

CAPÍTULO 8

Enzimas

Existem duas condições fundamentais para a vida. Uma delas é que o organismo vivo deve ser capaz de se auto-replicar (tópico que será visto na Parte IV deste livro). A segunda é que o organismo deve ser capaz de catalisar reações químicas eficiente e seletivamente. A importância fundamental da catálise pode surpreender alguns estudantes iniciantes em bioquímica, mas é fácil ilustrá-la. Como descrito no Capítulo 1, os sistemas vivos utilizam energia do meio ambiente. Os seres humanos, por exemplo, consomem quantidades substanciais de sacarose — o açúcar comumente usado — como uma espécie de combustível, na forma de alimentos açucarados, bebidas, ou como açúcar. A conversão da sacarose em CO_2 e H_2O na presença de oxigênio é um processo altamente exergônico, que libera energia livre que pode ser utilizada para o ato de pensar, mover, sentir e ver. Entretanto, um saco de açúcar pode ser armazenado durante vários anos sem ser transformado em CO_2 e H_2O . Embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento! Contudo, quando a sacarose é consumida por uma pessoa (ou qualquer outro organismo), ela libera sua energia química em segundos. A diferença é a catálise. Sem a catálise, as reações químicas necessárias para sustentar a vida não ocorrem em uma escala de tempo útil.

Voltaremos, agora, nossa atenção para os catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos: as enzimas, as mais notáveis e altamente especializadas proteínas. As enzimas apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de uma maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não-biológicos apresentam tais propriedades.

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Agindo em seqüências organizadas, elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia química é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples. Devido à ação das enzimas reguladoras, as vias metabólicas são altamente coordenadas de forma a produzir uma atuação harmoniosa das muitas diferentes atividades necessárias para manter a vida.

O estudo das enzimas tem uma grande importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer uma deficiência ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Outras condições anormais também podem ser causadas pela excessiva atividade de uma enzima. Medidas da atividade de enzimas no plasma sanguíneo, eritrócitos ou amostras de tecido são importantes no diagnóstico de várias doenças. Muitas drogas exercem seu efeito biológico por meio de interações com as enzimas. As enzimas tornaram-

se importantes ferramentas práticas não apenas na medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura.

Iniciaremos este capítulo com a descrição das propriedades das enzimas e dos princípios fundamentais de seu poder catalítico. Em seguida, faremos uma introdução à cinética enzimática, uma disciplina que fornece a maior parte dos fundamentos para qualquer discussão sobre enzimas. Exemplos específicos de mecanismos enzimáticos serão então mostrados, ilustrando os princípios introduzidos anteriormente. Finalmente, discutiremos as enzimas reguladoras.

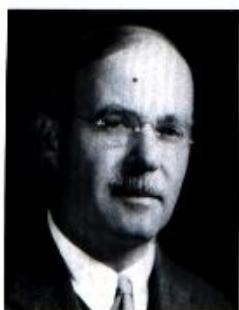
Uma Introdução às Enzimas

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final de 1700, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago. Em 1800 as pesquisas continuaram com o estudo da conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células vivas de levedura, uma hipótese chamada vitalismo, que prevaleceu por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedura podiam fermentar o açúcar até álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam funcionando mesmo quando removidas das células. Frederick W. Kühne denominou tais moléculas de enzimas. À medida que as noções do vitalismo da vida foram refutadas, o isolamento de novas enzimas e a investigação das suas propriedades propiciaram o progresso da ciência da bioquímica.

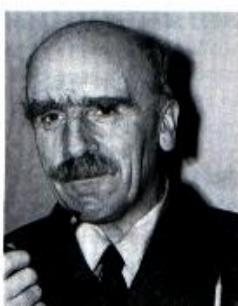


Eduard Buchner
(1860-1917)

O isolamento e a cristalização da urease, em 1926, por James Sumner, propiciaram um significante avanço nos estudos iniciais acerca das enzimas. Sumner demonstrou que os cristais de urease consistiam inteiramente de proteína e postulou que todas as enzimas são proteínas. Devido à falta de outros exemplos, essa premissa permaneceu controvertida por algum tempo. So-



James Sumner
(1887-1955)



J.B.S. Haldane
(1892-1964)

mente em 1930, após John Northrop e Moses Kunitz terem cristalizado a pepsina, a tripsina e outras enzimas digestivas e concluído que elas também eram proteínas, é que a conclusão de Sumner foi completamente aceita. Durante esse período, J.B.S. Haldane escreveu um tratado intitulado "Enzimas". Embora a natureza molecular das enzimas não estivesse completamente elucidada, Haldane fez a extraordinária sugestão de que as interações fracas que se estabelecem entre a enzima e o seu substrato poderiam ser usadas para distorcer a molécula do substrato e catalisar a reação. Esse conhecimento representa o cerne da compreensão atual da catálise enzimática.

No final do século XX, a pesquisa com enzimas que catalisam as reações do metabolismo celular foi intensa. Esse fato levou à purificação de milhares de enzimas, à elucidação da estrutura molecular e do mecanismo químico da ação de centenas delas e a uma compreensão geral de como as enzimas funcionam.

A maioria das enzimas são proteínas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas (Capítulo 26), todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protética nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, a atividade catalítica geralmente é destruída. Se uma enzima é quebrada em seus aminoácidos constituintes, a sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim, as estruturas protéticas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a sua atividade catalítica.

As enzimas, como outras proteínas, têm pesos moleculares que variam de cerca de 12.000 até mais de 1 milhão. Algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico, além de seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem um componente químico adicional chamado de **co-fator** — um ou mais íons inorgânicos, tal como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} (Tabela 8-1), uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica chamada de coenzima (Tabela 8-2). Algumas enzimas requerem *ambas*, a coenzima e um ou mais íons metálicos para a sua atividade. A coenzima, ou íon metálico, que está firmemente ou até mesmo covalentemente ligada à parte protética da enzima é chamada de **grupo prostético**. Uma enzima completa e cataliticamente ativa, juntamente com sua coenzima e/ou íons metálicos ligados, é chamada de **holoenzima**. A parte protética dessa enzima é chamada de **apoenzima** ou **apoproteína**. As coenzimas funcionam como transportadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 8-2). Geralmente elas são derivadas de vitaminas, nutrientes orgânicos necessários em pequenas quantidades na alimentação diária. As coenzimas serão estudadas com maiores detalhes à medida que aparecerem nas vias metabólicas discutidas na Parte III deste livro.

Tabela 8-1 – Alguns elementos inorgânicos que servem como co-fatores das enzimas

Cu^{2+}	Citocromo oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
K^+	Piruvato quinase
Mg^{2+}	Hexoquinase, glicose-6-fosfatase, piruvato quinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutatona peroxidase
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, desidrogenase alcoólica, carboxipeptidases A e B

Tabela 8-2 – Algumas coenzimas que servem como carregadores transitórios de átomos específicos ou grupos funcionais*

Coenzima	Exemplos de grupos químicos transferidos	Precursor dietético em mamíferos
Biocitina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acila	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-deoxiadenosil-cobalamina (coenzima B_{12})	Átomos de H e grupos acila	Vitamina B_{12}
Flavina adenina dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Elétrons e grupos acila	Não requerido na dieta
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	Ion hidreto ($: \text{H}^-$)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal fosfato	Grupos amina	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetraidrofolato	Grupos monocarbônicos	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B_1)

*A estrutura e o modo de ação dessas coenzimas estão descritos na Parte III deste livro.

Finalmente, algumas enzimas são modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas dessas alterações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática.

As enzimas são classificadas pelas reações que catalisam

Muitas enzimas têm sido nomeadas pela adição do sufixo “-ase” ao nome de seu substrato, ou à palavra ou frase que descreve sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da uréia, e a DNA polimerase catalisa a polimerização dos nucleotídeos para formar o DNA. Outras enzimas, como a pepsina e a tripsina, têm nomes independentes dos seus substratos ou reações. Algumas vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas diferentes enzimas possuem o mesmo nome. Devido a tais ambiguidades e ao sempre crescente número de enzimas recém-descritas, por intermédio de um acordo internacional, foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis grandes classes, cada uma com subclasses, conforme o tipo de reação catalisada (Tabela 8-3). A cada enzima é atribuído um número classificatório de quatro dígitos e um nome sistemático, que identifica a reação que ela catalisa. Exemplificando, o nome sistemático formal da enzima que catalisa a reação:



é ATP-glicose fosfotransferase, indicando que ela catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para a glicose. O seu nú-

Tabela 8-3 – Classificação internacional das enzimas*

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidorreduases	Transferência de elétrons (ions hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Lases	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C—C, C—S, C—O e C—N por meio de reações de condensação acopladas à quebra do ATP

*A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Desse modo, elas são classificadas de acordo com um número de código e atribuído-se um nome de acordo com o tipo da reação de transferência, do grupo doador e do grupoceptor.

mero na Comissão de Enzimas (número E.C.) é 2.7.1.1. O primeiro dígito (2) denota o nome da classe (transferase); o segundo dígito (7), a subclasse (fosfotransferase); o terceiro dígito (1), uma fosfotransferase que apresenta um grupo hidroxilaceptor de fosfato; e o quarto dígito (1) indica que a D-glicose é o acceptor do grupo fosfato. Para muitas enzimas, um nome trivial pode ser usado, como por exemplo no caso da hexoquinase.

Uma lista completa e a descrição das milhares de enzimas conhecidas está além do objetivo deste livro. Este capítulo é destinado principalmente aos princípios e às propriedades comuns a todas as enzimas.

Como as Enzimas Funcionam

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas — muitas das moléculas biológicas são bastante estáveis no ambiente aquoso, de pH neutro e temperatura moderada, do interior das células. Além disso, muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular, tais como a formação de intermediários carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa necessária para que ocorra a reação. Sem catálise, as reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem com uma velocidade útil.

Uma enzima contorna esses problemas fornecendo um ambiente específico onde uma dada reação é energeticamente mais favorável. A característica que distingue uma reação catalisada enzimaticamente é a de ela ocorrer no interior dos limites de uma cavidade na enzima chamada **sítio ativo** (Fig. 8-1). A molécula que se liga ao sítio ativo e sofre a ação da enzima é chamada **substrato**. A superfície do centro ativo é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação. O complexo enzima-substrato, cuja existência foi inicialmente proposta por Adolphe Wurtz em 1880, é fundamental para a ação das enzimas. Ele é também o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas, bem como para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos.

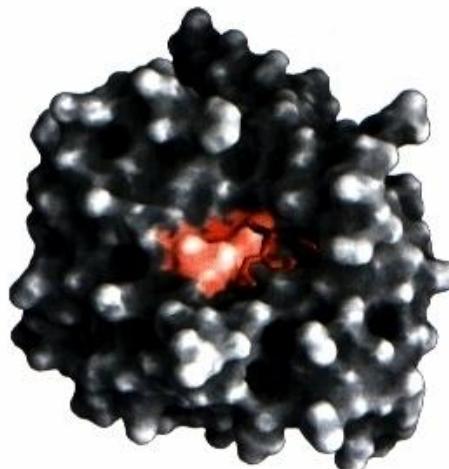


Figura 8-1 – Ligação de uma molécula de substrato no sítio ativo de uma enzima. A enzima quimotripsina está ligada ao substrato mostrado em vermelho. Alguns aminoácidos essenciais do sítio ativo são mostrados como manchas vermelhas na superfície da enzima.

As enzimas afetam a velocidade mas não o equilíbrio químico das reações

Uma reação enzimática simples pode ser escrita



onde E, S e P representam, a enzima, o substrato e o produto, respectivamente. ES e EP são complexos transitórios da enzima com o substrato e o produto.

Para compreender a catálise enzimática, precisamos entender primeiro a importante distinção entre equilíbrio da reação (discutido no Capítulo 4) e velocidade da reação. A função de um catalisador é aumentar a *velocidade* de uma reação. Os catalisadores não afetam o *equilíbrio* da reação. Qualquer reação do tipo $S \rightleftharpoons P$ pode ser descrita por um diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-2), uma representação das mudanças de energia durante a reação. Conforme explicado nos Capítulos 1 e 3, a energia nos sistemas biológicos é descrita em termos de energia livre, G. No diagrama de coordenadas, a energia livre do sistema é representada em função do progresso da reação (coordenada da reação). O ponto de partida, tanto para a reação de ida como para a reação reversa, é chamado **estado fundamental** e representa a contribuição de uma molécula típica (S ou P) para a energia livre do sistema, em um dado conjunto de condições. Para

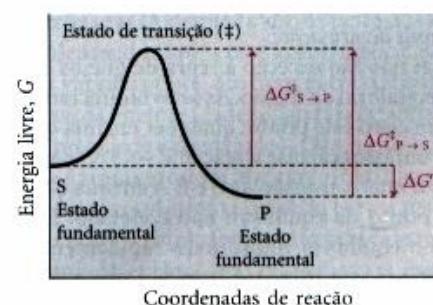


Figura 8-2 – Diagrama de coordenadas de reação para uma reação química. A energia livre do sistema é representada em função do progresso da reação $S \rightleftharpoons P$. Um diagrama desta natureza descreve as mudanças de energia durante a reação, e o eixo horizontal (coordenadas da reação) reflete as mudanças químicas sucessivas (por exemplo, quebra e formação de ligações) à medida que S é convertido em P. As energias de ativação para as reações $S \rightarrow P$ e $P \rightarrow S$ estão indicadas por $\Delta G^‡$. ΔG° é a variação total da energia livre padrão para a reação $S \rightarrow P$.

descrever as variações de energia livre das reações, os químicos definem um conjunto de condições-padrão (temperatura 298K; pressão parcial de cada gás 1 atm ou 101,3kPa; concentração de cada soluto 1M) e expressam a variação da energia livre para esse sistema reagente como ΔG° , a **variação da energia livre padrão**. Como os sistemas biológicos geralmente envolvem concentrações de H⁺ muito diferentes de 1M, os bioquímicos definem a **variação da energia livre padrão bioquímica**, ΔG^\ddagger , como sendo a variação da energia livre padrão em pH 7,0, que será utilizada neste livro. Uma definição mais completa de ΔG^\ddagger é dada no Capítulo 14.

O equilíbrio entre S e P reflete a diferença em energia livre dos seus estados fundamentais. No exemplo mostrado na Figura 8-2, a energia livre do estado fundamental de P é menor que a de S, assim ΔG^\ddagger é negativo para a reação S → P e o equilíbrio favorece a formação de P. A posição e a direção do equilíbrio não são afetadas por nenhum catalisador.

Um equilíbrio favorável não significa que a conversão S → P ocorra com uma velocidade mensurável. A velocidade da reação depende de um parâmetro completamente diferente. Existe uma barreira energética entre S e P que representa a energia necessária para o alinhamento dos grupos químicos reagentes, formação de cargas transientes instáveis, rearranjos de ligações e outras transformações necessárias para que a reação ocorra em uma das direções. Isso é ilustrado pela “colina” de energia nas Figuras 8-2 e 8-3. Para sofrer a reação, as moléculas devem superar essa barreira e, portanto, precisam ser excitadas até um nível de energia maior. No topo da colina de energia está um ponto no qual a passagem para o estado de S ou P é igualmente provável (é sempre um caminho “morro abaixo” em cada sentido). Esse é o chamado **estado de transição**. O estado de transição não é uma espécie química que apresenta uma estabilidade significativa e não deve ser confundido com um intermediário da reação (tal como ES ou EP). Ele é apenas um momento molecular efêmero no qual eventos como quebra de ligações, formação de ligações e desenvolvimento de cargas ocorrem em um ponto preciso no qual a decomposição para formar o substrato ou o produto é igualmente provável. A diferença entre os níveis de energia do estado fundamental e do estado de transição é chamada **energia de ativação** (ΔG^\ddagger). A velocidade de uma reação reflete essa energia de ativação, isto é, uma energia de ativação alta corresponde a uma reação lenta. As velocidades das reações podem ser aumentadas pela elevação da temperatura, que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para superar essa barreira de energia. Alternativamente, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador (Fig. 8-3). Os catalisadores aumentam a velocidade das reações diminuindo a energia de ativação.

As enzimas não são exceção à regra de que os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação. As setas bidirecionais na Equação 8-1 deixam claro este ponto: qualquer enzima que catalisa a reação S → P também catalisa a reação P → S. O papel das enzimas é acelerar a interconversão de S e P. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado. Entretanto, a reação atinge o equilíbrio muito mais rapidamente quando a enzima apropriada está presente, uma vez que a velocidade da reação é aumentada.

Esse princípio geral pode ser ilustrado considerando-se a conversão da sacarose e oxigênio em CO₂ e H₂O:



Esta conversão, que ocorre por meio de uma série de reações isoladas, tem um ΔG^\ddagger elevado e negativo, e, no equilíbrio, a quantidade de sacarose é desprezível. A sacarose é um composto

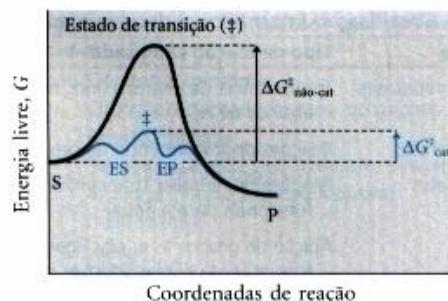


Figura 8-3 – Diagrama de coordenadas de reação comparando uma reação catalisada enzimaticamente com uma não-catalisada. Na reação S → P, os intermediários ES e EP assumem valores mínimos na curva de progresso da reação catalisada enzimaticamente. Os termos $\Delta G_{\text{não-cat}}^\ddagger$ e $\Delta G_{\text{cat}}^\ddagger$ correspondem às energias de ativação das reações não-catalisada e catalisada, respectivamente. A energia de ativação para o processo global é menor quando a enzima catalisa a reação.

estável porque a barreira de energia de ativação que deve ser superada para que ela reaja com o oxigênio é muito grande. Ela pode ser armazenada em um recipiente contendo O₂ indefinidamente, sem reagir. Entretanto, nas células, a sacarose é rapidamente transformada em CO₂ e H₂O por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas. Essas enzimas não apenas aceleram as reações, mas as organizam e as controlam de tal forma que a maior parte da energia liberada é conservada em outras formas químicas, ficando assim disponível para a célula executar outras tarefas. O caminho reacional pelo qual a sacarose (e outros açúcares) é degradada é a via primária de liberação de energia (Capítulos 15 e 19), e as enzimas dessa via permitem que a sequência de reações ocorra em uma escala de tempo biologicamente útil.

Na prática, qualquer reação pode ter vários passos (etapas) envolvendo a formação e o consumo de espécies químicas transientes, chamados de **intermediários da reação***. Quando a reação S ⇌ P é catalisada por uma enzima, os complexos ES e EP são os intermediários (Eq. 8-1). Eles ocupam os vales no diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-3). Quando ocorrem vários passos em uma reação, a velocidade total é determinada pelo passo (ou passos) com a maior energia de ativação. Esse passo é chamado “**passo limitante da velocidade**”. Para os casos simples, o passo limitante da velocidade é o ponto de mais alta energia no diagrama para as interconversões de S e P. Na prática, o passo limitante da velocidade pode variar com as condições da reação. Para muitas enzimas, vários passos têm energia de ativação similar, o que significa que todos eles são parcialmente limitantes da velocidade.

Como descrito no Capítulo 1, as energias de ativação são barreiras energéticas para as reações químicas. Essas barreiras são cruciais para a existência da própria vida. A estabilidade de uma molécula aumenta com o aumento da altura de sua barreira de ativação. Sem tais barreiras energéticas, as macromoléculas complexas poderiam reverter espontaneamente para as formas moleculares mais simples, e as estruturas complexas e alta-

* Observe que os termos “passos” e “intermediários” neste capítulo se referem às espécies químicas que ocorrem no caminho reacional de uma simples reação catalisada enzimaticamente. No contexto das vias metabólicas que envolvem várias enzimas (Parte III deste livro), esses termos são usados de uma maneira diferente. Uma reação enzimática geralmente é considerada como um “passo” em uma via metabólica, e o produto de uma reação enzimática (que é o substrato para a próxima enzima na via) é considerado como um “intermediário”.

mente ordenadas, bem como os processos metabólicos das células, poderiam não existir. As enzimas evoluíram para diminuir *seletivamente* as energias de ativação de reações necessárias à sobrevivência das células.

A velocidade e o equilíbrio das reações têm definições termodinamicamente precisas

O *equilíbrio* de uma reação está intrinsecamente ligado ao ΔG° , enquanto a *velocidade* da reação está ligada ao ΔG^\ddagger . Uma introdução básica a essas relações termodinâmicas é o próximo passo na compreensão de como as enzimas trabalham.

Um equilíbrio como $S \rightleftharpoons P$ é descrito por uma **constante de equilíbrio**, K_{eq} ou simplesmente K (Capítulo 4). Sob condições-padrão, empregadas para comparar processos bioquímicos, uma constante de equilíbrio é expressa por K'_{eq} (ou K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \quad (8-2)$$

Da termodinâmica, a relação entre K'_{eq} e ΔG° pode ser descrita pela expressão:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K'_{eq} \quad (8-3)$$

onde R é a constante dos gases, $8,315 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$, e T é a temperatura absoluta, 298 K (25°C). A Equação 8-3 será desenvolvida e discutida com maiores detalhes no Capítulo 14. O ponto importante aqui é que a constante de equilíbrio está diretamente relacionada com a variação global da energia livre padrão da reação (Tabela 8-4). Um grande valor negativo para ΔG° reflete um equilíbrio de reação favorável mas, como já foi salientado, isso não significa que a reação ocorrerá com uma velocidade considerável.

Tabela 8-4 – A relação entre K'_{eq} e ΔG° (veja Eq. 8-3)

K'_{eq}	ΔG° (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^1	-5,7
10^2	-11,4
10^3	-17,1

A velocidade de qualquer reação é determinada pela concentração do reagente (ou dos reagentes) e pela **constante de velocidade**, geralmente representada pelo símbolo k . Para a reação unimolecular $S \rightarrow P$, a velocidade da reação V , que representa a quantidade de S que reage por unidade de tempo, é expressa pela **equação da velocidade**:

$$V = k[S] \quad (8-4)$$

Nesta reação, a velocidade depende apenas da concentração de S . Ela é chamada de reação de primeira ordem. O fator k é uma constante de proporcionalidade que reflete a probabilidade de a reação ocorrer em um dado conjunto de condições (pH, temperatura etc.). Aqui, k é uma constante de velocidade de primeira ordem e sua unidade é o recíproco do tempo, por exemplo s^{-1} . Se uma reação de primeira ordem tem uma constante k de velocidade de $0,03 \text{ s}^{-1}$, isso pode ser interpretado (qualitativamente) que 3% do S disponível será convertido a P em 1s. Uma reação com uma constante de velocidade de 2.000 s^{-1} estará terminada em uma pe-

quena fração de segundo. Se a velocidade da reação depende da concentração de dois compostos diferentes, ou se duas moléculas do mesmo composto reagem entre si, a reação é de segunda ordem e k é uma constante de velocidade de segunda ordem, com unidade $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Nesse caso, a equação da velocidade torna-se:

$$V = k[S_1][S_2] \quad (8-5)$$

A partir da teoria do estado de transição, pode-se derivar uma expressão que relaciona a magnitude da constante de velocidade com a energia de ativação:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (8-6)$$

onde k é a constante de Boltzmann e h é a constante de Planck. O ponto importante a salientar aqui é que a relação entre a constante de velocidade, k , e a energia de ativação, ΔG^\ddagger , é inversa e exponencial. Em outras palavras, essa é a base para a afirmação de que uma energia de ativação menor significa uma velocidade de reação maior e vice-versa.

Agora vamos mudar o assunto de *o que* as enzimas fazem, para *como* elas o fazem.

Alguns princípios explicam o poder catalítico e a especificidade das enzimas

As enzimas são catalisadores extraordinários. Os aumentos da velocidade provocados pelas enzimas variam entre 5 e 17 ordens de magnitude (Tabela 8-5). As enzimas também são muito específicas, discriminando entre substratos com estruturas muito similares. Como esses aumentos, enormes e altamente seletivos, na velocidade das reações podem ser explicados? De onde vem a energia que diminui dramaticamente a energia de ativação para reações específicas?

Tabela 8-5 – Alguns valores do aumento da velocidade produzido por enzimas

Ciclofilina	10^5
Anidrase carbônica	10^7
Triose fosfato isomerase	10^9
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglicomutase	10^{12}
Succinil-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

A resposta para essas questões apresenta duas partes distintas, mas interligadas. A primeira diz respeito aos rearranjos das ligações covalentes durante a reação enzimática. Reações químicas dos mais variados tipos ocorrem entre o substrato e os grupos funcionais da enzima (cadeias laterais de aminoácidos específicos, íons metálicos e coenzimas). Os grupos funcionais catalíticos das enzimas podem formar uma ligação covalente transitória com um substrato e ativá-lo para a reação ou, então, algum grupo pode ser transferido transientemente do substrato para um grupo da enzima. Em muitos casos, essas reações sómente ocorrem no centro ativo da enzima. Elas diminuem a energia de ativação (e, portanto, aceleram a reação), propiciando um caminho reacional alternativo de energia mais baixa.

A segunda parte da resposta diz respeito às interações não-covalentes entre a enzima e o substrato. A maior parte da energia necessária para diminuir a energia de ativação é derivada de interações fracas, não-covalentes, entre o substrato e a enzima. O fator que de fato distingue as enzimas da maioria dos

catalisadores não-enzimáticos é a formação de um complexo ES específico. A interação entre o substrato e a enzima nesse complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura protéica, incluindo as pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas (Capítulo 6). A formação de cada interação fraca no complexo ES é acompanhada por uma pequena liberação de energia livre que garante o grau de estabilidade para a interação. A energia derivada da interação enzima-substrato é chamada de **energia de ligação**, ΔG_b . O seu significado vai além de uma simples estabilização da interação enzima-substrato. A **energia de ligação é a maior fonte de energia livre usada pelas enzimas para diminuir a energia de ativação das reações**.

Dois princípios fundamentais e inter-relacionados fornecem uma explicação geral para o fato de as enzimas utilizarem a energia de ligação não-covalente.

1. A maior parte do poder catalítico das enzimas é derivada, em última instância, da energia livre liberada na formação das múltiplas ligações fracas e interações entre a enzima e o seu substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como para a catálise.

