

Reações multi-substrato

Reações multi-substrato

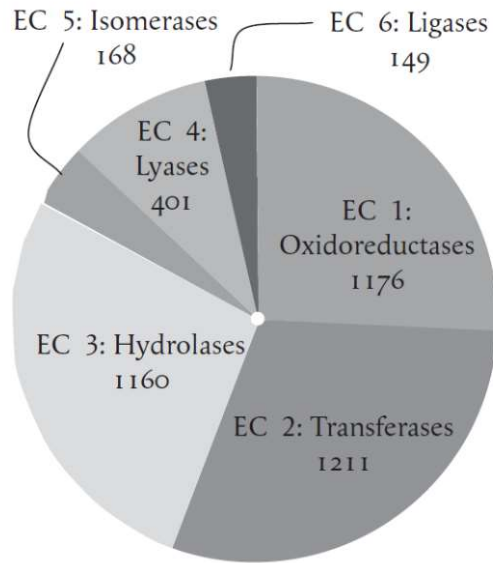
- Exceção feita de algumas reações de isomerização, não existem praticamente reações enzimáticas monosubstrato.
- Reações com mais de um substrato podem ser aproximadas por um modelo monosubstrato tendo em conta os seguintes aspectos:
 - o substrato, ou substratos adicionais podem estar em grande excesso (por exemplo H_2O nas reações catalisadas por hidrólases)
 - quando a concentração dos restantes substratos é mantida constante, o comportamento cinético do enzima relativo um dado substrato segue um modelo monosubstrato
- As reações bisubstrato biproducto :



constituem cerca de 60% de todas as reações enzimáticas conhecidas, incluindo as hidrolases, transferases e oxiredutases.

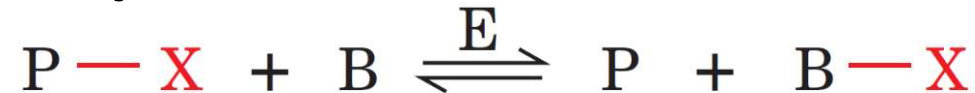
- As reações com três ou mais substratos também são frequentes, mas os métodos usados para o seu tratamento são essencialmente semelhantes aos usadas para as reações bisubstrato.

Reacções bi-substrato

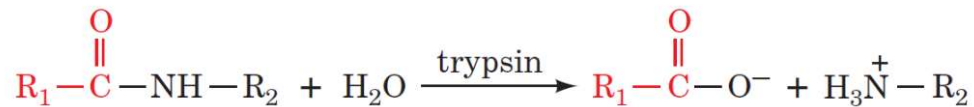


EC1 (oxidoreductases), EC2 (transferases) e EC3 (hidrolases) são maioritariamente reacções bi-substrato.

Reacção de transferência:



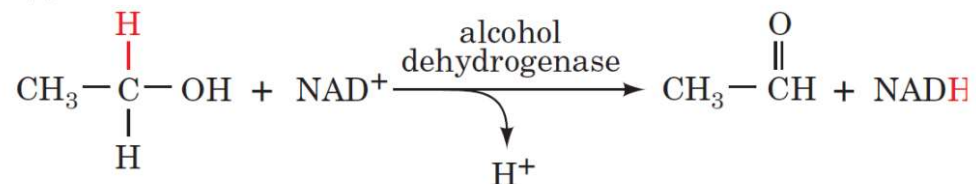
(a)



Polypeptide

Hidrólise

(b)



Oxidoredução

Mecanismos de reação

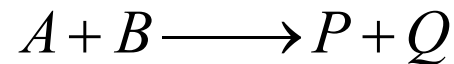
Os mecanismos de reacção multi-substrato podem ser classificados de acordo com a ordem de entrada e saída dos vários reagentes ou produtos;

- **Sequencial:** os substratos tendem a ligar-se todos antes de haver libertação de produtos. Situações possíveis:
 - *Aleatório:* a ordem de entrada dos substratos é variável.
Exemplo: algumas desidrogenases, cinases.
 - *Ordenado:* a ordem de entrada dos substratos é fixa.
Exemplo: NAD-desidrogenaes.
- **Ping-pong:** Ocorre libertação de produtos antes de todos os substratos se terem ligado.
Exemplo: protéases de serina, transaminases, flavoenzimas.

