
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO
CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

CURSO DE MESTRADO EM FÍSICA BÁSICA

GRUPO FÍSICA TEÓRICA DE BIOMOLÉCULAS E MATERIAIS

INIBIÇÃO ENZIMÁTICA ANALISADA COM UMA
ABORDAGEM DA MECÂNICA ESTATÍSTICA

Autor: Thales Souza Freire*

Orientador: Prof. Dr. Ignez Caracelli

São Carlos-SP

mês / 2018

* Bolsista CNPq

UNIVERSIDADE FEDERAL SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
MESTRADO EM FÍSICA BÁSICA

Thales Souza Freire

INIBIÇÃO ENZIMÁTICA ANALISADA COM UMA
ABORDAGEM DA MECÂNICA ESTATÍSTICA

São Carlos-SP

2018

THALES SOUZA FREIRE

INIBIÇÃO ENZIMÁTICA ANALISADA COM UMA ABORDAGEM DA MECÂNICA
ESTATÍSTICA

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Física da Universidade Fe-
deral De São Carlos, como requisito par-
cial para obtenção do Grau de Mestre.
Área de Concentração: Física Básica.

Orientador: Prof. Dr. IGNEZ CARACELLI

São Carlos-SP

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Física

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Thales Souza Freire, realizada em 21/02/2019:

Profa. Dra. Ignez Caracelli
UFSCar

Prof. Dr. Vivaldo Leiria Campo Júnior
UFSCar

Prof. Dr. Fernando Luis Barroso Silva
USP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Fernando Luis Barroso Silva e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Profa. Dra. Ignez Caracelli

Dedico este trabalho aos meu pais Valdineide e Hildebrando (in memoriam), que com seus ensinamentos me possibilitaram chegar até aqui.

Às minha irmãs, Thálita e Thayse, que sempre estiveram ao meu lado me dando forças. Aos meu tios Edenilto e Ivone por toda ajuda que deram.

À minha namorada Caroline, por me acompanhar nessa jornada, sempre me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A todos aqueles que deram a sua contribuição para a realização deste trabalho, deixo-lhes aqui o meu agradecimento sincero.

À minha família, pelo apoio incondicional que me deram, especialmente ao meu pai por sempre me incentivar e direcionar nos estudos.

À Prof. Dra. Ignez Caracelli, pela orientação, confiança e incentivo desde o início deste trabalho.

Ao grupo BioMat, pelas discussões e correções que melhoraram a qualidade da minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Vivaldo Leiria Campo Junior pelas valiosas sugestões durante conversas.

À minha namorada Caroline, por me dar suporte e ajudar a melhorar meus pontos fracos.

Aos meus amigos e colegas de curso, que me proporcionaram novas ideias durante o decorrer deste trabalho.

Ao DF-UFSCar, pela utilização de sua infraestrutura para a realização deste mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) juntamente com Programa de Pós Graduação em Física (PPGFIS), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Capes por tornar possível acesso aos periódicos, sem o que seria difícil estar em dia com a literatura.

Lista de Figuras

1.1	Diagrama do Estado de Transição	5
1.2	Estado de Transição com catálise	6
1.3	Complexo substrato-enzima	7
1.4	Velocidade de reação: Michaelis-Menten (Bioquímica)	9
1.5	Velocidade da reação: Hill (Bioquímica)	10
1.6	Resumo dos modelos sobre enzimas	15
2.1	Ensemble Grão-Canônico	17
2.2	Rede Cúbica - Potencial Químico	20
3.1	Michaelis-Menten Estados	27
3.2	Modelo KNF	31
3.3	Velocidade da reação em função da concentração relativa de substrato no modelo KNF	35
3.4	Derivada segunda da velocidade de formação de produto em relação à concentração de substrato no modelo KNF	36
3.5	Velocidade da reação em função da concentração relativa de inibidor no modelo KNF	37
3.6	Derivada segunda da velocidade de formação de produto em relação a concentração de inibidor no modelo KNF	38
3.7	Superfície 3D da velocidade da reação para concentração de inibidor e substrato (modelo KNF)	39
3.8	Superfície 3D da velocidade da reação para concentração de inibidor e substrato (modelo KNF)	40
3.9	Curva de $V \times S \times I(3D)$ interação inibidor-substrato (KNF)	42
3.10	Curva de $V \times S \times I(3D)$ interação inibidor-substrato (KNF)	43
3.11	Curva de $V \times S \times I(3D)$ interação inibidor-substrato (KNF)	44
3.12	Modelo MWC	45
3.13	MWC - Curva de nível da velocidade da reação - $[S] \times \gamma_{RT}$	50

3.14	MWC - Gráfico $v \times [S]$	51
3.15	MWC - Curva de nível da velocidade da reação - $[S] \times \gamma_{RT}$	52
3.16	MWC - Gráfico - $v \times [S]$	53
3.17	MWC - Curva de nível da velocidade da reação - $[I] \times \gamma_{RT}$	54
3.18	MWC - Gráfico - $v \times [I]$	55
3.19	MWC - Curva de Nível - Ativação da enzima pelo inibidor	56
3.20	MWC - Velocidades - Ativação da enzima pelo inibidor	57
3.21	$IC_{50} \times [S]$ sem interação cooperativa	61
3.22	$IC_{50} \times [S]$ com interação cooperativa entre pares de substrato	62
3.23	$\partial_{[S]}IC_{50} \times [S]$ com interação cooperativa entre pares de substrato	63
3.24	$IC_{50} \times \Delta\epsilon_I$ com interação cooperativa entre pares de substrato	64
3.25	$IC_{50} \times [S]$ com interação cooperativa entre substrato e inibidor	65
3.26	$\partial_{[S]}IC_{50} \times [S]$ com interação cooperativa entre inibidor e substrato	66
3.27	$IC_{50} \times \gamma_{RT}$ mostrando condições para o efeito alostérico	68
3.28	$IC_{50} \times [S]$ para o modelo MWC	69
3.29	$IC_{50} \times [S]$ para o modelo MWC	70
3.30	Dímero da PFK-1	73
3.31	Modelo dos estados alostéricos R e T da PFK-1	73
3.32	Trasição Alostérica nos Sítios da PFK-1	74
3.33	Dados experimentais para variação de concentração de ATP	76
3.34	Dados experimentais para variação de concentração de F6P	77

Sumário

Agradecimentos	v
Lista de Figuras	viii
Resumo	xi
Abstract	xiii
1 MOTIVAÇÃO TEÓRICA: BIOQUÍMICA ENZIMÁTICA	3
1.1 INTRODUÇÃO	3
1.2 CATÁLISE E INIBIÇÃO	5
1.2.1 Teoria do Estado de Transição	5
1.2.2 Catálise	6
1.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA	8
1.3.1 Modelo de Michaelis-Menten	8
1.3.2 Cooperatividade e Alosteria	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 O ENSEMBLE GRÃ-CANÔNICO	17
2.2 POTENCIAL QUÍMICO EM SOLUÇÕES DILUÍDAS	20
2.3 SIMULAÇÕES	22
3 DISCUSSÃO E RESULTADOS	23
3.1 VELOCIDADE DE CATÁLISE	23
3.1.1 Função de Partição para Estados Discretos	24
3.1.2 Enzima de Michaelis-Menten	26
3.1.3 Modelo Koshland–Nèmethy–Filmer (KNF)	31
3.1.4 Modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC)	45
3.2 EQUAÇÃO DO IC_{50}	59
3.2.1 Enzima de Michaelis-Menten	59

3.2.2	Modelo KNF	59
3.2.3	Modelo MWC	66
3.3	GENERALIZAÇÃO DOS CONCEITOS E APLICAÇÃO	71
3.3.1	Catálise da Frutose pela Fosfofrutoquinase-1	72
4	CONCLUSÃO	79
	Referências Bibliográficas	84
	Apêndice	85
A	APROXIMAÇÃO QUASI-ESTÁTICA	87

Resumo

Na abordagem convencional da Bioquímica, um parâmetro para a descrição do funcionamento de uma enzima é a taxa de conversão de substrato em produto, na presença ou ausência de um inibidor. Outro parâmetro é o IC_{50} , que mede a eficácia de uma substância em inibir uma função biológica ou bioquímica específica. Dadas estas considerações, neste trabalho o foco foi estudar a cinética enzimática a partir da Mecânica Estatística. Neste sentido, partindo de uma aproximação do equilíbrio termodinâmico, foi possível usar o ensemble grã-canônico para deduzir equações para a taxa de formação de produto em reações catalisadas por homodímeros de enzimas. Foi considerada a situação onde pode existir pelo menos duas conformações possíveis para cada enzima, possibilitando assim modelar o efeito cooperativo positivo e negativo com base nas energias dos microestados do sistema. As equações obtidas foram usadas para se obter as curvas de velocidade da reação em função da concentração de substrato e inibidor. Nestas simulações, obteve-se curvas de formato sigmoide esperado para enzimas desse tipo e aplicou-se o modelo para explicar uma situação onde um inibidor gera ativação enzimática. Em seguida, deduziram-se equações para IC_{50} , onde se obteve curvas não lineares em função da concentração de substrato, possibilitando identificar cooperatividade positiva e negativa em gráficos do tipo $IC_{50} \times [S]$. Por fim, o método foi generalizado para enzimas com mais de dois sítios, o que foi exemplificado com um tratamento de caso real, para o qual o modelo produziu um bom ajuste dos dados experimentais.

Palavras-chave: Mecânica Estatística, Cinética Enzimática, Alosteria, Cooperatividade, Inibição Enzimática

Abstract

In the conventional approach of Biochemistry, a parameter for the description of the functioning of an enzyme is the rate of conversion of substrate into product in the presence or absence of an inhibitor. Another parameter is the IC_{50} , which measures the effectiveness of a substance in inhibiting a specific biological or biochemical function. Given these considerations, the aim of this work was to study the enzyme kinetics from Statistical Mechanics point of view. So, starting from an approximation to the thermodynamic equilibrium, it was possible to use the grand canonical ensemble to get equations for the rate of product formation in reactions catalyzed by homodimeric enzymes. It was considered the situation where there could be at least two possible conformations for each monomer, thus enabling modeling of the positive and negative cooperative effects based on the energies of the system micro-states. These equations were used to obtain a reaction rate curve as a function of the concentrations of the substrate and the inhibitor. In these simulations were obtained the expected sigmoid shaped curve for the enzymes of this type and the model was applied to a special situation where an inhibitor causes enzymatic activation. Then, equations for IC_{50} were deduced, where non-linear curves were obtained as a function of substrate concentration, allowing to identify positive and negative cooperativity in plots of $IC_{50} \times [S]$. Finally, the method was generalized for enzymes with more than two binding sites and tested in a real case, giving a good fitting of the experimental data

Keywords: Statistical Mechanics. Enzyme Kinetics, Allostery, Cooperativity, Enzyme Inhibition

Esta dissertação descreve no Capítulo 1 a motivação teórica para tratar, em uma abordagem estatística, um problema bioquímico, com a visão de um físico.

No Capítulo 2 descrevem-se os materiais e métodos. Já no Capítulo 3 inicia-se o tratamento dos modelos da bioquímica com a abordagem da mecânica estatística, onde se aplica o ensemble grão-canônico para tratar de enzimas com dois sítios equivalentes, chegando-se a modelos representativos para inibição deste tipo de enzima. No final deste capítulo os conceitos são generalizados para enzimas com mais de dois sítios e aplicados em um caso real para análise de dados experimentais.

No Capítulo 4 são apresentadas as conclusões.

MOTIVAÇÃO TEÓRICA: BIOQUÍMICA ENZIMÁTICA

Neste Capítulo descrevem-se os fundamentos teóricos necessários ao entendimento do problema tratado nesta dissertação. Inicia-se descrevendo as enzimas, classe de moléculas biológicas com atividade especializada, relacionando os parâmetros bioquímicos utilizados para medir suas funções.

1.1 INTRODUÇÃO

Enzimas são a base de funcionamento da sinalização fisiológica, regulando cada etapa de uma série de reações em cascata pela modificação de moléculas. A sensibilidade desta regulação está relacionada com resposta enzimática a variações de concentração de substrato e/ou inibidor. Respostas fisiológicas como estas dependem de uma característica especial de determinadas enzimas, definida pelos termos cooperatividade e alosteria [1–7].

Algumas destas rotas biológicas podem se tornar hiperativas e gerarem defeitos, como no caso da doença de Alzheimer (DA) onde algumas teorias apontam que a hiperfosforilação da proteína *tau*¹ pela enzima *GSK3 β* causa a destruição do citoesqueleto dos neurônios, prejudicando toda a dinâmica de transporte dos neurotransmissores [8]. Um modo de tratar problemas semelhantes a esse consiste em reduzir a velocidade de catálise de tais enzimas por uso de um inibidor. O parâmetro comumente usado para avaliar a eficácia de um inibidor é o IC_{50} , definido como concentração necessária desta molécula para causar redução de 50% da velocidade de uma reação catalisada por enzimas em relação a esta reação na ausência de inibidor [9, 10].

A Mecânica Estatística tem sido utilizada na Física para descrever o comportamento

¹Proteína estabilizadora do citoesqueleto dos neurônios

de sistemas com um grande número de moléculas. Ela possibilita a conexão entre características microscópicas de um conjunto de partículas e suas propriedades termodinâmicas [11]. Por este motivo sistemas biológicos tem sido uma área de interesse para físicos. Neste sentido é possível citar estudos na área da enzimologia [12], membranas celulares [13, 14] e estudo e modelagem teórica de fármacos [15].

Com base nestas considerações, serão considerados a seguir os principais pontos encontrados na literatura considerados necessários para compreensão dos modelos que são estudados na segunda parte deste trabalho, além de servirem como referência para a discussão de resultados já conhecidos e estudo de novas aplicações da teoria desenvolvida aqui.

1.2 CATÁLISE E INIBIÇÃO

1.2.1 Teoria do Estado de Transição

Para que uma reação química ocorra entre duas moléculas é preciso que se forme um complexo ativo, de maior energia livre que os reagentes, de acordo com a *Teoria do Estado de Transição* (TST²) desenvolvida principalmente por Henry Eyring [1]. Por esta teoria a reação fica representada pela equação



Neste estágio intermediário, o

composto está em seu maior estado energético e, por esse motivo, a reação só ocorre se a energia do choque entre as moléculas for suficiente para a formação desse complexo.

Na TST clássica considera-se que cada reagente está situado em um ponto do plano de fase, com coordenada (q) e momentum (p) para cada molécula. Na formação do complexo ativo os reagentes possuem a mesma coordenada q^\ddagger , de forma que quando $q < q^\ddagger$ existem apenas moléculas de reagentes e para $q > q^\ddagger$ se encontram os produtos da reação [16]. Com esta abordagem é possível calcular o potencial termodinâmico G (Gibbs) para cada intervalo de coordenadas, e com isso calcula-se a variação desse potencial (ou energia livre) ΔG^\ddagger necessária a formação do estado de transição (Figura 1.1). A energia livre entre reagentes e produtos ($\Delta G_{\text{reação}}$) informa se a reação é espontânea ($\Delta G_{\text{reação}} < 0$) ou não ($\Delta G_{\text{reação}} > 0$).

O estado de transição tem duração muito curta da ordem de $10^{-13}s$ a $10^{-14}s$, de forma que a taxa de conversão deste para produtos ou reagentes determinam a taxa geral

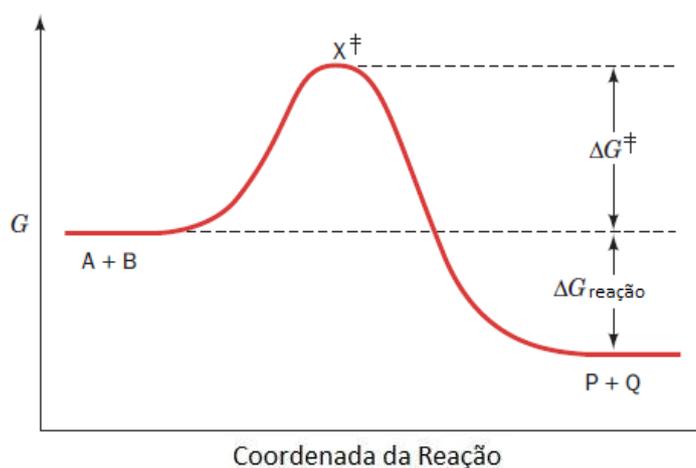


Figura 1.1: Diagrama do estado de transição, mostrando a variação de energia livre ΔG^\ddagger da formação do complexo e da reação $\Delta G_{\text{reação}}$.

Fonte: Figura adaptada da referência [1]

²do inglês *Transition State Theory*

da reação química. No equilíbrio termodinâmico é possível mostrar que a taxa de formação do estado de transição é proporcional a $e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$, onde R é a constante dos gases e T a temperatura absoluta. Assim, quanto maior ΔG^\ddagger mais lenta será a reação, porém o aumento da temperatura tende a aumentar a velocidade da reação.

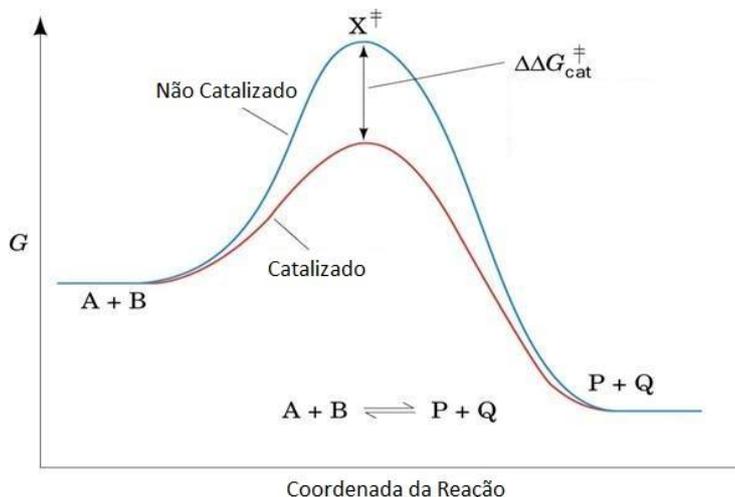


Figura 1.2: Diagrama mostrando a variação de energia livre da reação com e sem catálise.

Fonte: Figura adaptada da referência [1]

a reação reversa na mesma proporção que a direta.

1.2.2 Catálise

A catálise ocorre quando um reagente, classificado como *substrato* da reação catalisada, se ligam ao *sítio ativo* (ou catalítico) da enzima e sofre algum tipo de modificação [1]. Esse encaixe ocorre de forma a promover *interações intermoleculares* (Figura 1.3) complementares estéricas e geométricas entre o substrato e o sítio ativo, tornando a ação enzimática específica de um substrato. Por esse motivo é dito que enzimas são *estereoespecíficas* e *geometricamente específicas*. A primeira característica se deve ao fato de enzimas serem formadas apenas de aminoácidos com isomeria óptica levogira (classificados como L-aminoácidos), de forma que o sítio ativo possui uma assimetria intrínseca e só conseguirá realizar catálise de um isômero óptico específico para uma classe de substratos. Por outro lado, a especificidade geométrica tende a ser menos restritiva do que a estérica, possibilitando que algumas enzimas consigam agir sobre uma variedade de substratos com

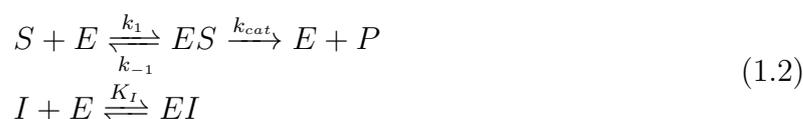
Neste contexto, as enzimas realizam o importante papel de reduzir a barreira de energia livre do complexo ativo e, deste modo, a reação se torna mais rápida e é classificada como *catálise*. A eficiência da catálise é dada por $e^{\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger/RT}$, onde $\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger$ é a diferença entre energia livre da reação catalisada e não catalisada. Por outro lado, a enzima não altera a energia livre entre reagentes de produtos e, dessa forma, facilita

semelhança de grupos químicos a serem catalisados.

Do ponto de vista cinético, a reação de catálise pode ser representada pela Eq. 1.1:



onde S representa o substrato, E a enzima e P o produto. O estado intermediário ES indica que a modificação de S ainda não ocorreu (Figura 1.3 após a seta) e é chamado de *complexo enzima-substrato*. Para reduzir a taxa de formação de produto desta reação é preciso introduzir um *inibidor* no sistema, o qual deve se ligar à enzima sem que ocorra reação. Existem quatro tipos principais de inibição: competitiva, acompetitiva, não-competitiva e mista. No caso da inibição competitiva³ (que é foco deste trabalho), o inibidor se liga ao sítio catalítico da enzima e bloqueia a entrada do substrato (Eq. 1.2):



k_1 , k_{-1} , k_{cat} e K_I são as constantes de formação, dissociação, catálise e inibição, respectivamente.

Em enzimas com mais de um sítio catalítico este tipo de inibição é mais complexa e pode ocorrer fenômenos que alteram significativamente o perfil da catálise, que é o conteúdo da próxima seção.

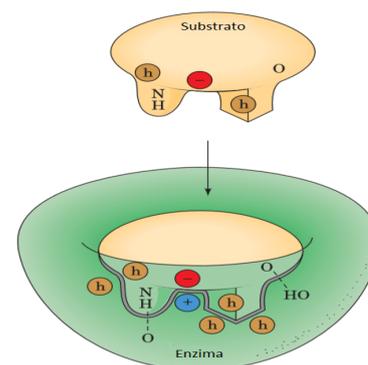


Figura 1.3: Esquema representando o substrato com ligações complementares ao sítio.