2. As interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os centros ativos das enzimas são complementares não aos respectivos substratos *per si*, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam à medida que são transformados em produtos durante as reações enzimáticas.

Esses aspectos são críticos para a compreensão da ação das enzimas e agora eles se tornarão o foco da nossa atenção.

As interações fracas entre a enzima e o substrato são otimizadas no estado de transição

Como uma enzima utiliza a energia de ligação para diminuir a energia de ativação da reação? Embora a formação do complexo ES não seja a explicação adequada, algumas das primeiras considerações dos mecanismos enzimáticos começaram com essa premissa. Os estudos sobre a especificidade das enzimas desenvolvidos por Emil Fischer levaram-no a propor, em 1894,

que as enzimas eram estruturalmente complementares aos seus substratos, de tal forma que se ajustariam tal qual “fechadura e chave” (Fig. 8-4).

Essa premissa elegante de que a interação específica (exclusiva) entre duas moléculas biológicas é mediada por superfícies moleculares com formas complementares influenciou fortemente o desenvolvimento da bioquímica e tais interações permanecem no cerne de muitos processos bioquímicos. Entretanto, a hipótese “fechadura e chave” pode gerar confusão quando aplicada à catálise enzimática. Uma enzima totalmente complementar a seu substrato seria uma enzima muito pouco eficiente.

Considere uma reação imaginária, a quebra de um bastão de metal magnetizado. A reação não-catalisada está mostrada na Figura 8-5a. Vamos analisar duas enzimas imaginárias — duas “bastonases” — que catalisam essa reação e ambas empregando forças magnéticas como modelo para a energia de ligação empregada pelas enzimas reais. Vamos considerar inicialmente uma enzima perfeitamente complementar ao substrato (Fig. 8-5b). O centro ativo dessa “bastonase” é uma cavidade delimitada por magnetos. Para reagir (quebrar), o bastão precisa atingir o estado de transição da reação, mas ele se ajusta muito firmemente ao sítio ativo que não pode se dobrar. Isso porque o dobramento do bastão eliminaria parte das interações magnéticas entre ele e a enzima. Esse tipo de enzima *impede* a reação, uma vez que, na realidade, estabiliza o substrato. Num diagrama de coordenadas da reação (Fig. 8-5b), esse tipo de complexo ES corresponderia a um poço de energia do qual o substrato dificilmente escaparia. Esse tipo de enzima seria inútil.

A noção moderna de catálise enzimática, proposta inicialmente por Haldane em 1930, foi elaborada por Linus Pauling, em 1946: a fim de catalisar reações, uma enzima deve ser complementar ao *estado de transição*. Isso significa que as interações ótimas (por meio de ligações fracas) entre o substrato e a enzima ocorrem apenas no estado de transição. A Figura 8-5c mostra como uma enzima desse tipo pode trabalhar. O bastão de metal liga-se à enzima, mas algumas poucas interações magnéticas são usadas para formar o complexo ES. O substrato ligado precisa ainda receber um aumento de energia livre para

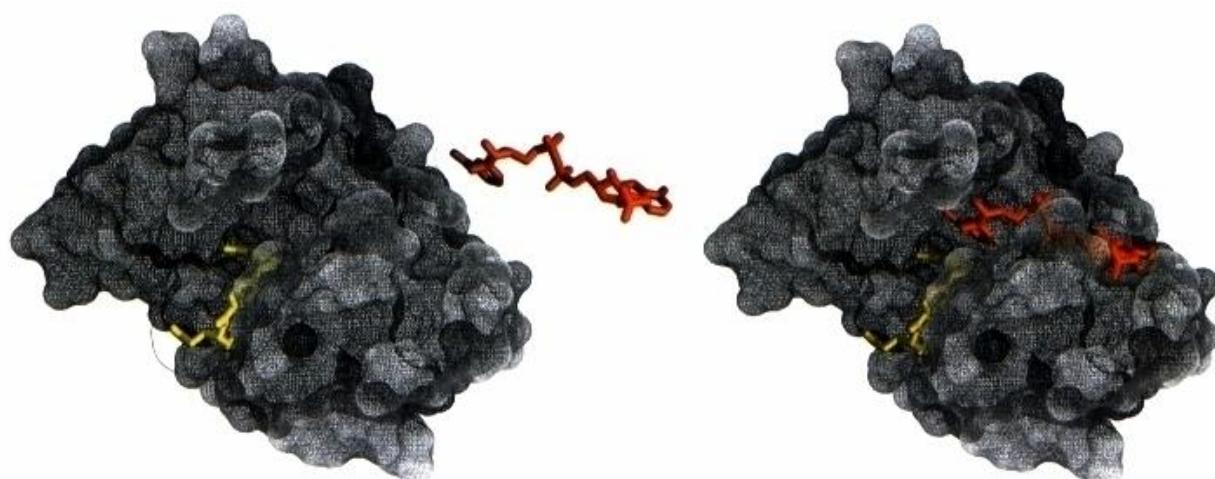


Figura 8-4 – Formas complementares de um substrato e seu sítio ativo em uma enzima. A enzima diidrofolato redutase é mostrada com o seu substrato NADP⁺ (vermelho) não ligado (à esquerda) e ligado (à direita). Também é visível um outro substrato ligado à enzima, o tetraidrofolato (amarelo). O NADP⁺ liga-se a uma cavidade que é complementar à sua forma e propriedades iônicas. Na realidade, a complementaridade entre a proteína e o ligante (neste caso, o substrato) raramente é perfeita, como já visto no Capítulo 7. A interação de uma proteína com um ligante freqüentemente envolve mudanças na conformação de uma ou ambas as moléculas, um processo denominado ajuste induzido. Essa falta de uma complementaridade perfeita entre a enzima e o substrato (não evidenciada nesta figura) é importante para a catálise enzimática.

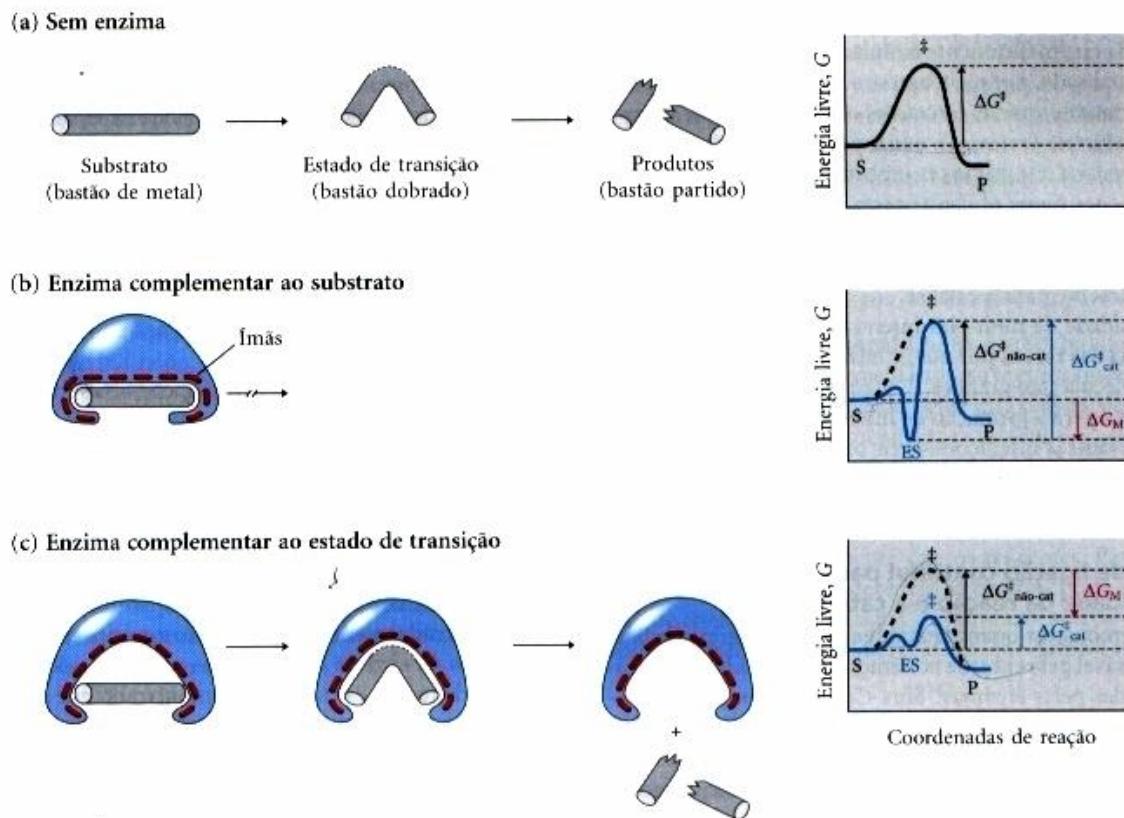


Figura 8-5 – Uma enzima imaginária (“bastonase”) projetada para catalisar a quebra de um bastão de metal. (a) Para ser quebrado, primeiramente o bastão deve ser dobrado (o estado de transição). Em ambos os exemplos de “bastonase”, as interações magnéticas fazem o papel das interações por ligações fracas entre enzima e substrato. (b) Uma “bastonase” que apresenta uma cavidade magnetizada com estrutura complementar à estrutura do bastão (o substrato) estabiliza esse substrato. O dobramento do bastão é impedido pela atração magnética entre o bastão e a “bastonase”. (c) Uma enzima complementar ao estado de transição da reação ajuda a desestabilizar o bastão, contribuindo para a catálise da reação. A energia de ligação das interações magnéticas compensa o aumento de energia livre necessário para dobrar o bastão. Os diagramas de coordenadas da reação (à direita) mostram as consequências energéticas da complementariedade ao substrato versus a complementariedade ao estado de transição. O termo ΔG_M representa a diferença entre as energias dos estados de transição da reação não-catalisada e da catalisada e provém das interações magnéticas entre o bastão e a “bastonase”. Quando a enzima é complementar ao substrato (b), o complexo ES é mais estável e tem menos energia livre no estado fundamental que o próprio substrato. O resultado é um aumento na energia de ativação.

atingir o estado de transição. Assim, o aumento em energia livre necessário para dobrar o bastão e quebrar parcialmente a sua conformação é compensado ou “ pago” pelas interações magnéticas (energia de ligação) que se formam entre a enzima e o substrato no estado de transição. Muitas dessas interações envolvem partes do bastão que estão longe do ponto de rompimento. Assim sendo, as interações entre a “bastonase” e as regiões não-reativas do bastão fornecem parte da energia necessária para o rompimento do bastão. Esse “pagamento de energia” é traduzido em uma menor energia de ativação real e uma maior velocidade de reação.

As enzimas reais trabalham segundo um princípio análogo. Algumas interações fracas são formadas no complexo ES, mas a totalidade das interações fracas que se estabelecem entre o substrato e a enzima é estabelecida apenas quando o substrato atinge o estado de transição. A energia livre (energia de ligação) liberada pela formação dessas interações supre parcialmente a energia requerida para se atingir o topo da colina de energia. O somatório da energia de ligação desfavorável (positiva), ΔG^\ddagger , e favorável (negativa), ΔG_B , resulta em uma energia de ativação líquida menor (Fig. 8-6). Mesmo para a enzima, o estado de transição não é uma espécie estável, mas um breve instante que o

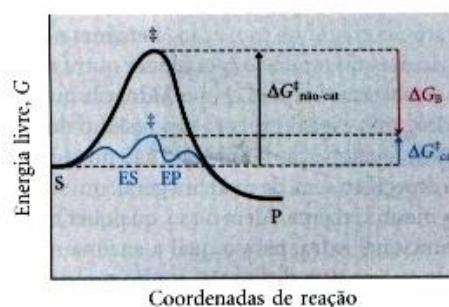


Figura 8-6 – O papel da energia de ligação na catálise. Para diminuir a energia de ativação de uma reação, o sistema precisa adquirir uma quantidade de energia equivalente à diminuição de ΔG^\ddagger . A maior parte dessa energia provém da energia de ligação (ΔG_B) e é disponibilizada pela formação de interações não-covalentes fracas entre o substrato e a enzima no estado de transição. O significado de ΔG_B é análogo ao de ΔG_M na Figura 8-5.

substrato gasta para atingir o topo da barreira de energia. A reação catalisada enzimaticamente é muito mais rápida que o processo não-catalisado, porque a barreira é muito menor. O princípio importante é que *as interações de ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem a maior parte da força que dirige a catálise enzimática*. Os grupos no substrato que são envolvidos nessas interações fracas podem estar a uma certa distância das ligações que são quebradas ou mudadas. As interações fracas que se formam apenas no estado de transição são as que contribuem fundamentalmente para a catálise.

A necessidade de múltiplas interações fracas para dirigir a catálise é uma das razões por que as enzimas (e algumas coenzimas) são moléculas tão grandes. A enzima deve fornecer os grupos funcionais para a formação de interações iônicas, pontes de hidrogênio e outras interações, bem como posicionar precisamente esses grupos de tal forma que a energia de ligação seja otimizada no estado de transição.

A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise

É possível demonstrar quantitativamente que a energia de ligação é responsável pela enorme aceleração da velocidade das reações catalisadas pelas enzimas? Sim. Como um ponto de referência, a Equação 8-6 permite calcular que ΔG^\ddagger deve diminuir aproximadamente 5,7 kJ/mol para acelerar cerca de dez vezes uma reação de primeira ordem, sob as condições comumente encontradas nas células. A energia disponível devido à formação de uma única interação fraca geralmente é da ordem de 4 a 30 kJ/mol. A energia total disponível, devido à formação de um certo número dessas interações, provavelmente é suficiente para diminuir a energia de ativação de cerca de 60 a 100 kJ/mol, requerida para explicar os grandes aumentos na velocidade observados para muitas enzimas.

A mesma energia de ligação que fornece a energia para a catálise também é responsável pela especificidade, a habilidade da enzima em discriminar entre o substrato e uma outra molécula competidora. Conceitualmente, a especificidade é fácil de ser diferenciada da catálise, mas essa distinção é muito mais difícil de ser feita experimentalmente, porque a catálise e a especificidade são originárias do mesmo fenômeno. Se o centro ativo de uma enzima tem grupos funcionais arranjados de forma otimizada para formar uma variedade de interações fracas com um dado substrato no estado de transição, a enzima não será capaz de interagir do mesmo modo com qualquer outra molécula. Por exemplo, se o substrato tem um grupo hidroxila que forma uma ponte de hidrogênio específica com um resíduo de ácido glutâmico na enzima, qualquer molécula que não possuir aquele grupo hidroxila específico será, de maneira geral, um substrato mais pobre para a mesma enzima. Além disso, qualquer molécula com um grupo funcional extra, para o qual a enzima não apresenta uma cavidade ou um sítio de ligação, muito provavelmente será excluída da enzima. Geralmente, a especificidade é derivada da formação de múltiplas interações fracas entre a enzima e a molécula de seu substrato específico.

Os princípios gerais já descritos podem ser ilustrados por uma grande variedade de mecanismos catalíticos conhecidos. Esses mecanismos não são mutuamente exclusivos e uma dada enzima pode incorporar vários deles em seu mecanismo de ação. Geralmente é difícil quantificar a contribuição de um dado mecanismo catalítico para a velocidade e/ou especificidade de uma determinada reação catalisada enzimaticamente.

A energia de ligação é a força impulsora dominante em vários mecanismos e ela pode ser o principal, se não o único,

contribuinte para a catálise. Vamos considerar o que é necessário acontecer para que a reação ocorra. Os fatores físicos e termodinâmicos importantes que contribuem para o ΔG^\ddagger , a barreira energética, incluem: (1) a mudança na entropia, na forma de movimento de liberdade de duas moléculas em solução; (2) a camada de solvatação de moléculas de água ligadas por pontes de hidrogênio que envolvem e ajudam a estabilizar a maioria das biomoléculas em solução aquosa; (3) a distorção dos substratos que precisa ocorrer em muitas reações, e (4) a necessidade de se obter um alinhamento adequado dos grupos catalíticos funcionais na enzima. A energia de ligação pode ser usada para vencer todas essas barreiras.

A vantagem mais evidente da ligação dos substratos à enzima é uma grande redução nos movimentos relativos, ou **redução da entropia**, desses substratos. A energia de ligação mantém os substratos orientados adequadamente para reagir. Isso representa uma importante contribuição à catálise, uma vez que as colisões produtivas entre as moléculas em solução podem ser muito raras. Esse alinhamento preciso do substrato sobre a superfície da enzima é devido à grande quantidade de interações fracas entre cada molécula de substrato e grupos estratégicamente localizados na enzima que fixam as moléculas de substrato na posição adequada. Estudos têm demonstrado que a restrição do movimento de dois reagentes pode produzir aumentos de velocidade da ordem de $10^6 M$ (Fig. 8-7).

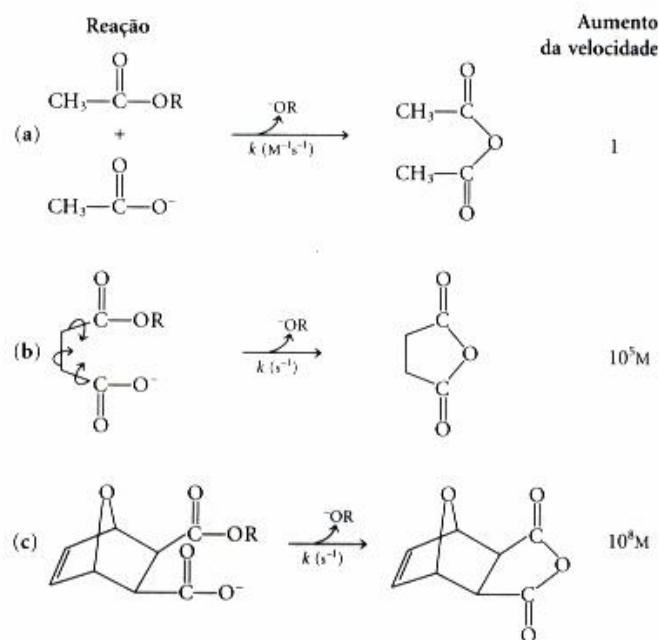


Figura 8-7 – Aumento da velocidade por meio da redução da entropia. São representadas reações de um éster com um grupo carboxílico para formar um anidrido. O grupo R é o mesmo em cada caso. (a) Para esta reação bimolecular, a constante de velocidade é de segunda ordem com unidade $M^{-1} \cdot s^{-1}$. (b) Quando os dois grupos reagentes estão na mesma molécula, a reação é muito mais rápida. Para esta reação unimolecular, a unidade de k é s^{-1} . Dividindo-se a constante de velocidade de (b) pela constante de velocidade de (a), tem-se um aumento da velocidade de cerca de $10^5 M$ (a unidade molaridade é resultante do fato que foi comparada uma reação unimolecular com outra bimolecular). Colocando-se de outro modo, se o reagente em (b) estivesse presente em uma concentração 1M, os grupos reagentes se comportariam como se estivessem presentes em uma concentração $10^5 M$. Embora o reagente em (b) apresente livre rotação em três ligações (mostradas com setas curvas), isso ainda representa uma substancial redução da entropia em relação a (a). Se as ligações que giram em (b) ficam impedidas como em (c), a entropia é reduzida mais ainda e a reação exibe um aumento de velocidade de $10^8 M$ em relação a (a).

A formação de ligações fracas entre o substrato e a enzima também resulta na **desolvatação** do substrato. As interações enzima-substrato substituem a maior parte (ou até mesmo todas) das pontes de hidrogênio existentes entre o substrato e a água.

A energia de ligação envolvendo as interações fracas formadas apenas no estado de transição da reação ajuda a compensar termo-dinamicamente qualquer distorção (fundamentalmente uma redistribuição de elétrons) que o substrato deva sofrer para reagir.

Finalmente, a própria enzima pode sofrer mudanças conformacionais induzidas pelas múltiplas interações fracas com o substrato, quando da ligação com o substrato. Esse fato é denominado de **ajuste induzido**, um mecanismo postulado por Daniel Koshland, em 1958. O ajuste induzido serve para colocar grupos funcionais específicos da enzima em uma posição apropriada para catalisar a reação. A mudança conformacional também permite a formação de interações adicionais por ligações fracas no estado de transição. Em quaisquer desses casos, a nova conformação apresenta propriedades catalíticas aumentadas. Como vimos, o ajuste induzido é uma característica comum da ligação reversível dos ligantes às proteínas (Capítulo 7). O ajuste induzido também é importante na interação de quase todas as enzimas com os seus substratos.

Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise

Uma vez que o substrato se liga à enzima, os grupos catalíticos funcionais, adequadamente posicionados, auxiliam a quebra e a formação de ligações por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo a catálise ácido-base geral, a catálise covalente e a catálise por íons metálicos. Esses são mecanismos distintos daqueles baseados na energia de ligação, uma vez que geralmente envolvem uma interação *covalente* transitória com o substrato ou uma transferência de grupos do substrato ou para o substrato.

Catálise ácido-base geral. Muitas reações bioquímicas envolvem a formação de intermediários carregados instáveis que tendem a se transformar rapidamente em suas espécies reagentes constituintes, impedindo assim a reação (Fig. 8-8). Esses intermediários carregados freqüentemente podem ser estabilizados pela transferência (retirada ou adição) de prótons do substrato ou de um intermediário, para formar espécies que se quebram em produtos mais rapidamente que os reagentes. Para as reações não-enzimáticas, a transferência de prótons pode envolver apenas os constituintes da água ou também outros doadores ou aceitores fracos de prótons. A catálise que envolve apenas os íons

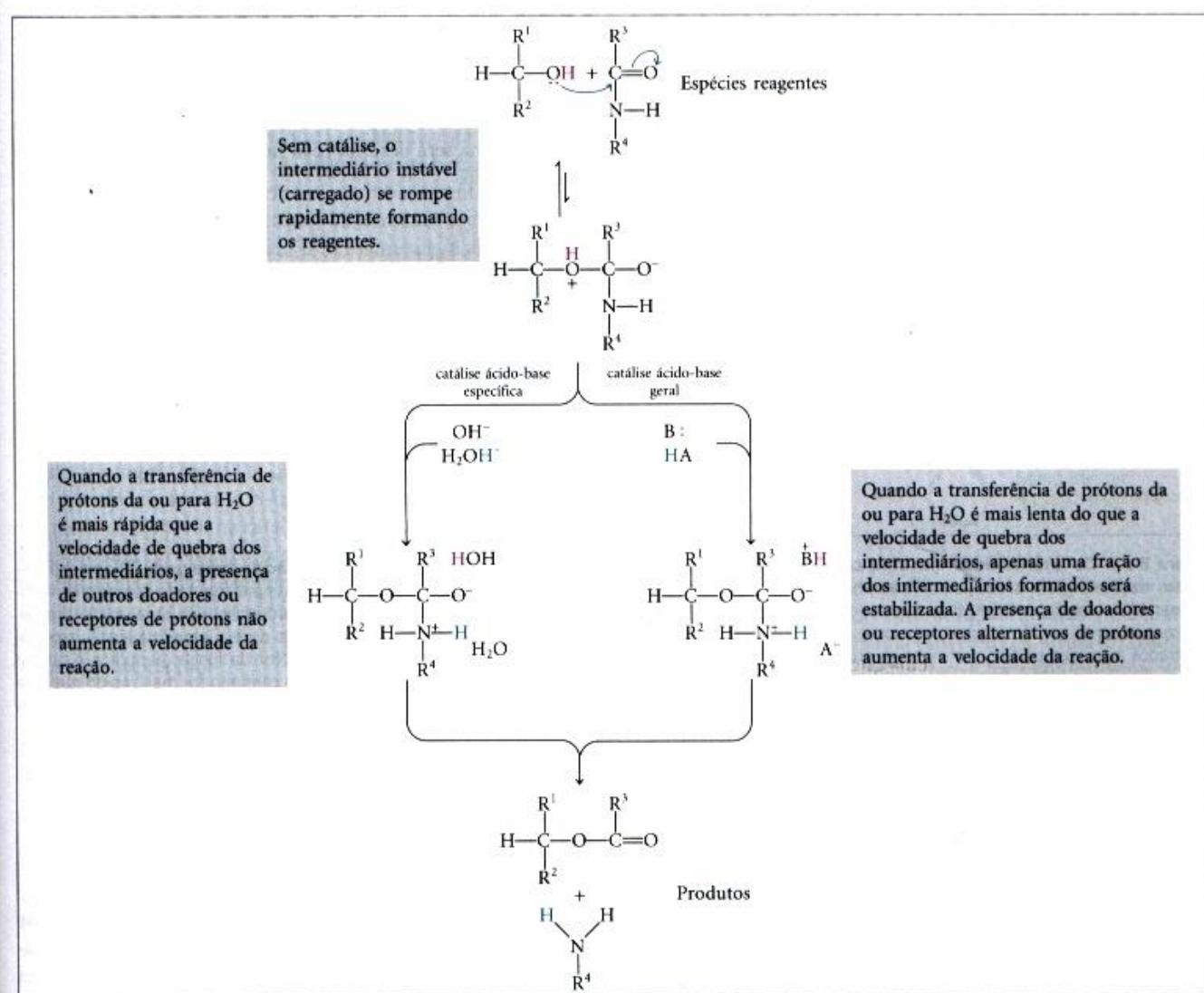


Figura 8-8 – Desenvolvimento desfavorável de cargas durante a quebra de uma ligação amida que pode ser evitado pela catálise. É mostrada a hidrólise de uma ligação amida, a mesma reação catalisada pela quimotripsina e outras proteases. O desenvolvimento da carga é desfavorável e pode ser evitado pela doação de um próton pelo H_3O^+ (catálise ácida específica) ou HA (catálise ácida geral), em que HA representa um ácido qualquer. Similarmente, a carga pode ser neutralizada pela captura de um próton pelo OH^- (catálise básica específica) ou B: (catálise básica geral), em que B: representa uma base qualquer.

H^+ (H_3O^+) ou OH^- , presentes na água, é denominada **catalise ácido-base específica**. Se a transferência de prótons entre o intermediário e a água é mais rápida que a transformação do intermediário nos reagentes, o intermediário será efetivamente estabilizado todas as vezes que se formar. Desse modo, nenhuma catalise adicional, mediada por outros receptores ou doadores de prótons, ocorrerá. Entretanto, em muitos casos, apenas a participação da água não é suficiente. O termo **catalise ácido-base geral** refere-se a transferências de prótons mediadas por outras classes de moléculas. Para reações não-enzimáticas em soluções aquosas, isso ocorre apenas quando o intermediário instável da reação se transforma nos reagentes com uma velocidade maior com que os prótons são transferidos da água ou para a água. Nessas situações, vários ácidos orgânicos fracos podem suplementar a água como doadores de prótons, ou, ainda, bases orgânicas fracas podem servir como aceitoras de prótons.