Nomenclatura de Cleland

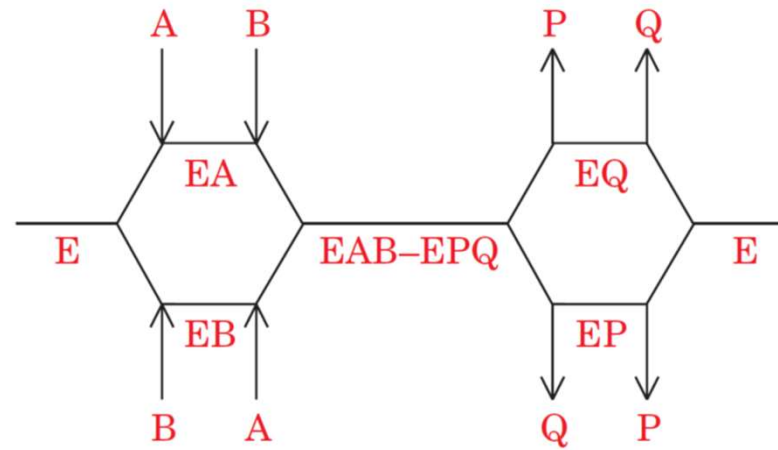
1. Os substratos designam-se pelas letras A, B, C, D, ... segundo a ordem pela qual se ligam ao enzima.
2. Os produtos designam-se pelas letras P, Q, R, S, ... segundo a ordem pela qual se libertam do enzima.
3. As formas estáveis do enzima designam-se pelas letras E, F, G... sendo a forma E o enzima livre. Entendem-se por formas estáveis do enzima aquelas que, por si só, são incapazes de se converter numa outra forma estável do enzima.
4. O número de reagentes e produtos numa dada reacção é especificado por ordem, usando os termos *Uni* (um), *Bi* (dois), *Ter* (três) e *Quad* (quatro).

Exemplo: a reacção



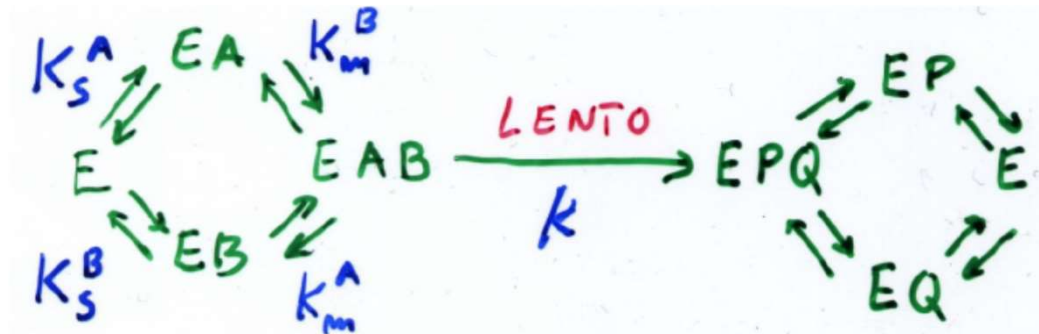
é uma reacção **bi-bi**.

Bi-Bi sequential aleatório

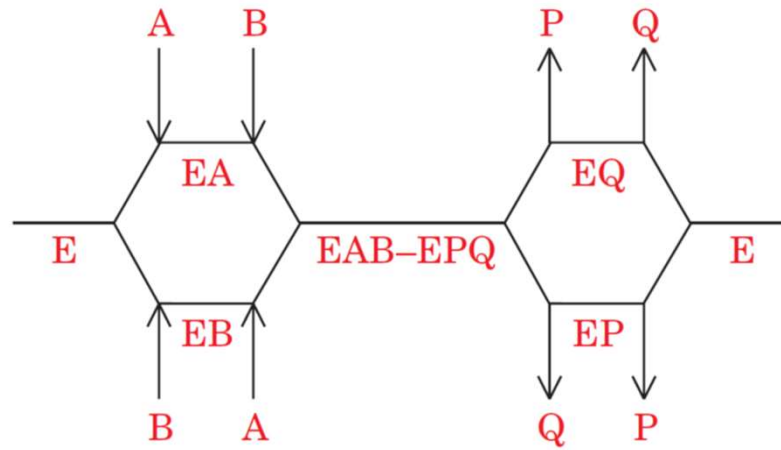


Neste mecanismo qualquer dos substratos se pode ligar ao enzima, originando complexos binários EA e EB na via de formação do complexo ternário EAB.

Assumindo que o passo EAB – EPQ é um passo lento e determinante da reação, os complexos EA e EB podem considerar-se em estado de pré-equilíbrio:



