

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Sumário

ENZIMAS: Cinética enzimática

- As reacções catalisadas por enzimas exibem uma cinética de saturação (Curvas de saturação hiperbólicas e sigmoidais)
- Esquema cinético simples para uma reacção enzimática.
- Modelo de Michaelis-Menten
 - Hipóteses restritivas (condição de velocidade inicial, estado estacionário, rápido equilíbrio)
 - Expressão matemática do modelo
 - Significado físico dos parâmetros do modelo (V_M e K_M)
 - Determinação experimental dos parâmetros V_M e K_M
- Enzimas cataliticamente perfeitas

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Cinética enzimática

- **Inibição reversível e irreversível**

Modelos cinéticos para inibição reversível: inibição competitiva, incompetitiva e não-competitiva. Referência ao Modelo geral de Webb. Determinação dos parâmetros cinéticos dos modelos.

- **Efeito do pH na actividade enzimática**

Como escolher um modelo de pH adequado aos resultados experimentais?

Modelos cinéticos para enzimas com 1 e 2 graus de protonação.

Gráficos das fracções molares das várias formas em função do pH. Estimativa dos valores de pKa do modelo.

- **Cinética enzimática a dois substratos**

Notação de Cleland. Mecanismo sequencial ordenado e sequencial ao acaso.

Mecanismo não sequencial (Ping Pong)

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Como vou obter velocidades no laboratório?

- Medindo o aparecimento do produto em função do tempo

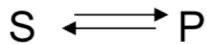
$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

- Medindo o desaparecimento do substrato em função do tempo

$$v = -\frac{d[S]}{dt}$$

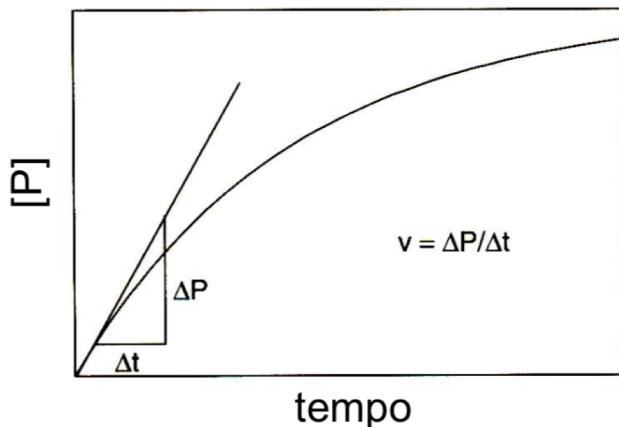
Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Curvas de evolução temporal : concentração P vs tempo



velocidade instantânea:

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$



As curvas de evolução são, normalmente lineares até $\approx 20\%$ de conversão de substrato em produto.

A velocidade da reacção (declive das curvas de evolução) diminui com o tempo até se atingir o equilíbrio:

- i) A reacção inversa torna-se cada vez mais importante com a acumulação do produto.

No equilíbrio a velocidade de conversão de S em P iguala a velocidade de conversão de P em S e $v=0$.

- ii) A enzima torna-se instável no decurso da reacção;
- iii) O grau de saturação da enzima pelo substrato diminui à medida que o substrato é consumido;
- iv) Os produtos da reacção inibem a enzima;
- iv) Qualquer combinação dos factores anteriores.

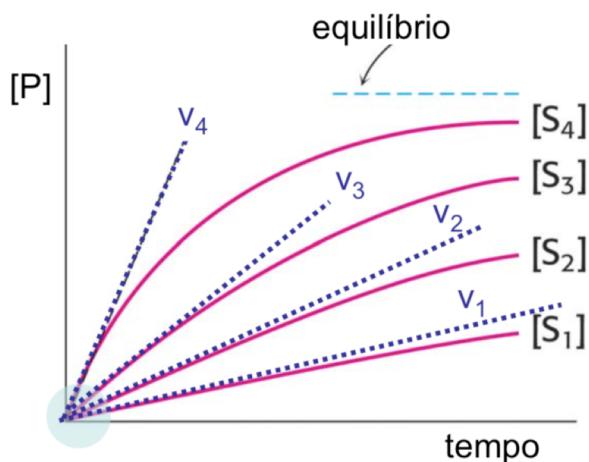


velocidades iniciais, v_0

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Determinação experimental da velocidade inicial

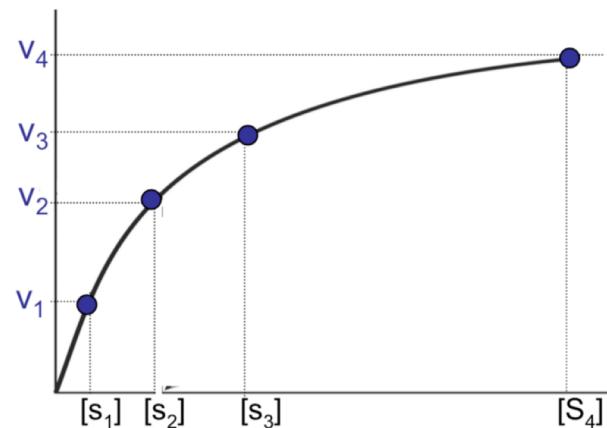
[P] em função do tempo
(exponencial)



Determinação experimental da velocidade inicial: $v_0 = (d[P]/dt)_0$

Determinam-se as tangentes na origem das curvas $[P]$ vs tempo, para diferentes valores de concentração de substrato. A concentração total de enzima (E_T) tem que ser constante.

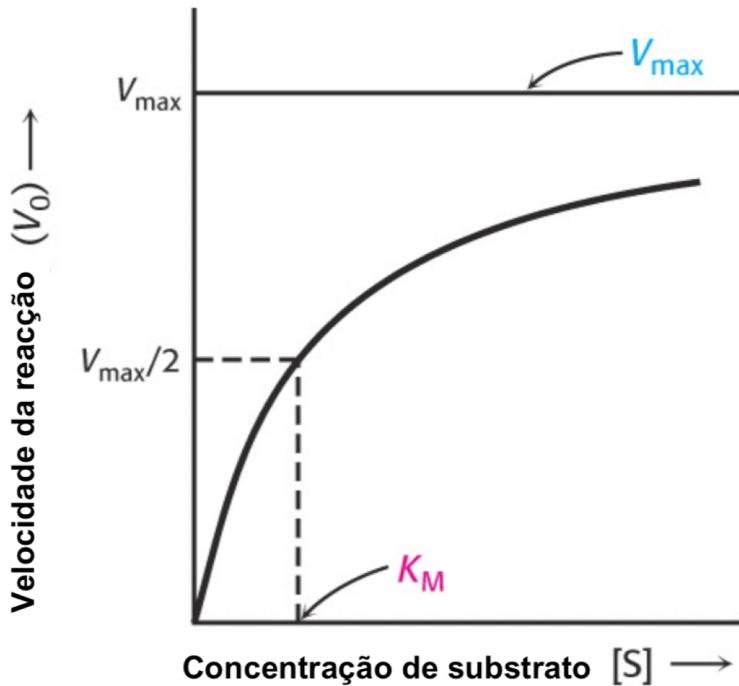
v_o em função de [substrato]
(Hipérbole)