No centro ativo de uma enzima, um certo número de cadeias laterais de aminoácidos pode atuar tanto como doador quanto como aceitor de prótons (Fig. 8-9). Esses grupos podem ser posicionados precisamente no centro ativo de uma enzima, permitindo a transferência de prótons e garantindo aumentos na velocidade da reação da ordem de 10^2 a 10^5 . Esse tipo de catalise ocorre com a maioria das enzimas. De fato, as transferências de prótons são as reações bioquímicas mais comuns.

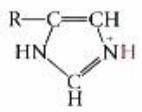
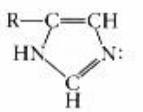
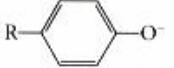
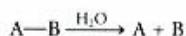
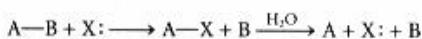
Resíduo de aminoácido	Forma ácida geral (doador de próton)	Forma básica geral (aceitor de próton)
Glu, Asp	R—COOH	R—COO ⁻
Lys, Arg	R— ^H NH ₂	R—NH ₂
Cys	R—SH	R—S ⁻
His		
Ser	R—OH	R—O ⁻
Tyr		

Figura 8-9 – Os aminoácidos em uma catalise ácido-base geral. Muitas reações orgânicas são promovidas por doadores de prótons (ácidos gerais) ou aceitores de prótons (bases gerais). Os sítios catalíticos de algumas enzimas contêm grupos funcionais de aminoácidos, como os mostrados aqui, que podem participar no processo catalítico como doadores ou aceitores de prótons.

Catalise covalente. Neste tipo de catalise é formada uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Considere a hidrólise da ligação química entre os grupos A e B:



Na presença de um catalisador covalente (uma enzima com um grupo nucleofílico X:⁻), a reação ocorre da seguinte forma:



Isso altera o caminho da reação e resulta em catalise apenas quando o novo caminho tem uma energia de ativação menor que aquele da reação não-catalisada. Assim, os dois novos passos precisam ser mais rápidos que os da reação não-catalisada. Algumas cadeias laterais de aminoácidos, incluindo as da Figu-

ra 8-9, e os grupos funcionais de alguns co-fatores de enzimas podem servir como nucleófilos na formação de ligações covalentes com os substratos. Esses complexos covalentes sempre sofrem reações posteriores para regenerar a enzima livre. A ligação covalente formada entre a enzima e o substrato pode ativar esse substrato para uma reação subsequente de uma maneira particularmente específica para o grupo ou coenzima envolvidos.

Catalise por íons metálicos. Os metais firmemente ligados à molécula da enzima ou captados da solução junto com o substrato podem participar de várias maneiras na catalise. As interações iônicas entre um metal ligado à enzima e o substrato podem ajudar a orientar o substrato para a reação ou estabilizar os estados de transição carregados eletricamente. O uso de interações por ligações fracas entre o metal e o substrato é similar à utilização da energia de ligação enzima-substrato já descrita anteriormente. Os metais podem também mediar reações de oxir-redução por meio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Cerca de um terço das enzimas conhecidas requer um ou mais íons metálicos para sua atividade catalítica.

A maioria das enzimas emprega uma combinação de várias estratégias catalíticas para aumentar a velocidade da reação. Um bom exemplo do uso das catalises covalente e ácido-base geral é a reação catalisada pela quimotripsina. O primeiro é a quebra de uma ligação peptídica que é acompanhada pela formação de uma ligação covalente entre um resíduo de serina da enzima e parte do substrato. A reação é acelerada pela catalise básica geral envolvendo outros grupos na enzima (Fig. 8-10). A reação da quimotripsina será descrita com maiores detalhes mais adiante neste capítulo.

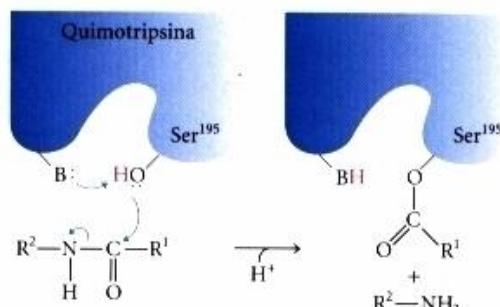


Figura 8-10 – Catálises covalente e ácido-base geral. O primeiro passo da reação catalisada pela quimotripsina é chamado de passo da acilação. O grupo hidroxila da Ser¹⁹⁵ é o nucleofílico em uma reação acelerada pela catalise básica geral (a base é a cadeia lateral da His⁵⁷). Isso proporciona um novo caminho para a hidrólise da ligação peptídica. A catálise somente ocorre se cada passo do novo caminho for mais rápido que o da reação não-catalisada. A reação da quimotripsina está descrita com mais detalhes na Figura 8-19.

A Cinética Enzimática como uma Abordagem para a Compreensão do Mecanismo de Ação das Enzimas

Múltiplas abordagens são comumente empregadas para estudar o mecanismo de ação de uma enzima purificada. O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína fornece informações importantes e o valor dessa informação estrutural é aumentado significativamente pelos conhecimentos obtidos por meio da química de proteína clássica e pelos métodos modernos de mutagênese sitio dirigida (mudança da seqüência de aminoácidos de uma proteína por meio da engenharia genética; veja Capitu-

lo 29). Essas tecnologias permitem ao enzimologista examinar o papel individual dos aminoácidos tanto na estrutura da enzima como na sua ação catalítica. Entretanto, a abordagem central para estudar o mecanismo de uma reação catalisada por uma enzima é determinar a *velocidade* da reação e como ela se altera em função de mudanças nos parâmetros experimentais, uma disciplina conhecida como **cinética enzimática**. Essa é a abordagem mais antiga para a compreensão dos mecanismos enzimáticos e continua sendo muito importante até hoje. O que segue é uma introdução básica à cinética das reações catalisadas por enzimas. Para um estudo mais avançado devem ser consultadas as referências citadas no final do capítulo.

A concentração do substrato afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação *in vitro*, catalisada por uma enzima purificada, é a concentração do substrato, $[S]$. Entretanto, estudar os efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de $[S]$ variar durante o curso de uma dada reação, à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a **velocidade inicial** da reação, designada por V_0 , quando $[S]$ é geralmente muito maior que a concentração da enzima, $[E]$. Assim, se o tempo de reação for suficientemente curto, as mudanças na $[S]$ serão desprezíveis, portanto a $[S]$ pode ser considerada constante.

O efeito em V_0 provocado pela variação da $[S]$, quando a concentração de enzima é mantida constante, está mostrado na Figura 8-11. Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 aumenta quase linearmente com o aumento da $[S]$. Em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta cada vez menos em resposta aos aumentos da $[S]$. Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem aumentos insignificantes de V_0 , à medida que a $[S]$ aumenta. Esse patamar atingido para tais valores de V_0 é muito próximo da **velocidade máxima**, V_{\max} .

O complexo ES é fundamental para a compreensão desse comportamento cinético, já que ele foi o ponto de partida para a discussão da catálise enzimática. O perfil cinético apresentado na Figura 8-11 levou Victor Henri, seguindo as diretrizes de Wurtz, a propor, em 1903, que a combinação de uma enzima com a molécula de seu substrato para formar o complexo ES é um passo obrigatório na catálise enzimática. Em 1913 essa idéia foi expandida em uma teoria geral da ação das enzimas por Leonor Michaelis e Maud Menten. Eles postularam que inicialmente a enzima se combina reversivelmente com o substrato para formar o complexo enzima-substrato, em um passo reversível relativamente rápido:



Em uma segunda etapa lenta, o complexo ES então se quebra liberando a enzima livre, o produto da reação, P:



Como a segunda reação é mais lenta (Eq. 8-8), ela limita a velocidade da reação enzimática. Assim, a velocidade da reação enzimática deve ser proporcional à concentração da substância que reage no segundo passo, isto é, ES.

Em qualquer instante de uma reação catalisada enzimaticamente, a enzima existe em duas formas, a não ligada ao substrato, ou forma livre E, e a forma ligada ao substrato, ES. Em baixas $[S]$, a maior parte da enzima está na forma livre E. Nessas condições, a velocidade da reação será proporcional à $[S]$ porque o equilíbrio da Equação 8-7 é deslocado na direção da formação

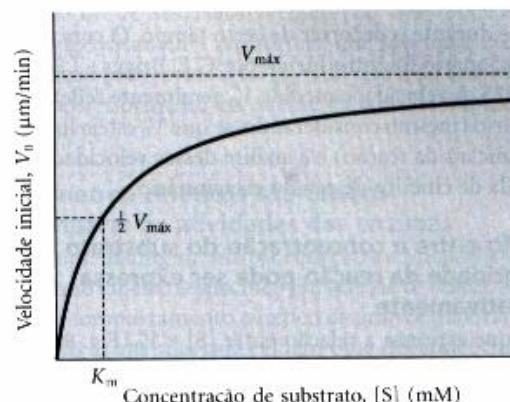


Figura 8-11 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada enzimaticamente. Por meio deste tipo de gráfico, a V_{\max} pode ser determinada apenas aproximadamente, isso porque V_0 se aproxima mas nunca chega a atingir V_{\max} . A concentração de substrato, em que a V_0 é a metade da V_{\max} , é K_m , a constante de Michaelis-Menten. A concentração da enzima em um experimento como esse é geralmente tão baixa que $[S] \gg [E]$ mesmo quando $[S]$ é descrita como pequena ou relativamente pequena. As unidades são típicas para reações catalisadas enzimaticamente e apresentadas apenas para ilustrar o significado V_0 e $[S]$ (note que a curva descreve parte de uma hipérbole rectangular, com uma das assintotas em V_{\max}). Se a curva continuasse para concentrações abaixo de $[S] = 0$, ela se aproximaria de uma assintota vertical quando $[S] = -K_m$.



Leonor Michaelis
(1875-1949)



Maud Menten
(1879-1960)

de mais ES, à medida que a $[S]$ aumenta. A velocidade inicial máxima da reação (V_{\max}) será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo ES e a concentração da enzima livre E for significativamente pequena. Nessas condições, a enzima está “saturada” com seu substrato e a velocidade da reação não aumenta mais com novos aumentos da $[S]$. Essa condição existirá sempre que a $[S]$ for suficientemente alta para manter todas as moléculas de enzima na forma combinada com o substrato, ES. Em seguida, o complexo ES transforma-se no produto P e a enzima é liberada para catalisar a transformação de outra molécula de substrato. O efeito de saturação é uma característica que distingue os catalisadores enzimáticos e é o responsável pelo patamar observado na Figura 8-11. Essa condição de saturação existirá sempre que $[S]$ for suficientemente alta.

Quando a enzima é misturada com um grande excesso de substrato, existe um período inicial, o **estado pré-estacionário**, no qual a concentração de ES aumenta. Esse período é muito curto para poder ser facilmente observado. A reação atinge rapidamente o **estado estacionário**, em que a [ES] (e a concentração

de quaisquer outros intermediários) permanecerá praticamente constante durante o decorrer de certo tempo. O conceito de estado estacionário foi introduzido por G.E. Briggs e J.B.S. Haldane em 1925. A velocidade medida V_0 geralmente reflete o estado estacionário (mesmo considerando-se que V_0 esteja limitada aos tempos iniciais da reação) e a análise dessas velocidades iniciais é chamada de **cinética de estado estacionário**.

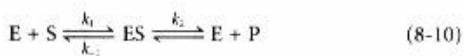
A relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação pode ser expressa quantitativamente

A curva que expressa a relação entre $[S]$ e V_0 (Fig. 8-11) tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas (ela se aproxima de uma hipérbole retangular) que pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Michaelis e Menten derivaram essa equação partindo de sua hipótese básica de que o passo limitante da velocidade nas reações enzimáticas seria a quebra do complexo ES para formar o produto e a enzima livre. A equação é

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8-9)$$

Os termos importantes são $[S]$, V_0 , V_{\max} e uma constante chamada de constante de Michaelis, K_m . Todos esses termos são facilmente medidos experimentalmente.

Nós desenvolveremos aqui a lógica básica e os passos algébricos da dedução moderna da equação de Michaelis-Menten, que inclui a consideração do estado estacionário introduzido por Briggs e Haldane. A dedução começa com as duas etapas básicas envolvidas na formação e na quebra de ES (Eqs. 8-7 e 8-8). Nos primeiros momentos da reação, a concentração do produto, $[P]$, é negligenciável e, para simplificar, assumiremos que k_2 (que descreve a reação reversa de P para S) pode ser ignorada. Essa consideração não é crítica mas simplifica nossa tarefa. Assim, a reação geral se reduz a



V_0 é determinada pela quebra de ES para formar o produto, que por sua vez é determinado pela $[ES]$:

$$V_0 = k_2[ES] \quad (8-11)$$

Como a $[ES]$ na Equação 8-11 não é facilmente medida experimentalmente, é preciso encontrar uma expressão alternativa para $[ES]$. Primeiro, introduziremos o termo $[E_t]$ que representa a concentração total da enzima (a soma das concentrações da enzima livre e da ligada ao substrato). Desse modo, a concentração da enzima livre, ou não ligada ao substrato, pode ser representada por $[E_t] - [ES]$. Como a $[S]$ geralmente é muito maior que a $[E_t]$, a quantidade de substrato ligada à enzima, em qualquer momento da reação, é desprezível quando comparada com a $[S]$. Tendo em vista essas considerações, os passos que se seguem conduzirão a uma expressão simples para V_0 , em termos de parâmetros que podem ser facilmente medidos experimentalmente.

Passo 1. As velocidades de formação e quebra de ES são determinadas pelos passos governados pelas constantes de velocidade k_1 (formação) e $k_{-1} + k_2$ (desaparecimento), de acordo com as expressões:

$$\text{Velocidade de formação de ES} = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (8-12)$$

$$\text{Velocidade de quebra de ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (8-13)$$

Passo 2. Considera-se agora que a velocidade inicial da reação reflete um estado estacionário em que a $[ES]$ é constante, isto é, a velocidade de formação de ES é igual à velocidade de quebra de

ES. Essa é a chamada consideração de estado estacionário. Assim, as expressões nas Equações 8-12 e 8-13 podem ser igualadas

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (8-14)$$

Passo 3. Desenvolveremos agora uma série de passos algébricos para resolver a Equação 8-14 em função da $[ES]$. Primeiramente, o lado esquerdo da equação é multiplicado e o lado direito é simplificado

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (8-15)$$

Adicionando-se o termo $k_1[ES][S]$ a ambos os lados da equação e simplificando

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \quad (8-16)$$

Resolvendo esta equação em função da $[ES]$:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (8-17)$$

Simplificando esta última expressão e combinando-se todas as constantes de velocidade em um único termo:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1} \quad (8-18)$$

O termo $(k_2 + k_{-1})/k_1$ é definido como a **constante de Michaelis**, K_m . A substituição desse valor na Equação 8-18 simplifica a expressão para

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (8-19)$$

Passo 4. V_0 agora pode ser expressa em termos da $[ES]$. Substituindo-se a $[ES]$ da Equação 8-11 pelo lado direito da Equação 8-19 obtém-se

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (8-20)$$

Esta equação ainda pode ser simplificada. Já vimos que a velocidade atingirá o ponto máximo quando a enzima estiver saturada, isto é, quando $[ES] = [E_t]$. Assim V_{\max} pode ser definida como $k_2[E_t]$. Substituindo este valor na Equação 8-20 obtém-se:

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

Esta é a **equação de Michaelis-Menten**, a equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato. Ela é uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0 , a velocidade inicial máxima V_{\max} e a concentração inicial de substrato $[S]$, todas relacionadas pela constante de Michaelis, K_m . Note que o K_m tem unidade de concentração. Essa equação está realmente de acordo com resultados experimentais reais? Sim. Confirmaremos essa afirmação considerando situações limites em que a $[S]$ é muito alta ou muito baixa, como mostrado na Figura 8-12.

Uma importante relação numérica emerge da equação de Michaelis-Menten no caso especial em que V_0 é exatamente a metade de V_{\max} (Fig. 8-12). Então:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8-21)$$

Dividindo por V_{\max} , obtém-se

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (8-22)$$

Resolvendo em função de K_m , obtém-se $K_m + [S] = 2[S]$, ou

$$K_m = [S], \quad \text{quando } V_0 = \frac{1}{2} V_{\max} \quad (8-23)$$

Isto representa uma definição prática muito útil de K_m : o K_m é equivalente à concentração de substrato onde V_0 é igual à metade de V_{\max} .

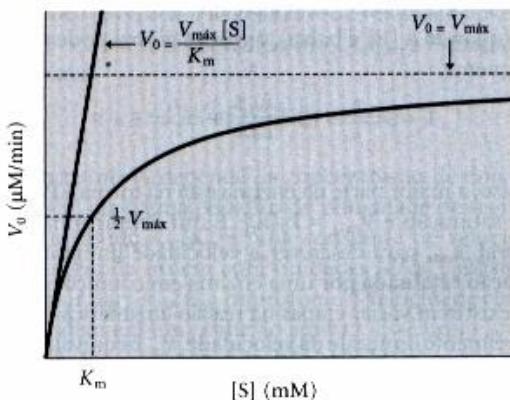


Figura 8-12 – Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação. O gráfico mostra os parâmetros cinéticos que definem os limites da curva em baixas e altas $[S]$. Em baixas $[S]$, $K_m \gg [S]$ e o termo $[S]$ no denominador da equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-9) torna-se insignificante. A equação pode ser simplificada para $V_0 = V_{\text{máx}}[S]/K_m$, e V_0 passa a ter uma dependência linear em função da $[S]$, como pode ser observado nesta figura. Em $[S]$ elevadas, onde $[S] \gg K_m$, o termo K_m no denominador da equação de Michaelis-Menten torna-se insignificante e a equação pode ser simplificada para $V_0 = V_{\text{máx}}$. Isso é consistente com o patamar observado nas $[S]$ elevadas. Portanto, a equação de Michaelis-Menten é consistente com a dependência observada de V_0 em relação a $[S]$. A forma da curva é definida pelos termos $V_{\text{máx}}/K_m$, quando a $[S]$ é pequena, e apenas por $V_{\text{máx}}$, quando a $[S]$ é alta.

A equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-9) pode ser transformada algebricamente em formas que são mais úteis para a determinação prática de K_m e $V_{\text{máx}}$ (Adendo 8-1) e, como descreveremos posteriormente, na análise da ação de inibidores (veja Adendo 8-2).

Os parâmetros cinéticos são usados para comparar as atividades das enzimas

É importante distinguir entre a equação de Michaelis-Menten e o mecanismo cinético específico em que ele se baseia. A equação descreve o comportamento cinético da grande maioria das enzimas, e todas as enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0 em relação a $[S]$ são denominadas enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten. A regra prática de que $K_m = [S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{máx}}$ (Eq. 8-23) é válida para todas as enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten (a maioria das exceções à cinética de Michaelis-Menten são as enzimas reguladoras, discutidas no final deste capítulo). Entretanto, a equação de Michaelis-Menten não depende do mecanismo de reação relativamente simples, de duas etapas, proposto por Michaelis e Menten (Eq. 8-10). Muitas enzimas que seguem a equação de Michaelis-Menten têm mecanismos de reação muito diferentes entre si, e enzimas que catalisam reações com seis ou oito etapas identificáveis freqüentemente exibem o mesmo comportamento cinético de estado estacionário. Mesmo considerando que a Equa-

Adendo 8-1

Transformações da equação de Michaelis-Menten: o gráfico dos duplos recíprocos

A equação de Michaelis-Menten

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

pode ser transformada algebricamente em equações que são mais úteis no tratamento gráfico dos dados experimentais. Uma transformação comum é obtida simplesmente invertendo-se os dois lados da equação de Michaelis-Menten:

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

Separa-se os componentes do numerador do lado direito da equação obtém-se

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

que pode ser simplificada para:

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

Esta forma da equação de Michaelis-Menten é chamada de equação de Lineweaver-Burk. Para as enzimas que obedecem a equação de Michaelis-Menten, o gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ (gráfico dos “duplos recíprocos” de V_0 versus $[S]$ que usamos até agora) é representado por uma linha reta (Fig. 1). Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{\text{máx}}$ um intercepto de $1/V_{\text{máx}}$ no eixo de $1/V_0$ e um intercepto de $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$. A representação dos duplos recíprocos, também chamada representação de Lineweaver-Burk, tem a grande vantagem de per-

mitir uma determinação mais acurada de $V_{\text{máx}}$, que pode ser obtida apenas *aproximadamente* pelo gráfico V_0 versus $[S]$ (veja Fig. 8-12).

Outras transformações da equação de Michaelis-Menten têm sido deduzidas, cada uma apresentando alguma vantagem particular na análise de dados de cinética enzimática (veja problema 11, pág. 223).

O gráfico dos duplos recíprocos para velocidades de reações enzimáticas é muito útil na diferenciação de diferentes mecanismos de reação enzimática (veja Fig. 8-14) e na análise de inibidores de enzimas (veja Adendo 8-2).

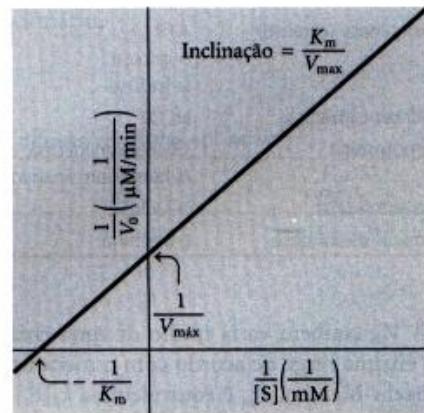


Figura 1 – O gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk.

ção 8-23 é verdadeira para muitas enzimas, a magnitude e o significado real de $V_{\text{máx}}$ e K_m podem variar de uma enzima para outra. Isso é uma limitação importante do modelo do estado estacionário para a cinética enzimática. $V_{\text{máx}}$ e K_m são parâmetros que podem ser obtidos experimentalmente para qualquer enzima, mas mesmo assim elas fornecem pouca informação sobre o número, a velocidade ou a natureza química das etapas discretas da reação. Não obstante, a cinética de estado estacionário representa a linguagem-padrão pela qual as eficiências catalíticas das enzimas são caracterizadas e comparadas. Trataremos agora da aplicação e interpretação e aplicação dos termos $V_{\text{máx}}$ e K_m .

Um método gráfico simples para se obter um valor aproximado para o K_m está mostrado na Figura 8-12. Um procedimento mais conveniente, usando o gráfico dos duplos recíprocos, está apresentado na Adendo 8-1. O K_m pode variar muito de enzima para enzima e até mesmo para diferentes substratos de uma mesma enzima (Tabela 8-6). O termo K_m muitas vezes é empregado (inadequadamente) como uma indicação da afinidade da enzima pelo seu substrato. O significado real do K_m depende de aspectos específicos do mecanismo de reação, tais como o número e as velocidades relativas dos passos individuais da reação.

Para reações com duas etapas,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (8-24)$$

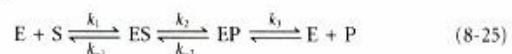
Quando k_2 é limitante da velocidade, $k_2 \ll k_{-1}$ e K_m se reduzem a k_{-1}/k_1 , que é definida como a **constante de dissociação**, K_d , do complexo ES. Nos casos em que essas condições prevalecem, o K_m representa uma medida da afinidade da enzima pelo substrato no complexo ES. Entretanto, essas condições não se aplicam para a maioria das enzimas. Algumas vezes $k_2 > k_{-1}$ e então $K_m = k_2/k_1$. Em outros casos, k_2 e k_{-1} são comparáveis e K_m permanece como uma função mais complexa das três constantes de velocidade (Eq. 8-24). Nesse caso, a equação de Michaelis-Menten e o comportamento característico da saturação da enzima ainda são válidos, mas o K_m não pode ser considerado como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato. Ainda mais comuns são os casos em que a reação ocorre por meio de etapas múltiplas após a formação do complexo ES. O K_m então se torna uma função muito complexa de muitas constantes de velocidade.

Tabela 8-6 – Valores de K_m para algumas enzimas e substratos

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25
Hexoquinase (cérebro)	ATP	0,4
	D-glicose	0,05
	D-frutose	1,5
Anidrase carbônica	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-benzoiltirosinâmida	2,5
β -galactosidase	D-lactose	4,0
Treonina desidratase	L-treonina	5,0

A V_m também varia muito de uma enzima para outra. Se uma enzima reage de acordo com o mecanismo de duas etapas Michaelis-Menten, V_m é equivalente a $k_2[\text{E}_t]$, onde k_2 é a etapa limitante da velocidade. Entretanto, o número de etapas de reação e a identidade da(s) etapa(s) limitante(s) da velocidade podem variar de enzima para enzima. Por exemplo, considere uma situação muito comum na qual a liberação do produto,

$\text{EP} \rightarrow \text{E} + \text{P}$, é limitante da velocidade. Nos instantes iniciais da reação (quando a $[\text{P}]$ é baixa), a reação global pode ser descrita pelo esquema



Neste caso, a maior parte da enzima está na forma EP em condições de saturação e $V_{\text{máx}} = k_3[\text{E}_t]$. É útil definir uma constante mais geral, k_{cat} , para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima em condições de saturação. Se existirem várias etapas na reação enzimática e uma delas for visivelmente limitante da velocidade, k_{cat} é equivalente à constante de velocidade da etapa limitante. Para a reação da Equação 8-10, $k_{\text{cat}} = k_2$. Para a reação da Equação 8-25, $k_{\text{cat}} = k_3$. Quando várias etapas são parcialmente limitantes da velocidade, k_{cat} pode se transformar em uma função complexa de várias das constantes de velocidade que definem cada etapa individual da reação. Na equação de Michaelis-Menten, $k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}}/[\text{E}_t]$ e a Equação 8-9 se transforma em

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}_t][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad (8-26)$$

A constante k_{cat} é uma constante de velocidade de primeira ordem cuja unidade é o recíproco do tempo. Ela também é chamada de **número de renovação** e é equivalente ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula da enzima, em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada pelo substrato. Os números de renovação de várias enzimas são apresentados na Tabela 8-7.

