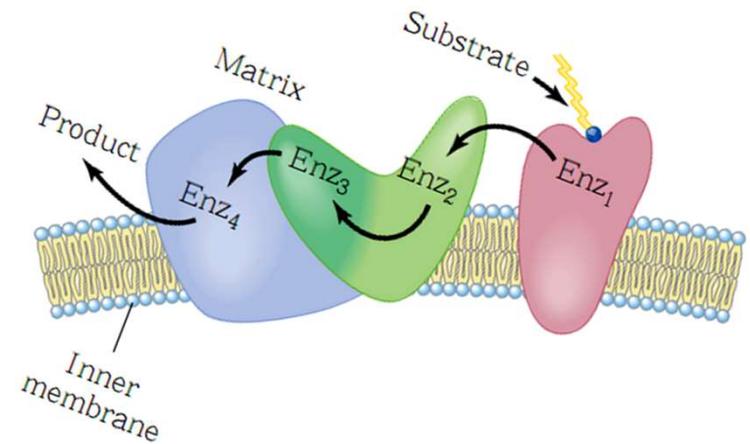
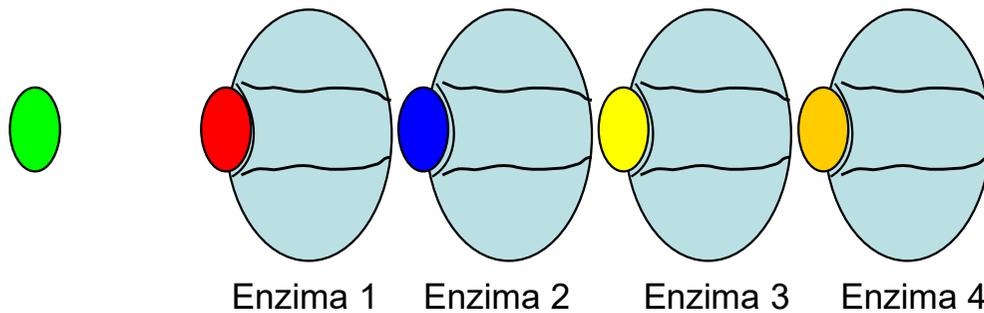


# Enzimas que ultrapassam o limite difusivo

Em certas condições é possível observar eficiências catalíticas superiores ao limite difusional do substrato e enzima.

## 1 - Canalização de substratos:

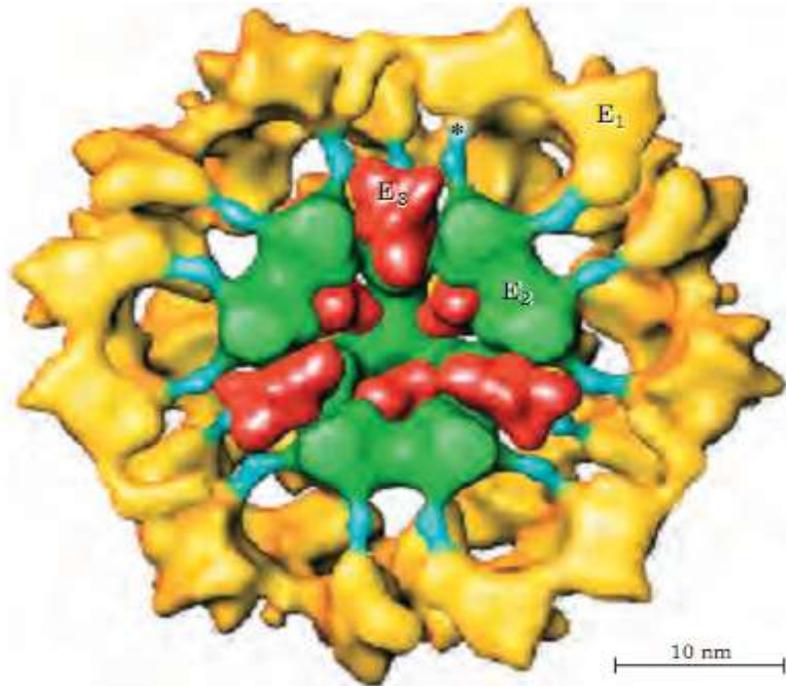


A difusão do produto de uma reacção enzimática é facilitada por canalização para o centro activo do próximo enzima da via metabólica. Por vezes as várias actividades enzimáticas estão localizadas num mesmo complexo multi-enzimático (e.g.: complexo piruvato desidrogenase no ciclo TCA)