Fonte: Figura adaptada da referência [1]

³Para mais detalhes sobre os outros tipos de inibição ver [1,2]

1.3 CINÉTICA ENZIMÁTICA

1.3.1 Modelo de Michaelis-Menten

Na natureza existem enzimas para os mais diversos tipos de reações, levando à ocorrência de várias classes destes catalisadores biológicos. O modelo para a classe mais simples considera que existe apenas uma conformação possível para a enzima durante a catálise, desenvolvido por Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten em 1913 [17, 18]. As equações diferenciais que governam a cinética para essa classe de enzimas representada pela Eq. 1.1 são:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_{cat}[ES] \quad (1.3)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (1.4)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{cat}[ES] \quad (1.5)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES] \quad (1.6)$$

onde $[X]$ indica concentração da variável X .

Quando $[S] \gg [E]$ a concentração de substrato cai lentamente de forma que é possível considerar $[S]$ aproximadamente constante e resolver o sistema de equações. Sendo assim, considere as Eqs. 1.3 e 1.5 para $[S] \gg [E]$ [16]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} [ES] \\ [E] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_{-1} + k_{cat}) & [S]k_1 \\ (k_{-1} + k_{cat}) & -[S]k_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} [ES] \\ [E] \end{pmatrix} \quad (1.7)$$

A Eq. 1.7 possui dois autovalores λ . Para $\lambda = 0$ o sistema tem solução estacionária para o complexo ES , dada por:

$$[ES]_{est} = \frac{[S][E]_o}{[S] + K_M} \quad (1.8)$$

onde se introduz a constante de Michaelis

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

O segundo autovalor dá a solução transiente, que para as condições iniciais $[ES](t = 0) = [P](t = 0) = 0$ e $[E](t = 0) = [E]_o$ a solução transiente para $[ES]$ fica:

$$[ES](t) = \frac{[S][E]_o}{[S] + K_M} (1 - e^{-([S]k_1 + k_{-1} + k_{cat})t}) \quad (1.9)$$

Para um tempo suficientemente grande em relação a $\tau = ([S]k_1 + k_{-1} + k_{cat})^{-1}$ o sistema atinge o estado estacionário, de forma que para τ muito menor do que o tempo mínimo de consumo do substrato (ver Apêndice A) a contribuição para a taxa de formação de produto é predominantemente do estado estacionário.

Devido ao rápido decaimento exponencial (Eq. 1.9) é possível então assumir que será mais provável encontrar o sistema no estado estacionário. Dessa forma:

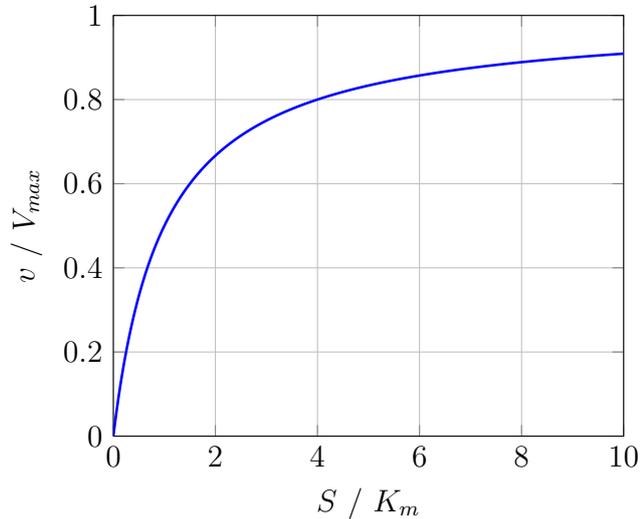


Figura 1.4: Velocidade da reação para o modelo Michaelis-Menten. Não existe ponto de inflexão para enzimas desse tipo e, por consequência, é necessário uma grande variação na concentração de substrato para aumentar a velocidade da reação.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} \frac{[S][ES]_{est}}{K_M} \quad (1.10)$$

Usando o fato de que as enzimas são conservadas no processo de catálise, ou seja $[E]_o = [E]_{tot} = [ES] + [E]$, a Eq. 1.10 se torna:

$$v = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1.11)$$

onde $V_{max} = k_{cat}[E]_{tot}$.

A Figura 1.4 mostra o comportamento da Eq. 1.11. Note que não existe ponto de inflexão na curva, característica principal das enzimas de Michaelis-Menten. Isto implica em baixa sensibilidade do sistema em relação ao aumento da concentração de substrato, medida à partir da relação [2]

$$R_S = \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}}, \quad (1.12)$$

onde $v([S]_{0,1}) = 0,1V_{max}$ e, analogamente, $v([S]_{0,9}) = 0,9V_{max}$.

1.3.2 Cooperatividade e Alosteria

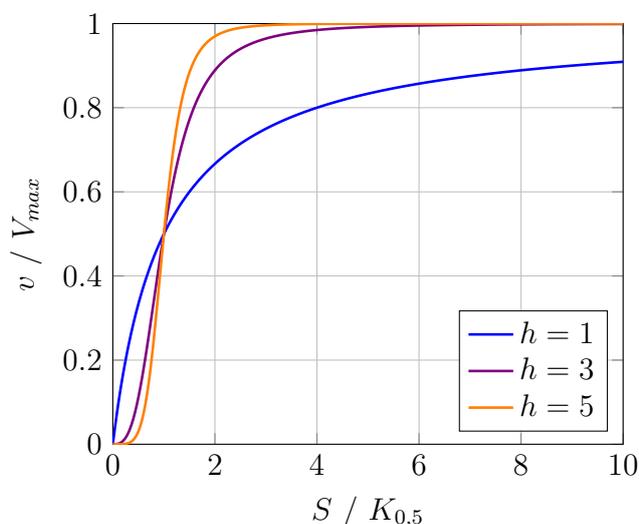


Figura 1.5: Velocidade relativa da reação segundo a equação de Hill. Para valores de $h > 1$ existe ponto de inflexão para a curva, o que torna a catálise mais sensível a variações de concentração do substrato no intervalo de $0,1V_{max}$ a $0,9V_{max}$ [2].

a:

Enzimas que se comportam segundo a cinética de Michaelis-Menten apresentam $R_S = 81$ (calculado a partir da Eq. 1.11). Isto significa que é preciso um aumento de 81 vezes da concentração de substrato para causar uma variação de velocidade 10% para 90% da velocidade máxima da reação. Porém existem enzimas com $R_S < 81$ e formato sigmóide da curva de velocidade de reação (Figura 1.5), fazendo surgir a necessidade de uma nova teoria cinética. A primeira tentativa de descrição destes fenômenos foi realizada por Archibald Vivian Hill em 1910 para explicar o comportamento da hemoglobina [19], onde se propôs uma equação semelhante

$$v = V_{max} \frac{[S]^h}{K_{0,5}^h + [S]^h} \quad (1.13)$$

A Eq. 1.13 trata apenas de uma modificação empírica da Eq. 1.11 para ajustar dados experimentais da forma apresentada na Figura 1.5, sem significado microscópico para o fator h . Porém, já se tinha a informação de que algumas enzimas oligoméricas apresentavam taxa de formação de produto sigmoidal e, por isso, cunhou-se o termo *cooperatividade* para descrever um efeito de cooperação entre os sítios catalíticos [2].

Modelo de Pauling

O desenvolvimento de modelos para cooperatividade assumem que a ligação de uma molécula ao sítio ativo está em equilíbrio [2]. Com base nestas ideias, Linus Pauling em 1935 publicou uma interpretação estrutural para a ligação em equilíbrio do oxigênio ao grupo heme da hemoglobina [20]. Trazendo as ideias de Pauling para a cinética de uma enzima⁴ com dois sítios equivalentes, é possível propor a seguinte equação para a taxa de formação de produto:

$$v = V_{max} \frac{K[S] + \alpha(K[S])^2}{1 + 2K[S] + \alpha(K[S])^2} \quad (1.14)$$

onde K é a constante de equilíbrio da formação do complexo relacionada à energia livre, definida como $K = e^{\Delta G_{ligação}/RT}$, e α é uma constante definida de forma similar a K para energia livre adicional relacionada estabilização da interação dos dois sítios ($\alpha = e^{\Delta G_{interação}/RT}$). Tal interação indireta foi posteriormente chamada de *efeito alostérico* no trabalho publicado MONOD, CHANGEUX e JACOB em 1963 [6].

Este tratamento mostra uma boa concordância com os dados experimentais, como mostrado por Pauling para o caso da hemoglobina, porém não explicita informações sobre modificações na estrutura da enzima e apenas introduz constantes macroscópicas para modelar o efeito cooperativo.

⁴Neste e nos próximos modelos descritos nesta seção será considerado que a constante de catálise K_{cat} não sofre alteração com o efeito cooperativo. No próximo capítulo isso será levado em consideração.

Modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC)

Em 1965 Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux desenvolvem um modelo onde assumem que as interações indiretas entre sítios de ligação em proteínas, assim como ocorre na hemoglobina, devem ser mediados por algum tipo de transição molecular⁵, definida como *transição alostérica* [21]. Esta modificação é induzida ou estabilizada na proteína quando esta se liga à um *ligante alostérico*.

Para facilitar o entendimento do modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC) considera-se o caso de enzimas formadas por subunidades equivalentes (*homodímeros*), onde cada subunidade possui apenas um sítio ativo. Para tal enzima existem dois (pelo menos dois) estados alostéricos para os quais a simetria do dímero é mantida quando o sítio ativo é ocupado. Cada estado tem configurações geométricas e/ou de distribuição de cargas distintas nas suas cadeias de aminoácidos, de forma que a afinidade do substrato é diferente para cada estado. A enzima existe em equilíbrio entre os estados R e T segundo a constante L :



Para o substrato S existem duas constantes de dissociação: K_R e K_T , relacionadas à ligação do substrato a um dos dois sítios do estado R e T , respectivamente. Neste modelo os sítios de cada estado são independentes. Segue desses argumentos⁶ que:

$$v = V_{max} \frac{Lc\alpha'(1 + c\alpha') + \alpha'(1 + \alpha')}{L(1 + c\alpha')^2 + (1 + \alpha')^2} \quad (1.16)$$

onde $\alpha' = \frac{[S]}{K_R}$; $c = \frac{K_R}{K_T}$

Diferente das considerações de Pauling, no modelo MWC não se faz ligação das constantes com energia livre do sistema, porém é possível estabelecer uma relação entre a constante L e a energia livre da transição de um estado para o outro. Mais adiante será

⁵Também conhecido como *Modelo Concertado*

⁶Ver mais detalhes dos cálculos na referência [21]

desenvolvida uma equação semelhante à 1.16 que leva em consideração estados de energia no ensemble grão-canônico.

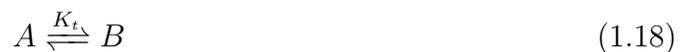
Modelo Koshland–Nèmethy–Filmer (KNF)

Partindo das ideias dos modelos de Pauling e do MWC, em 1965, D. E. Koshland, Jr., G. Nèmethy, e D. Filmer apresentaram um modelo teórico onde apenas as subunidades ocupadas por um ligante sofrem uma transição alostérica de um estado (A) para um novo estado (B) [22]. Dessa forma, diferentemente do modelo MWC, a transição ocorre de forma sequencial⁷ e dependente da ocupação dos sítios.

Os autores definem as seguintes constantes:

$$K_s = \frac{[BS]}{[B][S]}; \quad K_t = \frac{[B]}{[A]},$$

as quais estão relacionadas com as seguintes equações de equilíbrio:



As interações entre subunidades vizinhas são dadas pelas constantes K_{AA} , K_{AB} e K_{BB} , onde o subscrito indica o par interagente. Tomando interações AA como referencial, as constantes de interação ficam definidas da seguinte forma:

$$K_{AA} = 1; \quad K_{AB} = \frac{[AB][A]}{[AA][B]}; \quad K_{BB} = \frac{[BB][A][A]}{[AA][B][B]}$$

Como quantidades estequiométricas de cada estado nas constantes de interação são iguais no numerador e no denominador, caso se tenha, por exemplo, $K_{BB} > 1$ isto significa que a interação entre os vizinhos BB tende a estabilizar mais este estado com relação ao referencial AA .

⁷E por esse motivo chamado de *Modelo Sequencial* pelos próprios autores

Aplicando estas definições para homodímeros de enzimas é possível mostrar que a velocidade de formação de produto é dado por⁸:

$$v = V_{max} \frac{K_{AB}K_sK_t[S] + K_{BB}(K_sK_t[S])^2}{1 + 2K_{AB}K_sK_t[S] + K_{BB}(K_sK_t[S])^2} \quad (1.19)$$

⁸Ver mais detalhes dos cálculos na referência [22]

Resumo do modelos

A Figura 1.6 apresenta um resumo dos três principais modelos que serão tratados no Capítulo 3 e serve como guia de comparação entre eles.

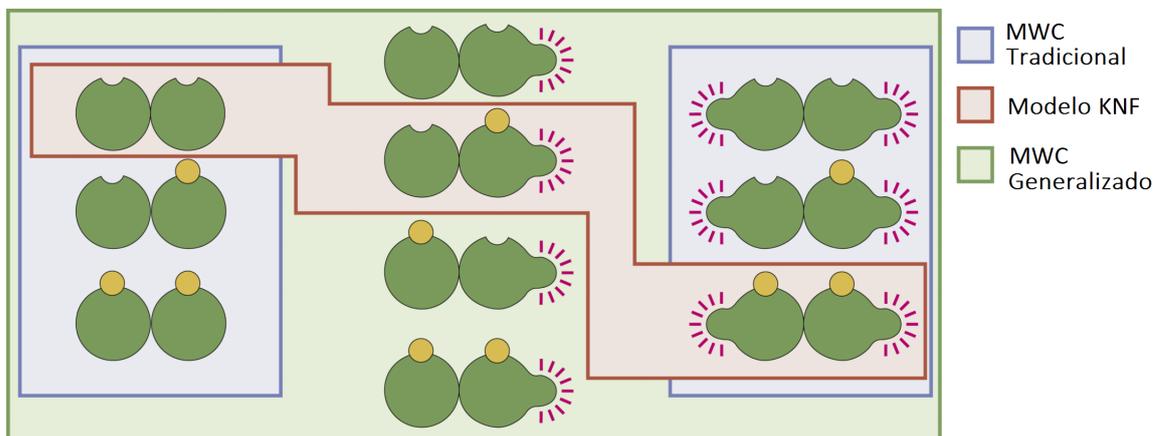


Figura 1.6: Diagrama mostrando um resumo dos principais modelos para tratar a cinética enzimática. Neste diagrama destacado em azul tem-se o modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC) e em vermelho o modelo Koshland-Némethy-Filmer (KNF). É possível desenvolver um modelo generalizado fazendo uma combinação de todos esses, como mostrado no diagrama.

Fonte: Figura adaptada da referência [23]

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste Capítulo inicia-se a descrição da abordagem estatística para a descrição dos processos enzimáticos. Ao final chega-se às equações generalizadas que serão posteriormente aplicadas para descrever o funcionamento de enzimas com dois sítios equivalentes.

2.1 O ENSEMBLE GRÃ-CANÔNICO

Em um experimento com enzima, substrato e inibidor é possível imaginar o sistema fechado como sendo constituído de duas porções: um reservatório térmico e de partículas (inibidor e substrato) e um sistema (enzima, substrato e inibidor) permeável apenas à troca de calor e partículas. Para isso, deve existir a seguinte relação entre as partículas: $N_{enzima} \ll \{N_{inibidor}, N_{substrato}\}$, com $N_{particula} \sim mol$.

No caso geral, considera-se um sistema composto por n tipos de partículas distintas (excluindo as enzimas) em contato com um reservatório de mesma configuração. Se o sistema é permeável à troca de partículas e energia térmica existe as seguintes equações de vínculo [11]:

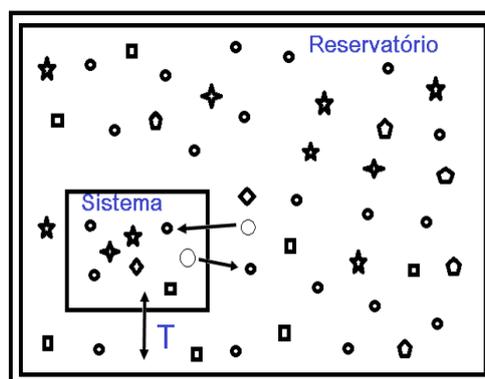


Figura 2.1: Esquema representando o ensemble grã-canônico para uma mistura de partículas

$$\begin{cases} E = E_s + E_r \\ N_i = N_{si} + N_{ri}, \quad i = 1, 2, \dots, n \end{cases} \quad (2.1)$$

onde o subscrito s indica a variável do sistema e r a do reservatório. Por definição, o reservatório é muito maior que o sistema. Assim devem valer as seguintes relações: $E_r \gg E_s$ e $N_{ri} \gg N_{si}$.

Devido aos vínculos, a probabilidade de um estado k do sistema é proporcional ao número de microestados do reservatório:

$$p_k(E_s^k, N_{s1}^k, \dots, N_{sn}^k) = C W_r(E_r^k, N_{r1}^k, \dots, N_{rn}^k) \quad (2.2)$$

Aplicando logaritmo natural na Eq. 2.2 e usando a Eq. 2.1, obtém-se

$$\ln p_k(E_s^k, N_{s1}^k, \dots, N_{sn}^k) = Cte + \ln W_r(E - E_s^k, N_1 - N_{s1}^k, \dots, N_n - N_{sn}^k) \quad (2.3)$$

Devido as relações entre as energias do sistema e reservatório é possível usar Série de Taylor para expandir o termo $\ln W_r$ em torno de $(E_s^k, N_s^k) = 0$:

$$\ln p_k(E_s^k, N_{s1}^k, \dots, N_{sn}^k) = Cte + (-E_s^k) \frac{\partial \ln W_r}{\partial E_r^k} \Big|_{V, N_{r1}, \dots, N_{rn}} + \sum_{i=1}^n (-N_{si}^k) \frac{\partial \ln W_r}{\partial N_{ri}^k} \Big|_{V, E_s^k, N_{rj} (j \neq i)} \quad (2.4)$$

Com uso da equação de Boltzman $S = k_B T \ln W$ identifica-se na Eq 2.4 as relações termodinâmicas:

$$\frac{\partial S_r}{\partial E_r} = \frac{1}{T_r} \quad ; \quad \frac{\partial S_r}{\partial N_{ri}} = \frac{\mu_{ri}}{T_r} \quad (2.5)$$

Como $T_r = T_s = T$ e $\mu_{si} = \mu_{ri} = \mu_i$, das Eqs. 2.4 e 2.5 tem-se:

$$p_k = Cte \exp \left[-\beta \left(E_s^k - \sum_{i=1}^n \mu_i N_{si}^k \right) \right] \quad (2.6)$$

Aplicando a condição de normalização na equação anterior, obtém-se

$$\sum_k p_k = Cte \sum_k \exp \left[-\beta \left(E_s^k - \sum_{i=1}^n \mu_i N_{si}^k \right) \right] = 1, \quad (2.7)$$

onde o inverso da constante Cte de normalização é definida como a função de partição do sistema

$$Q_G = \sum_k \exp \left[-\beta \left(E_s^k - \sum_{i=1}^n \mu_i N_{si}^k \right) \right]. \quad (2.8)$$

Como aparece apenas variáveis do sistema a notação será simplificada por: $E_s^k \rightarrow E_R$, $\mu_{si} \rightarrow \mu_i$ e $N_{si}^k \rightarrow N_{Ri}$.

No caso em que a energia de cada tipo de partícula é independente das demais, ou seja, a interação entre elas é desprezível, a energia do estado R e o seu peso ficam escritos como:

$$p_R = \frac{1}{Q_G} e^{-\beta E_R} \prod_{i=1}^n e^{\beta N_{Ri} \mu_i} \quad (2.9)$$

$$Q_G = \sum_R e^{-\beta E_R} \prod_{i=1}^n e^{-\beta N_{Ri} \mu_i} \quad (2.10)$$

As Eqs. 2.9 e 2.10 são versões generalizadas para o ensemble grão-canônico e serão usadas na modelagem da catálise enzimática.

A importância desta seção e da próxima é de explicitar em quais condições se pode usar o modelo que será desenvolvido a seguir, como a relação entre as concentrações de moléculas de soluto e solvente além das condições de reservatório de partículas e temperatura.

2.2 POTENCIAL QUÍMICO EM SOLUÇÕES DILUÍDAS

Uma solução diluída será definida aqui da seguinte forma: o número de moléculas de água (N_A) é muito maior do que a soma do número de moléculas dos solutos ($N_A \gg \sum N_i$) de modo que as partículas de soluto se comportam como um gás ideal. A partir desta definição é possível usar o modelo da rede cúbica [3], onde o volume total do sistema será transformado em uma rede cúbica. Cada cubo da rede será ocupado por uma molécula com energia μ_o e ϵ_i para cada molécula de água e soluto, respectivamente (Figura 2.2). Este sistema (na condição de ensemble microcanônico) assume um número de micro-estados dado pela combinatória das partículas na rede (Eq. 2.11) [3, 11]:

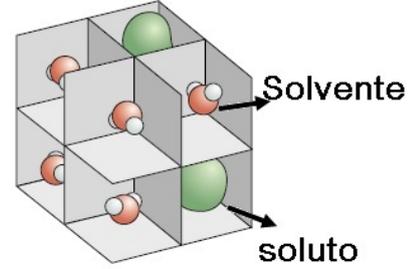


Figura 2.2: Representação esquemática do modelo da rede cúbica (Fonte: [3])

$$W = \frac{(N_{H_2O} + N_1 + \dots + N_n)!}{N_{H_2O}! N_1! \dots N_n!} \quad (2.11)$$

Usando a equação de Boltzman para a entropia obtém-se (Eq 2.12):

$$S = k_B \left\{ \ln \left[\left(N_{H_2O} + \sum_{i=1}^n N_i \right)! \right] - \ln(N_{H_2O}!) - \sum_{i=1}^n \ln(N_i!) \right\} \quad (2.12)$$

Em experimentos de atividade e inibição de enzimas as concentrações típicas usadas são da ordem de nM e μM [8], assim pode-se estimar que: $N_i \sim 10^{14} - 10^{17}$, $N_{H_2O} \sim 10^{20} - 10^{23}$. Neste caso o número de partículas é grande o suficiente para se usar a aproximação de Stirling de primeira ordem (Eq.2.13) [24]:

$$\ln(M!) \simeq M \ln M - M \quad (2.13)$$

Usando a Eq. 2.13 na Eq. 2.12, obtém-se:

$$S \simeq k_B \left\{ \sum_{i=1}^n N_i + \sum_{i=1}^n N_i \ln \left(\frac{N_{H_2O}}{N_i} \right) + \frac{1}{N_{H_2O}} \left[\sum_{i=1}^n N_i \right]^2 \right\} \quad (2.14)$$

Comparando os termos desta equação através das estimativas feitas anteriormente, o termo quadrático terá uma contribuição na sexta casa decimal e pode ser desprezado para a maioria dos experimentos em bioquímica. Com isso, a Eq. 2.14 se reduz a:

$$S \simeq \sum_{i=1}^n k_B N_i \left[1 + \ln \left(\frac{N_{H_2O}}{N_i} \right) \right] \quad (2.15)$$

A partir disso é possível calcular o potencial de Helmholtz do sistema [11]:

$$F = N_{H_2O} \mu_o + \sum_{n=1}^n N_i \epsilon_i^0 - TS \quad (2.16)$$

Substituindo a Eq. 2.15 na Eq. 2.16 e usando a definição do potencial químico,

$$\mu_i \equiv \left. \frac{\partial F}{\partial N_i} \right)_{T, V, N_1, \dots, N_{i-1}, N_{i+1}, \dots, N_n},$$

conclui-se que:

$$\mu_i = \epsilon_i^0 + k_B T \ln \left(\frac{C_i}{C_{H_2O}} \right), \text{ onde } C_j = \frac{N_j}{V} \quad (2.17)$$

Este resultado será usado nos próximos tópicos para explicitar a relação do potencial químico com a energia do ligante em solução e das respectivas concentrações.