$v_o = f ([S]_0)$ exibe saturação

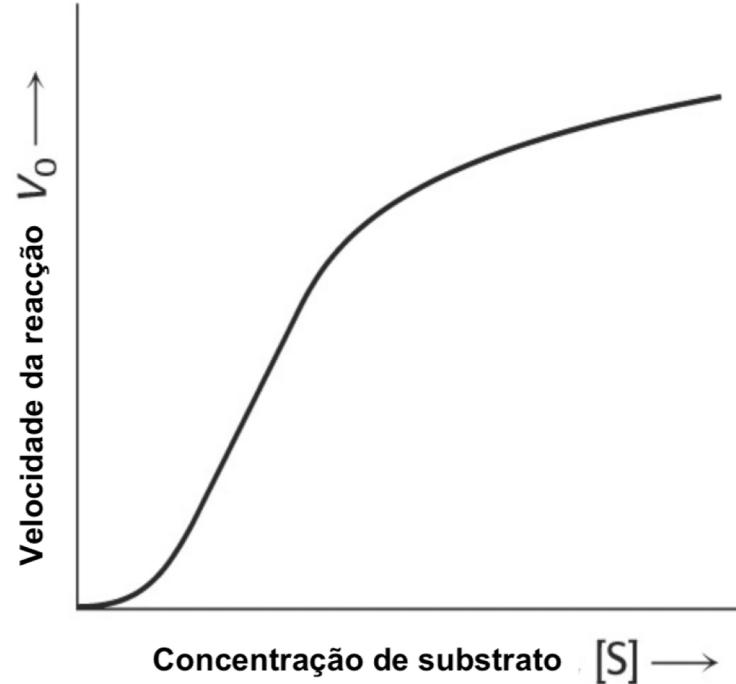
Chapter 8: Enzymatic Kinetics

As reacções catalisadas por enzimas exibem uma cinética de saturação



$V_0=f([S])$ curva Hiperbólica

Enzima Michaeliana
(obedece à cinética de Michaelis-Menten)



$V_0=f([S])$ curva Sigmoidal

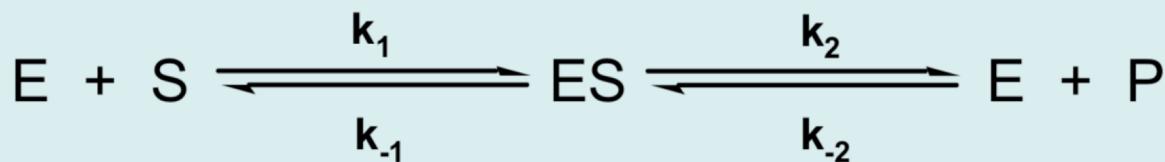
Enzima Allostérica

Nesta disciplina só vamos estudar a cinética de enzimas Michaelianas !

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Uma cinética de saturação implica a existência de um complexo enzima-substrato

Esquema cinético simples para uma reacção enzimática



- **4 variáveis:** 4 concentrações: [S], [P], [E] e [ES] (unidades M)
- **4 parâmetros:** 4 constantes de velocidade:
2 constantes de primeira ordem (k_{-1} , e k_2) (unidades: s^{-1})
2 constantes de segunda ordem (k_1 e k_{-2}) (unidades: $M^{-1} s^{-1}$)
Nota: Só se podem comparar constantes com as mesmas unidades (para comparar as constantes é necessário transformar as constantes de segunda ordem em constantes de pseudo-primeira ordem: $k_1 [S]$ e $k_{-2} [P]$)
- **4 equações diferenciais** descrevem a variação temporal das 4 espécies
(Rever noções de cinética química!)
- **2 equações de balanço de massa:**
substrato: $[S_o] = [S] + [ES] + [P]$
enzima: $ET = [E] + [ES]$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Para simplificar a análise vamos considerar duas hipóteses restritivas:

1 – condição de velocidade inicial (v_0)

as velocidades são determinadas a partir da tangente na origem da curva $[P]$ vs. tempo. Nestas condições pode-se desprezar a reacção de conversão de produto em ES porque a concentração de produto é muito baixa.

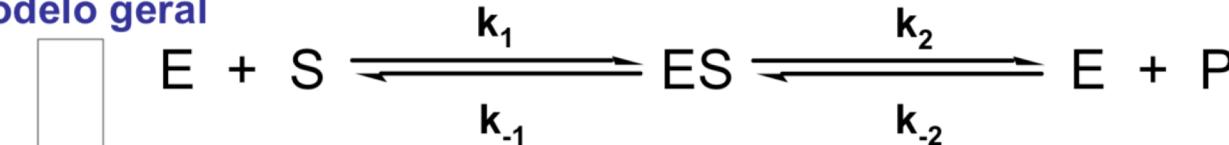
2 – Hipótese de estado estacionário ($[S_0] \ggg ET$)

Se a concentração de substrato for muito superior à concentração de enzima, a concentração do intermediário ES é sempre muito baixa e pode considerar-se constante ao longo do tempo ($d[ES]/dt = 0$).

No laboratório é necessário garantir que as experiências são feitas nestas condições!

