

Competição de substratos e especificidade enzimática

Competição de substratos e especificidade enzimática

A eficiência catalítica $k_A = k_{\text{cat}}/K_m$ também se designa por *constante de especificidade*. A razão torna-se clara se considerarmos uma situação de *competição* entre dois substratos A e A', pelo centro activo de um mesmo enzima E:



A partir deste esquema podem deduzir-se o seguinte par de equações de velocidade:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[A]}{K_m(1 + [A']/K_m') + [A]}$$

$$v' = \frac{d[P']}{dt} = \frac{k_2'[E]_0[A']}{K_m'(1 + [A]/K_m) + [A']}$$

Cada um dos substratos se comporta como um *inibidor competitivo* relativamente ao outro, sendo a constante de inibição igual ao K_m do substrato em competição.

Competição de substratos e especificidade enzimática

O verdadeiro significado da constante k_A emerge se considerarmos o quociente v/v' :

$$\frac{v}{v'} = \frac{\frac{k_2[E]_0[A]}{K_m(1+[A']/K_m')+[A]}}{\frac{k_2'[E]_0[A']}{K_m'(1+[A]/K_m)+[A']}} = \frac{\frac{(k_2/K_m)[E]_0[A]}{1+[A']/K_m'+[A]/K_m}}{\frac{(k_2'/K_m')[E]_0[A']}{1+[A]/K_m+[A']/K_m'}} = \frac{(k_2/K_m)[E]_0[A]}{(k_2'/K_m')[E]_0[A']}$$

Tendo em conta que $k_A = k_2/K_m$ e $k_A' = k_2'/K_m'$:

$$\frac{v}{v'} = \frac{(k_2/K_m)\cancel{[E]_0}[A]}{(k_2'/K_m')\cancel{[E]_0}[A']} = \frac{k_A[A]}{k_A'[A']} \quad \text{e quando } [A]=[A']$$

$$\boxed{\frac{v}{v'} = \frac{k_A}{k_A'}}$$

Numa mistura *equimolar* de substratos competindo para o *mesmo centro activo* de um enzima E, a razão entre as velocidades de catálise de dois substratos é igual à razão entre as constantes de especificidade do enzima para cada substrato.

Competição de substratos e especificidade enzimática

Parâmetros cinéticos para diferentes substratos da fumarase:

| Substrate | k_{cat} (s ⁻¹) | K_m (mM) | " K_i " (mM) | k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹) |
|----------------|------------------------------|------------|----------------|---|
| Fluorofumarato | 2700 | 0.027 | - | 100000 |
| Fumarato | 800 | 0.005 | - | 160000 |
| Clorofumarato | 20 | 0.11 | 0.10 | 180 |
| Bromofumarato | 2.8 | 0.11 | 0.15 | 25 |
| Iodofumarato | 0.043 | 0.12 | 0.10 | 0.36 |
| Mesaconato | 0.023 | 0.51 | 0.49 | 0.047 |
| L-tartarato | 0.93 | 1.3 | 1.0 | 0.72 |

Exemplo: numa mistura equimolar dos substratos *fumarato* e *fluorofumarato* o enzima fumarase catalisa a decomposição do fumarato 60% mais rápido:

$$\frac{v}{v'} = \frac{k_A}{k_A'} = \frac{160000}{100000} = 1.60$$

O fumarato é o substrato mais **específico**

Teste de competição de substratos

Quando se verifica a transformação de dois substratos na presença de um extracto enzimático, podem verificar-se duas situações:

- a) Os dois substratos competem para o centro activo de um mesmo enzima
- b) Os dois substratos são catalizados por enzimas distintos presentes no extracto

Para distinguir entre estas duas situações podemos recorrer a um *teste de competição*.