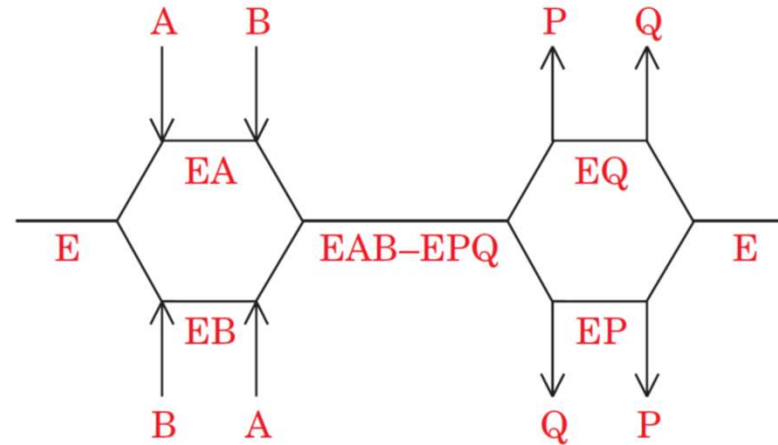
Bi-Bi sequential aleatório



Nas condições de pré-equilíbrio de EA e EB, pode derivar-se a seguinte equação de velocidade:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^a}{[A]} + \frac{K_m^b}{[B]} + \frac{K_s^a K_m^b}{[A][B]}}$$

Bi-Bi sequential aleatório



Mantendo $[B] = \text{cte}$, a equação de velocidade é Michaeliana em relação a $[A]$:

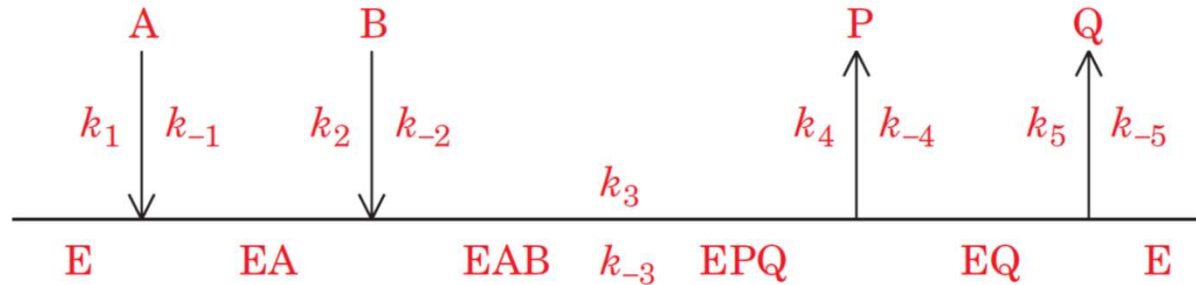
$$v = \frac{V_{\max}^{app} [A]}{K_m^{app} + [A]}$$

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max} [B]}{K_m^b + [B]}$$

$$K_m^{app} = \frac{K_m^a[B] + K_s^a K_m^b}{K_m^b + [B]}$$

$$\frac{V_{\max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{(V_{\max}/K_m^a)[B]}{[B] + K_s^a K_m^b / K_m^a}$$

Bi-Bi sequential ordenado



Este mecanismo obriga a que A e B interajam com o enzima por uma ordem específica. Não há libertação de produtos sem que forme o complexo EAB, e estes são libertados também por uma ordem específica.

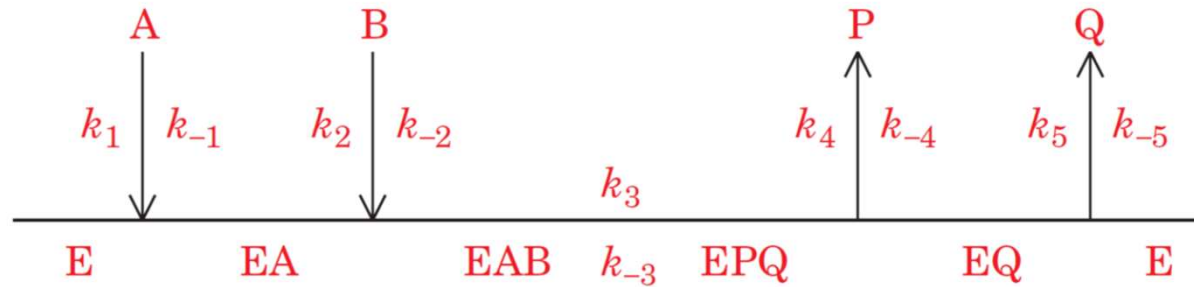
É possível deduzir a seguinte equação de velocidade em condições de estado estacionário:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^a}{[A]} + \frac{K_m^b}{[B]} + \frac{K_s^a K_m^b}{[A][B]}}$$

formalmente idêntica à do mecanismo sequencial aleatório, mas em que:

$$K_m^a = \frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)} \quad K_m^b = \frac{(k_{-1} + k_3) k_4}{k_2 (k_3 + k_4)} \quad k_{cat} = \frac{k_3 k_4}{k_3 + k_4}$$

Bi-Bi sequential ordenado



Se $k_{-1} \gg k_{\text{cat}}$ ou $K_{sA} \gg K_{mA}$, a equação de velocidade fica:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^b}{[B]} + \frac{K_s^a K_m^b}{[A][B]}}$$

(mecanismo sequential ordenado de equilíbrio)