2.3 SIMULAÇÕES

Para a realização das simulações e construção de figuras e gráficos foram usados o Gnuplot [25] juntamente com o pacote PGFPlots¹ em um script LaTeX. Para cálculos de autovalores e autovetores na solução de sistemas de equações diferenciais e manipulação algébrica de expressões foi usado MATLAB².

¹<http://sourceforge.net/projects/pgfplots/>

²<https://www.mathworks.com>

DISCUSSÃO E RESULTADOS

Neste Capítulo, utilizando a abordagem estatística, e com os resultados obtidos anteriormente, descritos no Capítulo 2, realiza-se um estudo de aplicação ao caso de enzimas diméricas. Na última seção os conceitos são generalizados para caso de enzimas com mais sítios, incluindo sítios alostéricos, na qual se aplica a teoria a dados experimentais da catálise realizada pela Fosfofrutoquinase-1.

3.1 VELOCIDADE DE CATÁLISE

Como foi tratado anteriormente, a atividade de uma enzima está relacionada com a velocidade da reação. Isto implica em calcular a velocidade de formação de produto, ou mais especificamente a taxa de variação temporal da concentração de produto [1]. Por este motivo a catálise enzimática constitui um processo fora do equilíbrio e ao invés de calcular função de partição do sistema seria necessário utilizar funções de correlação temporal [26]. Porém para a situação em que a concentração de substrato (e/ou inibidor) é muito maior do que a concentração de enzimas, a formação de produto ocorre em uma taxa muito lenta em comparação com a velocidade formação do complexo enzima-substrato [27]. Por consequência, para intervalos de tempos suficientemente curtos a concentração de substrato se manterá muito maior do que a concentração de enzimas no meio (pois a formação de produto implica numa igual redução de substrato do sistema).

Isso possibilita separar as escalas de tempo do sistema em interna τ_{in} (tempo de formação do complexo) e externa τ_{ex} (velocidade da reação). Sendo $\tau_{ex} \gg \tau_{in}$ segue-se o princípio da aproximação adiabática [28]: resolve-se a porção do sistema de menor escala de tempo sem a perturbação externa e posteriormente se usa a solução para estudar o comportamento externo. Este procedimento se assemelha à aproximação estacionária usada Briggs e Haldane [27], que pode ser visto com mais detalhes no Apêndice A.

Antes de tratar da dedução das equações de velocidade de formação de produto para cada modelo, será introduzido uma notação matricial para estruturar o cálculo analítico da função de partição.

3.1.1 Função de Partição para Estados Discretos

Nos modelos apresentados nas próximas seções, o cálculo da energia de um dado estado K do sistema segue um padrão de multiplicação de matrizes, onde é possível agrupar as energias envolvidas em um vetor (matriz coluna), e a informação do número de sítios ocupados em um operador (matriz linha). Com esta notação, a forma genérica da energia E_K de um estado K é dada por:

$$E_K = \mathbf{u}^t \mathbf{N} \boldsymbol{\epsilon}. \quad (3.1)$$

Onde E_K é um escalar, \mathbf{u} é uma matriz coluna, \mathbf{N} uma matriz quadrada, $\boldsymbol{\epsilon}$ uma matriz coluna e \mathbf{u}^t é vetor transposto de \mathbf{u} . Para este trabalho será suficiente que \mathbf{u} seja um vetor composto por três componentes binárias, obedecendo as relações abaixo:

$$\mathbf{u} = \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

$$u_1 = \begin{cases} 1, \text{ se existem sítios catalíticos} \\ 0, \text{ se não existem sítios catalíticos} \end{cases}$$

$$u_2 = \begin{cases} 1, \text{ para sítios catalíticos interagentes} \\ 0, \text{ para sítios catalíticos independentes} \end{cases}$$

$$u_3 = \begin{cases} 1, \text{ se existem formas alostérica}^1 \\ 0, \text{ se existe apenas uma conformação alostérica} \end{cases}$$

A componente u_1 foi definida de forma genérica apenas para mostrar qual característica ela representa para a molécula em questão, porém como se trata de uma enzima apenas

¹Aqui a existência de formas alostéricas diz respeito ao caso do modelo MWC

o valor $u_1 = 1$ é possível. Para as demais componentes deve se analisar cada caso (exemplo: o modelo de Michaelis-Menten requer $u_2 = u_3 = 0$), como será feito em 3.1.2, 3.1.3 e 3.1.4. Definir \mathbf{u} desta forma permite escrever a matriz \mathbf{N} e o vetor $\boldsymbol{\epsilon}$ independente do modelo em questão, pois \mathbf{u} irá escolher quais termos aparecerão na expressão de E_K .

\mathbf{N} será uma matriz bloco diagonal² que contém a informação sobre a ocupação dos sítios, por meio das variáveis de estado σ (definidas nas próximas seções). Esta matriz fica escrita como:

$$\mathbf{N} = \text{diag}(\mathbf{N}_1, \mathbf{N}_2, \mathbf{N}_3) = \begin{pmatrix} \mathbf{N}_1 & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{N}_2 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{N}_3 \end{pmatrix} \quad (3.3)$$

ou de outra forma, usando o operador soma direta³:

$$\mathbf{N} = \bigoplus_{i=1}^3 \mathbf{N}_i = \mathbf{N}_1 \oplus \mathbf{N}_2 \oplus \mathbf{N}_3 \quad (3.4)$$

A matriz \mathbf{N} será definida aqui como *operador número de sítios*, pois está relacionada com o número de sítios catalíticos possíveis no sistema de enzimas a ser tratado.

As componentes \mathbf{N}_i são matrizes e seguem uma definição equivalente a das componentes u_i : \mathbf{N}_1 é o operador relativo ocupação dos sítios, \mathbf{N}_2 opera sobre a interação entre sítios catalíticos e \mathbf{N}_3 sobre as formas alostéricas. Esta sequência também é seguida pelo vetor $\boldsymbol{\epsilon}$:

$$\boldsymbol{\epsilon} = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\epsilon}_1 \\ \boldsymbol{\epsilon}_2 \\ \boldsymbol{\epsilon}_3 \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

onde $\boldsymbol{\epsilon}_1$ é o vetor energia potencial da interação de uma molécula com o sítio ativo da enzima, $\boldsymbol{\epsilon}_2$ o vetor das energias de interação cooperativa e $\boldsymbol{\epsilon}_3$ da energia dos estados alostéricos de uma enzima. Neste mesmo sentido pode se definir o vetor potencial químico:

²Segundo a definição de matriz bloco diagonal encontrada na referência [29]

³Definição de operador soma direta retirada da referência [30]

$$\boldsymbol{\mu} = \begin{pmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

As componentes de $\boldsymbol{\mu}$ estão relacionadas com a solução do sistema e não serão afetadas por fatores que dizem respeito a características específicas da enzima, como no caso das interações cooperativas e alosteria. Como $\boldsymbol{\mu}$ deve ser compatível com a definição de $\boldsymbol{\epsilon}$, conclui-se que

$$\mu_2 = \mu_3 = 0.$$

Com isso, o escalar $N_K \boldsymbol{\mu}$ da função de partição será gerado por $\mathbf{u}^t \mathbf{N} \boldsymbol{\mu}$, levando à seguinte forma geral:

$$E_K - N_K \boldsymbol{\mu} = \mathbf{u}^t \mathbf{N} (\boldsymbol{\epsilon} - \boldsymbol{\mu}) \quad (3.7)$$

As próximas seções mostrarão a utilidade desta notação.

3.1.2 Enzima de Michaelis-Menten

Ao separar as escalas temporais, é possível assumir dois estados de equilíbrio para a porção do sistema de menor escala. Estes estados são o de uma *molécula de tipo l em solução* (onde $l = S$ ou I , sendo S moléculas de substrato e I para inibidor) e *ligada em um dos sítios catalíticos* (complexo enzimático). Usando o ensemble grão-canônico, o estado zero de energia será o da molécula em solução, e para o complexo define-se um estado de energia ϵ_l [3].

Para a enzima de Michaelis-Menten existe apenas uma conformação possível, de modo que em um homodímero com um sítio catalítico por monômero as moléculas se ligarão a cada sítio de forma independente. Se $l = S$ ou I , os possíveis estados para uma enzima são (Figura 3.1):

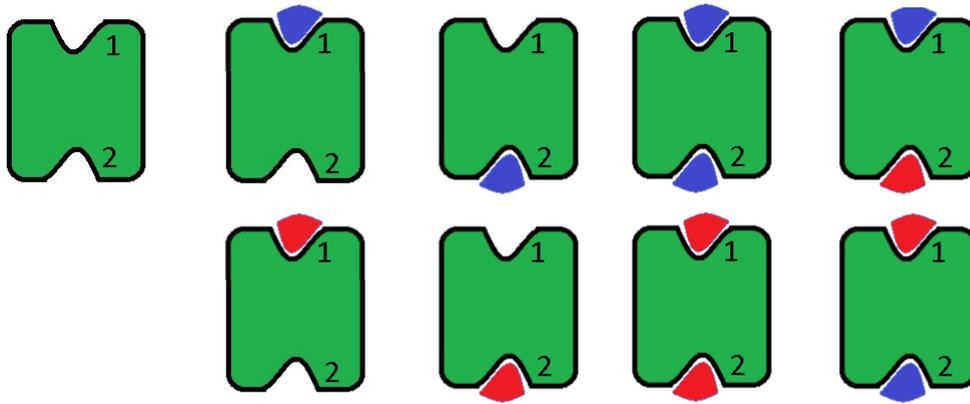


Figura 3.1: Representação esquemática dos estados possíveis para um homodímero de Michaelis-Menten

Na Figura 3.1 a enzima está representada em verde, com os sítios numerados (1 e 2), o substrato (S) em azul e o inibidor (I) em vermelho. Estes estados surgem analiticamente utilizando variáveis de estado: $\sigma_{jl} = 0$ ou 1 ($j = 1$ ou 2), para o sítio j desocupado ou ocupado, respectivamente. O índice l indica o tipo de molécula que irá se ligar ao sítio ativo da enzima e, por consequência, o número de linhas da matriz \mathbf{N}_1^l . A dinâmica de tais enzimas implica em um vetor \mathbf{u} com componentes relativas à interação cooperativa e alosteria nulas:

$$\mathbf{u} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

Devido a ação do vetor \mathbf{u} sobre a matriz \mathbf{N} , as únicas componentes relevantes serão \mathbf{N}_1 e \mathbf{e}_1 (as demais componentes desaparecerão). É importante comentar que definir primeiramente o vetor \mathbf{u} facilita os cálculos, porém é possível fazer $u_1 = u_2 = u_3 = 1$ e definir as componentes \mathbf{N}_2 , \mathbf{N}_3 , \mathbf{e}_2 , \mathbf{e}_3 adequadamente segundo as condições iniciais do problema.

Escolhendo a situação de inibição competitiva, o índice l pode assumir dois valores: S para moléculas de substrato e I para inibidor. Pelas variáveis σ_{jl} , a matriz de estado de ocupação dos sítios fica:

$$\mathbf{N}_1^t = \sum_{j=1}^2 \begin{pmatrix} \sigma_{jS} \\ \sigma_{jI} \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

Considere a situação na qual um sítio não pode ser ocupado por duas moléculas ao mesmo tempo (ou dois tipos de moléculas diferentes), como mostrado na Figura 3.1. Esta restrição é dada matematicamente para o sítio j pela expressão $\sigma_{jS} + \sigma_{jI} < 2$. Nesta situação, as moléculas do mesmo tipo se ligarão com potenciais iguais para os dois sítios. Sendo assim, os vetores $\boldsymbol{\epsilon}_1$ e $\boldsymbol{\mu}_1$ serão:

$$\boldsymbol{\epsilon}_1 = \begin{pmatrix} \epsilon_S \\ \epsilon_I \end{pmatrix} \quad \boldsymbol{\mu}_1 = \begin{pmatrix} \mu_S \\ \mu_I \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

O método desenvolvido na seção anterior considera apenas uma enzima, porém os níveis de energia são sempre os mesmos independentes da enzima em questão. Assim a função de partição do sistema de n enzimas se fatoriza em produtos das funções de partição de cada enzima:

$$\Xi = \Xi_1^n \quad (3.11)$$

Aplicando a Eq. 3.7 com os valores definidos para uma dímero simétrico de Michaelis-Menten na Eq. 3.11, obtém-se

$$\Xi = \left[\sum_{\{\sigma_{jS}, \sigma_{jI}\}}^* \prod_{j=1}^2 e^{-\beta(\sigma_{jS})(\epsilon_S - \mu_S)} e^{-\beta(\sigma_{jI})(\epsilon_I - \mu_I)} \right]^n \quad (3.12)$$

onde o asterisco sobre o somatório indica a restrição $\sigma_{jS} + \sigma_{jI} < 2$.

Avaliando produtório e o somatório, a expressão anterior leva a:

$$\Xi = \left(1 + 2x + 2y + 2xy + x^2 + y^2 \right)^n = (1 + x + y)^{2n} \quad (3.13)$$

com $x = e^{-\beta(\epsilon_S - \mu_S)}$ e $y = e^{-\beta(\epsilon_I - \mu_I)}$. É possível ver todos os estados mostrados na Figura 3.1 representados na Eq. 3.13.

Para calcular a velocidade da reação é preciso saber qual a probabilidade de que cada estado ocorra. Em um sistema com número de enzimas suficientemente grande é possível igualar a probabilidade estatística de cada estado com a fração de enzimas ocupadas [12]. Apenas os estados com substrato em um dos sítios realiza catálise, sendo seus pesos dados por:

$$p_{ES} = \frac{[ES]}{[E_{tot}]} = \frac{x}{(1+x+y)^2} \quad (3.14)$$

$$p_{ES^2} = \frac{[ES^2]}{[E_{tot}]} = \frac{x^2}{(1+x+y)^2} \quad (3.15)$$

$$p_{IES} = \frac{[IES]}{[E_{tot}]} = \frac{xy}{(1+x+y)^2} \quad (3.16)$$

onde $[ES]$ e $[ES^2]$ são as concentrações de enzimas com um e dois sítios catalítico ocupados apenas por substrato, respectivamente, enquanto $[IES]$ é a concentração da ocupação mista.. Até aqui tratou-se a porção do sistema com menor escala de tempo, cujo resultado será usado para calcular a porção externa. Para isso, deve-se avaliar a velocidade da reação, dada pela derivada temporal da concentração do produto. Na Eq. 3.17 é levado em conta que a concentração de enzimas com apenas um sítio ocupado por substrato é o dobro em relação às enzimas com os dois sítios ocupados por substrato, porém estas formam o dobro de produto:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_{cat}^S(2[ES]) + 2K_{cat}^S[ES^2] + K_{cat}^S(2[SEI]) \quad (3.17)$$

A taxa de formação do produto faz parte da porção de maior escala temporal do sistema. Como uma aproximação de primeira ordem, usam-se as probabilidades de cada estado na equação da velocidade de reação para construir:

$$\frac{d[P]}{dt} = 2K_{cat}^S[E_{tot}] \left(\frac{x}{1+x+y} \right) \quad (3.18)$$

Se a mistura substrato + inibidor + H_2O forma uma solução diluída no reservatório é possível usar a equação do potencial químico deduzida anteriormente e reescrever x e y

da forma:

$$\begin{cases} x = \frac{[S]}{[H_2O]} e^{-\beta \Delta \epsilon_S} \\ y = \frac{[I]}{[H_2O]} e^{-\beta \Delta \epsilon_I} \end{cases} \quad (3.19)$$

onde $\Delta \epsilon_l = \epsilon_l - \epsilon_l^0$ ($l = S$ ou I) é a variação de energia do sistema, da passagem de uma molécula l em solução para o sítio catalítico. Quanto menor $\Delta \epsilon_l$ (mais negativo) mais favorável será a formação do complexo.

3.1.3 Modelo Koshland–Nèmethy–Filmer (KNF)

Considerando ainda dímeros simétricos, um segundo modelo a abordar a dinâmica de enzimas um pouco mais complexas é o modelo sequencial, atualmente denominado modelo Koshland–Nèmethy–Filmer (KNF) [4]. Nele se considera que cada monômero da enzima pode existir em dois estados distintos (mudança estrutural da forma terciária), tomados como R (relaxed) e T (tense) [5]. A mudança de uma forma para a outra ocorre devido à ocupação de um do sítio catalítico, e pode ser interpretada como interação entre os sítios (cooperatividade). O modelo da Figura 3.2 descreve a seguinte passagem encontrada em [31] na visão do modelo sequencial:

The first plausible description of cooperative phenomena was proposed in 1935 by Linus Pauling. He considered the macromolecule to consist of identical binding sites with an uniform binding constant K_d . He further assumed that the subunit occupied by a ligand confers a stabilizing effect on the unoccupied subunits enhancing their affinities...

Esta interação pode ser associada a uma energia J_{lm} e o estado de ocupação dos dois sítios terá energia $\epsilon_l + \epsilon_m - J_{lm}$. Sendo assim, interpreta-se a ocupação dos sítios como não independentes, ou seja, a probabilidade de ocupação para um sítio catalítico será modificada pela ocupação do outro. Daqui até o final deste trabalho, tal mecanismo será referenciado pelo termo **interação cooperativa**.

Existem três possíveis valores para a interação: se $J_{lm} > 0$ a probabilidade de ocupação simultânea dos dois sítios é maior em relação ao modelo de Michaelis-Menten e é definida como cooperatividade positiva, mas se $J_{lm} < 0$ a probabilidade deste estado será menor e, por isso, definida como cooperatividade negativa. $J_{lm} = 0$ elimina o termo

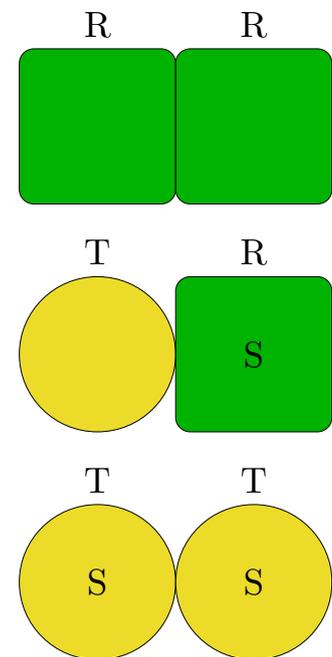


Figura 3.2: Representação esquemática do modelo KNF para um dímero. Neste exemplo, a ligação do substrato em um dos monômeros alterou a conformação do outro, modificando a probabilidade de ligação do segundo substrato.

cooperativo, recuperando o modelo de Michaelis-Menten.

As condições de contorno agora serão: dímeros simétricos com um sítio por monômero, interação cooperativa e ausência de formas alostéricas⁴. Partindo destas informações calcula-se facilmente a função de partição. Basta definir o operador número de sítios $\mathbf{u}^t \mathbf{N}$ e o vetor energia $\boldsymbol{\epsilon}$, como feito anteriormente.