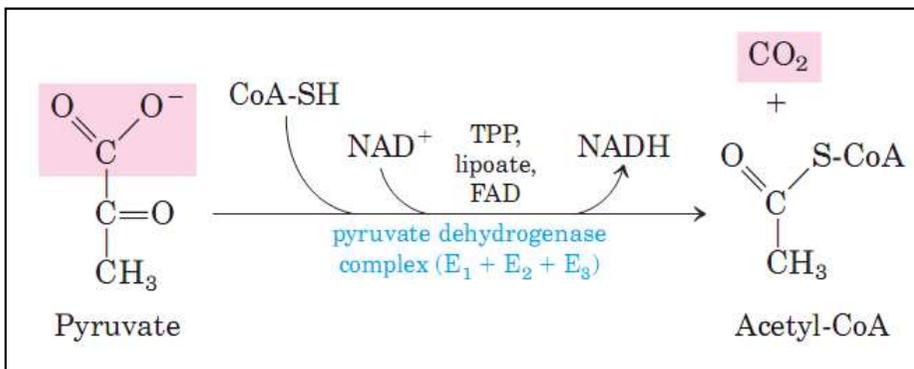
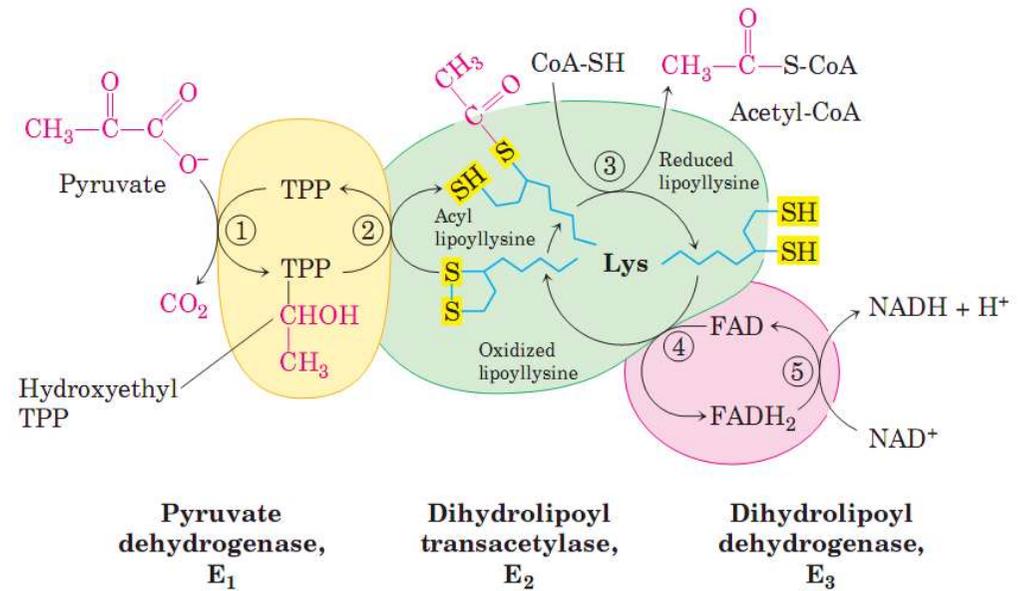
A difusão de um substrato hidrófobo pode ocorrer no interior de uma membrana, limitando o volume disponível para a difusão até ao centro activo do enzima (e.g.:enzimas da cadeia respiratória)

# Exemplo de canalização de substratos: o complexo da piruvato desidrogenase

Complexo multienzimático:

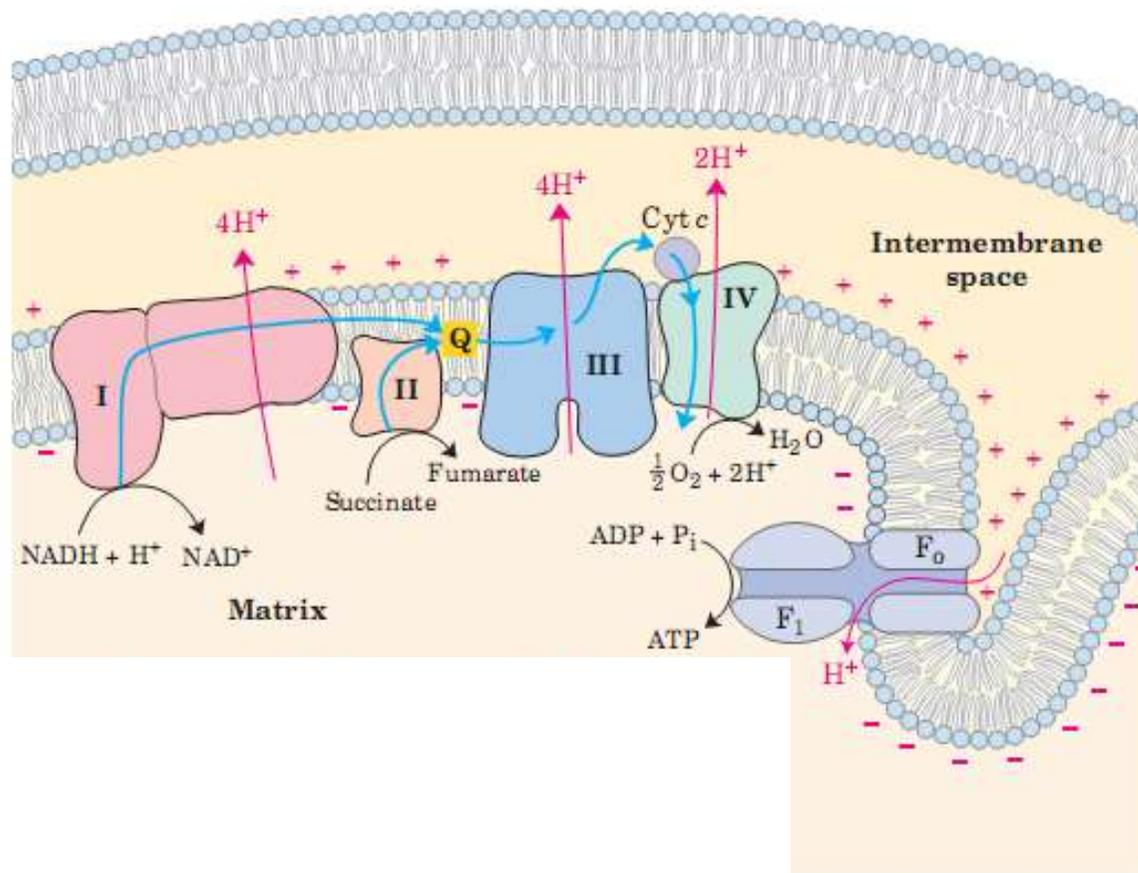


Canalização dos substratos:



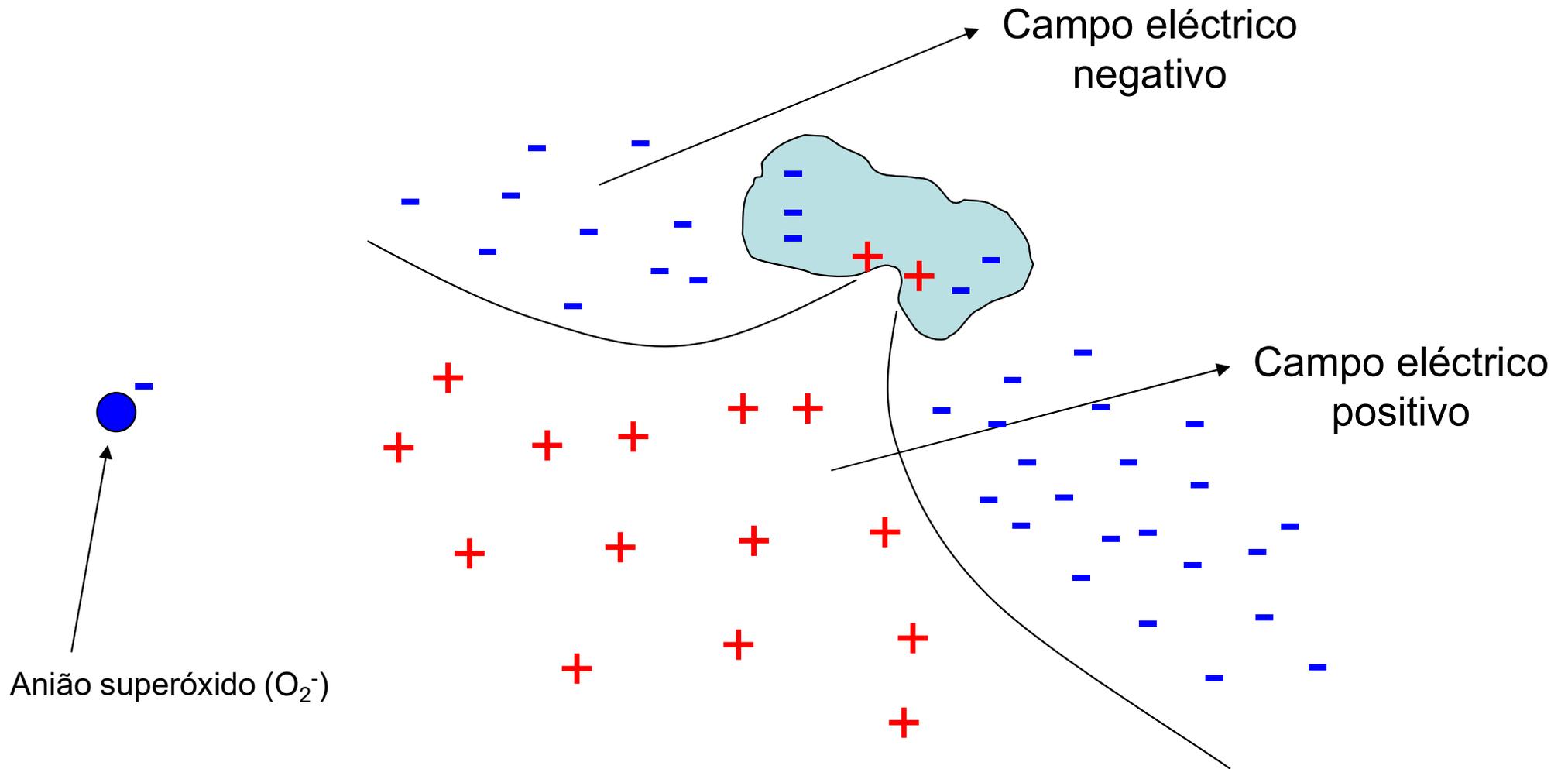
Reacção total catalizada  
pelo complexo piruvato  
desidrogenase