[A] fixa:

$$V_{\max}^{\text{app}} = V_{\max}$$

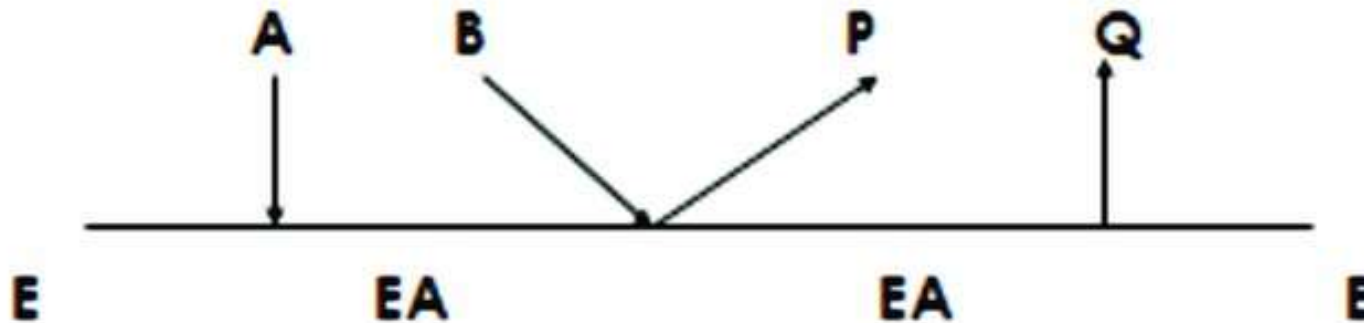
$$K_m^{\text{app}} = K_m^b \left(1 + K_s^a / [A] \right)$$

[B] fixa:

$$V_{\max}^{\text{app}} = V_{\max} \left(1 + K_m^b / [B] \right)$$

$$K_m^{\text{app}} = \frac{K_s^a K_m^b / [B]}{1 + K_m^b / [B]}$$

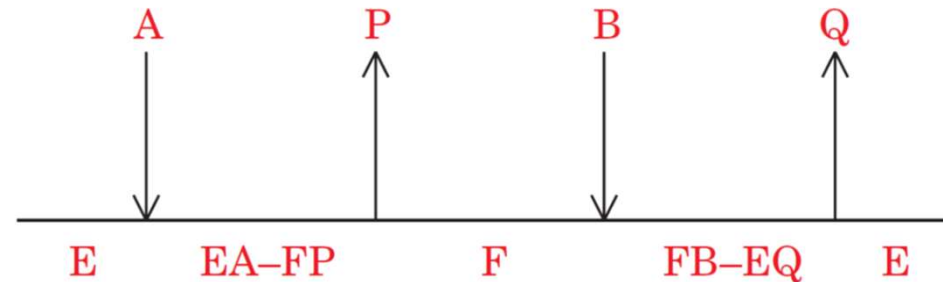
Mecanismo de Theorell-Chance



Caso limite do mecanismo bi-bi sequencial ordenado em que a ligação do segundo substrato e a libertação do primeiro produto ocorrem num único passo. Neste caso, em vez de um *complexo ternário* tem-se um *estado de transição* ternário.

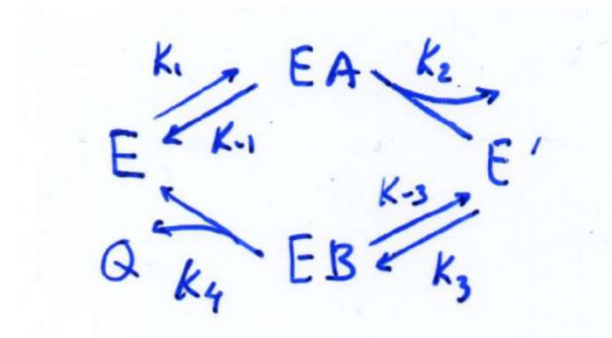
Exemplo: álcool desidrogenase

Ping-pong Bi-Bi

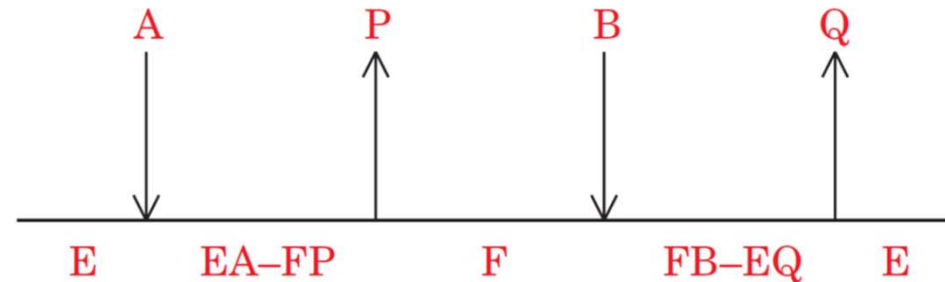


No mecanismo de ping-pong, a ligação de A e B é mutuamente exclusiva, não se formando complexo ternário. O produto correspondente ao primeiro substrato liberta-se antes da ligação do segundo substrato.