Das condições de contorno, o vetor \mathbf{u} fica:

$$\mathbf{u} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.20)$$

As componentes \mathbf{N}_1 , $\boldsymbol{\epsilon}_1$ e $\boldsymbol{\mu}_1$ assumem a mesma configuração da seção 3.1.2,

$$\mathbf{N}_1^t = \sum_{j=1}^2 \begin{pmatrix} \sigma_{jS} \\ \sigma_{jI} \end{pmatrix}; \quad \boldsymbol{\epsilon}_1 = \begin{pmatrix} \epsilon_S \\ \epsilon_I \end{pmatrix}; \quad \boldsymbol{\mu}_1 = \begin{pmatrix} \mu_S \\ \mu_I \end{pmatrix}, \quad (3.21)$$

pois a interação ficará concentrada nas componentes \mathbf{N}_2 e $\boldsymbol{\epsilon}_2$. Aqui deve se lembrar que a interação J_{lm} aparece apenas quando os dois sítios catalíticos forem ocupados. Isto resulta na seguinte matriz de interação cooperativa:

$$\mathbf{N}_2^t = \begin{pmatrix} \sigma_{1S}\sigma_{2S} \\ \sigma_{1S}\sigma_{2I} \\ \sigma_{1I}\sigma_{2S} \\ \sigma_{1I}\sigma_{2I} \end{pmatrix} \quad (3.22)$$

Esta matriz terá termos nulos quando um dos sítios estiverem desocupados. Assim, ela descreve os tipos de moléculas que geraram a interação e o número de interações possíveis para uma enzima. Como \mathbf{N}_2^t irá operar sobre a componente $\boldsymbol{\epsilon}_2$, é conveniente escrever

⁴Aqui refere-se a forma alostérica da enzima como um todo, como no modelo MWC

$$\boldsymbol{\epsilon}_2 = \mathbf{J} = \begin{pmatrix} J_{SS} \\ J_{SI} \\ J_{IS} \\ J_{II} \end{pmatrix}, \text{ com } J_{SI} = J_{IS} \quad (3.23)$$

A função de partição é dada por:

$$\Xi = \left\{ \sum_{\{\sigma_{jS}, \sigma_{jI}\}}^* e^{-\beta[\mathbf{u}^t \mathbf{N}(\boldsymbol{\epsilon} - \boldsymbol{\mu})]} \right\}^n \quad (3.24)$$

Após somar sobre todos os valores possíveis das variáveis de estado obtém-se:

$$\Xi = \left(1 + 2x + 2y + 2xyZ_{SI} + x^2Z_{SS} + y^2Z_{II} \right)^n \quad (3.25)$$

com $Z_{lm} = e^{\beta J_{lm}}$, $x = e^{-\beta(\epsilon_S - \mu_S)}$ e $y = e^{-\beta(\epsilon_I - \mu_I)}$.

A Eq. 3.25 concorda com a forma química da função de partição para o modelo KNF mostrada em no Capítulo 1 como o denominador da Eq. 1.19 para $y = 0$. Além disso, o modelo de Michaelis-Menten se torna um caso especial aqui, pois fazendo $J_{lm} = 0$ na Eq. 3.25 recupera-se a Eq. 3.13.

Assim como na seção anterior, os pesos de ocupação para os estados que participam da catálise são:

$$p_{ES} = \frac{[ES]}{[E_{tot}]} = \frac{x}{1 + 2x + 2y + 2xyZ_{SI} + x^2Z_{SS} + y^2Z_{II}} \quad (3.26)$$

$$p_{ES^2} = \frac{[ES^2]}{[E_{tot}]} = \frac{x^2Z_{SS}}{1 + 2x + 2y + 2xyZ_{SI} + x^2Z_{SS} + y^2Z_{II}} \quad (3.27)$$

$$p_{IES} = \frac{[IES]}{[E_{tot}]} = \frac{xyZ_{SI}}{1 + 2x + 2y + 2xyZ_{SI} + x^2Z_{SS} + y^2Z_{II}} \quad (3.28)$$

Em uma situação mais geral deve-se considerar o efeito cooperativo sobre a constante de catálise [7]. Assim, a equação da velocidade da reação fica:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_{cat}^S(2[ES]) + 2K_{cat}^{SS}[ES^2] + K_{cat}^{SI}(2[IES]) \quad (3.29)$$

onde o sobrescrito na constante de catálise indica o tipo e número de vezes que uma molécula aparece ligada à enzima. É conveniente rescrever a Eq. 3.29 da forma:

$$\frac{d[P]}{dt} = K_{cat}^S \left([ES] + \zeta^S [ES^2] + \zeta^I [IES] \right), \text{ com } \zeta^l = \frac{K_{cat}^{Sl}}{K_{cat}^S} \quad (l = S \text{ ou } I) \quad (3.30)$$

onde ζ^l é definida como constante catalítica relativa, e representa um fator de multiplicidade gerado pelo efeito cooperativo sobre a constante de catálise do modelo de Michaelis-Menten. Na literatura esta constante é normalmente tomada como a unidade para simplificar os cálculos [7], o que não será feito aqui para se obter uma equação de velocidade o mais geral possível.

Procedendo como em 3.1.2, a equação da velocidade fica:

$$\frac{d[P]}{dt} = 2K_{cat}^S [E_{tot}] \left(\frac{x + x^2 Z_{SS} \zeta^S + xy Z_{SI} \zeta^I}{1 + 2x + 2y + 2xy Z_{SI} + x^2 Z_{SS} + y^2 Z_{II}} \right) \quad (3.31)$$

$$\begin{cases} x = \frac{[S]}{[H_2O]} e^{-\beta \Delta \epsilon_s}; y = \frac{[I]}{[H_2O]} e^{-\beta \Delta \epsilon_I} \\ Z_{lm} = e^{\beta J_{lm}} \end{cases} \quad (3.32)$$

Como consequência da cooperatividade a função de partição não é mais um quadrado perfeito, e a velocidade de reação não assume mais uma forma simplificada como no modelo de Michaelis-Menten.

Análise Gráfica

Partindo das equações do modelo KNF é possível recuperar as anteriores por ajuste dos parâmetros. Assim, da Eq. 3.31 para a reação de catálise sem inibição basta fazer $[I] = 0$, e escolher valores de $J_{SS} = 0$ para o modelo Michaelis-Menten ou $J_{SS} > 0$ ou $J_{SS} < 0$ para efeito cooperativo positivo ou negativo, respectivamente. As curvas apresentadas nas Figuras de 3.3 a 3.8 são simulações da Eq. 3.31, onde se escolheu para ambas $J_{SI} = 0$ e $\zeta^l = 1$. Para não sobrecarregar de informação a legenda de cada curva,

adotou-se a seguinte notação: quando aparece apenas o valor de interação para um tipo de molécula (substrato ou inibidor) significa que para o outro tipo é nulo, já a interação para os dois tipos de moléculas está escrita na forma geral J_{mm} ($m = S$ ou I).

A Figura 3.3 mostra o comportamento da taxa de formação de produto em relação a variações de concentração de substrato do sistema. Nesta simulação, a curva azul descreve o comportamento de uma enzima de Michaelis-Menten sem a presença de inibidor, deixando evidente a característica de crescimento lento da taxa de formação de produto em relação ao aumento da concentração de substrato, resultado que concorda com a literatura (ver referências [1,2]). A introdução do inibidor no sistema sem interação cooperativa (curva vermelha) e com interação cooperativa positiva (curva violeta) acarreta na redução da velocidade da reação.

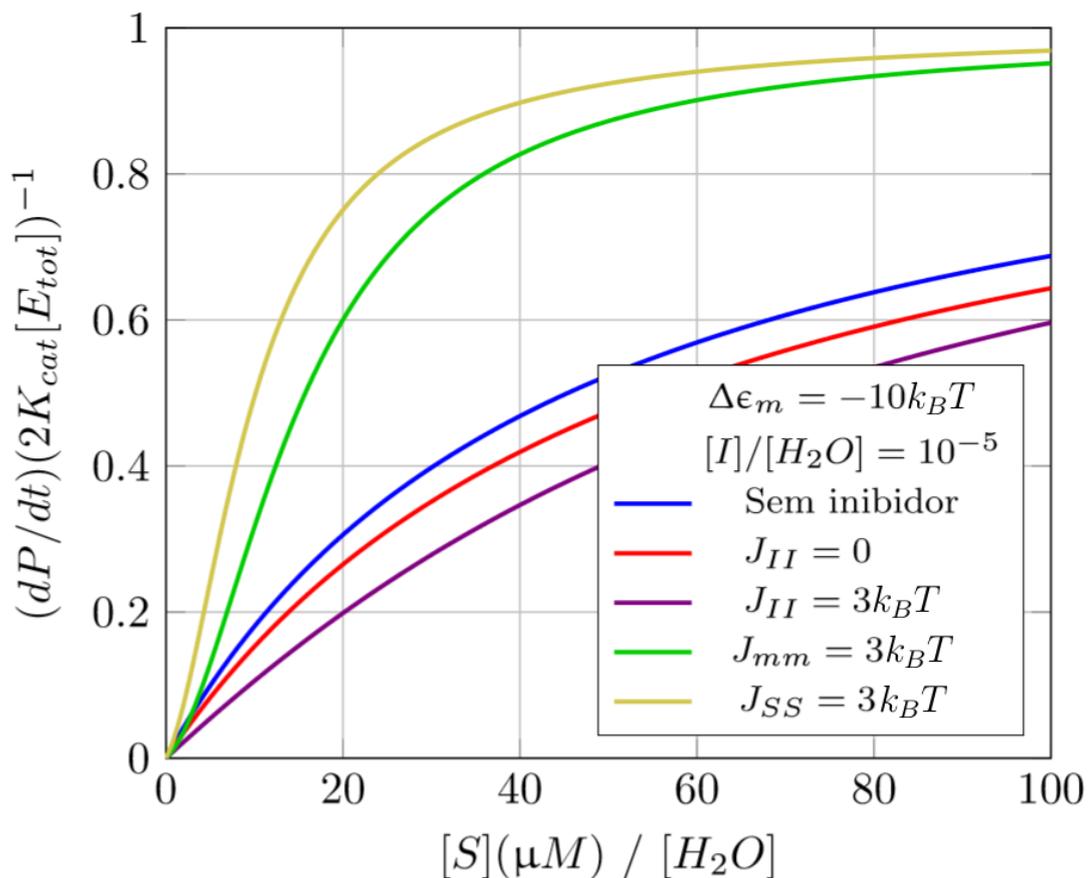


Figura 3.3: Velocidade da reação em função da fração de moléculas de substrato por moléculas de água, comparando curvas sem interação entre os sítios e com cooperatividade positiva e negativa. Neste e nos demais gráficos, $[S](\mu M)/[H_2O]$ expressa a fração das concentrações de substrato, em 10^{-6} mols por litro, e moléculas de água, em mols por litro.

A redução da velocidade é acentuada pela interação positiva entre os inibidores, porém a concavidade da curva é preservada, como é possível ver nas curvas das derivadas apresentadas na Figura 3.4 (derivadas numéricas da Eq.3.31). Quando existe interação cooperativa para o substrato (curvas amarelo e verde) um ponto de inflexão aparece, como se nota pelo surgimento de uma raiz na derivada segunda. Este ponto de inflexão é responsável por aumentar a sensibilidade da velocidade de formação de produto em relação a variação da concentração de substrato, mecanismo fundamental para que algumas reações fisiológicas ocorram.

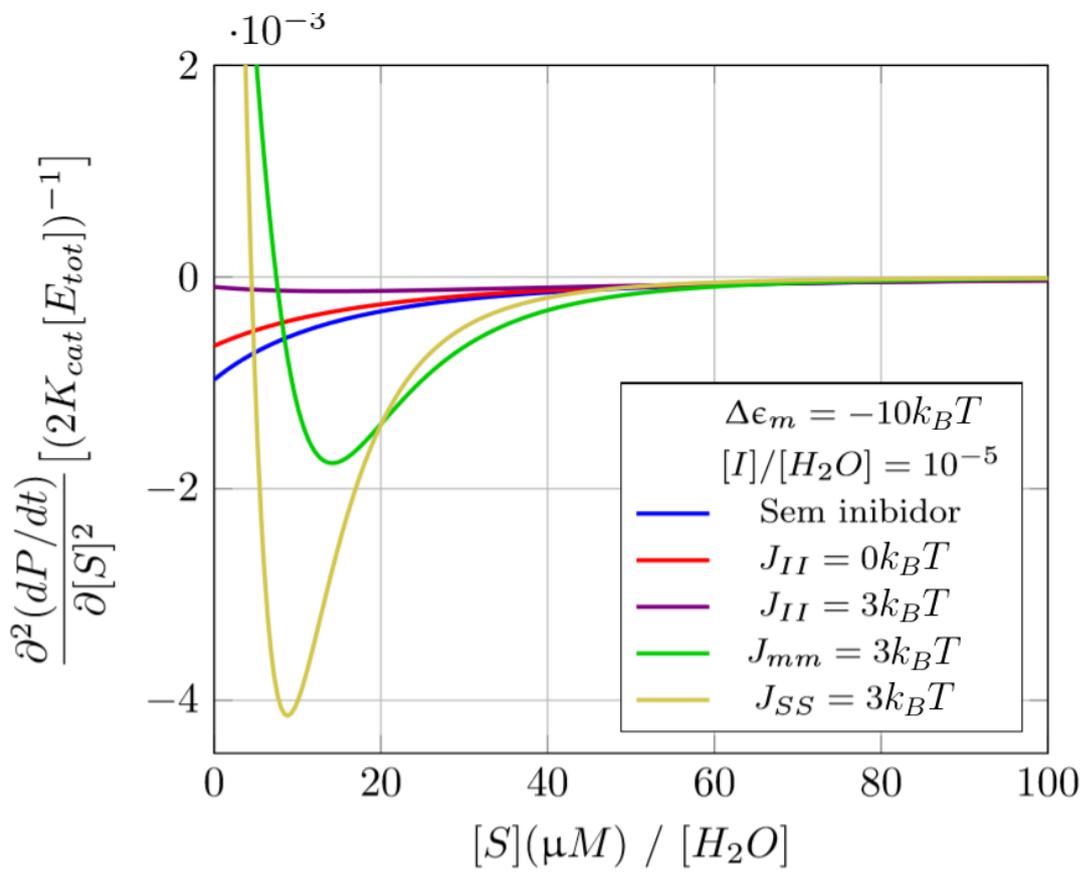


Figura 3.4: Derivada segunda da velocidade de formação de produto em relação à concentração de substrato, evidenciando a ocorrência de pontos de inflexão para cooperatividade positiva entre substratos (curvas com raízes).

Fazendo uma análise gráfica semelhante à do parágrafo anterior, porém agora mantendo fixa a concentração de substrato e variando a concentração de inibidor, a simulação da Eq.3.31 resulta nas curvas das Figuras 3.5 e 3.6. Nota-se que a velocidade de formação de produto inicia em um valor maior ou igual a zero para $[I] = 0$ (dependendo da concentração de substrato), e cai assintoticamente para zero em altas concentrações

de inibidor. Quando não existe interação cooperativa para o inibidor (curva vermelha) a velocidade de formação de produto é pouco sensível à variação da concentração de inibidor, o que se mantém para cooperatividade negativa (curva amarela), a qual torna o inibidor menos efetivo. Semelhante ao caso anterior, a interação cooperativa positiva para o inibidor faz surgir um ponto de inflexão (curvas violeta e verde), aumentando consideravelmente a sensibilidade do sistema a variações de concentração de inibidor.

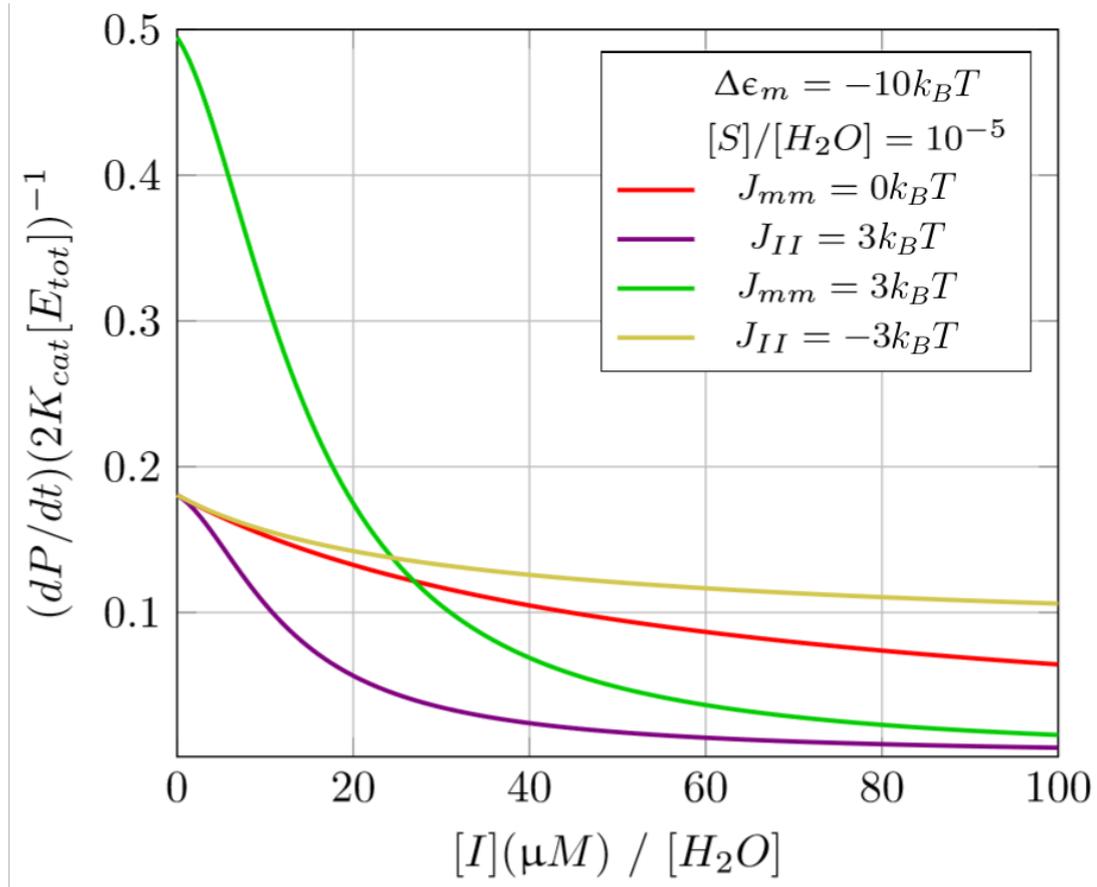


Figura 3.5: Velocidade da reação em função da concentração relativa de inibidor, comparando curvas sem interação ($J_{mm} = 0$) entre os sítios e com cooperatividade positiva ($J_{mm} = 3k_B T$, ($J_{II} = 3k_B T$)) e negativa ($J_{II} = -3k_B T$)

Os gráficos da Figuras 3.7 e 3.8 são simulações tridimensionais para a velocidade da reação em função das concentrações de substrato e inibidor, onde é possível ver que em um intervalo de concentração da ordem de μM as características mostradas na Figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 se mantém. Na Figura 3.7 nota-se o crescimento rápido da velocidade de formação de produto em relação ao aumento da concentração de substrato, para concentrações diferentes de inibidor na situação em que existe cooperatividade positiva entre pares de

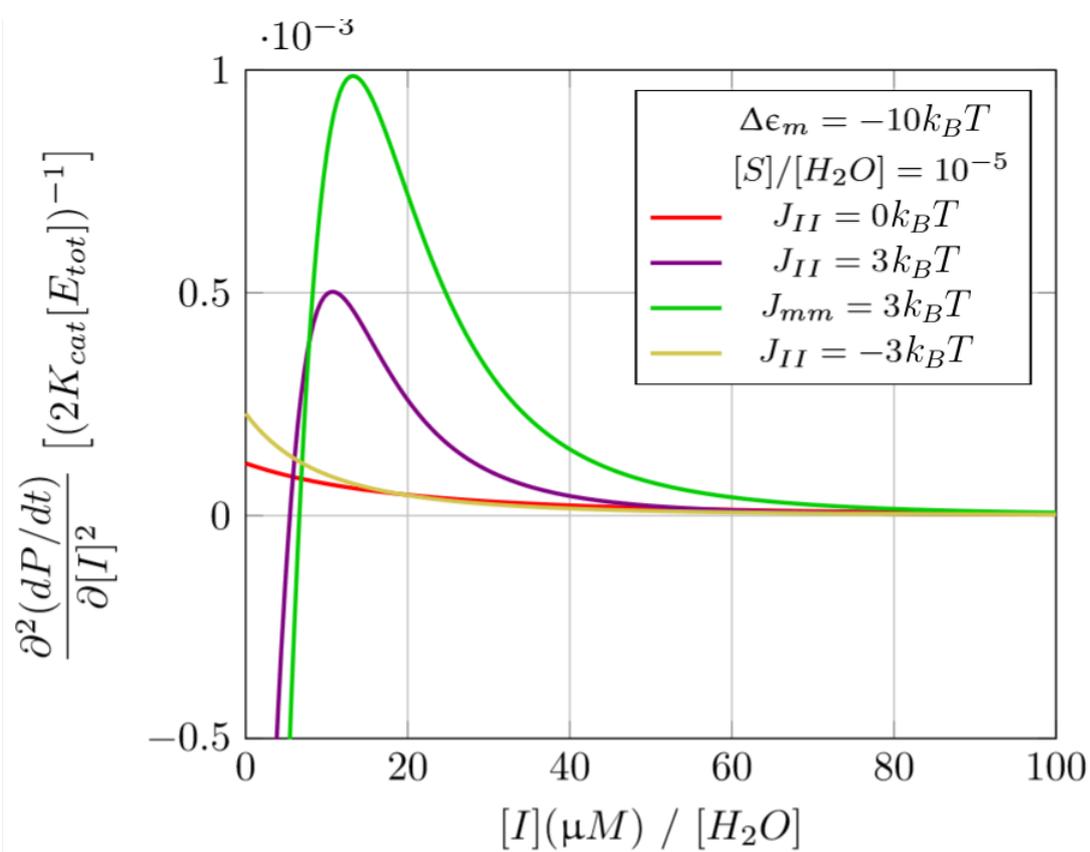


Figura 3.6: Derivada segunda da velocidade de formação de produto em relação a concentração de inibidor, evidenciando a ocorrência de pontos de inflexão para cooperatividade positiva entre inibidores (curvas com raízes)

substrato e nula entre pares de inibidores e inibidor-substrato (compare as Figuras 3.3 e 3.7). Já quando a cooperatividade é positiva apenas entre pares de inibidores e nula nos demais casos (Figura 3.8) a velocidade cai rapidamente com o aumento da concentração de inibidor para diferentes concentrações de substrato.