A soma das velocidades v e v' para dois substratos em competição é:

$$v_{\text{tot}} = v + v' = \frac{(V_{\text{max}} / K_m)[A] + (V_{\text{max}}' / K_m')[A']}{1 + [A'] / K_m' + [A] / K_m}$$

Determinando experimentalmente duas concentrações de referência $[A]=[A]_0$ e $[A']=[A']_0$ tais que:

$$\frac{V_{\text{max}}[A]_0}{K_m + [A]_0} = \frac{V_{\text{max}}[A']_0}{K_m + [A']_0} = v_0$$

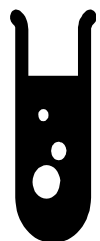
Estas são assim concentrações de $[A]$ e $[A']$ que conduzem a uma mesma velocidade de catálise observada para cada substrato.

Teste de competição de substratos

Preparando uma série de soluções contendo uma mistura dos dois substratos tais que as suas concentrações são interpoladas entre zero e $[A]_0$ e $[A']_0$:

$$\left. \begin{array}{l} [A] = (1 - r)[A]_0 \\ [A'] = r[A']_0 \end{array} \right\} r \in [0, 1]$$

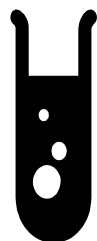
Exemplo com 5 soluções:



$$[A] = [A]_0$$

$$[A'] = 0$$

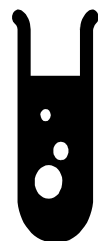
$$r = 0$$



$$[A] = 0.75[A]_0$$

$$[A'] = 0.25[A']_0$$

$$r = 0.25$$



$$[A] = 0.5[A]_0$$

$$[A'] = 0.5[A']_0$$

$$r = 0.5$$



$$[A] = 0.25[A]_0$$

$$[A'] = 0.75[A']_0$$

$$r = 0.75$$



$$[A] = 0$$

$$[A'] = [A']_0$$

$$r = 1$$

Para cada uma destas soluções, v_{tot} será a soma das velocidades observadas para a catálise de A e A' .