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^a}{[A]} + \frac{K_m^b}{[B]}}$$



Ping-pong Bi-Bi



[A] fixo:

$$v = \frac{V_{\max} [B] (1 + K_m^a / [A])}{[B] + K_m^b / (1 + K_m^a / [A])}$$

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{1 + K_m^a / [A]}$$

$$\frac{V_{\max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V_{\max}}{K_m^b}$$

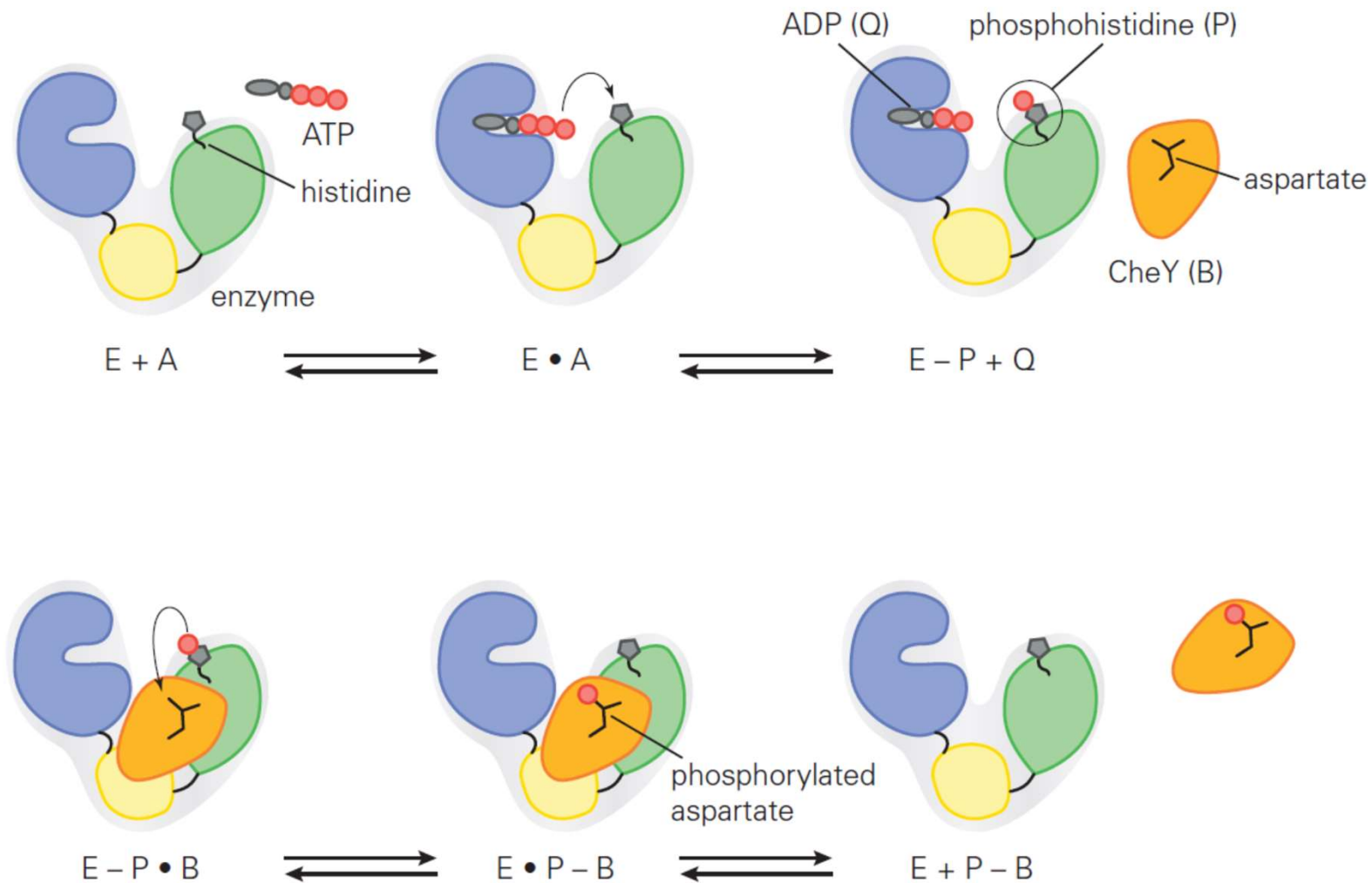
[B] fixo:

$$v = \frac{V_{\max} [A] (1 + K_m^b / [B])}{[A] + K_m^a / (1 + K_m^b / [B])}$$

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{1 + K_m^b / [B]}$$

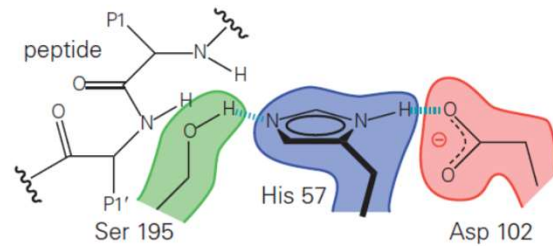
$$\frac{V_{\max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V_{\max}}{K_m^a}$$