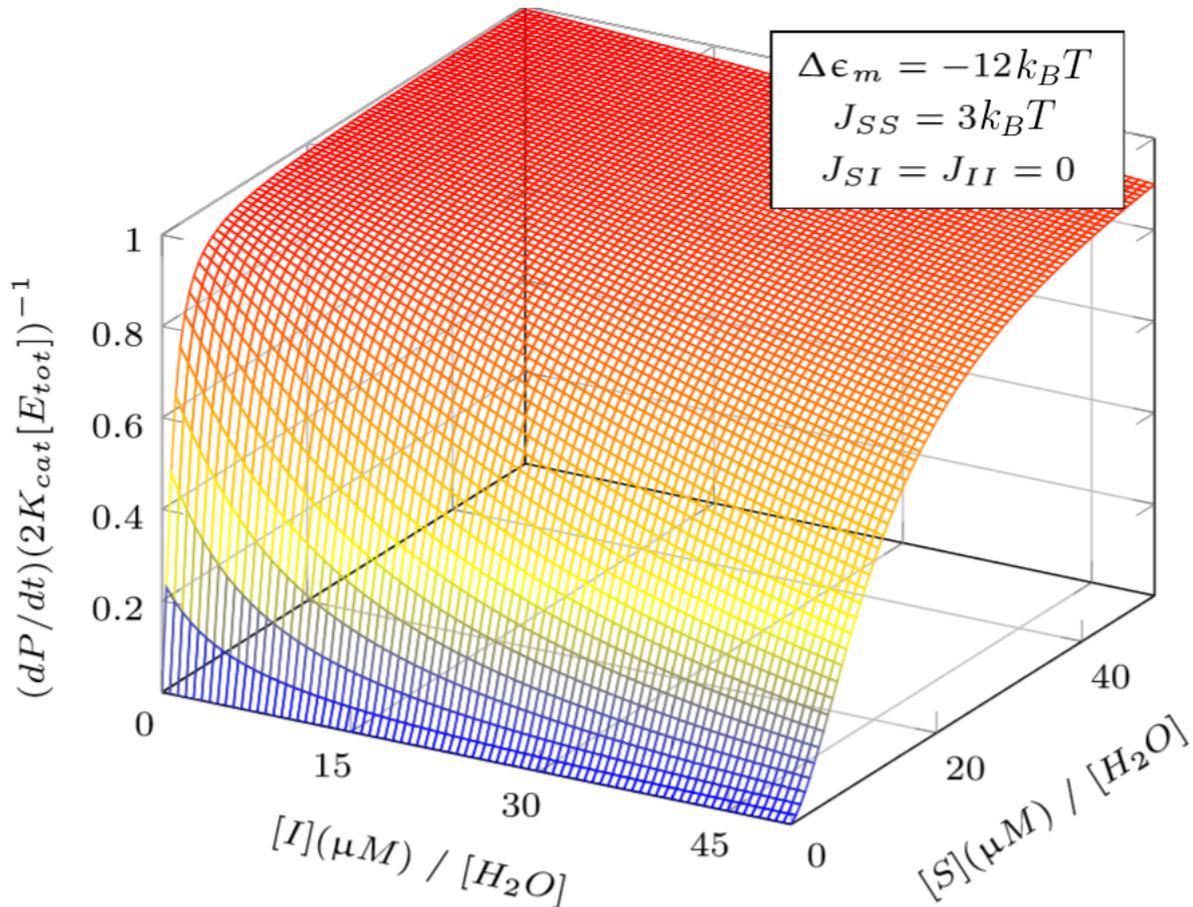


Figura 3.7: Superfície da velocidade de formação de produto gerada por variação das concentrações de substrato e inibidor, com cooperatividade positiva no par substrato-substrato

O resultado apresentado nas Figuras 3.3 e 3.7 já permite perceber que enzimas que se comportam dessa forma serão bem mais sensíveis à variação de concentração de inibidores. Por esse motivo, em casos de inibição de uma determinada via fisiológica, cuja a atividade seja a possível causa de uma enfermidade, seria importante escolher enzimas que possuam interação cooperativa positiva para inibidores. Isto fará com que a concentração máxima de fármaco utilizada no tratamento seja menor se comparado com o que seria necessário para se inibir uma enzima de Michaelis-Menten. Porém é preciso lembrar que os casos tratados aqui se aplicam apenas para inibição competitiva. Sendo assim, seria mais interessante utilizar o modelo desenvolvido aqui para estudar comparativamente vários

inibidores (que competem pelo sítio catalítico) diferentes para uma mesma enzima alvo, procurando qual deles formam um complexo enzima-inibidor mais estável juntamente com um efeito cooperativo mais forte.

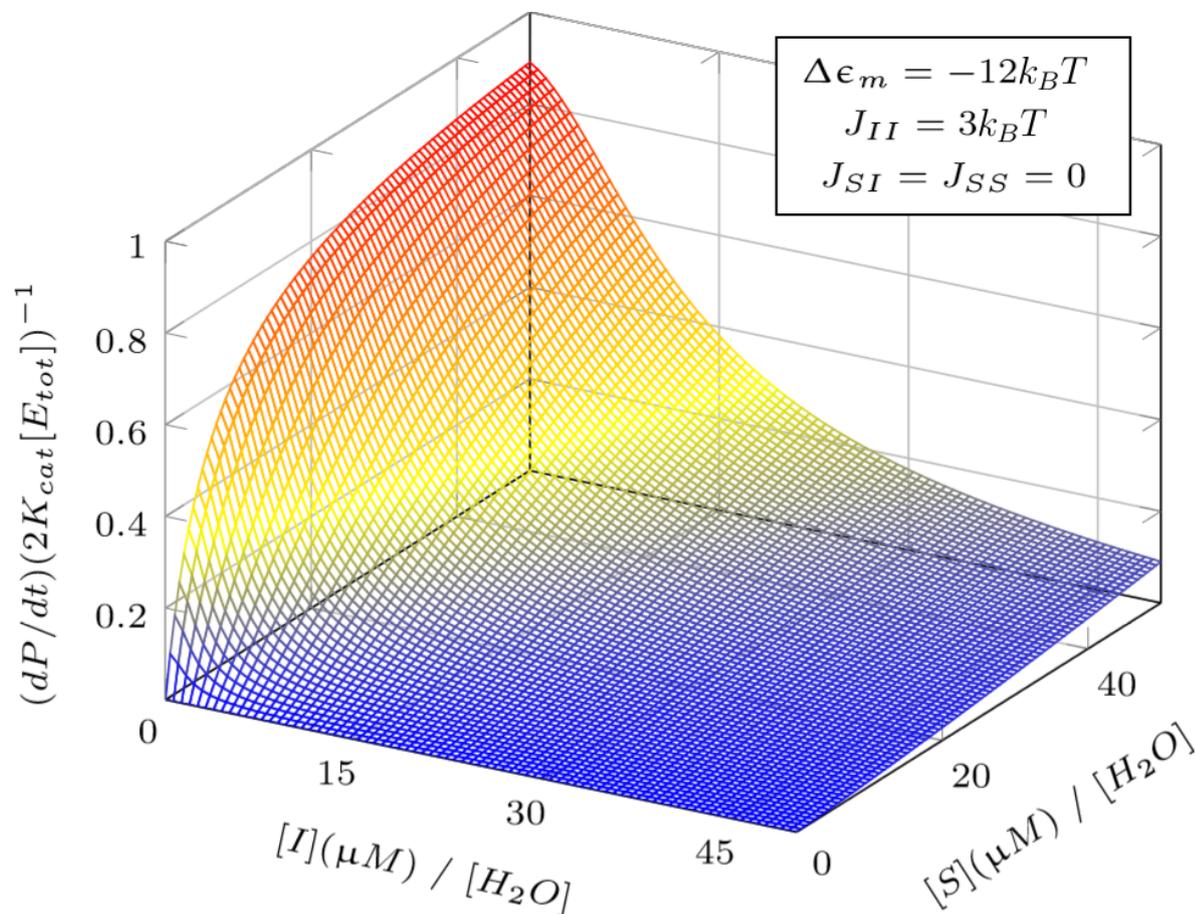


Figura 3.8: Superfície da velocidade de formação de produto gerada por variação das concentrações de substrato e inibidor, com cooperatividade positiva no par inibidor-inibidor (apenas um tipo de interação cooperativa foi escolhida como não nula nesta na simulação e na anterior)

Agora inserindo um valor não nulo para a interação de pares distintos (inibidor-substrato), o inibidor se comportará de forma não usual para concentrações específicas de substrato: para baixas concentrações de substrato, o aumento da concentração de inibidor apresenta um pico na velocidade de formação de produto, seguido por um comportamento assintótico lento em relação à reta $[S] = 0$. Isto foi possível ser visto nas simulações apresentadas nas Figuras 3.9 e 3.10. Na primeira simulação (Fig. 3.9) tem-se apenas interação não nula entre inibidor e substrato. Já na segunda (Fig. 3.10) foi testada uma situação onde existe cooperatividade positiva para todas as combinações dos pares, porém foi mantido $J_{SI} > J_{mm}$. Ao inverter a situação ($J_{SI} < J_{mm}$) o gráfico não apresenta mais o

pico na velocidade para o mesmo intervalo de simulação (Fig. 3.11). A partir deste ponto, o efeito somado das situações apresentadas nas Figuras 3.7 e 3.8 passa a predominar.

Estas três últimas simulações (Figuras 3.9 a 3.11) mostram duas condições para que o inibidor promova aumento da velocidade de formação de produto: baixas concentrações de substrato e efeito cooperativo positivo predominante para o par inibidor-substrato. Nesta situação, uma baixa fração das enzimas estarão ligadas a algum dos dois tipos de moléculas e a competição do inibidor pelo sítio não será tão significativa, porém cada enzima que tiver um sítio ocupado por inibidor terá maior probabilidade de um substrato se ligar ao sítio vazio do que uma segunda molécula de inibidor. A partir do ponto de máximo da velocidade, aumentos de concentração de inibidor elevarão a sua probabilidade de se ligar ao segundo sítio catalítico e, por consequência, a competição terá maior efeito sobre as probabilidades de ligação do que a interação. Este mecanismo ilustra uma situação em que um inibidor competitivo pode funcionar como ativador de uma enzima ⁵ por consequência de transições alostéricas ⁶.

⁵Ver definição de ativação enzimática utilizada por BOWDEN (2012) [2]

⁶Um mecanismo de ativação enzimática promovida por um inibidor competitivo independente de efeitos alostéricos foi descrito em 2017 por KUUSK e VÄLJAMÄE [32]

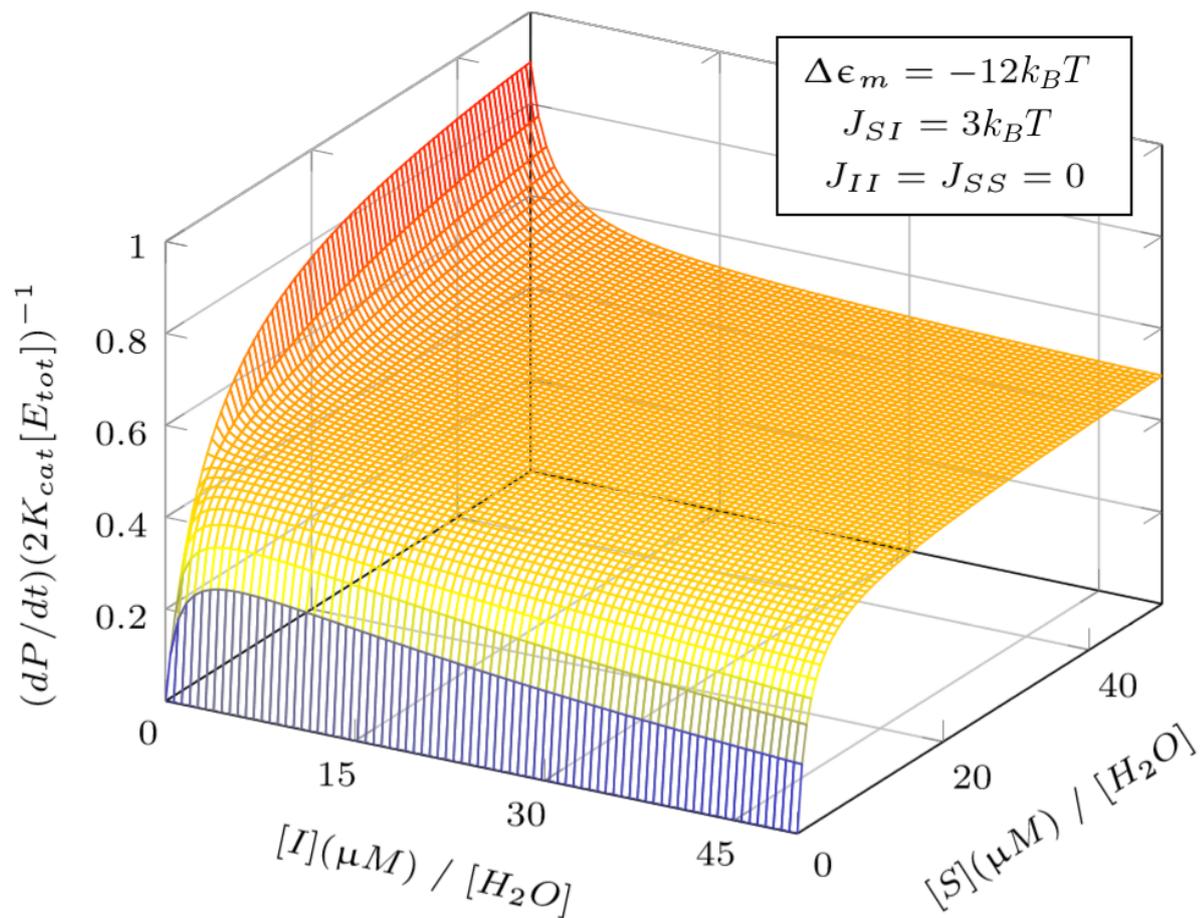


Figura 3.9: Superfície mostrando a variação da velocidade de formação de produto devido a variação das concentrações de substrato e inibidor, com formação de máximo na direção da coordenada $[I]/[H_2O]$.

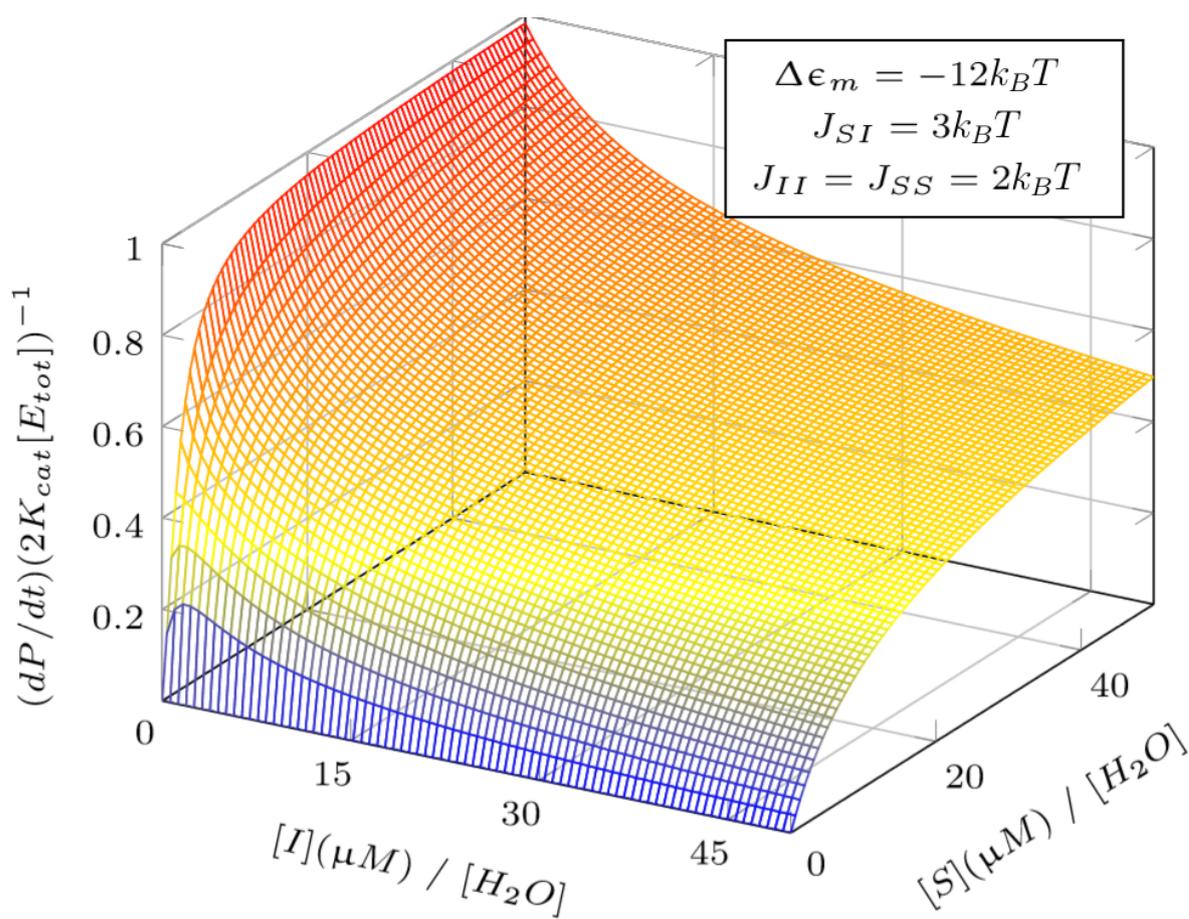


Figura 3.10: A superfície ainda apresenta um pico da velocidade da reação para baixas concentrações de substrato quando a interação entre pares de inibidor é mais forte que as demais.

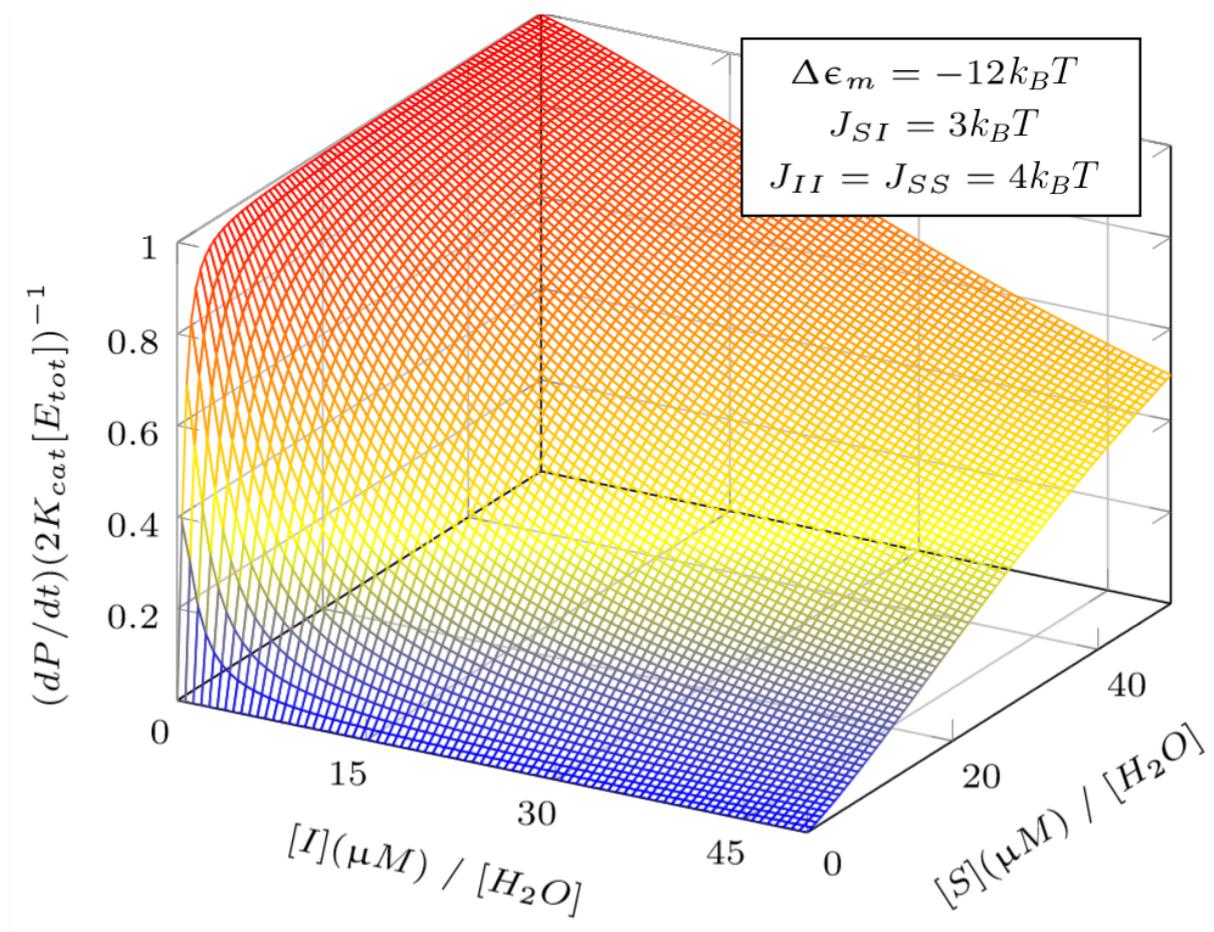


Figura 3.11: Quando a interação entre pares do mesmo tipo é mais forte do que entre pares distintos o inibidor não age mais como ativador da enzima.

3.1.4 Modelo Monod-Wyman-Changeux (MWC)

Proposto por Monod, Wyman e Changeux [21] o modelo MWC considera a existência de dois estados quaternários das enzimas (R e T), conhecidas como formas alostéricas [5]. Neste modelo a ocupação do sítio não interfere na estrutura do monômero, como ocorre no KNF. O mecanismo pode ser descrito da seguinte forma: a molécula que se ligará ao sítio catalítico terá afinidades distintas para uma das formas R ou T [23] (Figura 3.12), as quais existem em um equilíbrio [4] afetado pela ocupação de um sítio alostérico por uma molécula específica (que por simplicidade não será introduzida no modelo deste trabalho).

