Resumo Tema 9: Enzimas: inibição, regulação e caracterização por espectrometria de massas

1. Enzimas: função e classificação

As enzimas são responsáveis pela catálise das reações dos sistemas biológicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob diferentes condições de temperatura e pH. Com exceção de um pequeno grupo de RNAs catalíticos, as enzimas são em sua maioria proteínas, e sua atividade catalítica depende da integridade das suas conformações nativas. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida.

Algumas enzimas necessitam grupamentos químicos adicionais para efetivar a catálise de uma reação, esse grupo químico é denominado cofator, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como Fe2+, Mg2+, Mn2+ ou Zn2+ ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada coenzima. As coenzimas agem como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos, e a maioria delas são derivadas das vitaminas. Algumas enzimas necessitam tanto de uma coenzima como de um ou mais íons metálicos para terem atividade catalítica. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligam muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado grupo prostético. Uma enzima completa, cataliticamente ativa junto com a sua coenzima e/ou íons metálicos, é denominada holoenzima. A parte proteica de uma dessas enzimas é denominada apoenzima ou apoproteína.

De acordo com o tipo de reações que catalisam, as enzimas são classificadas da seguinte forma:

1)Oxidorredutases: Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H)

2) Transferases: Reações de transferência de grupos

3)Hidrolases: Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)

4) Liases: Clivagem de C¬C, C¬O, C¬N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.

5) Isomerases: Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas

6) Ligases: Formação de ligações C¬C, C¬S, C¬O e C¬N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato-S (molécula sobre a qual a enzima age) e a enzima-E para formação de um complexo ES. A ligação ao substrato ocorre em um bolsão da enzima denominado sítio ativo. Assim, a função das enzimas e dos outros catalisadores é diminuir a energia de ativação de uma reação, aumentando assim, a velocidade das reações.

De um modo geral, uma reação enzimática simples pode ser descrita da seguinte forma:

E+S <--> ES <--> EP <--> E+P

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

1. Inibição reversível e irreversível de enzimas

Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. Existem duas classes de inibidores de enzimas:reversíveis e irreversíveis.

Na inibição reversível, um tipo muito comum de inibição é denominado competitivo. Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. À medida que o inibidor (I) ocupa o sítio ativo, ele impede que o substrato se ligue à enzima. Muitos inibidores competitivos têm estrutura similar à estrutura do substrato e se combinam com a enzima formando um complexo EI, que não leva à catálise. Outro tipo de inibição reversível, é a inibição incompetitiva, na qual o inibidor se liga em um sítio distinto do sítio ativo do substrato ligando apenas ao complexo ES. Finalmente, o terceiro tipo de inibição reversível é a inibição mista, na qual há ligação do inibidor acontece tanto na enzima quanto no complexo ES.

Na inibição irreversível, os inibidores se ligam covalentemente ou destroem um grupo funcional da enzima essencial para a atividade da enzima ou então formam uma associação não covalente estável. Uma classe especial de inibidores irreversíveis é formada pelos inativadores suicidas. Esses compostos são relativamente não reativos até que se liguem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um inativador suicida passa pelas primeiras etapas químicas de uma reação enzimática, mas em vez de ser transformado no produto normal, é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima.

1. Enzimas regulatórias

A nível celular, a atividade das vias metabólicas é regulada pelo controle da atividade de determinadas enzimas que têm a sua atividade catalítica aumentada ou diminuída em resposta a certos sinais. No caso das enzimas alostéricas a atividade catalítica é ajustada pela ligação reversível e não covalente com compostos regulatórios denominados moduladores alostéricos. Esse modulador pode ser o próprio substrato ou algum outro metabólito, sendo que os efeitos do modulador podem ser inibitórios ou estimulatórios.

As propriedades das enzimas alostéricas são significativamente diferentes das propriedades das enzimas não regulatórias. Parte das diferenças é estrutural, pois além do sítio ativo, as enzimas alostéricas em geral têm um ou mais sítios regulatórios, ou alostéricos, para ligarem o modulador. Da mesma maneira que o sítio ativo das enzimas é específico para o seu substrato, cada sítio regulatório é específico para o seu modulador, assim enzimas com vários moduladores em geral têm sítios de ligação específicos para cada um deles. Adicionalmente às diferenças estruturais, enzimas alostéricas também diferem das enzimas não regulatórias quanto a suas propriedades cinéticas,uma vez que apresentam um gráfico de V0 vs [S] que produz uma curva de saturação sigmóide em vez da curva de saturação hiperbólica típica das enzimas não regulatórias.

