

Cinética Enzimática

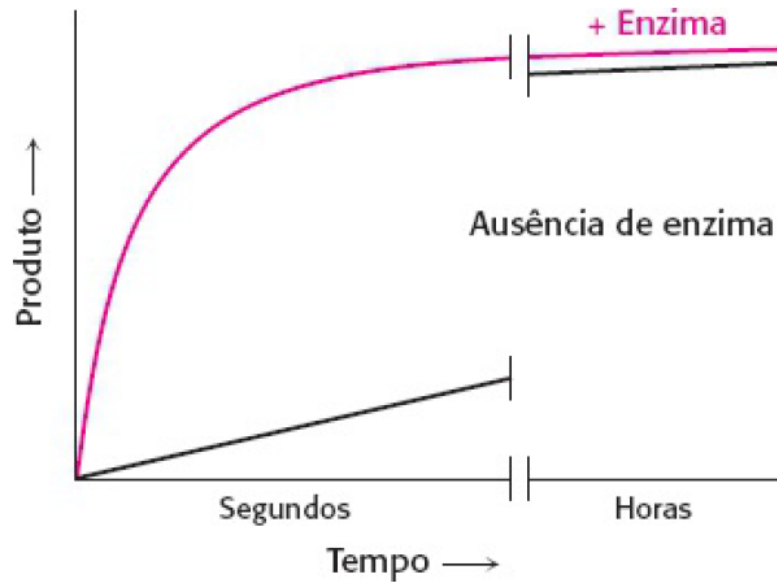
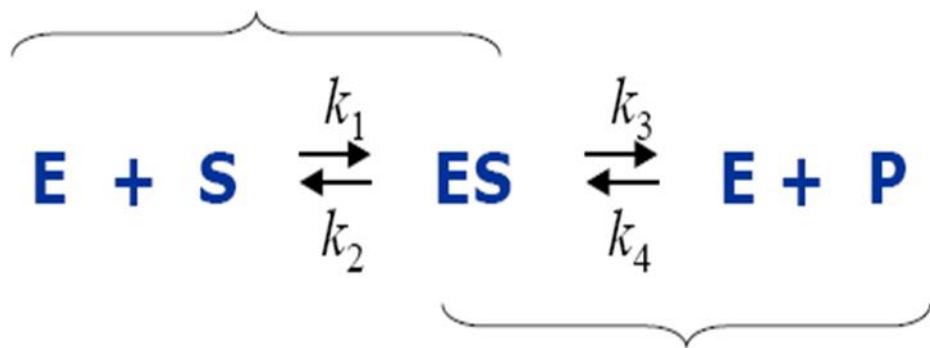


Figura 8.2 As enzimas aceleram a velocidade da reação. O mesmo ponto de equilíbrio é alcançado, porém muito mais rapidamente na presença de uma enzima.

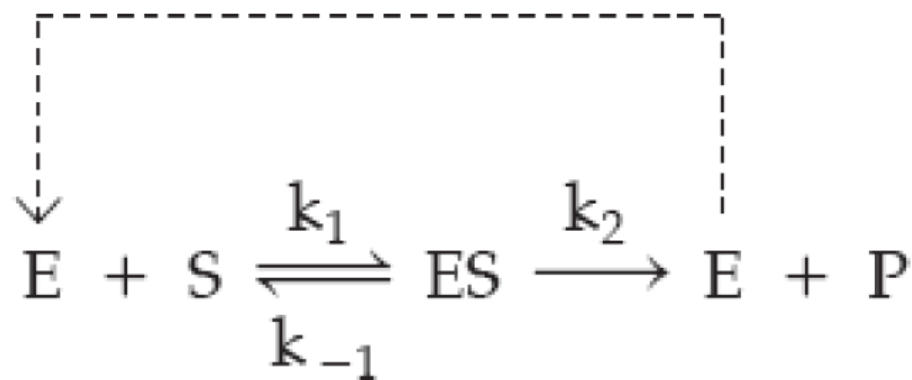
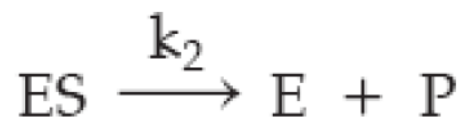
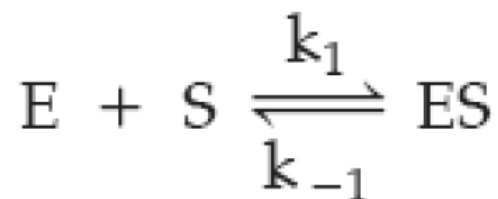
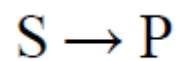
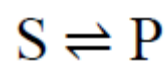
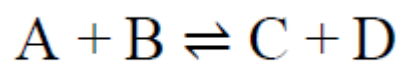
ETAPA 1. Ligação de um substrato (S) a uma enzima (E), formando um complexo intermediário (ES)

Etapa 1



Etapa 2

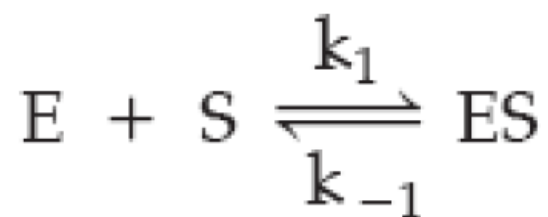
ETAPA 2. Formação do produto (P) a partir do complexo ES, com recuperação da forma livre da enzima (E)



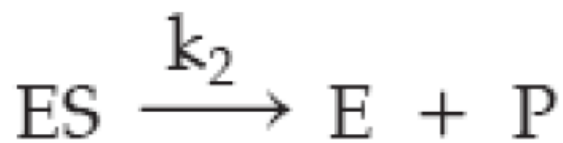
$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$



