

INTRODUÇÃO A QUÍMICA MEDICINAL

ENZIMAS

Prof. Gustavo Pozza Silveira

gustavo.silveira@iq.ufrgs.br

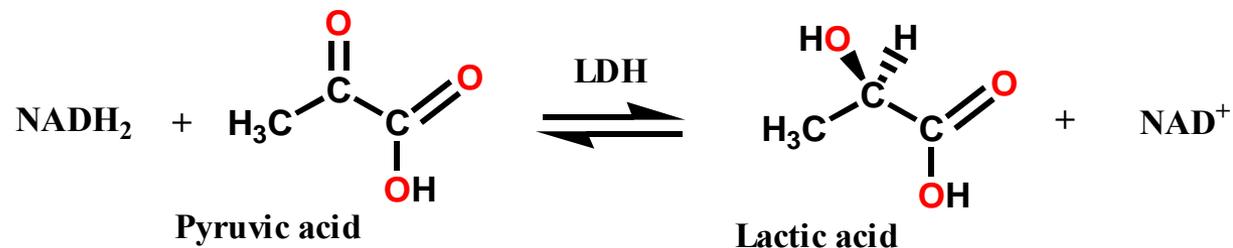
Sala 201A – Bloco E



Estrutura e função de enzimas

- Proteínas globulares agem como catalisadores do corpo.
- Aumentam a velocidade reacional para que a mesma atinja o equilíbrio.
- Diminuem a energia de ativação reacional.

Exemplo:



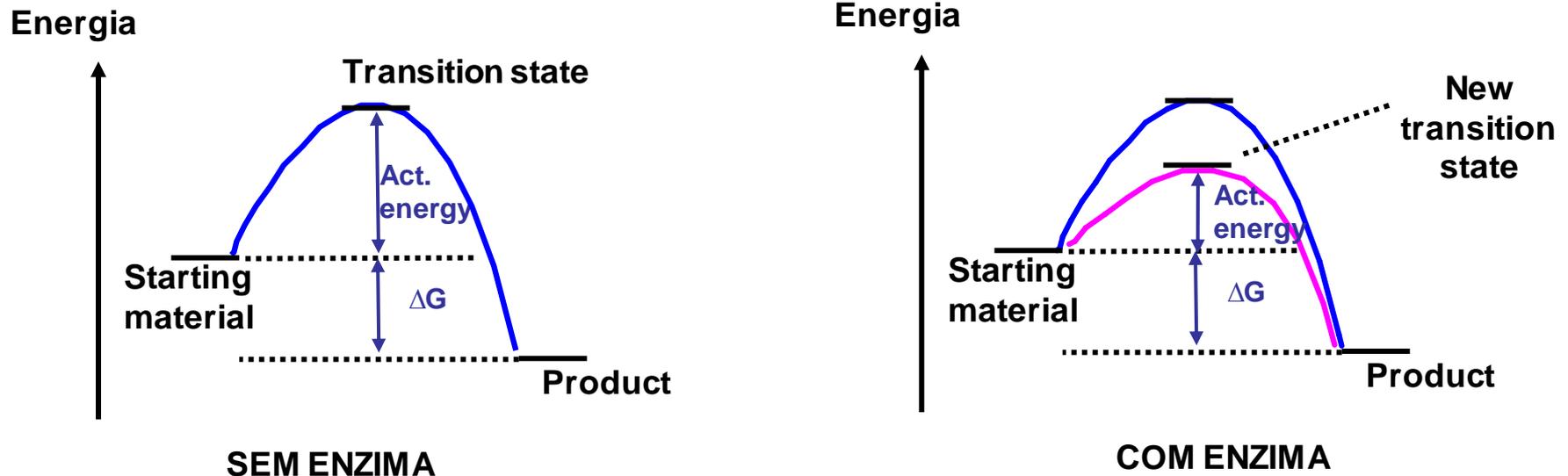
LDH = Lactato desidrogenase (enzima)

NADH₂ = Nicotinamida adenosina dinucleotídeo (agente redutor & cofator)

Ácido Pirúvico = Substrato

Estrutura e função de enzimas

Diminui a energia de ativação de uma reação:



Enzimas diminuem a energia de ativação reacional, mas ΔG permanece o mesmo.

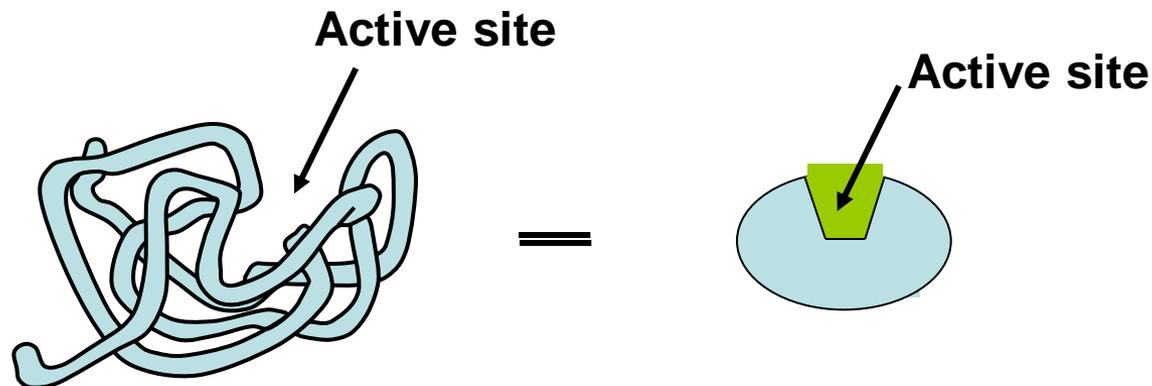
Estrutura e funcionamento de enzimas

Métodos de catálise enzimática

- Promovem uma superfície reacional (o sítio ativo)
- Promovem o ambiente adequado para reação ocorrer (meio hidrofóbico).
- Aproximam reagentes.
- Posicionam reagentes corretamente para reação (confôrmeros).
- Enfraquecem ligações nos reagentes.
- Promovem catálise ácida / básica.
- Intensificam grupos nucleofílicos.

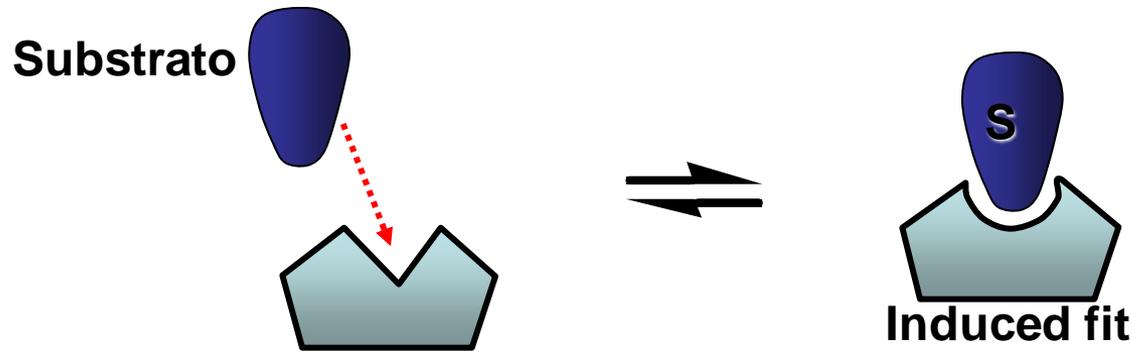
Sítio ativo

- Cavidades hidrofóbicas na superfície enzimática
- Aceitam reagentes (substratos e cofatores)
- Contém aminoácidos que:
 - Ligam-se a reagentes (substratos e cofatores).
 - Catalisam a reação.



Ligação do substrato

Preenchimento induzido.



Notas:

- Sítio ativo está próximo do formato correto para interação com o substrato
- Ligação altera o formato da enzima (preenchimento induzido)
- Força de ligação com o substrato é aumentada devido a indução
- Ligação envolve forças intermoleculares entre grupos funcionais do substrato e do sítio ativo

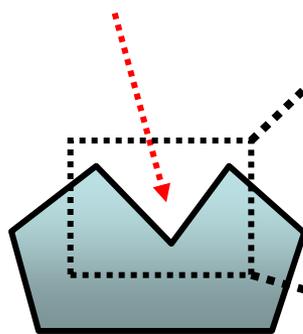
Ligação do substrato

Forças ligantes

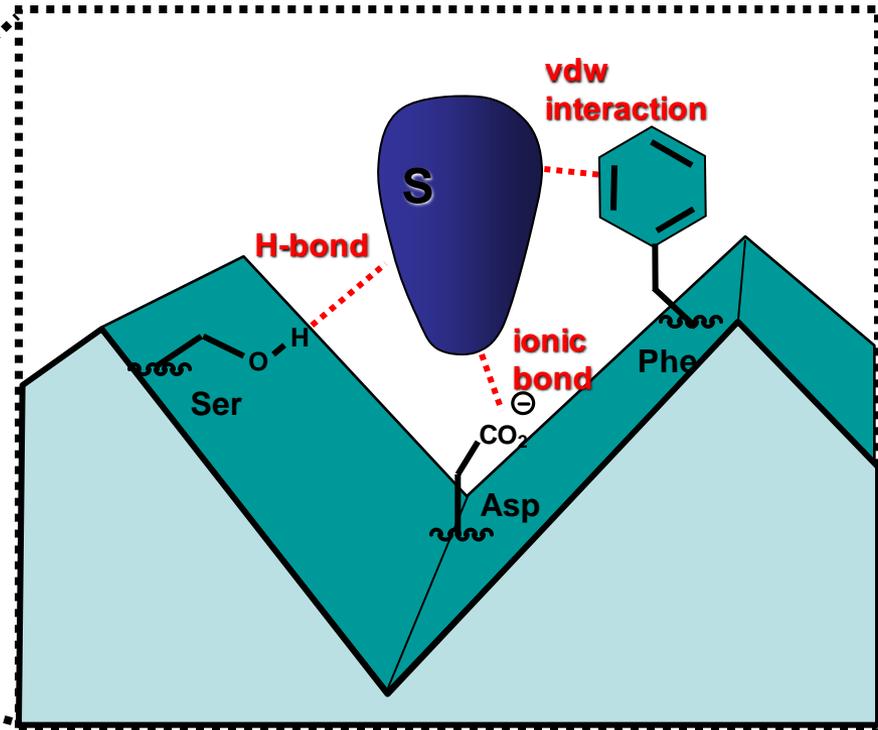
- Iônicas
- Ligação de H
- van der Waals