Para gerar efeito cooperativo pelo modelo MWC considera-se haver uma variação de energia γ_{RT} da transição estado R para o T . Além disso, deve se fazer a seguinte escolha: a forma R é mais estável para os dois sítios ativos desocupados ($\gamma_{RT} > 0$), porém a T tem maior afinidade de ocupação dos sítios [3].

No formalismo do operador número de ocupação, as condições de contorno para este tipo de enzima são: dímeros simétricos com um sítio catalítico por monômero, sem interação cooperativa e duas formas alostéricas (R e T). É importante notar que apenas quando a enzima existe em equilíbrio para duas formas distintas a componente u_3 não será nula, pois esta não sofre influência da ocupação dos monômeros individualmente por substrato ou inibidor.

Das condições de contorno, o vetor \mathbf{u} fica:

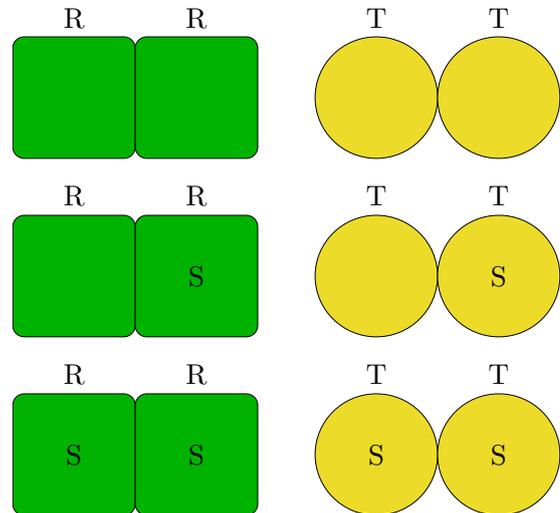


Figura 3.12: Representação esquemática do modelo MWC para um dímero. Neste exemplo, a ligação do substrato não alterou a forma terciária dos monômeros. A enzima sofrerá transição da forma T para a R por completo independente da ocupação das cavidades catalíticas.

$$\mathbf{u} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (3.33)$$

Para justificar a forma da matriz \mathbf{N}_1 foi considerada a impossibilidade física de uma molécula macroscópica estar em dois estados ao mesmo tempo. Matematicamente esse comportamento pode ser associado a uma variável de estado (binária) η . Quando se tem $\eta = 1$ a enzima estará no estado R , caso o contrário ocorra ($\eta = 0$) o dímero estará no estado T . Isto exige que \mathbf{N}_1 agora possua quatro componentes, sendo duas delas relativas à forma alostérica T e as outras duas à R . Este grupo de componentes formam dois blocos verticais em \mathbf{N}_1^t que não assumem valor nulo simultaneamente, podendo serem chamados de bloco R e bloco T , devido a sua relação com esses estados. Estabelecidos estes conceitos, a matriz transposta de \mathbf{N}_1 será:

$$\mathbf{N}_1^t = \begin{pmatrix} \eta \mathbf{N}_{1R}^t \\ (1 - \eta) \mathbf{N}_{1T}^t \end{pmatrix}; \quad \text{com } \mathbf{N}_{1R}^t = \sum_{j=1}^2 \begin{pmatrix} \sigma_{jS}^R \\ \sigma_{jI}^R \end{pmatrix} \text{ e } \mathbf{N}_{1T}^t = \sum_{j=1}^2 \begin{pmatrix} \sigma_{jS}^T \\ \sigma_{jI}^T \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

com $(\sigma_{jl}^R, \sigma_{jl}^T) = (0 \text{ ou } 1, 0 \text{ ou } 1)$, $j = 1 \text{ ou } 2$ e $l = S \text{ ou } I$, onde j diferencia as subunidades do dímero.

Agora a somatória da função de partição se estenderá por um grupo de variáveis maior em relação aos outros casos, sendo σ relacionadas à ocupação dos sítios catalíticos e η aos estado alostérico. Esta segunda variável de estado assegura que o número de sítios ocupados não sejam contados além daqueles que o sistema realmente possui.

Analogamente, o vetor \mathbf{e}_1 deverá conter dois blocos (T e R) com as respectivas energias de ligação com os sítios catalíticos dos dímeros T e R . Geralmente, mudanças na forma tridimensional de uma enzima podem acarretar alterações na disposição espacial dos resíduos de aminoácido do sítio ativo, possibilitando valores diferentes do potencial de interação de qualquer molécula dentro desta cavidade. Mesmo que a posição inicial dos resíduos de aminoácidos não se modifique, rearranjos de cargas também afetarão a formação de complexo. Com essas informações é possível escrever o vetor \mathbf{e}_1 da forma:

$$\boldsymbol{\epsilon}_1 = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\epsilon}_1^R \\ \boldsymbol{\epsilon}_1^T \end{pmatrix}; \quad \text{com } \boldsymbol{\epsilon}_1^R = \begin{pmatrix} \epsilon_S^R \\ \epsilon_I^R \end{pmatrix} \text{ e } \boldsymbol{\epsilon}_1^T = \begin{pmatrix} \epsilon_S^T \\ \epsilon_I^T \end{pmatrix} \quad (3.35)$$

O vetor $\boldsymbol{\mu}_1$ deve ser compatível com $\boldsymbol{\epsilon}_1$, porém ele é uma característica da molécula (substrato ou inibidor) em solução, e não se modifica pela existência de formas alostéricas. Por este motivo, os dois blocos T e R para $\boldsymbol{\mu}$ serão iguais:

$$\boldsymbol{\mu}_1 = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\mu}_1^R \\ \boldsymbol{\mu}_1^T \end{pmatrix}; \quad \text{com } \boldsymbol{\mu}_1^R = \boldsymbol{\mu}_1^T = \begin{pmatrix} \mu_S \\ \mu_I \end{pmatrix} \quad (3.36)$$

Falta agora escrever a matriz número de estados alostéricos e o respectivo vetor energia. Como já argumentado antes, os estados T e R não acontecem simultaneamente para a mesma molécula e, para representar isso, se definiu a nova variável de estado η . Já o vetor energia deve ter componentes relativas à energia de configuração dos aminoácidos da estrutura, interagindo entre si e com o meio. Esta discussão faz parte de um tema mais amplo, conhecido como *folding protéico*, e pode ser visto com mais detalhes nas referências [33, 34]. Não é preciso ser muito exato quanto a um referencial para R e T , pois no final, o importante será a diferença de potencial entre estes estados. Sendo assim, suponha que o estado R tenha energia γ_R , e γ_T para o estado T , em relação a um dado referencial, resultando em um custo energia na transição de R para T de $\gamma_{RT} = \gamma_T - \gamma_R$.

A partir das informações anteriores propõe-se a seguinte estrutura para \mathbf{N}_3 e $\boldsymbol{\epsilon}_3$:

$$\mathbf{N}_3 = \begin{pmatrix} \eta \\ 1 - \eta \end{pmatrix} \quad \boldsymbol{\epsilon}_3 = \begin{pmatrix} \gamma_R \\ \gamma_T \end{pmatrix} \quad (3.37)$$

Definidos todos os elementos necessários, agora basta inseri-los na função de partição (como feito na Eq. 3.24) e realizar a soma sobre as variáveis de estado, seguindo a mesma restrição já descrita nas seções anteriores para σ . Deste cálculo resulta, para uma enzima:

$$\Xi_1 = e^{-\beta\gamma_R} (1 + x_R + y_R)^2 + e^{-\beta\gamma_T} (1 + x_T + y_T)^2 \quad (3.38)$$

com $x_A = e^{-\beta(\epsilon_S^A - \mu_S)}$ e $y_A = e^{-\beta(\epsilon_I^A - \mu_I)}$ ($A = R$ ou T).

Como já era possível imaginar, o resultado é o mesmo da soma de funções de partição para duas enzimas de Michaelis-Menten distintas multiplicadas por distribuições de Boltzmann de cada estado alostérico. Dito isto, fica claro que os pesos relevantes para a catálise serão praticamente os mesmos apresentados na Seção 3.1.2, porém cada estado alostérico terá todos os pesos multiplicados pelas respectivas exponenciais $e^{-\beta\gamma_A}$

$$p_{EAS} = \frac{[EAS]}{[E_{tot}]} = \frac{x_A e^{-\beta\gamma_A}}{e^{-\beta\gamma_R} (1 + x_R + y_R)^2 + e^{-\beta\gamma_T} (1 + x_T + y_T)^2} \quad (3.39)$$

$$p_{EAS^2} = \frac{[EAS^2]}{[E_{tot}]} = \frac{x_A^2 e^{-\beta\gamma_A}}{e^{-\beta\gamma_R} (1 + x_R + y_R)^2 + e^{-\beta\gamma_T} (1 + x_T + y_T)^2} \quad (3.40)$$

$$p_{IEAS} = \frac{[IEAS]}{[E_{tot}]} = \frac{x_A y_A e^{-\beta\gamma_A}}{e^{-\beta\gamma_R} (1 + x_R + y_R)^2 + e^{-\beta\gamma_T} (1 + x_T + y_T)^2} \quad (3.41)$$

Por questão de generalidade, assume-se que cada conformação do dímero possui contante de catálise diferente. Assim:

$$\frac{d[P]}{dt} = \sum_A \left\{ K_{cat}^A (2[EAS]) + 2K_{cat}^A [EAS^2] + K_{cat}^A (2[IEAS]) \right\} \quad (3.42)$$

Para simplificar os cálculos, toma-se R como referencial escrevendo K_{cat}^R e $e^{-\beta\gamma_R}$ em evidência. Feito isto e substituindo as Eqs. 3.39, 3.40 e 3.41 na Eq. 3.42, obtém-se a equação geral de velocidade⁷:

$$\frac{d[P]}{dt} = 2K_{cat}^R [E_{tot}] \left[\frac{x_R(1 + x_R + y_R) + x_T Z_{RT} \zeta^{RT} (1 + x_T + y_T)}{(1 + x_R + y_R)^2 + Z_{RT} (1 + x_T + y_T)^2} \right] \quad (3.43)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} x_A = \frac{[S]}{[H_2O]} e^{-\beta\Delta\epsilon_S^A}; y_A = \frac{[I]}{[H_2O]} e^{-\beta\Delta\epsilon_I^A} \\ Z_{RT} = e^{-\beta\gamma_{RT}}; \zeta^{RT} = \frac{K_{cat}^T}{K_{cat}^R} \end{array} \right. \quad (3.44)$$

⁷A Eq. 3.43 assume forma equivalente à Eq. 1.19

Análise Gráfica

Agora será mostrado que o modelo MWC também reproduz a surgimento de pontos de inflexão, característica da cooperatividade positiva. Porém nessa etapa do trabalho optou-se por gerar curvas de nível no lugar de superfícies tridimensionais, para analisar as condições para o surgimento de pontos de inflexão nas curvas de velocidade da reação em função da concentração de substrato ou inibidor. Com este procedimento foi possível observar alguns detalhes específicos para este modelo, onde a competição consegue mascarar a existência de estados alostéricos, como será discutido a seguir, além de ser possível modelar o fenômeno da ativação da enzima pelo inibidor, já discutido para o modelo KNF.

Todas simulações da Eq.3.43 foram feitas deixando o estado R como o mais estável quando com os sítios desocupados e o estado T com maior probabilidade de ocupação dos sítios em relação a R , que significa obedecer as condições $\gamma_{RT} > 0$ e $\Delta\epsilon_m^T < \Delta\epsilon_m^R$. Além disso, para simplificar a análise, foi assumido que a mudança de estado alostérico não afeta a constante de catálise e por isso, a contante catalítica relativa foi fixada como um ($\zeta^{RT} = 1$).

A primeira simulação (Figura 3.13) trata de uma curva de nível da velocidade de formação de produto (linha cheia) e da sua segunda derivada em relação à concentração de substrato (linha pontilhada), onde se variou a concentração de substrato ($[S]$) e a energia de transição entre estados alostéricos (γ_{RT}) na ausência de inibidor. Para a segunda derivada foi escolhido apenas o nível onde esta se anula, de forma a mapear todos os pontos de inflexão para as coordenadas $[S]$ e γ_{RT} . Já para a velocidade da reação foi escolhido os níveis de 10% e 90% da velocidade máxima, que colocados juntamente com o nível da derivada segunda nula no mesmo sistema de eixos, foi possível notar a uma relação entre as coordenadas do ponto de inflexão e a variação da concentração de substrato necessária para causar este aumento na taxa de formação de produto.

Para um exemplo prático, com base na simulação apresentada na Figura 3.13, pode-se calcular o fator R_S , dado pela Eq. 1.12, onde $v([S]_{0,9}) = 0,9V_{max}$, $v = \frac{d[P]}{dt}$ e $V_{max} = 2K_{cat}^R[E_{tot}]$. Para este cálculo considera-se a energia $\gamma_{RT} = 10k_B T$, onde se tem $[S]_{0,1} = 0,1 \cdot 10^{-6}[H_2O]$ e $[S]_{0,9} = 1 \cdot 10^{-6}[H_2O]$, o que resulta em $R_S = 10$. Isto

significa que se a energia de transição entre os estados alostéricos for de $10k_B T$, o ponto de inflexão na curva $v/V_{max} \times [S]$ ocorrerá para $[S]/[H_2O] \approx 0,18 \cdot 10^{-6}$ e será necessário um aumento de 10 vezes na concentração de substrato para um incremento de 10% para 90% na velocidade da reação em relação ao seu máximo. Esta aplicação exemplifica o fato de que enzimas cuja a transição alostérica gera cooperatividade positiva possuem R_S menor do que enzimas de Michaelis-Menten⁸.

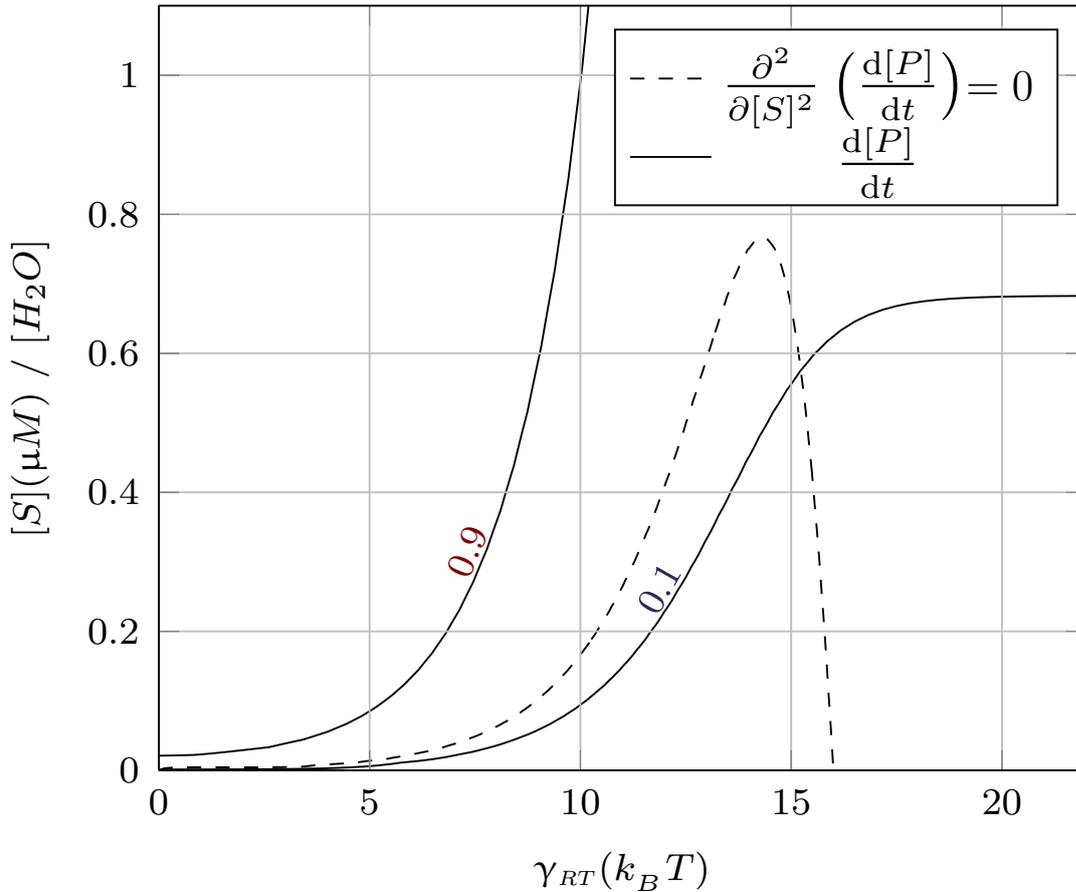


Figura 3.13: Curvas de nível da taxa de formação de produto e sua derivada segunda em relação à concentração de substrato. A curva pontilhada mapeia os pontos onde a derivada segunda (relativa a $[S]$) é nula para as variáveis $[S]$ e γ_{RT} no primeiro quadrante dos eixos e mostra para quais valores positivos de $[S]$ existem pontos de inflexão para cada γ_{RT} . Já as linhas com as marcações 0.1 e 0.9 pode ser usada para se calcular a variação de substrato necessária para que a taxa de formação de produto varie de 10% para 90% do seu valor máximo para um dado γ_{RT} . Parâmetros matidos fixos: $[I] = 0$; $\Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Na Figura 3.14 é possível olhar por outro ângulo o que foi mostrado na Figura 3.13,

⁸Cujo valor, mencionado no Capítulo 1 deste trabalho, é de $R_S = 81$

onde à medida que γ_{RT} cresce a abscissa do ponto de inflexão se desloca para a direita. Como consequência disto, o fator R_S será cada vez maior e atingirá o limite $R_S = 81$ dado pelo modelo de Michaelis-Menten, que pode ser calculado facilmente pela Eq. 3.43 ou usando diretamente a Eq. 1.11.

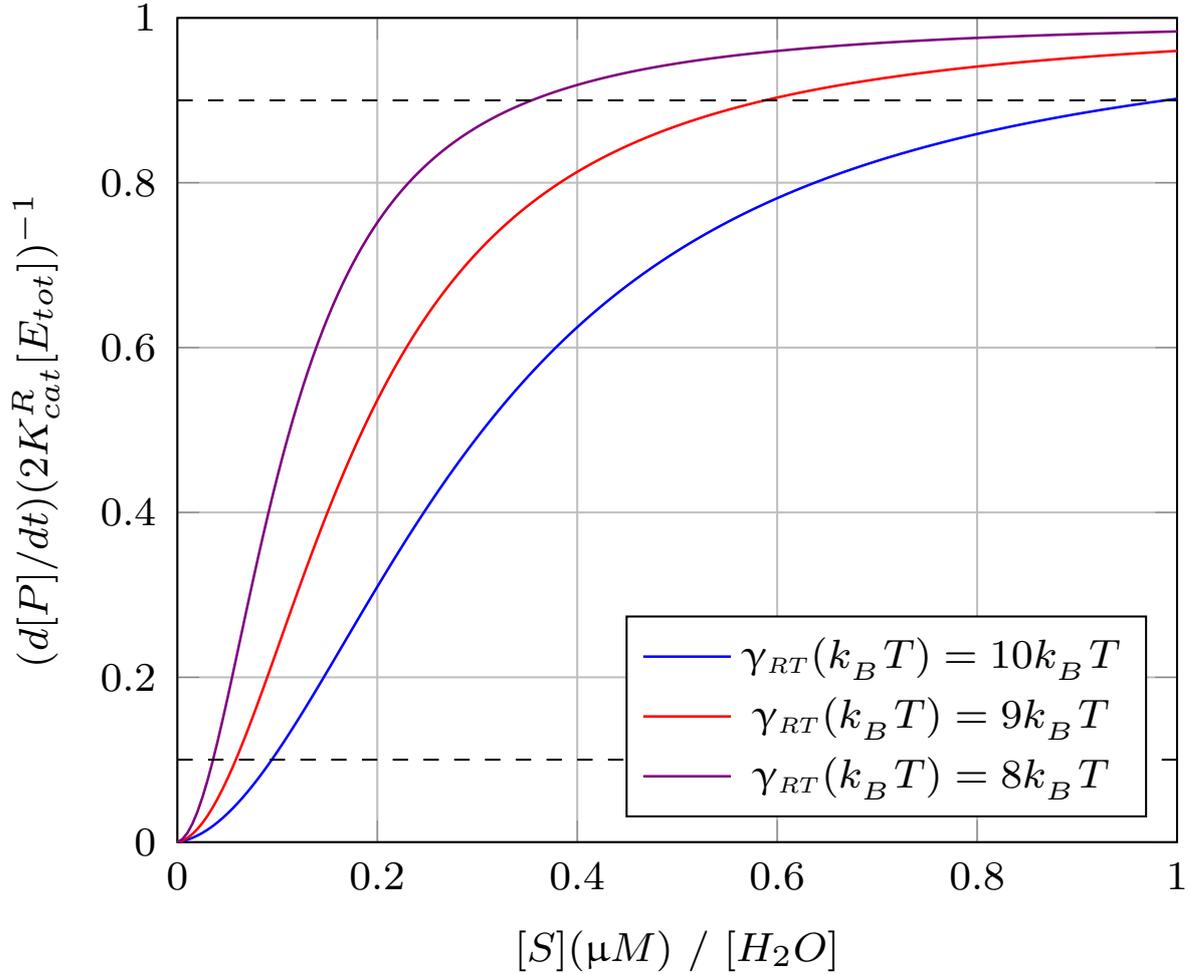


Figura 3.14: Taxa de formação do produto para valores em função da concentração de substrato. As curvas mostram como a velocidade de formação de produto varia para valores distintos de γ_{RT} onde existem pontos de inflexão para $[S] > 0$. Aqui pode ser observado, por uma perspectiva diferente, o que foi explicado na Figura 3.13 e é possível usá-la como guia para identificar a posição dos pontos de inflexão.