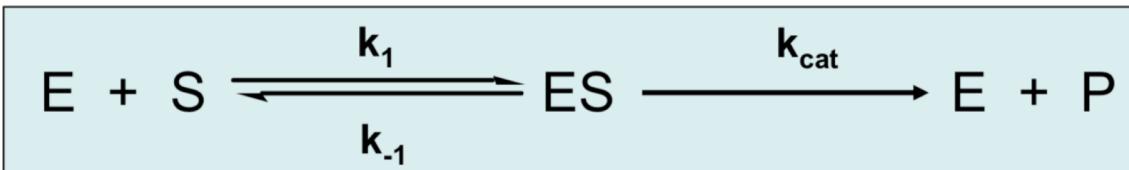
Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Modelo geral



Hipóteses restritivas: Condição de velocidade inicial ($[P] \approx 0$)
e hipótese de estado estacionário ($d[ES]/dt=0$)

Modelo cinético de Michaelis-Menten



Equações simplificadas:

Equações diferenciais:

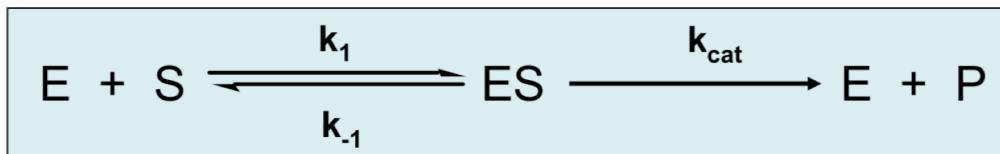
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} [ES] \quad \text{velocidade inicial} \\ \frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - (k_{-1} [ES] + k_{cat} [ES]) = 0 \end{array} \right.$$

Balanço de massas:

$$\left\{ \begin{array}{l} [S]_0 = [S] \quad (\text{porque } [S] \gg E_T \text{ e } [P] \approx 0) \\ E_T = [E] + [ES] \end{array} \right.$$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Dedução da equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten



Objectivo:

Expressar v_0 em função dos parâmetros do modelo ($k_1, k_{-1}, k_{\text{cat}}$) e de quantidades conhecidas ($[S_0]$ e E_T).

Vamos utilizar a expressão da velocidade inicial, a hipótese do estado estacionário e as equações de balanço de massa da enzima e do substrato.

$$\left\{ \begin{array}{l} v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_{\text{cat}}[\text{ES}] \\ \frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - (k_{-1} + k_{\text{cat}})[\text{ES}] = 0 \\ ET = [\text{E}] + [\text{ES}] \\ [S_0] = [S] \end{array} \right.$$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Dedução da equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = k_{cat}[ES]$$



$$\begin{cases} k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES] \\ [S] = [S]_0 \\ E_T = [E] + [ES] \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} [E] = [ES] \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \frac{1}{[S]_0} \\ E_T = [ES] \frac{K_M}{[S]_0} + [ES] \end{cases} \longrightarrow [ES] = \frac{E_T}{1 + \frac{K_M}{[S]_0}} \longrightarrow [ES] = \frac{E_T [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Substituindo na expressão de v_0

definindo

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

$$V_M = k_{cat}E_T$$

$$v_0 = \frac{k_{cat}E_T[S]_0}{K_M + [S]_0}$$



$$v_0 = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Equação de Michaelis-Menten

K_M constante de Michaelis-Menten

V_M velocidade máxima

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten: hipérbole rectangular

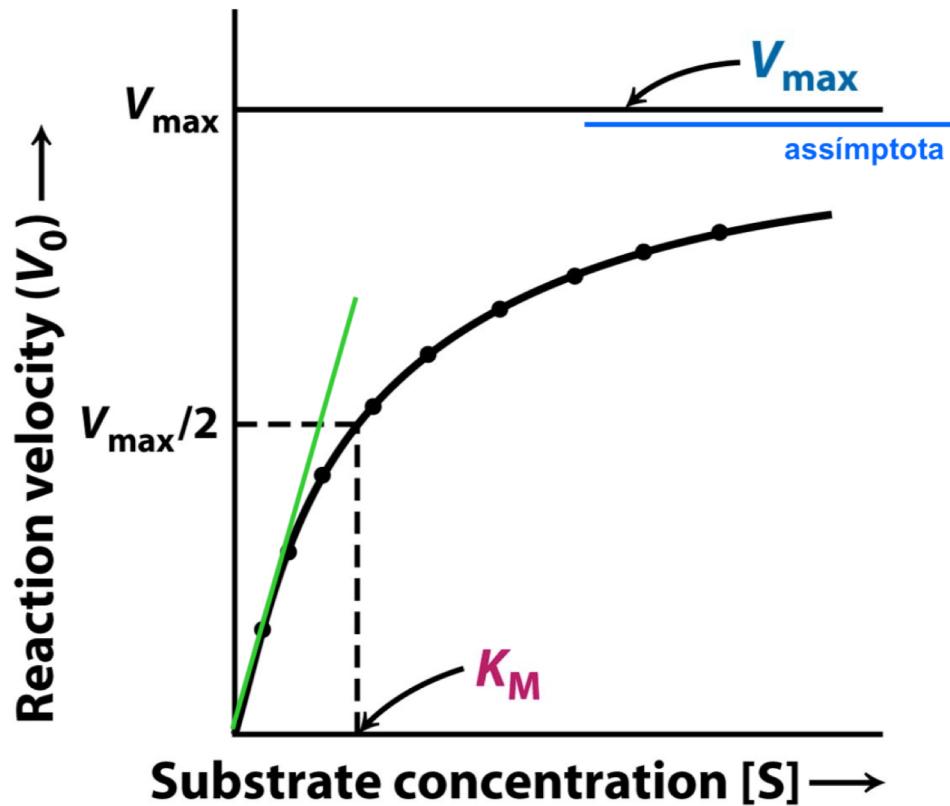
$$v_0 = \frac{V_M [S]_o}{K_M + [S]_o}$$

K_M unidades de concentração
 V_M unidades de velocidade

Reacção de 1^a ordem

$$[S]_o \ll K_M \quad v_o = (V_M/K_M) [S]_o$$

Reacção de ordem zero
 $[S]_o \gg K_M \quad v_o = V_M$



Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Inibição irreversível

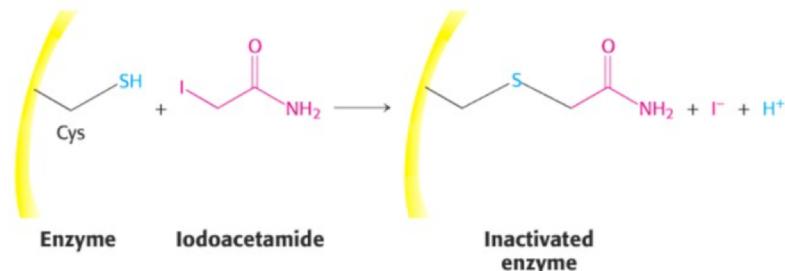
O inibidor liga-se fortemente à enzima e dissocia-se muito lentamente.

Alguns inibidores irreversíveis são drogas potentes.