Exemplo:

Sítio ativo



Enzima

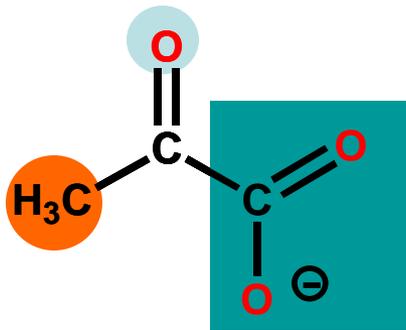


Ligação do substrato

Forças ligantes

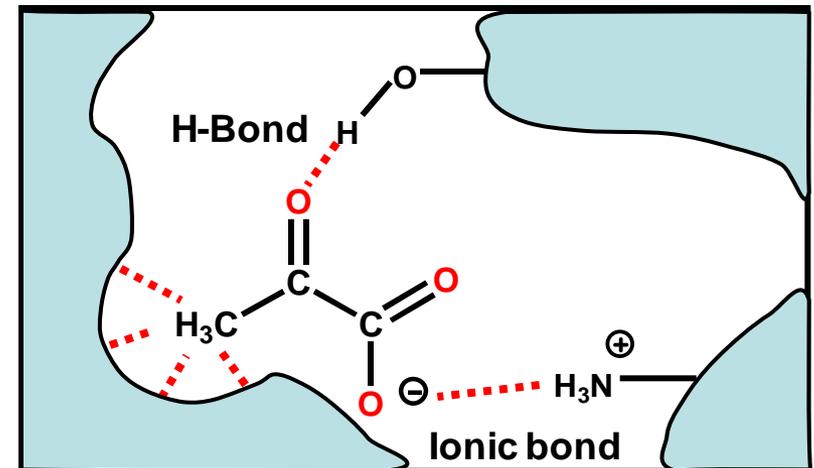
- Iônicas
- Ligação de H
- van der Waals

Exemplo – Ligação do ácido pirúvico no lactato desidrogenase (LDH)



Interações possíveis

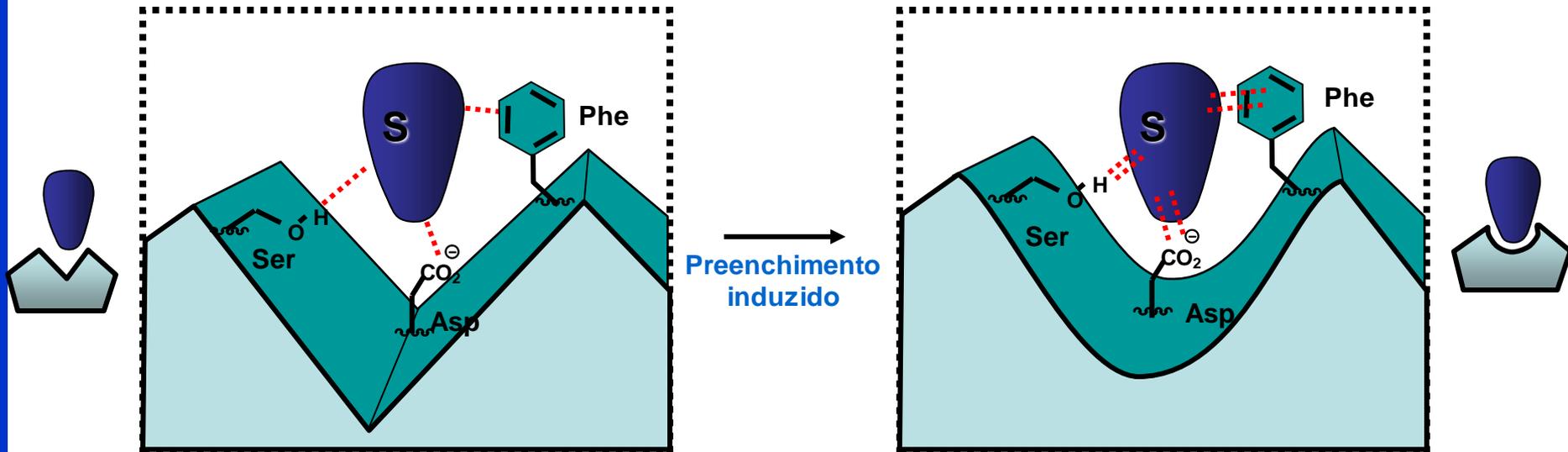
	Ligação-H
	van der Waals
	Iônica



Ligação do substrato

Forças de ligação

- Indução do molde correto – sítio ativo é alterado para maximizar ligações intermoleculares.

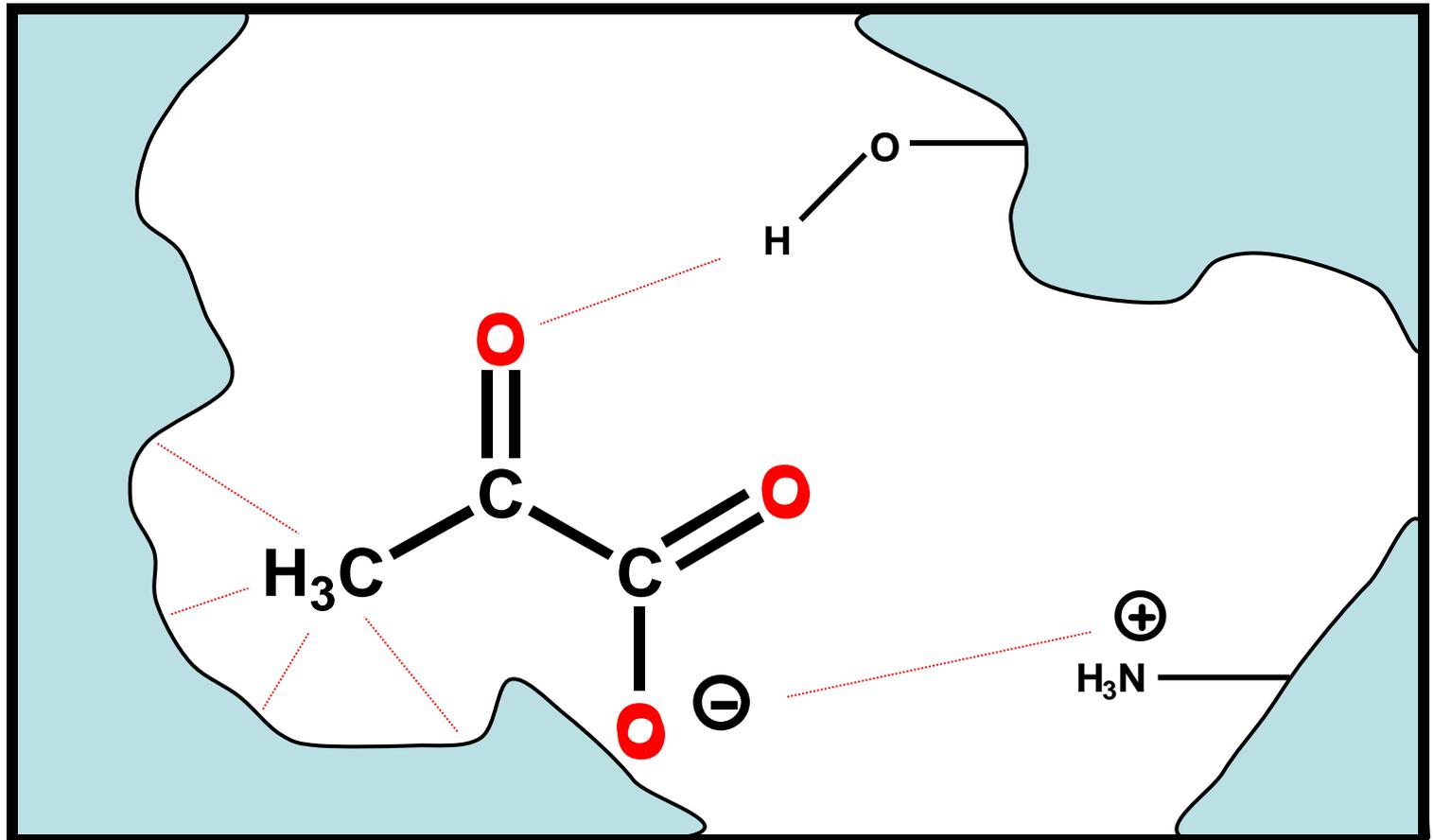


Ligações intermoleculares não estão em um comprimento ótimo para maximizar a ligação

Comprimento das ligações intermoleculares otimizados. Ligações suscetíveis no substrato são alongadas levando a uma maior facilidade dessas ligações serem quebradas