Tabela 8-7 – Número de renovação (k_{cat}) de algumas enzimas

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40.000.000
Anidrase carbônica	HCO_3^-	400.000
Acetylcolinesterase	Acetylcolina	140.000
β -lactamase	Benzilpenicilina	2.000
Fumarase	Fumarato	800
Proteína RecA (uma ATPase)	ATP	0,4

Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m geralmente são úteis para o estudo e a comparação de diferentes enzimas independentemente de seus mecanismos de reação serem simples ou complexos. Cada enzima apresenta valores ótimos de k_{cat} e K_m que refletem o ambiente celular, a concentração do substrato normalmente encontrado *in vivo* pela enzima e a química da reação que está sendo catalisada.

Os parâmetros k_{cat} e K_m permitem avaliar a eficiência catalítica das enzimas, mas esses parâmetros isoladamente são insuficientes para essa tarefa. Duas enzimas que catalisam reações diferentes podem ter a mesma k_{cat} (número de renovação), embora as velocidades das reações não-catalisadas possam ser diferentes. Dessa forma, o aumento da velocidade provocado pela enzima pode ser muito diferente. Experimentalmente, o K_m de uma enzima tende a ser similar à concentração celular do seu substrato. Uma enzima que atua sobre um substrato presente em uma concentração muito baixa no interior da célula tenderá a ter um K_m muito menor que aquela que atua sobre um substrato que é mais abundante.

A melhor maneira de se comparar a eficiência catalítica de diferentes enzimas ou o número de renovação de diferentes substratos para uma mesma enzima é analisar a relação k_{cat}/K_m para as duas reações. Esse parâmetro, que algumas vezes é denomina-

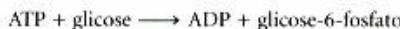
do constante específica, é a constante de velocidade para a conversão de E + S em E + P. Quando $[S] \ll K_m$, a Equação 8-26 se reduz à forma

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m} [E_t][S] \quad (8-27)$$

Neste caso, como V_0 depende da concentração de dois reagentes, $[E_t]$ e $[S]$, ela é uma equação de velocidade de segunda ordem e a constante k_{cat}/K_m é uma constante de velocidade de reação de segunda ordem com unidades $M^{-1}s^{-1}$. Existe um limite superior para k_{cat}/K_m , imposto pela velocidade com que E e S se difundem em uma solução aquosa. Esse limite, controlado pela difusão, é da ordem de 10^8 a $10^9 M^{-1}s^{-1}$, e muitas enzimas apresentam o valor de k_{cat}/K_m próximo a esse intervalo (Tabela 8-8). Tais enzimas são consideradas cataliticamente perfeitas. Note que diferentes valores de k_{cat} e K_m podem produzir relações máximas.

Muitas enzimas catalisam reações que envolvem dois ou mais substratos

Já vimos como a $[S]$ afeta a velocidade de uma reação enzimática simples ($S \rightarrow P$) na qual participa apenas uma molécula de substrato. Entretanto, em muitas reações enzimáticas, duas (algumas vezes mais de duas) moléculas de substratos diferentes se ligam à enzima e participam da reação. Por exemplo, na reação catalisada pela hexoquinase, o ATP e a glicose são as moléculas de substrato e o ADP e a glicose-6-fosfato são os produtos:



As velocidades dessas reações com dois substratos também podem ser analisadas pela abordagem de Michaelis-Menten. A hexoquinase tem um K_m característico para cada um dos seus dois substratos (Tabela 8-6).

As reações enzimáticas com dois substratos usualmente envolvem a transferência de um átomo ou um grupo funcional de um substrato para o outro. Tais reações ocorrem por meio de um ou vários caminhos diferentes. Em alguns casos, ambos os substratos estão ligados à enzima ao mesmo tempo, em algum instante da reação, formando um complexo ternário não-covalente (Fig. 8-13a). Esse complexo pode ser formado pela ligação dos substratos em uma sequência ao acaso ou em uma ordem específica. Nenhum complexo ternário é formado se o primeiro substrato é convertido em produto e se dissocia antes da ligação do segundo substrato. Um exemplo é o mecanismo chamado pingue-pongue ou de dupla-troca (Fig. 8-13b). A cinética do estado estacionário freqüentemente pode ajudar na distinção entre essas possibilidades (Fig. 8-14).

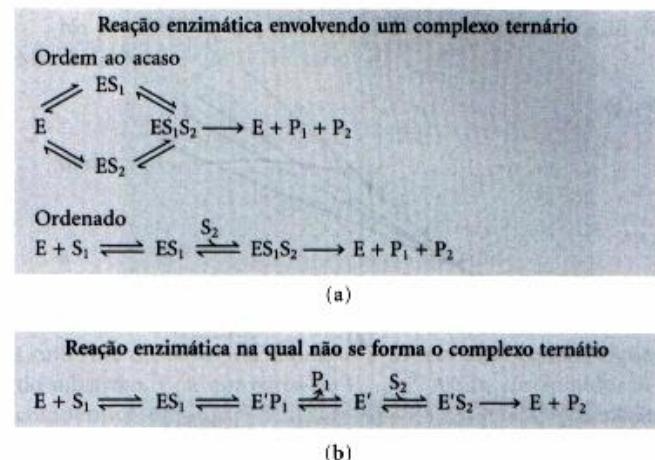


Figura 8-13 – Mecanismos comuns para reações com dois substratos catalisados enzimaticamente. Em (a) a enzima e ambos os substratos se juntam para formar um complexo ternário. Em uma associação ordenada, o substrato 1 deve ser ligado antes, para que o substrato 2 possa se ligar produtivamente. Em uma associação ao acaso, os substratos podem se ligar em qualquer ordem. Em (b), um complexo enzima-substrato se forma, um produto é formado, a enzima modifica a forma um segundo complexo com uma molécula de um outro substrato, e um segundo produto é formado, regenerando a enzima livre. O substrato 1 pode transferir um grupo funcional para a enzima (originando a forma modificada covalentemente, E'), que é subsequentemente transferida para o substrato 2. Esse é o mecanismo chamado pingue-pongue ou de dupla-troca.

A cinética de estado pré-estacionário pode fornecer evidências para etapas específicas da reação

A cinética enzimática foi introduzida como um método importante para estudar as etapas de uma reação enzimática, bem como foram mencionadas as limitações dos parâmetros cinéticos mais comuns que fornecem tal informação. Os dois parâmetros experimentais mais importantes fornecidos pela cinética de estado estacionário são o k_{cat} e o k_{cat}/K_m . As variações desses parâmetros com a variação do pH e da temperatura podem fornecer informações adicionais a respeito das etapas de uma reação. No caso de reações com dois substratos, a cinética do estado estacionário pode ajudar a determinar se durante a reação é formado um complexo ternário (Fig. 8-14). Um quadro mais completo geralmente requer métodos cinéticos mais sofisticados, que vão além dos objetivos de um texto introdutório. Assim, será introduzida, de forma muito breve, uma das mais importantes abordagens para se estudar o mecanismo de uma reação, a cinética de estado pré-estacionário.

Tabela 8-8 – Enzimas nas quais o valor de k_{cat}/K_m está próximo do limite controlado pela difusão (de 10^8 a $10^9 M^{-1}s^{-1}$)

Enzima	Substrato	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (M)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Acetilcolinesterase	Acetylcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	CO ₂	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO ₃ ⁻	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H ₂ O ₂	4×10^7	1,1	4×10^7
Crotonase	Crotonil CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β -Lactamase	Benzilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

Fonte: Fersht, A (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166. Freeman and Company, New York.

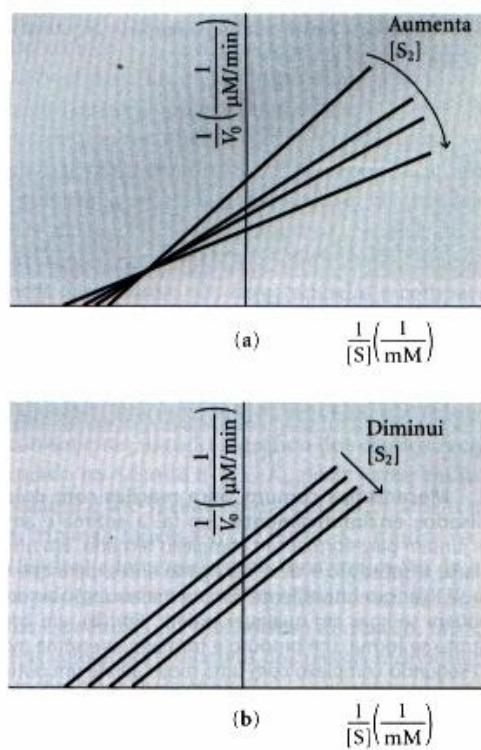


Figura 8-14 – Análise cinética do estado estacionário para reações com dois substratos. Nesses gráficos dos duplos recíprocos (veja Adendo 8-1), a concentração do substrato 1 é variável, enquanto a concentração do substrato 2 é mantida constante. Isso é repetido para vários valores de $[S_2]$, gerando várias retas separadas. A interseção dessas retas indica a formação de um complexo ternário na reação (a); retas paralelas indicam que a reação ocorre por uma via do tipo pingue-porque ou dupla-troca (b).

Uma descrição completa de uma reação catalisada por enzimas requer medidas diretas das velocidades das etapas individuais da reação, como por exemplo a medida da associação da enzima e com o substrato para formar o complexo ES. É durante o estado pré-estacionário que as velocidades de muitas etapas da reação podem ser medidas independentemente. As condições da reação são ajustadas para facilitar a medida dos eventos que ocorrem durante a transformação de uma única molécula de substrato. Uma vez que a fase de estado pré-estacionário em geral é muito curta, freqüentemente são necessárias técnicas especializadas para efetuar uma mistura muito rápida dos reagentes e a amostragem que se segue. Um dos objetivos é a obtenção de um quadro completo e quantitativo das mudanças de energia durante a reação. Conforme mencionado anteriormente, a velocidade das reações e o equilíbrio estão relacionados com as mudanças de energia livre que ocorrem durante a reação. A medida da velocidade das etapas individuais de uma reação revela como a energia é usada por uma enzima específica, o que representa um componente importante do mecanismo global da reação. Em um grande número de casos já é possível medir a velocidade de cada uma das etapas individuais de uma reação enzimática que apresenta várias etapas. Alguns exemplos da aplicação da cinética de estado pré-estacionário estão incluídos nas descrições de enzimas específicas, ainda neste capítulo.

As enzimas são sujeitas à inibição

Os inibidores das enzimas são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares e não é surpreendente que os inibidores das en-

zimas estejam entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos. Por exemplo, a aspirina (acetilsalicílico) inibe a enzima que catalisa o primeiro passo na síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em muitos processos, incluindo alguns que produzem a sensação de dor. O estudo dos inibidores das enzimas tem fornecido valiosas informações a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas. Existem duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis.

A inibição reversível pode ser competitiva, incompetitiva ou mista

Um tipo comum de inibidor reversível é chamado competitivo (Fig. 8-15a). Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor (I) ocupar o

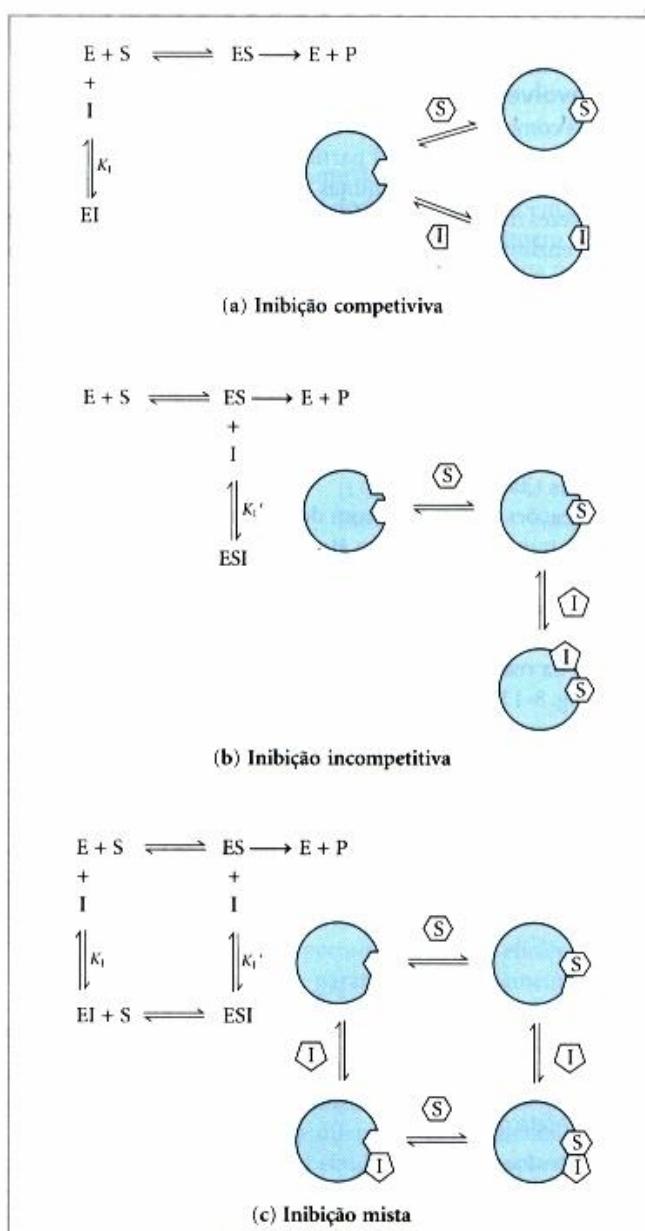


Figura 8-15 – Três tipos de inibição reversível. (a) Os inibidores competitivos se ligam ao centro ativo da enzima. (b) Os inibidores incompetitivos se ligam em regiões diferentes do sítio ativo, mas se ligam apenas ao complexo ES. K_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à enzima, enquanto K_1' é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ao complexo ES. (c) Os inibidores mistos se ligam em regiões diferentes do sítio ativo, mas podem se ligar tanto a E como a ES.

centro ativo da enzima, ele impedirá a ligação do substrato. Os inibidores competitivos são compostos cujas estruturas moleculares freqüentemente lembram a do substrato e que se combinam com a enzima para formar um complexo EI, sem contudo propiciar a catálise. Até mesmo associações rápidas desse tipo afetarão negativamente a eficiência da enzima. Levando-se em consideração a geometria molecular do inibidor, que é parecida com a do substrato, é possível obter conclusões sobre quais partes do substrato normal se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente pela cinética de estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten (Eq. 8-28) fica:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (8-28)$$

onde

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

e

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

A Equação 8-28 descreve as características importantes da inibição competitiva. O termo αK_m (K_m observado na presença do inibidor), determinado experimentalmente, é freqüentemente denominado K_m “aparente”.

Como o inibidor se liga reversivelmente à enzima, a competição pode se tornar favorável ao substrato pela adição de mais substrato. Quando a $[S]$ é muito maior que a $[I]$, a probabilidade de uma molécula do inibidor se ligar à enzima será mínima e a reação exibirá uma V_{\max} normal. Entretanto, a $[S]$ em que $V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$, o K_m aparente, estará aumentada de um fator α na presença do inibidor. Esse efeito no K_m aparente, combinado com a ausência de um efeito em V_{\max} , é diagnóstico da inibição competitiva e facilmente revelado no gráfico dos duplos recíprocos (Adendo 8-2). A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor, K_I , pode ser obtida a partir do mesmo gráfico.

Uma terapêutica baseada na competição pelo centro ativo é usada para tratar pacientes que ingeriram metanol, um solvente encontrado em misturas anticongelantes. A desidrogenase alcoólica do fígado converte o metanol em formaldeído, que é prejudicial à maioria dos tecidos. A cegueira é um resultado freqüente da intoxicação pelo metanol, porque os olhos são particularmente sensíveis ao formaldeído. O etanol compete efetivamente com o metanol como um substrato alternativo para a desidrogenase alcoólica. O efeito do etanol é muito parecido com o de um inibidor competitivo, com a ressalva de que o etanol também é um substrato e a sua concentração diminui com o decorrer do tempo, à medida que a enzima o converte em acetaldeído. Assim, a terapia para o envenenamento com metanol é a infusão endovenosa gradual de etanol, em uma velocidade que mantenha uma concentração controlada na corrente sanguínea durante várias horas. Isso diminui a formação do formaldeído, reduzindo o perigo, enquanto os rins excretam o metanol pela urina sem maiores danos.

As duas outras formas de inibição reversível, incompetitiva e mista, são freqüentemente definidas em termos de enzimas com um único substrato, mas na prática têm sido observadas apenas com enzimas que têm dois ou mais substratos. Um **inibidor incompetitivo** (Fig. 8-15b) se liga em um sítio diferente do sítio ativo do substrato, porém, diferentemente do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES.

Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten se altera para

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (8-29)$$

onde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

e

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Conforme descrito pela Equação 8-29, em altas concentrações do substrato, V_0 se aproxima de V_{\max}/α' . Assim, um inibidor incompetitivo diminui a V_{\max} . O valor do K_m aparente também diminui porque a $[S]$ requerida para alcançar a metade da V_{\max} diminui de um fator α' .

Um **inibidor misto** (Fig. 8-15c) também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto a E como a ES. A equação que descreve a inibição mista é

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (8-30)$$

onde α e α' são definidos como anteriormente. Um inibidor misto geralmente afeta tanto o K_m como a V_{\max} . O caso especial em que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado na prática, é definido classicamente como **inibição não-competitiva**. Analise a Equação 9-30 para perceber por que um inibidor não competitivo afeta a V_{\max} , mas não o K_m .

Na prática, as inibições incompetitiva e mista são observadas somente para enzimas com dois ou mais substratos (por exemplo, S_1 e S_2), e esses substratos são muito importantes na análise experimental de tais enzimas. Se um inibidor se liga ao sítio ocupado por S_1 , ele pode atuar como um inibidor competitivo em experimentos nos quais a $[S_1]$ é variável. Se um inibidor se liga ao sítio normalmente ocupado por S_2 , ele pode atuar como um inibidor misto ou como um inibidor incompetitivo de S_1 . Os modelos de inibição atualmente observados dependem do fato de as ligações de S_1 e S_2 serem ordenadas ou ao acaso. Desse modo, pode-se determinar a ordem com que esses substratos se ligam ao sítio ativo e os produtos são liberados. Frequentemente, o uso de um dos produtos da reação como um inibidor é particularmente informativo. Se somente um dos dois produtos da reação estiver presente, então a reação inversa não ocorrerá. Contudo, um produto geralmente se ligará em alguma parte do sítio ativo atuando como um inibidor. Os estudos de inibição geralmente são elaborados e podem proporcionar uma descrição detalhada do mecanismo de uma reação bissubstrato.

A inibição irreversível é uma ferramenta importante na pesquisa das enzimas e em farmacologia

Inibidores irreversíveis são aqueles que se combinam com um grupo funcional na molécula da enzima ou o destroem ou ainda formam uma associação covalente bastante estável. A formação de uma ligação covalente entre o inibidor e a enzima é muito comum. Os inibidores irreversíveis representam uma ferramenta muito útil no estudo do mecanismo das reações. Os aminoácidos essenciais do sítio ativo que apresentam funções catalíticas importantes freqüentemente são identificados por meio da determinação do aminoácido que está ligado covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada. Um exemplo está mostrado na Figura 8-16.

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é a dos **inibidores suicidas**. Esses compostos são relativamente pouco reativos até se ligarem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um

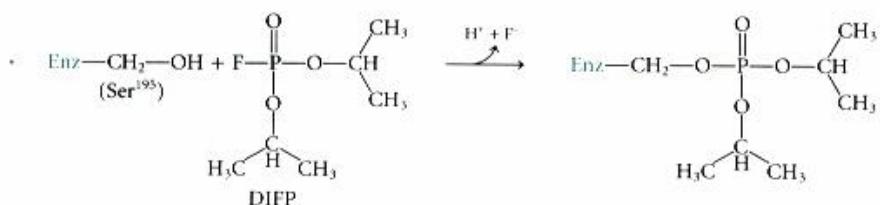


Figura 8-16 – Inibição irreversível. A reação da quimotripsina com o diisopropilfluorofosfato (DIFP) inibe irreversivelmente a enzima. Isso levou à conclusão de que a Ser¹⁹⁵ é o resíduo-chave de serina do sítio ativo da quimotripsina.

Adendo 8-2

Testes cinéticos para a determinação dos mecanismos de inibição

O gráfico dos duplos recíprocos (veja Adendo 8-1) oferece uma forma fácil de determinar se um inibidor enzimático é competitivo, incompetitivo ou misto. Dois conjuntos de experimentos de determinação de velocidade devem ser realizados e, em ambos os conjuntos, a concentração da enzima é mantida constante. No primeiro conjunto, a [S] também é mantida constante, permitindo a medida do efeito do aumento da concentração do inibidor [I] na velocidade inicial V_0 (não mostrado). No segundo conjunto, a [I] é mantida constante, mas a [S] varia. Os resultados são lançados em gráfico na forma de $1/V_0$ versus $1/[S]$.

A Figura 1 mostra um conjunto de gráficos dos duplos recíprocos, um deles obtido na ausência do inibidor e dois outros obtidos em duas concentrações diferentes de um inibidor competitivo. O aumento da [I] resulta em uma família de retas com intercepto comum no eixo $1/V_0$ mas com inclinações diferentes. Como o intercepto no eixo $1/V_0$ é igual a $1/V_{\max}$, observa-se que a V_{\max} permanece inalterada na presença de um inibidor competitivo. Isto é, independentemente da concentração de um inibidor competitivo, uma concentração suficientemente alta do substrato sempre deslocará o inibidor competitivo do sítio ativo da enzima. Acima do gráfico está mostrado o rearranjo da Equação 8-28, na qual o gráfico é baseado. O valor de α pode ser

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

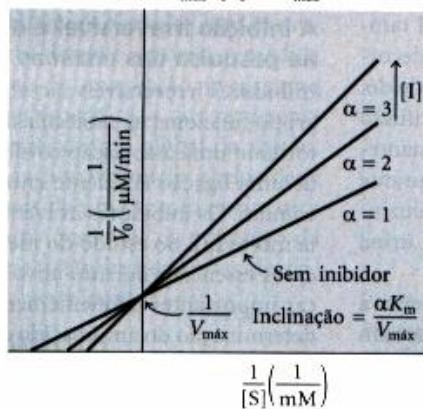


Figura 1 – Inibição competitiva.

calculado pela mudança da inclinação para uma dada [I]. Conhecendo-se a [I] e α , é possível determinar K_I por meio da expressão:

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

Para uma inibição incompetitiva e mista, gráficos similares dos valores de velocidade originam as famílias de retas mostradas nas Figuras 2 e 3. Mudanças nos interceptos dos eixos assinalam mudanças em V_{\max} e K_m .

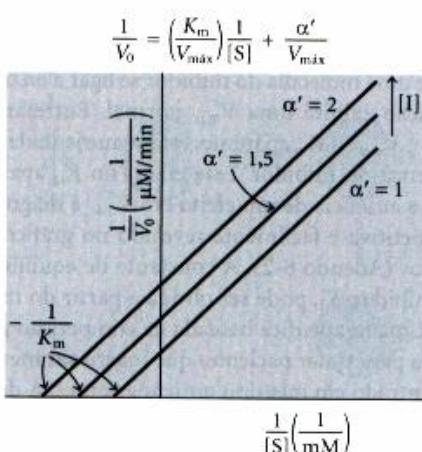


Figura 2 – Inibição incompetitiva.

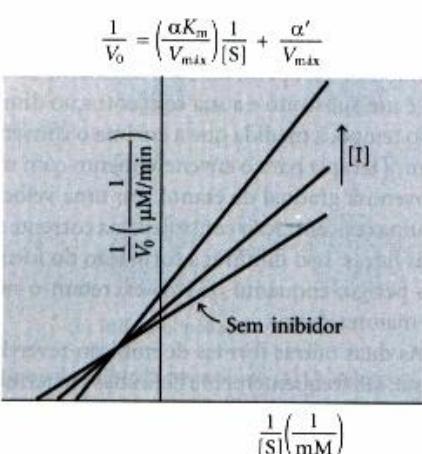


Figura 3 – Inibição mista.

inibidor suicida é desenhado para participar dos primeiros passos químicos da reação enzimática normal. Entretanto, em vez de ser transformado no produto normal, o inibidor é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima. Esses compostos também são chamados de **inibidores com base no mecanismo**, porque eles utilizam o mecanismo da reação enzimática normal para inativar a enzima. Esses inibidores ocupam um papel central no desenvolvimento racional de drogas, uma abordagem moderna para a obtenção de novos agentes farmacêuticos, em que novos substratos são sintetizados baseando-se no conhecimento dos substratos já conhecidos e nos mecanismos das reações. Um inibidor suicida bem planejado é específico para uma única enzima e não é reativo até que esteja dentro do sítio ativo da enzima. Assim, as drogas baseadas nessa estratégia oferecem a grande vantagem de apresentar poucos efeitos colaterais (veja Adendo 22-2).

A atividade enzimática é afetada pelo pH

As enzimas têm um pH ótimo (ou um intervalo de pH) no qual a sua atividade é máxima (Fig. 8-17). Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. Isso não é surpreendente. As cadeias laterais dos aminoácidos do centro ativo podem atuar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da manutenção de certos estados de ionização e, em algum lugar da proteína, as cadeias laterais ionizadas podem desempenhar um papel essencial nas interações que mantêm a estrutura da proteína. Por exemplo, a remoção de um próton de um resíduo de His fora do centro ativo pode eliminar uma interação iônica essencial para a estabilização da conformação ativa da enzima. Uma causa menos comum de sensibilidade ao pH é a titulação de grupos do substrato.

O intervalo de pH no qual a enzima sofre mudanças na atividade pode fornecer uma pista sobre qual aminoácido está envolvido (veja Tabela 5-1). Uma mudança na atividade enzimática ao redor de pH 7,0, por exemplo, em geral reflete a titulação de um resíduo His. Entretanto, os efeitos do pH precisam ser interpretados com certa cautela. No ambiente bem empacotado de uma proteína, o pK_a da cadeia lateral de um aminoácido pode variar significativamente. Por exemplo, uma carga positiva vizinha pode diminuir o valor do pK_a de um resíduo de lisina, enquanto uma carga negativa vizinha pode aumentá-lo. Algumas vezes, esses efeitos resultam em um pK_a deslocado de duas ou mais unidades de pH em relação ao seu valor normal (do aminoácido livre). Na enzima acetoacetato descarboxilase, um resíduo Lis (pK_a normal 10,5) apresenta um pK_a de 6,6 devido a efeitos eletrostáticos de cargas positivas próximas.