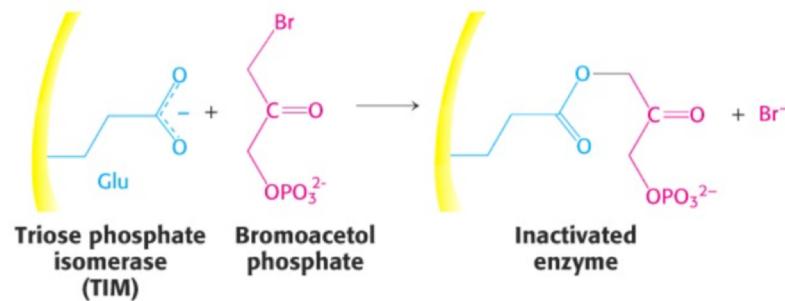
Ex. penicilina (modifica covalentemente a enzima transpeptidase), aspirina (inibe a enzima ciclooxigenase).

Podem utilizar-se inibidores irreversíveis para determinar quais são os aminoácidos do centro activo importantes para a catálise:

Reagentes específicos para certos grupos funcionais que podem estar no centro activo (Cis-SH, Ser-OH, ...)(ex. iodoacetamida, DIPF)



Marcadores de afinidade semelhantes ao substrato mas ligam-se irreversivelmente (ex. bromoacetol fosfato, TPCK).



Inibidores suicidas substratos modificados que ao reagir dão origem a um intermediário que inactiva irreversivelmente a enzima.

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Inibição reversível

Caracteriza-se por uma rápida dissociação do complexo enzima-inibidor.

Inibição competitiva: o inibidor é estruturalmente semelhante ao substrato e liga-se no centro activo impedindo a ligação do substrato.

Um inibidor competitivo diminui a velocidade de catálise porque reduz a proporção de moléculas de enzima ligadas ao substrato. É possível reverter este tipo de inibição aumentando a concentração do substrato.

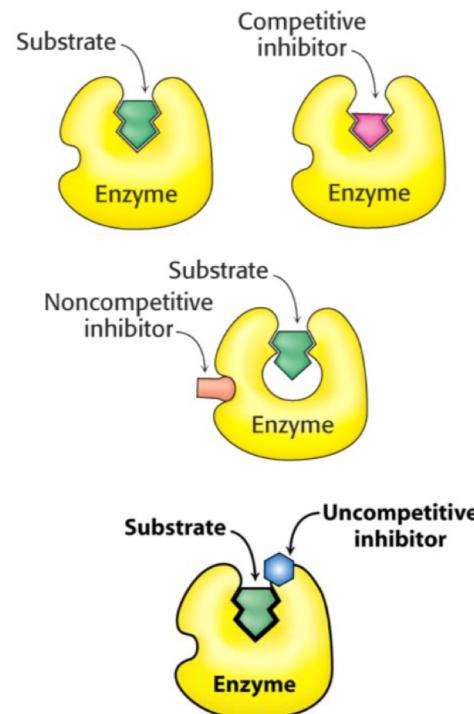
Inibição não-competitiva: inibidor e substrato podem estar simultâneamente ligados à enzima porque se ligam a sítios diferentes.

Um inibidor não competitivo diminui a velocidade de catálise porque diminui o número de *turnover* (k_{cat}).

Inibição incompetitiva: o inibidor incompetitivo só se liga a uma molécula de enzima que tem substrato ligado.

Um inibidor incompetitivo afecta simultâneamente a velocidade de catálise e a afinidade da enzima para o substrato.

Inibição mista: Situações em que há combinações dos mecanismos anteriores.

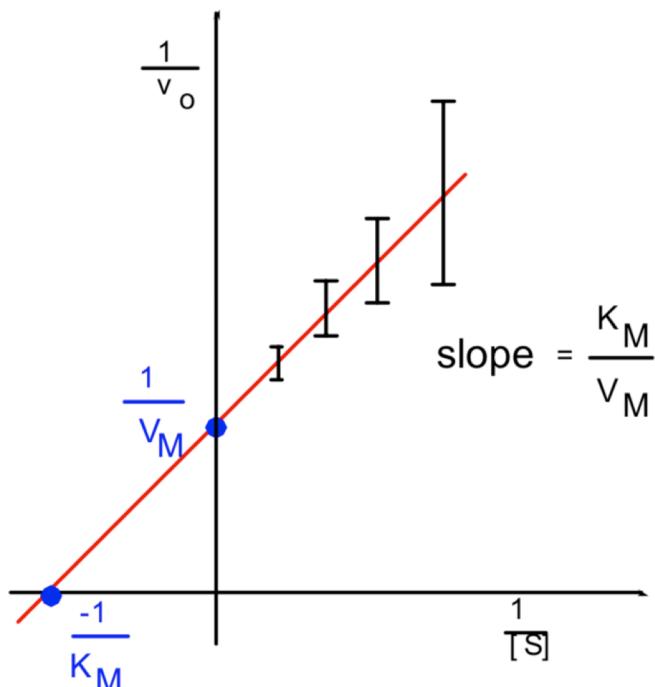


Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Determinação experimental de V_M e K_M

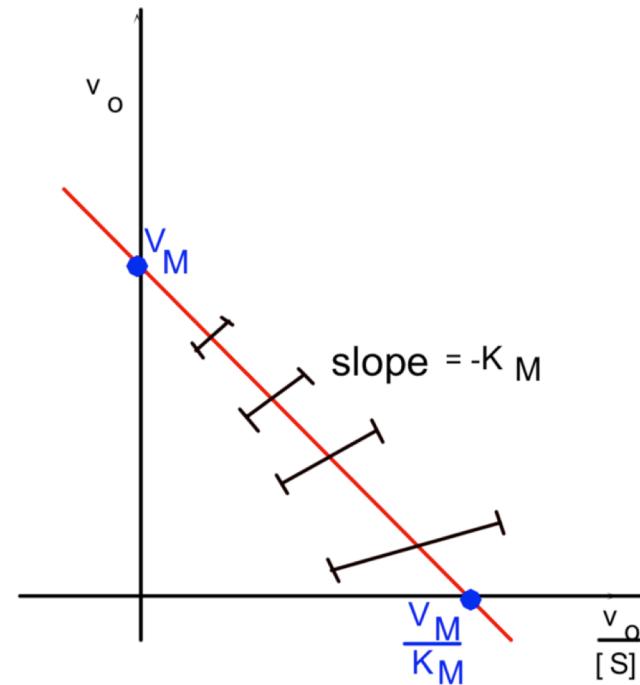
Linearizações da equação de Michaelis-Menten

