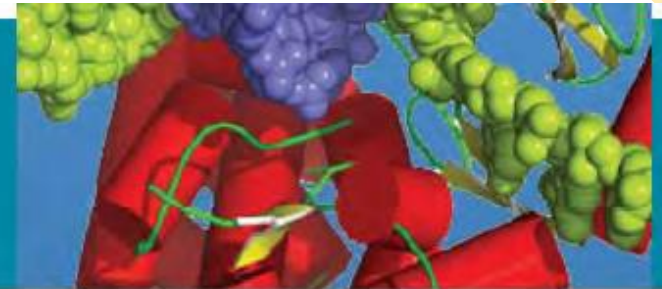


Aula 5

11 Março 2022

3

Enzymes: Classification, Kinetics, and Control

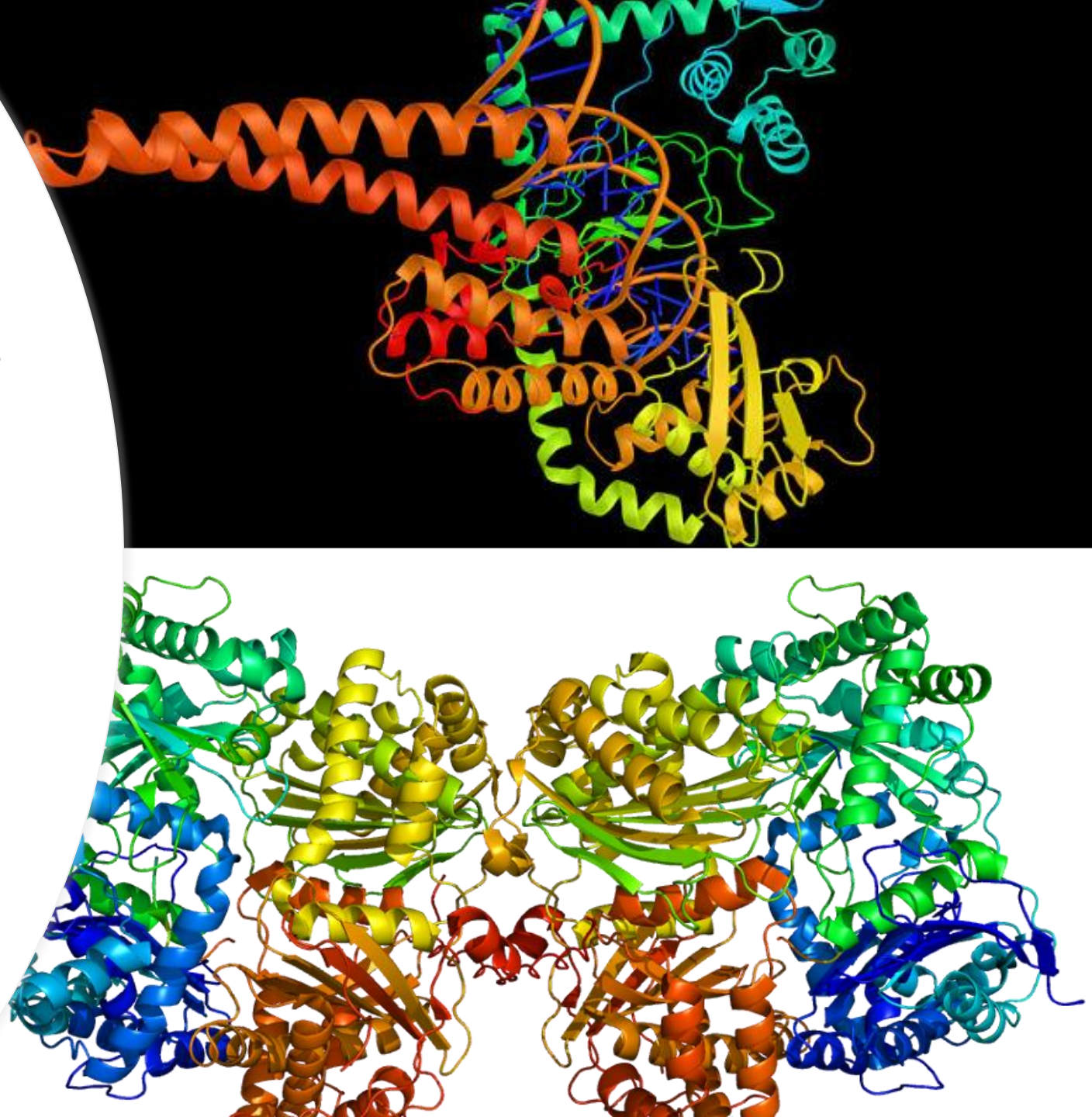


Tópicos

- 3.1.** Classificação dos enzimas
- 3.2.** Mecanismo geral dos enzimas
- 3.3** Centro activo os enzimas
- 3.4.** Coenzimas, co-substrates e cofactores
- 3.5.** Reacções de um só substrato

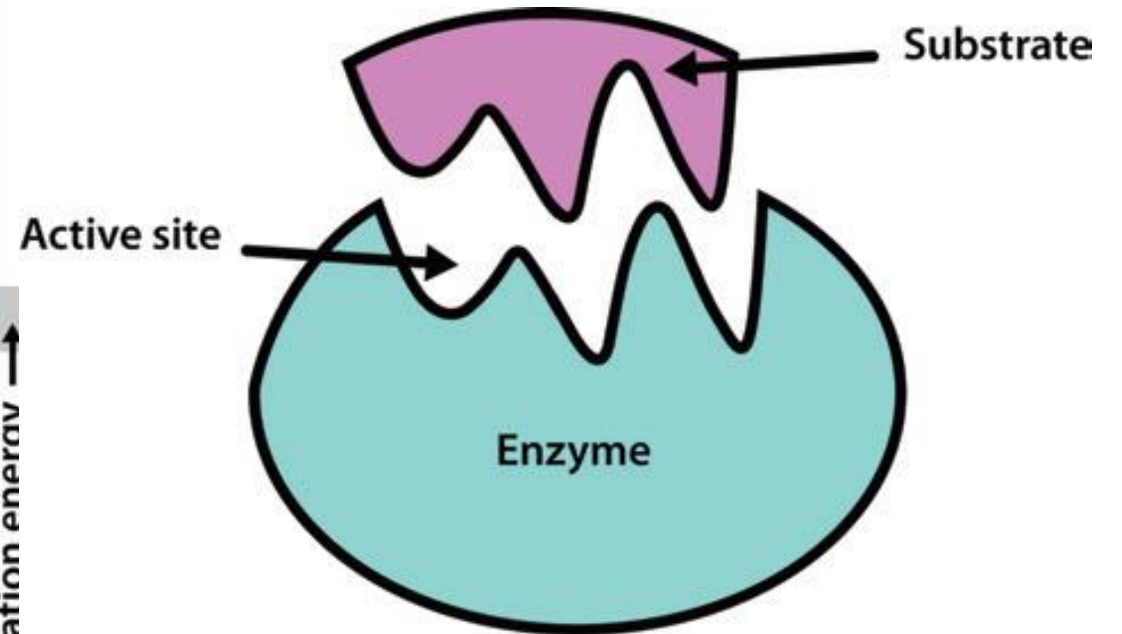
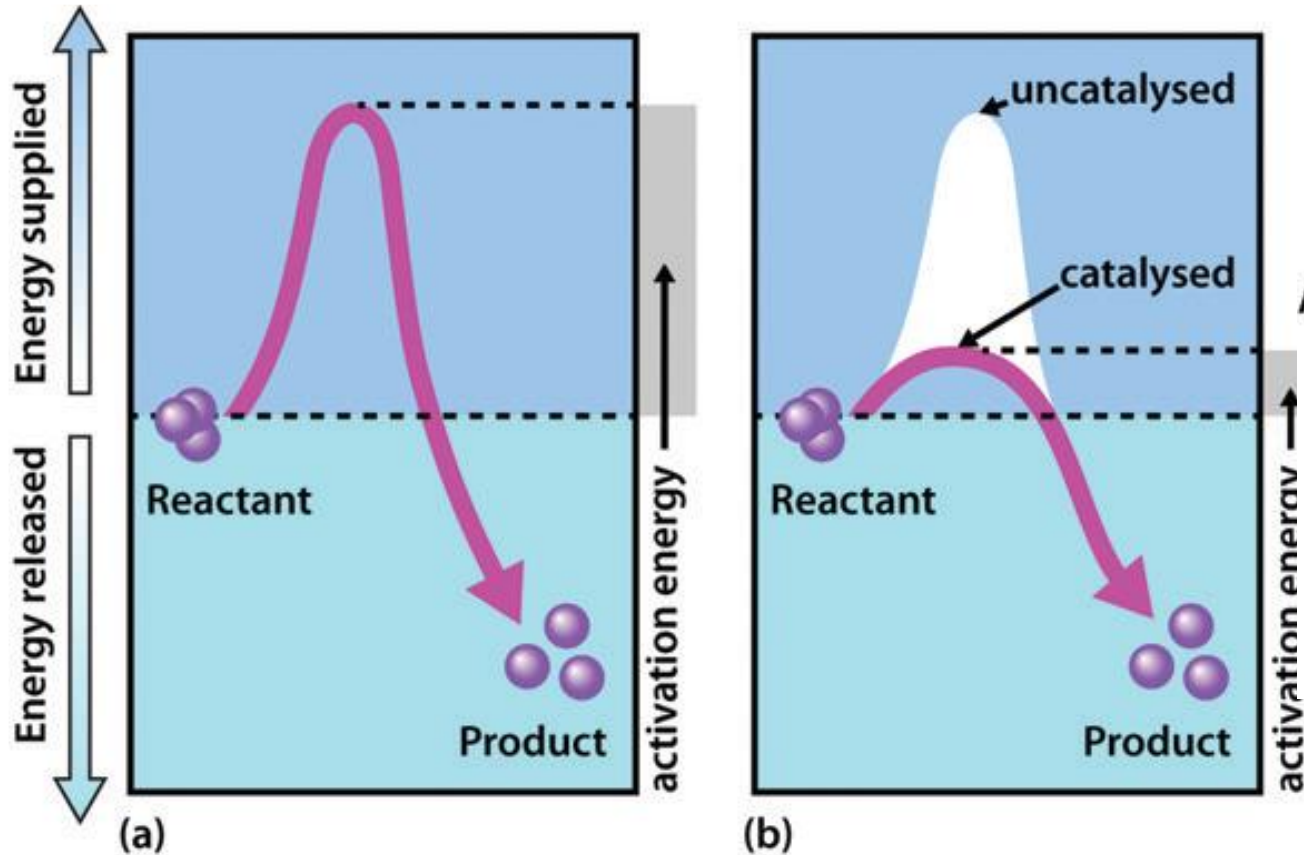
O que são enzimas

- Moléculas de tipo proteico (não só, mas na maior parte das vezes) com actividade catalítica. Fazem acelerar a velocidade de uma reacção, baixando a energia de activação do processo e como qualquer catalisador não são consumidos durante a reacção. Podem ser modificados temporariamente, mas voltam à sua estrutura inicial.

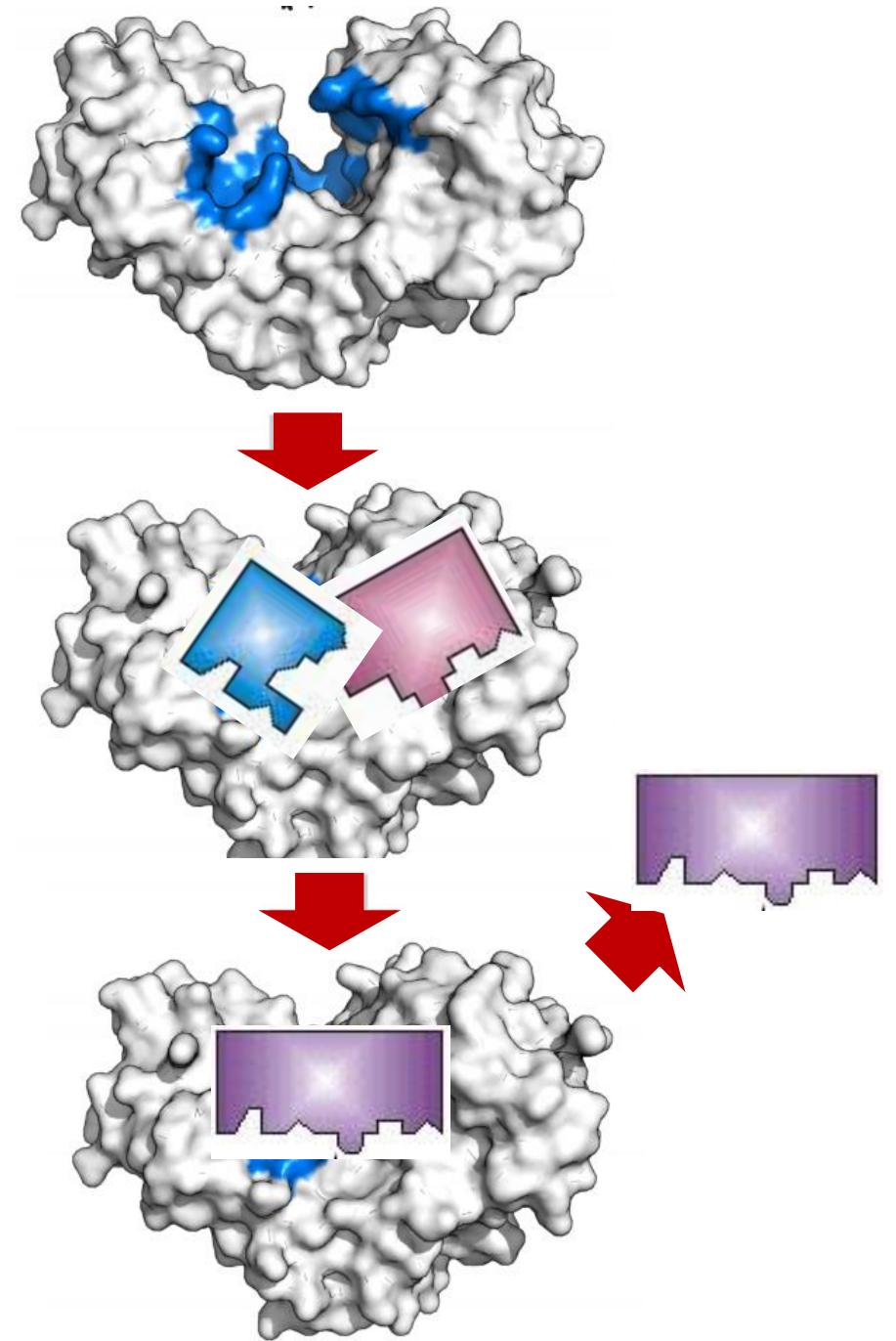
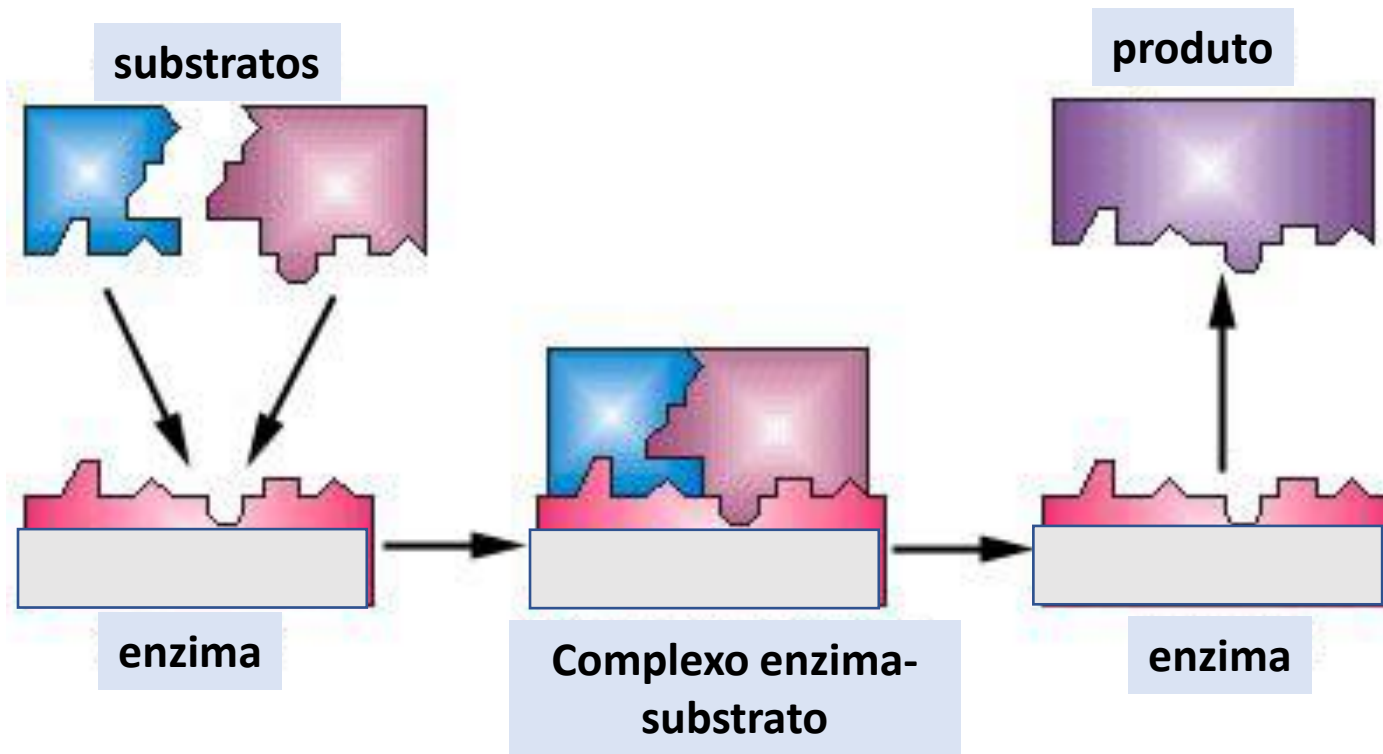


Fazem diminuir a energia de activação, pois ao participarem na reacção tornam o processo mais económico energeticamente

Reacção com 1 substrato



Reacção com 2 substratos



3.1.

CLASSIFICATIONS OF ENZYMES

Existem muitas reacções químicas, no organismo, a serem catalisadas por enzimas:

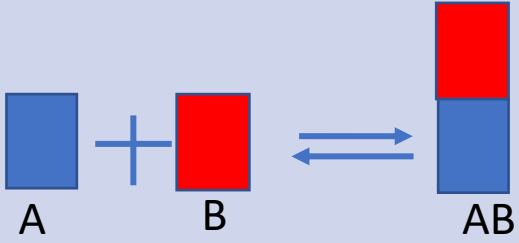
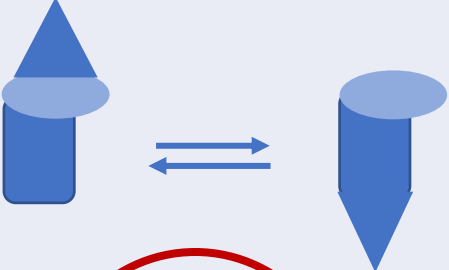
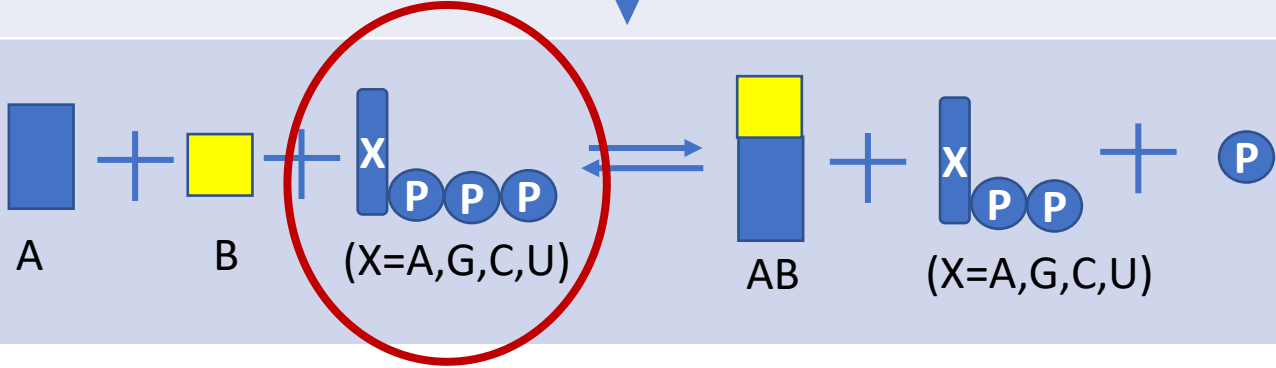
exemplo: reacções de hidrólise, reacções de síntese, reacções de transferência de grupos funcionais entre substratos, etc.