Exemplo de mecanismo ping-pong: a histidina cinase CheA



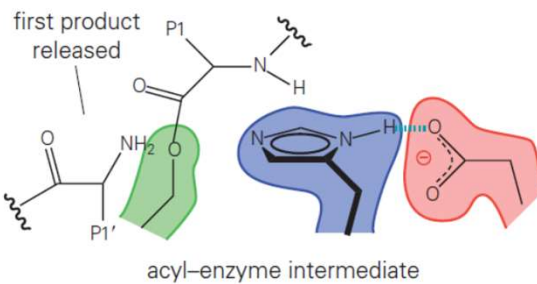
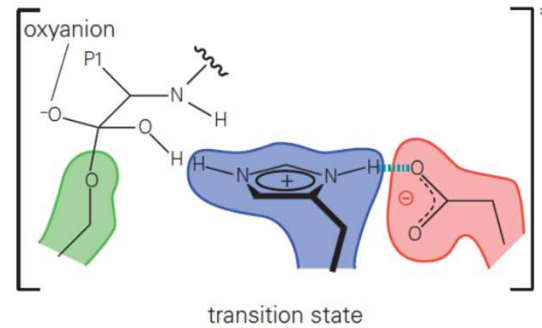
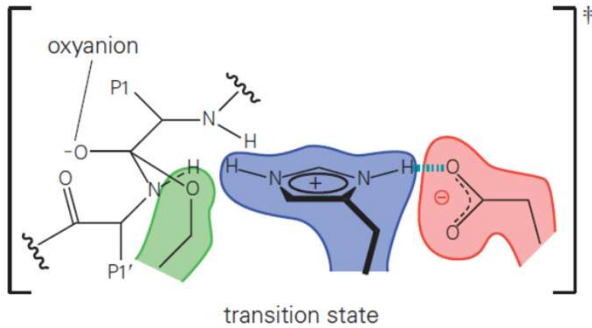
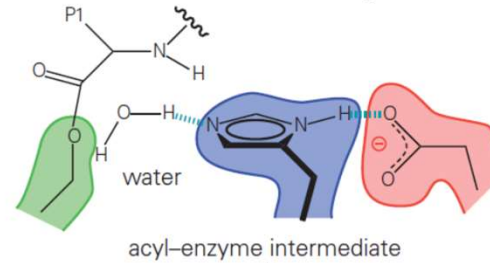
Trypsina

step 1

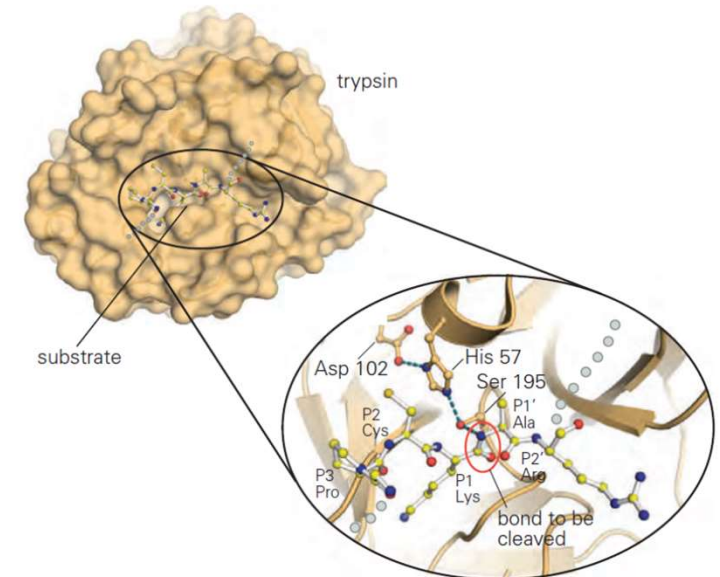
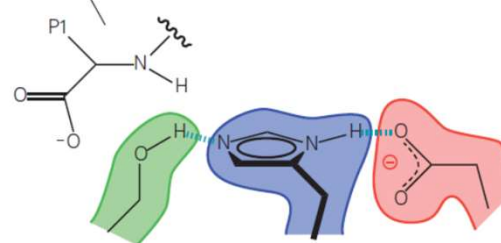


step 2

"oxyanion hole" on the enzyme, which is illustrated in Figure 16.43.



second product released



Significado das constantes nos modelos bi-bi

V_{\max} - velocidade de reacção para valores saturantes de [A] e [B]

K_m^a - [A] que produz $V_{\max}/2$ para [B] saturante

K_m^b - [B] que produz $V_{\max}/2$ para [A] saturante]

K_s^a - Constante de dissociação do complexo EA

K_s^b - Constante de dissociação do complexo EB

Discriminação de mecanismos

A análise da dependência dos parâmetros cinéticos dos mecanismos bi-bi com a concentração dos diferentes substratos permite em alguns casos discriminar entre mecanismos.