Ligação do substrato

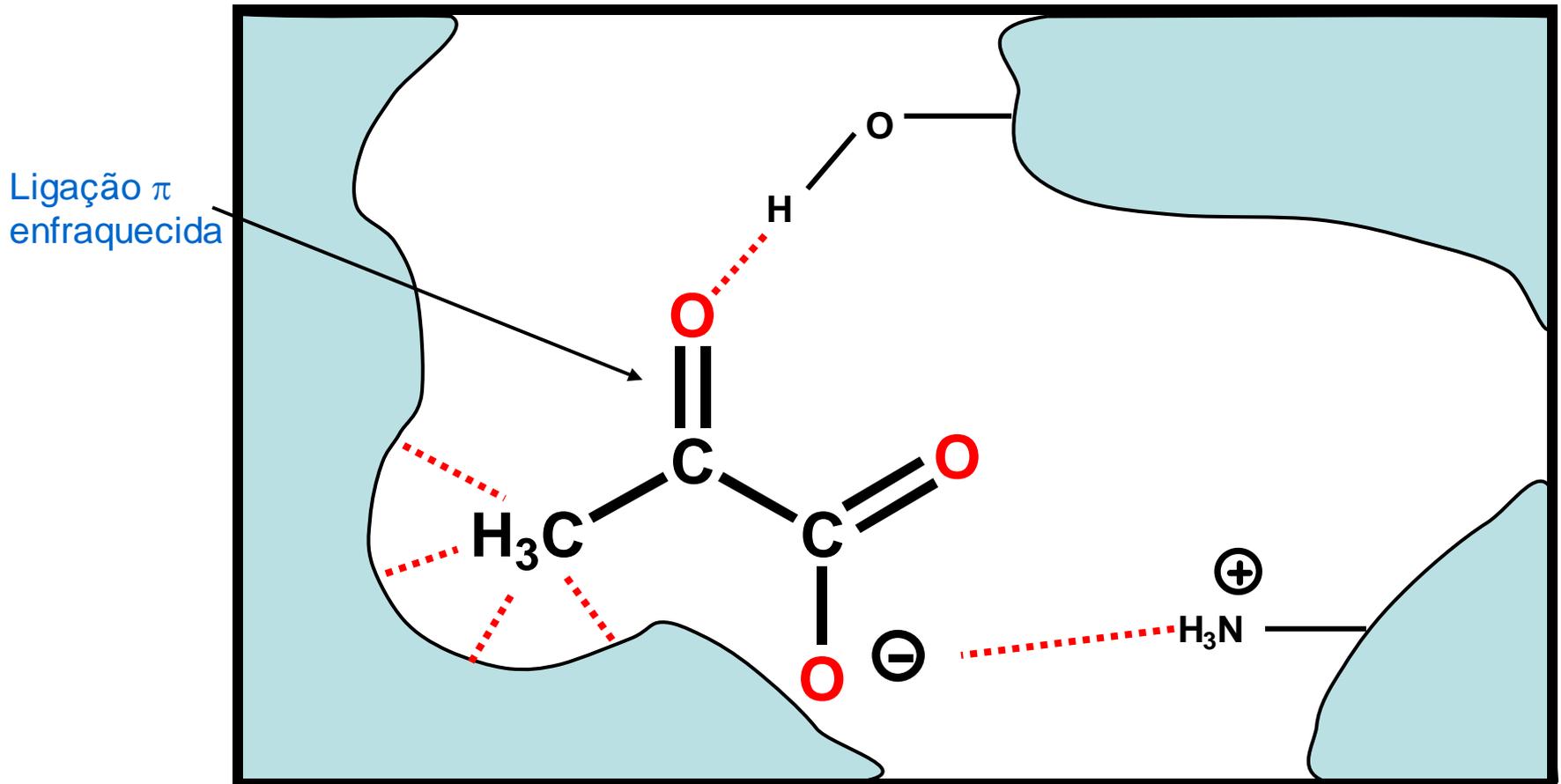
Exemplo – Ligação entre o ácido pirúvico noa LDH



Importante: substrato não precisa necessariamente estar na sua conformação mais estável.

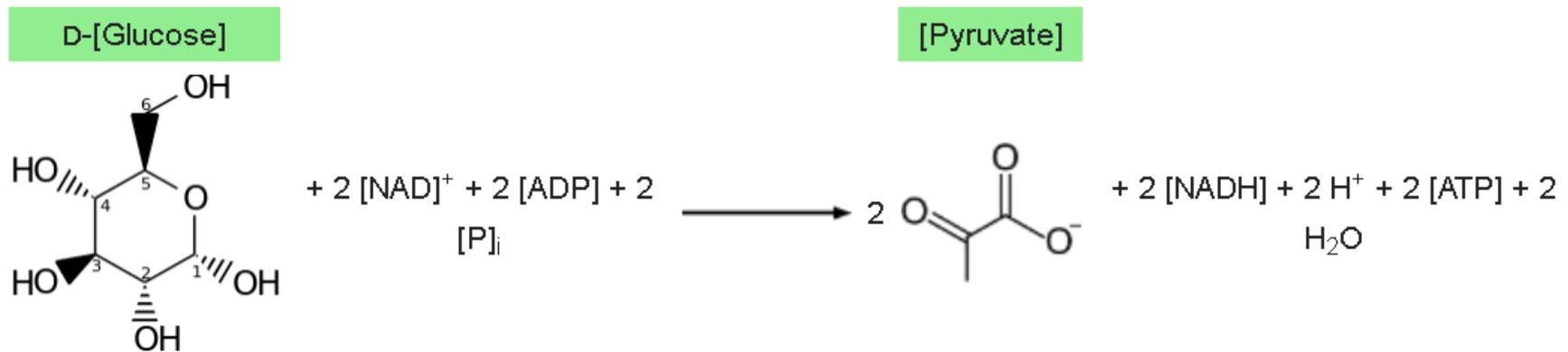
Ligação do substrato

Exemplo – Ligação entre o ácido pirúvico no LDH



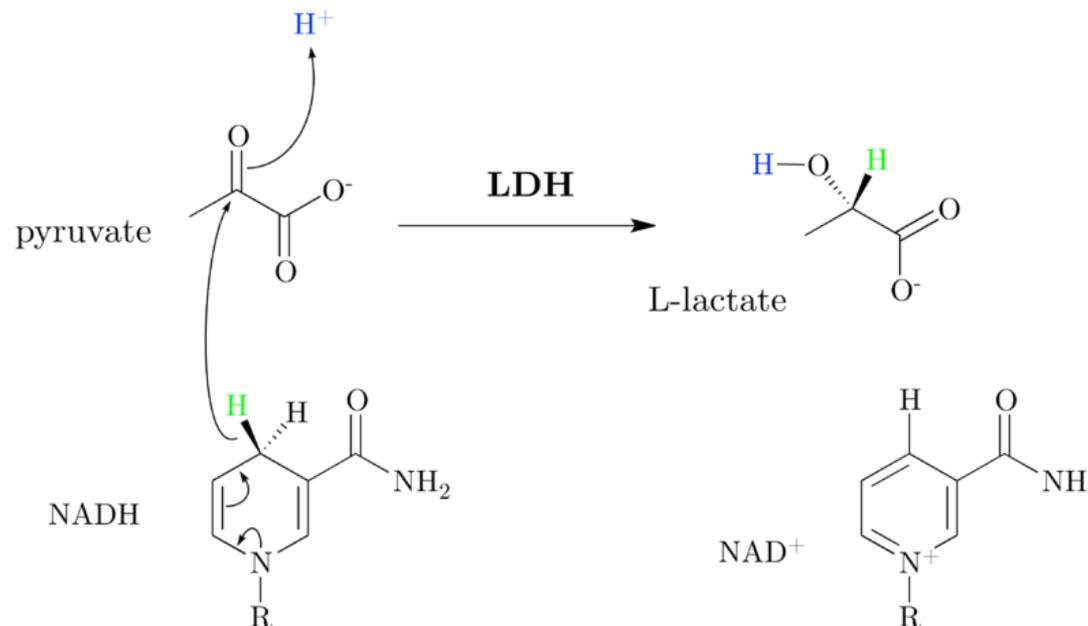
Lactato desidrogenase (LDH)

Lactato desidrogenase é uma válvula de segurança no nosso processo de produção de energia. Na maior parte do tempo, nossas células vivem completamente a glicose liberando átomos de carbono na forma de CO_2 e átomos de hidrogênio como H_2O com formação de ATP e NADH. Este processo necessita de muito oxigênio. Se o fluxo de oxigênio não for suficiente, o processo de produção de energia para antes do final do ciclo da glicólise. Para resolver temporariamente este problema, entra em cena a lactato desidrogenase.



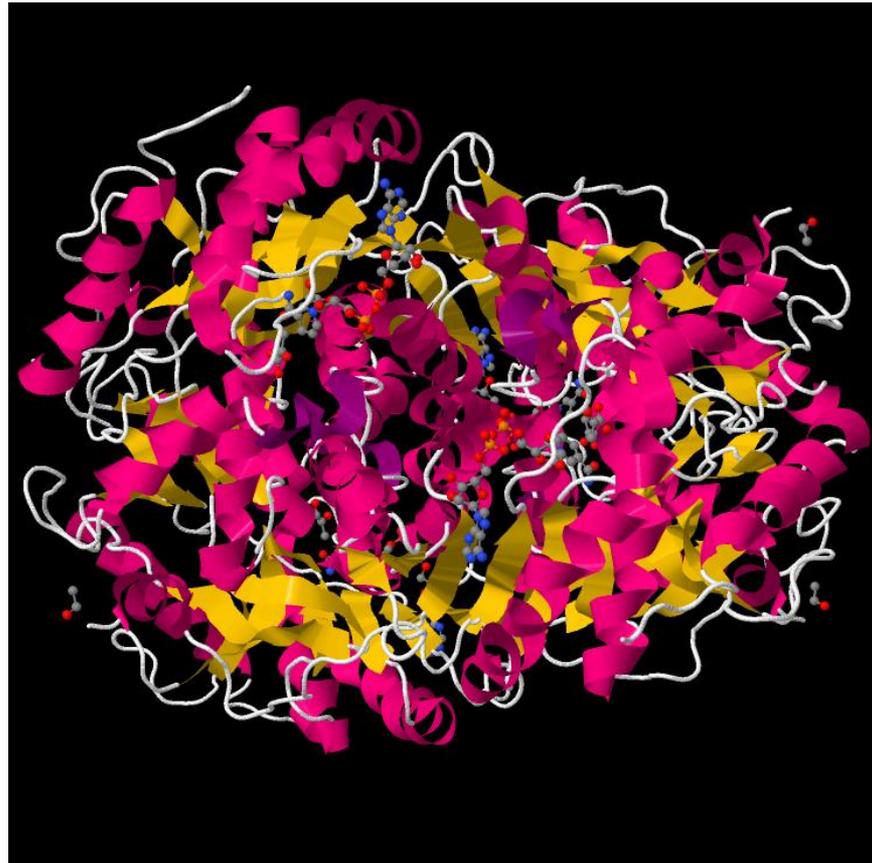
Lactato desidrogenase (LDH)

Quando nos exercitamos exaustivamente, a taxa de oxigênio disponível diminui. Assim, nossas células passam a utilizar a glicólise como fonte primária de energia. Na glicólise, hidreto obtido a partir da glicose é capturado pelo NAD^+ para formar NADH . Enquanto que prótons são capturados por oxigênio formando água. Mas se oxigênio não estiver disponível, a concentração de NADH cresce sem haver novas moléculas de NAD^+ para continuar o processo de glicólise para gerar ATP. Desta forma, lactato desidrogenase é “acionada” para combinar piruvato e NADH e gerar ácido láctico e NAD^+ . Finalmente, o NAD^+ é reciclado para continuar a glicólise.