$$K_{\text{eq}} = \frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$



$$v_2 = k_2 [ES]$$

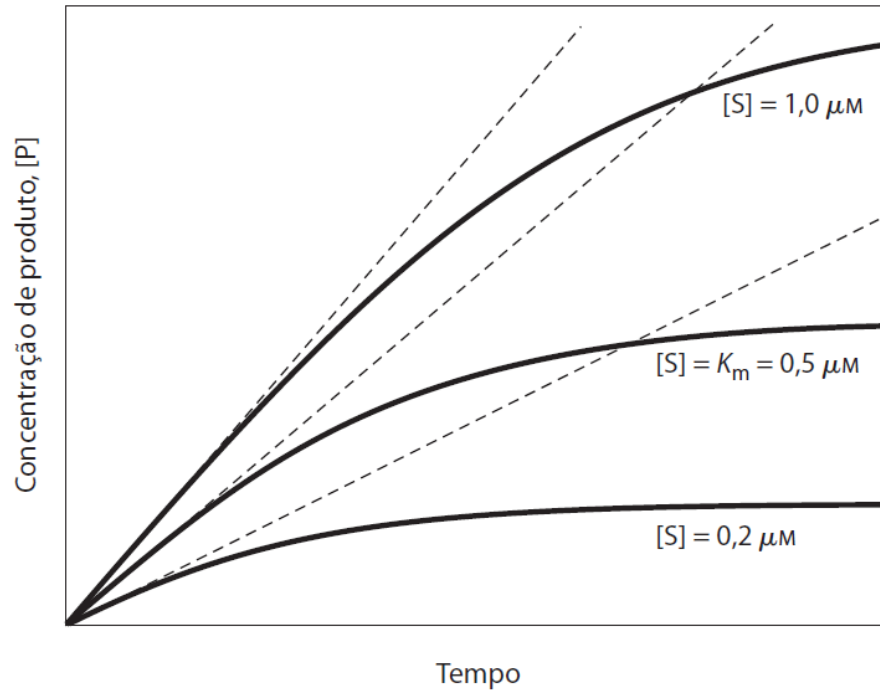
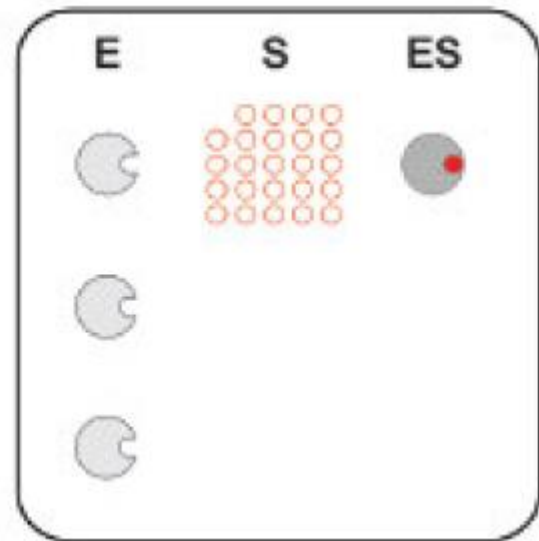
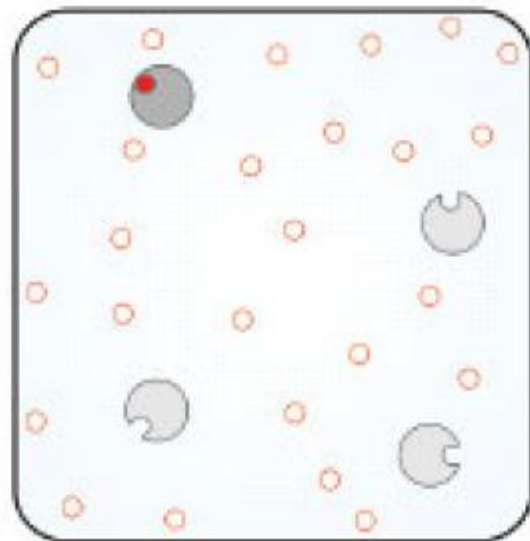
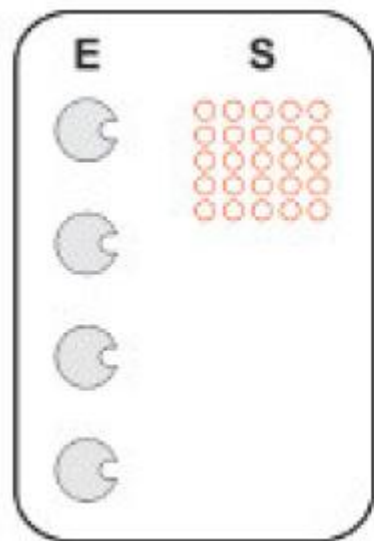
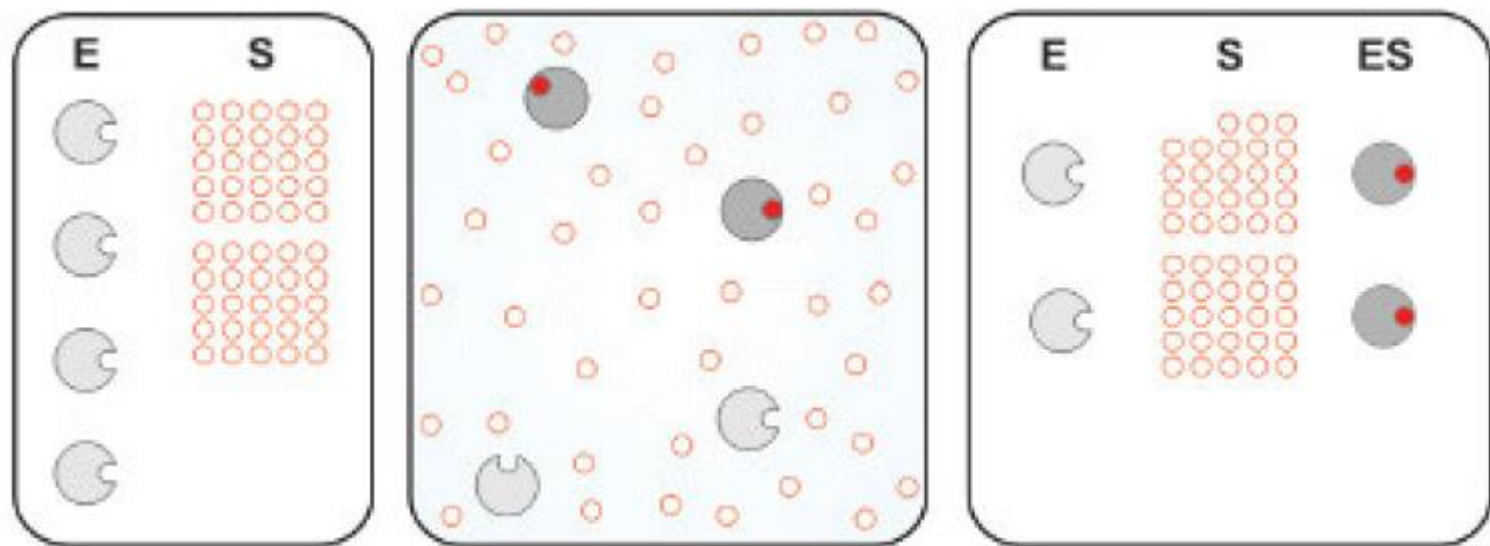
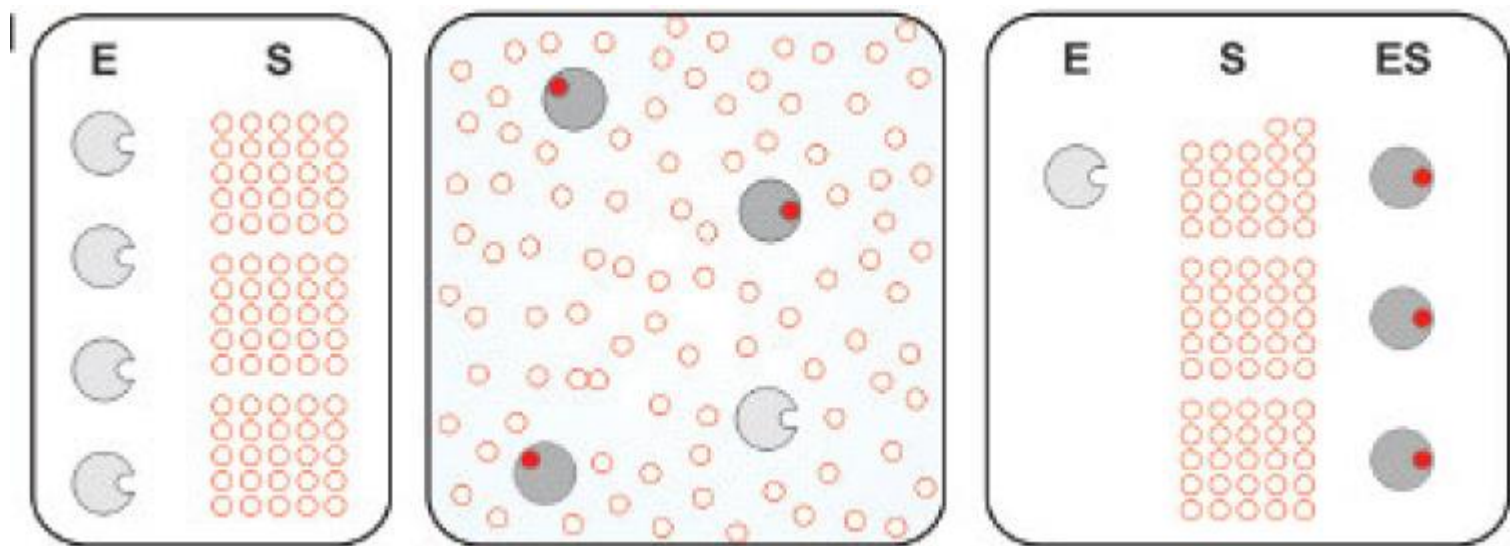


FIGURA 6-10 Velocidades iniciais de reações catalisadas por enzimas.

Uma enzima teórica catalisa a reação $S \rightleftharpoons P$. A enzima está presente em uma concentração suficiente para catalisar a reação a uma velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$, de $1 \mu\text{M}/\text{min}$. A constante de Michaelis, K_m (explicada no texto), é $0,5 \mu\text{M}$. Estão mostradas as curvas de progressão da reação para as concentrações abaixo, exatamente no K_m e acima dele. A velocidade de uma reação catalisada por uma enzima diminui à medida que o substrato é convertido em produto. A tangente de cada curva, no tempo zero, define a velocidade inicial, V_0 , de cada uma das reações.







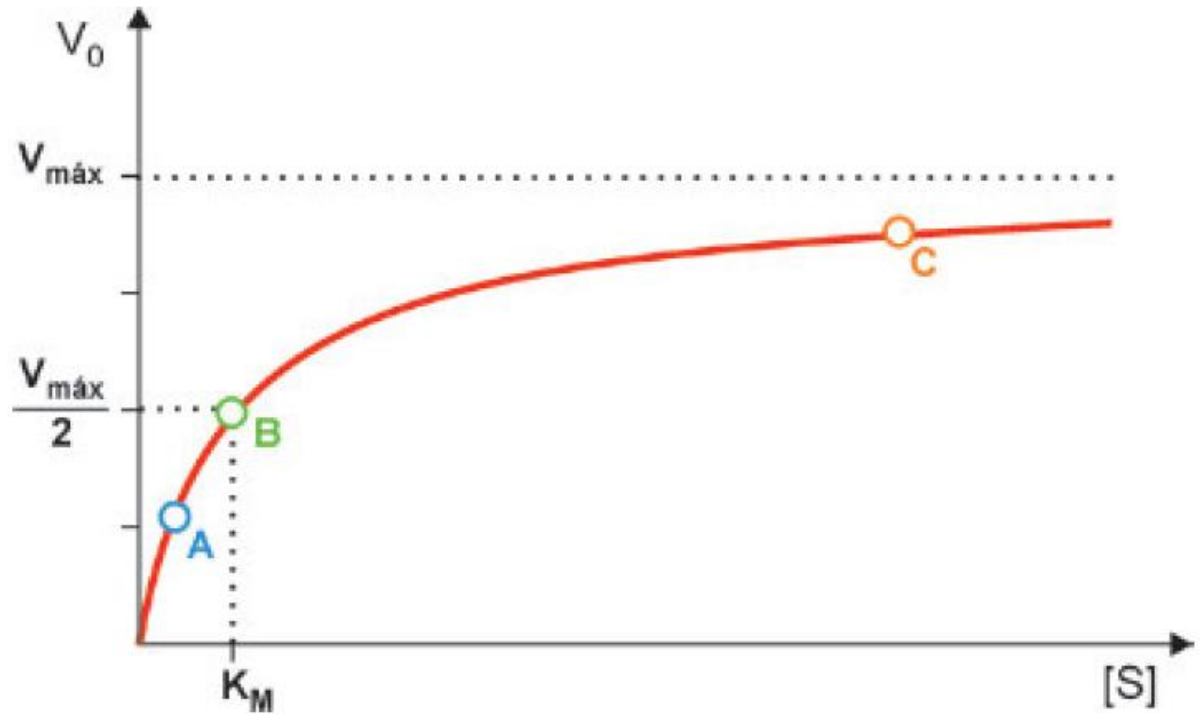


Figura 5.7 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S).