# Exemplo de canalização de substratos: cadeia respiratória mitocondrial



# Enzimas que ultrapassam o limite difusivo

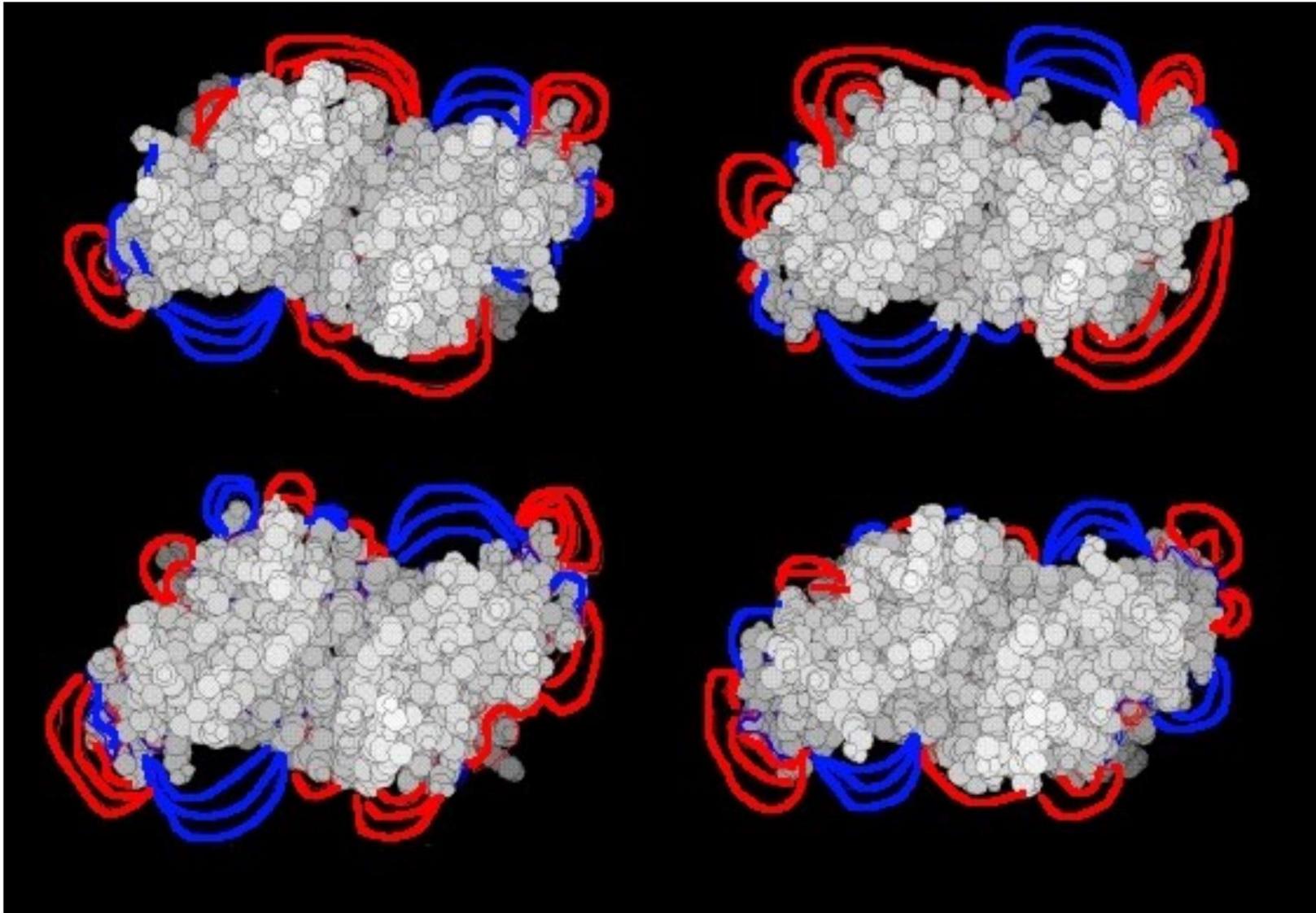
2 – Condução activa do substrato:



Anião superóxido ( $O_2^-$ )

Condução electrostática na superóxido dismutase

# Potential electrostático do enzima superóxido dismutase



 positivo

 negativo

# Equação reversível de Michaelis-Menten

Uma vez que todas as reacção enzimáticas são, *em princípio*, reversíveis, o tratamento apresentado para os enzimas mono-substrato só ficará completo se for permitida a reacção inversa à de formação do produto:



Também neste caso assumimos condições de estado estacionário para o complexo central:

$$\frac{d[EA]}{dt} = 0$$

Sendo a variação de [EA] dada por

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] + k_{-2}([E]_0 - [EA])[P] - (k_{-1} + k_2)[EA] = 0$$

(cont.)