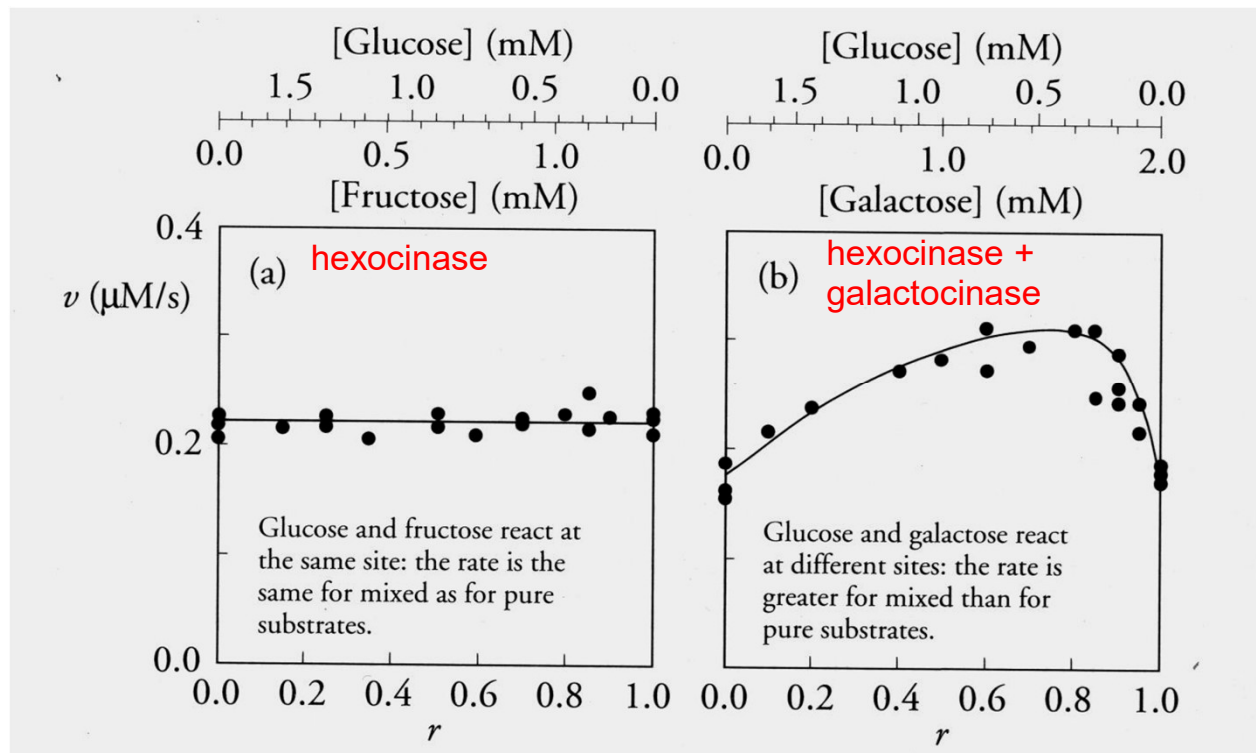
Teste de competição de substratos

A expressão de v_{tot} assume a seguinte forma:

$$v_{\text{tot}} = \frac{(V_{\text{max}} / K_m)(1-r)[A]_0 + (V'_{\text{max}} / K'_m)r[A']_0}{1 + (1-r)[A]_0 / K_m + r[A']_0 / K'_m}$$

$$= \frac{v_0[(1-r)(1 + [A]_0 / K_m) + r(1 + [A']_0 / K'_m)]}{(1-r)(1 + [A]_0 / K_m) + r(1 + [A']_0 / K'_m)} = v_0$$

Conclusão: se os dois substratos competirem para o mesmo centro activo, a velocidade total observada *será a mesma* em todas as misturas (v_0).



Forma integrada da equação de Michaelis-Menten

Forma integrada da equação de Michaelis-Menten

Se a concentração do substrato A não pode ser considerada constante ao longo do percurso de uma reacção enzimática Michaeliana, a velocidade de reacção irá depender da concentração $[A]_t$ no instante t ,

$$v_t = \frac{V_{\max} [A]_t}{K_m + [A]_t}$$

A velocidade v_t é igual à variação $d[P]$ com o tempo

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

O que permite obter a seguinte equação diferencial para a variação da quantidade de produto com o tempo:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} [A]_t}{K_m + [A]_t} = \frac{V_{\max} ([A]_0 - [P])}{K_m + ([A]_0 - [P])}$$

A integração desta equação permite obter uma expressão para a quantidade total de produto produzido após um determinado tempo t

Integração da equação de Michaelis-Menten

A curva de progresso de uma reacção enzimática depende de uma multiplicidade de factores. No entanto, há situações em que pode ser aproximada pela forma integrada da equação de Michaelis-Menten, se os factores dominantes for a depleção de substrato ou inibição pelo produto.

Nestas situações, e se a estimativa das velocidades iniciais se revelar pouco fiável, é possível recorrer à forma integrada da equação de Michaelis-Menten para ajust da curva de progresso e extracção de parâmetros cinéticos do enzima.

A situação mais simples envolve apenas depleção do substrato:

$$\left\{ \begin{array}{l} v = \frac{d[P]}{dt} \\ [A] = [A]_0 - [P] \\ v = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A]} \end{array} \right. \Rightarrow \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} ([A]_0 - [P])}{K_m + ([A]_0 - [P])}$$

Integração da equação de Michaelis-Menten

A equação diferencial:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} ([A]_0 - [P])}{K_m + ([A]_0 - [P])},$$

pode ser integrada por separação das variáveis:

$$\int \frac{K_m + [A]_0 - [P]}{[A]_0 - [P]} d[P] = \int V_{\max} dt$$

$$-K_m \ln([A]_0 - [P]) + [P] = V_{\max} t + \alpha$$

Usando a condição inicial $[P]=0$ quando $t=0$, fica $\alpha=-K_m$, e rearranjando vem:

$$V_{\max} t = [P] + K_m \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

Forma integrada da
equação de
Michaelis-Menten

Exemplo de aplicação

$$K_m = 1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M/min}$$

$$[A] = 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Calcular a quantidade de produto produzida nos primeiros 5 min de reacção...