Os enzimas são específicos e como tal só catalisam um tipo de reacção, por isso pode-se classificá-los consoante a reacção que catalisam e muitas vezes usando também os substratos que participam nessa reacção

Existem 6 classes de enzimas

Classe	Reacção	Sub-classes
Oxidoreductases	<p> $A_{\text{red}} + B_{\text{oxid}} \rightleftharpoons A_{\text{oxid}} + B_{\text{red}}$ </p>	Desidrogenases Oxidases/reductases Monooxigenases/dioxigenases
Transferases	<p> $AB + C \rightleftharpoons A + CB$ </p>	Glicosiltransferases Aminotransferases fosfotransferases
Hidrolases	<p> $A-B + H_2O \rightleftharpoons AH + B-OH$ </p>	Esterases/glicosidases/peptidases Proteases amidases

Classificação (cont)

Classe	Reacção	Sub-classes
Liasas (sintases)	 <p>A + B \rightleftharpoons AB</p>	C-C liases C-O liases C-N liases C-S liases
Isomerasas		Epimerases Isomerasas cis-trans
Ligasas (sintetases)	 <p>A + B + X-PPPP \rightleftharpoons AB + X-PP + P (X=A,G,C,U)</p>	C-C ligases C-O ligases C-N ligases C-S ligases

1. Oxidoreductases

Dehydrogenases
Oxidases
Reductases
Peroxidases
Catalase
Oxygenases
Hydroxylases

3. Hydrolases

Esterases
Glycosidases
Peptidases
Phosphatases
Thiolases
Phospholipases
Amidases
Deaminases
Ribonucleases

2. Transferases

Transaldolase
and transketolase
Acyl, methyl,
glucosyl, and
phosphoryltransferases
Kinases
Phosphomutases

4. Lyases

Decarboxylases
Aldolases
Hydratases
Dehydratases
Synthases
Lyases

5. Isomerases

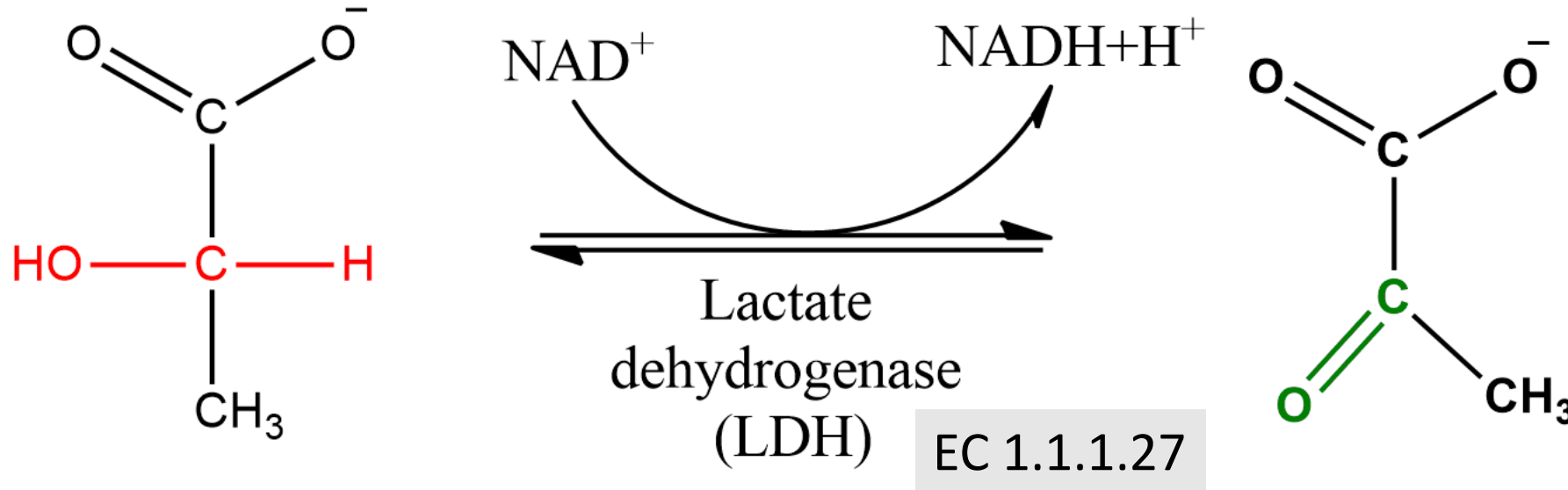
Racemases
Epimerases
Isomerases
Mutases (not all)

6. Ligases

Synthetases
Carboxylases

Exemplos destas várias reacções

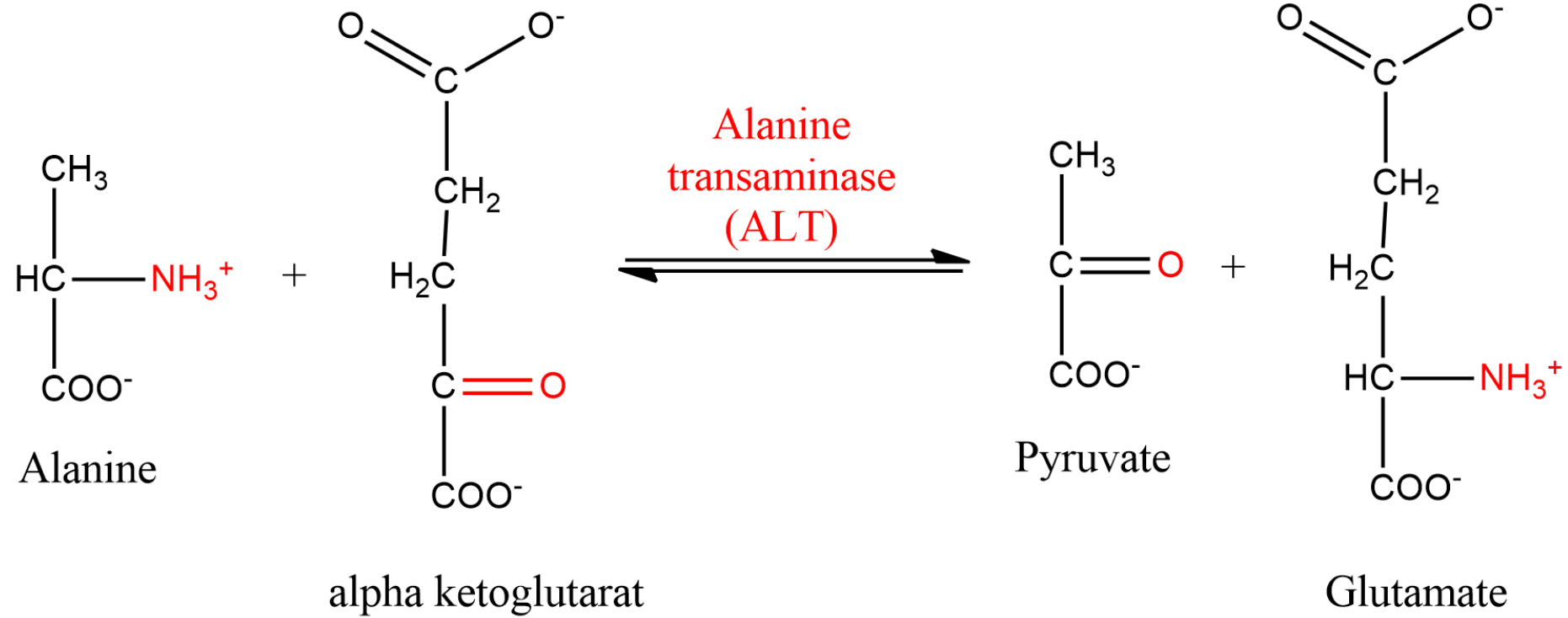
Classe 1: Oxidoreductases



2º número: indica o grupo que dá hidrogénio ou electrões para a redução, sendo ele próprio oxidado, 1 indica um grupo -CHOH- group, 2 a -CHO or -CO-COOH

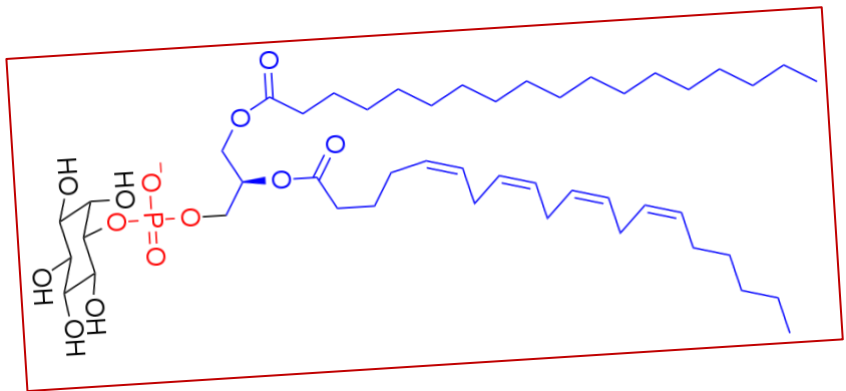
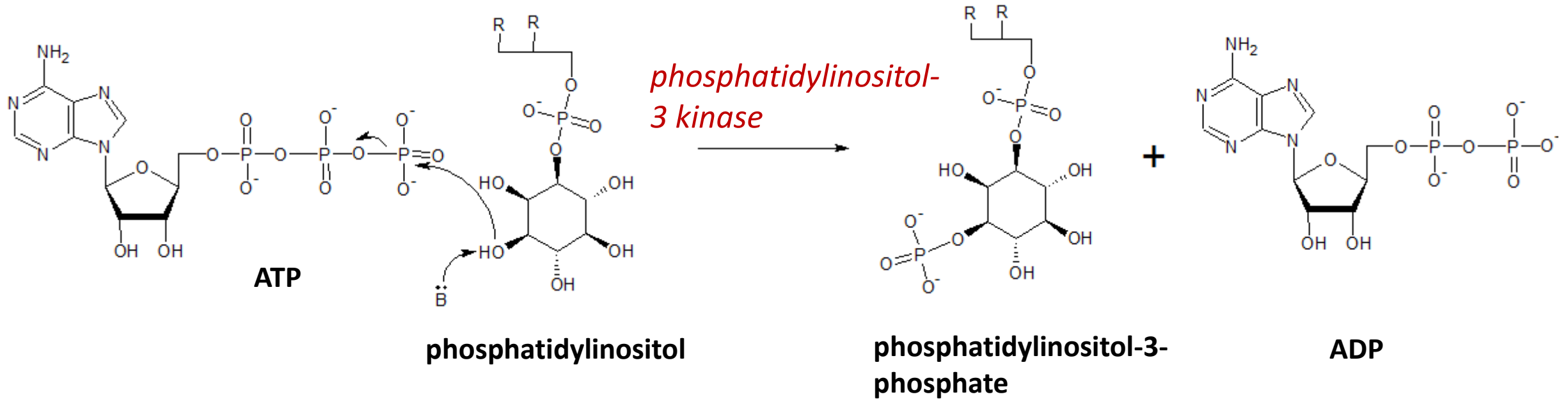
3º número: indica o tipo de aceitador envolvido: 1 denotes NAD(P)⁺, 2 a cytochrome, 3 molecular oxygen, 4 a disulfide

Classe 2: Transferases



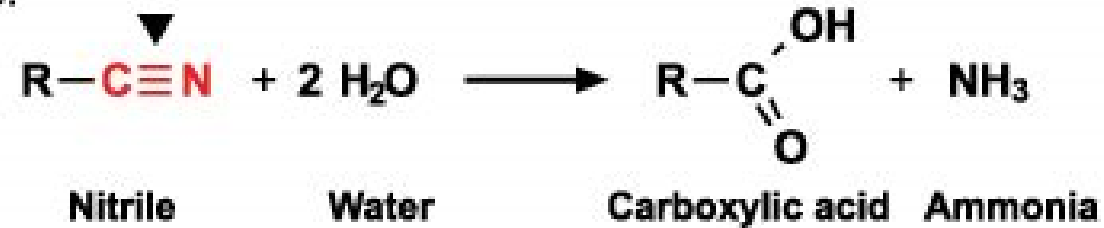
Classe 2: Transferases

Cinases: enzimas que catalisam a fosforilação de substratos

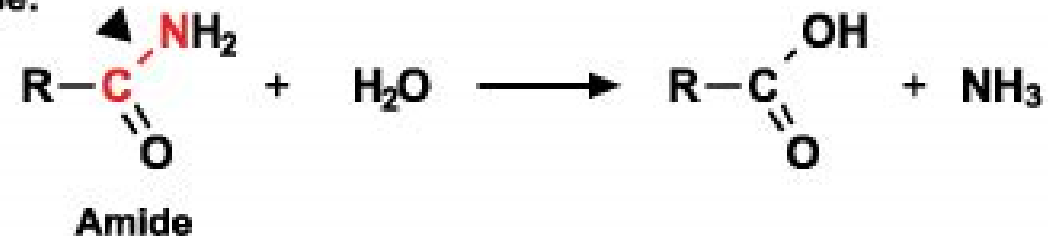


Classe 3: Hidrolases

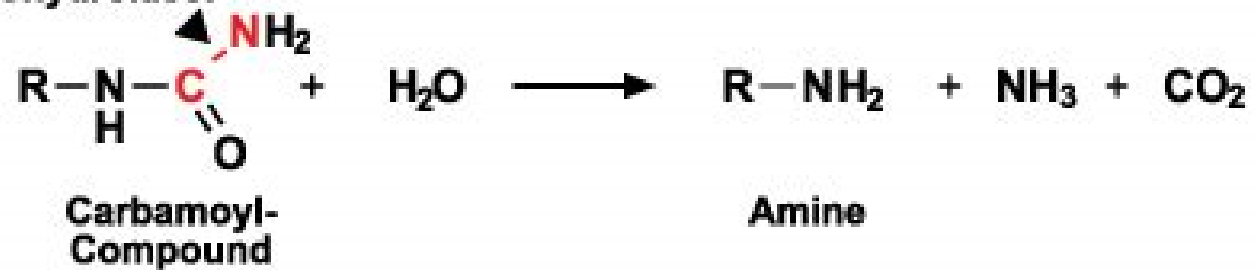
Nitrilase:



Amidase:

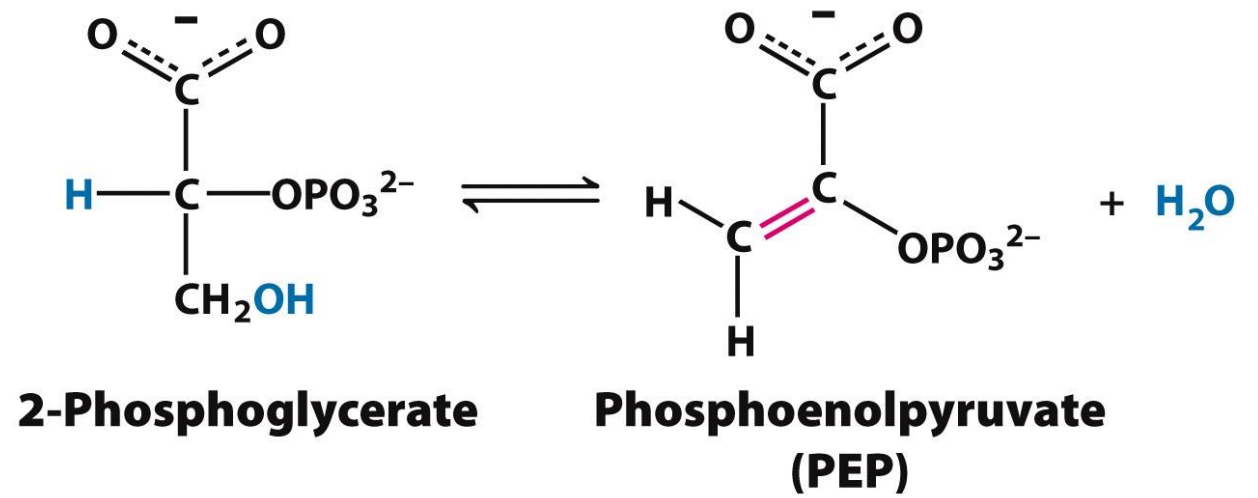
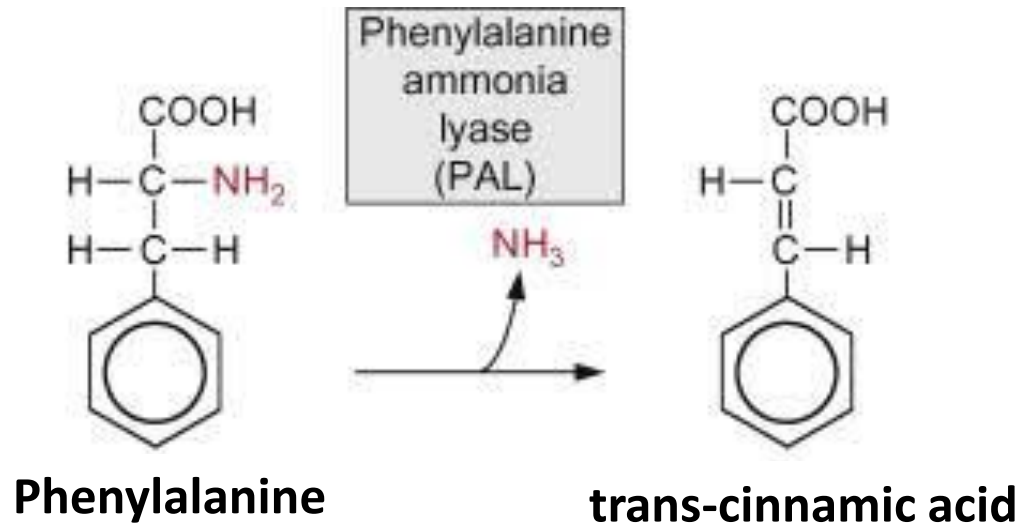


N-Carbamoyl
Amidohydrolase:

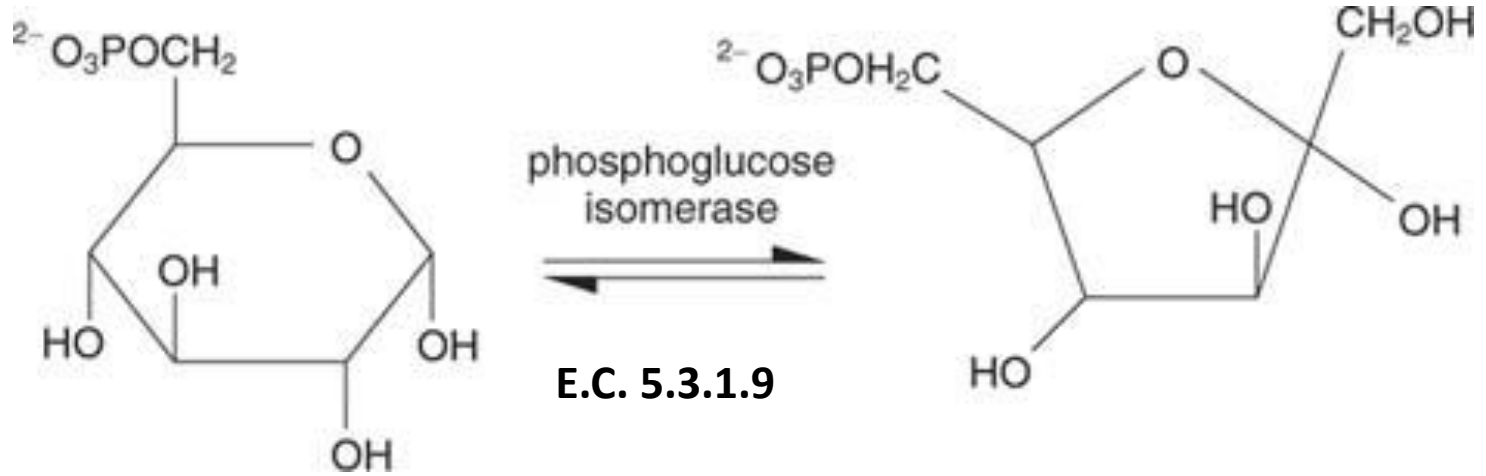
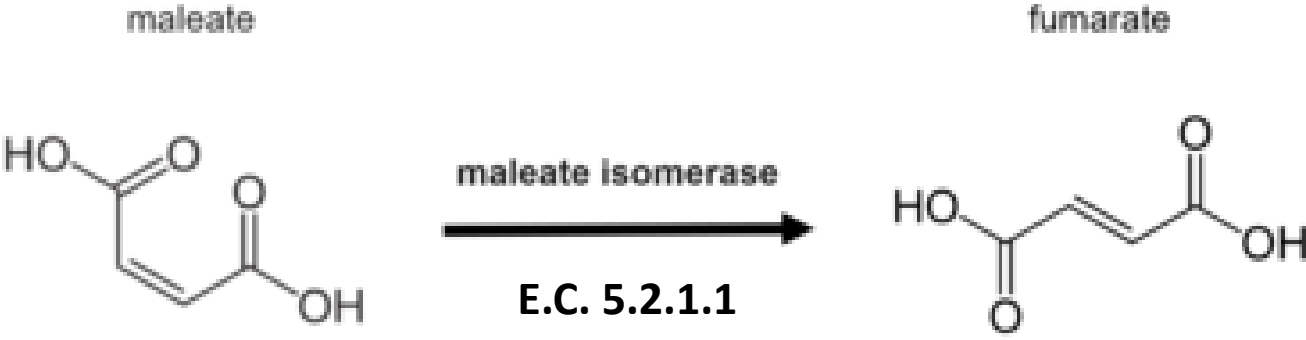


Classe 4: Liases

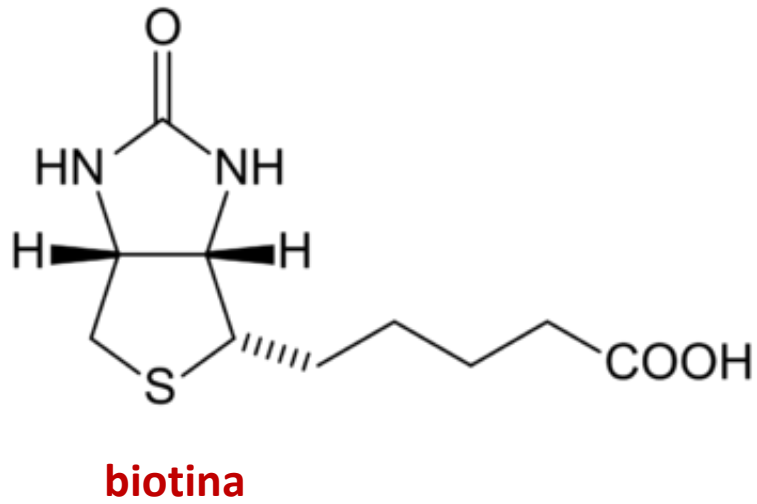
Podem quebrar ou formar ligações



Classe 5: Isomerases

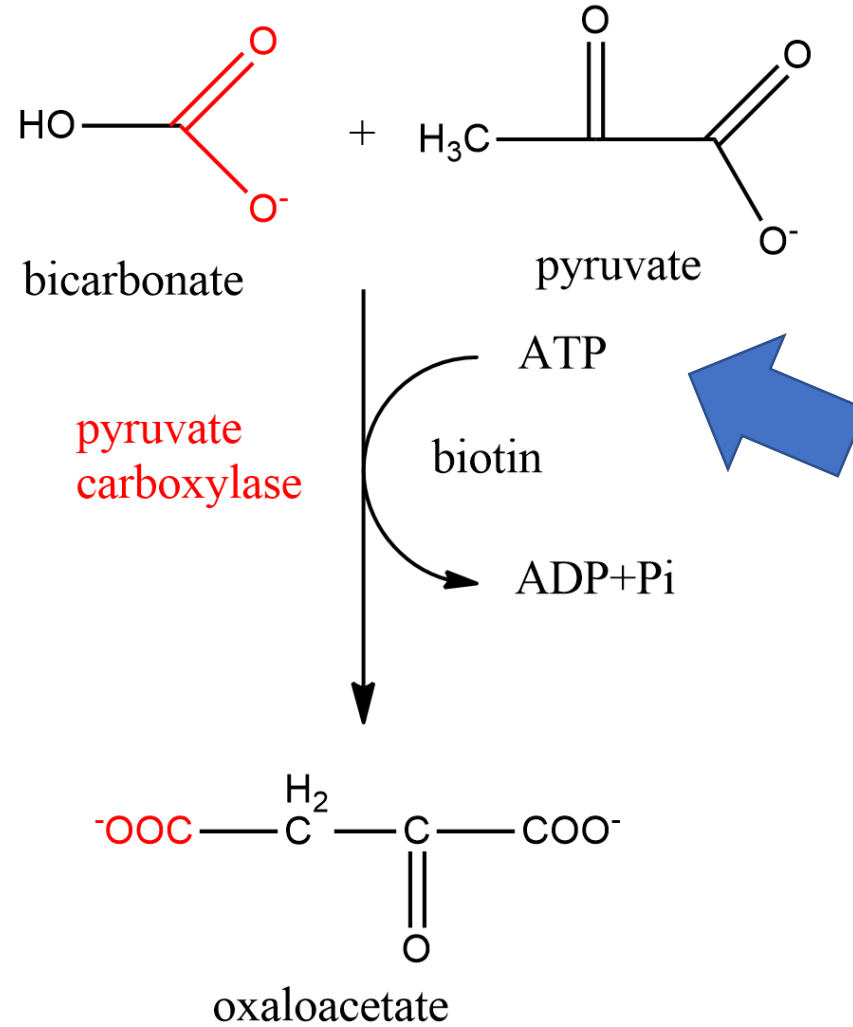


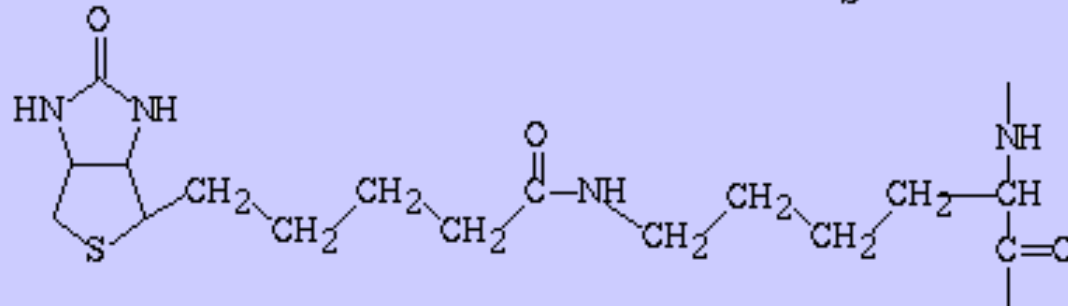
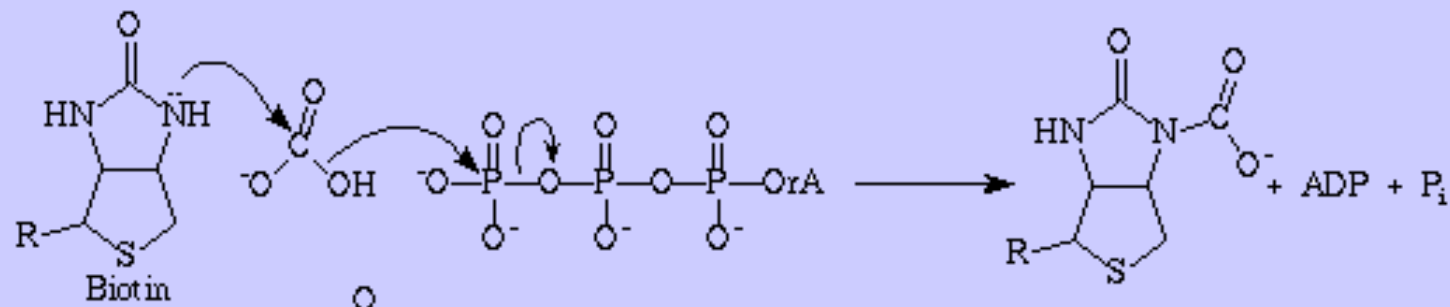
Classe 6: Ligases