Exemplos de Reações Enzimáticas

Este capítulo focalizou até agora os princípios gerais da catálise e introduziu alguns parâmetros cinéticos empregados para descrever a ação das enzimas. Os princípios e os conhecimentos cinéticos estão combinados na Adendo 8-3 que descreve algumas das evidências que indicam que a energia de ligação e a complementariedade do estado de transição são pontos centrais para a catalise enzimática. Vamos examinar agora vários exemplos específicos de reação enzimática.

A compreensão do mecanismo de ação completa de uma enzima purificada requer a identificação de todos os substratos, co-fatores, produtos e reguladores. Além disso, ela requer o conhecimento de: (1) seqüência temporal da ligação das formas intermediárias da reação à enzima, (2) estrutura de cada intermediário e cada estado de transição, (3) velocidade de interconversão dos intermediários, (4) relação estrutural da enzima com cada intermediário, e (5) energia de todos os grupos reagentes e que interagem e contribuem para a formação dos intermediários e estados de transição. Provavelmente não existe nenhuma enzima de que nosso conhecimento atual satisfaça completamente esses requisitos. Não obstante a isso, várias décadas de pesquisa produziram informações mecânicas a respeito de centenas de enzimas e, em alguns casos, essa informação é altamente detalhada.

O mecanismo das reações ilustra princípios

Apresentamos aqui os mecanismos da quimotripsina, hexoquinase e enolase. Essas enzimas foram escolhidas não por serem as mais bem conhecidas ou por abrangerem todas as classes possíveis da química de enzimática, mas porque ilustram claramente alguns princípios gerais explicados neste capítulo. A discussão está concentrada em princípios selecionados juntamente com alguns experimentos cruciais que ajudaram a chamar a atenção sobre esses princípios. Muitos detalhes mecânicos e evidências experimentais foram omitidos e, em nenhum caso, os mecanismos descritos fornecem uma completa explanação para os aumentos da velocidade catalítica provocada por essas enzimas.

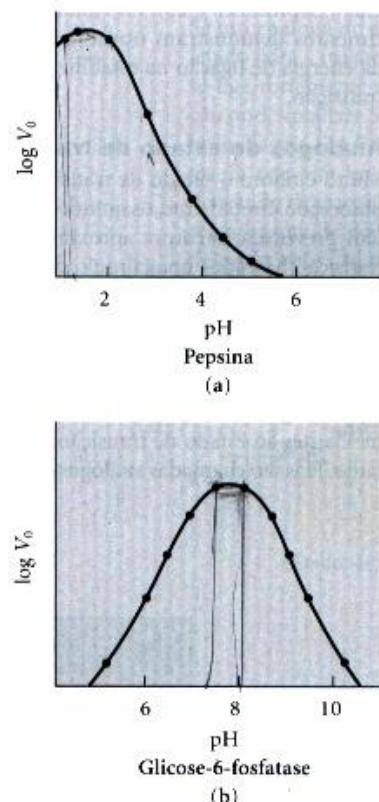


Figura 8-17 – O perfil pH-atividade de duas enzimas. Estas curvas são construídas com resultados de medidas das velocidades iniciais, quando a reação é desenvolvida em tampões com diferentes pH. Como o eixo do pH é uma escala logarítmica que reflete mudanças da ordem de 10 vezes nas concentrações de H^+ , as mudanças em V_0 também são lançadas em uma escala logarítmica. O pH ótimo para a atividade de uma enzima geralmente reflete o ambiente onde a enzima é normalmente encontrada. (a) A pepsina que hidrolisa certas ligações peptídicas das proteínas durante a digestão no estômago tem pH ótimo, de cerca de 1,6. O pH do suco gástrico é da ordem de 1 a 2. (b) A glicose-6-fosfatase dos hepatócitos (células do fígado) com pH ótimo de cerca de 7,8 é responsável pela liberação da glicose no sangue. O pH normal do citosol dos hepatócitos é cerca de 7,2.

Adendo 8-3

Evidências da complementaridade entre a enzima e o estado de transição

O estado de transição de uma reação é difícil de ser estudado porque ele tem um tempo curto de vida. Entretanto, para entender a catálise enzimática é preciso analisar a interação entre a enzima e esse momento efêmero durante a reação. A complementaridade entre a enzima e o estado de transição é virtualmente um requisito para a catálise, já que a colina de energia sobre a qual o estado de transição se situa é que a enzima precisa diminuir, se a catálise ocorrer. Como podem ser obtidas evidências para a complementaridade entre a enzima e o estado de transição? Felizmente existe uma variedade de abordagens novas e antigas para resolver esse problema, cada uma delas fornecendo evidências muito convincentes em apoio a esse princípio geral da catálise enzimática.

Correlações estrutura-atividade

Se as enzimas são complementares aos estados de transição da reação, então alguns grupos funcionais do substrato e da enzima precisam interagir preferencialmente no estado de transição que no complexo ES. A alteração desses grupos deve provocar pouco efeito na formação do complexo ES e, portanto, não deve afetar os parâmetros cinéticos (a constante de dissociação, K_d , ou algumas vezes K_m , se $K_d = K_m$) que refletem o equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$. Entretanto, mudanças desses mesmos grupos devem provocar um grande efeito na velocidade global (k_{cat} ou k_{cat}/K_m) da reação, uma vez que o substrato não apresenta as interações de ligação necessárias para diminuir a energia de ativação.

Um excelente exemplo desse efeito é mostrado na cinética associada a uma série de substratos similares para a quimotripsina (Fig. 1). A quimotripsina normalmente catalisa a hidrólise das ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos aromáticos. Os substratos mostrados na Figura 1 são modelos me-

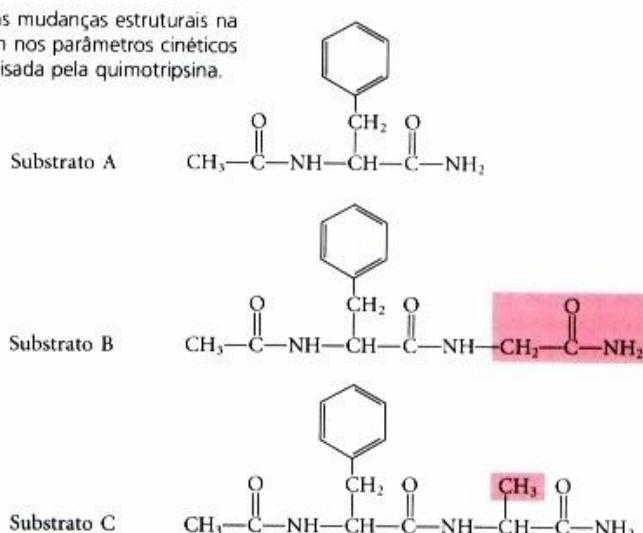
nores, convenientes para os substratos naturais (polipeptídeos longos e proteínas; veja Capítulo 5). Os grupos químicos funcionais adicionados a cada substrato (A para B para C) estão sombreados em vermelho. Conforme mostrado na tabela da Figura 1, a interação entre a enzima e esses grupos funcionais adicionados provoca um efeito mínimo sobre o K_m (assumido como uma imagem de K_d), porém um grande efeito positivo sobre k_{cat} ou k_{cat}/K_m . Isso é o que esperaríamos se a interação contribuisse significativamente para a estabilização do estado de transição. Os resultados também mostram que a velocidade da reação pode ser afetada significativamente pelas interações enzima-substrato que, fisicamente, estão longe das ligações covalentes que serão alteradas na reação enzimática. A quimotripsina é descrita em maiores detalhes mais adiante.

Uma abordagem experimental complementar é modificar a enzima, eliminando certas interações enzima-substrato pela substituição de aminoácidos específicos por meio de mutagênese sítio-dirigida (Capítulos 6 e 29). Os resultados desses experimentos demonstram novamente a importância da energia de ligação na estabilização do estado de transição.

Análogos do estado de transição

Muito embora o estado de transição não possa ser observado diretamente, os químicos freqüentemente têm previsto a estrutura aproximada do estado de transição baseados no acúmulo de conhecimento a respeito dos mecanismos de reação. O estado de transição, por definição, é transitório e tão instável que medidas diretas da interação de ligação entre essas espécies e a enzima são impossíveis. Entretanto, em alguns casos, moléculas estáveis muito semelhantes ao estado de transição podem ser projetadas. Elas são chamadas análogos do estado de transição.

Figura 1 – Efeitos que pequenas mudanças estruturais na molécula do substrato provocam nos parâmetros cinéticos da hidrólise de uma amida catalisada pela quimotripsina.



k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
0,06	31	2
0,14	15	10
2,8	25	114

síção. Em princípio, elas devem se ligar a uma enzima mais firmemente do que o substrato no complexo ES, uma vez que elas devem se ajustar melhor ao sítio ativo (isto é, formar um maior número de interações fracas) que o próprio substrato. A idéia dos análogos do estado de transição foi sugerida por Pauling, na década de 1940, e tem sido averiguada para um certo número de enzimas. Esses experimentos têm a limitação de que um estado de transição análogo nunca pode mimetizar perfeitamente o estado de transição. Entretanto, alguns análogos se ligam à enzima 10^2 a 10^6 vezes mais firmemente que o próprio substrato normal, acarretando uma boa evidência de que os sítios ativos das enzimas são realmente complementares aos estados de transição. O mesmo princípio é atualmente usado, como rotina na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novas drogas. As potentes drogas anti-HIV chamadas inibidores de proteases foram desenvolvidas como análogos que se ligam fortemente ao estado de transição e são direcionadas para o centro ativo da protease do HIV.

Anticorpos catalíticos

Se um análogo do estado de transição pode ser projetado para a reação $S \rightarrow P$, então um anticorpo que se liga fortemente ao análogo do estado de transição pode catalisar $S \rightarrow P$. Os anticorpos (imunoglobulinas; veja Fig. 7-23) são os principais participantes da resposta imunológica. Quando um análogo do estado de transição é empregado como uma proteína ligante de epitopo para estimular a produção de anticorpos, os anticorpos que se ligam a ele são catalisadores potenciais da reação correspondente.

O uso de “anticorpos catalíticos” inicialmente sugerida por William P. Jencks, em 1969, tornou-se prático com o desenvolvimento de técnicas de laboratório para produzir anticorpos idênticos que se ligam a um único antígeno específico (anticorpos monoclonais, veja Capítulo 7).

Trabalhos pioneiros nos laboratórios de Richard Lerner e Peter Schultz resultaram no isolamento de alguns anticorpos monoclonais que catalisam a hidrólise de ésteres ou carbonatos (Fig. 2). Nessas reações, o ataque da água (OH^-) ao carbono da carbonila produz um estado de transição tetraédrico, no qual uma carga parcial negativa se desenvolve no oxigênio da carbonila. Os fosfonatos mimetizam a estrutura e a distribuição de cargas desse estado de transição durante a hidrólise de ésteres, tornando-os bons análogos do estado de transição. Por isso, os fosfonatos são usados nas reações de hidrólise de carbonatos. Os anticorpos que ligam fortemente o fosfonato ou o fosfato aceleram as reações de hidrólise do éster ou carbonato correspondentes, da ordem de 10^3 a 10^4 . Análises estruturais de alguns desses anticorpos catalíticos mostraram que as cadeias laterais de alguns aminoácidos catalíticos estão arranjadas de tal modo que interagem com o substrato, principalmente quando ele se encontra no estado de transição.

Os anticorpos catalíticos geralmente não apresentam a mesma eficiência catalítica das enzimas; entretanto, eles estão começando a ser utilizados na indústria e em medicina. Por exemplo, os anticorpos catalíticos desenvolvidos para degradar a cocaína estão sendo pesquisados como auxílio importante no tratamento da dependência de cocaína.

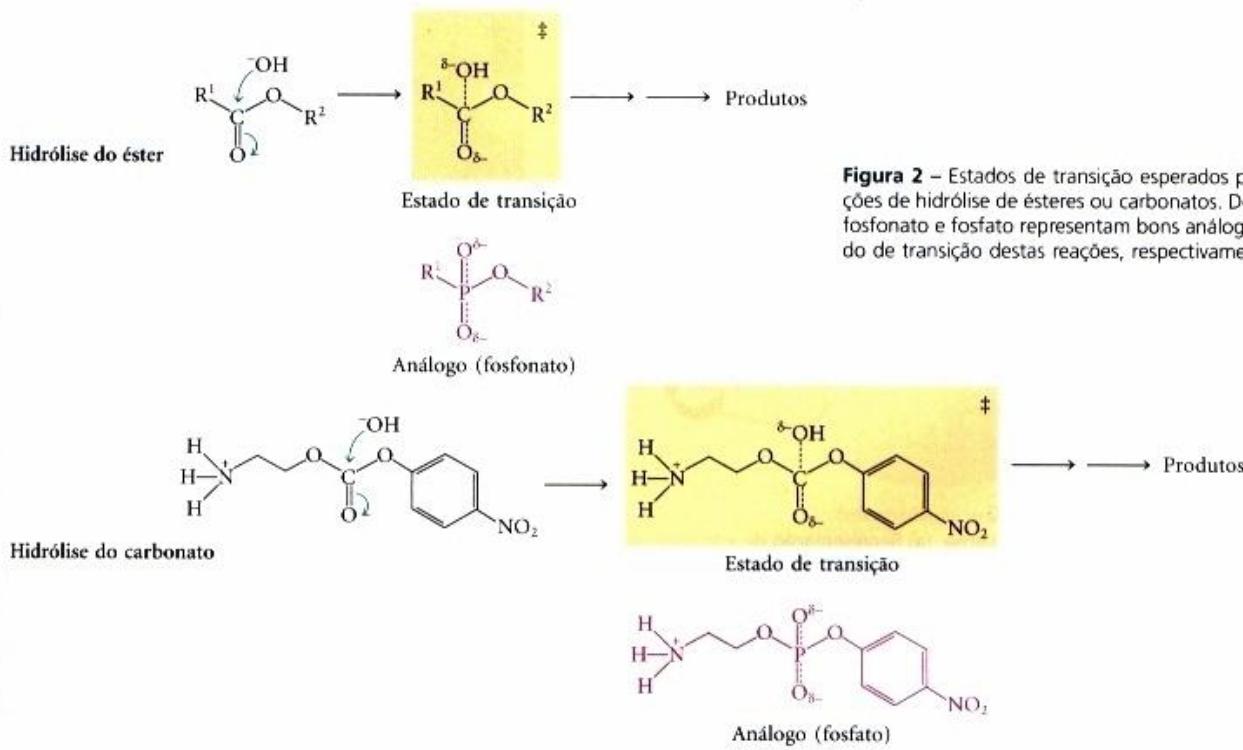


Figura 2 – Estados de transição esperados para as reações de hidrólise de ésteres ou carbonatos. Derivados de fosfonato e fosfato representam bons análogos do estado de transição destas reações, respectivamente.

Quimotripsina. A quimotripsina (M_r 25.000) é uma protease, uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Essa protease é específica para quebrar ligações peptídicas adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos (veja Tabela 5-7). A estrutura tridimensional da quimotripsina é mostrada na Figura 8-18, na qual estão enfatizados os grupos funcionais do sítio ativo. A reação catalisada por essa enzima ilustra o princípio da estabilização do estado de transição e também fornece um exemplo clássico de catálise ácido-base geral e catálise covalente.

A quimotripsina aumenta a velocidade de hidrólise da ligação peptídica de um fator de pelo menos 10^9 . A enzima não catalisa o ataque direto da água sobre a ligação peptídica. Em vez disso, ocorre a formação de um intermediário covalente transitente, a acil-enzima. Desse modo, essa reação tem duas fases principais (Fig. 8-19). Na fase de acilação, a ligação peptídica é quebrada e uma ligação éster é formada entre o carbono da carbonila e a enzima. Na fase de desacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima não-acilada é regenerada. Na fase de acilação o nucleófilo é o oxigênio da Ser¹⁹⁵. Normalmente, a hidroxila da serina está protonada em pH neutro, mas a Ser¹⁹⁵ está ligada por ponte de hidrogênio à His⁵⁷, que também está ligada por ponte de hidrogênio ao Asp¹⁰². Esses três aminoácidos são freqüentemente

chamados de triade catalítica. Quando o oxigênio da Ser¹⁹⁵ ataca o carbono da carbonila da ligação peptídica, a His⁵⁷, que está ligada por pontes de hidrogênio, funciona como uma base geral removendo o próton da serina, enquanto o Asp¹⁰², carregado negativamente, estabiliza a carga positiva que se forma no resíduo de His. Isso previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser¹⁹⁵ e a torna muito mais nucleofílica. A His⁵⁷ pode também agir como um doador de prótons e protonar o grupo amino na porção do substrato que foi deslocada (o grupo que sai). Um conjunto semelhante de transferências de prótons ocorre no passo de desacilação.

Enquanto o oxigênio da Ser¹⁹⁵ ataca o grupo carbonila do substrato, é formado um intermediário de vida muito curta, no qual o oxigênio da carbonila adquire uma carga negativa. Essa carga é formada dentro de uma cavidade na enzima, chamada de fenda oxiânon, e estabilizada por pontes de hidrogênio proporcionadas pelos nitrogênios dos grupos amida de duas ligações peptídicas do esqueleto da quimotripsina. Uma dessas pontes de hidrogênio ocorre apenas nesse intermediário e nos estados de transição de sua formação e quebra, reduzindo assim a energia necessária para atingir esses estados. Este é um exemplo do uso da energia de ligação na catálise.

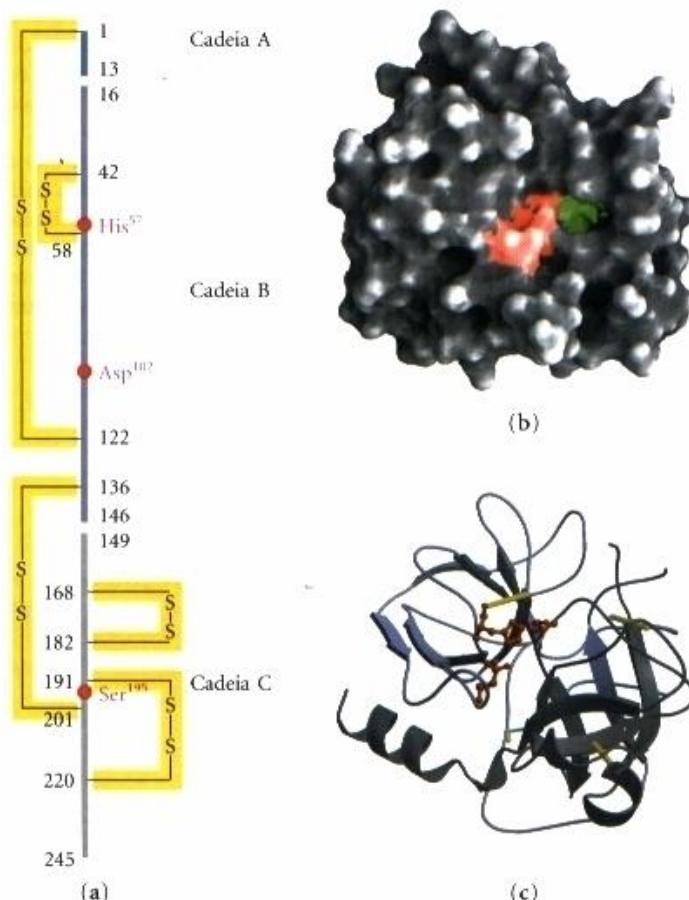


Figura 8-18 – Estrutura da quimotripsina. (a) Representação da estrutura primária mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos de aminoácidos cruciais para a catálise. A proteína consiste de três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. A numeração dos resíduos (14, 15, 147 e 148 não mostrados) está explicada na Figura 8-31. Os aminoácidos do sítio ativo estão agrupados na estrutura tridimensional. (b) Representação da enzima enfatizando sua superfície. A fenda em que a cadeia lateral do aminoácido aromático do substrato está ligada é mostrada em verde. Os resíduos-chave do centro ativo, incluindo a Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰², são mostrados em vermelho. O papel desses resíduos na catálise está ilustrado na Figura 8-19. (c) O esqueleto polipeptídico da quimotripsina como uma estrutura em fita. As pontes dissulfeto são mostradas em amarelo; as cadeias A, B e C são coloridas como mostradas em (a). (d) Uma vista completa do sítio ativo com o substrato (verde) ligado. Dois dos resíduos do centro ativo, Ser¹⁹⁵ e His⁵⁷, (vermelho) são parcialmente visíveis. A Ser¹⁹⁵ ataca o grupo carbonila do substrato (o oxigênio é mostrado em púrpura) e a carga negativa que se desenvolve no oxigênio é estabilizada pela cavidade oxiânon (nitrogênios da ligação amida mostrados em alaranjado), conforme explicado na Figura 8-19. No substrato, a cadeia lateral do aminoácido aromático e o nitrogênio amida da ligação peptídica que será quebrada (projetando-se na direção do leitor e projetando a trajetória do resto da cadeia polipeptídica do substrato) estão mostrados em azul.

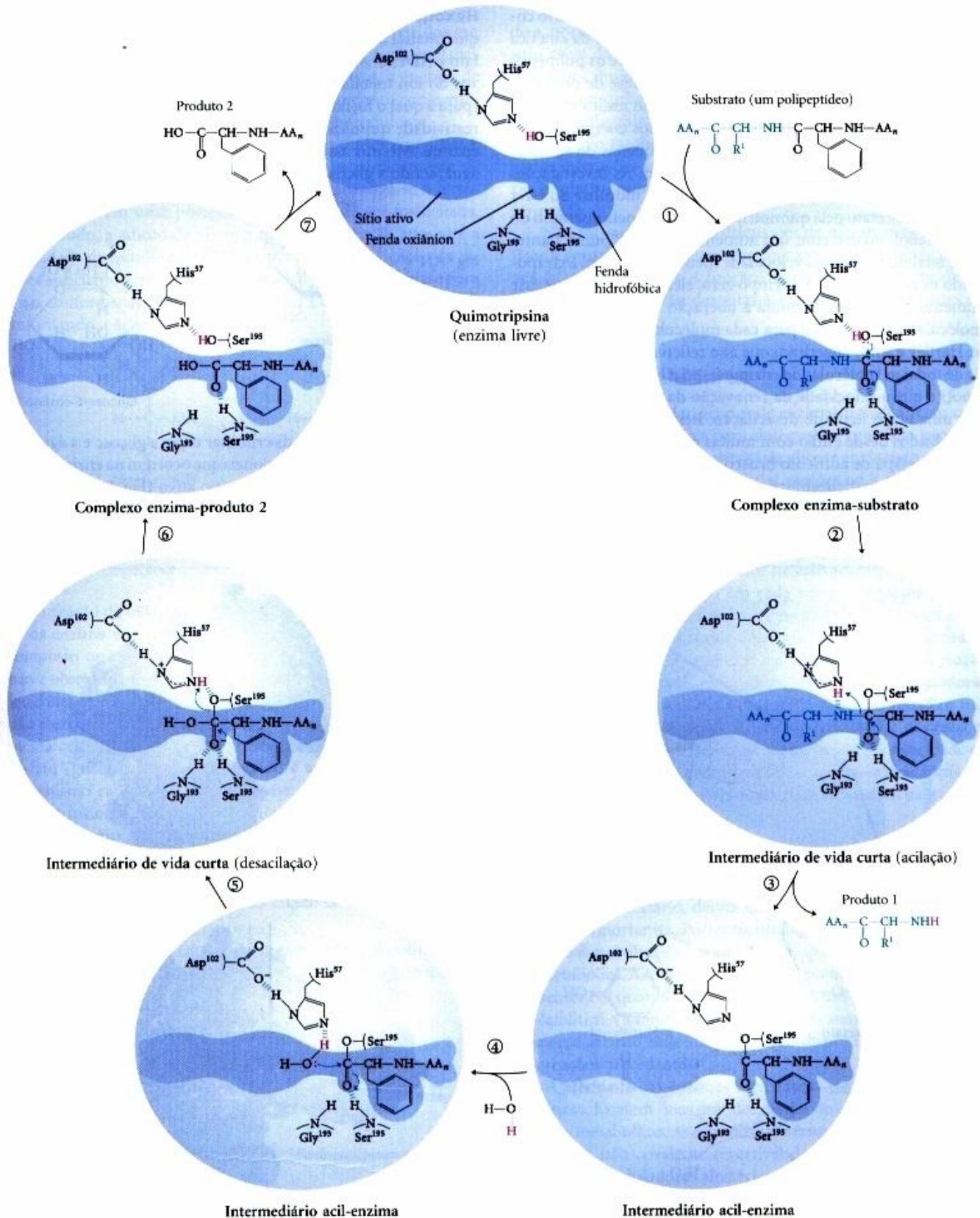


Figura 8-19 – Passos na hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina. O substrato (um polipeptídeo ou proteína) está ligado no sítio ativo. A ligação peptídica a ser quebrada é posicionada pela ligação da cadeia lateral do aminoácido hidrofóbico adjacente (um resíduo de fenilalanina, neste exemplo) em uma fenda hidrofóbica especial na enzima. A reação consiste de duas fases. Nas etapas ① a ③, a formação do intermediário covalente acil-enzima está associada à hidrólise da ligação peptídica (fase de acilação). Nas etapas ④ a ⑦, a desacilação regenera a enzima livre (fase de desacilação). Em ambas as fases, o oxigênio da carbonila do substrato adquire uma carga negativa no intermediário tetraédrico. A carga é estabilizada por pontes de hidrogênio entre os nitrogênios amida da Gly¹⁹³ e da Ser¹⁹⁵. A ponte de hidrogênio com a Gly¹⁹³ é formada apenas nesse intermediário de curta duração e nos estados de transição que levam à sua formação e decomposição. A desacilação é essencialmente o reverso da acilação, em que a água é usada em substituição ao grupo amino do substrato. Os resíduos de His e Asp cooperam na triade catalítica proporcionando uma catálise básica geral nas etapas ② e ⑤ e uma catálise ácida geral nas etapas ③ e ⑦.