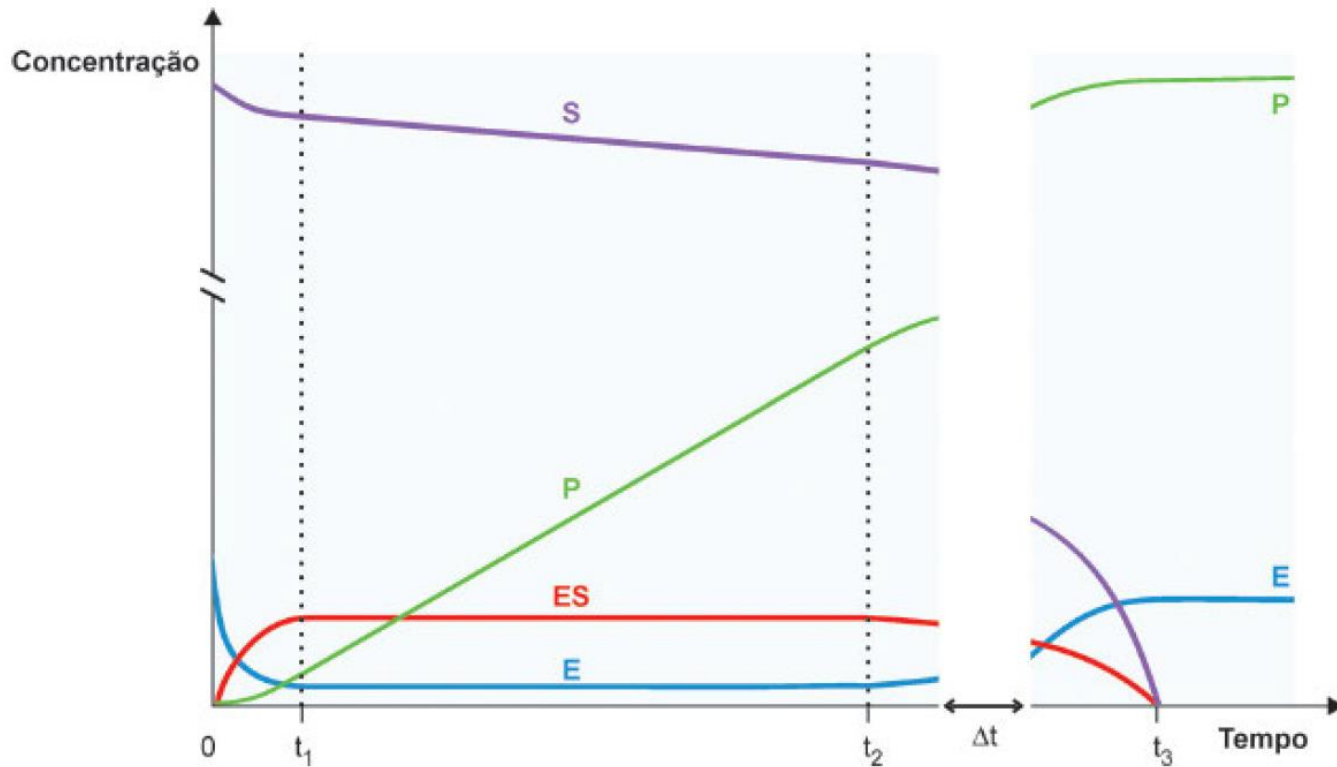
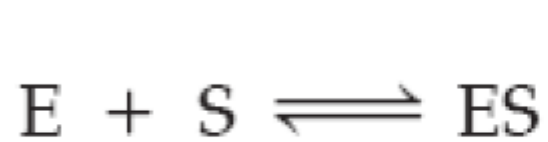


Figura 5.5 Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo $0 - t_1$ é muito pequeno. Após o tempo t_1 estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo t_2 . A concentração do produto cresce sempre; a concentração do substrato, a rigor, diminui, mas pode ser considerada constante face à sua enorme concentração em comparação à da enzima, do complexo ES e do produto. Entre t_1 e t_2 está o tempo inicial, durante o qual a velocidade inicial (v_0) deve ser medida. Durante o intervalo de tempo Δt , a concentração do substrato diminui efetivamente e a reação chega ao final (tempo t_3).



$$K_{\text{eq}} = \frac{[ES]}{[E][S]}$$

$$[S] - [ES] \cong [S]$$

e

$$[S] - [2ES] \cong [S]$$

$$K_{\text{eq}} = \frac{[2ES]}{[2E][S]}$$

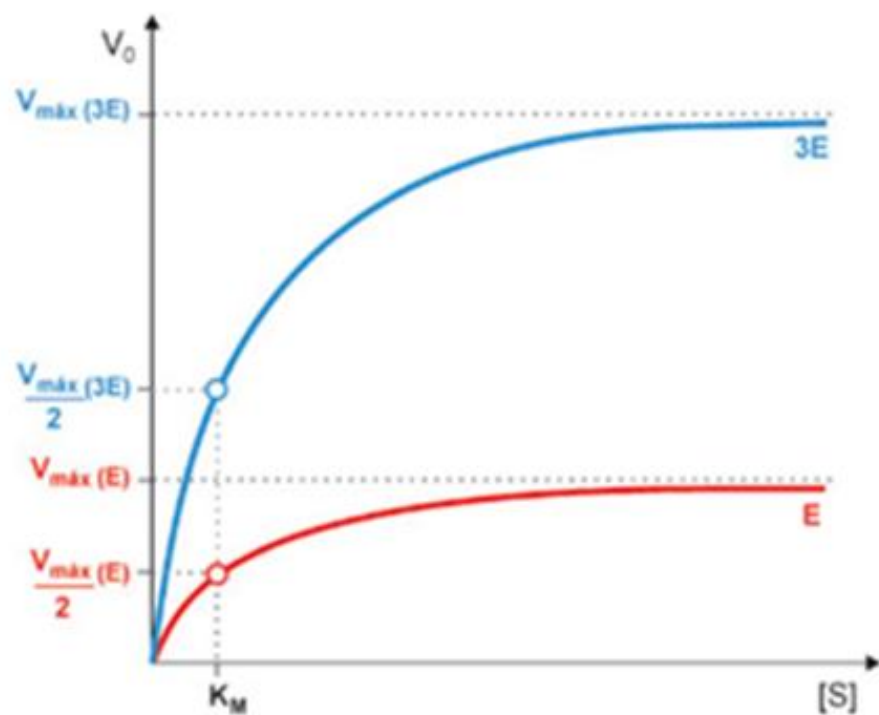
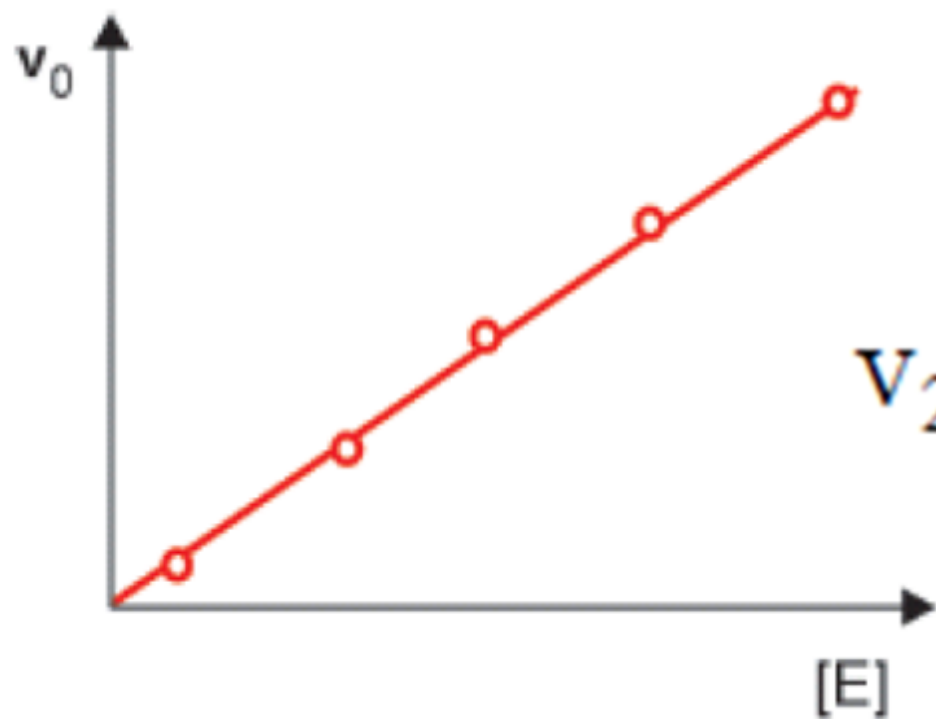