É um coenzima do enzima piruvato carboxilase

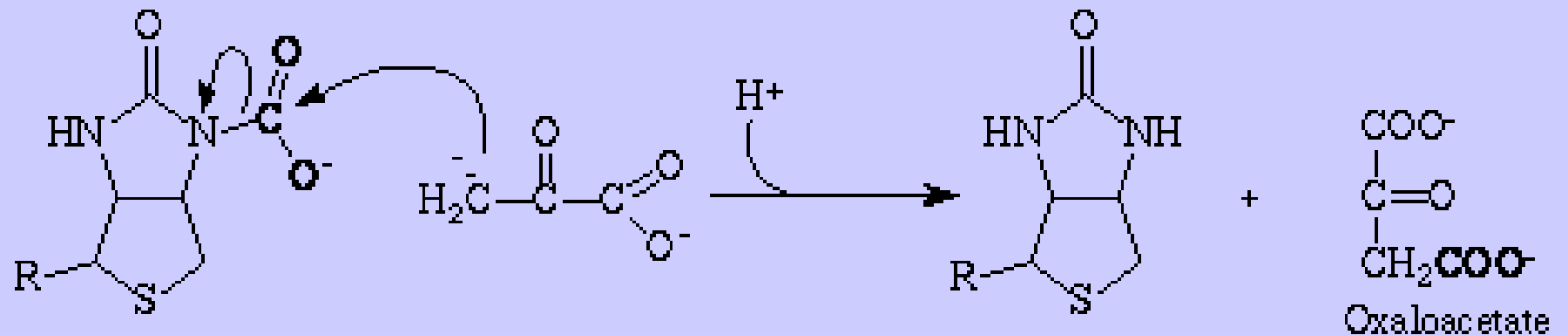
<https://tuitontube.com/classification-of-enzyme/>





Biocytin (biotinyllysyl residue)

Enzima piruvato carboxilase



Regras para nomenclatura de enzimas

<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/rules.html>

As reacções dentro de cada classe têm substratos tão variados que houve necessidade de encontrar sub-classes

Exº para as oxidoreductases

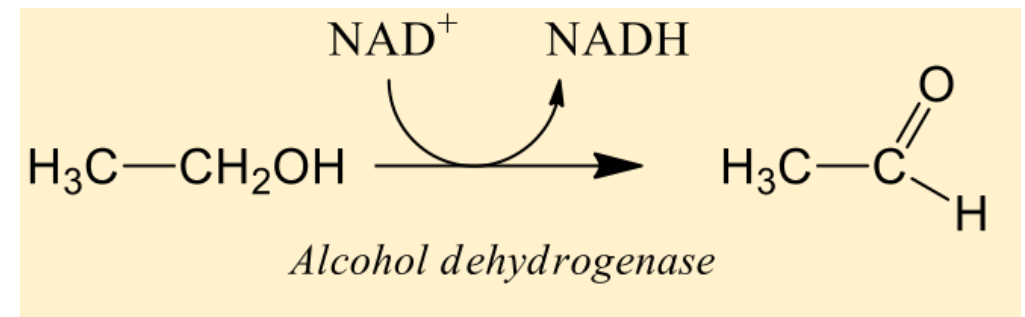
Segundo dígito: feito com o dador de hidrogenio ou de electrões

1. Alcohol (CHOH)
2. Aldehyde or ketone (C=O)
3. –CH–CH–
4. Primary amine (CHNH₂ or CHNH₃⁺)
5. Secondary amine (CHNH)
6. NADH or NADPH (when another redox catalyst is the acceptor)

Exº enzima com E.C. 1.1.1. = enzima oxidoreductase sendo o alcool o dador de hidrogenios e o NAD o aceitador

terceiro dígito: feito com o aceitador de hidrogénio ou de electrões

1. NAD⁺ or NADP⁺
2. Fe³⁺ (e.g. cytochromes)
3. O₂
4. Other





3.2.

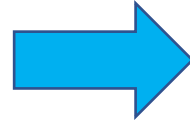
GENERAL CONCEPTS OF ENZYME MECHANISMS



Para que a catálise ocorra é preciso que o substrato se ligue ao enzima

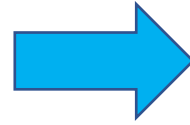
Existem 2 modelos de ligação:

➤ Modelo de chave fechadura

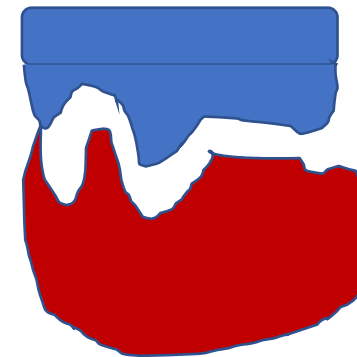
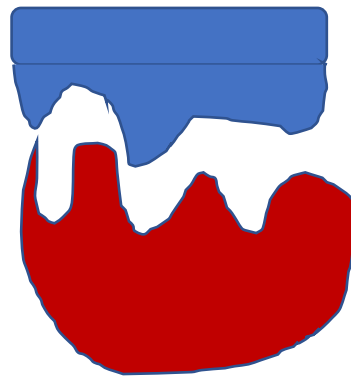
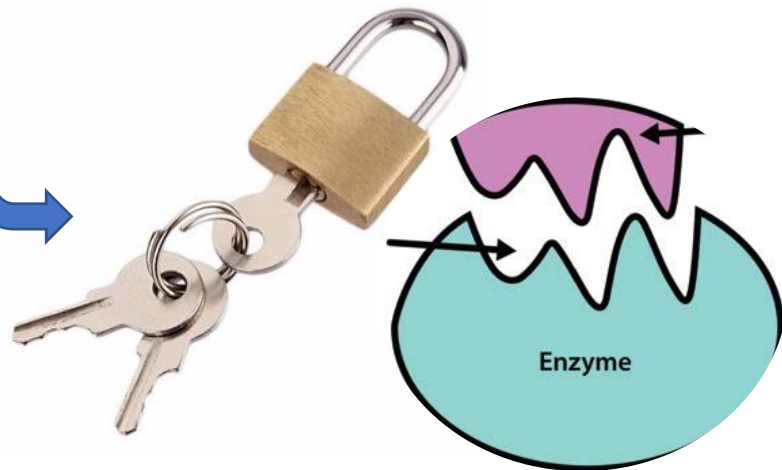


em que o encaixe será feito num local do enzima, centro catalítico com disponibilidade estrutural para esse encaixe

➤ Modelo de ajuste induzido

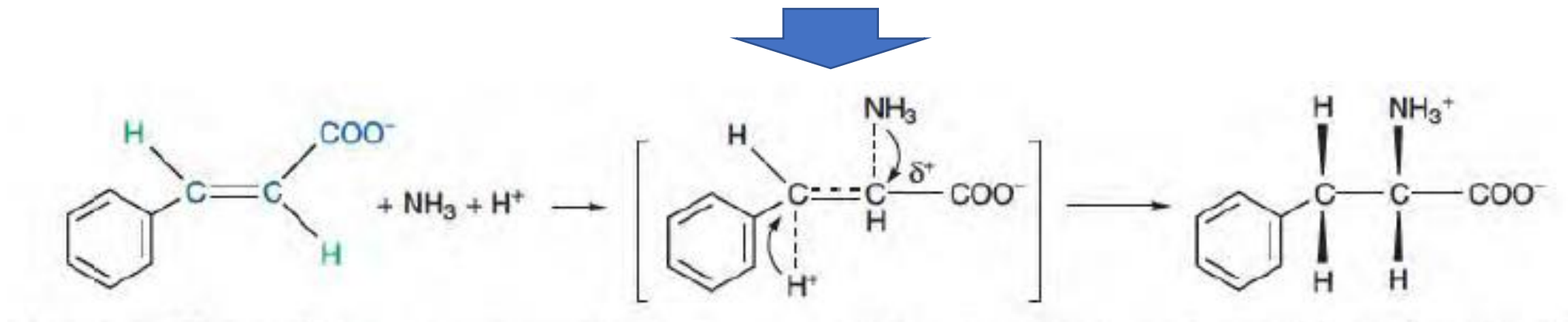


em que o centro activo altera a sua estrutura tridimensional para ajustar o substrato



Teoricamente a reacção é descrita com base na teoria do estado de transição.

1. Os complexos ativados formam-se com as moléculas reagentes, substratos.
2. Os complexos ativados podem ser convertidos em produtos



Passou de estrutura planar a tetraedrica

Estado de transição

Nas reações podem participar outras moléculas que ajudam no processo, chamam-se co-enzimas e co-factores

coenzimas

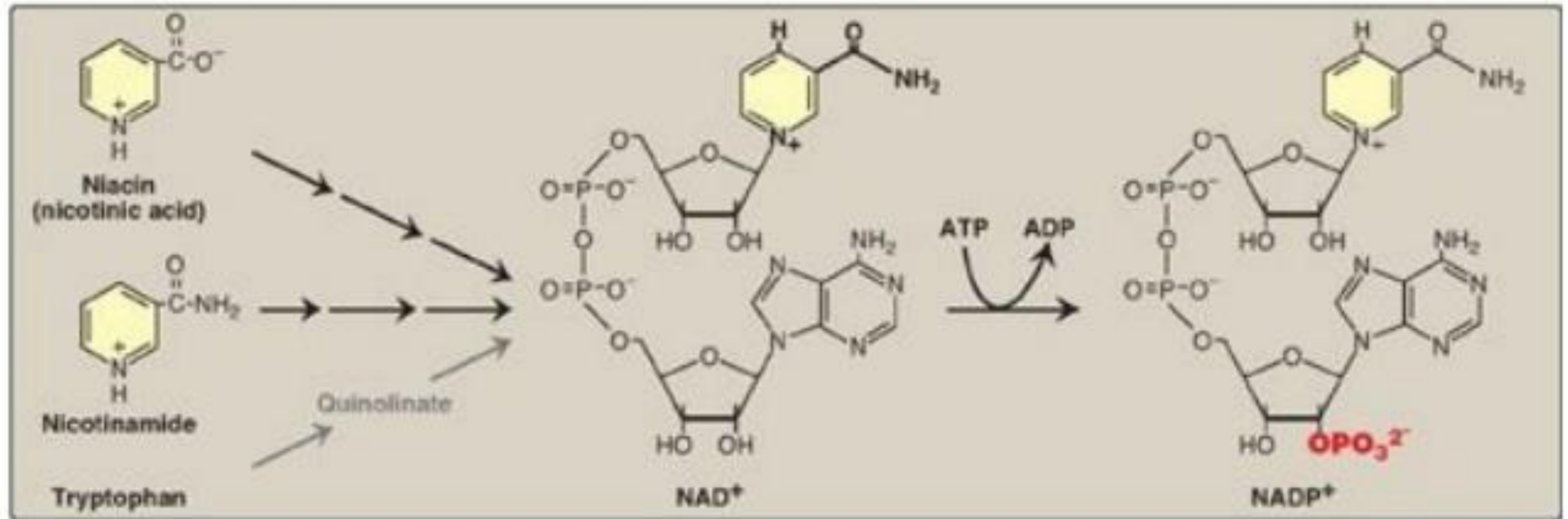
Reacção em que participam



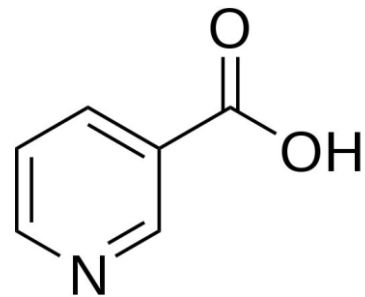
TABLE 10.3 • Coenzymes

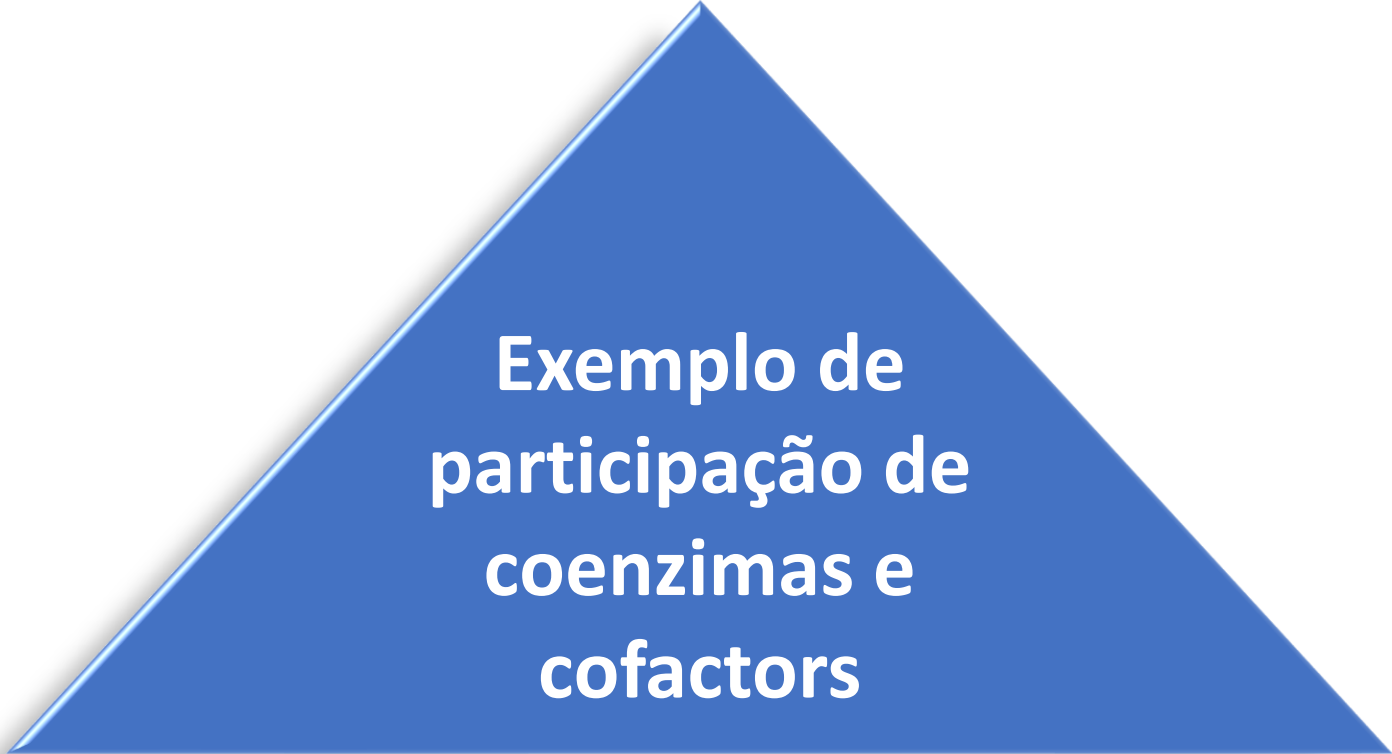
<i>Coenzyme</i>	<i>Vitamin</i>	<i>Reaction Mediated</i>
Biotin	Biotin	Carboxylation
Cobalamin (B ₁₂)	Cobalamin (B ₁₂)	Alkylation
Coenzyme A	Pantothenate	Acyl transfer
Flavin coenzymes FAD e FMN	Riboflavin (B ₂)	Oxidation–reduction
Lipoic acid		Acyl transfer
Niacin coenzymes NADH e NADPH	Niacin	Oxidation–reduction
Pyridoxal phosphate Piridoxal fosfato	Pyridoxine (B ₆)	Amino group transfer
Tetrahydrofolate	Folic acid	One-carbon group transfer
Thiamin pyrophosphate	Thiamin (B ₁)	Carbonyl transfer

Curiosidade:



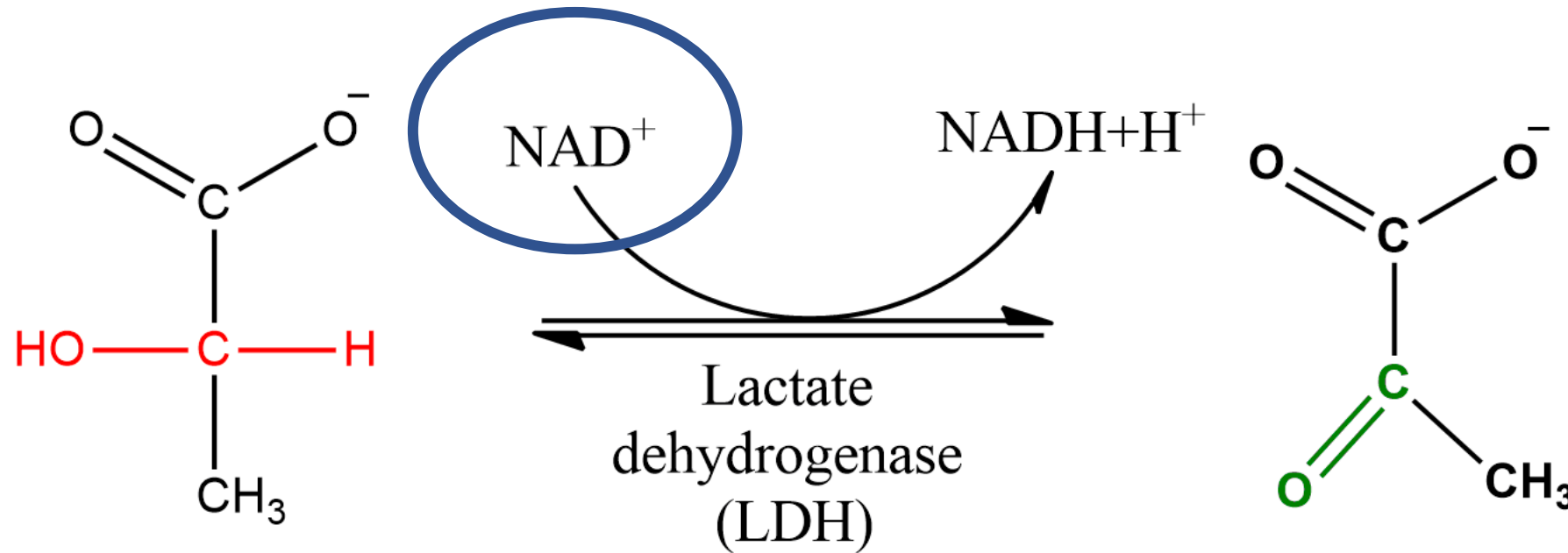
Niacina ou vitamina
PP ou vita B3





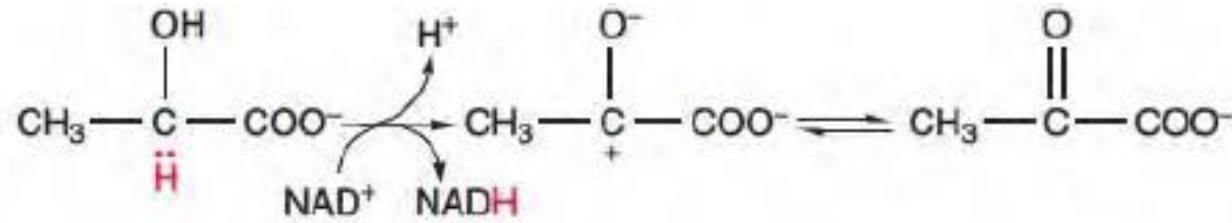
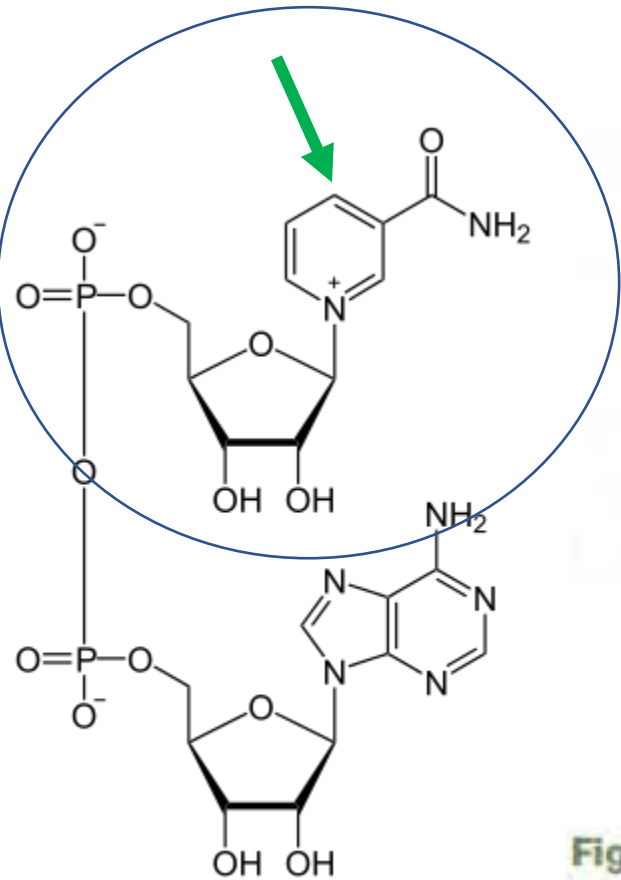
**Exemplo de
participação de
coenzimas e
cofactors**

Reacção de oxidação redução com a participação de nucleotidos (co-enzimas)