$$v = \frac{2.0 \times 10^{-5} \text{ M min}^{-1} \times 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}}{1.2 \times 10^{-5} \text{ M} + 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}} = 3.57 \times 10^{-6} \text{ M min}^{-1}$$

Assumindo uma velocidade constante de $3.57 \times 10^{-5} \text{ M min}^{-1}$, o reagent seria consumido em cerca de 1 min – a variação de concentração do substrato não pode ser desprezada!

Neste caso torna-se necessário aplicar a forma integrada da equação de M.M. para resolver este problema.

$$V_{\max} t = [P] + K_m \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

Como calcular $[P]$?

...resolver numericamente $f([P])=0$

$$2.0 \times 10^{-5} \text{ M min}^{-1} \times 5 \text{ min} = [P] + 1.2 \times 10^{-5} \text{ M} \times \ln \left(\frac{2.0 \times 10^{-6} \text{ M}}{2.0 \times 10^{-6} \text{ M} - [P]} \right)$$

Resolução numérica do problema

```
import numpy as np
from scipy.optimize import fsolve

def int_mm(x,a,t,vmax,km):
    return x+km*(np.log(a)-np.log(a-x))-vmax*t

km = 1.2e-5
vmax = 2.0e-5
t = 5
a = 2.0e-6

a=fsolve(int_mm,1.8e-10,args=(a,t,vmax,km),xtol=1e-10)
print t,a[0]
```



| Tempo (min) | [P] (M) |
|-------------|-----------------------|
| 1 | 1.57×10^{-6} |
| 2 | 1.92×10^{-6} |
| 3 | 1.98×10^{-6} |
| 4 | 1.99×10^{-6} |
| 5 | 2.00×10^{-6} |

Integração da equação de Michaelis-Menten

A forma integrada da equação de Michaelis-Menten é muitas vezes escrita:

$$V_{\max}^{\text{app}} t = [P] + K_m^{\text{app}} \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

O uso das grandezas aparentes realça o facto de que esta equação é muito mais geral do que o caso particular que se usou para a sua dedução (efeito único da depleção do substrato).

$V_{\max}(\text{app})$ e $K_m(\text{app})$ podem diferir muito de K_m e V_{\max} , podendo até ser negativos!

No entanto, a seguinte relação é sempre válida:

$$v_0 = \frac{V_{\max}^{\text{app}} [A]_0}{K_m^{\text{app}} + [A]_0}$$

e permite estimar v_0 se os valores de $V_{\max}(\text{app})$ e $K_m(\text{app})$ forem conhecidos.

Integração da equação de Michaelis-Menten

A equação integrada,

$$V_{\max}^{\text{app}} t = [P] + K_m^{\text{app}} \ln \left(\frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]} \right)$$