# Equação reversível de Michaelis-Menten

Resolvendo em ordem a [EA] fica:

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A] + k_{-2}[E]_0[P]}{k_{-1} + k_2 + k_1[A] + k_{-2}[P]}$$

A velocidade efectiva de formação de produto já não é simplesmente dada por  $v = k_2[EA]$ , porque temos também que considerar a reacção inversa que consome P para formar EA:

$$v = k_2[EA] - k_{-2}([E]_0 - [EA])[P]$$

Substituindo o valor anterior de [EA] nesta expressão e simplificando, temos

$$v = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [A] - k_{-1} k_{-2} [E]_0 [P]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [A] + k_{-2} [P]}$$

(cont.)

# Equação reversível de Michaelis-Menten

Note-se que se tivermos  $[P]=0$ , esta expressão reduz-se a

$$v = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [A]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [A]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [A]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]_0}$$

que é simplesmente a equação de Michaelis-Menten obtida no contexto do mecanismo de Briggs-Haldane. (Porquê  $[A]_0$  em vez de  $[A]$  ?...)

As expressões da constante de especificidade  $k_A$  e para a constante de Michaelis,  $K_{mA}$ , (o uso do “A” em índice denota reacção directa),

$$K_{mA} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{e} \quad k_A = \frac{k_2}{K_{mA}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Têm um equivalente para a reacção inversa dado por

$$K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad \text{e} \quad k_P = \frac{k_{-1}}{K_{mP}} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$$

(cont.)

# Equação reversível de Michaelis-Menten

(cont.) se substituirmos estas definições na expressão da velocidade, fica:

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

Esta expressão é a forma reversível da equação de Michaelis-Menten, não sendo exclusiva do mecanismo particular a partir da qual foi obtida. Mecanismos muito mais complexos podem produzir esta equação!

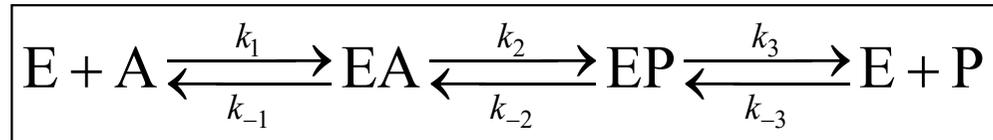
Note-se que:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [A]}{K_m + [A]} = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + \frac{[A]}{K_m}}$$

logo a forma funcional da equação irreversível de MM fica semelhante à forma reversível desde que escrita em termos de  $k_A$  e  $K_m$

## Mecanismo reversível com dois complexos centrais (mecanismo de 3 passos)

Uma extensão natural do mecanismo discutido consiste em assumir que a ligação do substrato e libertação do produto ocorrem de modo simétrico, e que o complexo enzima-produto tem uma existência que não é desprezável:



A equação de velocidade tem a forma funcional do mecanismo anterior,

$$\boxed{v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}}$$

Mas as definições dos parâmetros observáveis em termos das constantes cinéticas são muito mais complexas.

(cont.)

## Mecanismo reversível com dois complexos centrais

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

$$K_{mA} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)} \quad k_0 = \frac{k_2k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \quad k_A = \frac{k_0}{K_{mA}} = \frac{k_1k_2k_3}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}$$

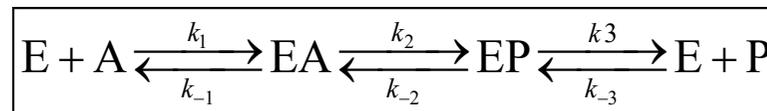
$$K_{mP} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)} \quad k_{-0} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-1} + k_{-2} + k_2} \quad k_P = \frac{k_{-0}}{K_{mP}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}}{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}$$

Note-se que temos 6 constantes de mecanismo ( $k_1$   $k_2$   $k_3$   $k_{-1}$   $k_{-2}$   $k_{-3}$ ) mas apenas 4 parâmetros observáveis ( $K_{mA}$ ,  $K_{mP}$ ,  $k_A$  e  $k_P$ ), pelo que não existe uma única solução para os valores das constantes em termos de observáveis.