Figura 5.8 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S) para duas concentrações de enzima (E , $3E$).



$$v_2 = k_2 [ES]$$

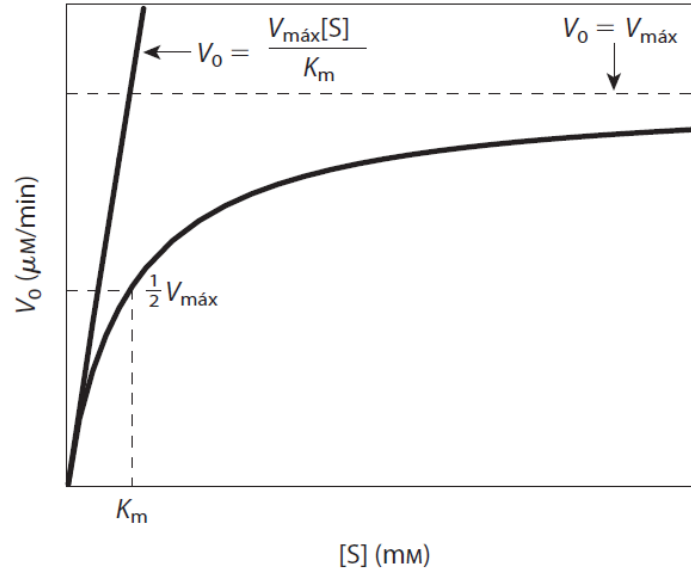
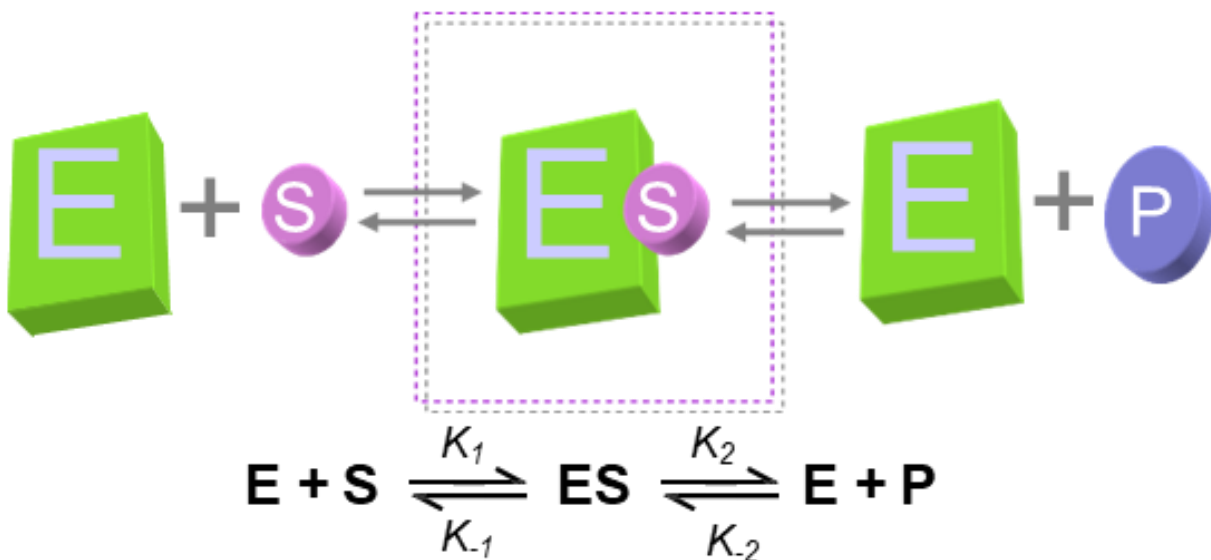


FIGURA 6-12 Dependência da velocidade inicial da concentração de substrato. Este gráfico mostra os parâmetros cinéticos que definem os limites da curva em $[S]$ elevada e baixa. Em baixa $[S]$, $K_m \gg [S]$, e o termo $[S]$ no denominador na equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) torna-se desprezível. A equação fica simplificada a $V_0 = V_{\text{máx}}[S]/K_m$, e V_0 apresenta uma dependência linear de $[S]$, como observado aqui. Em alta $[S]$, quando $[S] \gg K_m$, o termo K_m , denominador na equação de Michaelis-Menten, torna-se desprezível, e a equação fica simplificada a $V_0 = V_{\text{máx}}$, o que é consistente com o platô observado em $[S]$ elevada. A equação de Michaelis-Menten é, portanto, consistente com a dependência observada de V_0 por $[S]$, e a forma da curva é definida pelos termos $V_{\text{máx}}/K_m$ em baixa $[S]$ e $V_{\text{máx}}$ em alta $[S]$.

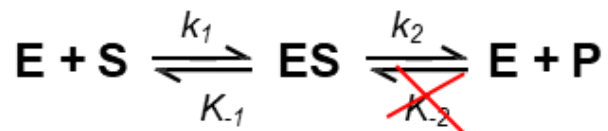
Teoria de Michaelis-Menten



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

velocidade inicial - V_0
velocidade máxima - V_{\max}
constante de Michaelis - K_M

Equação de Michaelis-Menten (I)



Premissa: primeira metade mais rápida que segunda

$$V = k_2 [ES] - k_{-2} [E][P]$$

$$V_0 = k_2 [ES]$$

No equilíbrio estacionário $[ES] = \text{cte}$

(Reações que criam e desfazem ES ocorrem com mesma velocidade)

$$k_2 [ES] + k_{-1} [ES] = k_1 [E][S]$$

Equação de Michaelis-Menten (II)

$$k_2[ES] + k_{-1}[ES] = k_1[E][S]$$



Bayardo
Marzzoco



$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Equação de Michaelis-Menten (III)

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

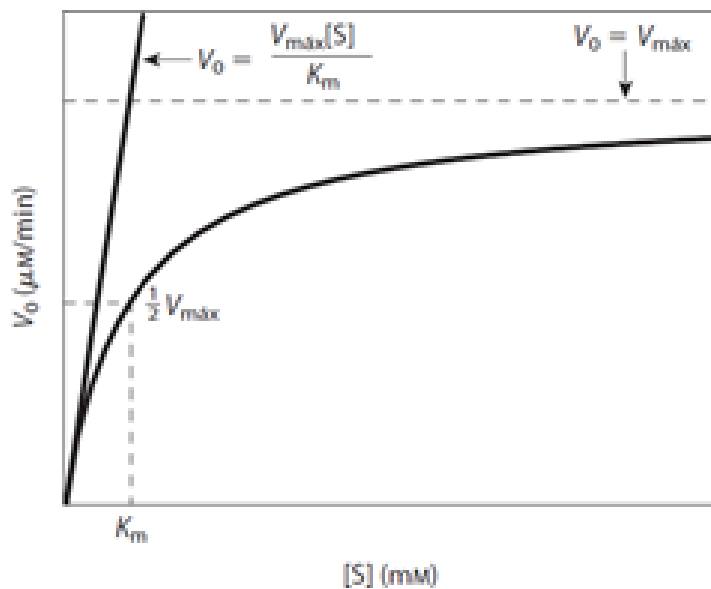
$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \rightarrow K_M \quad \text{Constante de Michaelis}$$

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

K_M e V_{\max} revelam características importantes de uma enzima:

K_M indica afinidade

V_{\max} indica veloc. de catálise



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

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

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

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

3. $V_0 = 1/2 V_{\text{max}}$

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

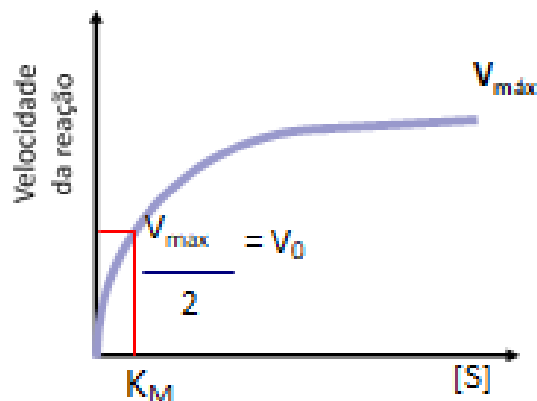
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

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

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

$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = [S]$$



$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\text{máx}} [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$