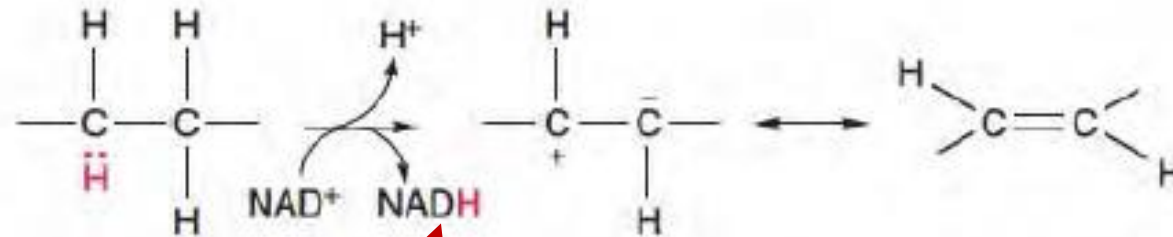
Reacções de oxidação redução

Mecanismo de reacção de NAD



(a) Lactate

Pyruvate



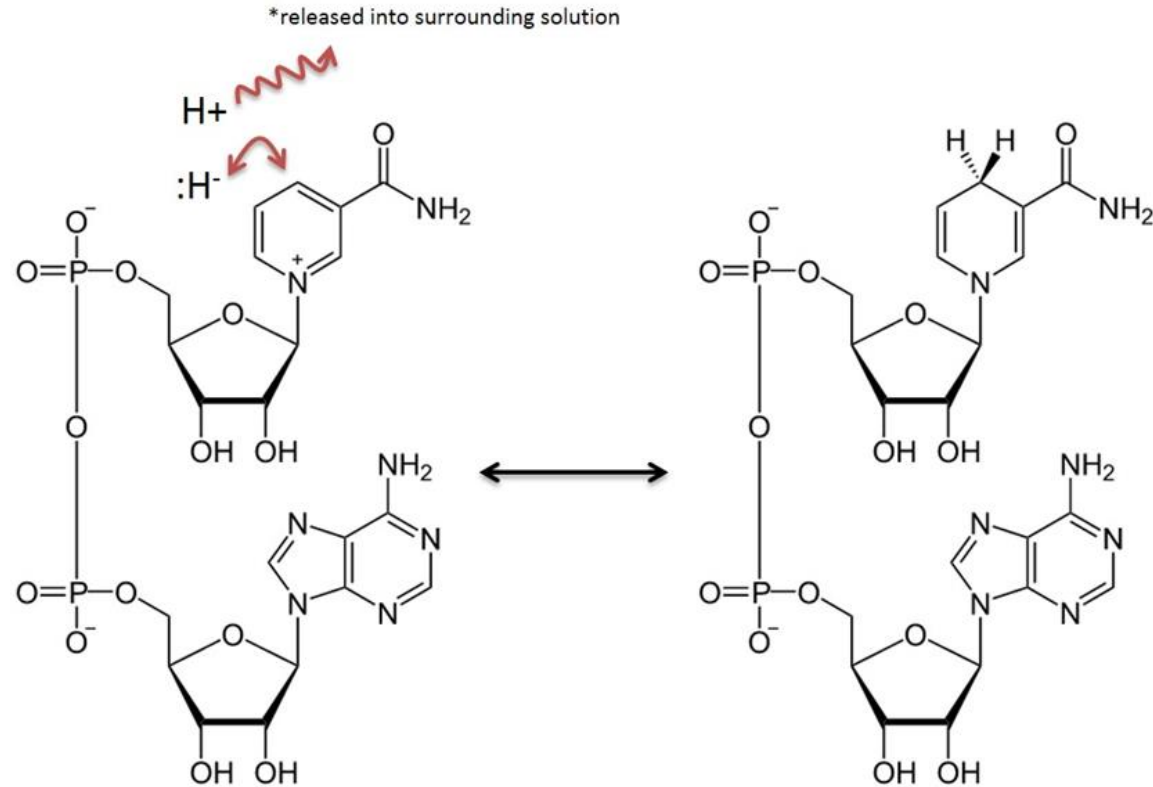
(b) Saturated

Unsaturated

Figure 10.18 Oxidation of lactate and a saturated carbon bond. (a) Lactate to pyruvate. (b) Saturated bond to an unsaturated bond. These reactions undergo an ionic-type reaction even though a hydride ion (H⁻) is involved.

Nicotinamida adenina dinucleótido é um co-enzima

NADH participa em reacções de oxidação-redução

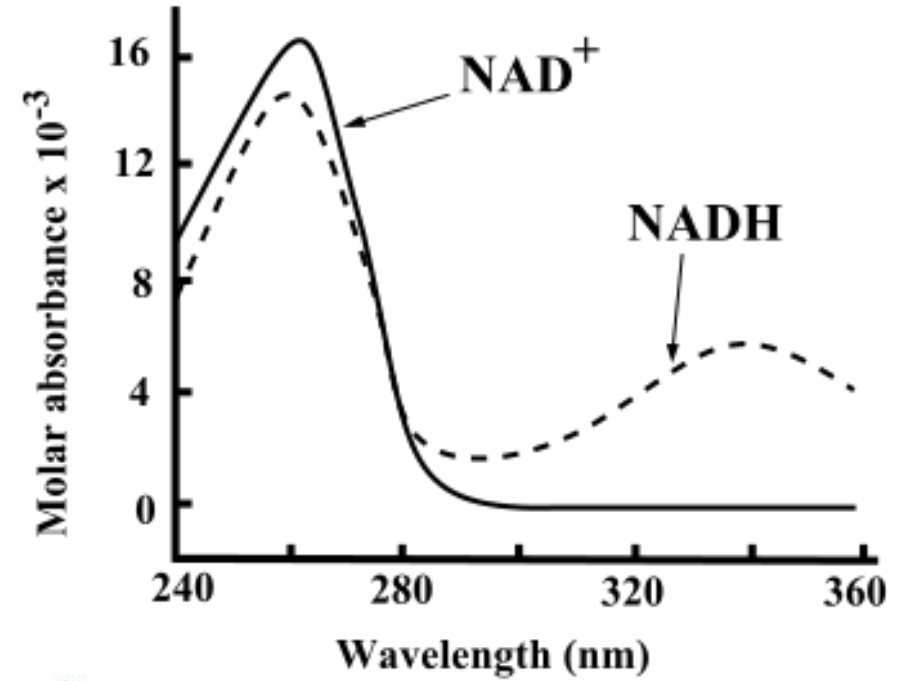


NAD⁺

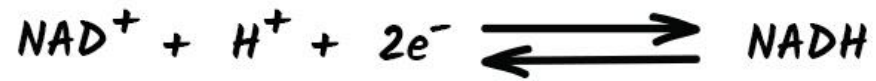
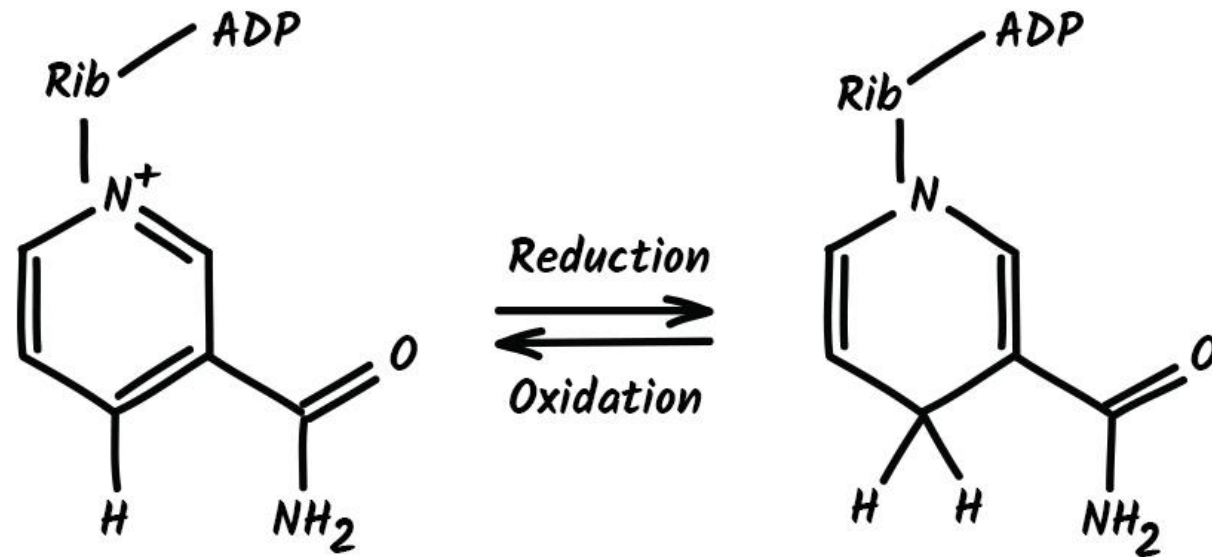
NADH

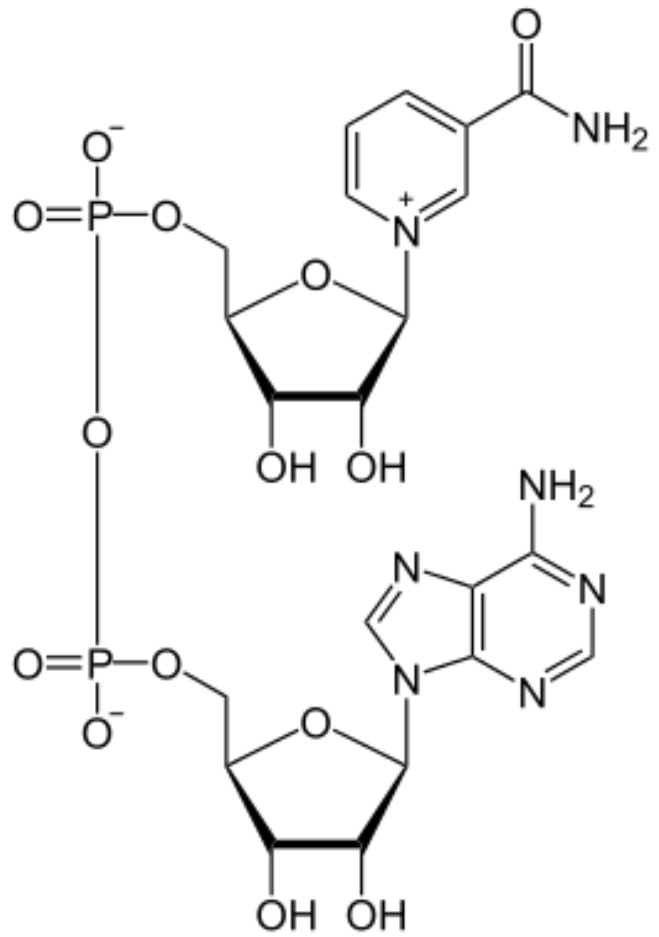
+ H⁺

+ H⁺



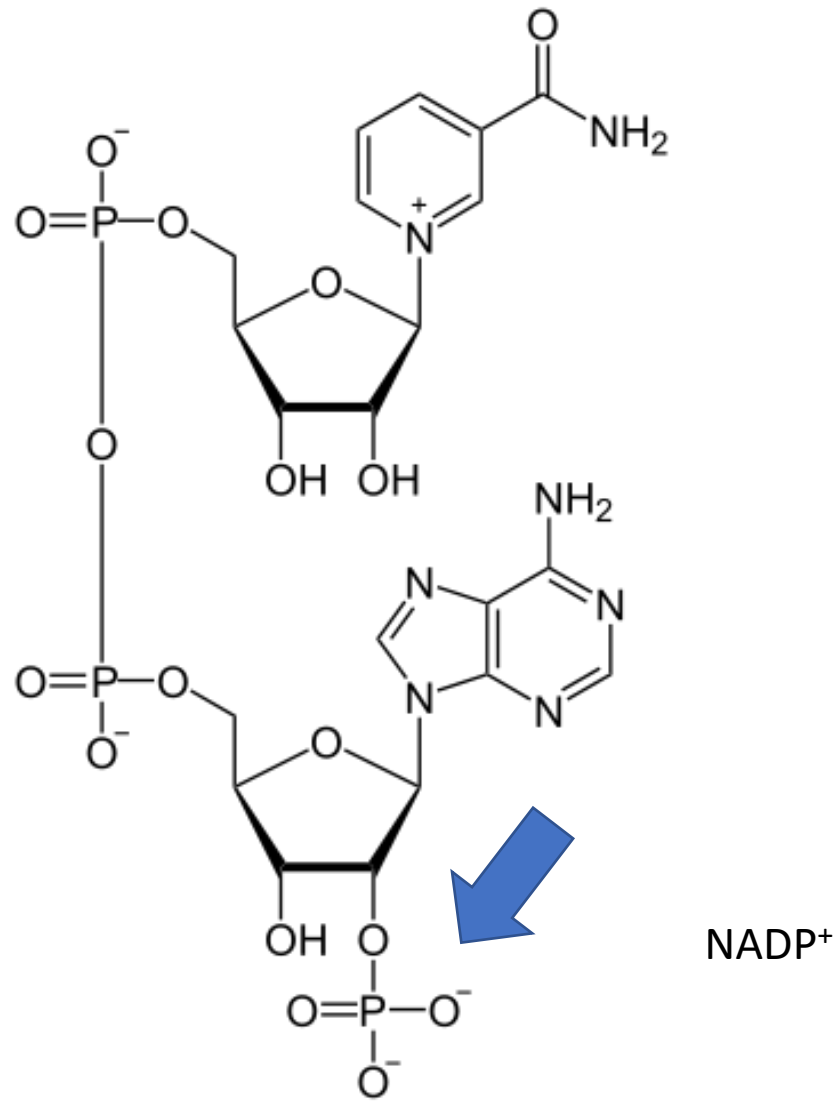
RESUMINDO





NAD⁺

Nicotinamida adenina dinucleótido



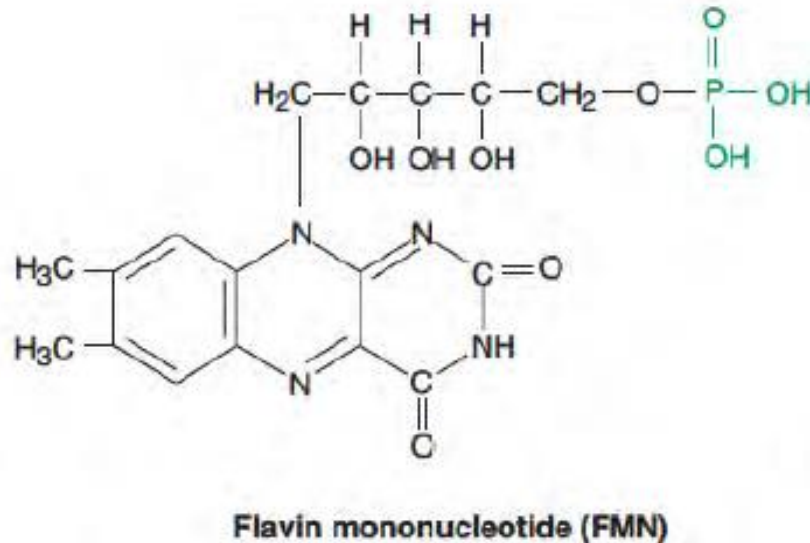
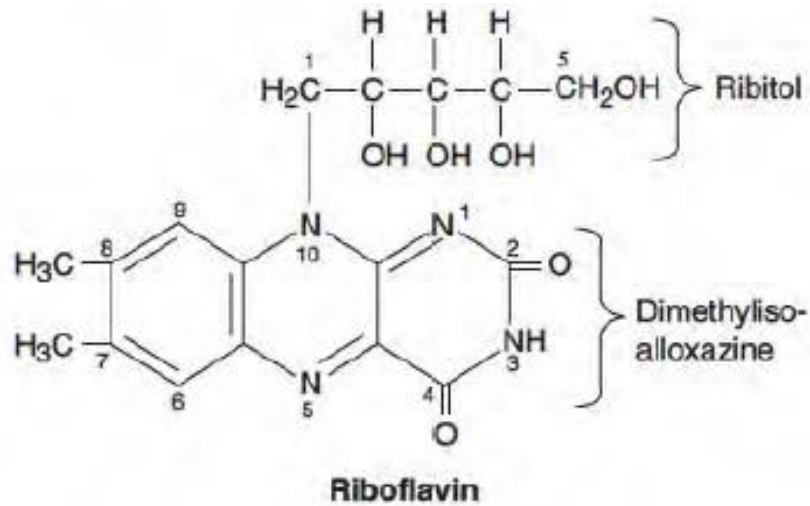
NADP⁺

Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

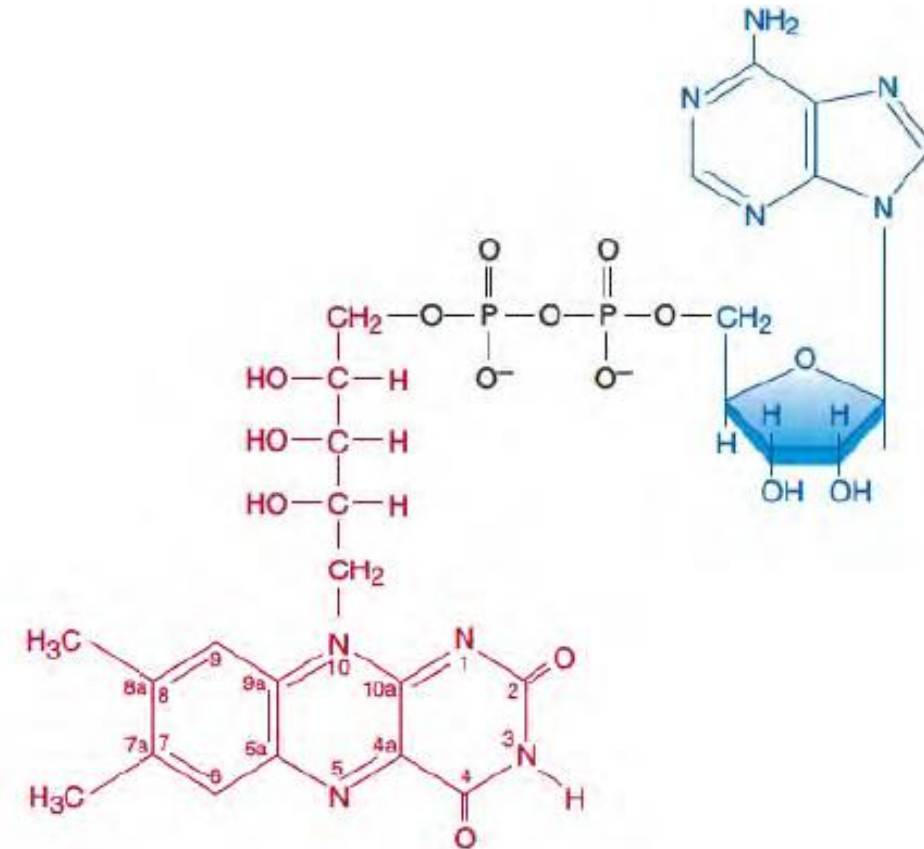
Outro coenzima

FMN and FAD Are Coenzyme Forms of Riboflavin

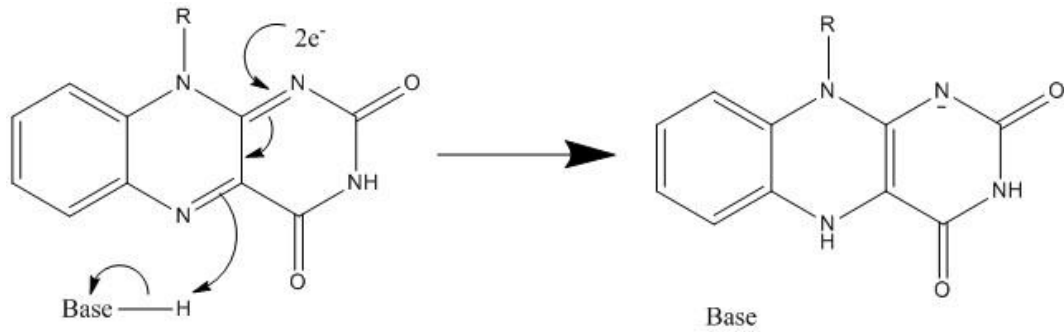
Coenzima para reacções redox



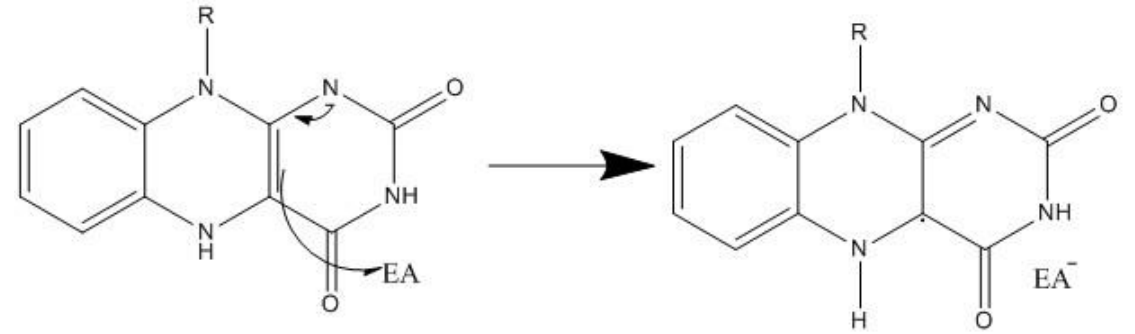
Fi



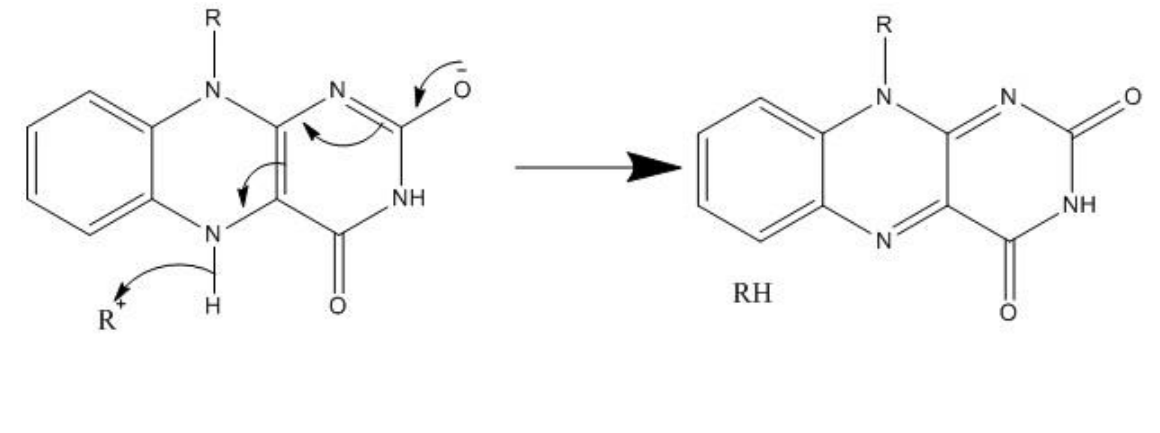
Mecanismo de reacção de FAD



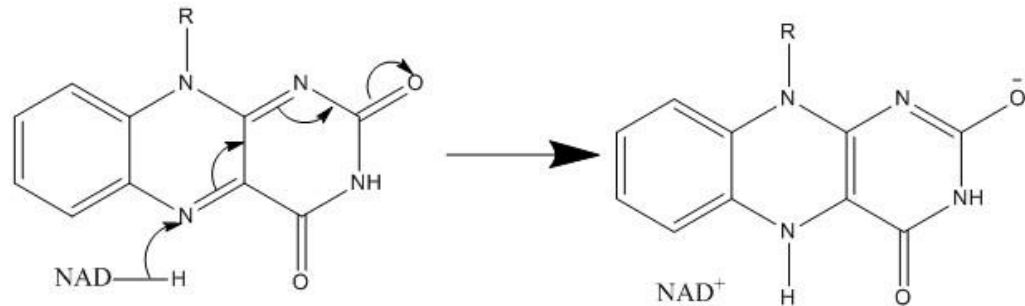
Mechanism 1. Hydride transfer occurs by addition of H^+ and $2e^-$