Outro tipo de regulação que acontece em algumas enzimas, é a presença de modificações covalentes com grupos funcionais específicos que acontecem em um ou mais resíduos de aminoácidos da molécula. Esses grupos funcionais incluem fosforil, acetil, adenilil, uridilil, metil, amida, carboxil, miristoíl, palmitoíl, prenil, hidroxila, sulfato e ribosiladenosina-difosfato. Existem inclusive proteínas inteiras que são usadas como grupo modificador especial, como é o caso da ubiquitina e a sumo.

Muitas enzimas proteolíticas são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios, que são ativados após remoção de pequenos fragmentos peptídicos por proteólise. Esta clivagem específica provoca mudanças conformacionais que expõem o sítio ativo da enzima. Uma vez que esse tipo de ativação é irreversível, é necessária a participação de proteínas inibitórias que se ligam firmemente ao sítio ativo, para inativar essas enzimas. Além dos zimogênios, outras proteínas também são ativadas por proteólise, sendo conhecidas como pró-proteínas ou pró-enzimas.

Finalmente, algumas enzimas são reguladas pela combinação de vários mecanismos regulatórios, como é o caso de algumas enzimas encontradas em cruzamentos de vias metabólicas importantes para o organismo. Um exemplo é a glutamina-sintetase de bactérias, que catalisa a reação que introduz nitrogênio reduzido no metabolismo. Esta enzima tem um mecanismo de regulação complexo, que envolve a regulação alostérica (por ao menos oito moduladores diferentes), presença de modificações covalentes reversíveis e associação com outras proteínas regulatórias.

As conversões enzimáticas desempenham um papel crucial não apenas na regulação de todos os processos biológicos mas também têm um papel na biocatalisse de processos industriais ou como alvos na descoberta de medicamentos, resultando de grande importância o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a elucidação dos mecanismos de catálise enzimática e a caracterização das atividades enzimáticas.

Tradicionalmente, a maioria dos ensaios enzimáticos se fundamentam na alteração das propriedades espectroscópicas durante a conversão de um substrato em produto, geralmente fazendo a detecção usando absorbância UV-Vis e espectroscopia de fluorescência. Porém a maioria dos substratos de ocorrência natural não apresentam propriedades ópticas,tornando necessário introduzir essas funcionalidades sinteticamente na estrutura da molécula.Essas modificações podem alterar o reconhecimento enzimático do substrato, e finalmente alterar as propriedades cinética.. Para contornar isto, a detecção pode se basear numa reacção secundária acoplada à conversão enzimática em questão, na qual é gerado um sinal opticamente detectável.

Uma alternativa viável aos métodos de detecção clássicos é a espectrometria de massa (MS), técnica analítica utilizada para medir a razão massa-carga (m/z) de uma ou mais moléculas presentes em uma amostra em fase gasosa. As vantagens do uso da MS para avaliar uma reação enzimática, incluem medição de atributos independente das propriedades espectroscópicas do analito, nenhuma modificação é necessária, substratos nativos podem ser usados nos ensaios enzimáticos e possibilidade de monitorar simultaneamente o destino de múltiplos analitos durante uma reação enzimática.

Um espectrômetro de massa consiste têm como mínimo três componentes: 1)uma fonte de íons, 2)um ou mais analisadores de massa e um 3)detector de íons.

Na fonte de ionização, as moléculas são convertidas em íons em fase gasosa para que possam ser movidas e manipuladas por campos elétricos e magnéticos externos. Um dos métodos de ionização mais amplamente utilizadas foi a MALDI, que consiste na

No entanto, como os espectrômetros de massa só podem analisar em fase gasosa foram desenvolvidos métodos como ionização por electrospray (ESI) a fim de converter analitos em fase líquida a íons gasosos. Assim a amostra líquida contendo o analito é bombeada através do orifício de entrada do espectrômetro, mantido em alta tensão. Ao chegar ao emissor da fonte, o fluxo constante do líquido se desintegra em gotículas pequenas, altamente carregadas, das quais a líquido se evapora rapidamente deixando íons moleculares na fase gasosa.