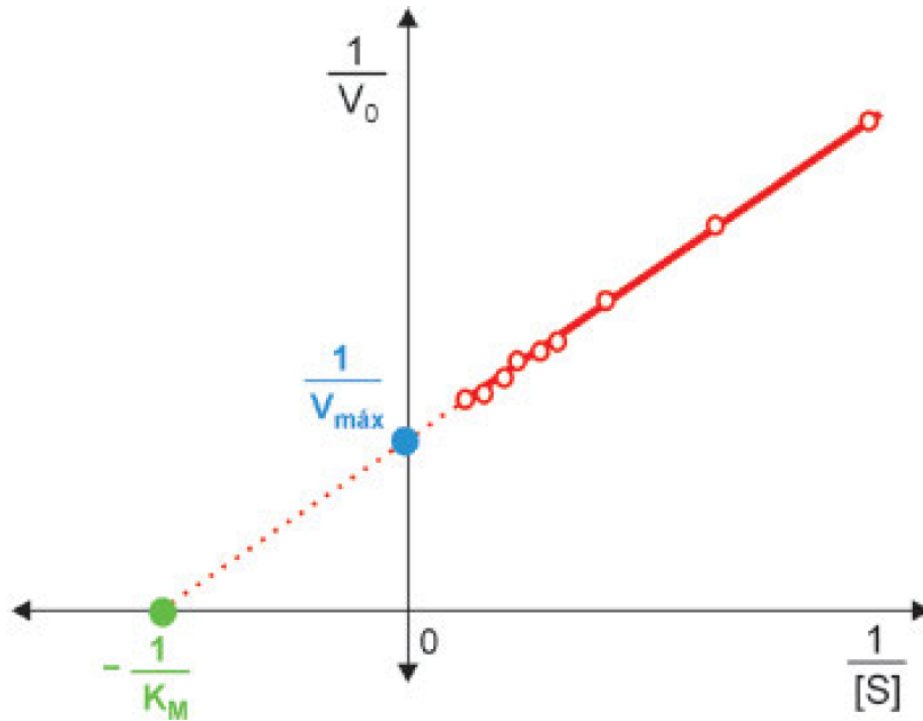


Figura 5.10 Transformação de Lineweaver-Burk para os resultados de um experimento onde foram preparados tubos contendo diversas concentrações de substrato e a mesma concentração de enzima; após a incubação, mediu-se v_0 . Os inversos dos valores das concentrações de substrato utilizadas e os inversos dos valores de v_0 compõem uma reta (linha contínua), que, extrapolada (linha pontilhada), permite a determinação dos valores de K_M e de $V_{máx}$.

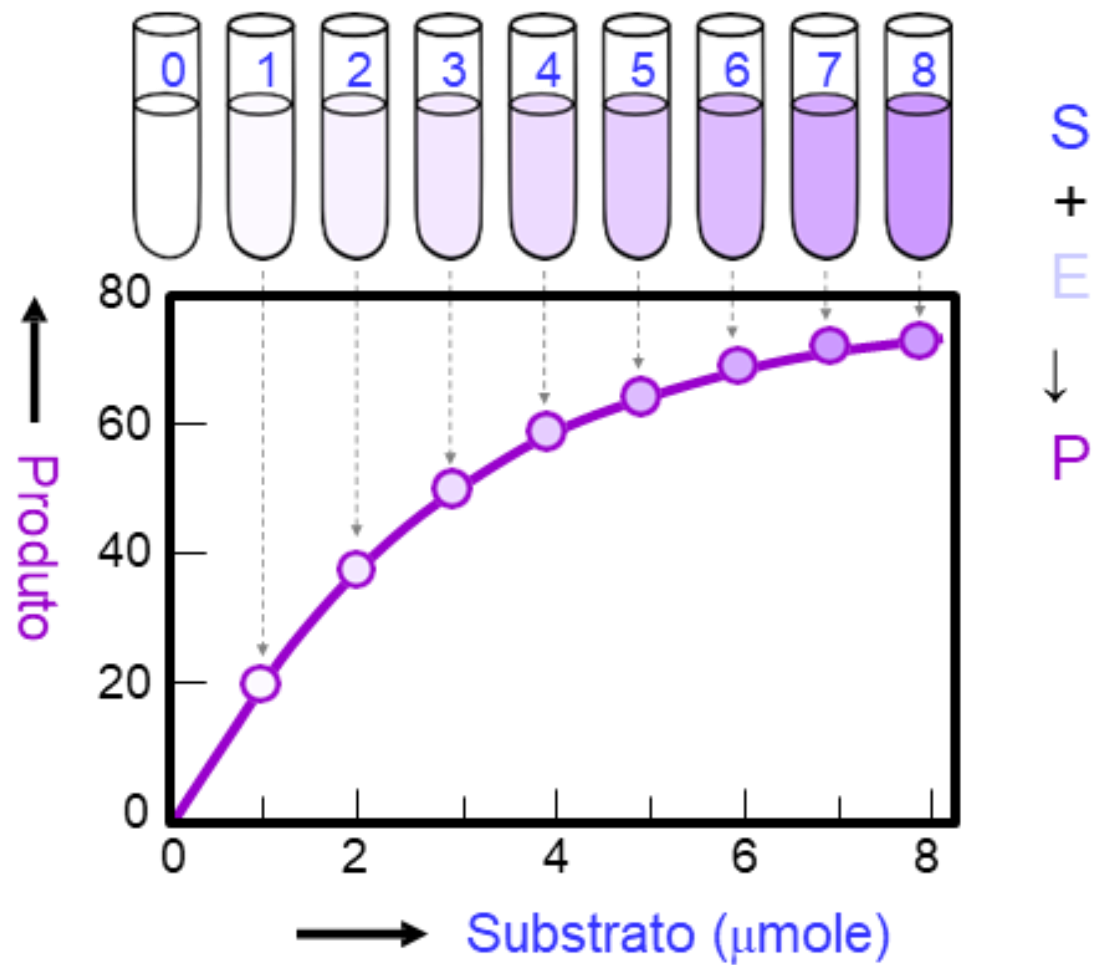
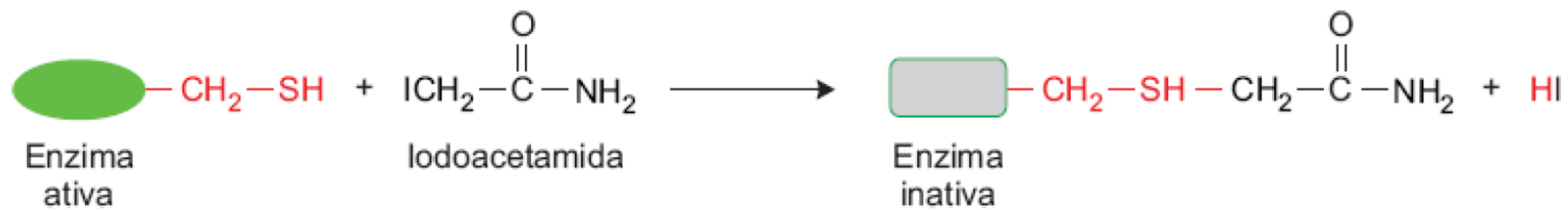


Tabela 5.10 Algumas enzimas de alta eficiência.

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$



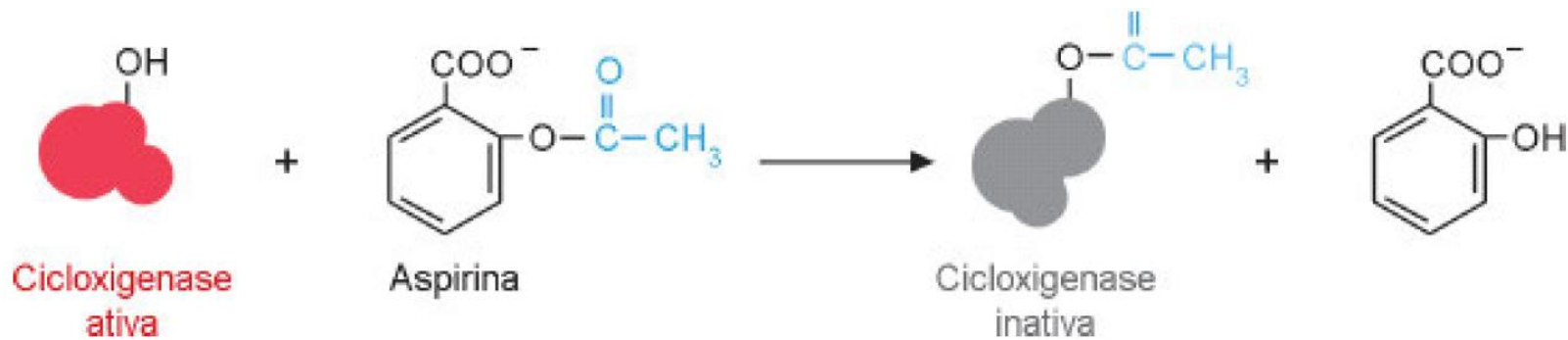


Figura 5.11 Reação de inativação da cicloxigenase por reação irreversível com aspirina (ácido acetilsalicílico).

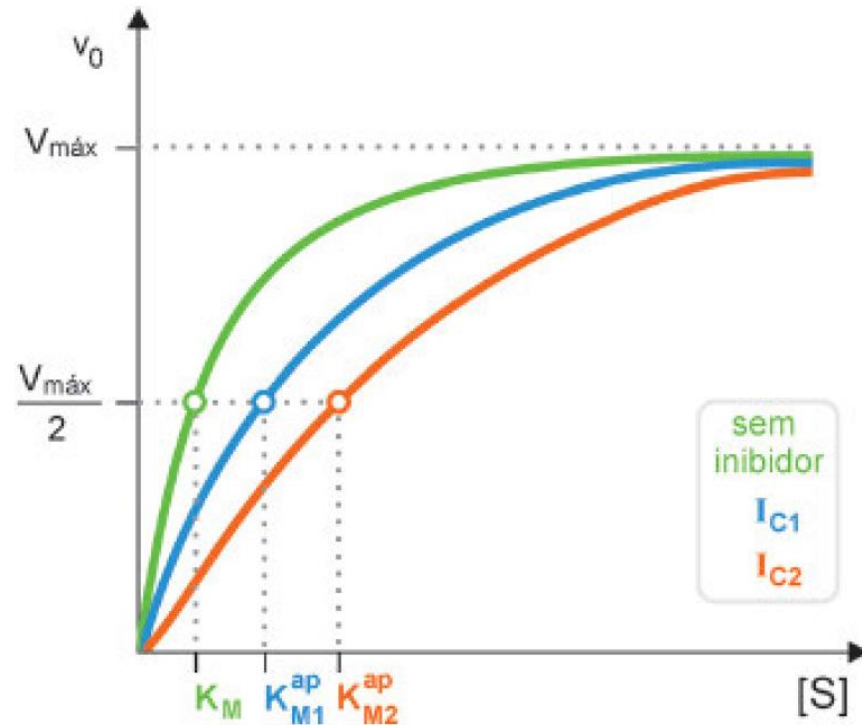


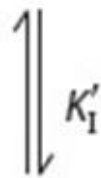
Figura 5.12 Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo ($I_{C1} < I_{C2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. K_{M1}^{ap} e K_{M2}^{ap} são valores do K_M aparente para as concentrações I_{C1} e I_{C2} de inibidor, respectivamente.