A primeira evidência da existência de um intermediário covalente acil-enzima surgiu de uma aplicação clássica da cinética de estado pré-estacionário. Além da sua ação sobre os polipeptídeos, a quimotripsina também catalisa a hidrólise de pequenas moléculas de amidas e ésteres. Essas reações são muito mais lentas que a hidrólise de peptídeos porque menos energia de ligação está disponível com essas moléculas pequenas de substratos, mas elas são mais fáceis de ser estudadas. As investigações de B.S. Hartley e B.A. Kilby mostraram que a hidrólise do éster *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina, medida pela liberação do *p*-nitrofenol, ocorre com um aumento brusco ("burst") antes de se estabilizar em uma velocidade menor (Fig. 8-20). Extrapolando os resultados para o tempo zero, eles concluíram que esse aumento brusco correspondia à liberação de exatamente uma molécula de *p*-nitrofenol para cada molécula de enzima presente. Hartley e Kilby sugeriram que isso refletia uma acilação rápida de todas as moléculas de enzima (com a liberação de *p*-nitrofenol) e que a velocidade da renovação da enzima era limitada por uma etapa lenta de desacilação. Resultados similares têm sido obtidos desde então com muitas outras enzimas. A observação da etapa de aumento brusco constitui outro exemplo do uso da cinética para decompor uma reação em suas etapas constituintes.

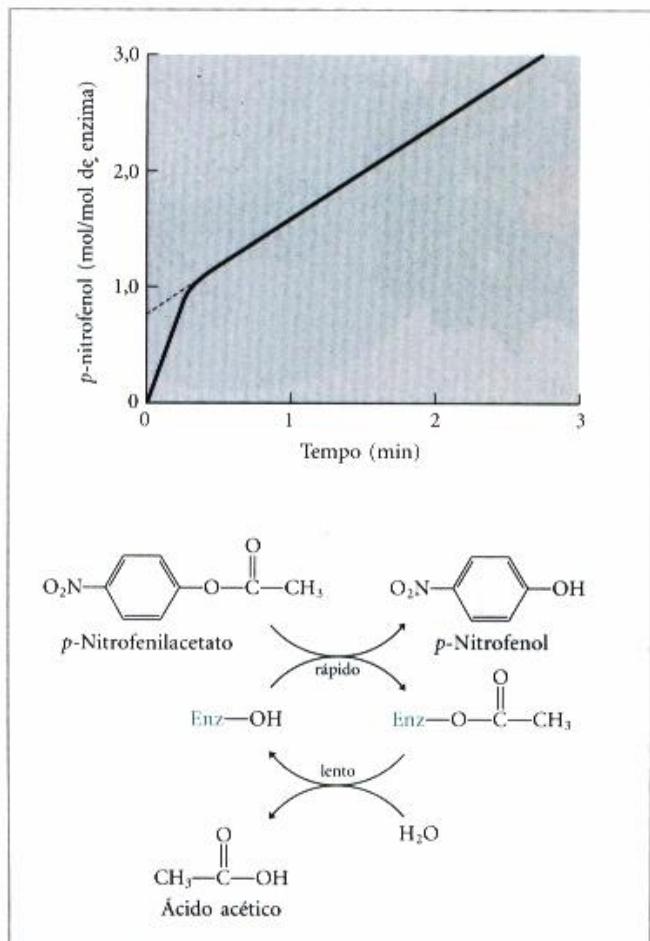
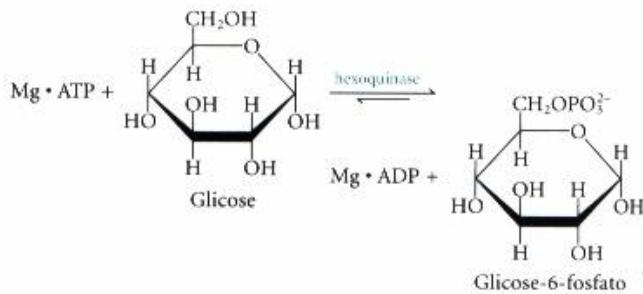


Figura 8-20 – A cinética de estado pré-estacionário evidencia um intermediário acil-enzima. A hidrólise do *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina é medida pela liberação de *p*-nitrofenol (um produto colorido). Inicialmente, uma quantidade de *p*-nitrofenol quase estequiométrica com a quantidade de enzima presente é liberada por meio de um aumento rápido. Isso reflete a fase rápida de acilação da reação. A velocidade subsequente é menor, uma vez que a renovação da enzima é limitada pela velocidade da fase de desacilação, mais lenta.

Hexoquinase. Esta é uma enzima bissubstrato (M_r 100.000) que catalisa a interconversão de glicose e ATP em glicose-6-fosfato e ADP. O ATP e o ADP ligam-se às enzimas como complexos do íon metálico Mg^{2+} . A hidroxila do carbono 6 da glicose (para a qual o fosfato γ do ATP é transferido) é similar à água em reatividade química, e a água entra livremente no sítio ativo da enzima. Mesmo assim, a hexoquinase discrimina a glicose da água, sendo a glicose favorecida por um fator de 10^6 .



A hexoquinase pode discriminar entre a glicose e a água devido às mudanças conformacionais que ocorrem na enzima quando o substrato correto se liga ao sítio ativo (Fig. 8-21). Assim, a hexoquinase representa um excelente exemplo de ajuste induzido.

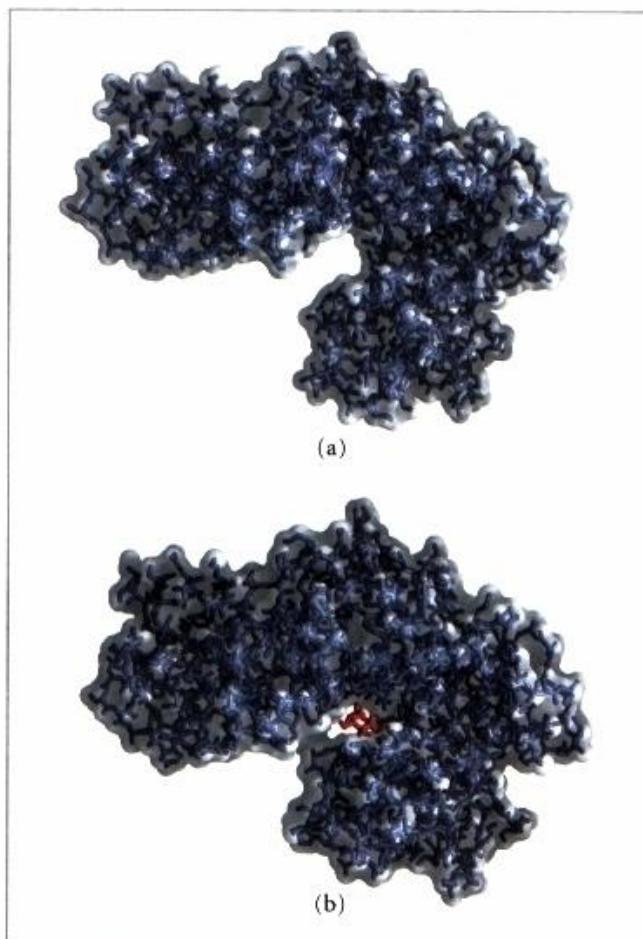
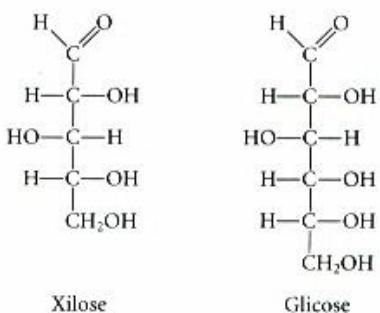


Figura 8-21 – Ajuste induzido na hexoquinase. As extremidades da hexoquinase, uma enzima em forma de U (a), atuam como pinça devido a uma mudança conformacional induzida pela ligação da D-glicose (vermelho) (b).

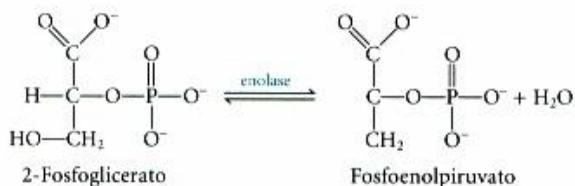
Quando a glicose não está presente, a enzima está em uma conformação inativa, com as cadeias laterais dos aminoácidos em uma posição inadequada para a reação. Quando a glicose (mas não a água) e o ATP · Mg se ligam ao sítio ativo, a energia de ligação derivada dessa interação induz uma mudança conformativa para a forma cataliticamente ativa da hexoquinase.

Essa conclusão tem sido reforçada por estudos cinéticos. A xilose, um açúcar de cinco carbonos, estereoquimicamente similar à glicose mas com um carbono a menos, liga-se à hexoquinase mas em uma posição onde não pode ser fosforilada. Desse modo, a adição de xilose à mistura de reação aumenta a velocidade de hidrólise do ATP. Evidentemente, a ligação da xilose é suficiente para induzir uma mudança na hexoquinase para a sua conformação ativa e, desse modo, a enzima é “enganada”, fosforilando a água.



A reação da hexoquinase também ilustra que a especificidade da enzima não é apenas um simples caso de ligação de um composto ou outro. No caso da hexoquinase, a especificidade não é observada na formação do complexo ES, mas sim nas velocidades relativas das etapas catalíticas subsequentes. A água não é excluída do centro ativo, mas a velocidade da reação aumenta consideravelmente na presença de um grupo aceptor de fosfato (glicose). O ajuste induzido é apenas um aspecto do mecanismo catalítico da hexoquinase: do mesmo modo que a quimotripsina, a hexoquinase utiliza várias estratégias catalíticas. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos do centro ativo (aqueles posicionados pelas mudanças conformativas resultantes da ligação do substrato) participam de uma catálise ácido-base geral e da estabilização do estado de transição.

Enolase. Esta enzima catalisa uma etapa da via glicolítica (Capítulo 15), a desidratação reversível do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:



A enolase de levedura (M_r , 96.000) é um dímero com 436 resíduos de aminoácidos por subunidade. A reação da enolase ilustra um tipo de catálise por íon metálico e proporciona um exemplo adicional de catálise ácido-base geral e estabilização do estado de transição. A reação ocorre em duas etapas (Fig. 8-22a). O resíduo Lys³⁴⁵ atua como um catalisador básico geral, retirando um próton do carbono 2 do 2-fosfoglicerato na primeira etapa. O Glu²¹¹ atua como um catalisador ácido geral, doando um próton para o grupo —OH que é removido da molécula na segunda etapa.

O próton do carbono 2 do 2-fosfoglicerato não é muito ácido e, portanto, ele não é removido rapidamente. Entretanto, no sítio ativo da enzima, o 2-fosfoglicerato é submetido a fortes interações iônicas com dois íons Mg²⁺ ligados (Fig. 8-22b), o que torna o carbono 2 mais ácido (diminuindo seu pK_a) e mais fácil de se abstrair. A formação de pontes em outros resíduos do centro ativo também contribui para o mecanismo global. As várias interações estabilizam efetivamente tanto o intermediário enolato como o estado de transição que precede a sua formação.

Não foi incluída nestas discussões de mecanismos enzimáticos a contribuição especial das coenzimas na atividade catalítica de muitas enzimas. A função das coenzimas é quimicamente variada, e elas serão descritas à medida que constatadas na Parte III deste livro.

Enzimas Reguladoras

No metabolismo celular, grupos de enzimas trabalham em conjunto em vias seqüenciais para desenvolver um dado processo metabólico, tal como a conversão da glicose em lactato no músculo esquelético por meio de várias reações ou a síntese de um aminoácido a partir de precursores mais simples em uma célula bacteriana, por meio de várias reações. Nesses sistemas enzimáticos, o produto da reação da primeira enzima torna-se o substrato da próxima enzima, e assim sucessivamente.

A maioria das enzimas em cada sistema segue os padrões cinéticos já descritos. Entretanto, em cada via metabólica existe pelo menos uma enzima que determina a velocidade de toda a seqüência, porque ela catalisa a reação mais lenta ou a reação limitante da velocidade. Além disso, essas **enzimas reguladoras** têm sua atividade catalítica aumentada ou diminuída em resposta a determinados sinais. Ajustes na velocidade das reações catalisadas pelas enzimas e consequentemente na velocidade da seqüência metabólica permitem à célula acertar as mudanças nas necessidades de energia e de biomoléculas requeridas para o crescimento e reparo.

Em muitos sistemas multienzimáticos, a primeira enzima da seqüência é uma enzima reguladora. Catalisar, ainda que somente algumas reações de uma via metabólica que leva a um produto desnecessário, desvia energia e metabólitos de processos mais importantes. Portanto, um lugar excelente para regular uma via metabólica é no ponto de comprometimento da seqüência metabólica. As outras enzimas na seqüência estão usualmente presentes em quantidades que fornecem um excesso de atividade catalítica. Geralmente elas promovem suas reações tão rapidamente quanto seus substratos são disponibilizados a partir das reações precedentes.

A atividade das enzimas reguladoras é modulada de várias maneiras. Existem duas grandes classes de enzimas reguladoras nas vias metabólicas. As **enzimas alostéricas** funcionam por meio da ligação não-covalente reversível de compostos reguladores chamados **moduladores alostéricos**, que geralmente são pequenos metabólitos ou co-fatores. Outras enzimas são reguladas por meio de uma modificação covalente reversível. Ambas as classes de enzimas reguladoras tendem a apresentar subunidades múltiplas e, em alguns casos, os sítios reguladores e o sítio ativo estão em subunidades separadas.

Existem pelo menos outros dois mecanismos de regulação da atividade enzimática. Algumas enzimas são estimuladas ou inibidas quando estão ligadas por outras proteínas regulatórias. Outras são ativadas quando segmentos peptídicos são removidos por meio de uma clivagem proteolítica. Diferentemente da

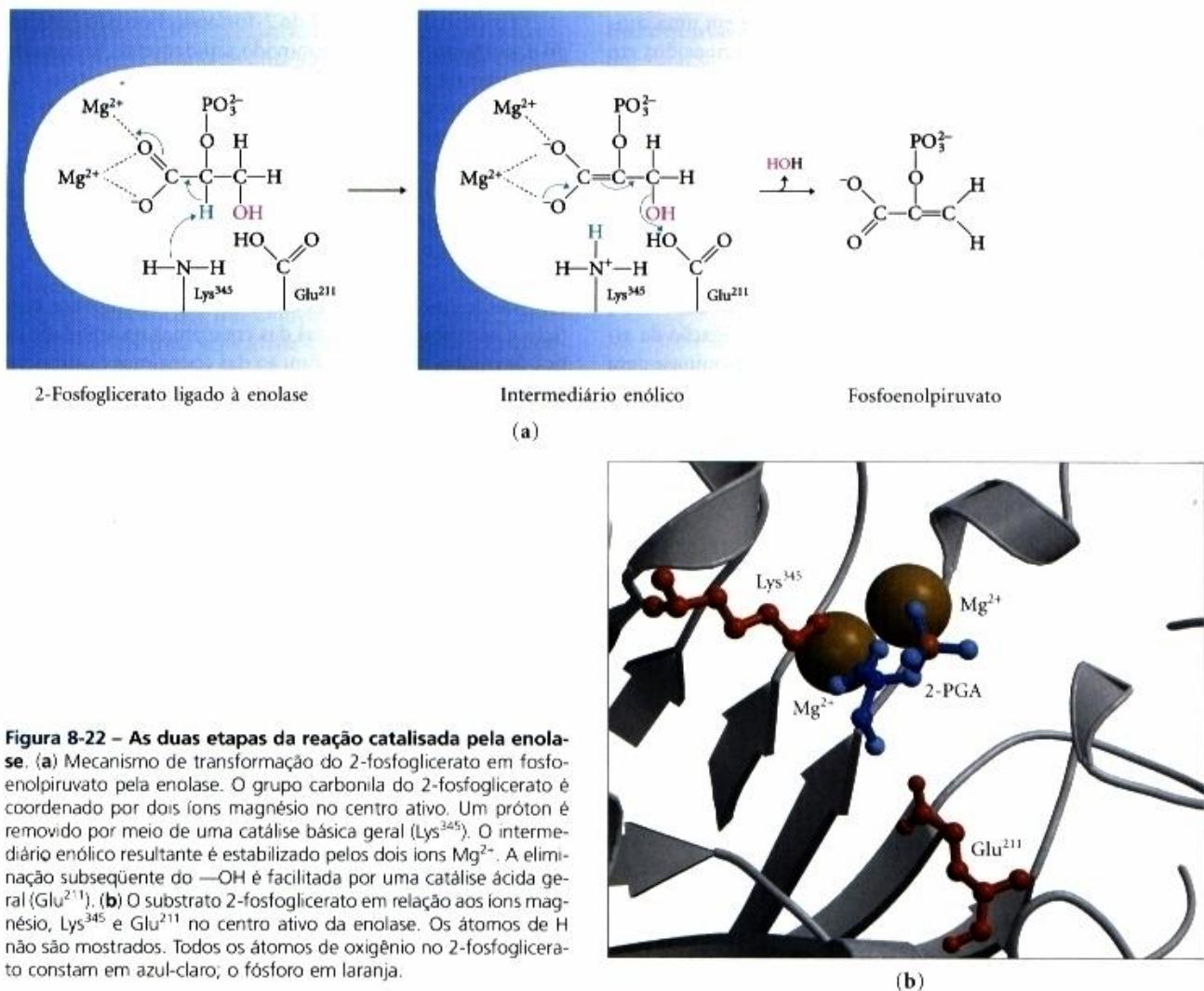


Figura 8-22 – As duas etapas da reação catalisada pela enolase. (a) Mecanismo de transformação do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato pela enolase. O grupo carbonila do 2-fosfoglicerato é coordenado por dois íons magnésio no centro ativo. Um próton é removido por meio de uma catálise básica geral (Lys^{345}). O intermediário enólico resultante é estabilizado pelos dois íons Mg^{2+} . A eliminação subsequente do $-\text{OH}$ é facilitada por uma catálise ácida geral (Glu^{211}). (b) O substrato 2-fosfoglicerato em relação aos íons magnésio, Lys^{345} e Glu^{211} no centro ativo da enolase. Os átomos de H não são mostrados. Todos os átomos de oxigênio no 2-fosfoglicerato constam em azul-claro; o fósforo em laranja.

regulação mediada por um efetor, a regulação por meio de uma quebra proteolítica é irreversível. Exemplos importantes desses dois mecanismos são encontrados em processos fisiológicos, tais como a digestão, a coagulação sanguínea, a ação hormonal e o processo da visão.

O crescimento celular e a sobrevivência dependem do uso eficiente dos recursos disponibilizados pelas enzimas reguladoras. Nenhuma regra única governa a ocorrência dos diferentes tipos e regulação nos diferentes sistemas. De um certo modo, a regulação alostérica (não-covalente) permite um ajuste fino das vias metabólicas que são requeridas continuamente, mas em diferentes níveis de atividade, à medida que condições celulares mudam. A regulação por modificação covalente pode ser tudo ou nada — principalmente no caso de quebra proteolítica — ou pode permitir mudanças tênues na atividade. Múltiplos tipos de regulação são observados em um grande número de enzimas reguladoras. O restante deste capítulo será destinado à regulação das enzimas.

As enzimas alostéricas sofrem mudanças conformacionais em resposta à ligação do modulador

Conforme visto no Capítulo 7, as proteínas alostéricas são aquelas que apresentam “outras formas” ou conformações induzidas pela ligação dos moduladores. O mesmo conceito se aplica para determinadas enzimas reguladoras, em que mudanças confor-

macionais induzidas por um ou mais moduladores interconvertem formas mais e menos ativas da enzima. Os moduladores das enzimas reguladoras podem ser tanto inibidores como estimuladores. Geralmente o próprio substrato é um ativador da enzima. As enzimas reguladoras cujos substrato e modulador são idênticos são chamadas homotrópicas. O efeito é similar à ligação do O_2 à hemoglobina, uma proteína que não tem atividade enzimática (Capítulo 7). A ligação do substrato causa mudanças conformacionais que afetam a subsequente atividade dos outros sítios na proteína. Quando o modulador é uma molécula diferente do substrato, a enzima é chamada heterotrópica.

É importante que os moduladores alostéricos não sejam confundidos com os inibidores incompetitivos e mistos. Embora estes últimos se liguem a um segundo sítio na enzima, eles não promovem necessariamente mudanças conformacionais entre as formas ativa e inativa. Além disso, os efeitos cinéticos são distintos.

As propriedades das enzimas alostéricas são significantemente diferentes das das meras enzimas não-reguladoras. Algumas das diferenças são estruturais. Além do sítio ativo, as enzimas alostéricas apresentam um ou mais sítios reguladores ou alostéricos para a ligação do modulador (Fig. 8-23). Tal como o centro ativo é específico para o seu substrato, cada sítio regulador é específico para seu modulador. Nas enzimas que apresentam vários moduladores geralmente existem sítios de ligação específicos diferentes para cada um deles. Nas enzimas homotrópicas, o centro ativo e o sítio regulatório são os mesmos.

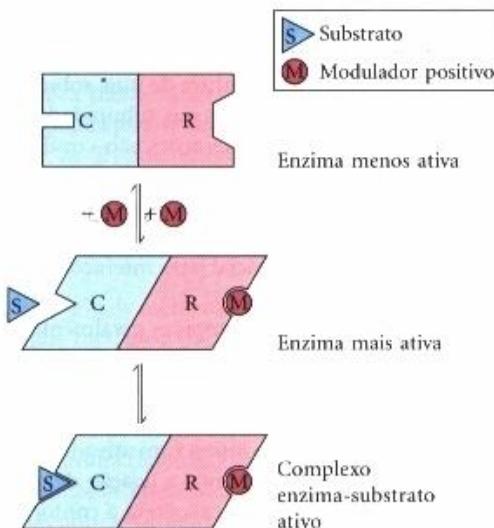


Figura 8-23 – Interações entre as subunidades em uma enzima allostérica e interações com os inibidores e ativadores. Em muitas enzimas allostéricas, o sítio de ligação do substrato e o(s) sítio(s) de ligação dos moduladores estão em subunidades diferentes, a subunidade catalítica (C) e a reguladora (R), respectivamente. A ligação de um modulador (M) positivo (estimulador) ao seu sítio específico na subunidade reguladora é comunicada à subunidade catalítica por meio de uma mudança conformacional. Essa mudança ativa a subunidade catalítica que passa a ligar o substrato (S) com alta afinidade. Quando ocorre a dissociação do modulador da subunidade reguladora, a enzima reverte para sua forma inativa ou menos ativa.

As enzimas allostéricicas geralmente são maiores e mais complexas que as enzimas não-alostéricicas. A maioria apresenta duas ou mais cadeias polipeptídicas ou subunidades. A aspartato transcarbamilase, que catalisa a primeira reação da biossíntese de nucleotídeos de pirimidina (Capítulo 22), apresenta 12 cadeias polipeptídicas organizadas em subunidades catalíticas e reguladoras. A Figura 8-24 mostra a estrutura quaternária dessa enzima, deduzida de análise de raios X.

A etapa reguladora em muitas vias é catalisada por uma enzima allostérica

Em alguns sistemas multienzimáticos, a enzima reguladora é inibida especificamente pelo produto final da via sempre que a sua concentração excede as necessidades celulares. Quando a reação catalisada pela enzima reguladora diminui, todas as enzimas subsequentes operam em velocidades reduzidas, uma vez que as concentrações de seus substratos diminuem. A velocidade de produção do produto final da via é, portanto, balanceada com as necessidades celulares. Esse tipo de regulação é chamado de **inibição por retroalimentação**. O aumento da concentração do produto final da via basicamente desacelera toda a via.

Um dos primeiros exemplos de inibição allostérica por retroalimentação descrito foi o sistema enzimático de bactéria que catalisa a conversão de L-treonina em L-isoleucina (Fig. 8-25). A primeira enzima desse sistema, a L-treonina desidratase, é inibida pela L-isoleucina, o produto da última reação da via. Este é um exemplo de inibição allostérica heterotrópica e a isoleucina é um inibidor muito específico. Nenhum outro intermediário nessa seqüência inibe a treonina desidratase, e nenhuma outra enzima da seqüência é inibida pela isoleucina. A isoleucina não se liga ao sítio ativo, mas a um outro sítio específico na molécula da enzima, o sítio regulador. Essa ligação é do tipo não-covalente e facilmente reversível. Se a concentração de isoleucina diminui, a atividade da treonina desidratase aumenta. Desse modo, a atividade da treonina desidratase responde rápida e reversivelmente às variações da concentração da isoleucina na célula.

As propriedades cinéticas das enzimas allostéricas divergem do comportamento de Michaelis-Menten

As enzimas allostéricas apresentam relações entre V_0 e [S] que diferem da cinética de Michaelis-Menten. Elas apresentam saturação pelo substrato quando [S] é suficientemente grande mas, para algumas enzimas allostéricas, o gráfico de V_0 versus [S] (Fig. 8-26) resulta em uma curva de saturação sigmoidal em vez da curva hiperbólica típica das enzimas não-reguladoras. Embora seja pos-

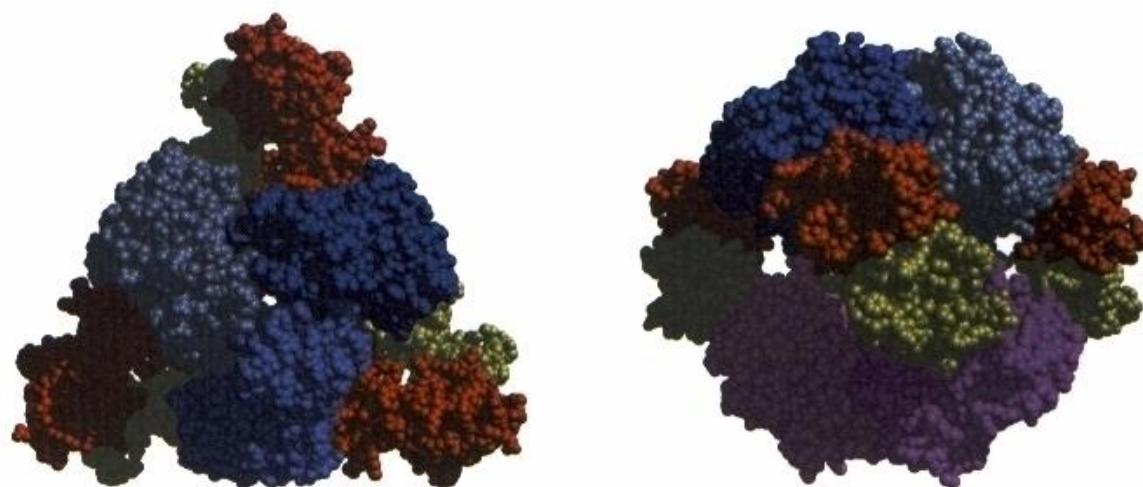


Figura 8-24 – Duas vistas da enzima reguladora aspartato transcarbamilase. Esta enzima reguladora allostérica tem dois arranjos catalíticos agrupados, cada um com três cadeias polipeptídicas catalíticas (sombreados de azul e púrpura), e três arranjos reguladores agrupados, cada um com duas cadeias polipeptídicas reguladoras (vermelho e amarelo). Os arranjos reguladores formam os pontos de um triângulo que rodeia as subunidades catalíticas. Os sítios de ligação para os moduladores allostéricos estão nas subunidades reguladoras. A ligação do modulador provoca grandes modificações na conformação e na atividade da enzima. A função dessa enzima na síntese de nucleotídeos e os detalhes da sua regulação serão discutidos no Capítulo 22. (Cortesia de Ray Steven, Universidade da Califórnia, Berkeley.)