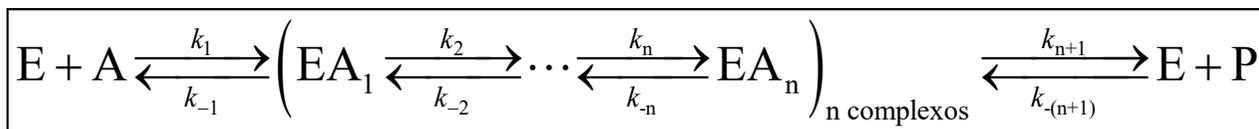
**N.B.:** veja-se o uso de  $k_0$  e  $k_{-0}$  para as constantes catalíticas da reacção directa e inversa.



1 complexo central



2 complexos centrais



n complexos centrais



condições de estado estacionário

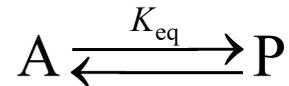
$$\boxed{v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}}$$

# A relação de Haldane

Os 4 parâmetros cinéticos da equação reversível de Michaelis-Menten,

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

Pois a constante de equilíbrio da reacção



Não é alterada pela presença do catalisador.

Se  $[A]_{eq}$  e  $[P]_{eq}$  forem concentrações de equilíbrio, temos que ter

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A]_{eq} - k_P [E]_0 [P]_{eq}}{1 + \frac{[A]_{eq}}{K_{mA}} + \frac{[P]_{eq}}{K_{mP}}} = 0$$

Porque no equilíbrio a velocidade de reacção é zero.

(cont.)

# A relação de Haldane

(cont.) daqui tiramos que:

$$k_A [E]_0 [A]_{\text{eq}} - k_P [E]_0 [P]_{\text{eq}} = 0$$

e

$$\frac{k_A}{k_P} = \frac{[P]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}} = K_{\text{eq}}$$

Relação de  
Haldane

A relação de Haldane também pode ser escrita como:

$$\frac{k_0 / K_{mA}}{k_{-0} / K_{mP}} = \frac{k_0 K_{mP}}{k_{-0} K_{mA}} = K_{\text{eq}}$$

Da relação acima conclui-se que os 4 parâmetros cinéticos da reacção reversível,  $K_{mA}$ ,  $K_{mP}$ ,  $k_A$  e  $k_P$  **não** são independentes !

# Enzimas “Irreversíveis”

Enzimas que apresentam enormes diferenças de velocidade na catálise da reacção directa e inversa, mesmo quando a reacção que catalisam tem uma constante de equilíbrio próxima da unidade.

**Ex:** *o enzima metionina-adenosil-transferase catalisa a reacção directa  $10^5$  vezes mais depressa que a reacção inversa, mas o  $K_{eq}$  da reacção é próximo de 1 !*