(a) Inibição competitiva



+

I



EI

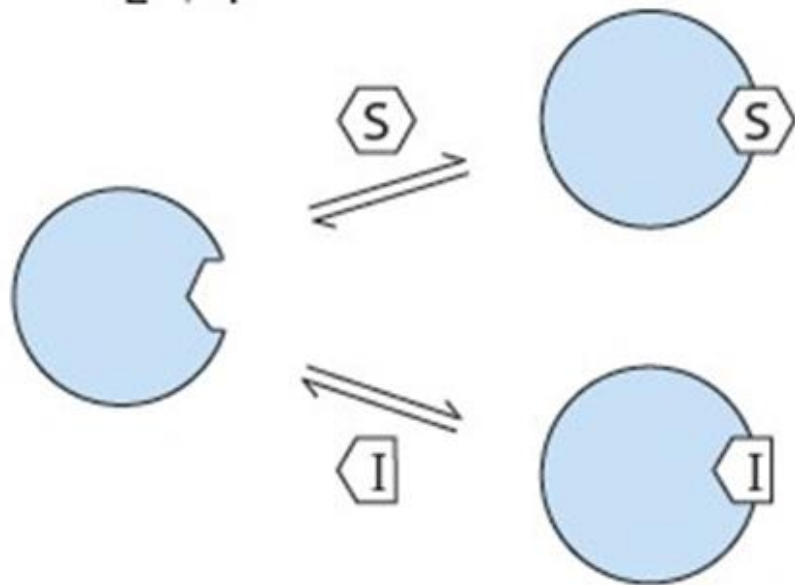
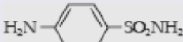

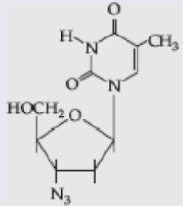
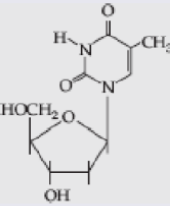
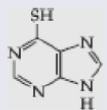
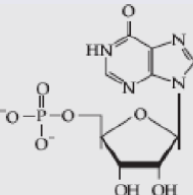


Tabela 5.11 Inibidores competitivos de algumas enzimas, seus substratos naturais e as moléstias em cujo tratamento são empregados.

Inibidor	Substrato	Enzima
$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{Malonato} \\ \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{Glutarato} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{Succinato} \end{array} $	Succinato desidrogenase
 <p>Sulfanilamida</p>	 <p>p-Aminobenzoato (PABA)</p>	Di-hidropteroato sintase
 <p>AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina)</p>	 <p>Desoxitimidina</p>	Transcriptase reversa
 <p>6-Mercaptopurina</p>	 <p>Inosina monofosfato (IMP)</p>	Adenilossuccinato sintetase

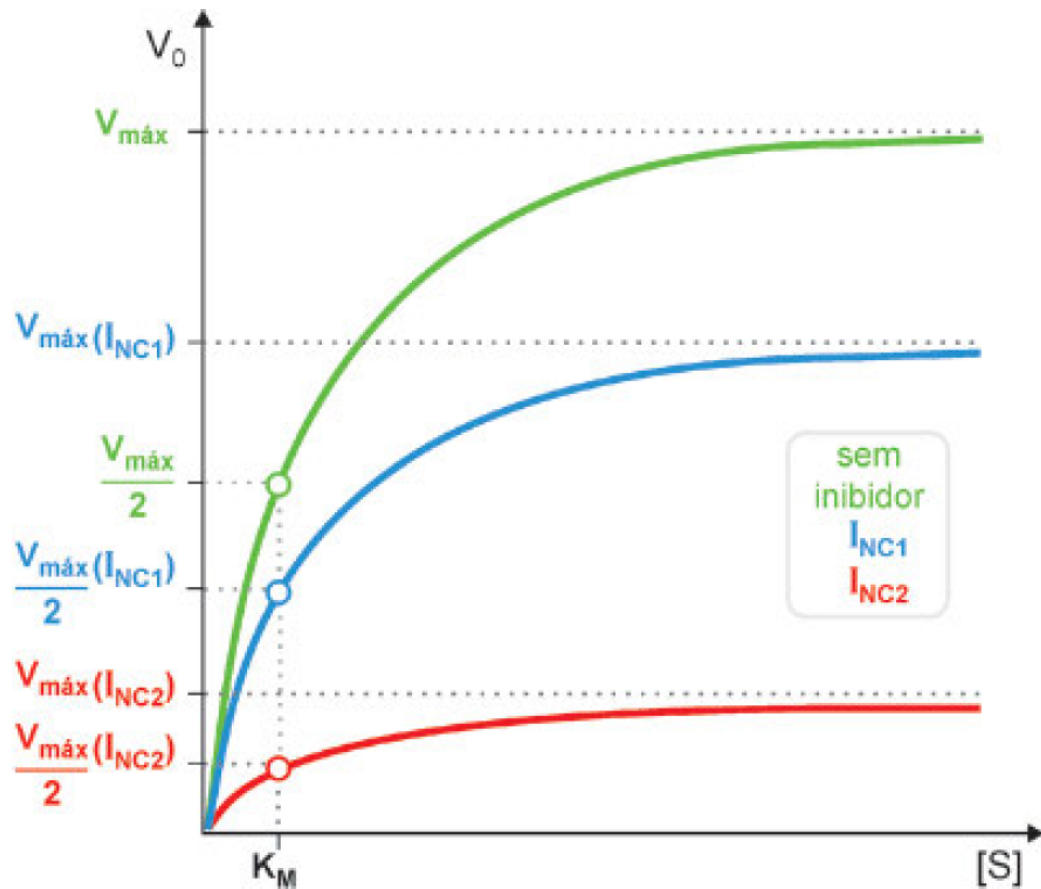


Figura 5.13 Efeito de duas concentrações de inibidor não competitivo ($I_{NC1} < I_{NC2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. O valor do K_M permanece inalterado, mas as velocidades máximas decrescem com o aumento da concentração do inibidor.

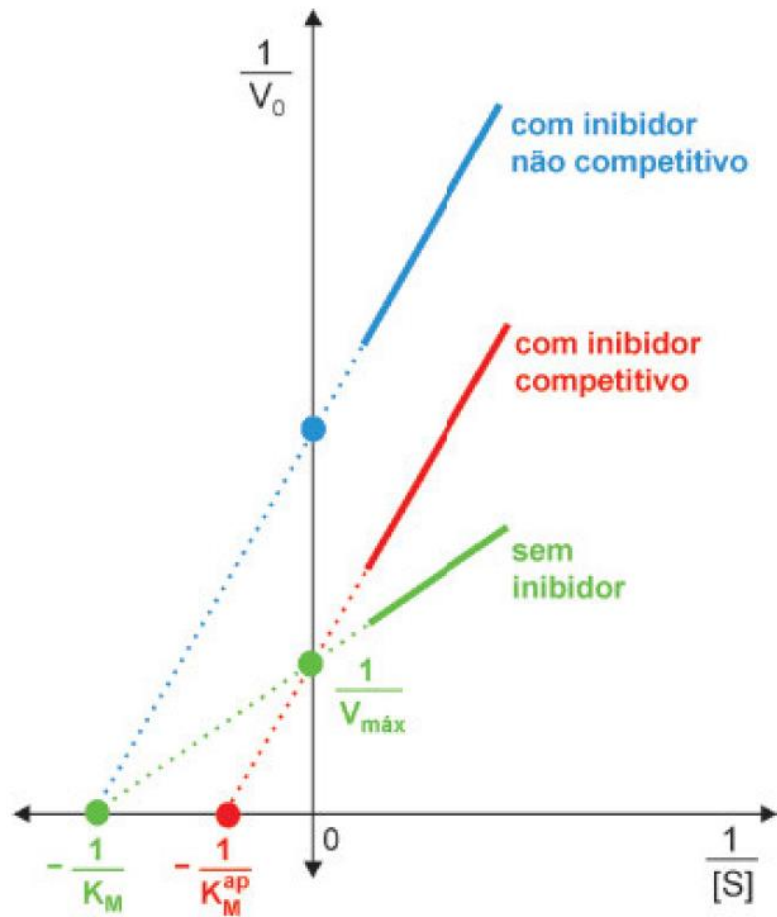
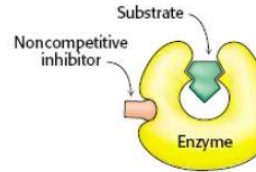
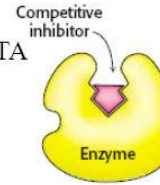
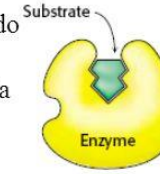


Figura 5.14 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não competitivo.