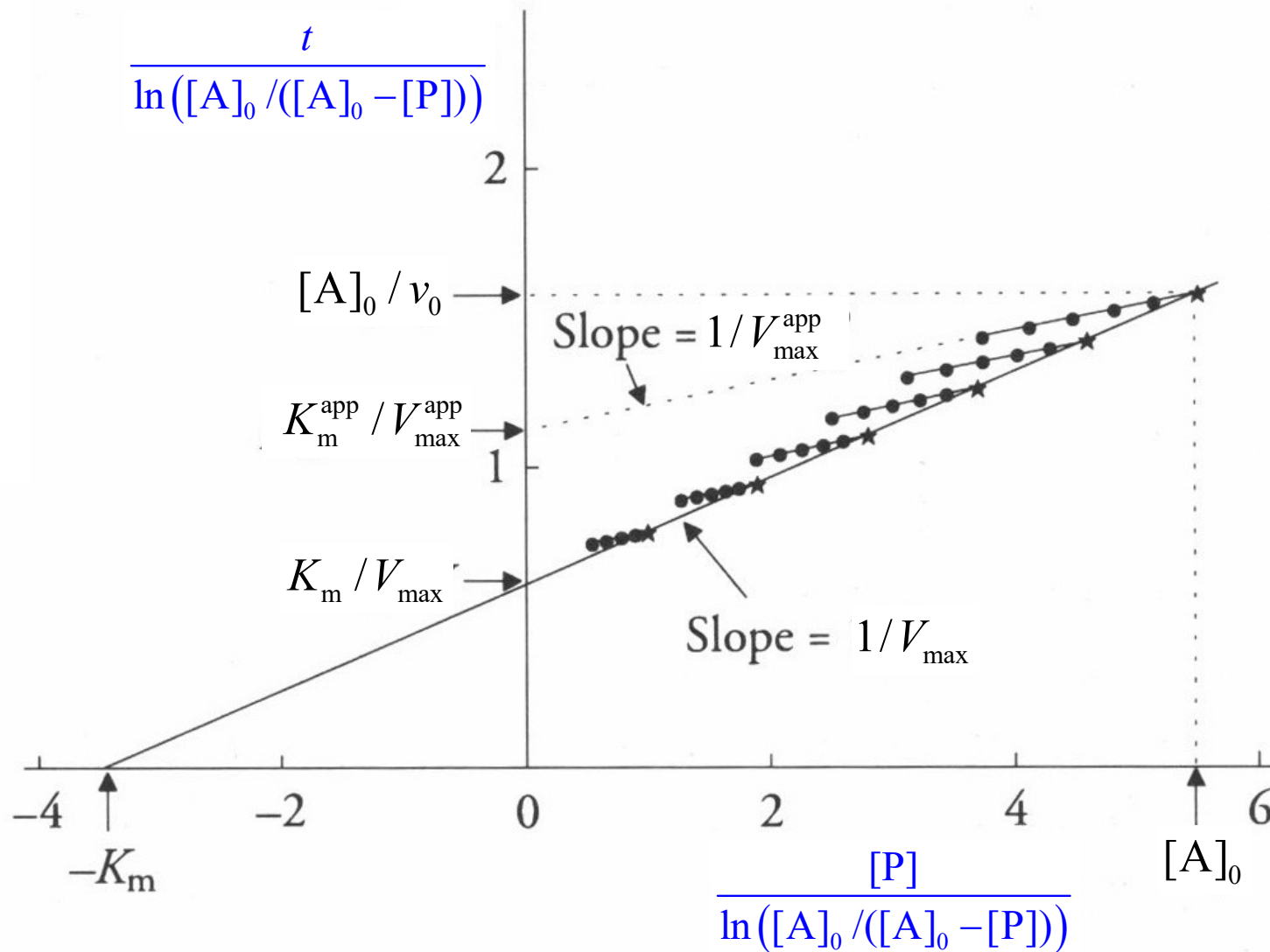
pode ser rearranjada para a seguinte forma:

$$\frac{t}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))} = \frac{1}{V_{\max}^{\text{app}}} \left\{ \frac{[P]}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))} \right\} + \frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\max}^{\text{app}}}$$

Portanto um gráfico de $\frac{t}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))}$ em função de $\frac{[P]}{\ln([A]_0 / ([A]_0 - [P]))}$

produz uma recta de declive $1 / V_{\max}^{\text{app}}$ e ordenada na origem $K_m^{\text{app}} / V_{\max}^{\text{app}}$

Estimativa de K_m e V_{max} a partir de curvas de progresso



Estimativa de K_m e V_{max} a partir de curvas de progresso