A - LineweaverBurk



$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_M} \frac{1}{[S]_o} + \frac{1}{V_M}$$

B - Eadie Hofstee

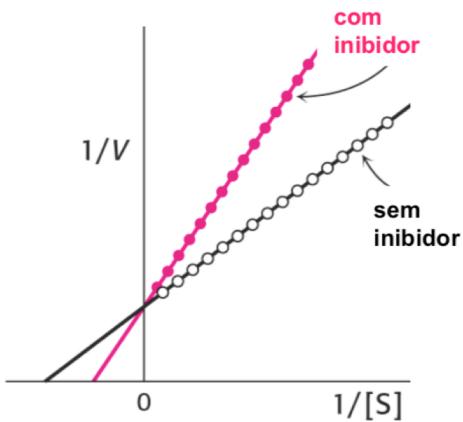


$$v_o = -K_M \frac{v_o}{[S]_o} + V_M$$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Representação de Lineweaver-Burk para os 3 tipos de inibição reversível

Inibição competitiva

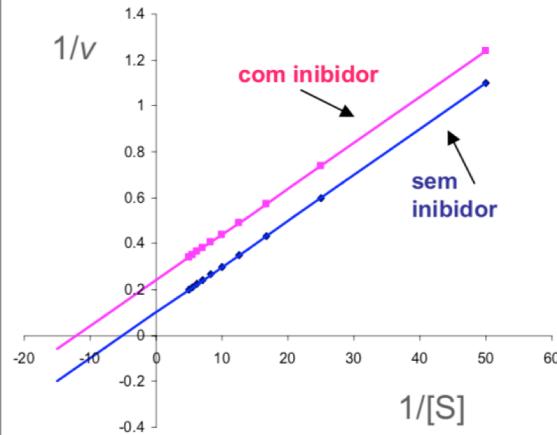


Rectas cruzam no eixo dos YY

$$V'_M = V_M$$

$$K'_M = K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Inibição incompetitiva

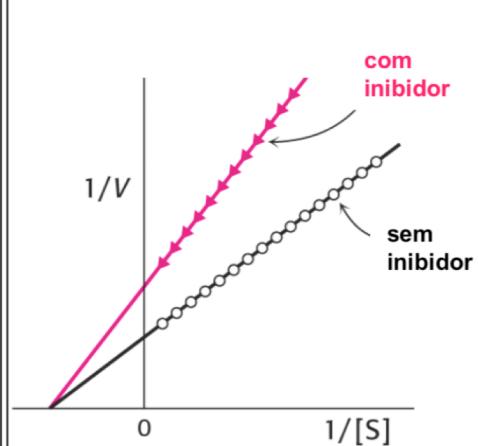


Rectas paralelas

$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$$K'_M = \frac{K_S}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

Inibição não competitiva



Rectas cruzam no eixo dos XX

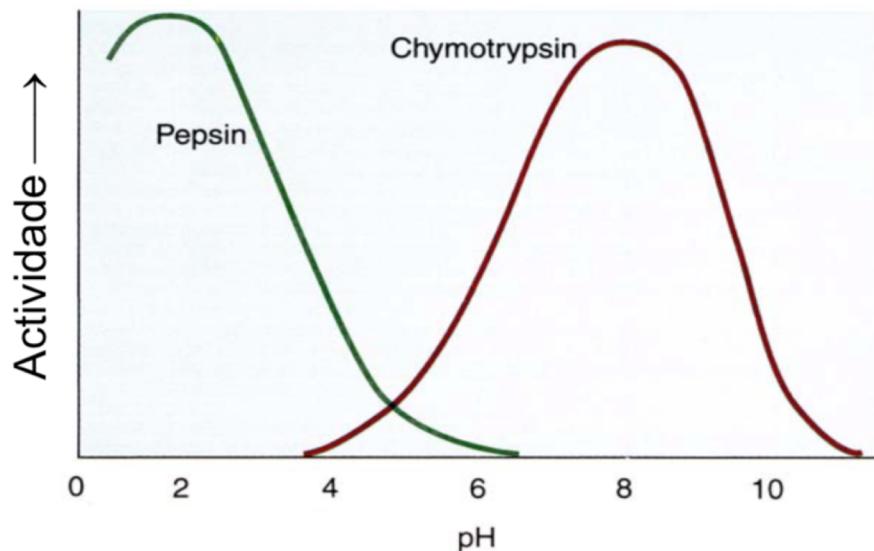
$$V'_M = \frac{V_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$$K'_M = K_S$$

Efeito do pH na actividade enzimática

As proteínas são sensíveis ao pH.

A maior parte das enzimas apenas está activa numa gama relativamente estreita de valores de pH.



Efeitos do pH na actividade enzimática:

- Ligação do substrato à enzima
- Actividade catalítica
- Ionização do substrato
- Estrutura da proteína (desnaturação a pH extremos)

O estudo da dependência da actividade com o pH pode dar informação acerca dos valores de pKa dos aminoácidos do centro activo.

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

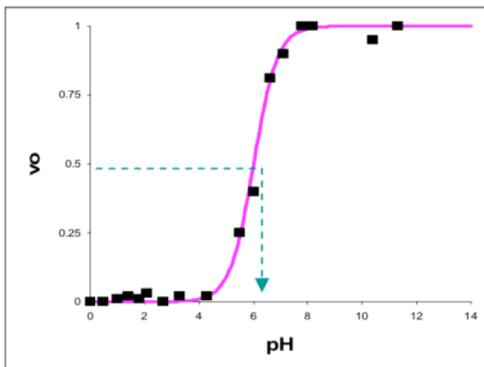
Modelação matemática do efeito do pH na cinética enzimática

- modelos com 1 grau de protonação
- modelos com 2 graus de protonação

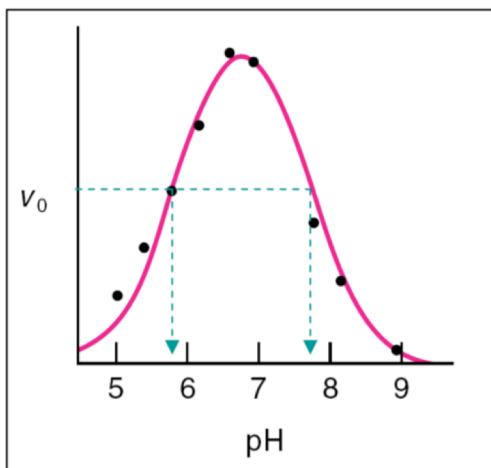
Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Como escolher um modelo de pH ?