Inibidor competitivo

- Estrutura semelhante à do substrato
- Liga-se ao Sítio Ativo da Enzima
- Aumento da [substrato] diminui a inibição
- A V_{max} NÃO se altera
- K_m da enzima AUMENTA Na presença do inibidor

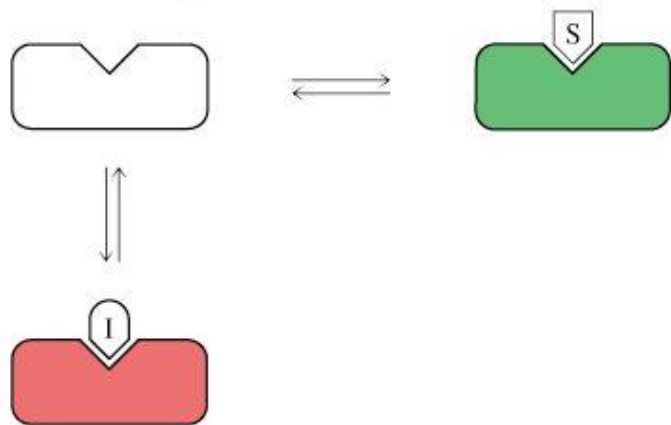


Inibição não-Competitiva

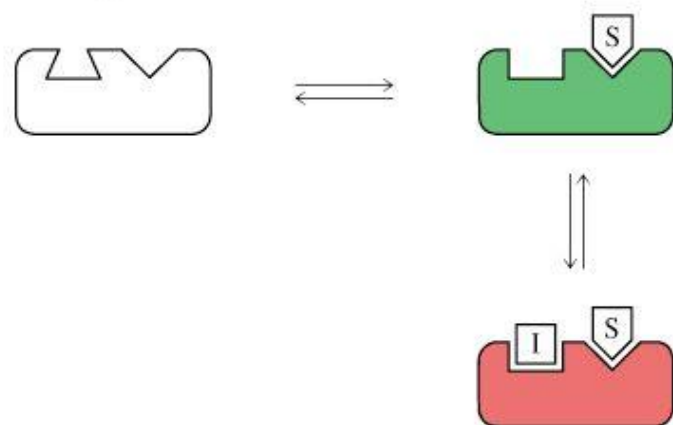
- Inibidor não tem semelhança estrutural com o substrato
- NÃO se liga no sítio ativo da enzima
- Aumento da [substrato] não diminui a inibição
- K_m da enzima NÃO se altera
- A V_{MAX} DIMINUI na presença do inibidor

FIGURE 8.15 Distinction between a competitive and a noncompetitive inhibitor. (Top) enzyme–substrate complex; (middle) a competitive inhibitor binds at the active site and thus prevents the substrate from binding; (bottom) a noncompetitive inhibitor does not prevent the substrate from binding.

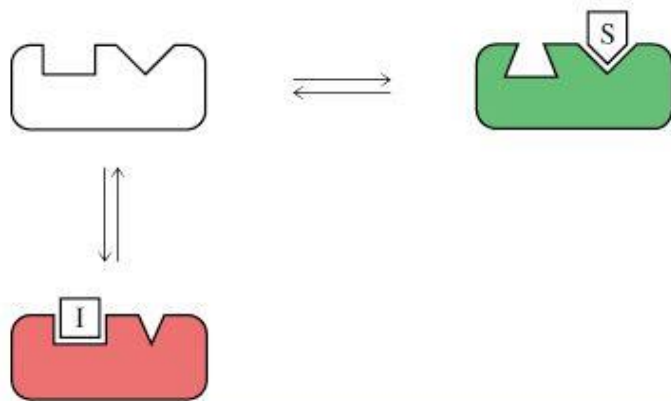
(a) Classical competitive inhibition



(c) Uncompetitive inhibition



(b) Nonclassical competitive inhibition



(d) Noncompetitive inhibition

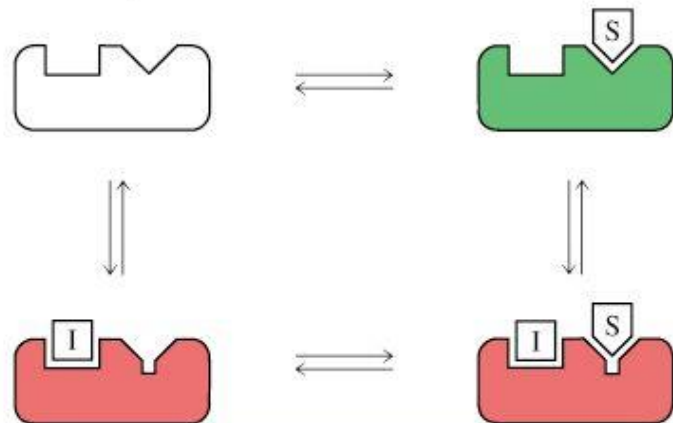
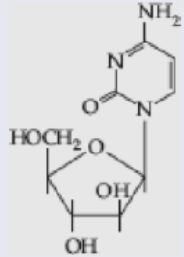
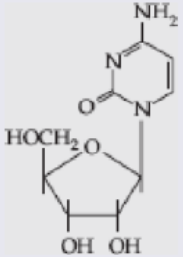
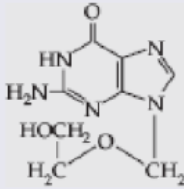
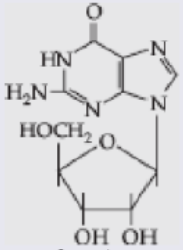


Tabela 5.12 Antimetabólitos e os substratos que substituem.

Antimetabólitos	Substratos
$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \\ \text{Canavanina} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \\ \text{Arginina} \end{array} $
 <p>Citosina arabinosídeo</p>	 <p>Citidina</p>
 <p>Acidoguanosina</p>	 <p>Guanosina</p>

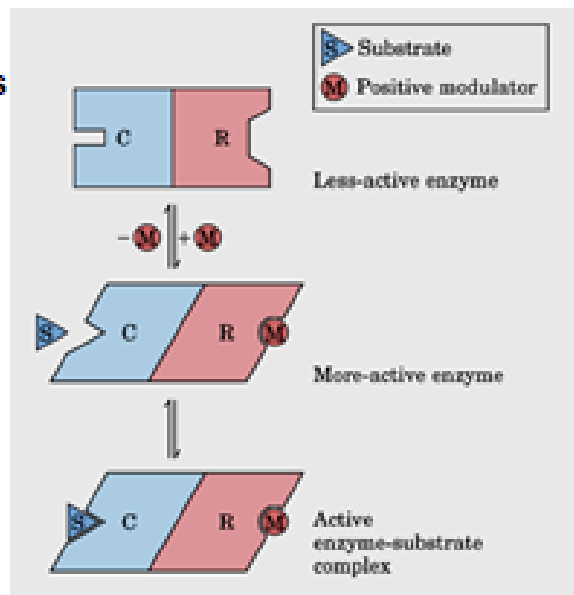
Enzimas alostéricas

Enzimas alostéricas são aquelas que possuem "outras formas" ou conformações induzidas pela ligação de moduladores.

Inibitórios
(negativos)

estimulatórios
(positivos)

- ✓ Possuem sítios reguladores para a ligação do modulador específico
- ✓ Maiores e mais complexas que as não-alostéricas (mais que uma cadeia polipeptídica)
- ✓ Sofrem modificações conformacionais em resposta à ligação do modulador.