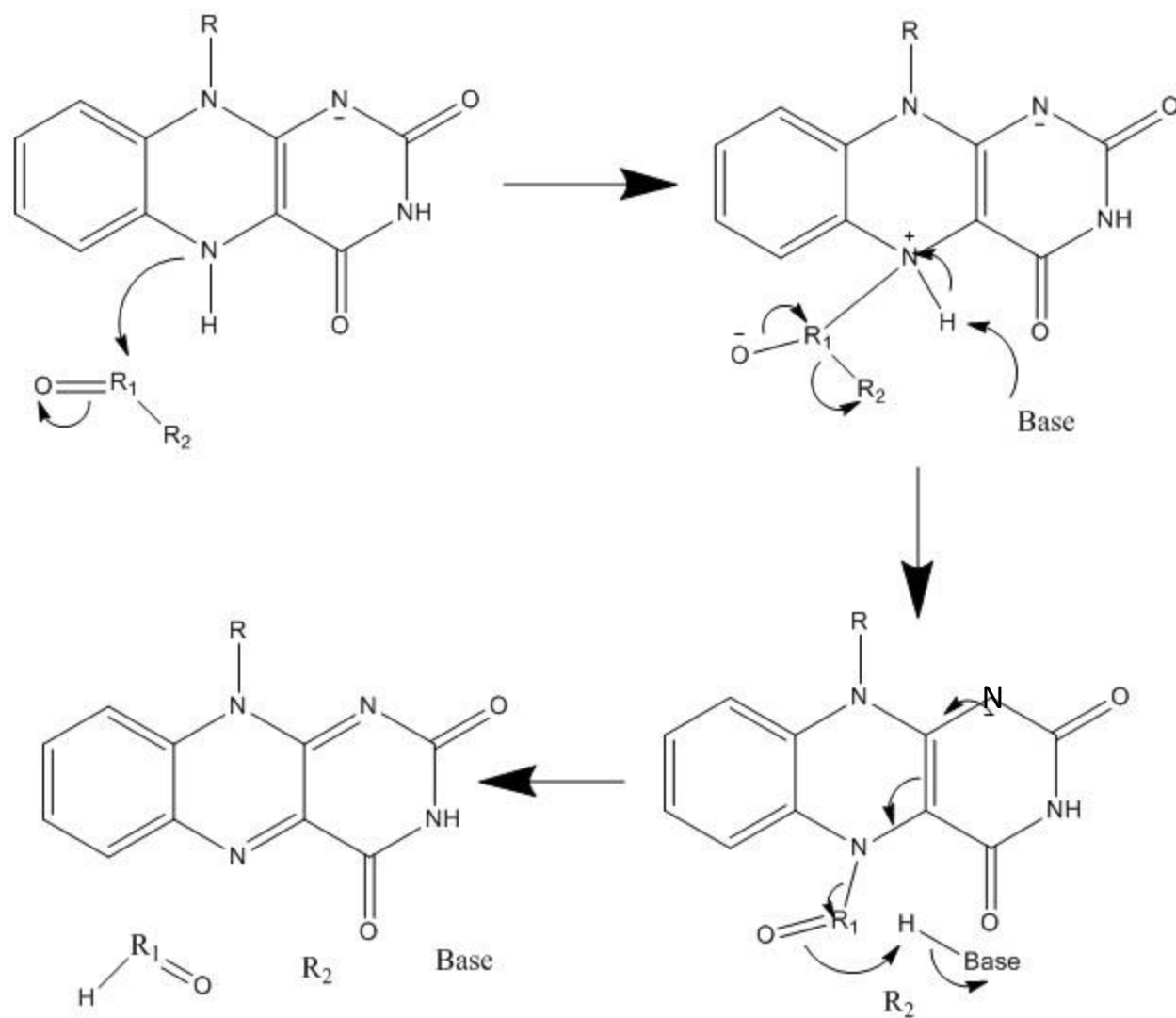
Mechanism 3. Radical formation by electron abstraction

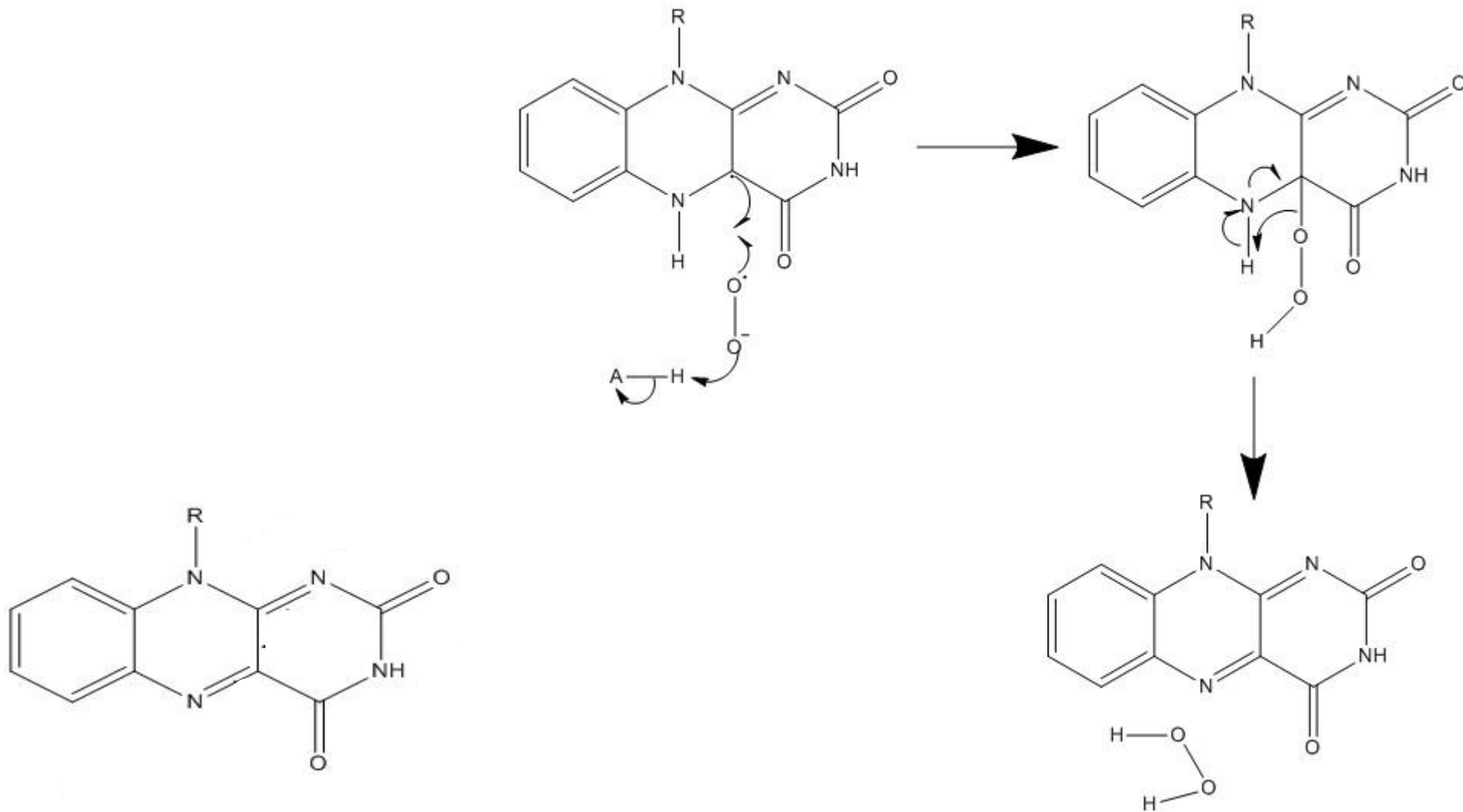


Mechanism 4. The loss of hydride to electron deficient R group



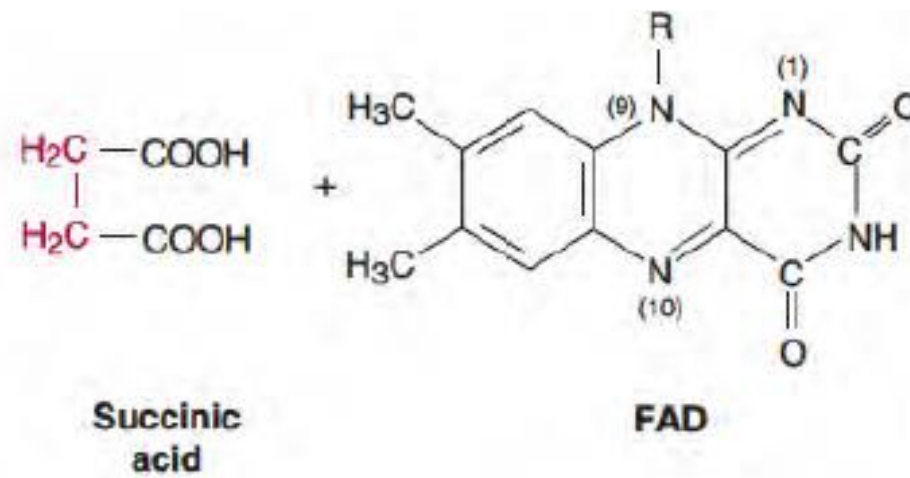
Mechanism 2. Hydride transfer by abstraction of hydride from NADH





Mechanism 6. Carbon radical reacts with O_2 and acid to form H_2O_2

Exemplo de reação de oxidação redução em que participa o FAD



Acido succínico a ácido fumárico

Perca de dois prótons, desidrogenação

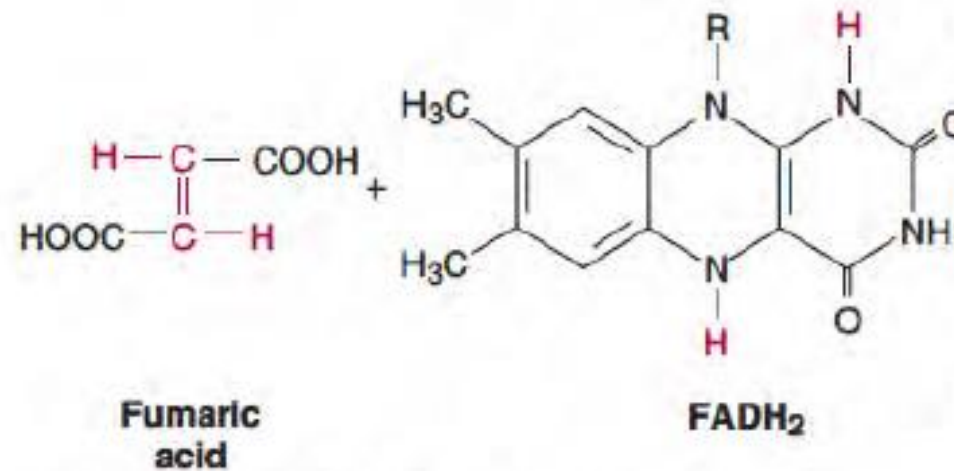


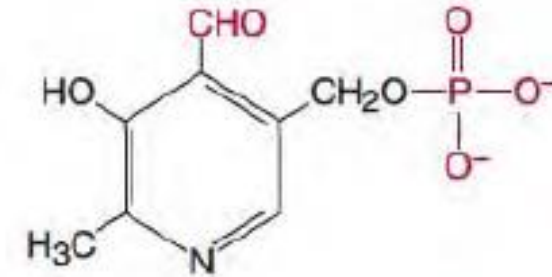
Figure 10.34 FAD is the coenzyme in the succinic dehydrogenase reaction.

Piridoxal fosfato-coenzima

Envolvido em reacções com amino ácidos

Forma activa da vitamina B6

A versatilidade do PLP decorre de sua capacidade de se ligar covalentemente ao substrato e, em seguida, atuar como um catalisador eletrófilo, estabilizando diferentes tipos de intermediários da reação carbaniónica.

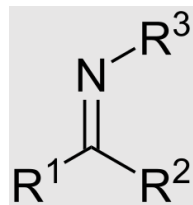


Pyridoxal phosphate

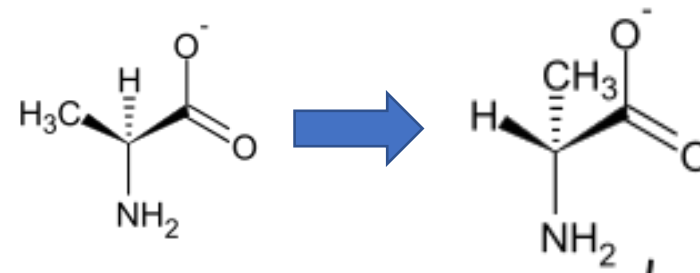
Figure 10.35 Pyridoxal phosphate. Pyridoxal phosphate binds to the amino group of an amino acid and assists in the removal of the R group, the H or the CO₂ of the amino acid.

PLP atua como uma coenzima em todas as reacções de transaminação e em certas reacções de descarboxilação, desaminação e racemização de aminoácidos

Exemplos mecanisticos: isomerização da alanina com a intervenção do piridoxal fosfato

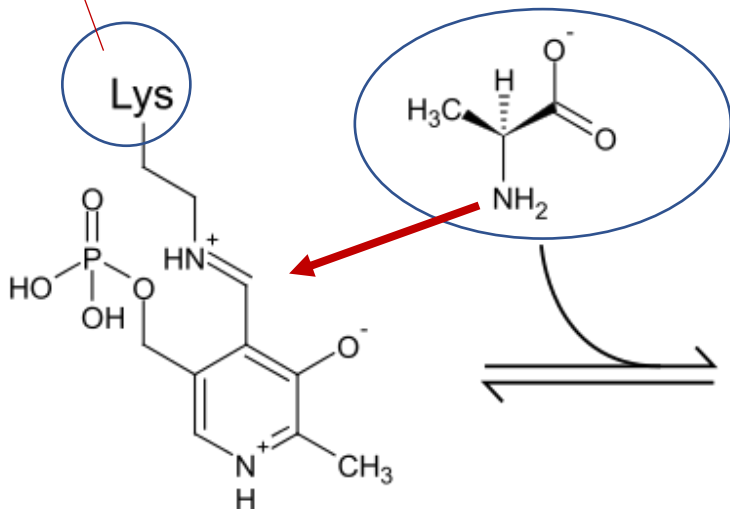


Aldimina ou base de Schiff se R_3 for composto orgânico



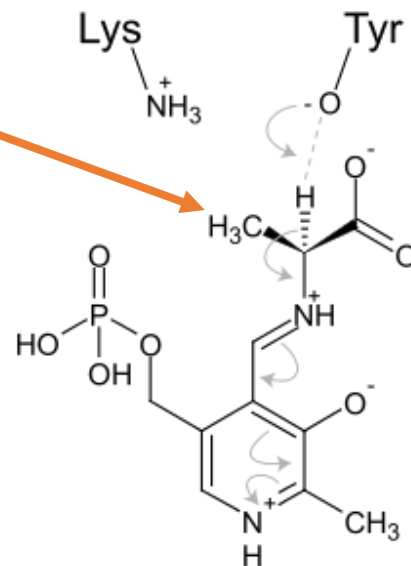
isomerização

Enzima



Enzyme aldimine

Enzima

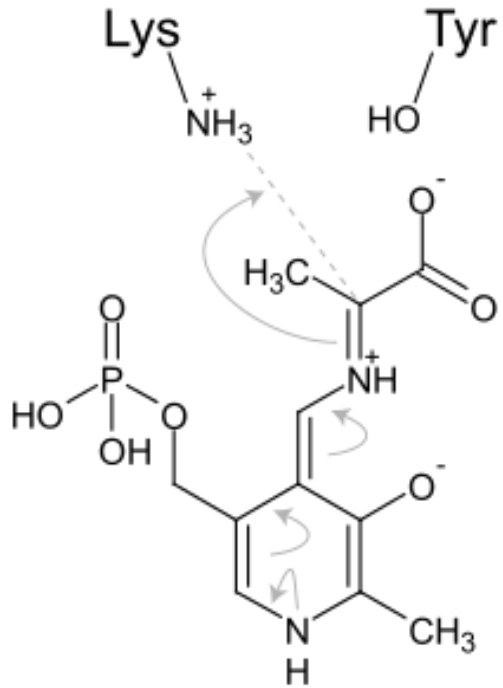


L-Ala aldimine

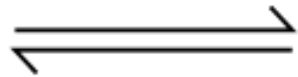
Fosfato de piridoxal

Enzima

Enzima

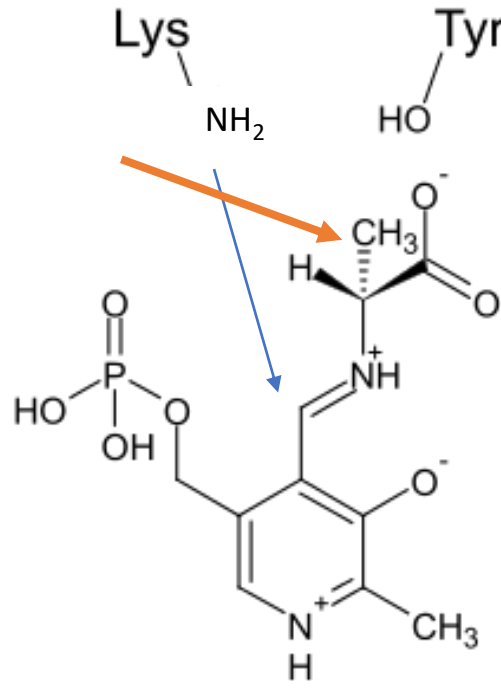


Quinonoid

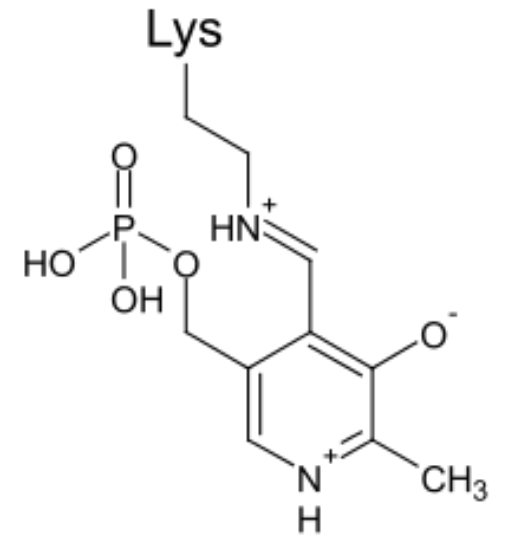
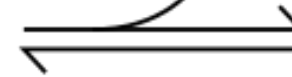
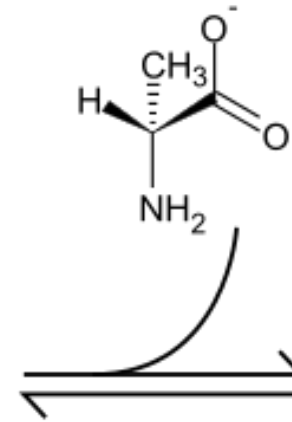


Enzima

Enzima

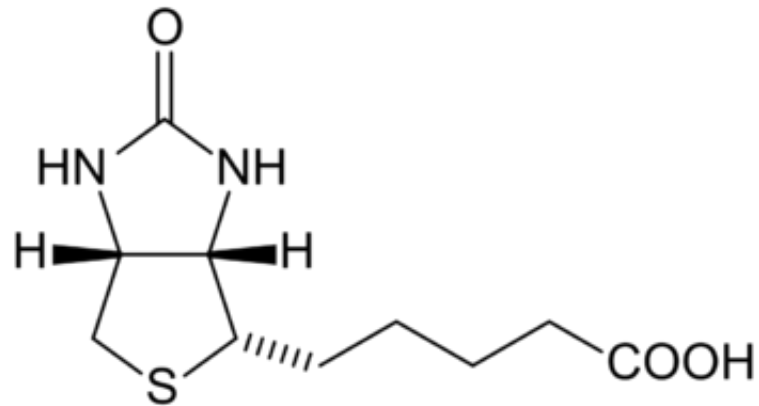


D-ala aldimine



Enzyme aldimine

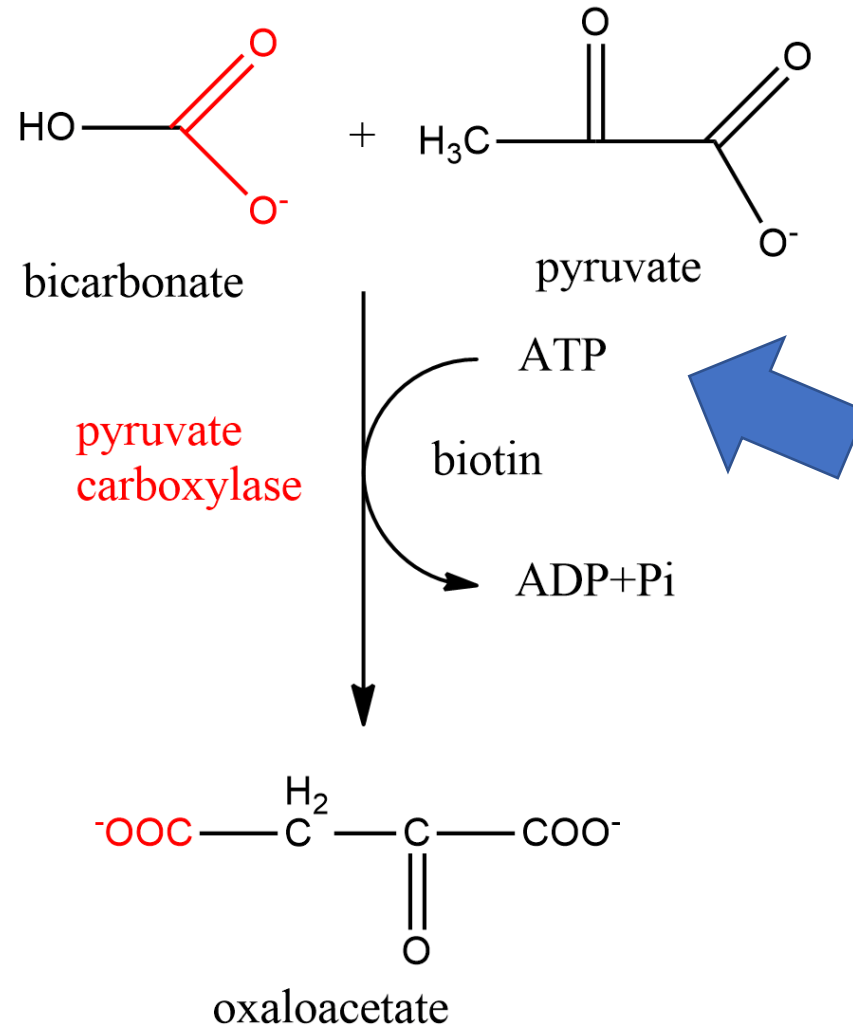
Biotina



biotina

É um coenzima do enzima piruvato carboxilase

<https://tuitontube.com/classification-of-enzyme/>



Co-factores Iões metálicos

metaloenzimas

Figura 10.38 Ligação de um carbonilo ao Zn^{2+} . Ligação de Zn^{2+} do carbonilo de um aldeído resulta em tornar o átomo de carbono parcialmente positivo e mais receptivo a aceitar um íon hidreto do NADH.