O número de parâmetros de um modelo nunca deve ser superior ao necessário para explicar os resultados experimentais.



Curvas de actividade deste tipo necessitam apenas de um grupo ionizável: **modelo com 1 grau de protonação** (dois pK_a : um para a enzima livre e outro para a enzima ligada a S). Se a actividade for elevada a pH baixo a forma da enzima activa é a forma protonada (EHS), se a actividade for elevada a pH básico a forma activa da enzima é a forma desprotonada (ES).



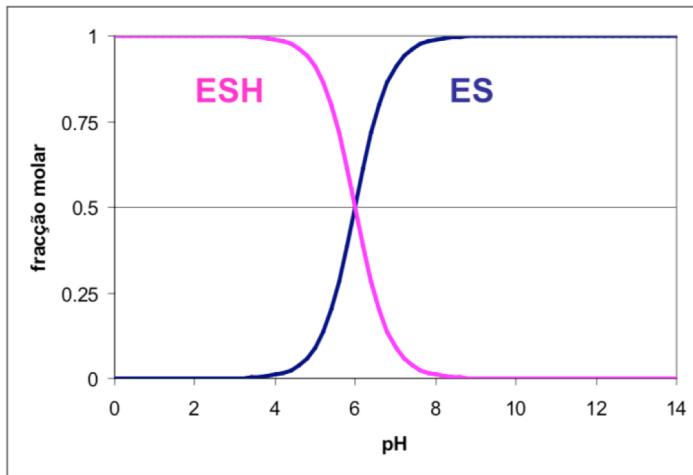
Curvas de actividade deste tipo necessitam de dois grupos ionizáveis: **modelo com 2 graus de protonação** (4 pK_a : dois para a enzima livre e dois para a enzima ligada a S). Neste caso apenas a forma com um grau de protonação intermédio dá origem a produto.

EH_2S

EHS

ES

Chapter 8: Enzymatic Kinetics



As curvas de actividade com o pH reflectem as populações das espécies que dão origem a produto

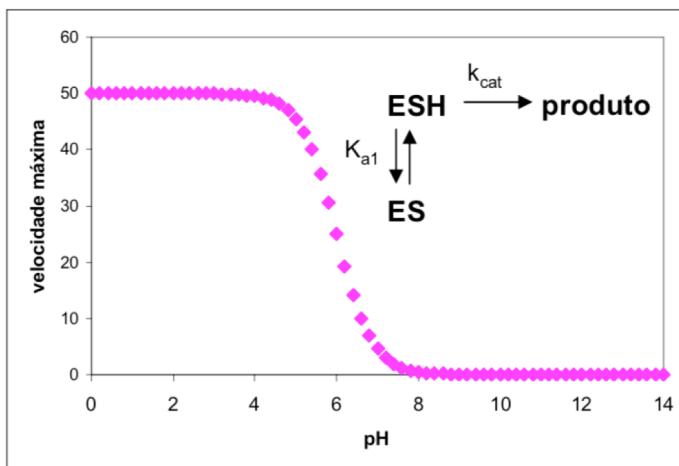
Modelos com 1 grau de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \gg K_s$

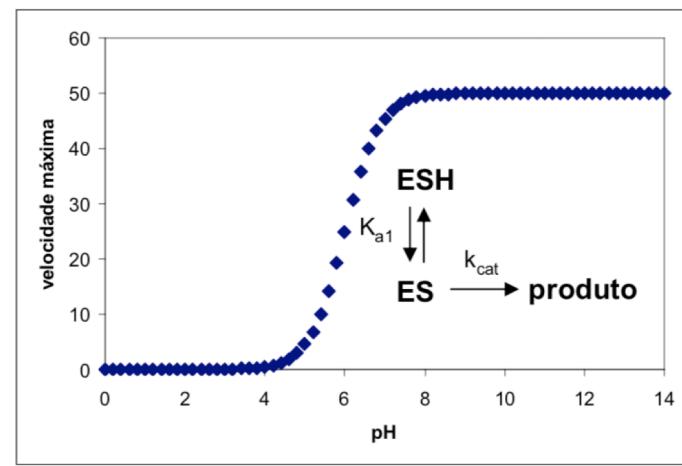
Parâmetros do modelo:

K_{a1} (constante de equilíbrio), nesta simulação $pK_{a1}=6$

k_{cat} (constante de velocidade)



Apenas a espécie protonada dá produto



Apenas a espécie desprotonada dá produto

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Cálculo das populações

Modelo com 1 grau de protonação

Condições de substrato saturante

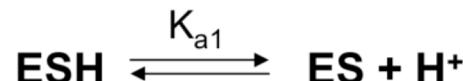
$$E_T = [ES] + [ESH]$$

$$E_T = [ES] + [ES] \frac{[H^+]}{K_{a1}}$$

$$E_T = [ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)$$

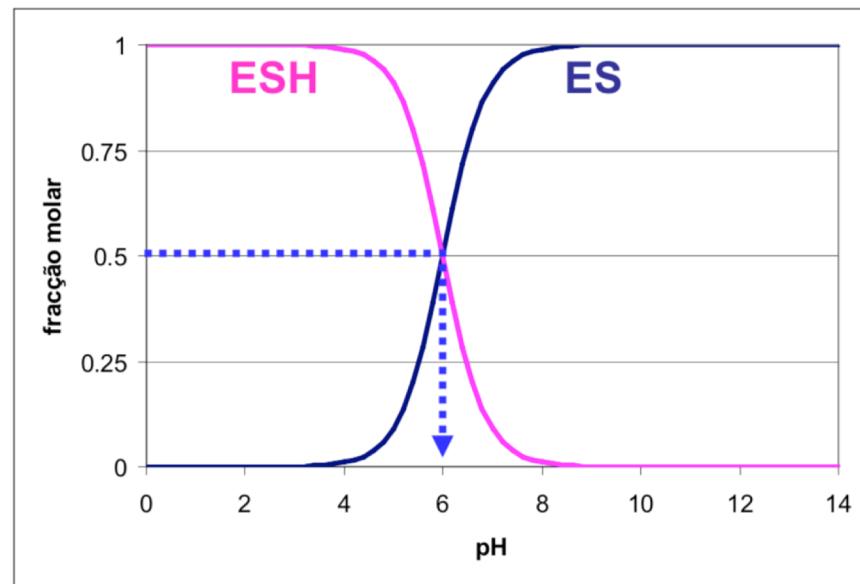
$$\chi_{ES} = \frac{[ES]}{E_T} = \frac{[ES]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)}$$