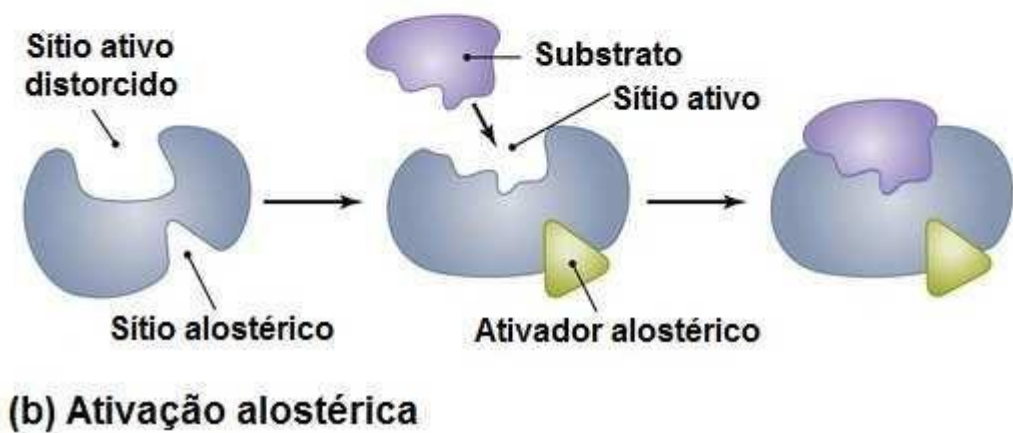
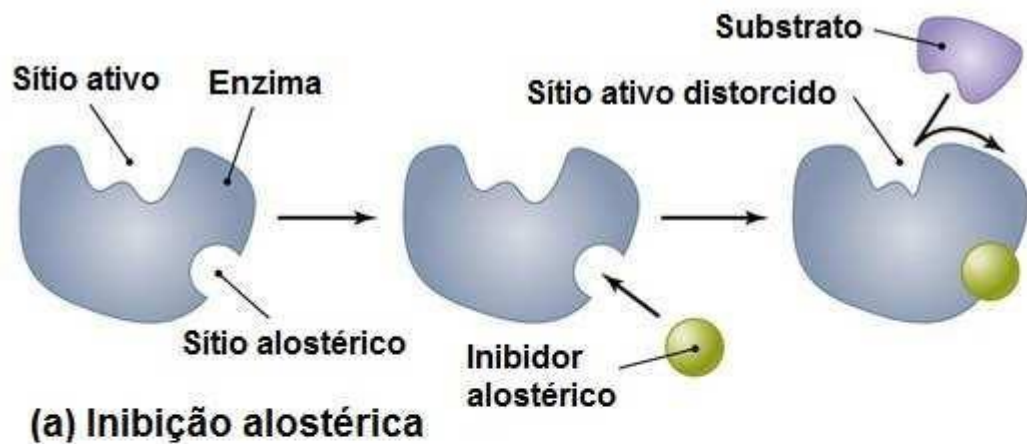
Modulador alostérico ≠ Inibidor incompetitivo

Induz mudança conformacional

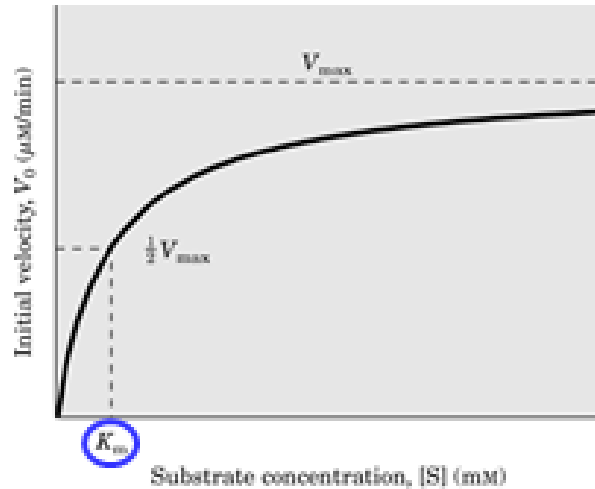
Não induz mudança conformacional

Homotrópicas: modulador é o próprio substrato (hemoglobina)

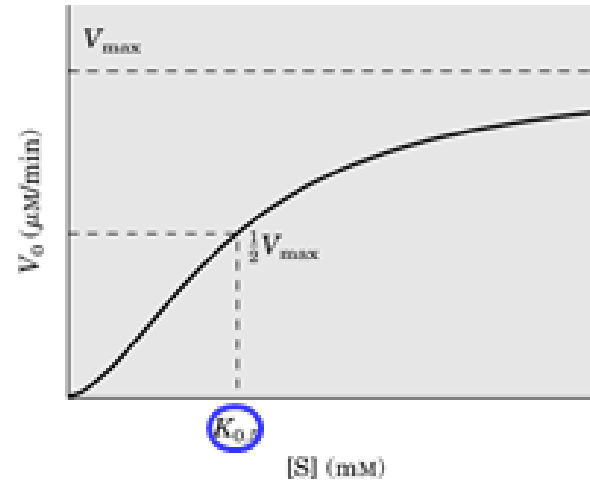
Heterotrópicas: modulador ≠ substrato



Regulação da atividade enzimática



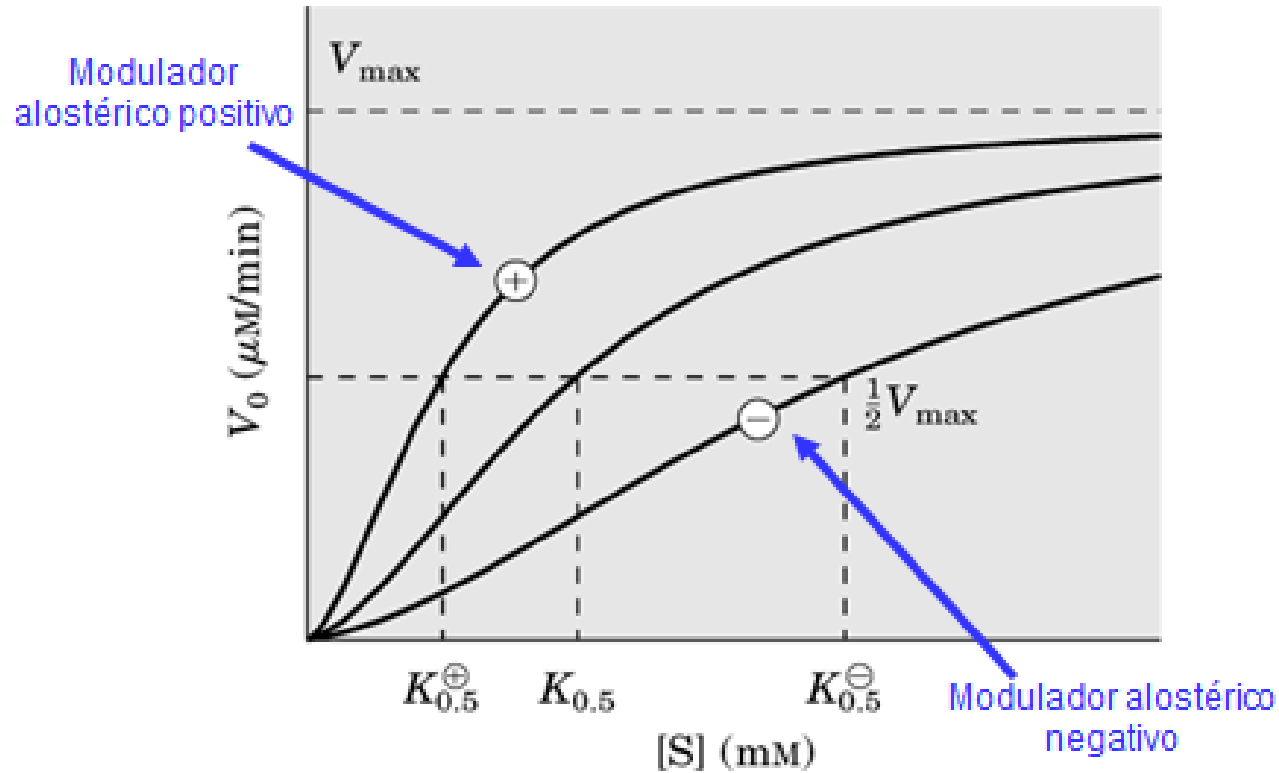
Enzima michaeliana



Enzima alostérica

Cinética sigmoide \rightarrow reflete interações cooperativas entre subunidades proteicas

Regulação da atividade enzimática

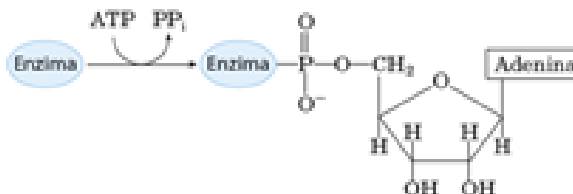


Enzimas regulatórias podem sofrer modificações covalentes

Fosforilação
(Tyr, Ser, Thr, His)



Adenilação
(Tyr)



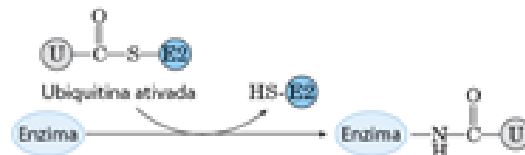
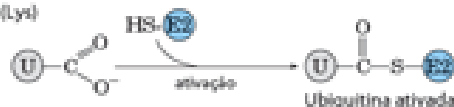
Acetilação
(Lys, α-amino (aminoterminal))



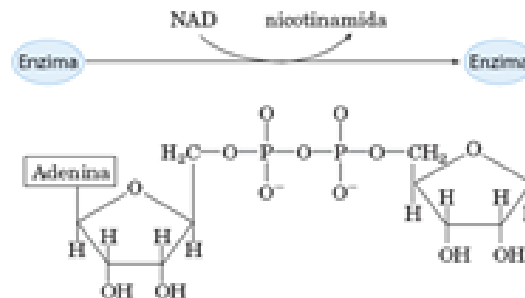
Miristoilação
(α-amino (aminoterminal))



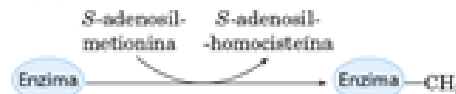
Ubiquitinação
(Lys)



ADP-ribosilação
(Arg, Gln, Cys, difarmida - uma His modificada)



Metilação
(Glu)



Enzimas regulatórias podem sofrer modificações covalentes

Ex.: regulação da enzima **glicogênio fosforilase** pela adição ou remoção de grupo fosfato da enzima