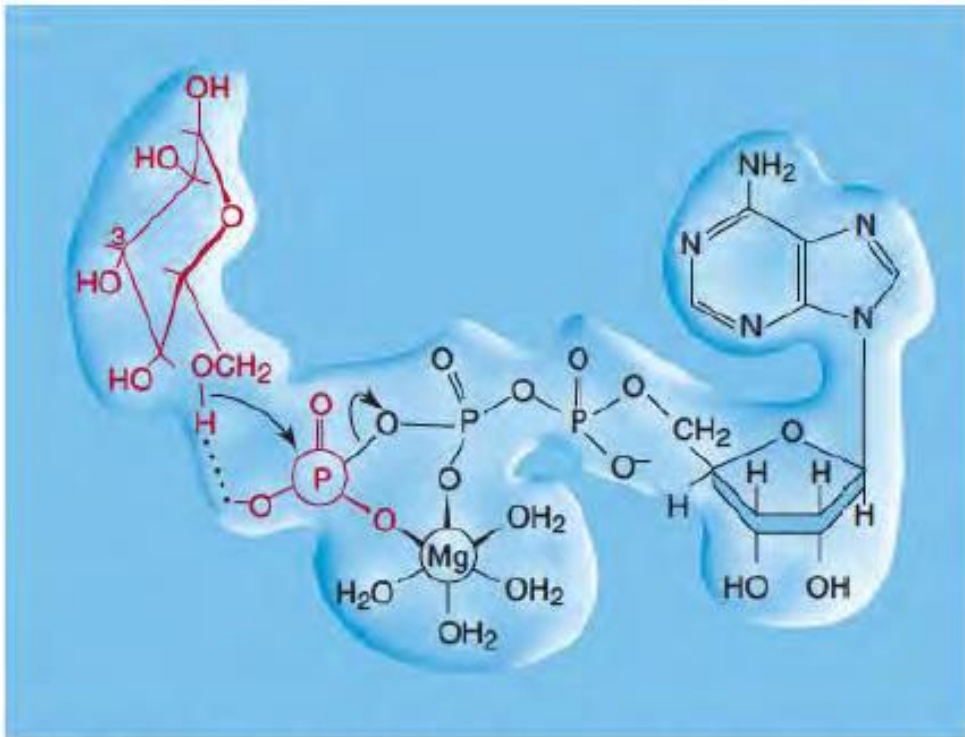
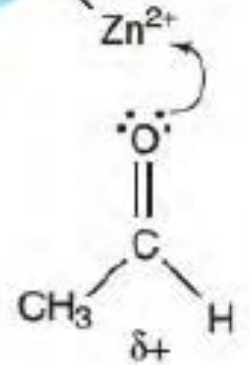
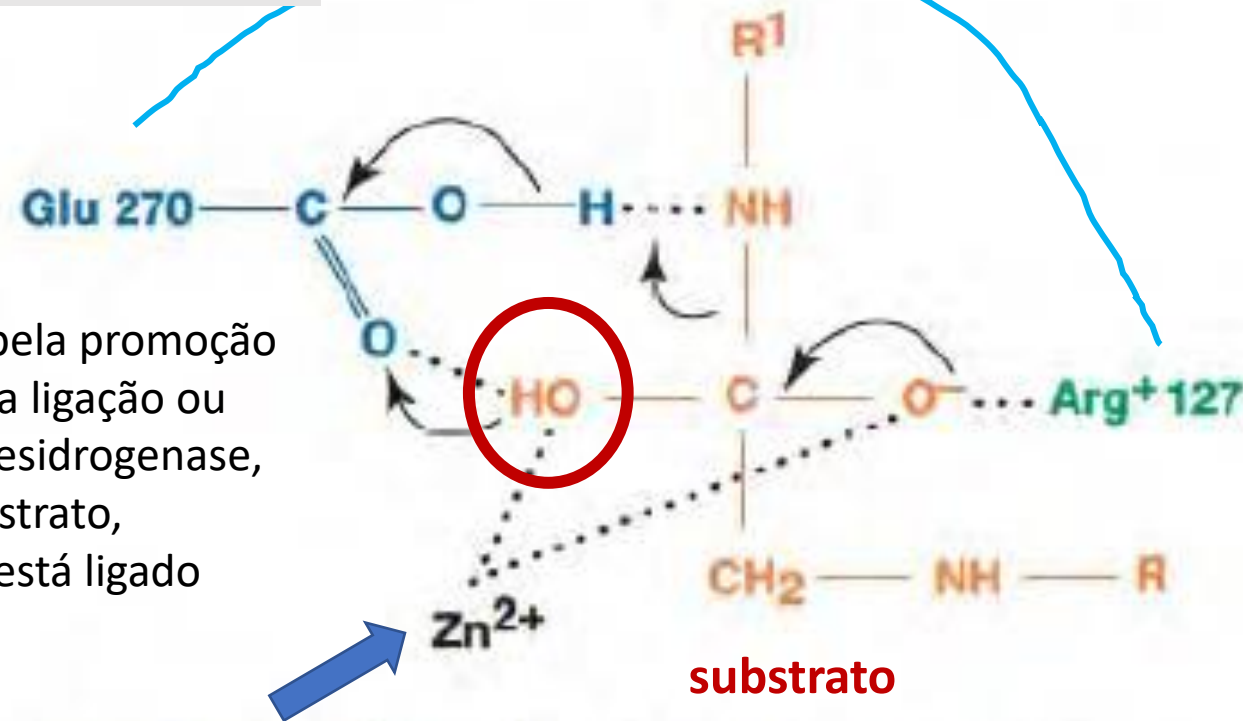


Figura 10.37 Papel do Mg^{2+} como um complexo ligado ao substrato no centro ativo das cinases. Na hexocinase o fosfato terminal do ATP é transferido para a glicose, produzindo glicose 6-fosfato. Mg^{2+} coordena com o ATP para formar o substrato verdadeiro e pode libertar a ligação P-O terminal de ATP para facilitar a transferência do fosfato para a glicose. Existem locais de ligação específicos no enzima para glicose bem como as porções de adenina e ribose do ATP.

Reacção de hidrólise

As metaloenzimas contêm um metal de transição fortemente ligado, como Zn^{2+} ou Fe^{2+} , o que facilita a ligação do substrato, formando um complexo com ponte de metal.

Função de metais tanto pela ligação do substrato quanto pela promoção da catálise eletrofílica (nucleofílica) no local de clivagem da ligação ou estabilizando intermediários na via de reação. No álcool desidrogenase, um Zn^{2+} ligado ao enzima interage com o oxigénio no substrato, mudando as propriedades do carbono ao qual o oxigénio está ligado (Figura 10.38).



Zn^{2+} funções em carboxipeptidase e termolisina, proteases com centros ativos idênticos, para gerar um grupo hidroxilo a partir da água e estabilizar o estado de transição resultante de ataque do hidroxilo na ligação peptídica.

A **Figura 10.39** descreve a geração do hidroxilo de centro ativo por Zn^{2+} . Glu 270 funciona como uma base necessária para remover o próton da água. A estabilização do estado de transição tetraédrica por Zn^{2+} é mostrada na Figura 10.40.

O Zn^{2+} fornece um contra-íon para estabilizar o oxigênio negativo no carbono tetraédrico.

exemplo de catálise mediada por íon metálico

O Zn torna a água um bom nucleófilo para o ataque ao carbonilo e hidrolizar a ligação peptídica nas proteínas

Carboxipeptidase A, hidrólise de proteínas

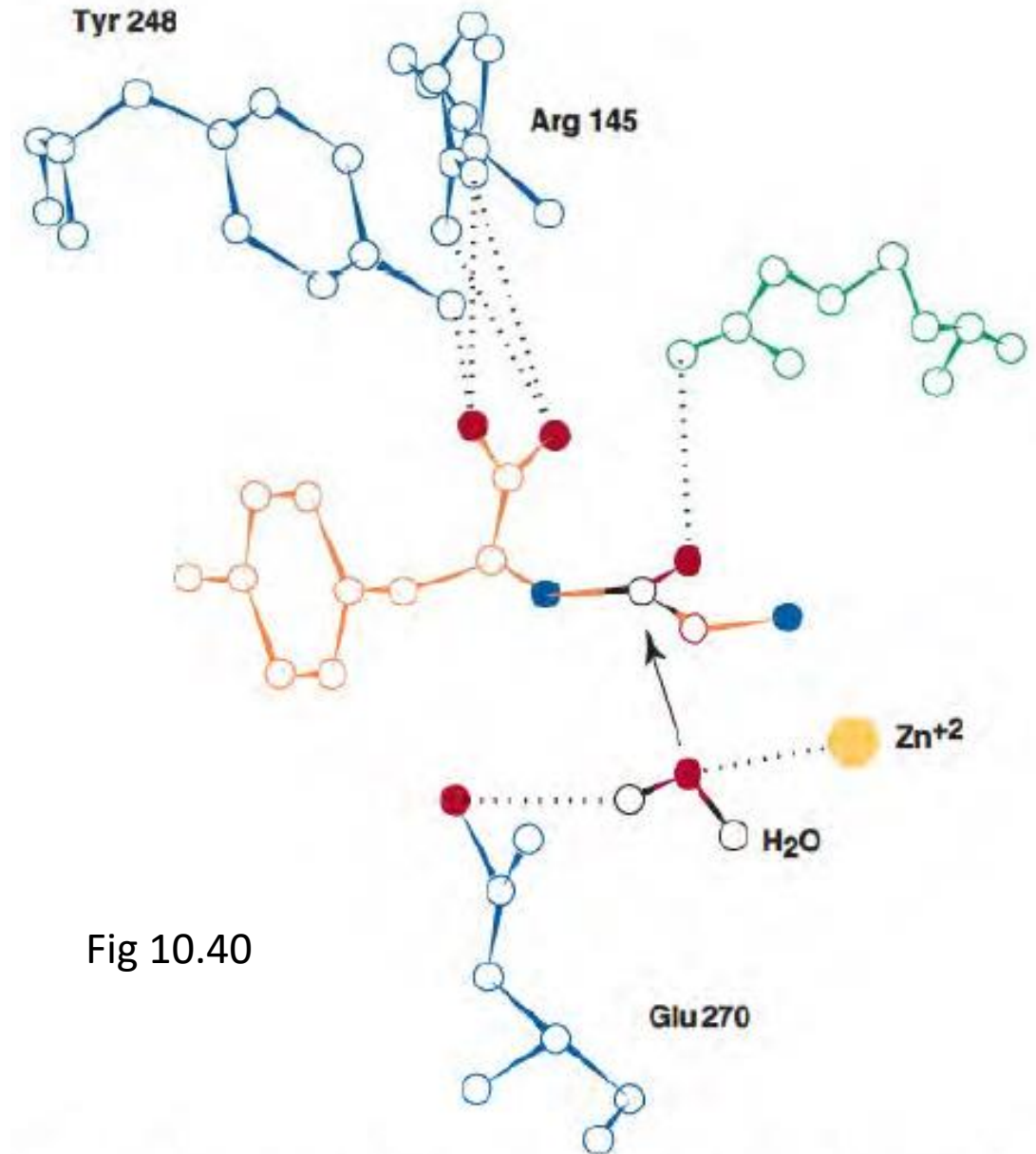
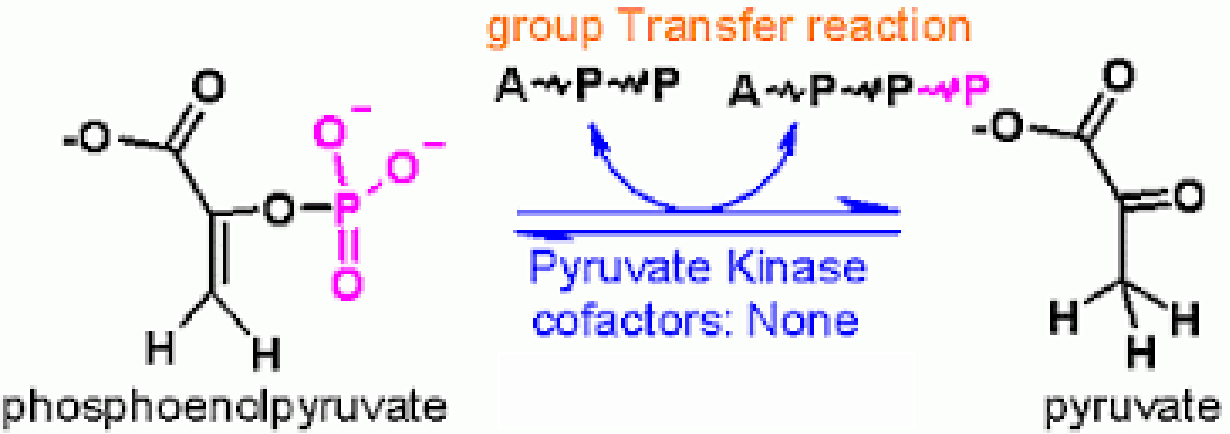
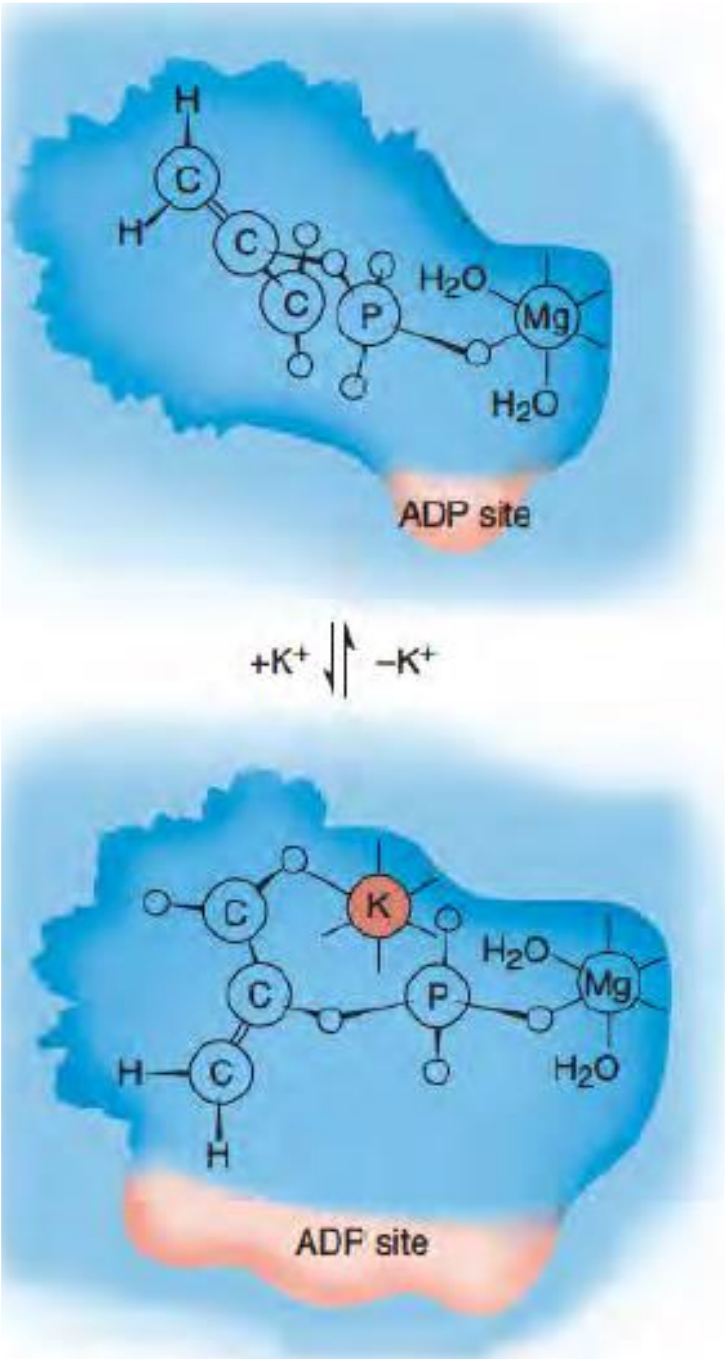


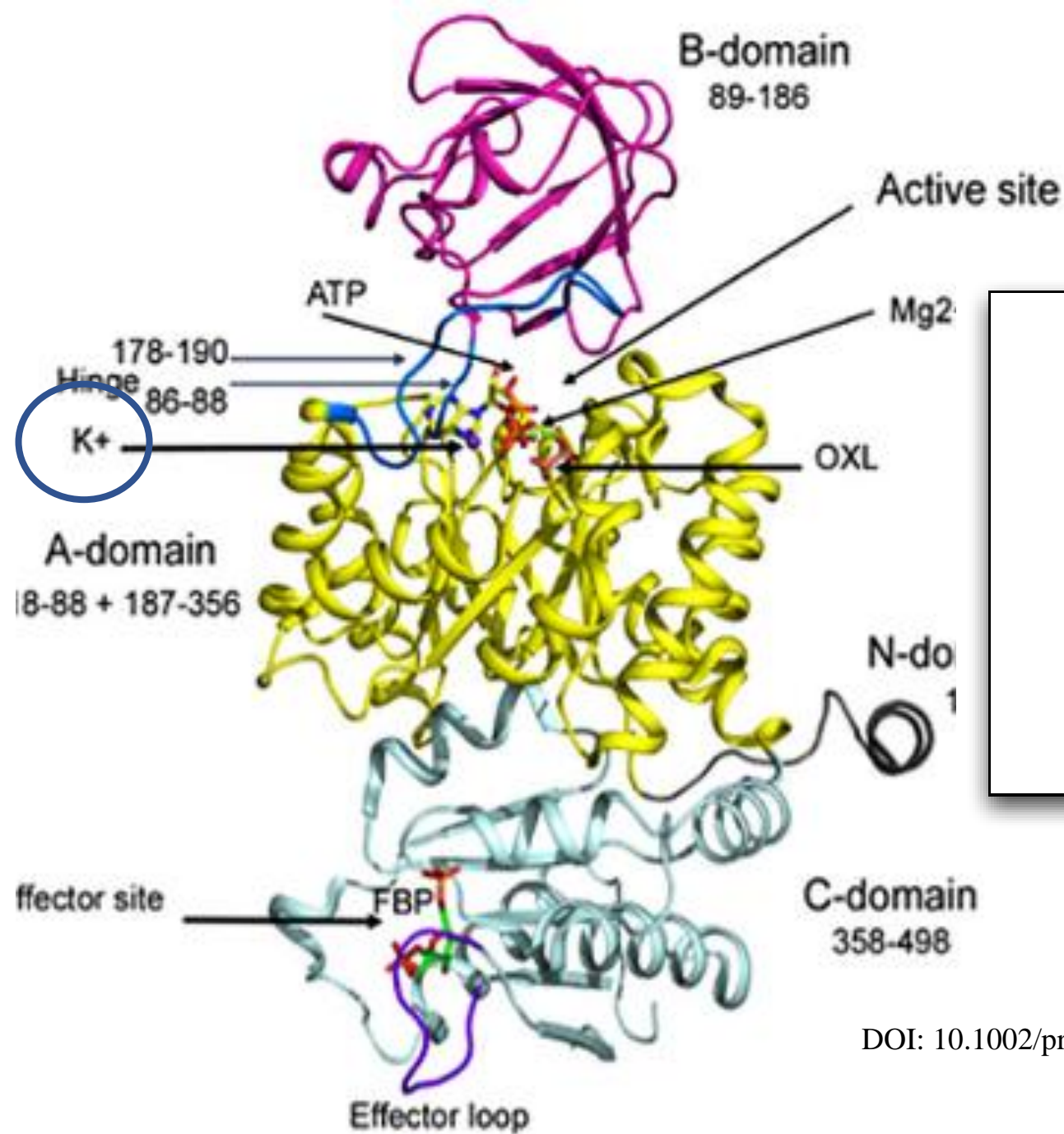
Fig 10.40

Figura 10.41 Modelo do papel de K^+ no centro ativo da piruvato cinase. (*enzima que transfere grupos fosfato a para o ADP*)

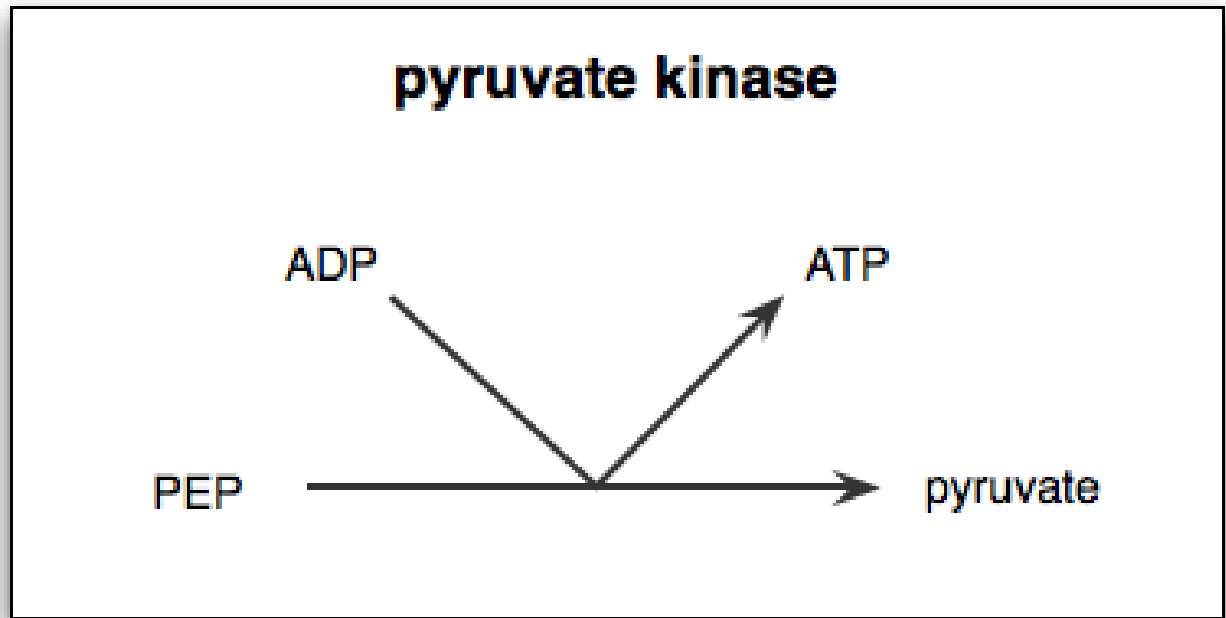
Piruvato quinase catalisa a reação: fosfoenolpiruvato + ADP → ATP + piruvato. Ligação inicial de K^+ induz mudanças conformacionais na cinase, que resulta em afinidade aumentada para fosfoenolpiruvato.