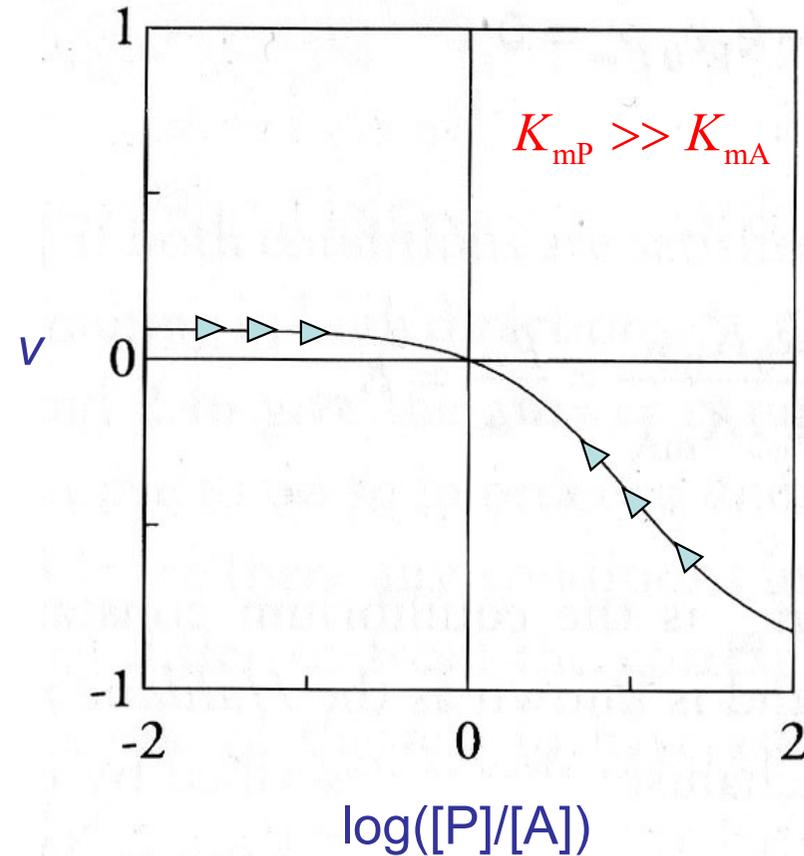
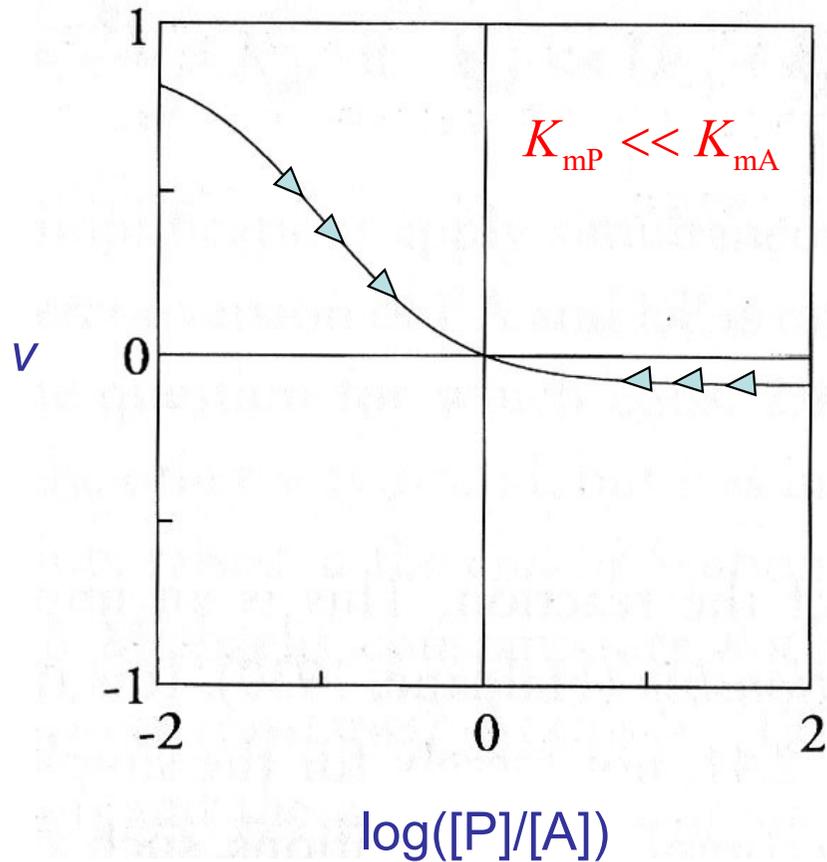
Não existe qualquer impedimento termodinâmico.

A relação de Haldane:

$$\frac{k_A}{k_P} = \frac{k_{cat}^A K_{mP}}{k_{cat}^P K_{mA}} = \frac{V_{max A}^A K_{mP}}{V_{max P}^A K_{mA}} = K_{eq}$$

Limita o âmbito das constantes cinéticas, mas não impede este tipo de situação, porque  $K_{mA}$  e  $K_{mP}$  podem variar livremente.

# Enzimas “Irreversíveis”



As setas indicam a direcção em relação ao equilíbrio, o qual é atingido quando  $[P]=[A]$  (sendo então  $\log([P]/[A])=\log(1)=0$ )