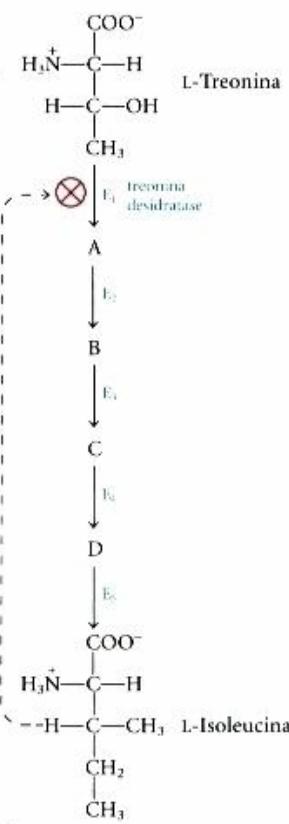


Figura 8-25 – Inibição por retroalimentação. A conversão da L-treonina em L-isoleucina é catalisada por uma seqüência de cinco enzimas (E_1 a E_5). A L-treonina desidratase (E_1) é inibida específica e alostericamente pela L-isoleucina, o produto final da seqüência, mas por nenhum dos quatro intermediários (A a D). A inibição por retroalimentação está indicada pela linha tracejada e pelo símbolo \otimes na seta da reação catalisada pela treonina desidratase, um esquema que é usado neste livro.

sível encontrar um valor de $[S]$ na curva de saturação sigmoidal para a qual V_0 é a metade da velocidade máxima, não se pode referir a ela como designando o K_m , pois a enzima não segue o comportamento hiperbólico de Michaelis-Menten. Como substituto, o símbolo $[S]_{0.5}$ ou $K_{0.5}$ é freqüentemente usado para representar a concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima da reação catalisada por uma enzima allostérica (Fig. 8-26).

O comportamento cinético sigmoidal geralmente reflete interações cooperativas entre múltiplas subunidades protéicas. Em outras palavras, mudanças na estrutura de uma subunidade são traduzidas em mudanças estruturais nas subunidades adjacentes, um efeito que é mediado por interações não-covalentes na(s) interface(s) subunidade-subunidade. Os princípios são muito bem ilustrados pela ligação do O_2 à hemoglobina (Capítulo 7). O comportamento cinético sigmoidal é explicado pelos modelos da simetria ajustada e seqüencial para interações de subunidades (veja Fig. 7-14).

As enzimas alostéricas homotrópicas geralmente apresentam múltiplas subunidades. Conforme salientado anteriormente, o mesmo sítio de ligação em cada subunidade pode funcionar tanto como sítio ativo quanto como sítio regulador. O substrato pode ser um modulador positivo (um ativador) porque as subunidades atuam cooperativamente: a ligação de uma molécula do substrato a um sítio de ligação altera a conformação da enzima e favorece a ligação de outras moléculas do substrato. Isso explica o aumento sigmoidal, e não o hiperbólico, de V_0 com o aumento da $[S]$. Uma característica da cinética sigmoidal é que pequenas mudanças na concentração de um modulador podem ser associadas a grandes mudanças na atividade. Como fica evidente na Figura 8-26a, um aumento relativamente pequeno na $[S]$, na parte ascendente da curva, provoca um aumento comparativamente grande em V_0 .

Para as enzimas alostéricas heterotrópicas, cujo modulador é um metabólito diferente do substrato, é difícil fazer generalizações acerca da forma da curva de saturação pelo substrato. Um ativador pode tornar a curva mais próxima de uma hipérbole, com uma diminuição no $K_{0.5}$ mas sem mudanças em V_{\max} resultando assim em uma maior velocidade de reação para uma concentração fixa de substrato (V_0 é maior para qualquer valor de $[S]$) (Fig. 8-26b, curva superior). Outras enzimas alostéricas heterotrópicas respondem a um ativador por meio de um aumento de V_{\max} com uma pequena variação no $K_{0.5}$ (Fig. 8-26c). Um modulador negativo (um inibidor) pode produzir uma curva de saturação pelo substrato mais sigmoidal, com um aumento no $K_{0.5}$ (Fig. 8-26b, curva inferior). As enzimas alostéricas heterotrópicas podem apresentar diferentes tipos de respostas nas suas curvas de variação da atividade em função da $[S]$ porque várias apresentam moduladores inibidores, várias apresentam moduladores ativadores e várias apresentam ambos os tipos.

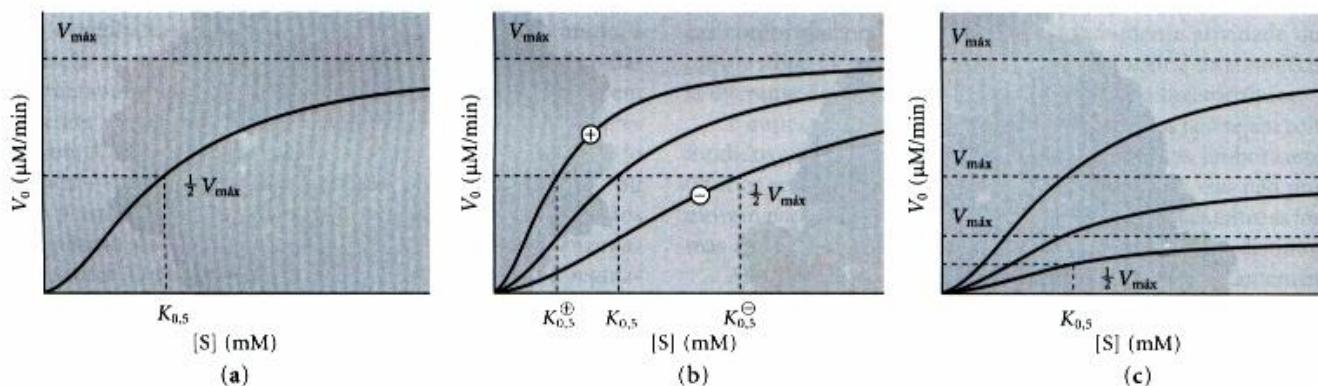


Figura 8-26 – Curvas de variação da atividade em função da concentração do substrato para enzimas alostéricas representativas. Três exemplos de respostas complexas dadas por enzimas alostéricas aos seus reguladores. (a) Curva sigmoidal de uma enzima homotrópica em que o substrato também atua como um modulador positivo (estimulador) ou ativador. Note a semelhança com a curva de saturação da hemoglobina pelo oxigênio (veja Fig. 7-12). (b) Efeitos de um modulador positivo \oplus e um modulador negativo \ominus sobre uma enzima allostérica em que $K_{0.5}$ é alterado sem mudanças na V_{\max} . A curva central mostra a relação entre atividade e concentração do substrato sem um modulador. (c) Tipo menos comum de modulação em que V_{\max} é alterada e $K_{0.5}$ permanece quase constante.

Algumas enzimas reguladoras sofrem modificações covalentes reversíveis

Em uma outra classe importante de enzimas reguladoras, a atividade é regulada por modificação covalente da molécula da enzima. Entre os grupos modificadores estão: fosfato, adenosina monofosfato, uridila monofosfato, adenosina difosfato ribose e grupos metila (Fig. 8-27). Esses grupos geralmente são ligados covalentemente e removidos da enzima reguladora por outras enzimas.

Um exemplo de metilação é a proteína quimiotática aceptora de grupos metila de bactérias. Essa proteína é parte de um sistema que permite uma bactéria mover-se em direção a uma substância atrativa (tal como um açúcar) em solução e se distanciar de uma substância repelente. O agente metilante é o S-adenosilmetionina (adoMet) descrito no Capítulo 18. Uma reação especialmente interessante é a ADP-ribosilação observada em algumas poucas proteínas. A ADP-ribose é derivada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (veja Fig. 10-41). Esse tipo de modificação ocorre para a enzima bacteriana dinitrogenase redutase, resultando na regulação do importante processo de fixação biológica do nitrogênio. Além disso, as toxinas da difteria e do cólera são enzimas que catalisam a ADP-ribosilação (e inativação) de enzimas celulares de grande importância e proteínas. A toxina da difteria age sobre o fator de elongação 2, uma pro-

teína envolvida na biossíntese de proteínas, e o inibe. A toxina do cólera age sobre uma proteína específica (uma proteína G específica que é parte de uma via de sinalização, veja Fig. 13-28), levando fundamentalmente a várias respostas fisiológicas que inclui a perda maciça de fluidos corporais e algumas vezes a morte.

As fosforilações representam a grande maioria das modificações reguladoras conhecidas. Cerca de um terço ou até mesmo a metade de todas as proteínas de uma célula eucariótica é fosforilado. Algumas proteínas apresentam apenas um resíduo fosforilado, outras apresentam vários e algumas poucas apresentam dúzias de sítios para fosforilação. Esse tipo de modificação covalente é fundamental para um grande número de vias reguladoras e por esse motivo será tratado detalhadamente a seguir.

Os grupos fosfato afetam a estrutura e a atividade catalítica das proteínas

A ligação de grupos fosfato a resíduos de aminoácidos específicos de uma proteína é catalisada por proteínas quinases e a remoção desses grupos é catalisada por proteínas fosfatases. A adição de um grupo fosfato a um resíduo de Ser, Thr ou Tyr introduz um grupo volumoso e carregado em uma região que era apenas moderadamente polar. Os oxigênios do grupo fosfato são capazes de formar ligações de hidrogênio com um ou vários gru-

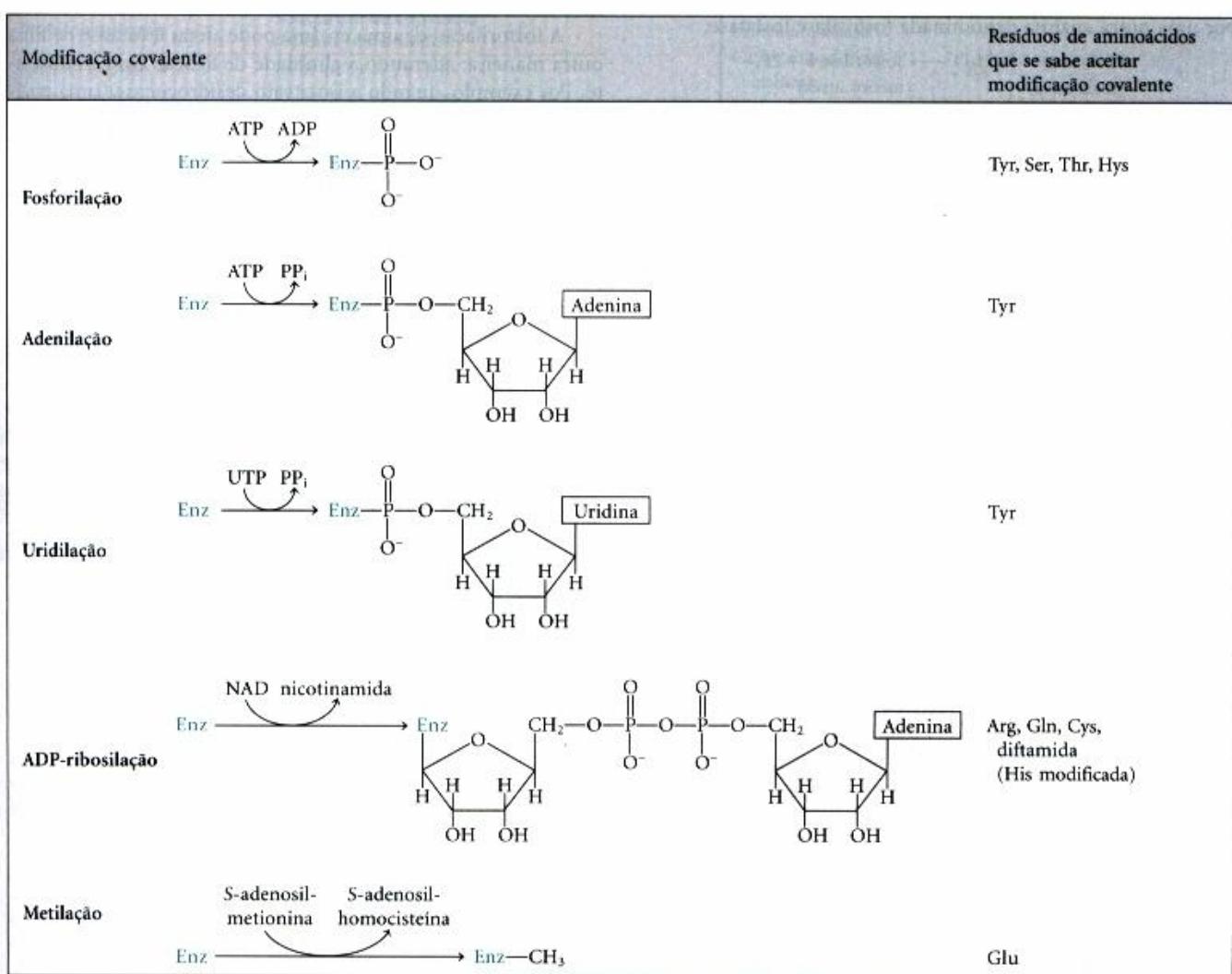
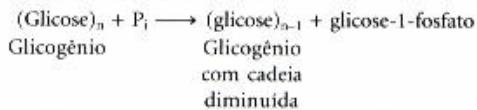


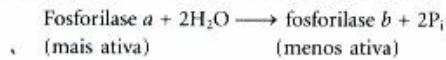
Figura 8-27 – Exemplos de reações de modificação de enzimas.

pos em uma proteína, geralmente os grupos amida do esqueleto peptídico no início de uma α -hélice ou então com grupos guanidino carregados das cadeias laterais da Arg. A dupla carga negativa na cadeia lateral fosforilada também pode repelir grupos vizinhos de resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu). (Nenhuma cadeia lateral de aminoácido não-modificada apresenta duas cargas negativas.) Quando a cadeia lateral modificada está localizada em uma região da proteína que é crítica para a sua estrutura tridimensional, podem-se esperar efeitos dramáticos da fosforilação na conformação da proteína e por conseguinte na ligação do substrato e catálise.

Um exemplo importante de regulação pela fosforilação é observado na glicogênio fosforilase (M_r , 94.500) do músculo e fígado (Capítulo 15) que catalisa a reação:



A glicose-1-fosfato assim formada pode ser usada para a síntese de ATP no músculo ou convertida em glicose livre no fígado. A glicogênio fosforilase ocorre em duas formas: a forma mais ativa ou fosforilase *a* e a forma menos ativa ou fosforilase *b* (Fig. 8-28). A fosforilase *a* tem duas subunidades, cada uma delas com um resíduo de serina específico que é fosforilado no seu grupo hidroxila. Esses resíduos de serina-fosfato são requeridos para a atividade máxima da enzima. Os grupos fosfato podem ser removidos da fosforilase *a* por meio de uma hidrólise efetuada por uma outra enzima denominada fosforilase fosfatase:



Nesta reação a fosforilase *a* é convertida em fosforilase *b* pela quebra de duas ligações covalentes de serina-fosfato, uma em cada subunidade da glicogênio fosforilase.

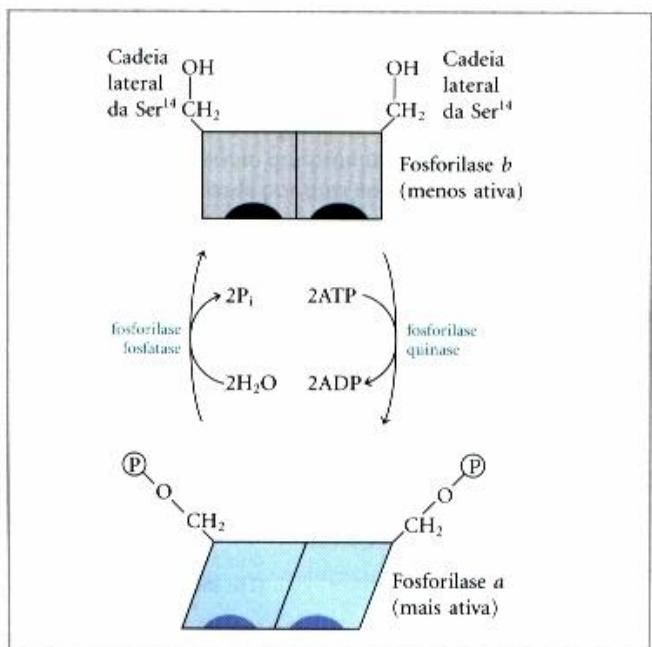
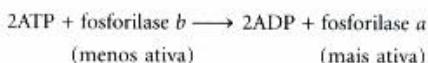


Figura 8-28 – Regulação da atividade da glicogênio fosforilase por modificação covalente. Na forma mais ativa da enzima, fosforilase *a*, um resíduo específico de serina em cada subunidade está fosforilado. A fosforilase *a* é convertida na fosforilase *b*, menos ativa, por meio da perda enzimática desses grupos fosfato que é catalisada pela fosforilase fosfatase. A fosforilase *b* pode ser reconverte (reativada) na fosforilase *a* pela ação da fosforilase quinase.

A fosforilase *b*, por sua vez, pode ser reativada novamente — transformada covalentemente em fosforilase *a* ativa — por uma outra enzima, a fosforilase quinase que catalisa a transferência dos grupos fosfato do ATP para os grupos hidroxila de dois resíduos específicos de serina na fosforilase *b*:



A quebra do glicogênio nos músculos esqueléticos e no fígado é regulada por variações na relação entre as duas formas da glicogênio fosforilase. As formas *a* e *b* da fosforilase diferem nas suas estruturas secundária, terciária e quaternária. O centro ativo sofre mudanças na sua estrutura e, consequentemente, mudanças na sua atividade catalítica à medida que as duas formas se interconvertem.

A regulação da glicogênio fosforilase pela fosforilação ilustra os efeitos da fosforilação sobre a estrutura e a atividade catalítica (Fig. 8-29). No estado não-fosforilado, cada subunidade dessa proteína está enrolada de tal forma a juntar 20 resíduos da extremidade aminoterminal, incluindo um certo número de resíduos básicos, em uma região contendo vários aminoácidos. Isso produz uma interação eletrostática que estabiliza a conformação. A fosforilação da Ser¹⁴ interfere com essa interação, forçando o domínio do grupo aminoterminal para fora do ambiente ácido e para uma conformação que permite a interação entre $\text{P}-\text{Ser}$ e várias cadeias laterais da Arg. Nessa conformação, a enzima é muito mais ativa.

A fosforilação de uma enzima pode afetar a catálise de uma outra maneira: alterando a afinidade de ligação com o substrato. Por exemplo, quando a isocitrato desidrogenase (uma enzima do ciclo do ácido cítrico; Capítulo 16) é fosforilada, a repulsão eletrostática pelo grupo fosfato impede a ligação do citrato (um ácido tricarboxílico) no centro ativo.

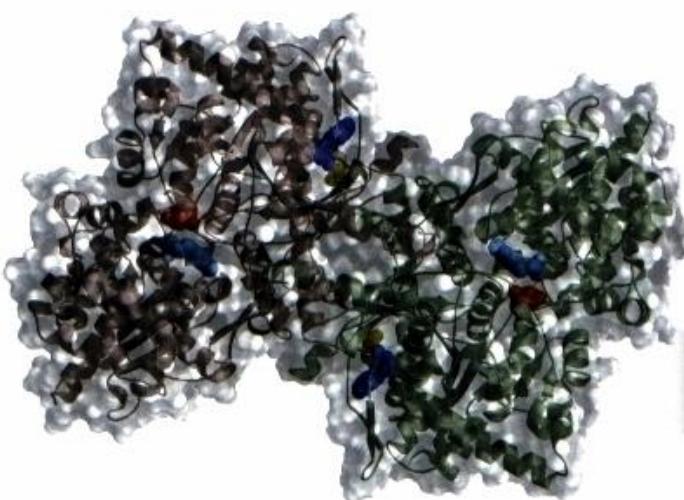


Figura 8-29 – Regulação da glicogênio fosforilase. Devido ao seu papel central no metabolismo intermediário, a glicogênio fosforilase está sujeita a vários níveis de regulação. Esta representação transparente da molécula simétrica da glicogênio fosforilase a mostra os sítios de regulação por modificação covalente (fosforilação da Ser¹⁴, amarelo) e ativação alostérica pelo AMP (azul-escuro) em cada uma das duas subunidades. A glicose (vermelho) está ligada ao sítio ativo. O pirodoxal fosfato (PLP; azul-claro), um derivado da vitamina B₆, é um co-fator ligado à enzima. Na glicogênio fosforilase, o PLP participa na catálise ácido-base geral, um papel não usual para esse co-fator, cujas funções mais típicas serão descritas em detalhe no Capítulo 18. Note quão distantes os sítios reguladores estão do centro ativo da enzima.

As interações entre as subunidades de proteínas estruturais oligoméricas podem ser alteradas pela fosforilação no sítio de interação. Por exemplo, a fosforilação de proteínas do citoesqueleto influencia o seu arranjo em estruturas supramoleculares. Tem sido relatado que a proteína-2, associada a microtúbulos, tem mais de trinta sítios capazes de ser fosforilados.

Fosforilações múltiplas proporcionam um apurado controle regulador

Os resíduos de Ser, Thr ou Tyr que não estão fosforilados nas proteínas reguladoras ocorrem no interior de motivos estruturais comuns, as chamadas seqüências de consenso que são reconhecidas por proteínas quinases (Tabela 8-9). Algumas quinases são basófilas, preferindo fosforilar um resíduo que apresenta vizinhos básicos; outras têm diferentes preferências por substratos, tal como um resíduo próximo a uma prolina. A seqüência primária não é o único fator para determinar se um dado resíduo será fosforilado. O enovelamento da proteína aproxima resíduos que estão afastados na seqüência primária, e a estrutura tridimensional resultante pode determinar se a proteína quinase tem acesso a um dado resíduo, reconhecendo-o como um substrato. Um fator que influencia a especificidade de substrato de certas proteínas quinases é a proximidade de outros resíduos fosforilados.

Tabela 8-9 – Seqüência de consenso para proteínas quinases

Proteína quinase	Seqüência de consenso resíduo fosforilado*
Proteína quinase A	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-B-
Proteína quinase G	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
Proteína quinase C	-(R/K)-(R/K)-X-(S/T)-B-(R/K)-(R/K)-
Proteína quinase B	-X-R-X-(S/T)-X-K-
Ca ²⁺ /calmodulina quinase I	-B-X-R-X-X-(S/T)-X-X-B-
Ca ²⁺ /calmodulina quinase II	-B-X-(R/K)-X-X-(S/T)-X-X-
Quinase da cadeia leve da miosina (músculo esquelético)	-K-K-R-X-X-S-X-B-B-
Fosforilase b quinase	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Quinase regulada por sinal extracelular (ERK)	-P-X-(S/T)-P-P-
Proteína quinase dependente de ciclina (cdc2)	-X-(S/T)-P-X-(K/R)-
Caseína quinase I	-(SpTp)-X-X-(X)-(S/T)-B
Caseína quinase II	-X-(S/T)-X-X-(E/D/SpTp)-X-
Quinase do receptor β-adrenérgico	-(D/E),-(S/T)-X-X-X-
Rodopsina quinase	-X-X-(S/T)-(E),-
Quinase do receptor da insulina	-X-E-E-E-Y-M-M-M-M-K-K-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-J-G-K-K-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF)	-E-E-E-E-Y-F-E-L-V-

Fontes: Pinna LA & Ruzzene MH. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191-225. Kemp BE & Pearson RB. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342-346. Kennelly PJ & Krebs EG. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15.555-15.558.

* São mostradas aqui as seqüências de consenso (em tipo normal) e as seqüências reais de substratos conhecidos (em itálico). Os resíduos de Ser (S), Thr (T) ou Tyr (Y) que sofrem fosforilação estão em vermelho; todos os aminoácidos estão mostrados na forma de suas abreviações de uma letra (veja Tabela 5-1). X representa qualquer aminoácido; B, qualquer aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp e Yp, os resíduos de Ser, Thr e Tyr já fosforilados.

A regulação pela fosforilação freqüentemente é muito complicada. Algumas proteínas apresentam seqüências de consenso reconhecidas por várias proteínas quinases diferentes, cada uma podendo fosforilar a proteína e alterar a sua atividade. Em alguns casos, a fosforilação é hierárquica: certos resíduos podem ser fosforilados somente se o resíduo vizinho tiver sido fosforilado primeiro. Por exemplo, a glicogênio sintase é inativada pela fosforilação de resíduos específicos de serina e também é modulada pelo menos por quatro outras proteínas quinases que fosforilaram quatro outros sítios na proteína (Fig. 8-30). A proteína não é uma substrato para a glicogênio sintase quinase 3, por exemplo, até que um dos sítios tenha sido fosforilado pela caseína quinase II. Algumas fosforilações inibem a glicogênio sintase mais que outras, e algumas combinações de fosforilação são cumulativas. Essas fosforilações reguladoras múltiplas proporcionam o potencial para as modulações extremamente sutis da atividade enzimática.