Além disso, o K^+ orienta o fosfoenolpiruvato na posição correta pela transferência de seu fosfato para ADP. Mg^{2+} coordena o substrato para o centro ativo da enzima. Resultados mais recentes mostram o papel preciso de íons K^+ não é realmente conhecido, mas parece que o íon permite a orientação adequada do centro ativo para permitir que a catálise ocorra.





cofactores



DOI: 10.1002/pro.3691

Fosforilação das proteínas, reacções de síntese de novas ligações pode recorrer a **XTP**

ATP-adenosina trifosfato

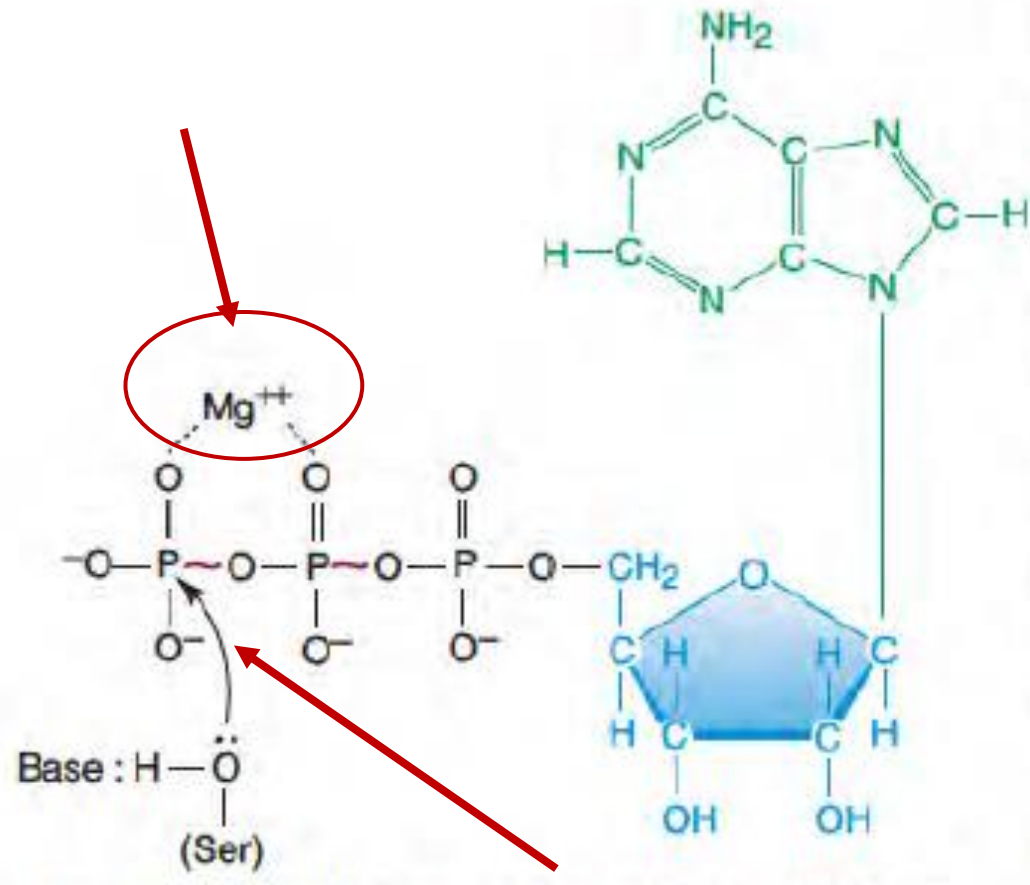


Figure 10.19 Phosphorylation is an attack of a nucleophile on a nucleoside triphosphate (NTP).

ATP ou outro NTP é atacado pelo par de electrões no oxigénio de um álcool como a serina, treonina ou tirosina. Um íão Mg²⁺ quando ligado pelo NTP serve para puxar os electrões para longe do grupo de fósforo tornando-o mais suscetível ao ataque do nucleófilo.

Exemplo de reacções químicas entre os substratos e o centro activo do enzima sem a participação de coenzimas ou cofactores



Ligações covalentes entre resíduos de aminoácidos como cisteína ou serina

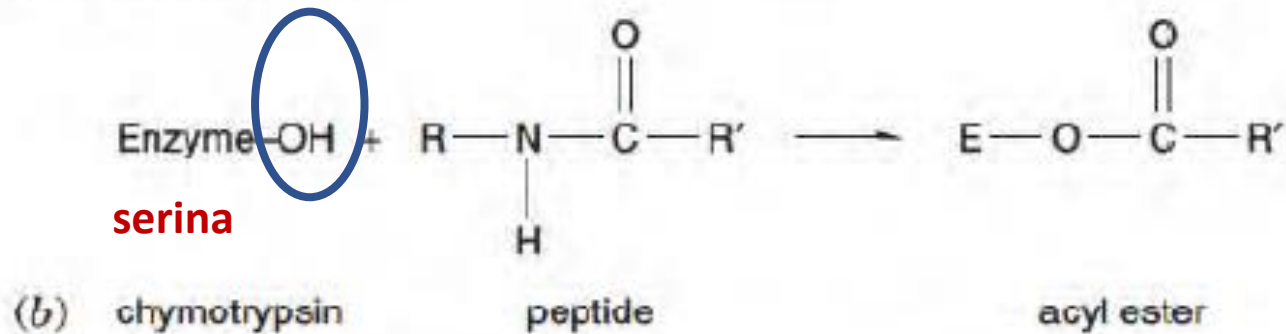
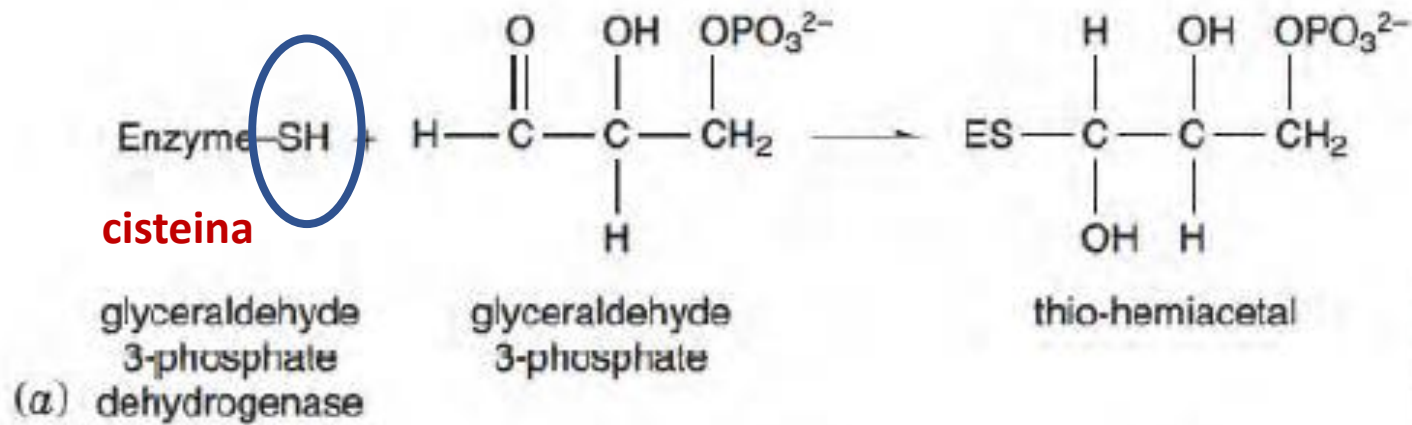


Ligações com grupos SH ou OH

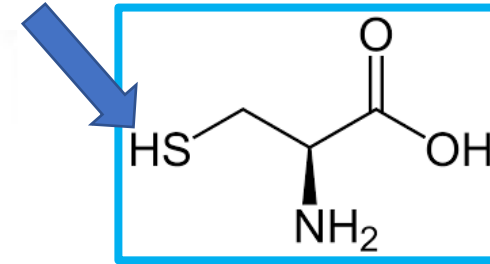


Catálise por ligações covalentes entre o substrato e o centro catalítico do enzima, sem intermediários

Desidrogenase de cisteína



Protease de serina

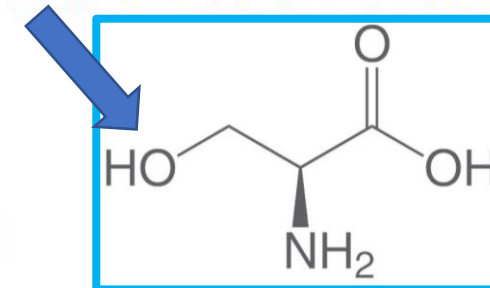


Cisteína

No centro activo

Figure 10.20 Some substrates form a covalent bond with an enzyme.

(a) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and (b) chymotrypsin function by first forming a covalent intermediate with substrate.



Serina

**Condições ambientais que influenciam
a cinética enzimática**

O pH da solução pode alterar a reacção por modificação da catalise ácido-base em que o centro catalítico do enzima participa

I
N
F
L
U
E
N
C
I
A

Do

pH

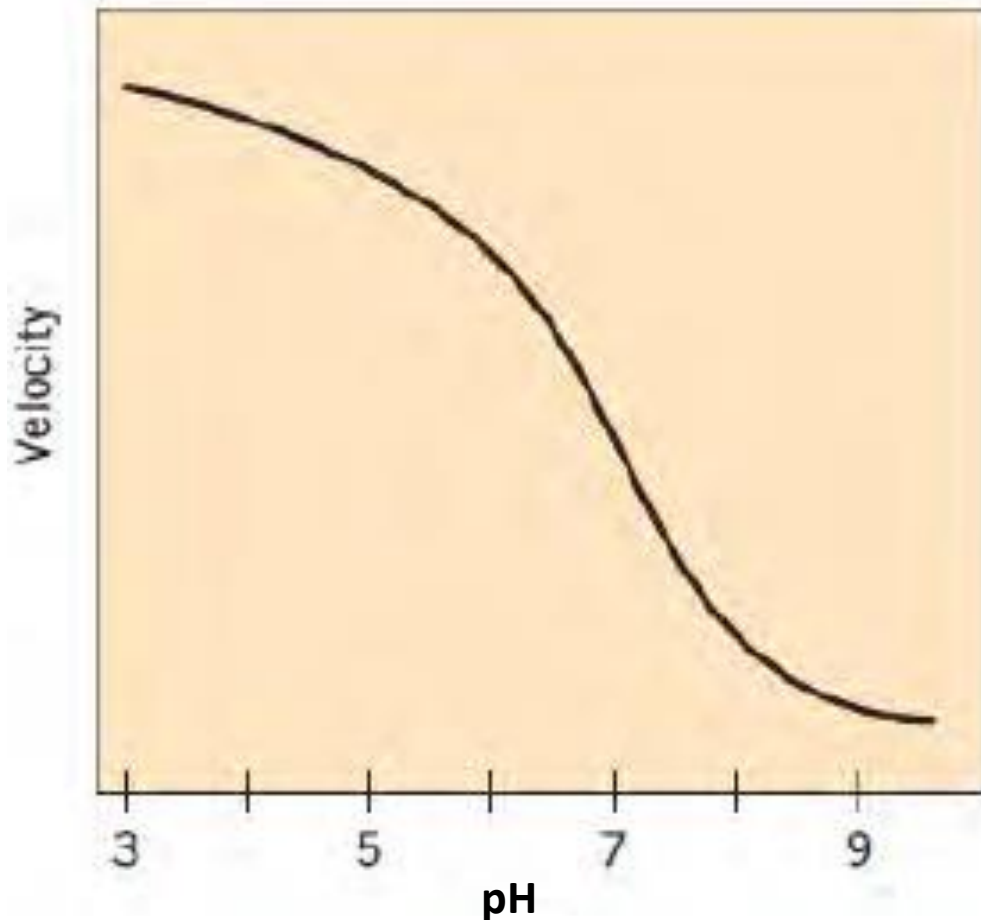
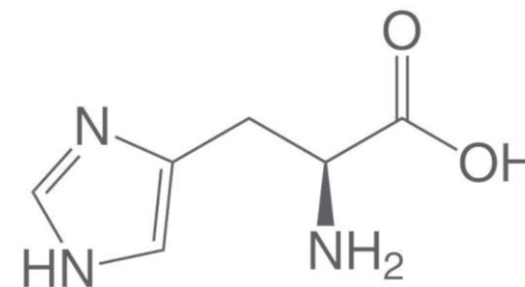


Figure 10.21 Velocity of an enzyme-catalyzed reaction can be affected by pH if a group dissociates a H^+ .

Se o anél imidazol da histidina precisa estar protonado para que um enzima seja activo, a velocidade da reacção diminuirá com o aumento do valor de pH acima do pKa (suponha 8) do resíduo. Se o grupo precisava de estar não protonado para que o enzima funcione, então a curva tem a forma reversa, com actividade máxima acima do pH8. Ao valor de pH = pKa a actividade enzimática será 50%, porque 50% do as moléculas estarão ionizadas e 50% não ionizadas.

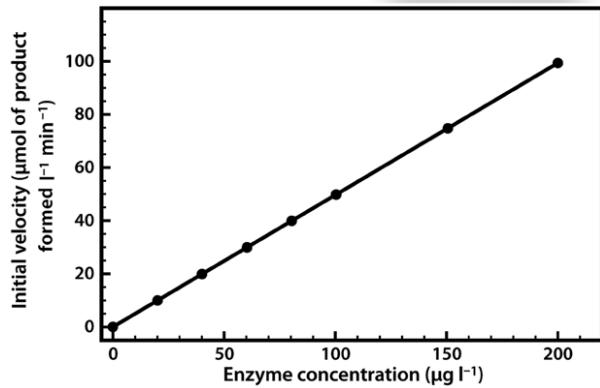


Actividade dos enzimas

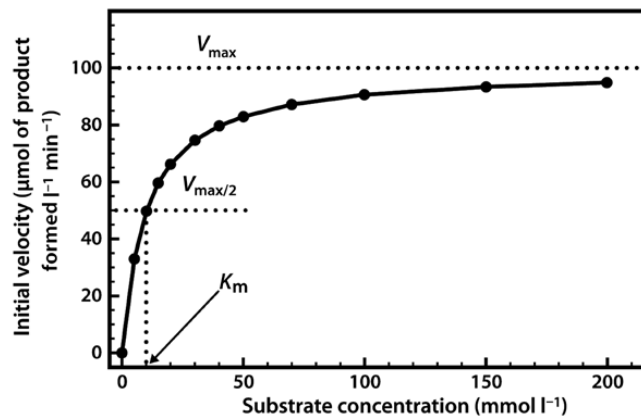
Depende

explicação

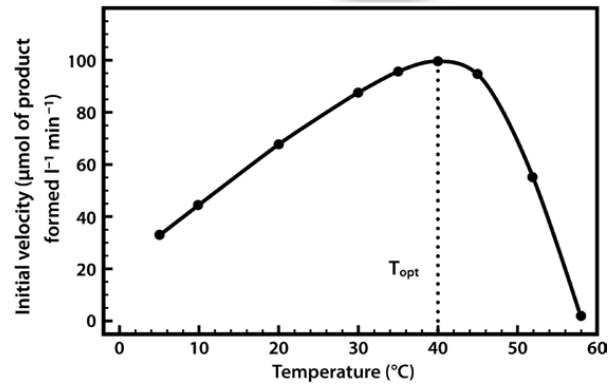
[E]



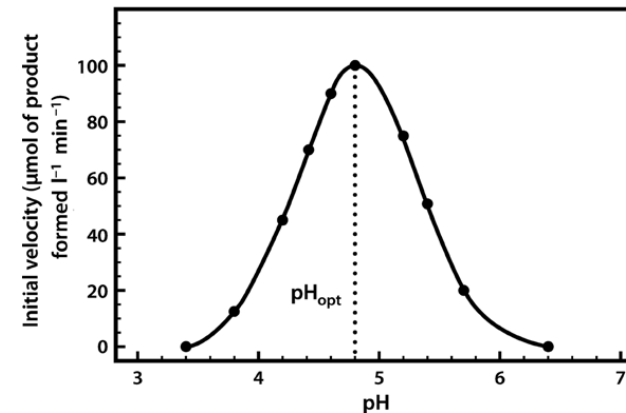
[S]



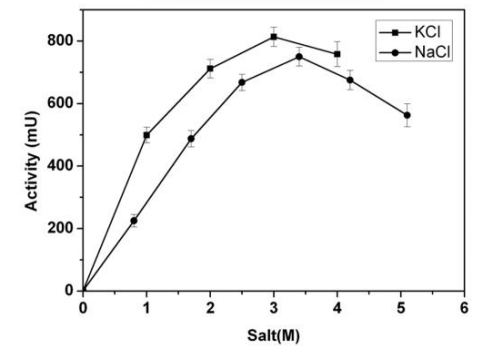
T



pH



[sais]





3.3.

ACTIVE SITE OF AN ENZYME

Centro activo do enzima

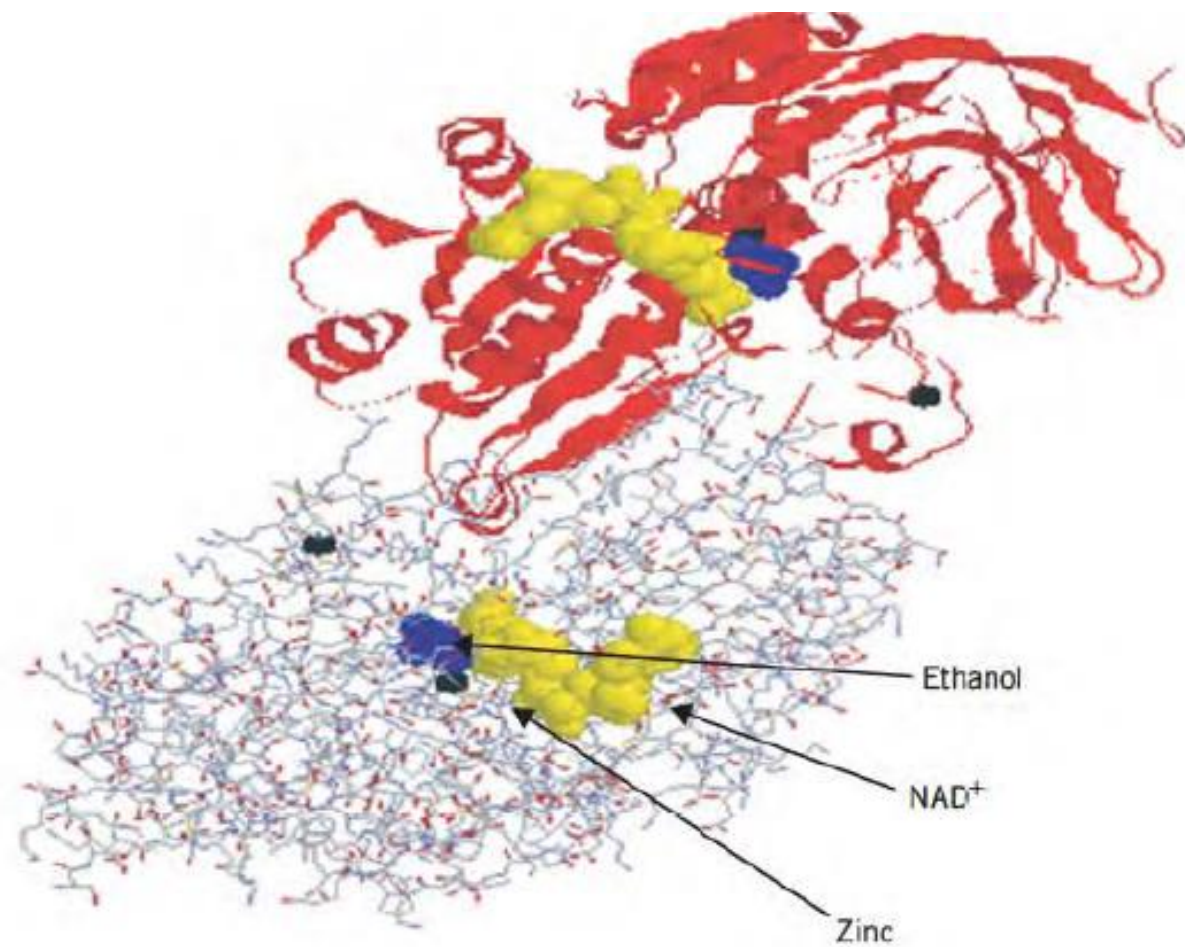
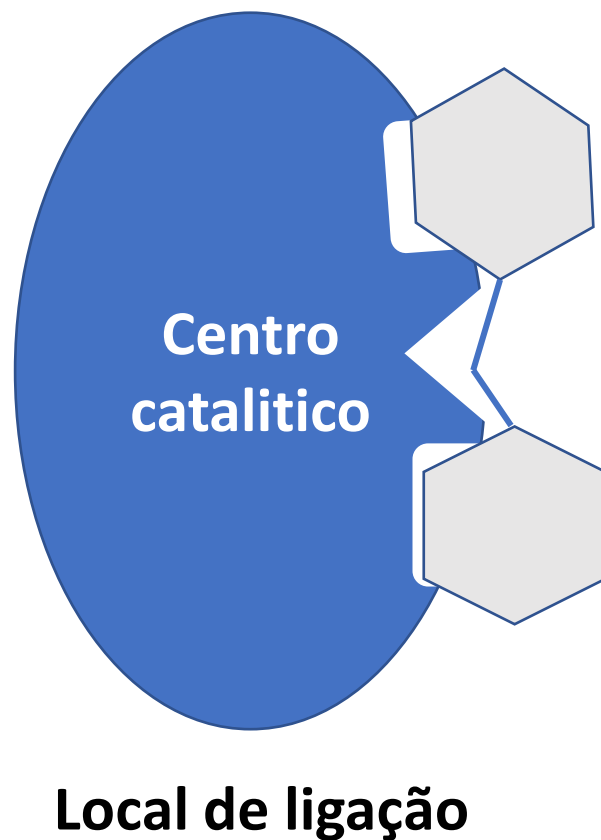
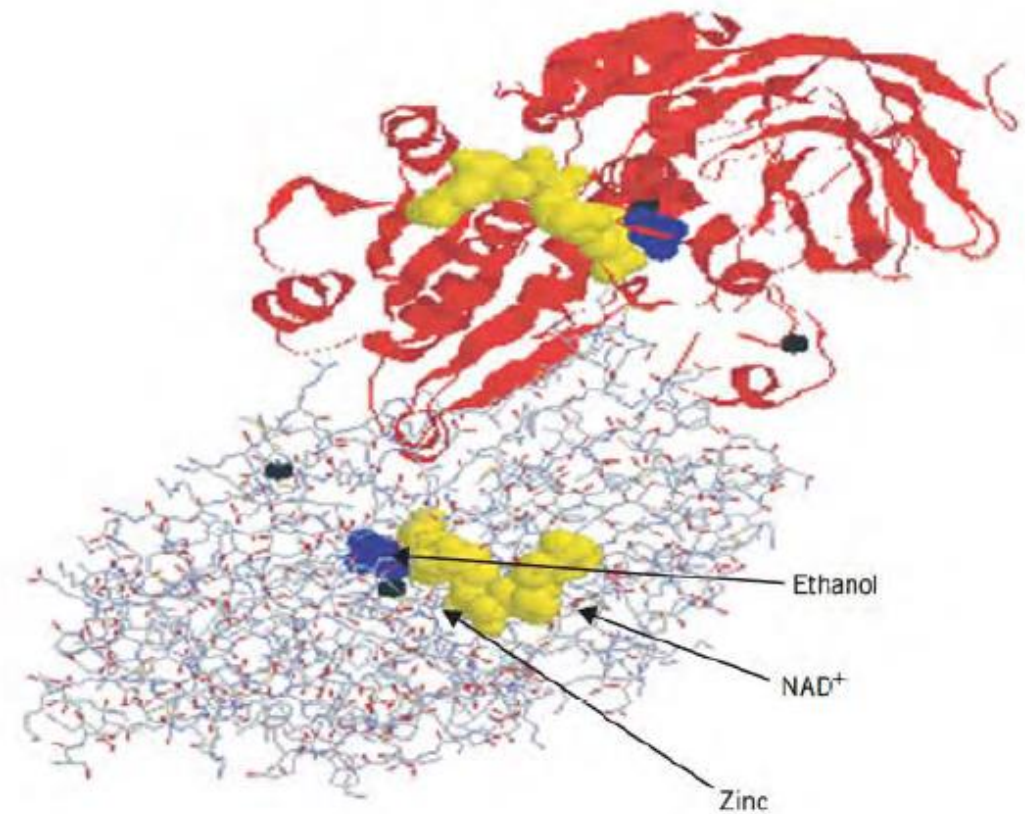


Fig 10.22. Os enzimas são muito maiores do que seus substratos. Álcool desidrogenase com etanol ligado a um Zn^{2+} e um NAD^+ no centro ativo. A maior parte dos aminoácidos da proteína não estão em contacto com o substrato.