$$\chi_{ES} = \frac{[ESH]}{E_T} = \frac{[ES] \frac{[H^+]}{K_{a1}}}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]}{K_{a1}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} \right)}$$



$$K_{a1} = \frac{[ES][H^+]}{[ESH]}$$

A constante de acidez
é uma constante de
dissociação



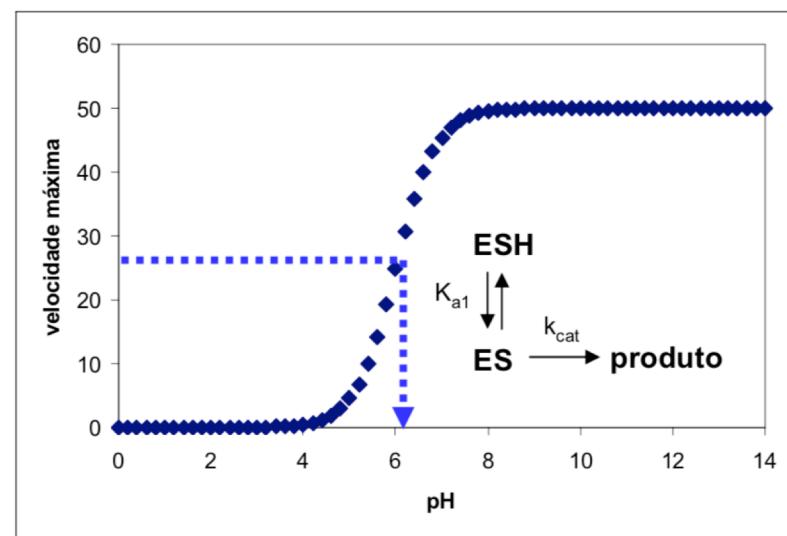
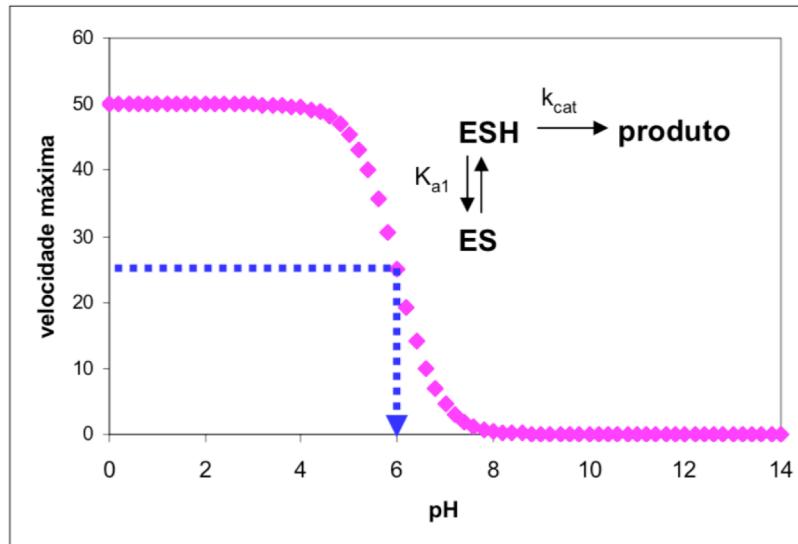
Quando $[ESH]=[ES]$ o valor $pH=pK_{a1}$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Determinação do valor de pK_{a1} a partir das curvas de V_M' em função do pH

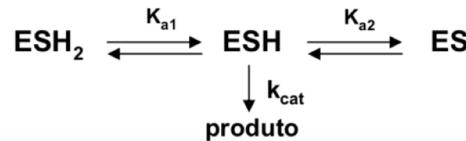
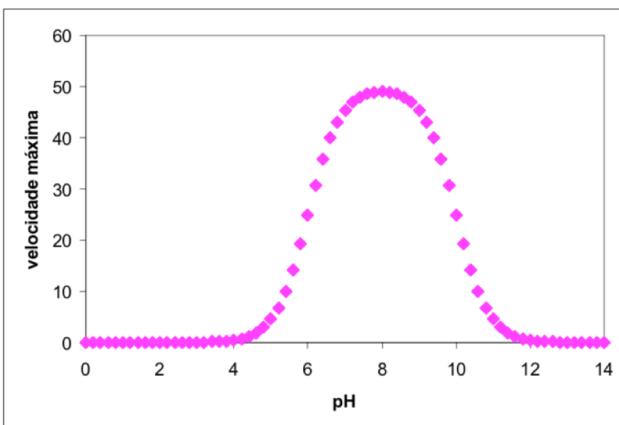
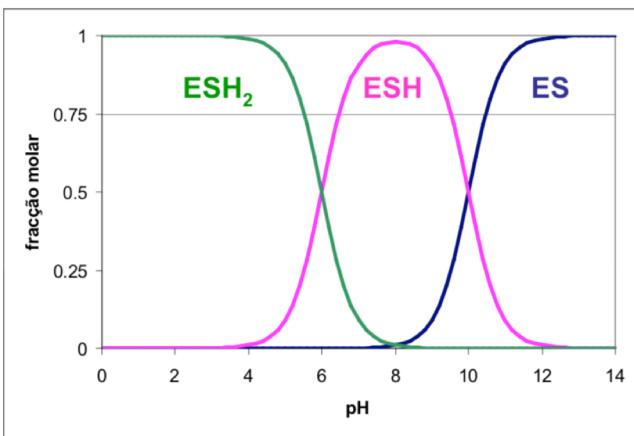
Modelos com 1 grau de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \gg K_S$



Quando $[ESH] = [ES]$ o valor de V_M' é igual a metade do seu valor máximo, porque apenas uma destas espécies dá origem a produto. Nesse ponto $pH = pK_{a1}$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics



As curvas de actividade com o pH reflectem as populações das espécies que dão origem a produto