Lactato desidrogenase (LDH)

Código PDB: 3ldh



Ligantes: NADH (cofator) e ácido pirúvico (substrato).

Cofator

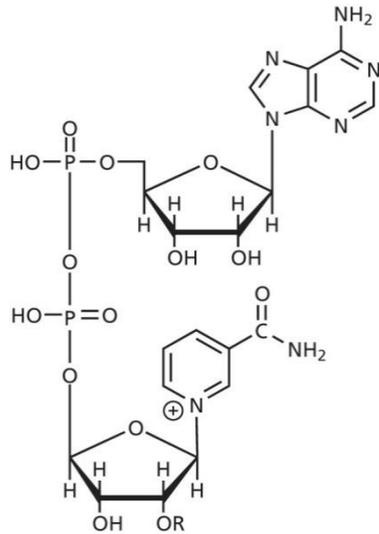
Muitas enzimas necessitam de substâncias adicionais não proteicas chamadas **cofatores** para que as reações ocorram. Cofatores podem ser íons metálicos (ex.: Zn) ou pequenas moléculas chamadas de **coenzimas** (ex.: NAD⁺, pirodoxal fosfato).

A maioria das coenzimas são ligadas por interações iônicas e outras ligações não covalentes. Já as coenzimas ligadas por ligações covalentes são chamadas de **grupos prostéticos**.

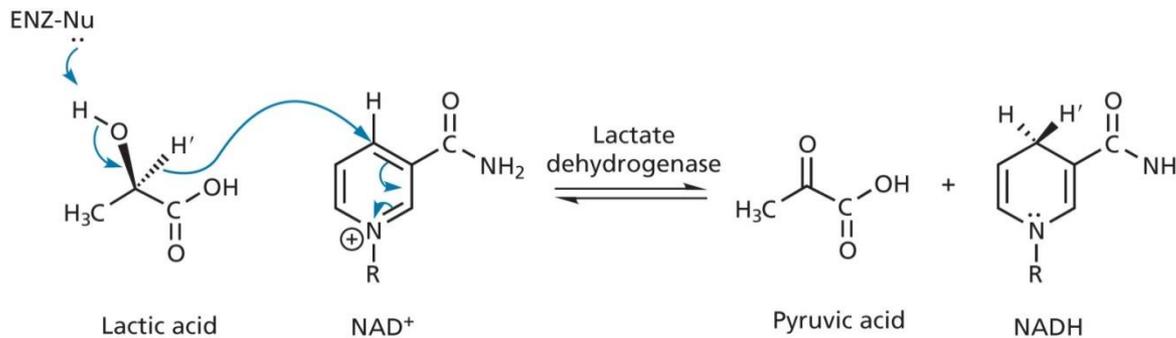
Coenzimas são obtidas a partir de vitaminas solúveis em água e agem no corpo como reagentes químicos (ex.: lactato desidrogenase necessita da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para catalisar a desidrogenação do ácido láctico à ácido pirúvico.

NAD⁺ liga-se ao sítio ativo juntamente com ácido láctico e age como agente oxidante sendo convertido a NADH. NADH também pode ligar-se a enzima agindo como agente redutor na reação reversa.

Cofator



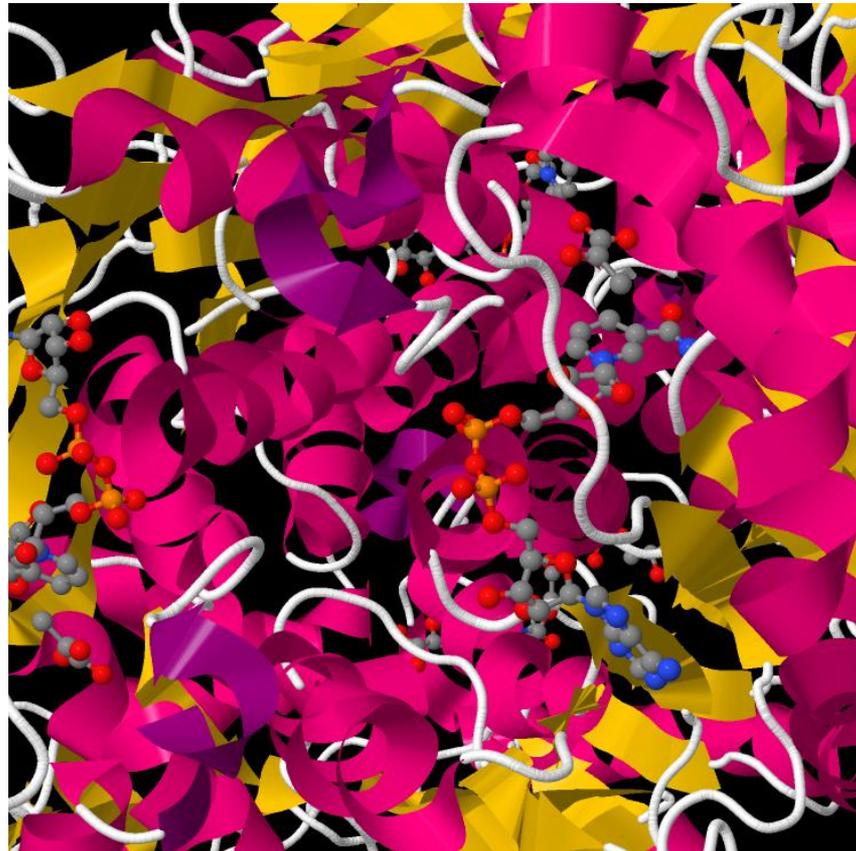
Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (R=H) e nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato (R=fosfato).



NAD⁺ agindo como coenzima

Lactato desidrogenase (LDH)

(Zoom do sítio ativo)



Código PDB: 3ldh

Ligantes: NADH (cofator) e ácido pirúvico (substato).

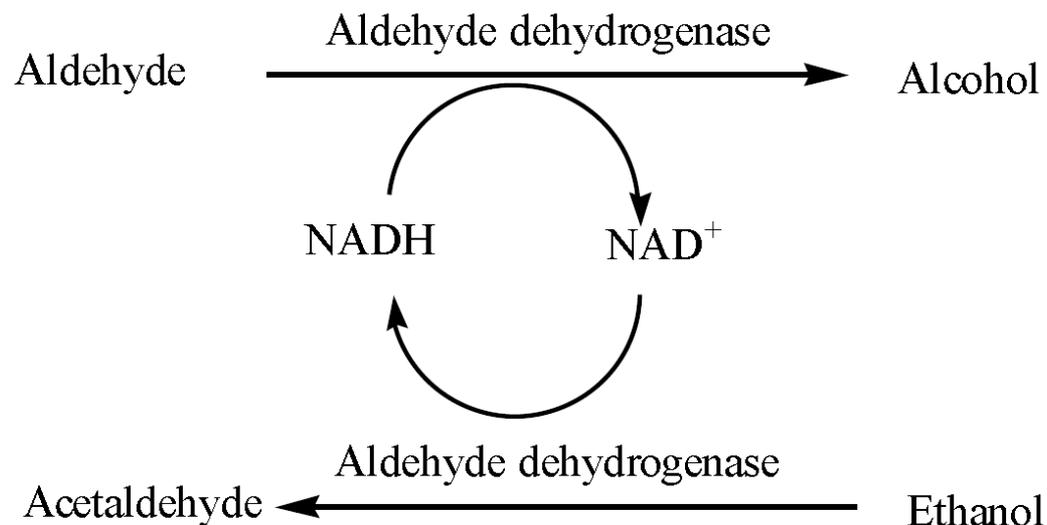
Nomenclatura de Enzimas

O nome da enzima corresponde ao tipo de reação que ela catalisa, sendo que o sufixo ase corresponde a uma enzima. É importante notar que a enzima catalisa reações que estão em equilíbrio.

EC number	Enzyme class	Type of reaction
E.C.1.x.x.x	Oxidoreductases	Oxidations and reductions
E.C.2.x.x.x	Transferases	Group transfer reactions
E.C.3.x.x.x	Hydrolases	Hydrolysis reactions
E.C.4.x.x.x	Lyases	Addition or removal of groups to form double bonds
E.C.5.x.x.x	Isomerases	Isomerizations and intramolecular group transfers
E.C.6.x.x.x	Ligases	Joining two substrates at the expense of ATP hydrolysis

Note: EC stands for Enzyme Commission, a body set up by the International Union of Biochemistry (as it then was) in 1955.

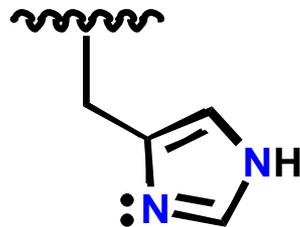
Exercício: enzimas podem ser utilizadas em síntese orgânica. Por exemplo, a redução de um aldeído é realizada utilizando aldeído desidrogenase. Infelizmente, a reação requer o cofator NADH, que é bastante caro. Porém, se etanol é utilizado na reação, somente quantidades catalíticas do cofator passa a ser necessário. Por que?