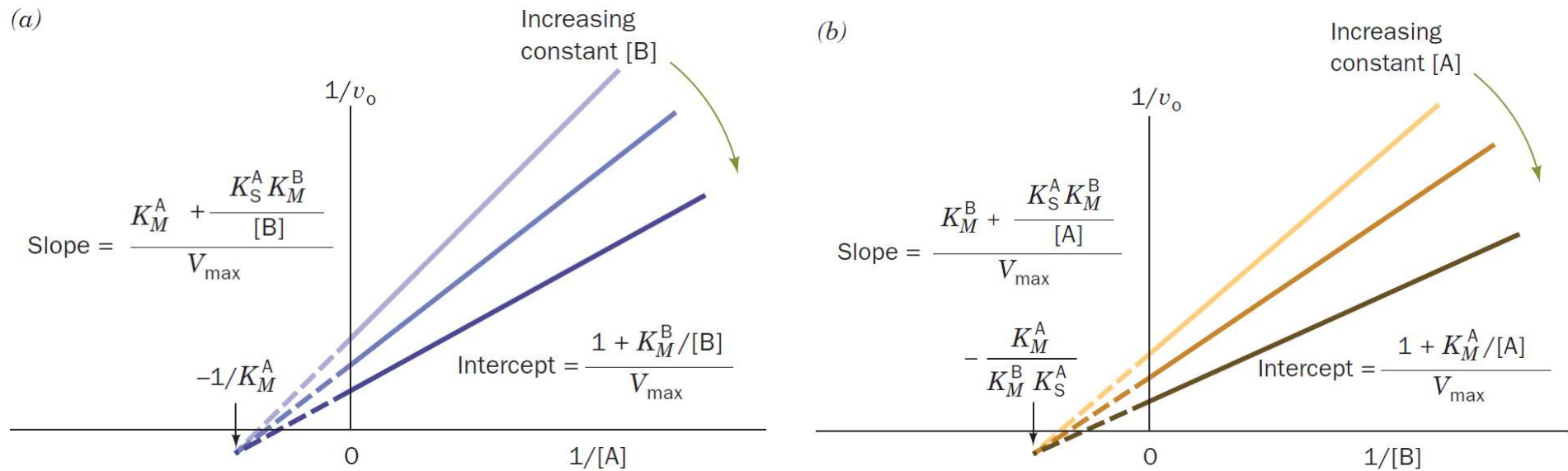
Os padrões de **inibição pelo produto** em reacções multi-substrato são outra forma de diagnosticar mecanismos.

Gráficos de $1/v$ em função de $1/[A]$ (ou $1/[B]$) – discriminação entre bi-bi sequencial ordenado e bi-bi ping pong

Estudos de inibição pelo produto – discriminação entre bi-bi sequencial ordeando e bi-bi sequencial aleatório.

Bi-Bi sequential ordenado

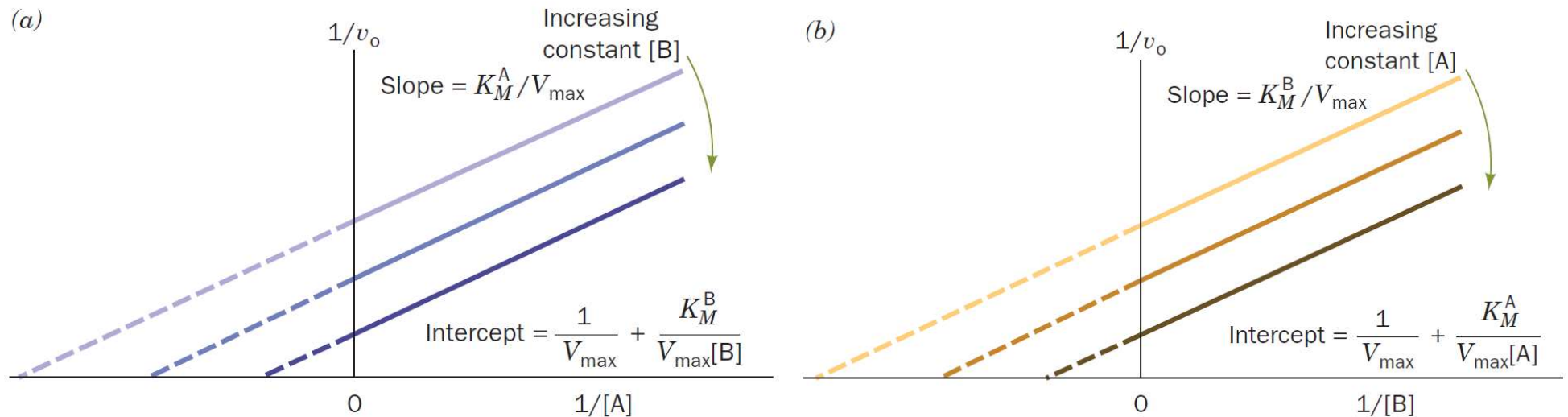
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m^a}{V_{\max} [A]} + \frac{K_m^b}{V_{\max} [B]} + \frac{K_s^a K_m^b}{V_{\max} [A][B]}$$