Parâmetros mantidos fixos: $[I] = 0$; $\Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Para as próximas simulações será considerada a existência de uma concentração de inibidor no reservatório da mesma ordem da concentração de substrato (Figuras de 3.15 a 3.20), com a mesma afinidade que o substrato pelo estado R ($\Delta\epsilon_S^R = \Delta\epsilon_I^R$) e maior

afinidade pelo estado T , de modo a obedecer sempre a relação $\Delta\epsilon_I^T < \Delta\epsilon_I^R$.

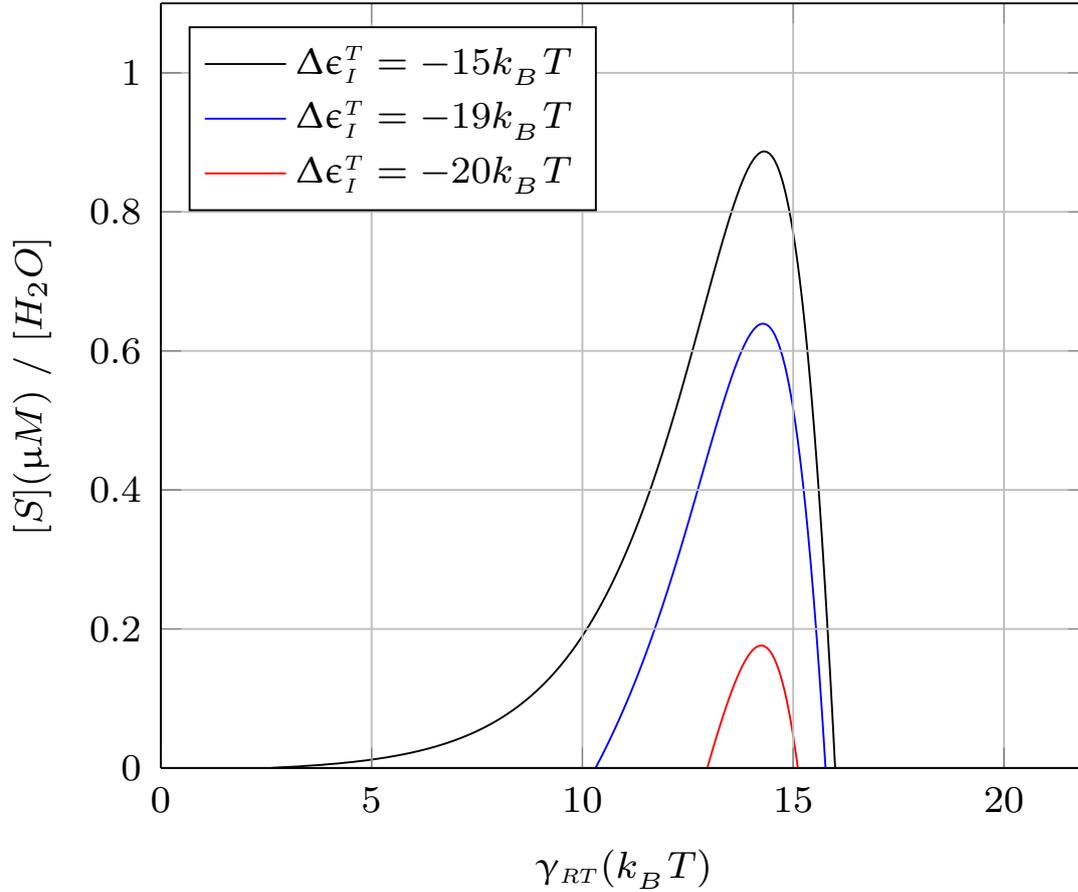


Figura 3.15: Curvas de nível da derivada segunda da taxa de formação de produto em relação à concentração de substrato. As curvas acima mapeiam os pontos onde a derivada segunda (relativa a $[S]$) é nula para as variáveis $[S]$ e γ_{RT} no primeiro quadrante dos eixos e mostram a interferência do inibidor sobre a distribuição de pontos de inflexão para $\frac{d[P]}{dt} \times [S]$. Ao aumentar a estabilidade do complexo inibidor-enzima para a forma alostérica T , ocorre uma redução do intervalo de valores de γ_{RT} para os quais existem pontos de inflexão para valores positivos de $[S]$, além de reduzir o valor máximo de $[S]$ para o ponto de inflexão.

Parâmetros matidos fixos: $[I]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_S^R = \Delta\epsilon_I^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Seguindo estas especificações, a simulação apresentada da Figura 3.15 mostra o efeito da afinidade do inibidor para o estado T sobre as coordenadas do ponto de inflexão (nível da derivada segunda nula). Como é possível notar, à medida que $\Delta\epsilon_I^T$ diminui e se aproxima de $\Delta\epsilon_S^T$ o valor máximo de concentração de substrato para o ponto de inflexão se aproxima de $[S] = 0$ e os valores de energia de transição possíveis para a ocorrência de

efeito cooperativo se restringem a um intervalo cada vez menor.

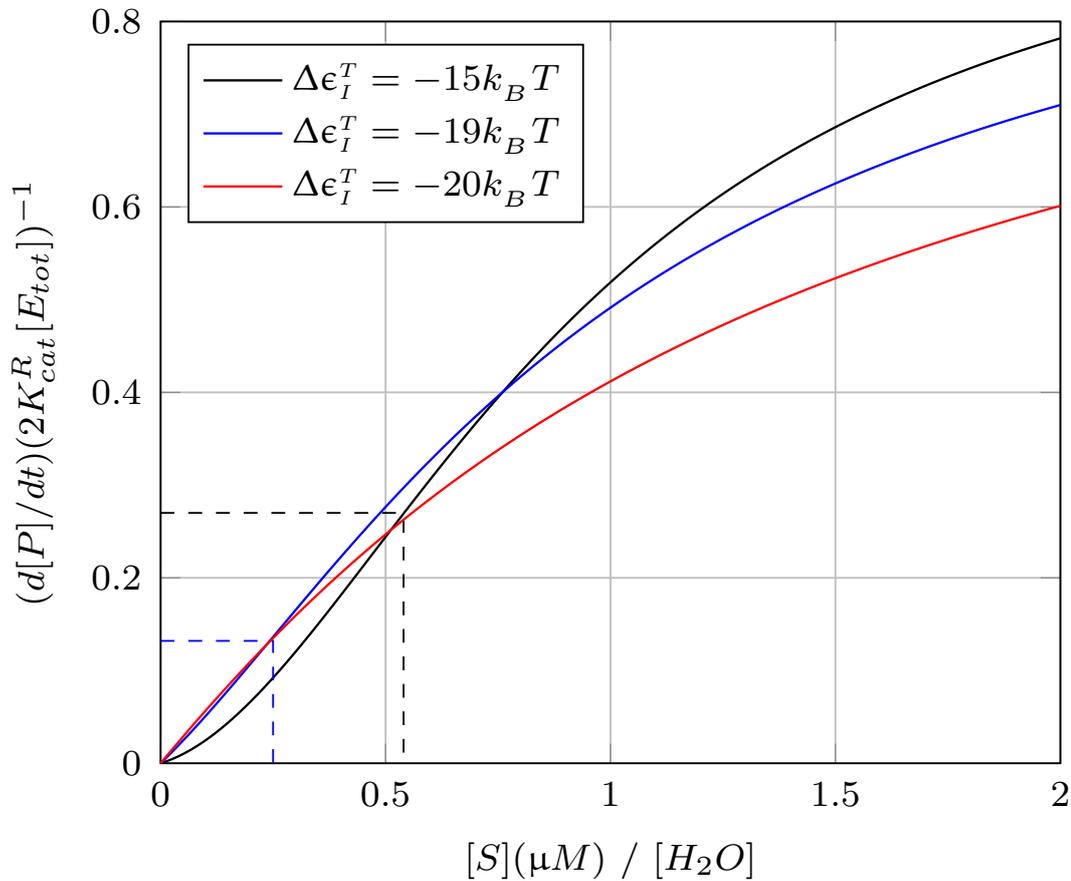


Figura 3.16: Taxa de formação do produto em função da concentração de substrato. As curvas mostram como a velocidade de formação de produto varia para valores distintos de $\Delta\epsilon_I^T$ e $\gamma_{RT} = 12k_B T$. Como foi explicado na Figura 3.15, os pontos de inflexão dependem da estabilidade do complexo inibidor-enzima e provocam uma modificação distinta da encontrada na Figura 3.14 com relação aos valores de $[S]$ para 10% da velocidade máxima. Além disso, nota-se que a força de interação do inibidor com a forma alostérica T pode eliminar o ponto de inflexão do quadrante positivo, como acontece na curva de cor vermelha, o que pode gerar uma falsa interpretação de que a enzima não possui estados alostéricos distintos.

Parâmetros matidos fixos: $[I]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_S^R = \Delta\epsilon_I^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$; $\gamma_{RT} = 12k_B T$

Para explicar a relevância do resultado anterior, considere que para uma dada série de inibidores a energia necessária para se tirar uma molécula da solução e colocá-la no sítio de uma enzima no estado R ($\Delta\epsilon_I^R$) seja aproximadamente igual para todos os inibidores desta série e para o substrato, porém cada um deles apresentam variações de energia

diferentes para o estado T (como os casos mostrados nas Figuras 3.15 e 3.16). Caso a enzima possua dois estados alostéricos bem definidos, a energia de transição entre eles será aproximadamente fixa.

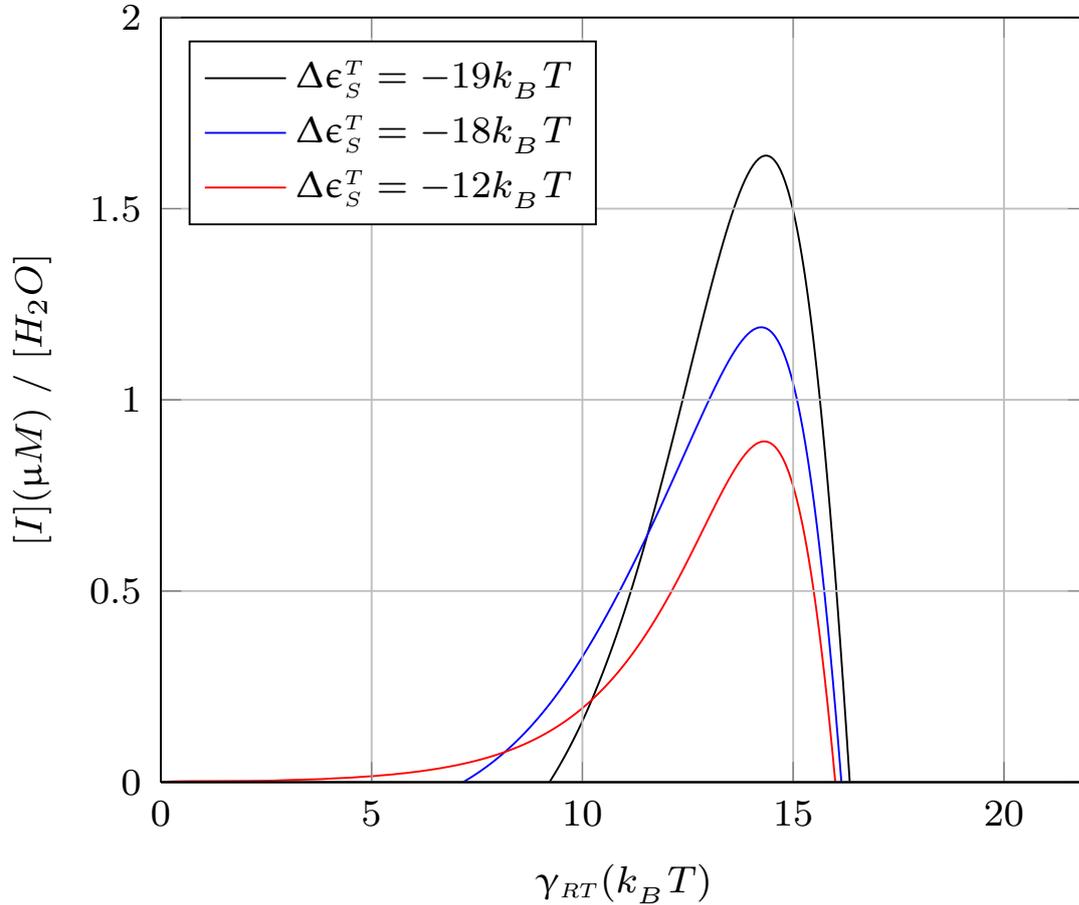


Figura 3.17: Curvas de nível da derivada segunda da taxa de formação de produto em relação à concentração de inibidor. As curvas acima mapeiam os pontos onde a derivada segunda (relativa à $[I]$) é nula para as variáveis $[I]$ e γ_{RT} no primeiro quadrante dos eixos e mostram a interferência do substrato sobre a distribuição de pontos de inflexão para $\frac{d[P]}{dt} \times [I]$. Ao aumentar a estabilidade do complexo substrato-enzima para a forma alostérica T da enzima, ocorre uma redução do intervalo de valores de γ_{RT} para os quais existem pontos de inflexão para valores positivos de $[I]$, porém isto implica em um aumento dos valores máximos de $[I]$ para os pontos de inflexão. Parâmetros matidos fixos: $[S]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Nesta situação, segue o exemplo numérico apresentado na Figura 3.16: com a energia de transição fixada $12k_B T$, é possível notar que para inibidores com $\Delta\epsilon_I^T \approx \Delta\epsilon_S^T$ o

ponto de inflexão da curva $v \times [S]$ desaparece, de forma que não é possível mais identificar a existência de estados alostéricos causando cooperatividade positiva por meio desta curva.

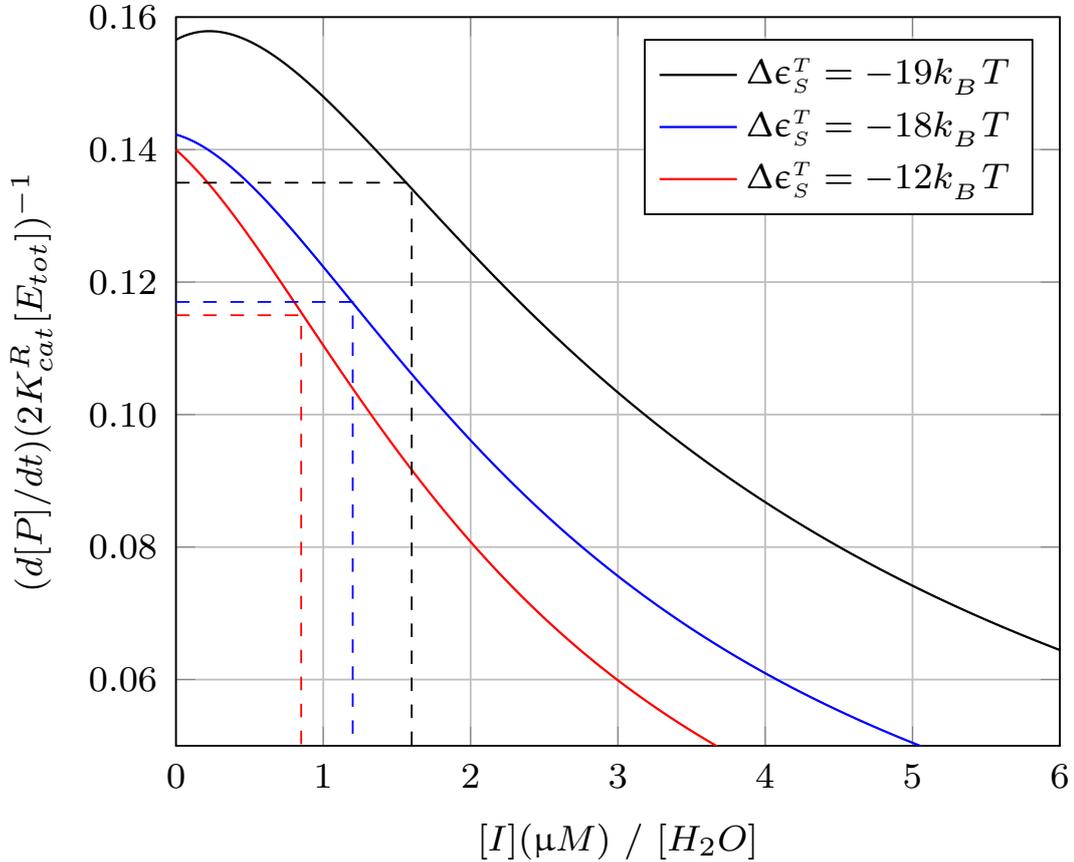


Figura 3.18: Taxa de formação de produto em função da concentração de inibidor. As curvas mostram como a velocidade de formação de produto varia para valores distintos de $\Delta\epsilon_S^R$ e $\gamma_{RT} = 14k_B T$. Como explicado na Figura 3.17, os pontos de inflexão dependem da estabilidade do complexo substrato-enzima. Além disso, nota-se que a força de interação do substrato com a forma alostérica T da enzima pode causar um pico na velocidade de formação de produto, como acontece na curva de cor preta.

Parâmetros matidos fixos: $[S]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$; $\gamma_{RT} = 14k_B T$

Um efeito similar ocorre na curva de inibição ($v \times [I]$), mostrado nas Figuras 3.17 e 3.18. Porém neste caso, mantendo-se fixo $\Delta\epsilon_I^T$ e variando $\Delta\epsilon_S^T$ o valor máximo de $[I]$ para o ponto de inflexão se afasta do zero à medida que o intervalo de energia de transição alostérica é reduzida.

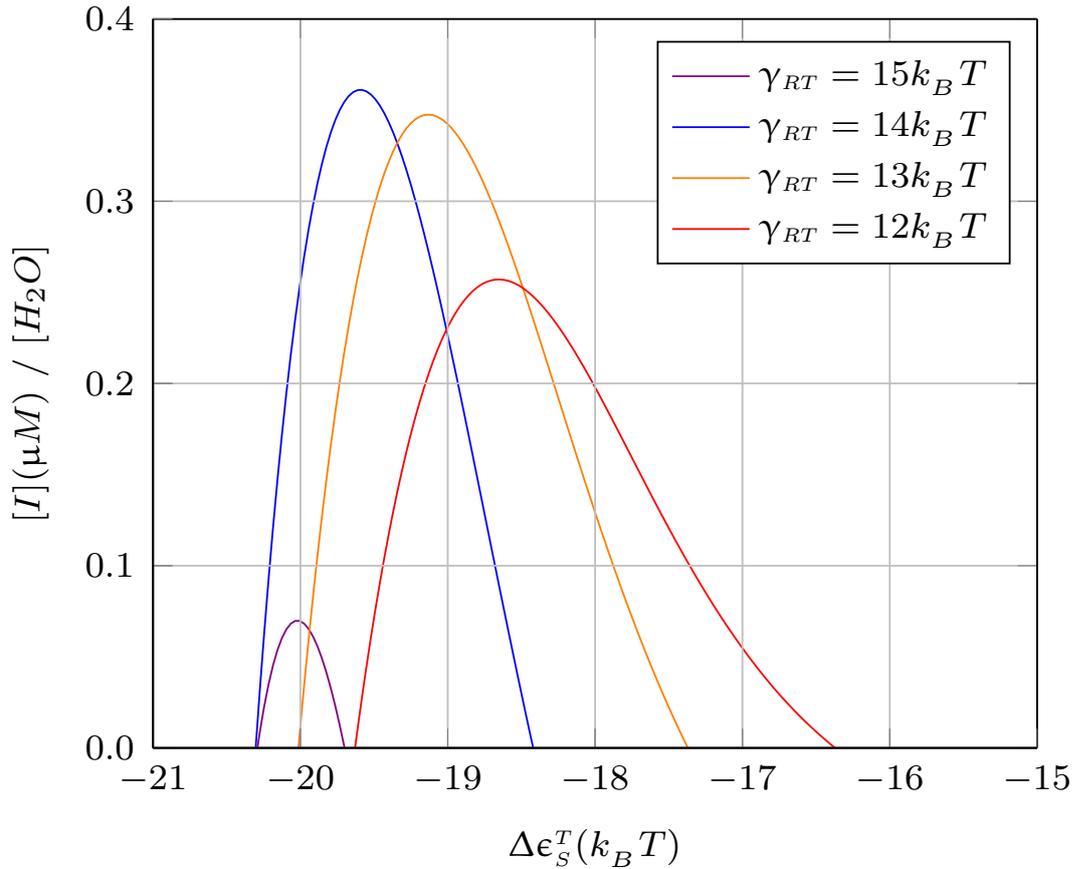


Figura 3.19: Curva de nível da derivada primeira da velocidade de formação de produto em relação a concentração de inibidor, para as variáveis $[I]$ e $\Delta\epsilon_S^T$ com diferentes valores de γ_{RT} . As quatro curvas são relativas aos valores onde a derivada se anula, apontando existência de pontos críticos. É possível confirmar pela Figura 3.20 que tais pontos se tratam de máximos para a curva $\frac{d[P]}{dt} \times [I]$ e mostram que também é possível modelar o fenômeno da ativação da enzima pelo inibidor usando o modelo MWC.

Parâmetros mantidos fixos: $[S]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Para finalizar a discussão deste modelo será feita uma aplicação na modelagem do fenômeno da ativação da enzima pelo inibidor, já discutida para o modelo KNF. Primeiramente vale lembrar que neste trabalho a ativação da enzima pelo inibidor remete ao fato de que, em uma situação específica, o inibidor competitivo pode gerar aumento da velocidade da reação para um dado intervalo de concentração. Como no limite $[I] \gg [S] \gg [E_{tot}]$ para inibição competitiva a velocidade tende a zero, espera-se um pico na curva $v \times [I]$. Por esse motivo, foi traçada uma curva de nível da derivada primeira da

taxa de formação de produto em relação à concentração de inibidor para as coordenadas $[I]$ e $\Delta\epsilon_S^T$ (Figura 3.19), onde para alguns valores de γ_{RT} observa-se que existe o nível onde a derivada se anula.