Resíduos de amino ácidos afastados do centro activo são importantes para a actividade do enzima

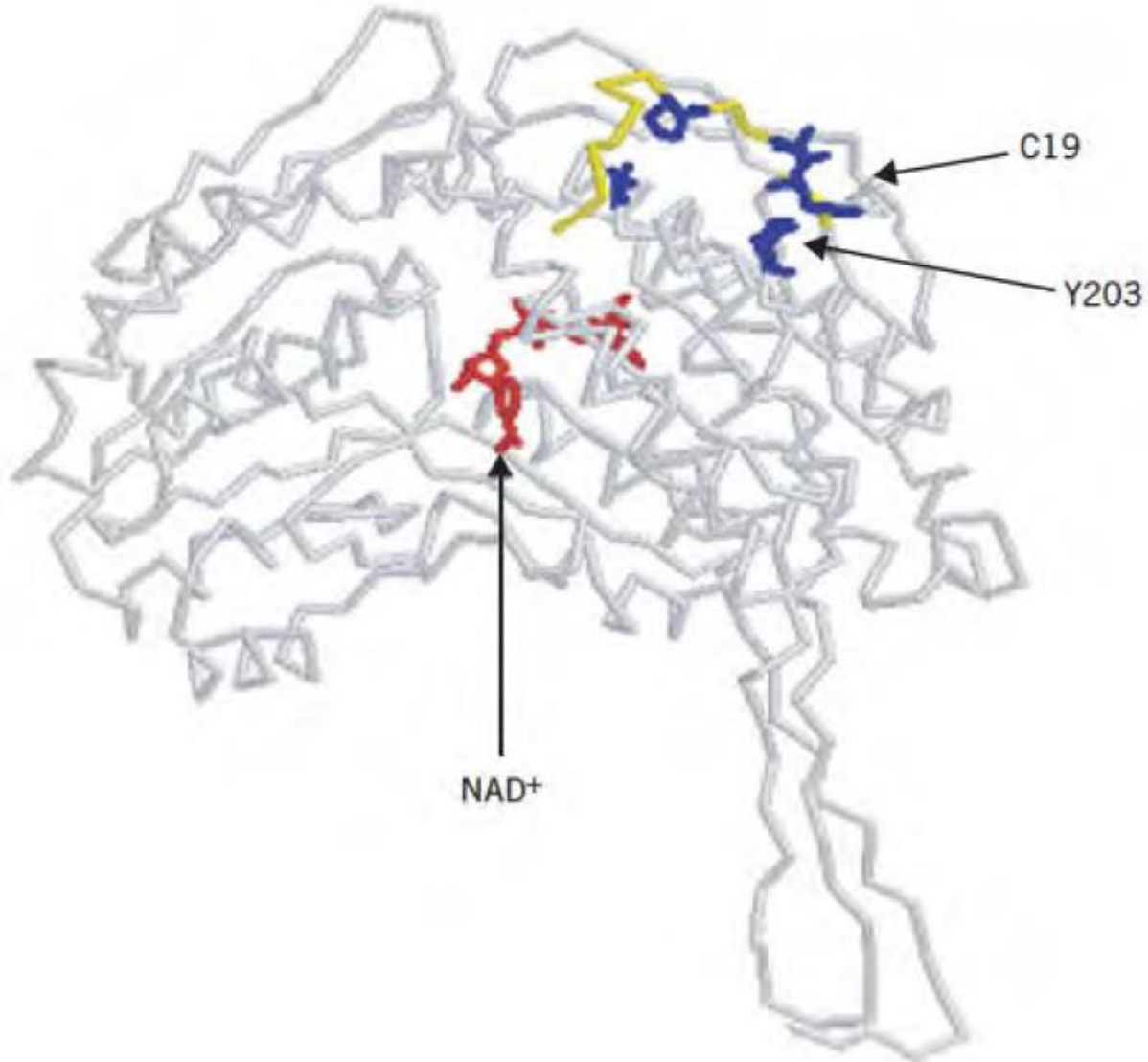


Figura 10.23 Aminoácidos a uma distância de o site ativo são críticos. Um resíduo de aminoácido na superfície de um enzima pode ser necessário para manter o enzima na sua forma adequada. Alterando o resíduo 19, uma cisteína, de uma subunidade de aldeído desidrogenase (500 aminoácidos) para tirosina, resultou um enzima insolúvel, sem actividade catalítica.

O resíduo 19 liga-se normalmente ao resíduo 203, o que é aparentemente necessário para manter a estrutura tridimensional adequada .

Estereoquímica do centro activo

Distinção entre ligações alfa e beta nas unidades glicosídicas

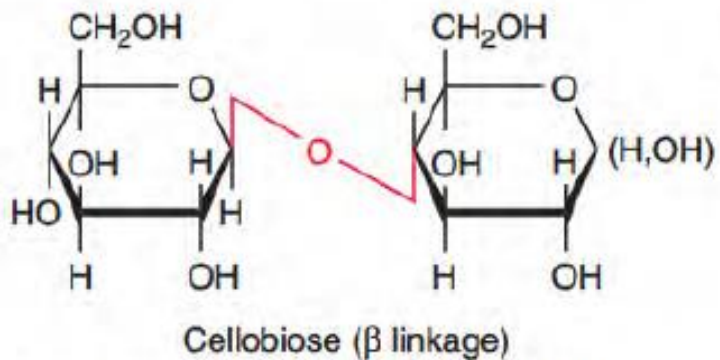
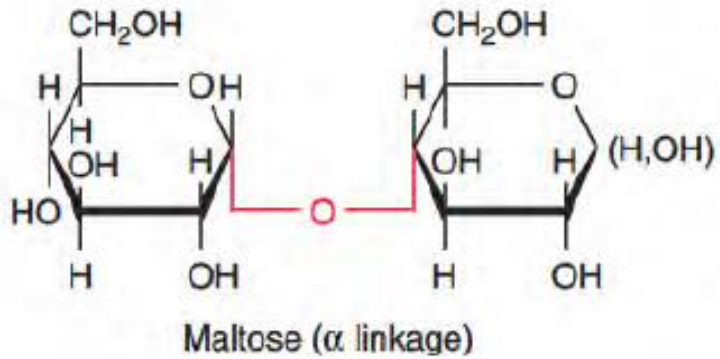


Figure 10.24 Enzymes can differentiate between α and β linkages. An enzyme that hydrolyzes maltose does not hydrolyze cellobiose.

Distinção entre isómeros óticos

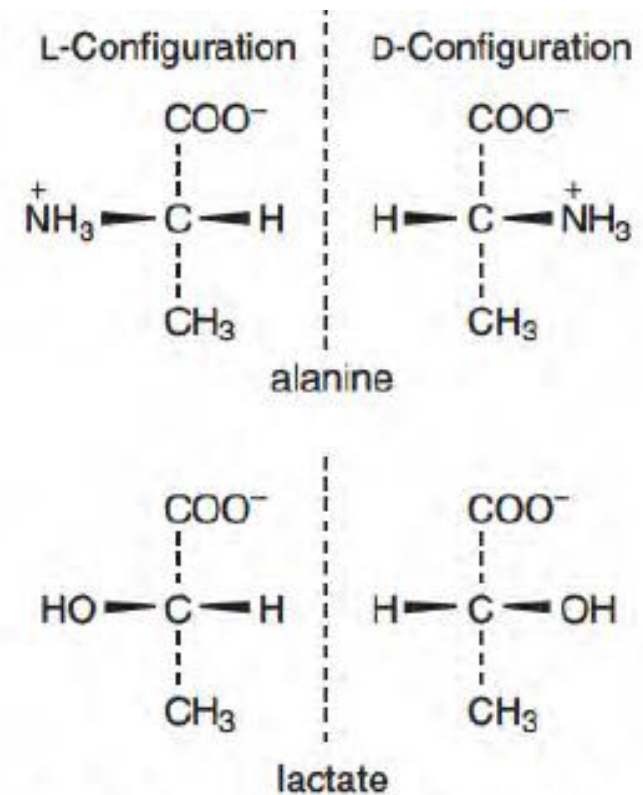


Figure 10.25 Enzymes can differentiate between optical isomers.



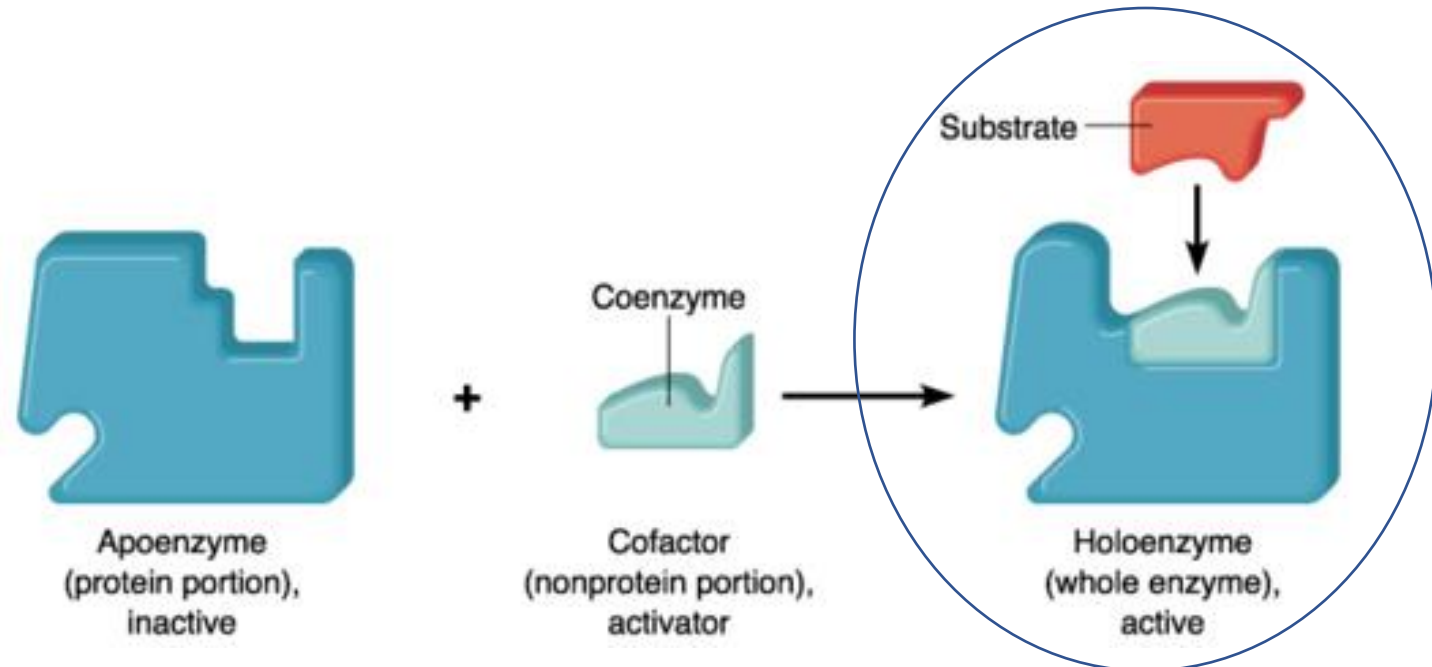
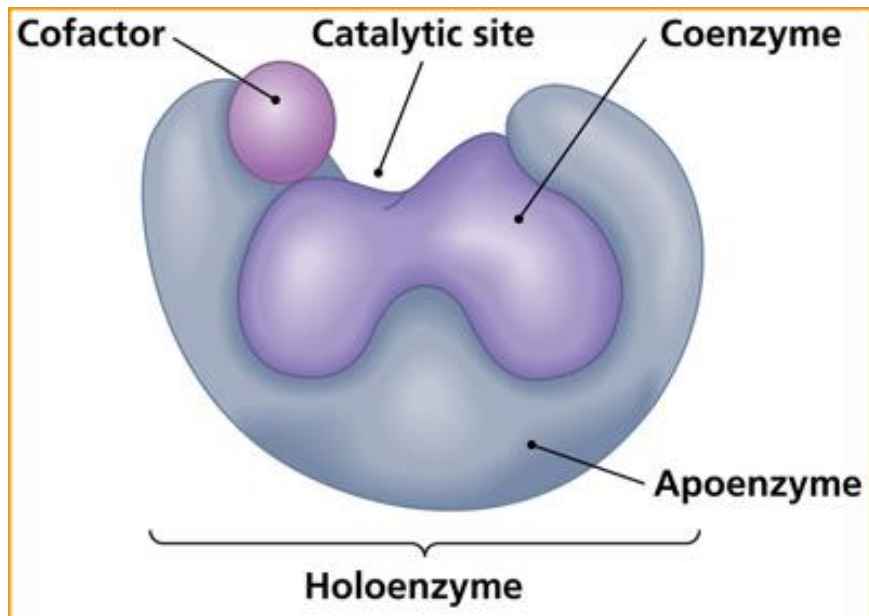
3.4.

COENZYMES, CO-SUBSTRATES, AND COFACTORS



Definições

- ❖ **Co-enzima:** liga-se ao enzima no centro activo; pequenas moléculas orgânicas muitas vezes derivadas de vitaminas
- ❖ **Co-factores não se liga ao enzima:** iões metálicos

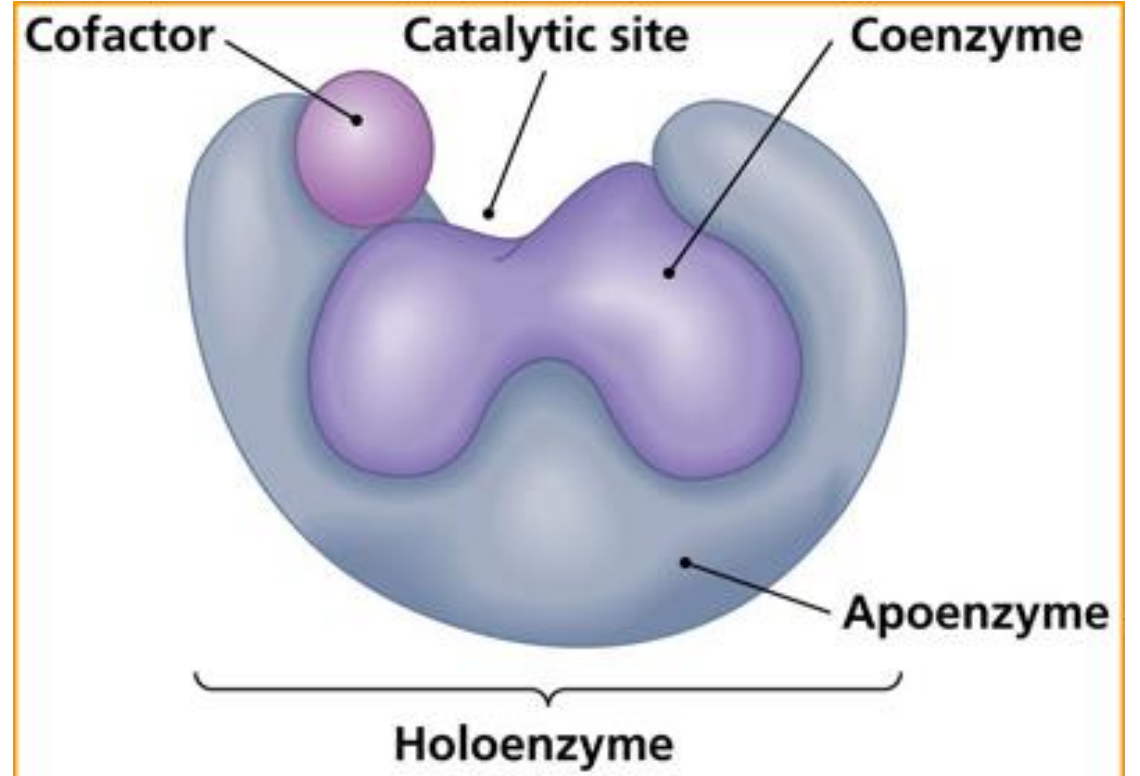
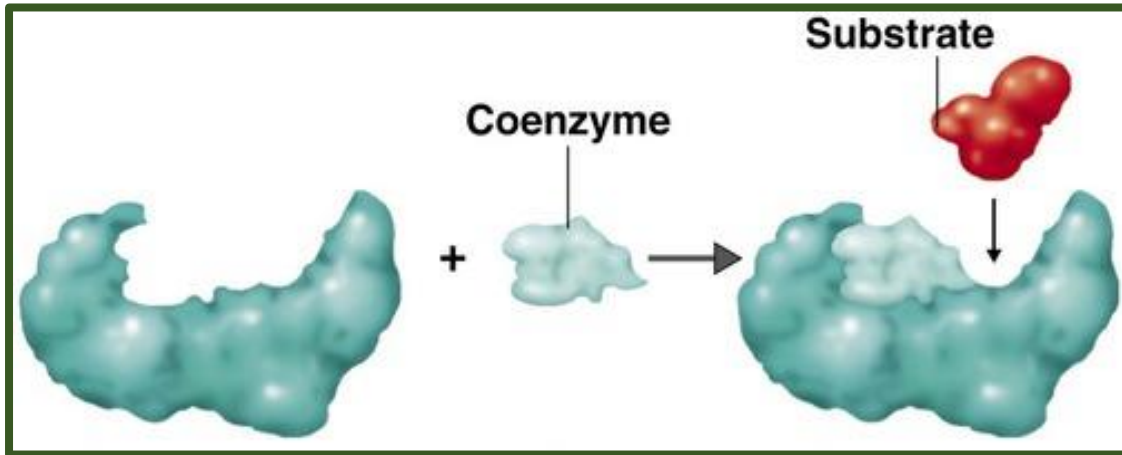


<https://www.biovision.com/products/metabolism-assays/coenzymes-cofactors.html>

Co-factores podem ajustar-se ao centro activo e ajudar o substrato a fazer a ligação

<https://www.pathwayz.org/Tree/Plain/ENZYME+COFACTORS>

Coenzimas

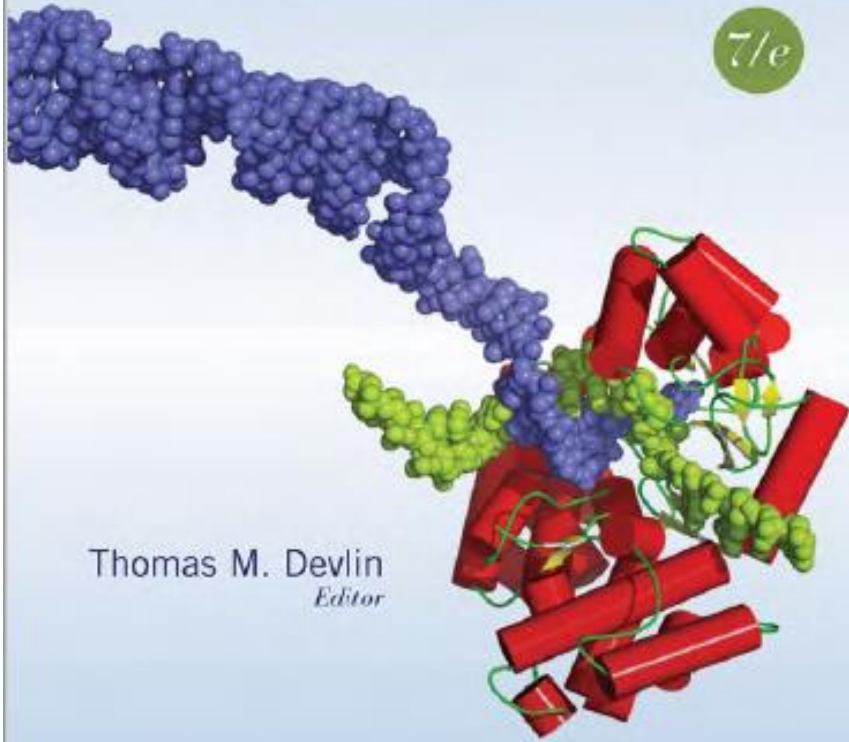


Textbook of
BIOCHEMISTRY

WITH CLINICAL CORRELATIONS

7/e

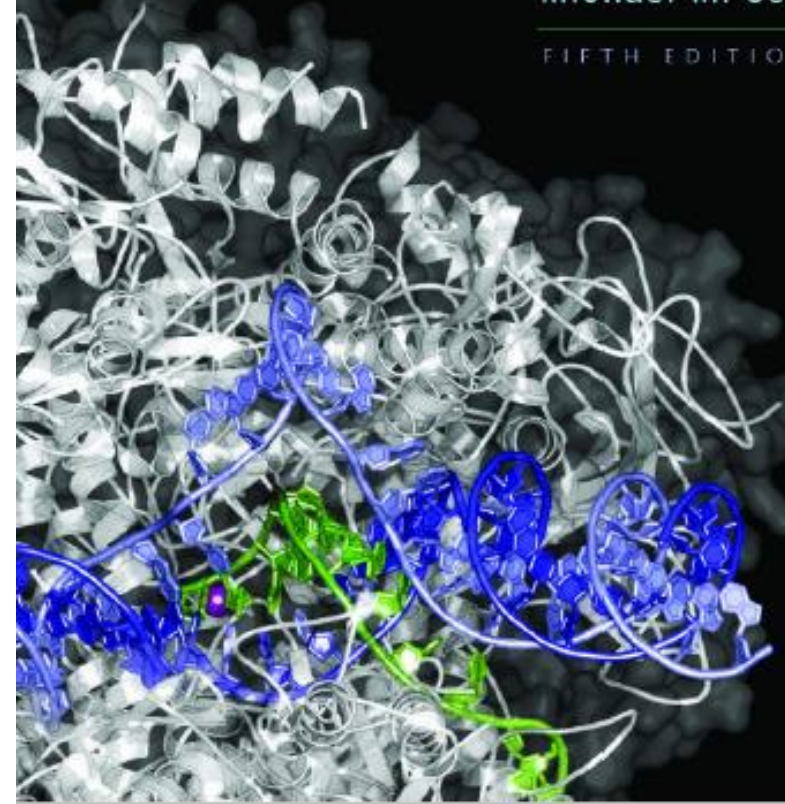
Thomas M. Devlin
Editor



LEHNINGER
PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

David L. Nelson
Michael M. Cox

FIFTH EDITION





3.5.

ENZYME KINETICS OF ONE-SUBSTRATE REACTIONS