Modelos com 2 graus de protonação

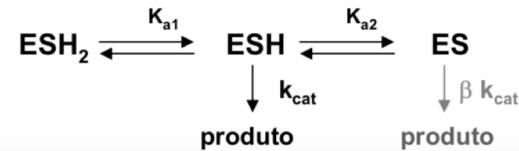
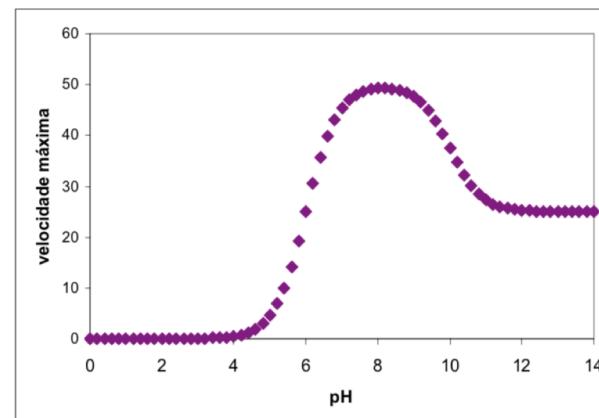
em situação de substrato saturante $[S] \gg K_s$

Parâmetros do modelo:

K_{a1} ; K_{a2} (constantes de equilíbrio), nesta simulação
 $pK_{a1}=6$ e $pK_{a2}=10$

k_{cat} (constante de velocidade)

β (coeficiente adimensional)



Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Cálculo das populações

Modelo com 2 graus de protonação

Condições de substrato saturante

$$E_T = [ES] + [ESH] + [ESH_2]$$

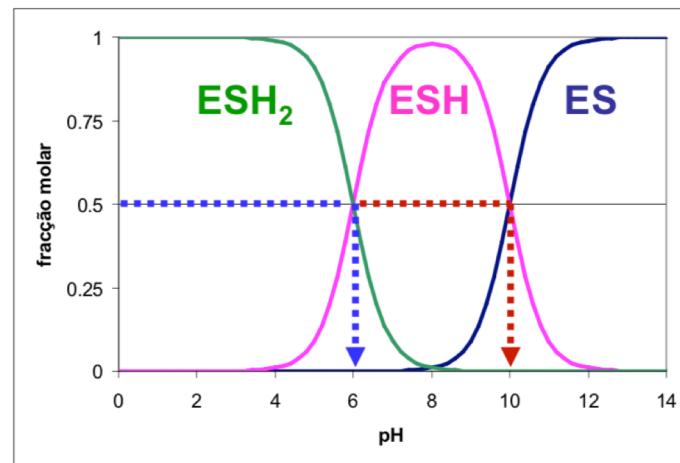
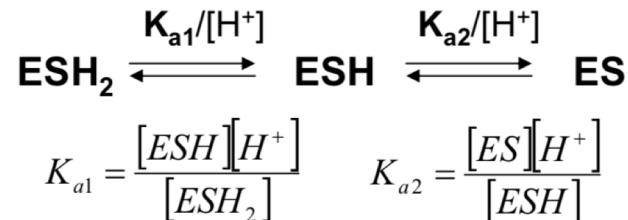
$$E_T = [ES] + [ES] \frac{[H^+]}{K_{a2}} + [ES] \frac{[H^+] [H^+]}{K_{a2} K_{a1}}$$

$$E_T = [ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)$$

$$\chi_{ES} = \frac{[ES]}{E_T} = \frac{[ES]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)}$$

$$\chi_{ESH} = \frac{[ESH]}{E_T} = \frac{[ES] \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]}{K_{a2}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)}$$

$$\chi_{ESH_2} = \frac{[ESH_2]}{E_T} = \frac{[ESH_2]}{[ES] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)} = \frac{\frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1} K_{a2}} \right)}$$



Quando

$[ESH_2] = [ESH]$ o valor $pH = pK_{a1}$

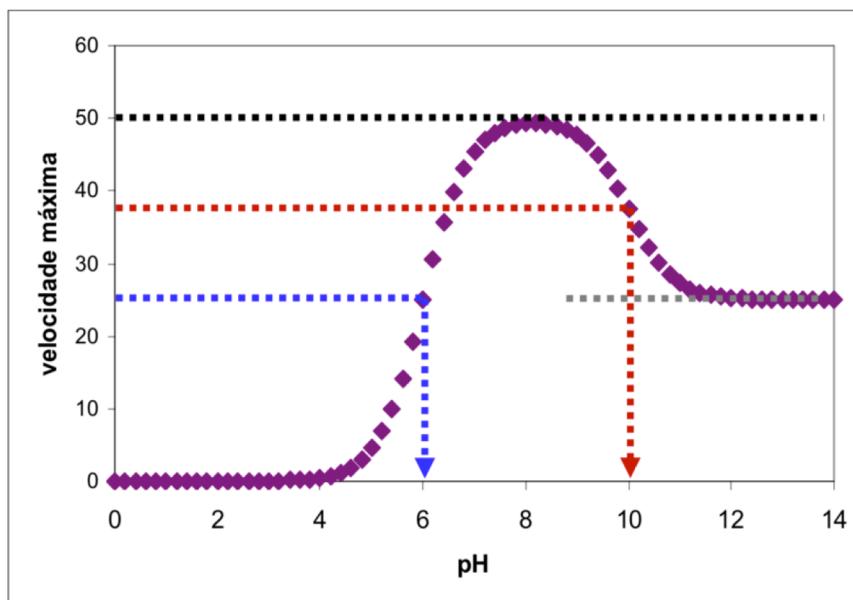
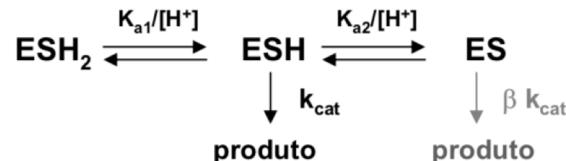
$[ESH] = [ES]$ o valor $pH = pK_{a2}$

Chapter 8: Enzymatic Kinetics

Determinação dos valores de pK_a e de β a partir das curvas de V_M' em função do pH

Modelos com 2 graus de protonação

em situação de substrato saturante $[S] \ggg K_s$



Para $pH >> pK_{a_2}$
 $[ES] = 1$ e por isso
 $V_M' = \beta V_M$
 Neste exemplo
 $\beta = 0.5$

Quando $[ESH_2] = [ESH]$ o valor de V_M' é igual a metade do seu valor máximo, porque apenas a espécie ESH dá origem a produto. Nesse ponto $pH = pK_{a1}$

Quando $[ESH] = [ES]$ o valor de V_M' é igual $0.5 V_M + 0.5 \beta V_M$, porque a espécie ESH dá origem a produto com k_{cat} e ES dá produto com βk_{cat} . Nesse ponto $pH = pK_{a2}$.

Chapter 8: Enzymatic Kinetics