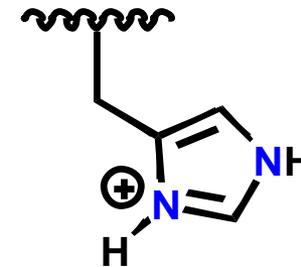
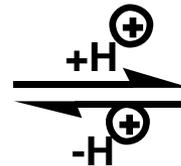
Mecanismo de catálise

Catálise ácido/base

- Histidina



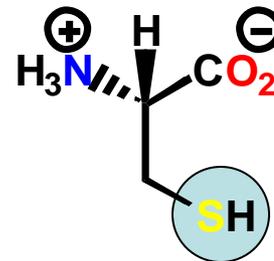
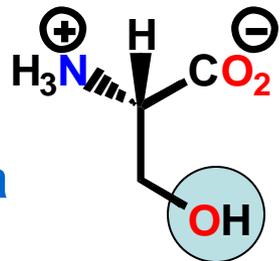
Não ionizada:
age como um
catalisador básico
(próton 'sink')



ionizada:
age como
catalisador ácido
(fonte protônica)

Resíduos nucleofílicos

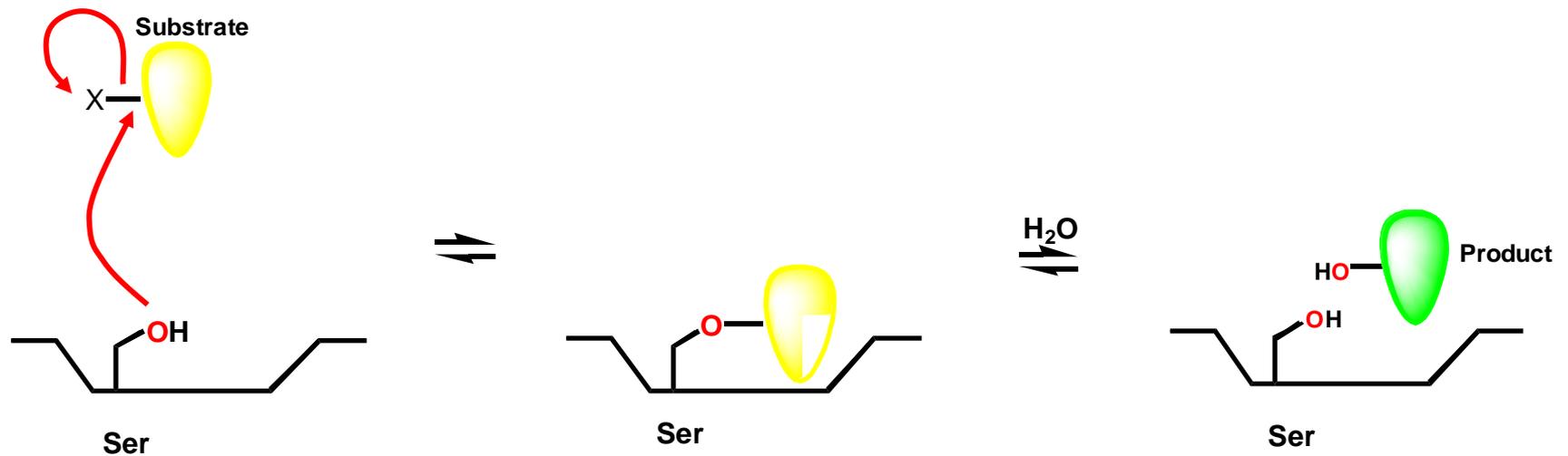
L-serina



L-cisteína

Mecanismo de catálise

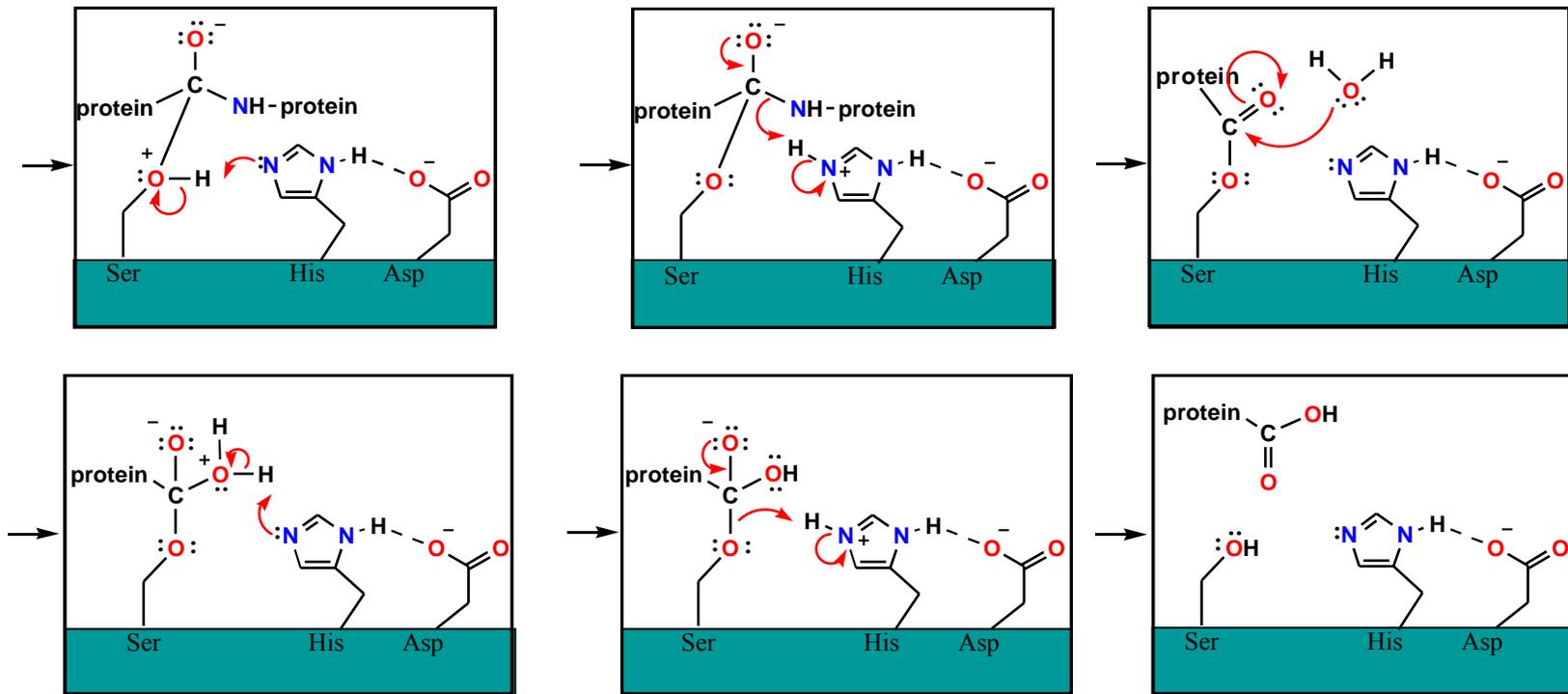
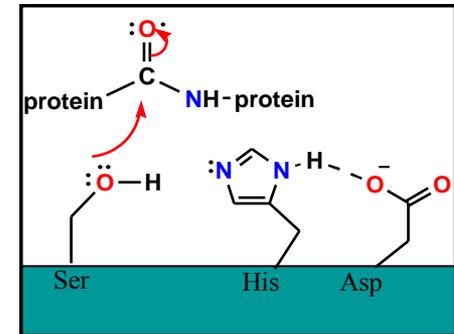
Serina agindo como nucleófilo



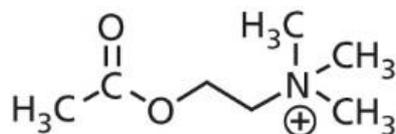
Mecanismos de catálise

Mecanismo para quimotripsina

Exemplo de tríade catalítica: água não é um bom nucleófilo para promover a clivagem do peptídeo. Serina agindo em conjunto com histidina e ácido aspártico formam uma tríade catalítica que permite que a clivagem ocorra.



Exercício 1: acetilcolina é o substrato da enzima acetilcolinesterase. Sugira que tipos de interações ligantes poderiam ser responsáveis em manter a acetilcolina no sítio ativo da enzima.

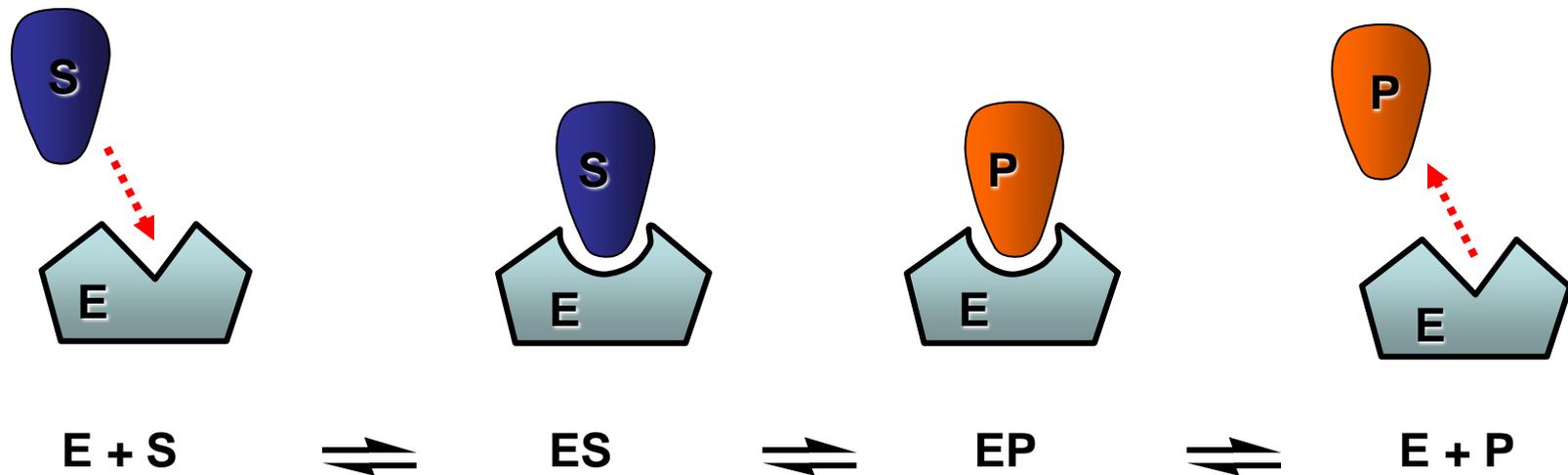


Acetylcholine

Exercício 2: a ligação éster da acetilcolina é hidrolizada pela acetilcolinesterase. Sugira um mecanismo pelo qual a enzima catalise esta reação.

