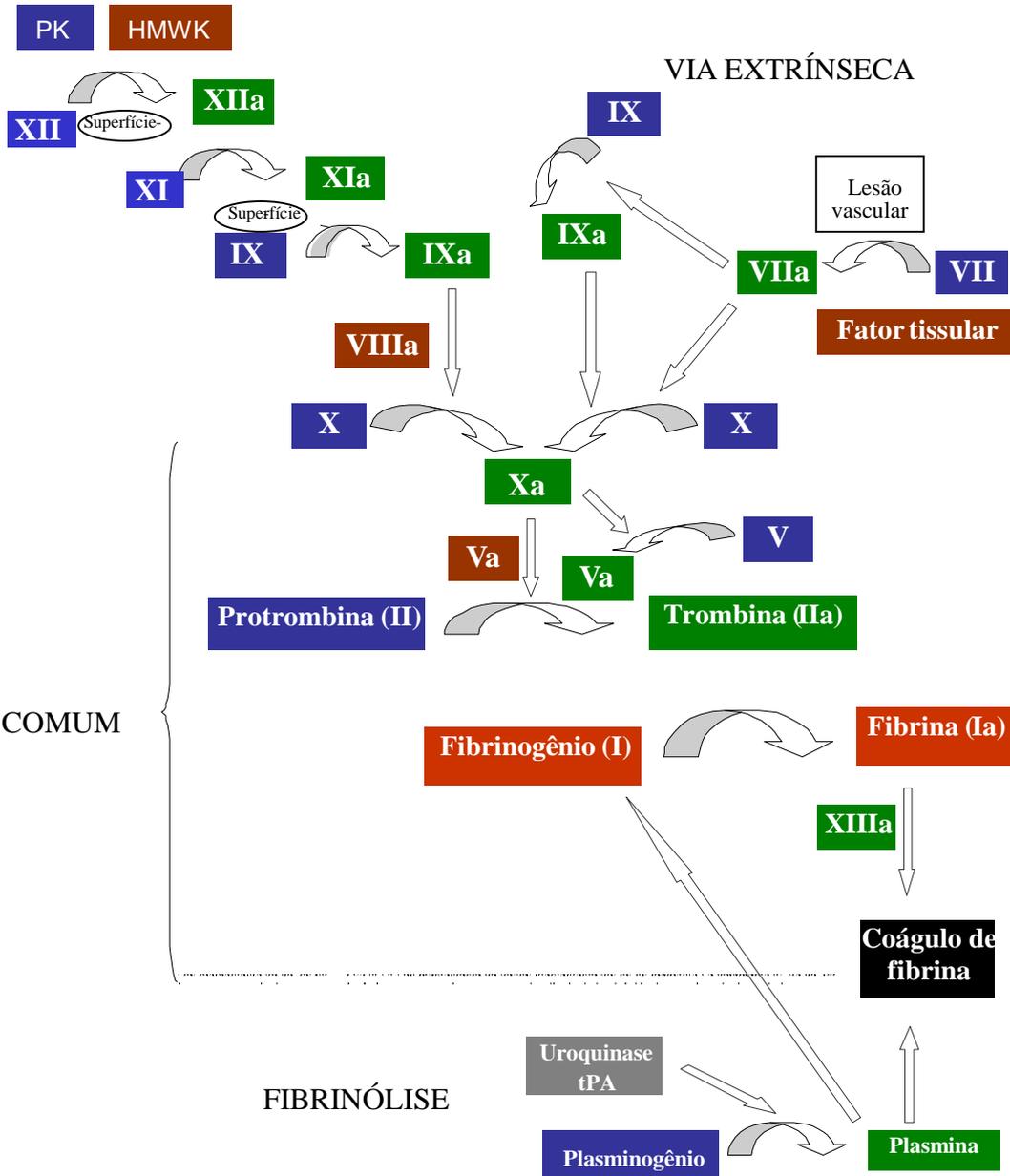
Em verde está representado o prosegmento com 43 aminoácidos, que bloqueia o acesso ao sítio ativo.

Inicialmente, o pepsinogênio é ativado pela exposição ao HCl, com uma mudança conformacional que permite que algumas moléculas hidrolisem o pro-segmento, tornando-as ativas.

Em seguida, a pepsina formada faz a proteólise limitada de mais moléculas de pepsinogênio.

Em rosa está representado as regiões da molécula que se reorganizam com a retirada do pro-segmento.

VIA INTRÍNSECA



A Coagulação Sanguínea é resultado da ativação de uma cascata de zimogênios de serino-proteínas.

A cascata pode ser iniciada independentemente através do fator XII (via intrínseca) ou do fator VII (via extrínseca).

Ambas as rotas convergem para uma via comum, com a ativação do fator Xa. Este, em presença de fator Va, converte protrombina em trombina.

O fibrinogênio é clivado formando fibrina por ação da Trombina.

Zimogênios
Serino-proteínas
Fatores não enzimáticos