Quinase	Sítios de fosforilação da glicogênio sintase	Grau de inativação da sintase
Proteína quinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína quinase G	1A, 1B, 2	+
Proteína quinase C	1A	+
Ca ²⁺ /calmodulina quinase	1B, 2	+
Fosforilase b quinase	2	+
Caseína quinase I	Pelo menos 9 sítios	++++
Caseína quinase II	5	0
Glicogênio sintase quinase 3	3A, 3B, 3C	+++
Glicogênio sintase quinase 4	2	+

Figura 8-30 – Fosforilações reguladoras múltiplas. A enzima glicogênio sintase apresenta pelo menos nove sítios diferentes em cinco regiões designadas para fosforilação por uma das proteínas quinases celulares. Por conseguinte, a atividade dessa enzima está sujeita à modulação em resposta a uma variedade de sinais. Assim, a regulação não é simplesmente um disjuntor binário (liga/desliga), mas uma modulação finamente ajustada da atividade em um grande intervalo.

Para atuar como um mecanismo regulador eficiente, a fosforilação deve ser reversível. Geralmente os grupos fosfato são adicionados e removidos por diferentes enzimas, e os processos podem ser regulados separadamente. As células apresentam uma família de fosfoproteínas fosfatases que hidrolisam ésteres de Ser-(P), Thr-(P) e Tyr-(P), liberando P. As fosfoproteínas fosfatases conhecidas atuam sobre um conjunto de fosfoproteínas, porém elas apresentam uma especificidade de substrato menor que as proteínas quinases. Embora as fosfoproteínas fosfatases ainda não estejam completamente estudadas como as proteínas quinases, elas também parecem ser importantes na regulação dos processos celulares e do metabolismo.

Alguns tipos de regulação requerem a proteólise de um precursor enzimático

Para algumas enzimas, um precursor inativo, chamado zimogênio, é hidrolisado para formar a enzima ativa. Muitas enzimas proteolíticas (proteases) do estômago e do pâncreas são

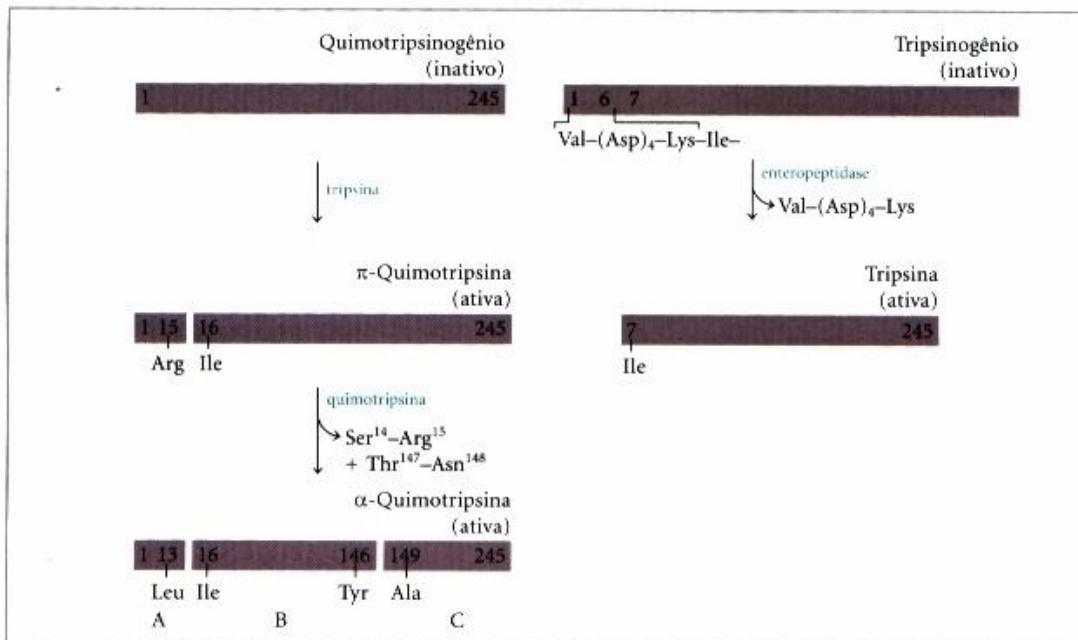


Figura 8-31 – Ativação de zimogênios por clivagem proteolítica. É mostrada a formação da quimotripsina e da tripsina a partir de seus zimogênios. As barras representam as seqüências primárias das cadeias polipeptídicas. Os aminoácidos nas extremidades dos fragmentos polipeptídicos gerados pela clivagem estão indicados abaixo das barras. Os números dos resíduos de aminoácidos representam as suas posições na seqüência primária dos zimogênios quimotripsinogênio ou tripsinogênio (o aminoácido terminal é o número um). Lembrar que as três cadeias polipeptídicas (A, B e C) da quimotripsina estão ligadas por pontes dissulfeto (veja Fig. 8-18).

reguladas dessa forma. A quimotripsina e a tripsina são inicialmente sintetizadas como quimotripsinogênio e tripsinogênio, respectivamente (Fig. 8-31). A quebra específica provoca mudanças conformacionais que expõem o sítio ativo da enzima. Uma vez que esse tipo de ativação é irreversível, outros mecanismos são necessários para inativar essas enzimas. As proteases são inativadas por proteínas inibidoras que se ligam muito fortemente ao sítio ativo da enzima. Por exemplo, o inibidor da tripsina pancreática (M_r 6.000) liga-se à tripsina e a inibe; a α_1 -antiproteínase (M_r 53.000) inibe primariamente a elastase de neutrófilos. Uma insuficiência de α_1 -antiproteínase, que pode ser causada pela exposição à fumaça de cigarros, tem sido associada com lesão do pulmão, incluindo enfisema.

As proteases não são as únicas proteínas ativadas por proteólise. Porém, em outros casos, os precursores são chamados mais freqüentemente de proproteínas ou proenzimas em vez de zimogênio. Por exemplo, o colágeno, uma proteína do tecido conectivo, é sintetizado inicialmente na forma do precursor solúvel procolágeno. O sistema de coagulação sanguínea apresenta muitos exemplos de ativação proteolítica de proteínas. A fibrina, uma proteína do coágulo sanguíneo, é produzida pela proteólise de sua proteína inativa, o fibrinogênio. A protease responsável por essa ativação é a trombina (similar em muitos aspectos à quimotripsina), que por sua vez é produzida pela proteólise da protrombina (neste caso um zimogênio), protrombina. A coagulação sanguínea é mediada por uma complicada cascata de ativação de zimogênios.

Algumas enzimas reguladoras usam mecanismos de regulação múltiplos

A glicogênio fosforilase catalisa a primeira reação de uma via que alimenta com glicose armazenada o metabolismo de carboidratos que produz energia (Capítulo 15). Esse é um importante passo metabólico e a sua regulação é correspondentemen-

te complexa. Embora a sua regulação primária ocorra por meio de modificação covalente, como delineada na Fig. 8-28, a glicogênio fosforilase também é modulada de uma maneira alostérica e não covalente pelo AMP, que é um ativador da fosforilase *b*, e por várias outras moléculas que são inibidores.

Outras enzimas reguladoras complexas são encontradas em cruzamentos metabólicos chaves. A glutamina sintetase de bactérias, que catalisa uma das etapas que introduz nitrogênio reduzido no metabolismo celular (Capítulo 22), é uma das mais complexas enzimas reguladoras conhecidas. Ela é regulada por alosteria (com pelo menos oito moduladores alostéricos diferentes) e por modificação covalente reversível. Ela também é regulada pela associação de outras proteínas reguladoras, um mecanismo já comentado muito brevemente neste capítulo mas que será examinado detalhadamente quando considerarmos a regulação de vias metabólicas específicas.

Qual é a vantagem de tal complexidade na regulação da atividade enzimática? Começamos este capítulo enfatizando a importância central da catálise para a existência da vida. O controle da catálise também é crítico para a vida. Se todas as possíveis reações em uma célula forem catalisadas simultaneamente, as macromoléculas e os metabólitos seriam rapidamente quebrados em formas químicas mais simples. Em vez disso, somente as reações necessárias para a célula em um dado momento são catalisadas. Quando as reservas químicas estão repletas, a glicose e outros metabólitos são sintetizados e armazenados. Quando as reservas estão escassas, esses depósitos são usados para alimentar o metabolismo celular. A energia química é usada economicamente, dividida para várias vias metabólicas à medida que as necessidades celulares ordenarem. A disponibilidade de catalisadores poderosos, cada um específico para uma dada reação, torna possível a regulação dessas reações. Isso, por sua vez, dá origem à uma complexa e altamente ordenada sinfonia que chamamos vida.

Resumo

A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Virtualmente, todas as reações bioquímicas são catalisadas por uma enzima. Com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. As enzimas são catalisadores extraordinariamente efetivos que comumente aumentam a velocidade das reações de um fator de 10^5 a 10^{17} . Para ser ativas, algumas enzimas requerem um co-fator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligado à enzima. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela catalisa.

As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (o complexo ES). A ligação ocorre em uma fenda na molécula da enzima chamada sítio ativo. A função das enzimas e de outros catalisadores é diminuir a energia de ativação da reação e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima.

A energia empregada para aumentar a velocidade da reação enzimática é derivada das interações fracas (pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas) entre o substrato e a enzima. O sítio ativo enzimático está estruturado de tal maneira que algumas dessas interações fracas ocorrem preferencialmente no estado de transição da reação, estabilizando assim o estado de transição. A energia disponibilizada pela formação das numerosas ligações fracas entre a enzima e o substrato (a energia de ligação) é substancial e em geral pode explicar as acelerações na velocidade das reações. A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. A energia de ligação pode ser usada para diminuir a entropia do substrato, para tensioná-lo ou provocar uma mudança conformational na enzima (ajuste induzido). Essa mesma energia de ligação responde pela refinada especificidade das enzimas em relação a seus substratos. Outros mecanismos catalíticos incluem a catálise ácido-base geral e a catálise covalente. Mecanismos de reação detalhados têm sido desenvolvidos para muitas enzimas.

A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos enzimáticos. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. À medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de uma forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima, V_{\max} característica, na qual praticamente toda enzima está na forma do complexo ES. A concentração de substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis, K_m ,

que é característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten

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

relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração de substrato e a V_{\max} pela constante K_m . Tanto o K_m como a V_{\max} podem ser medidos. Eles têm significados diferentes para enzimas diferentes. Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante k_{cat} , também chamada número de renovação. A relação k_{cat}/K_m fornece uma boa medida da eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten é também aplicável às reações com dois substratos, que ocorrem ou pela formação de um complexo ternário ou por uma dupla-troca (pingue-pongue). Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima.

As enzimas podem ser inativadas por modificações irreversíveis de um grupo funcional essencial para atividade catalítica. Elas também podem ser inibidas por moléculas que se ligam reversivelmente. Os inibidores competitivos competem reversivelmente com o substrato pelo centro ativo, mas não são transformados pela enzima. Os inibidores incomitativos ligam-se somente ao complexo ES, em um sítio distinto do sítio ativo. Na inibição mista, o inibidor liga-se tanto a E como a ES. Neste último caso, em um sítio distinto daquele em que o substrato se liga.

Algumas enzimas regulam a velocidade das vias metabólicas nas células. Na inibição por retroalimentação, o produto final de uma via inibe a primeira enzima dessa via. A atividade de algumas enzimas reguladoras, chamadas enzimas alostéricas, é ajustada pela ligação reversível de um modulador específico a um sítio regulador. Tais moduladores podem ser inibidores ou estimuladores e podem ser o próprio substrato ou então algum outro metabólito. O comportamento cinético das enzimas alostéricas reflete interações cooperativas entre as subunidades da enzima. Outras enzimas reguladoras são moduladas por modificação covalente de um grupo funcional específico necessário para a atividade. A fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos é um meio muito comum de regular a atividade da enzima. Muitas enzimas proteolíticas apresentam precursores inativos chamados zimogênio. Pequenos peptídeos são quebrados do zimogênio para formar a protease ativa.

Leitura Adicional

Geral

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52.

Uma coleção de excelentes artigos sobre muitos fundamentos; continua sendo muito útil.

Fersht A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma introdução concisa, clara e de caráter mais avançado.

Friedmann H (ed). (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry*, Vol. 1: *Enzymes*, Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, PA.

Uma coleção de artigos clássicos em química de enzima, com comentários históricos pelo editor. Extremamente interessante.

Jencks WP. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover Publications, Inc., New York.

Um livro proeminente no assunto e de caráter mais avançado.

Kornberg A. (1989) *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist*, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Princípios da catálise

Hansen DE & Raines RT. (1990) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* 67, 483-489.

Um bom texto para o estudante principiante adquirir uma melhor compreensão dos princípios da catálise.

Kraut J. (1988) How do enzymes work? *Science* 242, 533-540.

Landry DW, Zhao K, Yang GX-Q, Glickman M, & Georgiadis TM. (1993) Antibody degradation of cocaine. *Science* 259, 1899-1901.

Uma aplicação interessante de anticorpos catalíticos.

Lerner RA, Benkovic SJ & Schulz PG. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 252, 659-667.

Schramm VL. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 693-720.

Boas ilustrações dos princípios introduzidos neste capítulo.

Cinética

Cleland WW. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45, 273-387.

Radzicka A & Wolfenden R. (1995) A proficient enzyme. *Science* 267, 90-93.

Exame definitivo do aumento da velocidade por uma enzima que acelera a sua reação por um fator de 10^{17} .

Raines RT & Hansen DE. (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* 65, 757-759.

Segel IH. (1975) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Um tratamento mais avançado do assunto.

Exemplos de enzimas

Babbitt PC & Gerlt JA. (1997) Understanding enzymes superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 272, 30.591-30.594.

Uma descrição interessante da evolução das enzimas com diferentes especificidades catalíticas, que utilizam um repertório limitado de motivos estruturais protéicos.

Babbitt PC, Hasson MS, Wedekind JE, Palmer DRJ, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, & Gerlt JA. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α -protons of carboxylic acids. *Biochemistry* 35, 16.489-16.501.

Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman E, & Hwang JK. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry* 28, 3629-3637.

Enzimas reguladoras

Barford D, Das AK, & Egloff M-P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 133-164.

Dische Z. (1976) The discovery of feedback inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 1, 269-270.

Hunter T & Ploof GD. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22, 18-22.

Detalhes de uma variedade dessas importantes enzimas em um modelo eucarioto.

Johnson LN & Barford D. (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 199-232.

Koshland DE Jr & Neet KE. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 37, 359-410.

Monod J, Changeux J-P, & Jacob F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6, 306-329.

Um artigo clássico introduzindo o conceito de regulação alostérica.

Problemas

1. Conservando o sabor doce do milho. O sabor adocicado do grão de milho recém-colhido é devido ao alto nível de açúcar nos grãos. O milho comprado no mercado, vários dias após a colheita, não é tão doce porque cerca de 50% do açúcar livre do milho é convertido em amido um dia após a colheita. Para preservar o sabor adocicado do milho fresco, as espigas descascadas são mergulhadas em água fervente por alguns minutos ("branqueamento") e então resfriadas em água fria. O milho tratado dessa maneira e depois guardado em congelador mantém seu sabor adocicado. Qual é a base bioquímica desse procedimento?

2. Concentração intracelular de enzimas. Para obter um valor aproximado da concentração de enzimas em uma célula bacteriana considere que ela contém 1.000 enzimas diferentes, em igual concentração no citosol, e que cada proteína tem um peso molecular de 100.000. Considere que uma célula bacteriana é um cilindro (1 μm de diâmetro e 2 μm de altura), que o citosol (densidade específica 1,20) contém 20% em peso de proteínas solúveis e que todas as proteínas solúveis são enzimas. Calcule a concentração molar média de cada enzima nessa célula hipotética.

3. Aumento da velocidade pela urease. A enzima urease aumenta a velocidade de hidrólise da uréia em pH 8,0 e a 20°C de um fator de 10¹⁴. Se uma dada quantidade de urease pode hidrolisar completamente uma dada quantidade de uréia em 5min a 20°C e pH 8,0, quanto tempo será necessário para que a mesma quantidade de uréia seja hidrolisada na ausência de urease? Suponha que ambas as reações ocorram em meios estéreis de tal forma que a uréia não possa ser atacada pela bactéria.

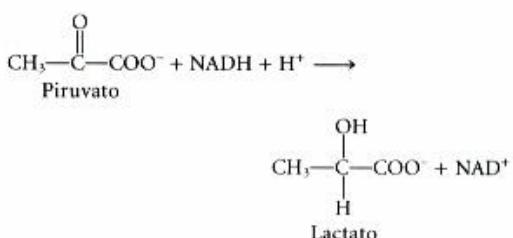
4. Proteção de uma enzima contra a desnaturação pelo calor. Quando uma solução de enzima é aquecida, ocorre uma progressiva perda de atividade catalítica com o tempo devido à desnaturação da enzima. Uma solução da enzima hexoquinase incubada a 45°C perde 50% de sua atividade em 12min. Entretanto, quando incubada a 45°C na presença de uma grande concentração de um de seus substratos, ela perde apenas 3% de sua atividade em 12min. Sugira por que a desnaturação térmica da hexoquinase foi retardada na presença de um dos seus substratos.

5. Requisitos dos sítios ativos de enzimas. A carboxipeptidase, que remove seqüencialmente os resíduos de aminoácidos, a partir da carboxila terminal, de seus substratos peptídicos é um polipeptídeo simples com 307 aminoácidos. Os dois grupos catalíticos essenciais no sítio ativo são Arg¹⁴⁵ e Glu²⁷⁰.

(a) Se a cadeia da carboxipeptidase fosse uma α-hélice perfeita, quão distantes (em Ångströms) estariam Arg¹⁴⁵ e Glu²⁷⁰? (Sugestão: veja Fig. 6-4b.)

(b) Explique como dois aminoácidos separados por essa distância podem catalisar reação que ocorre em um espaço de poucos Ångströms.

6. Ensaio quantitativo da desidrogenase láctica. A enzima desidrogenase láctica de músculo catalisa a reação:



NADH e NAD⁺ são as formas reduzida e oxidada, respectivamente, da coenzima NAD. Soluções de NADH, mas *não* de NAD⁺, absorvem luz em 340nm. Essa propriedade é usada para determinar a concentração de NADH em solução por meio da medida espectrofotométrica da quantidade de luz absorvida em 340nm pela solução. Explique como essas propriedades do NADH podem ser usadas para a padronização de um ensaio quantitativo da desidrogenase láctica.

7. Relação entre a velocidade da reação e a concentração do substrato: equação de Michaelis-Menten. (a) Qual será a concentração do substrato no qual uma enzima com k_{cat} de 30s⁻¹ e K_m de 0,005M apresenta uma velocidade um quarto da velocidade máxima? (b) Determine qual será a fração de V_{max} para as seguintes concentrações de substrato: $[S] = \frac{1}{2} K_m$, $2K_m$ e $10K_m$.

8. Estimação de V_{max} e K_m por inspeção. Embora existam métodos gráficos para a determinação precisa dos valores de V_{max} e K_m de uma reação catalisada enzimaticamente (veja Adendo 8-1), algumas vezes esses valores podem ser estimados rapidamente por inspeção dos valores de V_0 para concentrações crescentes de [S]. Estime os valores de V_{max} e K_m de uma reação enzimática em que foram obtidos os resultados apresentados a seguir.

[S] (M)	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-4}	139
1×10^{-3}	140

9. Propriedades de uma enzima da síntese da prostaglandina. As prostaglandinas são uma classe de eicosanóides, derivados de ácidos graxos com uma variedade de ações extremamente potente, cuja estrutura e ação serão discutidas posteriormente nos Capítulos 11 e 21. As prostaglandinas são responsáveis pela produção de febre e inflamação e a dor associada a elas. Elas são derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 carbonos, por meio de uma reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase. Essa enzima, uma cicloxygenase, usa o oxigênio para converter o ácido araquidônico em PGG₂, o precursor imediato de muitas prostaglandinas diferentes (Capítulo 21).

(a) Os dados cinéticos que seguem são da reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase. Considerando-se apenas os valores das duas primeiras colunas, determine a V_{max} e o K_m da enzima.

[Ácido araquidônico] (mM)	Velocidade de formação do PGG ₂ (mM/min)	Velocidade de formação do PGG ₂ com 10mg/mL de ibuprofen (mM/min)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

(b) O ibuprofen é um inibidor da prostaglandina endoperóxido sintase. Inibindo a síntese das prostaglandinas, o ibuprofen reduz a inflamação e a dor. Usando os dados da primeira e terceira colunas da tabela, determine o tipo de inibição que o ibuprofen exerce sobre a prostaglandina endoperóxido sintase.

10. Análise gráfica de V_{max} e K_m . Os dados experimentais que seguem foram coletados durante um estudo da atividade catalítica de uma peptidase intestinal com o substrato glicilglicina:



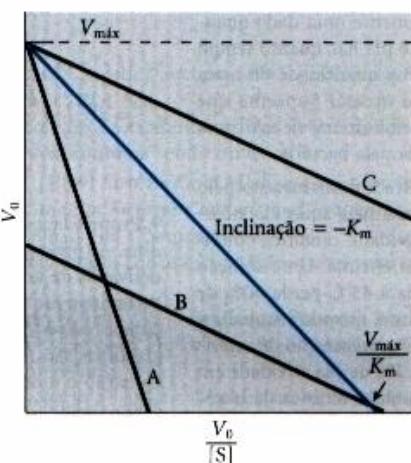
[S] (mM)	Produto formado ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

Use a análise gráfica (ver Adendo 8-1) para determinar o K_m e a V_{max} para essa preparação de enzima e substrato.

11. A equação de Eadie-Hofstee. Uma transformação da equação de Michaelis-Menten é a equação de Lineweaver-Burk ou dos duplos recíprocos. Multiplicando-se ambos os termos da equação de Lineweaver-Burk por V_{max} e rearranjando-os, tem-se a equação de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m) \frac{V_0}{[S]} + V_{max}$$

O gráfico de V_0 versus $V_0/[S]$ para uma reação enzimática é mostrado a seguir.



A reta azul foi obtida na ausência de inibidor. Qual a reta (A, B ou C) que mostra a atividade da enzima quando um inibidor competitivo é adicionado à mistura de reação?

12. O número de renovação da anidrase carbônica. A anidrase carbônica de eritrócitos (M_r , 30.000) tem o maior número de renovação entre todas as enzimas conhecidas. Ela catalisa a hidratação reversível do CO_2 :



Esse é um importante processo no transporte de CO_2 dos tecidos até os pulmões. Se 10 μg de anidrase carbônica pura catalisam a hidratação de 0,3g de CO_2 em 1min a 37°C sob condições de V_{\max} , qual é o número de renovação (k_{cat}) da anidrase carbônica (em unidades de min^{-1})?

13. Derivando a equação da velocidade para uma inibição competitiva. A equação da velocidade para uma enzima sujeita a uma inibição competitiva é

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

Começando com uma nova definição de enzima total:

$$[E]_t = [E] + [EI] + [ES]$$

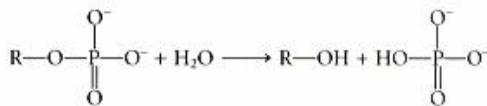
e as definições de α e K_i (veja Eq. 8-28), derive a equação da velocidade acima. Use a derivação da equação de Michaelis-Menten como exemplo.

14. Inibição irreversível de uma enzima. Muitas enzimas são inibidas irreversivelmente por íons de metais pesados como Hg^{2+} , Cu^{2+} ou Ag^+ , que podem reagir com grupos sulfidrila essenciais para formar mercaptídeos:



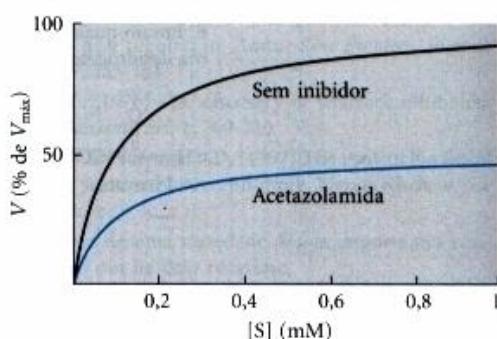
A afinidade dos íons Ag^+ pelos grupos sulfidrila é tão grande que esses íons podem ser usados para titular quantitativamente os grupos —SH. A 10mL de uma solução contendo 1mg/mL de uma enzima pura, um pesquisador adicionou AgNO_3 em uma quantidade suficiente para inativar completamente a enzima. Um total de 0,342 μmol de AgNO_3 foi necessário. Calcule o peso molecular *mínimo* da enzima. Por que o valor obtido dessa maneira fornece apenas o peso molecular mínimo?

15. Aplicação clínica de inibição diferencial de enzimas. O soro humano contém uma classe de enzimas, as fosfatases ácidas, que hidrolisam ésteres de fosfato em condições levemente ácidas (pH 5,0):



As fosfatases ácidas são produzidas pelos eritrócitos, fígado, rim, baço e próstata. A enzima da próstata é clinicamente importante porque o aumento da sua concentração no sangue é freqüentemente uma indicação de câncer da próstata. A fosfatase da próstata é fortemente inibida pelo íon tartarato, mas as fosfatases de outros tecidos não são. Como essa informação pode ser usada para desenvolver um procedimento específico para dosar a atividade da fosfatase ácida da próstata no soro sanguíneo humano?

16. Inibição da anidrase carbônica pela acetazolamida. A anidrase carbônica é fortemente inibida pela droga acetazolamida, que também é usada como diurético (para aumentar a secreção de urina) e para tratar o glaucoma (para reduzir a pressão excessivamente alta no olho, devido a um acúmulo de fluido intra-ocular). A anidrase carbônica desempenha um importante papel nesses e em outros processos de secreção porque ela participa na regulação do pH e do teor de bicarbonato em um grande número de fluidos do corpo. A curva experimental da velocidade inicial da reação (como porcentagem de V_{\max}) versus $[S]$ para a reação catalisada pela anidrase carbônica é ilustrada a seguir. Quando o experimento é repetido na presença de acetazolamida, obtém-se a curva inferior. Por meio da inspeção das duas curvas e do seu conhecimento das propriedades cinéticas dos inibidores competitivos e mistos competitivos, determine a natureza da inibição provocada pela acetazolamida. Explique.



17. O pH ótimo da lisozima. O sitio ativo da lisozima contém dois resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise: Glu³⁵ e Asp⁵². Os valores de pK_a das cadeias carboxílicas laterais desses dois resíduos são 5,9 e 4,5, respectivamente. Qual o estado de ionização (protonado ou não-protonado) de cada um desses resíduos em pH 5,2, o pH ótimo da lisozima? Como os estados de ionização desses dois resíduos de aminoácidos podem explicar o perfil pH-atividade da lisozima mostrado a seguir?