Exercício 3: Sugira como interações ligantes poderiam tornar a acetilcolina mais susceptível a hidrólise.

Processo completo de catálise enzimática



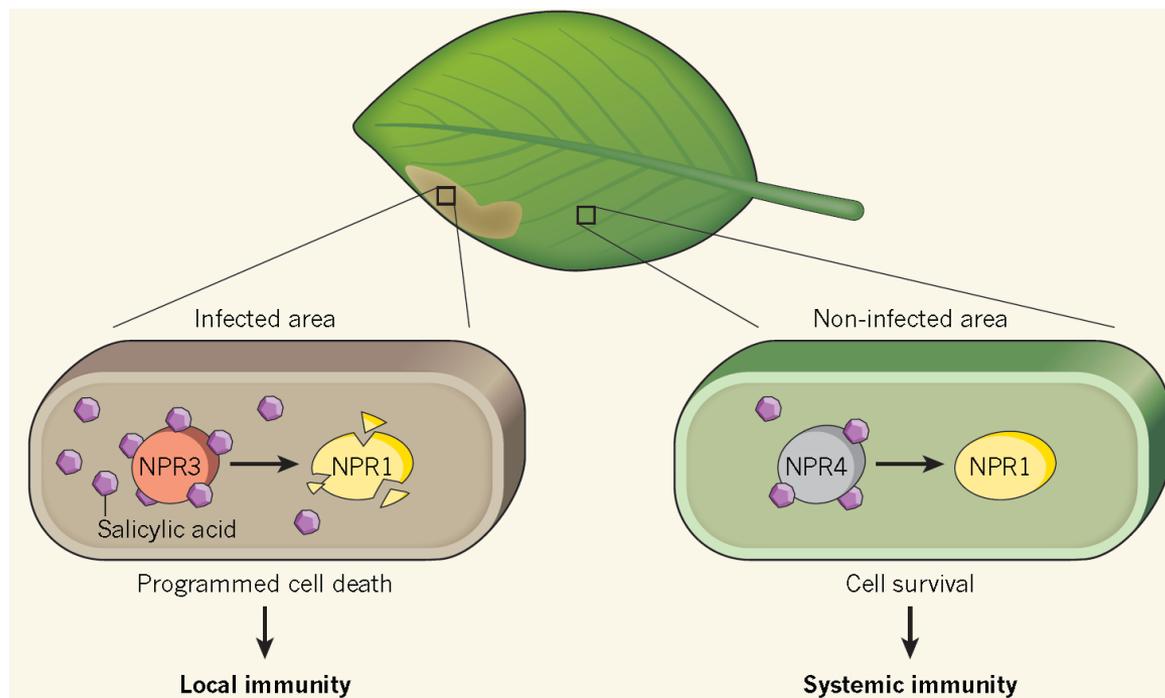
Notas:

- Interações ligantes devem ser fortes o suficiente para manter o substrato preso o tempo necessário para que a reação ocorra.
- Porém, as interações devem ser fracas o suficiente para permitir que o substrato deixe o sítio ativo após a catálise.
- Esse antagonismo deve ser seriamente levado em consideração!
- O planejamento de moléculas que liguem-se fortemente ao sítio ativo poderá bloqueá-lo permanentemente (substratos suicidas)!

Mecanismos de catálise

(Regulação enzimática)

Defesa de células vegetais (exemplo)



Ácido salicílico em alta concentração causa a morte do tecido celular (esquerda), enquanto que em baixa concentração dispara o mecanismo de defesa da planta (direita, SAR).

Mecanismos de catálise

(Regulação enzimática)

Defesa de células vegetais

A enzima SABP2 (salicylic acid binding protein) é uma das responsáveis pelo mecanismo de disparo das defesas naturais das plantas (resistência sistêmica adquirida).

Esta enzima catalisa a clivagem de salicilato de metila a ácido salicílico.

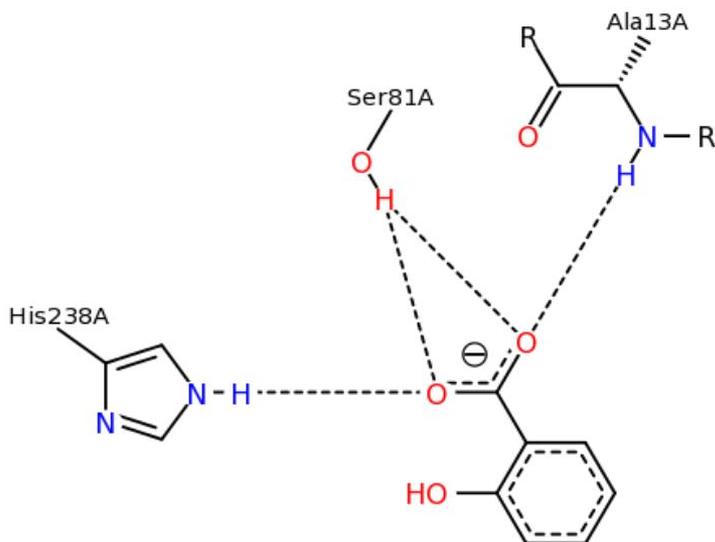
Ácido salicílico compete com salicilato de metila pelo sítio ativo da enzima impedimento que a tríade catalítica (ser, asp, his) desempenhe seu papel de hidrólise.

SAMe também é responsável por transmitir o mecanismo de defesa a áreas mais afastadas da infecção.



SABP2

(Regulação enzimática)



SABP2 – PDB code:1YKI



Ácido salicílico é um substrato competidor da enzima SAPB2 que liga-se a ela mais fortemente do que o salicilato de metila impedindo que a tríade ser, his e asp desempenhe sua função e inativando o sistema de defesa natural da planta (mecanismo SAR).

Como você classificaria essa proteína?

Regulando o funcionamento de enzimas

(sítio alostérico)

Muitas enzimas são reguladas por agentes que estão no interior celular. Essa regulação pode intensificar ou inibir a enzima.

Os produtos enzimáticos também podem agir como inibidores através da ligação a um sítio ligante chamado de sítio ligante alostérico. Portanto, uma enzima pode possuir sítios ligantes e alostéricos.

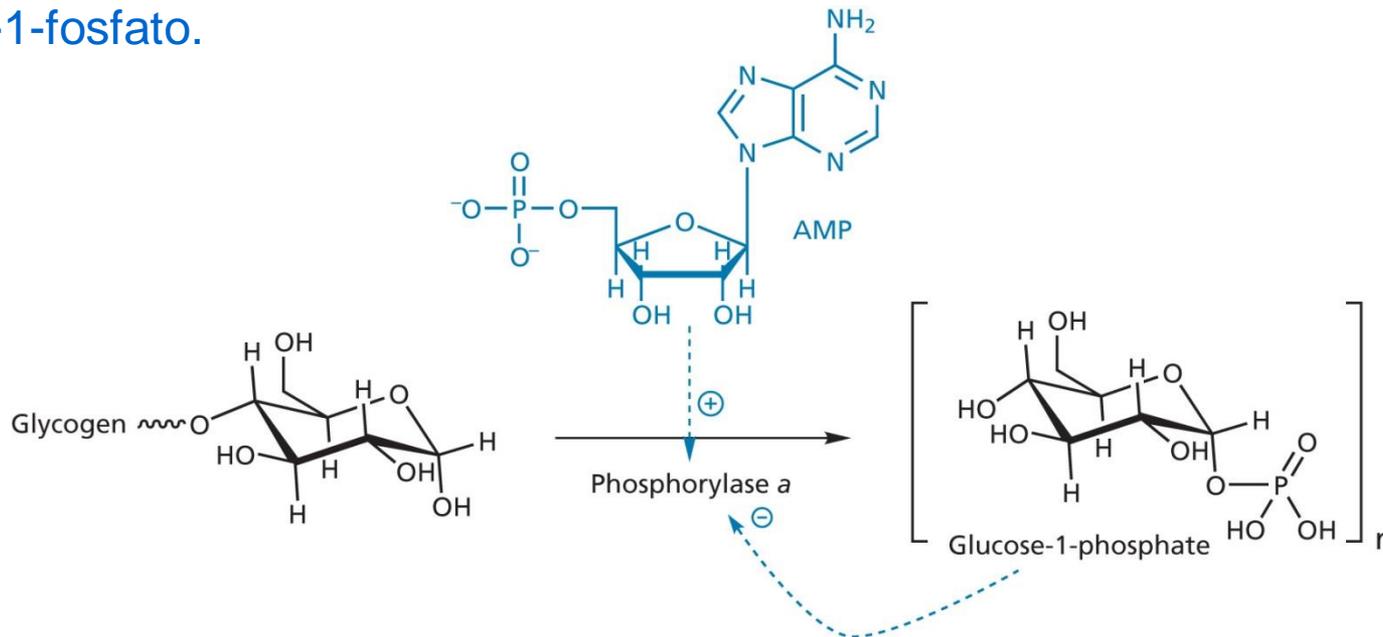
A ligação ao sítio alostérico altera a estrutura da enzima. Conseqüentemente, o sítio ativo também pode ser alterado de modo a não permitir que novos substratos sejam catalisados.