Quanto ao analisador de massa sua principal função é separar íons por suas razões massa-carga (m/z). Fundamentalmente, todos os íons são separados modulando suas trajetórias em campos elétricos. Os analisadores de massa diferem no princípio que usam para

separar íons, e isso define sua aplicação. Analisadores do tipo quadrupolo, analisadores por tempo de voo (TOF) ou analisadores Orbitrap, são os mais comuns.

Normalmente o analisador de ións é seguido por uma ‘cela de colisão’ um tipo de analisador onde os íons podem ser fragmentados com colisão com um gás inerte como o N2. O analisador de massa geralmente funciona em conjunto com o sistema de detecção de íons, registrando a intensidade de cada m/z detectada, gerando um espectro de massa. Os espectros resultantes dos íons precursores são chamados MS1 enquanto os espectros dos fragmentos gerados são chamados de MS2 ou MS/MS.

Ambas as estrátegias de inserção de amostra, ESI-MS e MALDI-MS oferecem recursos interessantes no monitoramento de ensaios enzimáticos. Nas análises baseadas em MALDI podem ser analisadas várias amostras em uma única placa, o que pode representar um alto rendimento. No entanto, a quantificação é um problema na espectrometria por MALDI-MS, uma vez que a amostra pode não estar homogeneamente distribuida na matriz, falta de reprodutibilidade entre tiros e ainda entre amostras

Por outro lado análises baseadas em ESI-MS podem ser usadas para monitorar em tempo real uma reação enzimática, seja fazendo injeção direta da solução de reação (online) ou fazendo a reação offline, na qual a reação é parada de tempos em tempos e a amostra bruta é injetada no sistema. O produto da reação bem como produtos intermediarios da reação podem ser monitorados e quantificados no modo de aquisição MRM (multiple reaction monitoring), na qual o espectrômetro opera na máxima sensibilidade para monitorar uma m/z definida e seus fragmentos.

Outra aplicação da análise off line é na avaliação de inibidores enzimáticos, nesta metodologia, pode ser criada uma biblioteca de inibidores conhecidos, que são avaliados individualmente. A atividade inibitoria dos padrões da biblioteca, pode ser deduzida a partir da quantificação de produto formado em comparação com uma reação na ausencia do inibidor. Fazendo um aumento na concentração do inibidor podem ser calculados valores de IC50 .

Além de analisar reações enzimáticas individuais, é possivel tb analisar simultaneamente a atividade de várias enzimas, para isto os ensaios enzimáticos são realizados off-line empregando conjugados sintéticos específicos para o substrato da enzima alvo, onde o substrato está covalentemente ligado a um marcador (tag), que permite alta seleção extração por meio de cromatografia de afinidade. Durante a conversão enzimática, o conjugado de substrato é modificado, resultando em uma mudança de massa molecular. Depois de parar a reação, o substrato marcado e espécies do produto são extraídas por meio de cromatografia de afinidade e o eluente injetado no espectrômetro de massa. A quantificação é realizada através do uso de um padrão interno do produto.

A determinação dos parâmetros cinéticos e conclusões sobre vias de reação catalítica como os descritos acima foram desenvolvidos a partir de experimentos em estado estacionário. No entanto, uma abordagem mais direta para investigar o mecanismo de reação real é fornecido por experimentos cinéticos de estado pré-estacionário, nos quais informações sobre intermediários transitórios, estrutura química de seus produtos e constantes das etapas das reações individuais pode ser calculadas. A janela de tempo para a cinética de estado pré-estacionário é bastante pequena (na ordem de milissegundos para segundos); portanto, uma mistura eficiente e uma análise rápida são críticas.

A montagem experimental para execusão de este tipo de experimento, compreende duas bombas de seringa para fazer o fluxo constante da enzima e solução de substrato, no final das quais é acoplado um T onde acontece a mistura da reação e na saida um capilar acoplado à fonte ESI. Diferentes tempos de reação são atingidos alterando o comprimento (volume) do capilar de reação. A reação é considerada interrompida após a nebulização da mistura da reação na fonte.

A ESI-MS têm a vantagem de ser compatível com as condições de reação em fase líquida,tornando possível monitorar conversões enzimáticas on-line diretamente para a interface de ionização do espectrômetro. Além disso, a precisão da quantificação e reprodutibilidade são geralmente melhores, em comparação com a MALDI-MS.