Gráficos de Lineweaver-Burke para [A] ou [B] constante produzem que se intersectam num ponto no segundo ou terceiro quadrantes.

Ping-pong Bi-Bi

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m^a}{V_{\max}[A]} + \frac{K_m^b}{V_{\max}[B]}$$

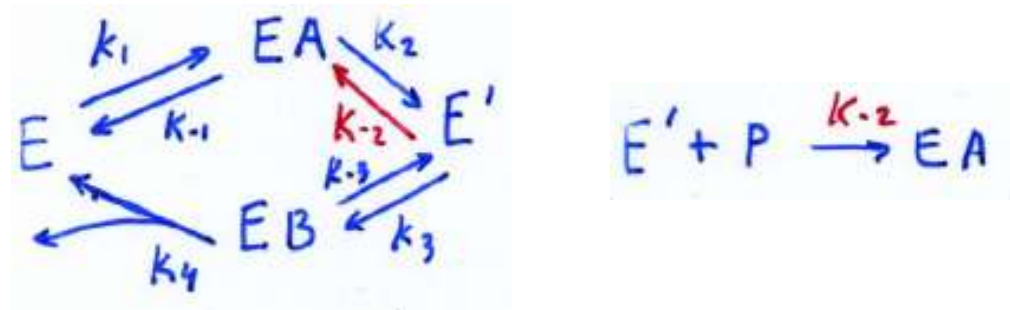


Gráficos de Lineweaver-Burke para $[A]$ ou $[B]$ constante produzem retas paralelas.

Padrões de inibição pelo produto

O efeito inibitório de um ou outro dos produtos numa reacção bi-substrato pode servir de diagnóstico para o tipo de mecanismo presente.

Exemplo (mecanismo ping-pong):



$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} \left(1 + \frac{[P]}{K_i} \right) + \frac{K_s^A K_m^B [P]}{K_i [A][B]}}$$

TOMANDO [A] COMO O SUBSTRATO VARIÁVEL:

$$V = \frac{V_{max} [A] / (1 + K_m^B / [B]) (1 + [P] / K_i)}{[A] + \frac{K_m^A + K_s^A K_m^B [P] / K_i [B]}{1 + (K_m^B / [B]) (1 + [P] / K_i)}} \quad \text{INIBIÇÃO MISTA}$$

PARA [B] SATURANTE VEM $\rightarrow V = \frac{V_{max} [A]}{K_m^A + [A]}$ \uparrow
 NÃO HÁ INIBIÇÃO

TOMANDO [B] COMO SUBSTRATO VARIÁVEL:

$$V = \frac{V_{max} [B] / (1 + K_m^A / [A])}{[B] + \frac{K_m^B (1 + [P] / K_i) + K_s^A K_m^B [P] / K_i [A]}{1 + K_m^A / [A]}}$$

INIBIÇÃO COMPETITIVA

PARA [A] SATURANTE
 FICA

$$V = \frac{V_{max} [B]}{[B] + K_m^B \left(1 + \frac{[P]}{K_i}\right)}$$

A INIBIÇÃO MANTÉM-SE

Padrões de inibição pelo produto

| | | | Inibição pelo produto | |
|----------------------|--------------------|----------------|-----------------------|------------------|
| Mecanismo | Substrato variável | Substrato fixo | P | Q |
| Aleatório equilíbrio | A | B | competitiva | competitiva |
| | A | B saturante | ---- | ---- |
| | B | A | competitiva | competitiva |
| | B | A saturante | ---- | ---- |
| Ordenado | A | B | competitiva | mista |
| | A | B saturante | competitiva | anti-competitiva |
| | B | A | mista | mista |
| | B | A saturante | ---- | ---- |
| Pingue-Pongue | A | B | mista | competitiva |
| | A | B saturante | ---- | competitiva |
| | B | A | competitiva | mista |
| | B | A saturante | competitiva | ---- |