Regulando o funcionamento de enzimas

(sítio alostérico)

Exemplo

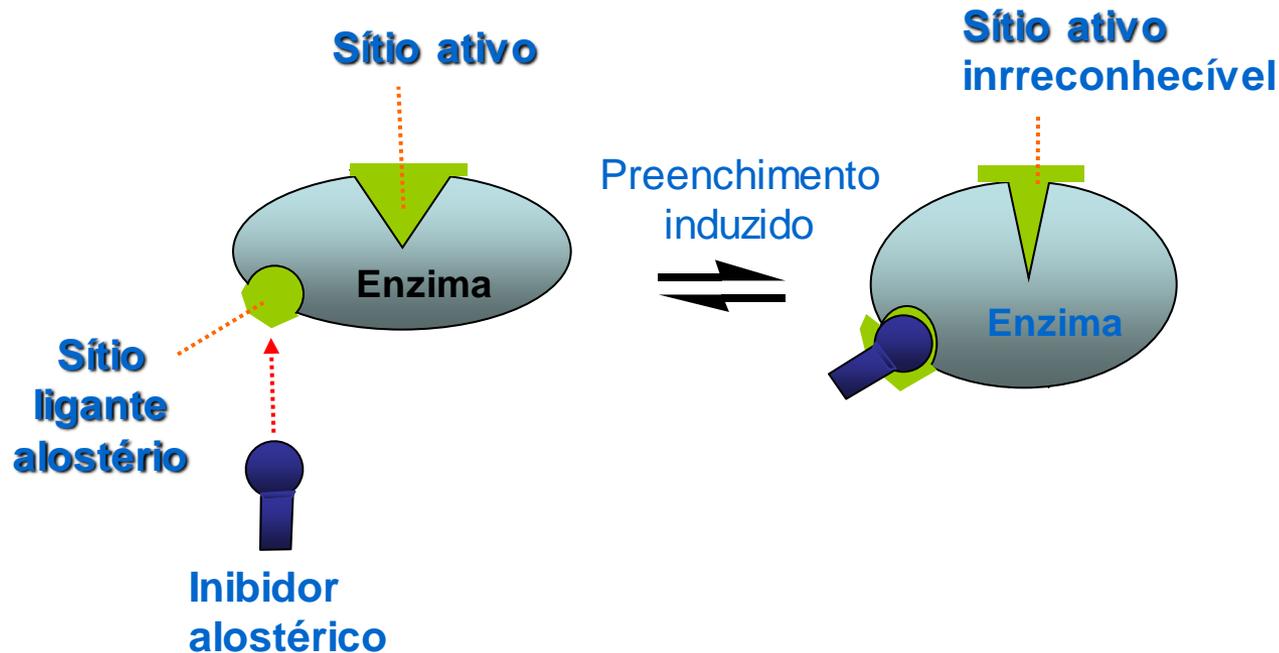
A enzima **fosforilase a** catalisa a quebra de glicogênio (um polímero formado por monômeros de glicose) para formar sub-unidades de glicose-1-fosfato. Esta reação é estimulada pela adenosina-5'-monofosfato (AMP) e inibida pela glicose-1-fosfato.



Assim, níveis elevados de glicose-1-fosfato acabam regulando a quantidade de glicogênio a ser clivado.

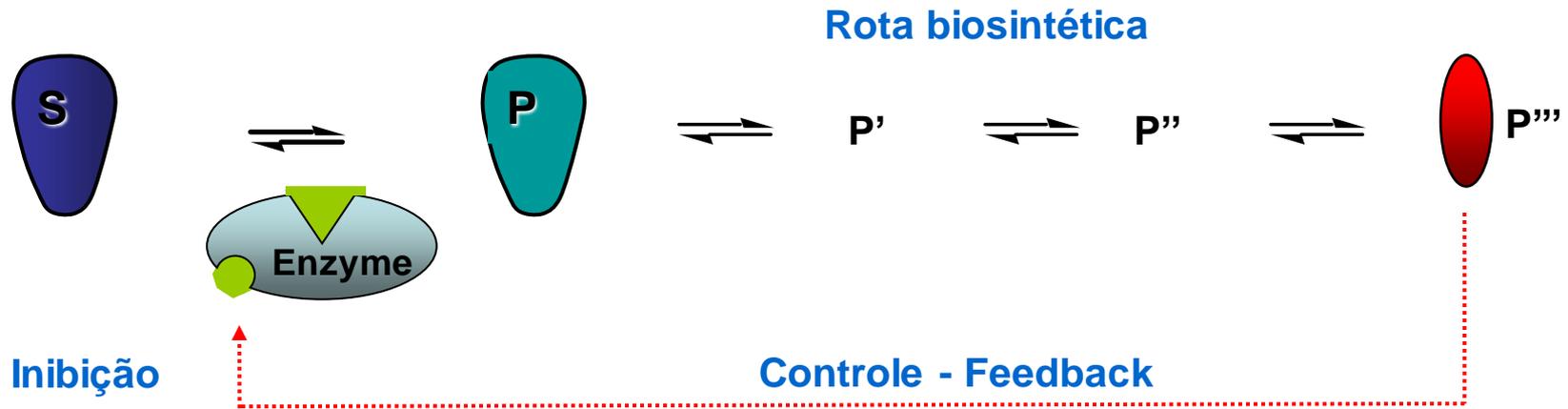
Regulando o funcionamento de enzimas

(sítio alostérico)



- Inibidor liga-se do modo reversível no sítio ligante alostérico
- Ligações intermoleculares são formadas
- Preenchimento induzido altera o formato da enzima
- Sítio ativo é distorcido e não reconhecido pelo substrato
- Aumento da concentração do substrato não reverte a inibição da enzima
- Inibidor não precisa necessariamente ter estrutura similar a do substrato

Regulando o funcionamento de enzimas



Notas

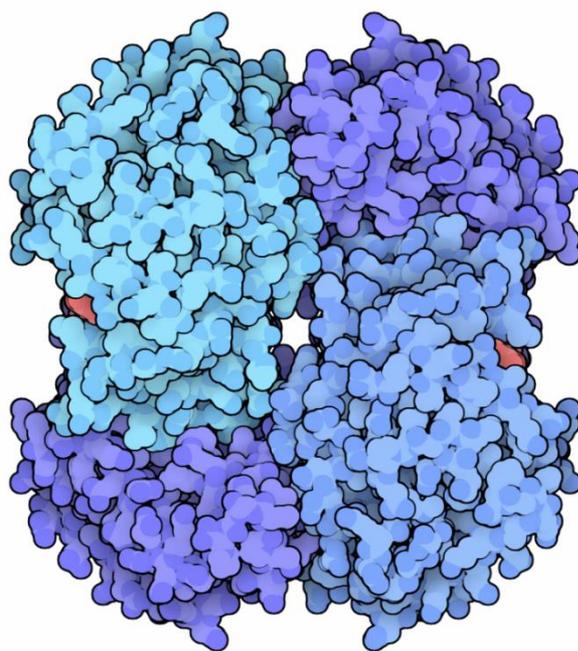
- Enzimas com sítios alostéricos fazem parte, geralmente, do início de uma rota biossintética
- Enzima é controlada pelo produto final a ser formado pela rota que liga-se ao sítio alostérico “desligando” a enzima.

Lactato desidrogenase (LDH)

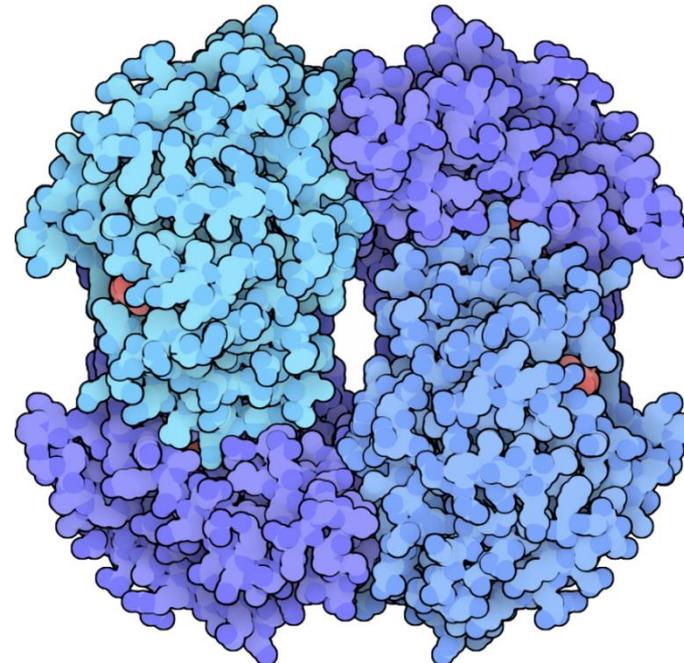
(sítio alósterico)

Algumas bactérias obtém a maior parte de sua energia pela conversão de glicose em lactose. Este proceso é chamado de fermentação. A enzima bacteriana **lactose desidrogenase** mostrada abaixo apresenta um sítio alostérico. A ligação da 1,6-bisfosfato frutose, que é uma molécula formada nos passos iniciais da glicólise, ao sítio alostérico resulta em modificações enzimáticas gerando a forma em que seu sítio ativo encontra-se ativado.

Código
PDB:
1LTH



Forma ativa



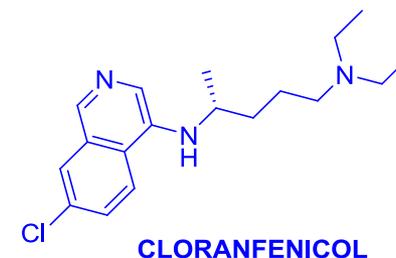
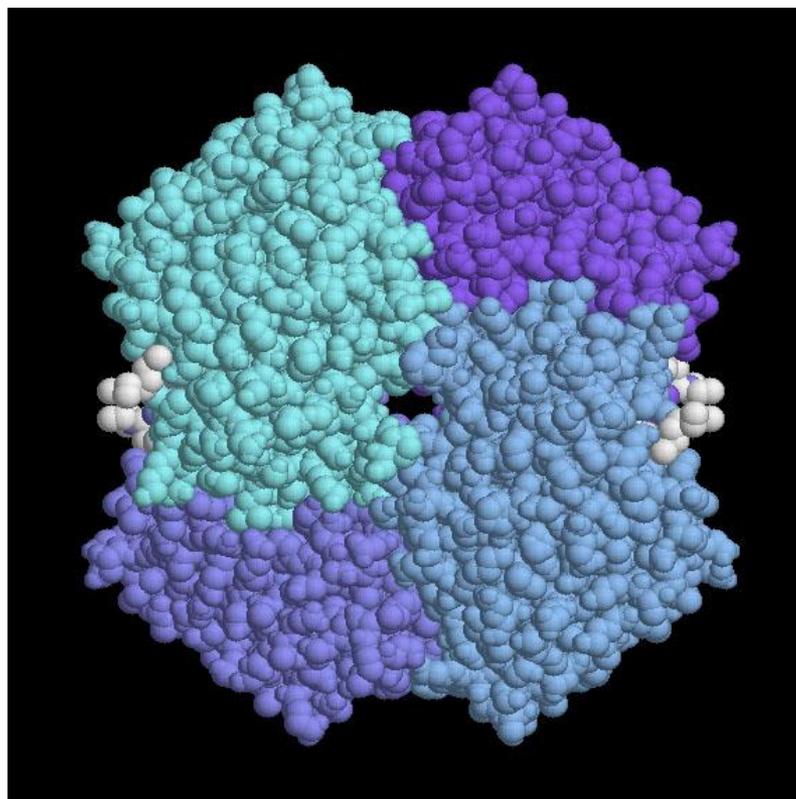
Forma inativa

Lactato desidrogenase (LDH)

(sítio alóstérico)

Acredita-se que o protozoário causador da malária dependa de glicólise para obtenção de energia durante parte do ciclo de infecção.

Código
PDB:
1cet

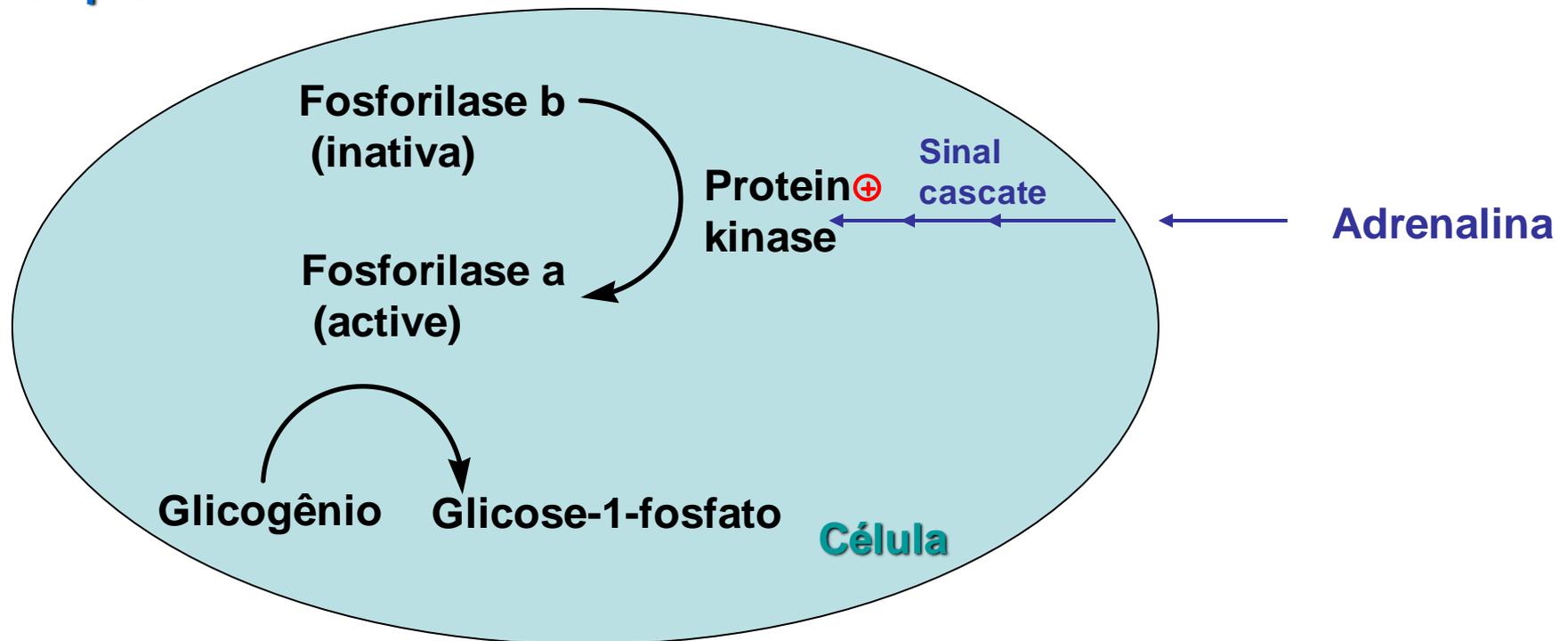


Cloranfenicol liga-se a porção a ser ocupada pela 1,6-bifosfato frutose impedindo a formação alostérica que resulta na forma ativa da enzima.

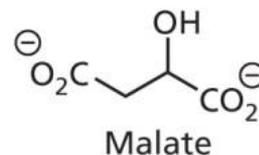
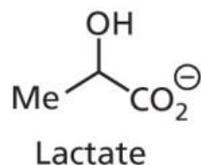
Regulando o funcionamento de enzimas

- Sinais externos podem regular a atividade de enzimas (ex. Neurotransmissores ou hormônios)
- Mensageiros químicos iniciam a cascata de sinalização que ativa enzimas chamadas de proteínas quinases
- Proteínas quinases fosforilam enzimas alvo (ex. ser, tyr, thr) alterando a atividade

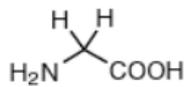
Exemplo



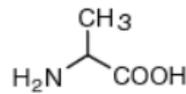
Exercício: Lactato desidrogenase possui uma seletividade 1000 vezes maior por lactato do que malato. Porém, se mutação ocorrer de modo a alterar uma glutamina no sítio ativo por uma arginina (isozimas), a enzima passa a apresentar uma seletividade 10 000 vezes maior por malato que lactato. Como você explicaria essa diferença.



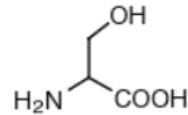
Small



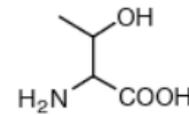
Glycine (Gly, G)
MW: 57.05



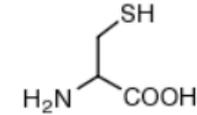
Alanine (Ala, A)
MW: 71.09



Serine (Ser, S)
MW: 87.08, pK_a ~ 16

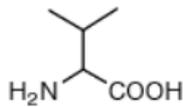


Threonine (Thr, T)
MW: 101.11, pK_a ~ 16

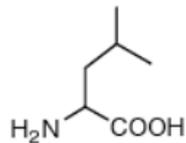


Cysteine (Cys, C)
MW: 103.15, pK_a = 8.35

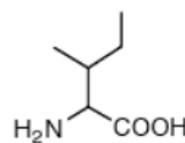
Hydrophobic



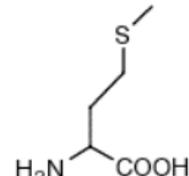
Valine (Val, V)
MW: 99.14



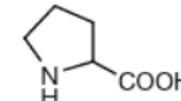
Leucine (Leu, L)
MW: 113.16



Isoleucine (Ile, I)
MW: 113.16

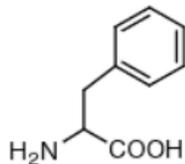


Methionine (Met, M)
MW: 131.19

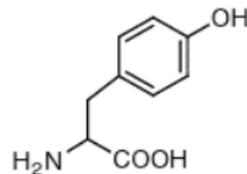


Proline (Pro, P)
MW: 97.12

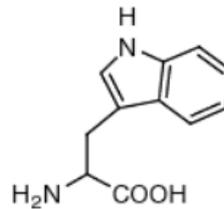
Aromatic



Phenylalanine (Phe, F)
MW: 147.18

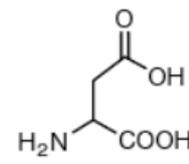


Tyrosine (Tyr, Y)
MW: 163.18

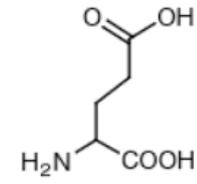


Tryptophan (Trp, W)
MW: 186.21

Acidic

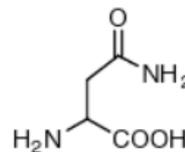


Aspartic Acid (Asp, D)
MW: 115.09, pK_a = 3.9

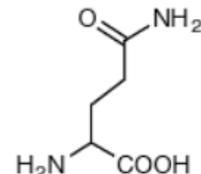


Glutamic Acid (Glu, E)
MW: 129.12, pK_a = 4.07

Amide

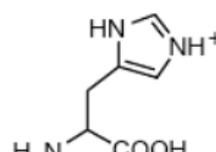


Asparagine (Asn, N)
MW: 114.11

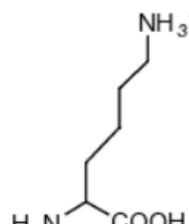


Glutamine (Gln, Q)
MW: 128.14

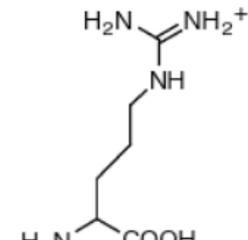
Basic



Histidine (His, H)
MW: 137.14, pK_a = 6.04



Lysine (Lys, K)
MW: 128.17, pK_a = 10.79



Arginine (Arg, R)
MW: 156.19, pK_a = 12.48