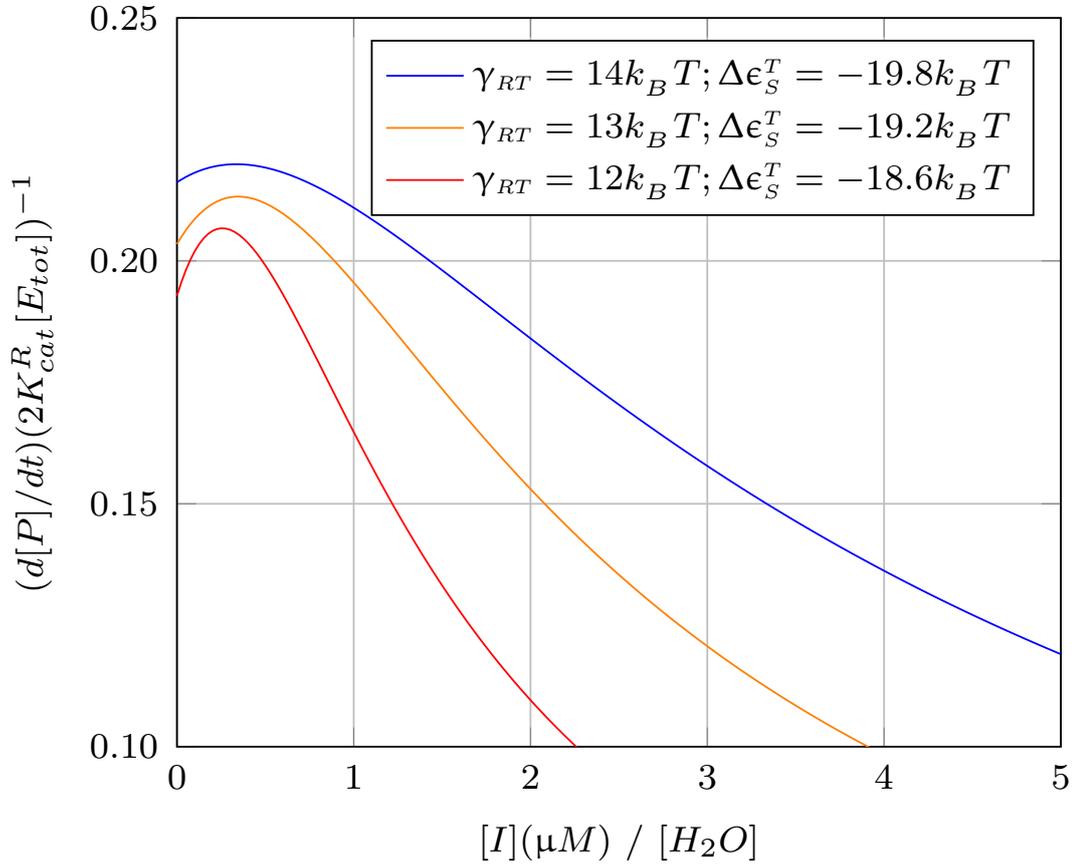


Figura 3.20: Velocidade de formação de produto em função da concentração de substrato, mostrando máximos da velocidade para baixas concentrações de inibidor e as modificações geradas pelas diferentes energias de transição entre os estados R e T da enzima (γ_{RT}) e da afinidade do substrato com o estado T . Os valores escolhidos para γ_{RT} e $\Delta\epsilon_S^T$ foram aproximadamente as coordenadas de máximo $[I]$ apresentadas nas curvas de nível da Figura 3.19. Como consequência, pontos de máximo todas as curvas apresentam ponto de inflexão no quadrante positivo.

Parâmetros mantidos fixos: $[S]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

A partir desta curva de nível foi possível escolher valores de $\Delta\epsilon_S^T$ e γ_{RT} para construir a curva $v \times [I]$ e observar os máximos formados para baixas concentrações de inibidor (Figura 3.20).

O possível mecanismo biológico para explicar a ocorrência deste pico, pelo modelo

MWC, é que para baixas concentrações de inibidor, poucas enzimas estão com seus sítios ocupados e, ao inserir o inibidor no reservatório, este começa a se ligar a um dos sítios das enzimas. Como o estado T é o mais estável quando um de seus sítios estão ocupados, o inibidor promove mais estruturas do estado R para T . À medida que se aumenta a concentração de inibidor, iniciando de $[I] = 0$, mais moléculas de substrato ocuparão o segundo sítio de enzimas no estado T , aumentando a velocidade da reação. Depois de uma certa concentração de inibidor, a competição pelo segundo sítio passa a ser mais forte e velocidade volta a cair.

3.2 EQUAÇÃO DO IC_{50}

3.2.1 Enzima de Michaelis-Menten

Para um inibidor ser efetivo na competição com o substrato pelo sítio ativo é preciso que em baixas concentrações de inibidor ocorra uma redução significativa na velocidade da reação. Esta característica é importante principalmente para o monitoramento terapêutico de drogas (TDM⁹) [35], onde a concentração plasmática do fármaco deve se encontrar em uma faixa abaixo de um valor referência para a toxicidade e acima da dosagem subterapêutica.

Uma maneira de medir comportamento funcional da inibição é através do IC_{50} , definido como a concentração de inibidor necessária para se reduzir pela metade a velocidade da reação sem inibidor [9]:

$$\left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{[I]=IC_{50}} = \frac{1}{2} \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{[I]=0} \quad (3.45)$$

Aplicando a Eq.3.45 na Eq.3.18, e rearranjando os termos para isolar IC_{50} , fica:

$$IC_{50} = [H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_I} \left[1 + \frac{[S]}{[H_2O]}e^{-\beta\Delta\epsilon_S} \right] \quad (3.46)$$

3.2.2 Modelo KNF

Ao aplicar a definição do IC_{50} para Eq.3.31 e isolar a variável y , obtém-se a equação do segundo grau $y^2 + 2b - c = 0$, com solução

$$y = -b \pm \sqrt{b^2 + c}.$$

Os parâmetros b e c são:

⁹Do inglês Therapeutic Drug Monitoring

$$\begin{cases} b = Z_{II}^{-1} + xZ_{SI}Z_{II}^{-1} \left(1 - \frac{1 + 2x + x^2Z_{SS}}{x + x^2\zeta^S Z_{SS}} \right) \\ c = Z_{II}^{-1}(1 + 2x + x^2Z_{SS}) \end{cases} \quad (3.47)$$

Mas $b^2 + c > b^2 \geq 0$, pois $c > 0$. Então y assume apenas um valor, pois por definição deve ser positivo, ou seja, $y = -b + \sqrt{b^2 + c}$. Como $y = y(IC_{50})$, basta inverter a função para obter

$$IC_{50} = [H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_I}y \quad (3.48)$$

com $y = y(b, c)$

Na Eq. 3.48 todo o efeito cooperativo fica concentrado no fator y . Por esse motivo, todos os casos envolvendo inibição competitiva para homodímeros podem ser ajustados por alteração dos parâmetros contidos em y . Uma simples verificação pode ser feita escrevendo $Z_{lm} = 1$ (ou $J_{lm} = 0$) e $\zeta^l = 1$ para recuperar a Eq. 3.46.

Análise Gráfica e Discussão

Como foi mostrado anteriormente, nas discussões sobre a velocidade de formação de produto, não é possível diferenciar uma enzima sem interação cooperativa de uma com cooperatividade negativa. Apenas se nota a existência de ponto de inflexão para interações positivas. Porém, simulações com a Eq. 3.48 (Figuras de 3.21 a 3.24) mostram que existem diferenças entre os dois tipos de interação, os quais serão discutidos a seguir.

Primeiramente usou-se a Eq. 3.48 com $J_{mm} = 0$ e $\zeta^m = 1$ (sem interação). Nessa configuração, a curva do IC_{50} em função da concentração de substrato é uma reta de coeficiente angular igual a um (Figura 3.21) quando a competição ocorre sem diferenças de afinidade para os complexos enzima-inibidor e enzima-substrato ($\Delta\epsilon_m = -10k_B T$). A inclinação da curva aumenta quando o complexo enzima-substrato tem maior afinidade ($\Delta\epsilon_S < \Delta\epsilon_I$) ou reduz caso o inibidor forme um complexo mais estável ($\Delta\epsilon_I < \Delta\epsilon_S$).

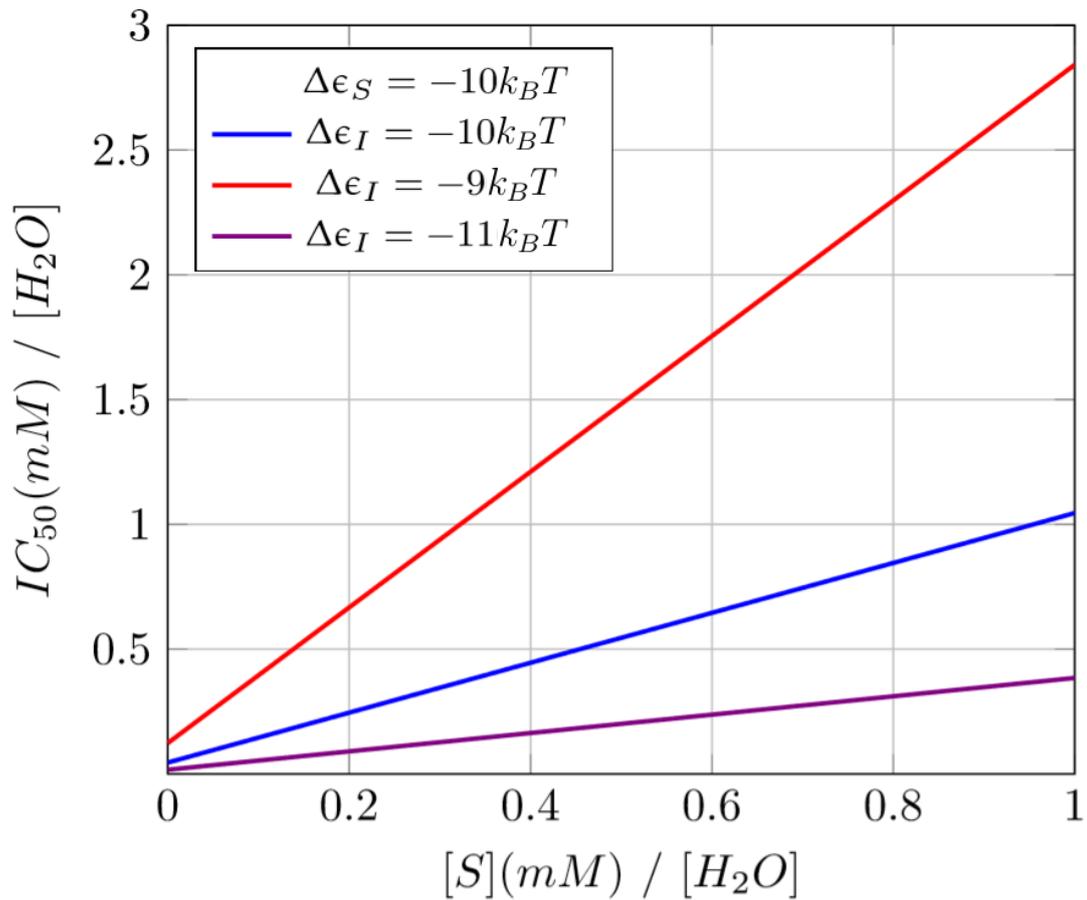


Figura 3.21: Simulação do $IC_{50} \times [S]$ para o modelo sem interação cooperativa, mostrando o comportamento de enzimas de Michaelis-Menten para inibição competitiva. Nas curvas acima é possível notar que quanto menos estável o complexo enzima-inibidor (EI e IEI) em relação a enzima-substrato (ES e SES) maior será a concentração de inibidor utilizada para causar redução de 50% na velocidade de formação de produto. É possível notar no para $[S] = 0$ o $IC_{50} \neq 0$, porém o que acontece é que existe uma descontinuidade da função IC_{50} , que pela sua definição deveria ser zero. Na situação limite onde a concentração de substrato tende a zero, mas não é nula, deve existir uma quantidade não nula de inibidor que obedeça a definição dada pela Eq. 3.45, gerando $IC_{50} \neq 0$ para $[S] \rightarrow 0$

(Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = -10k_B T$; $J_{Im} = 0$; $\zeta^m = 1$)

Na situação em que existe apenas interação para pares de substrato ($|J_{SS}| > 0$) ou se as demais interações são muito fracas em comparação com a do complexo SES ao ponto de ser possível desprezá-las, a curva $IC_{50} \times [S]$ não será mais linear. Como mostram as Figuras 3.22 e 3.23, a cooperatividade positiva tem concavidade voltada para cima e a negativa tem concavidade para baixo.

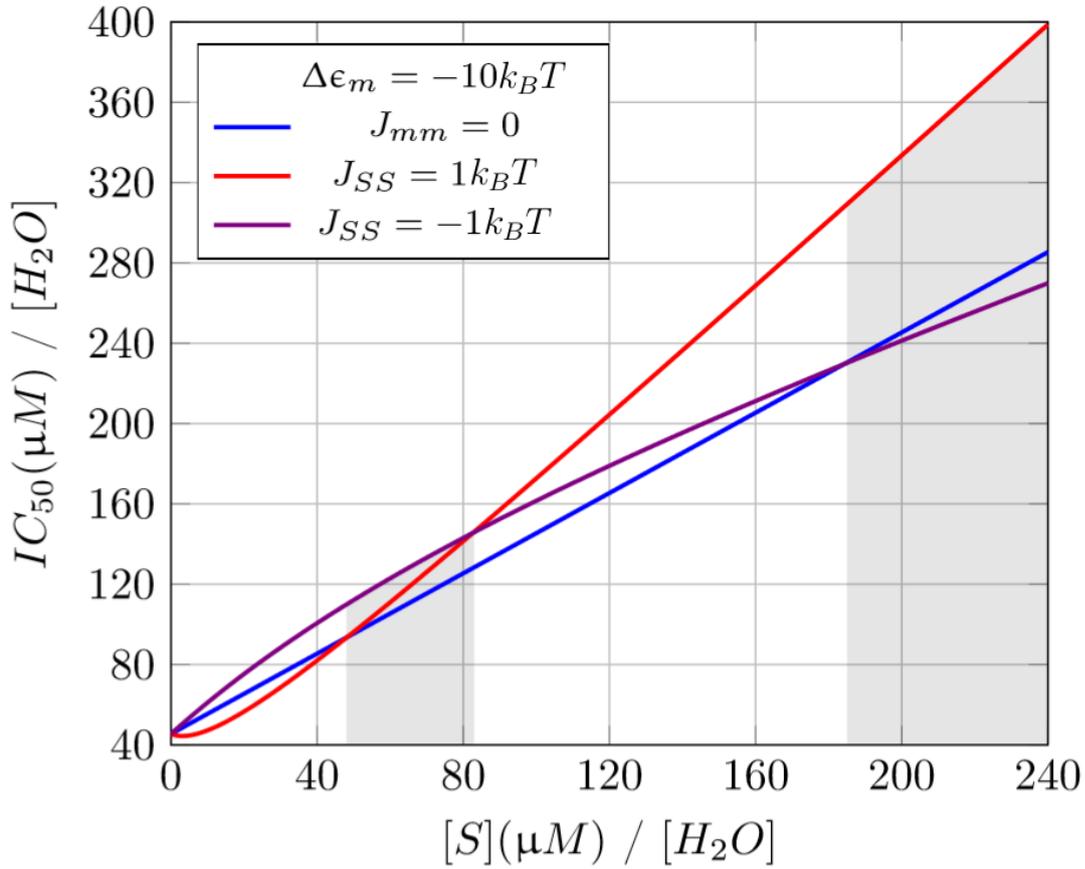


Figura 3.22: Simulação do $IC_{50} \times [S]$ para interação cooperativa predominante para o par substrato-substrato em relação aos demais, mostrando diferentes relações dos valores de IC_{50} para faixas de concentração de substrato: na primeira faixa ($[S]/[H_2O] < 48 \cdot 10^{-6}$) a interação positiva tem menor crescimento para variação da concentração de substrato se comparada com as demais, além de apresentar um ponto mínimo, como é possível notar pela raiz da derivada primeira (curva vermelha da Figura 3.23); na segunda faixa ($48 \cdot 10^{-6} < [S]/[H_2O] < 83 \cdot 10^{-6}$) a interação positiva não apresenta mais o menor crescimento, porém se mantém abaixo da curva de cooperatividade negativa; na terceira faixa ($83 \cdot 10^{-6} < [S]/[H_2O] < 185 \cdot 10^{-6}$) o IC_{50} passa a ser maior para a interação positiva, porém a curva da cooperatividade negativa continua acima da curva sem interação; na última faixa ($[S]/[H_2O] > 185 \cdot 10^{-6}$) a cooperatividade negativa gera valores menores de IC_{50} e a relação aumento e redução da afinidade do complexo enzima-substrato passa a ser compatível com o mostrado na Figura 3.21.

(Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = \Delta\epsilon_I = -10k_B T$; $J_{SI} = J_{II} = 0$; $\zeta^m = 1$)

Além disso, a Figura 3.22 mostra o aparecimento de quatro faixas de concentração de substrato onde os valores de IC_{50} tem comportamento distinto para $J_{SS} = 1k_B T$, $J_{SS} = -1k_B T$ e $J_{SS} = 0$. Se comparado com a simulação sem interação (Figura 3.21) é

possível ver que existem diferenças importantes ao se aumentar ou diminuir a afinidade da enzima pelo substrato em relação ao inibidor por meio do $\Delta\epsilon$ ou do J , onde para baixas concentrações de substrato a relação se mostra inversa ao que seria esperado.

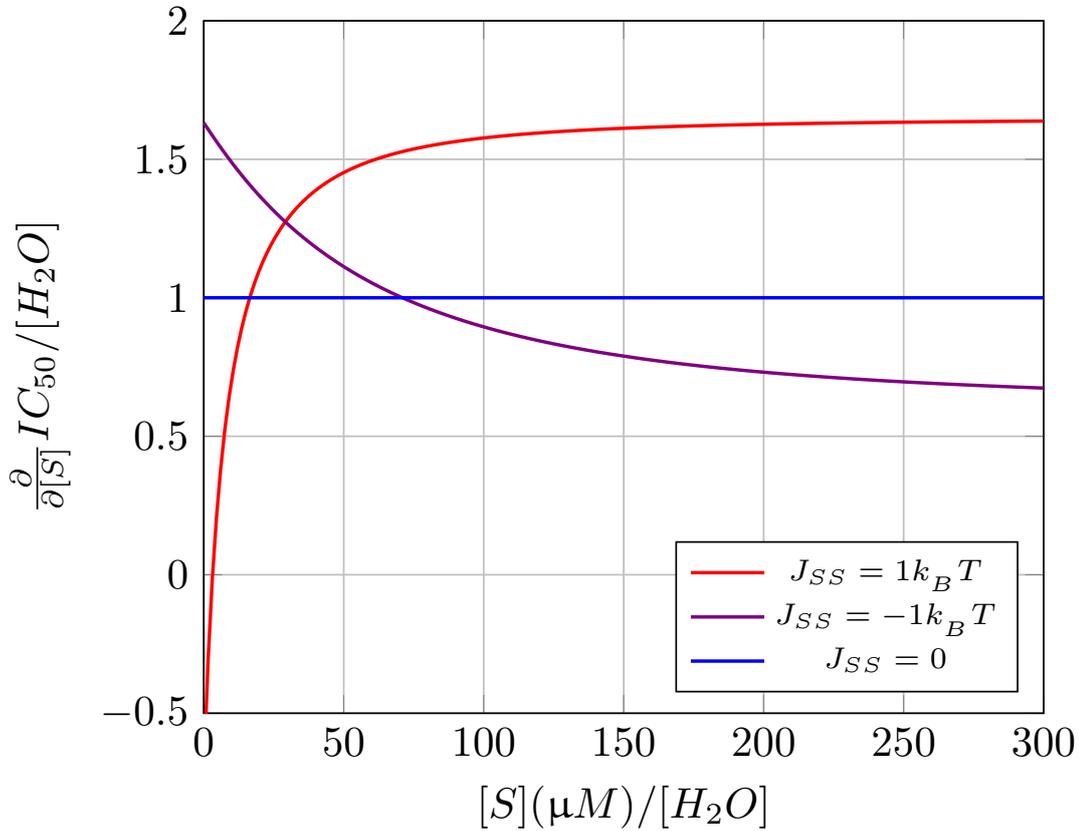


Figura 3.23: Simulação do $\partial_{[S]}IC_{50} \times [S]$ mostrando o crescimento e a concavidade das curvas do IC_{50} para cooperatividade positiva e negativa. A curva com interação positiva (vermelha) tem crescimento rápido para baixa concentração de substrato, com valores inicialmente negativos, passando pelo zero (ponto de mínimo da função $IC_{50}([S]|J_{SS} > 0)$) com comportamento assintótico para valores mais altos de $[S]$, de forma que a concavidade da função é preservada e a inclinação aproximada será maior do que a da curva $IC_{50}([S]|J_{SS} = 0)$ para o intervalo considerado. No caso de interação negativa a curva da derivada primeira (violeta) decresce com comportamento assintótico sem o surgimento de raízes, ou seja, a função $IC_{50}([S]|J_{SS} < 0)$ não apresenta ponto de máximo e tende para uma inclinação aproximadamente contante para e menor do que a inclinação do $IC_{50}([S]|J_{SS} = 0)$.

(Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = \Delta\epsilon_I = -10k_B T$; $J_{SI} = J_{II} = 0$; $\zeta^m = 1$)

Já para altas concentrações de substrato uma porcentagem alta de enzimas tem pelo menos um sítio ocupado e a competição pelo segundo sítio passa a ser predominante. Nesta

situação, a menor energia para o sistema ocorre para a molécula que melhor estabiliza o segundo sítio. Dessa forma, no caso de cooperatividade positiva para o substrato, o complexo SES será mais estável do que o SEI , gerando valores de IC_{50} maiores. Já quando ocorre cooperatividade negativa o complexo ESI será mais estável.

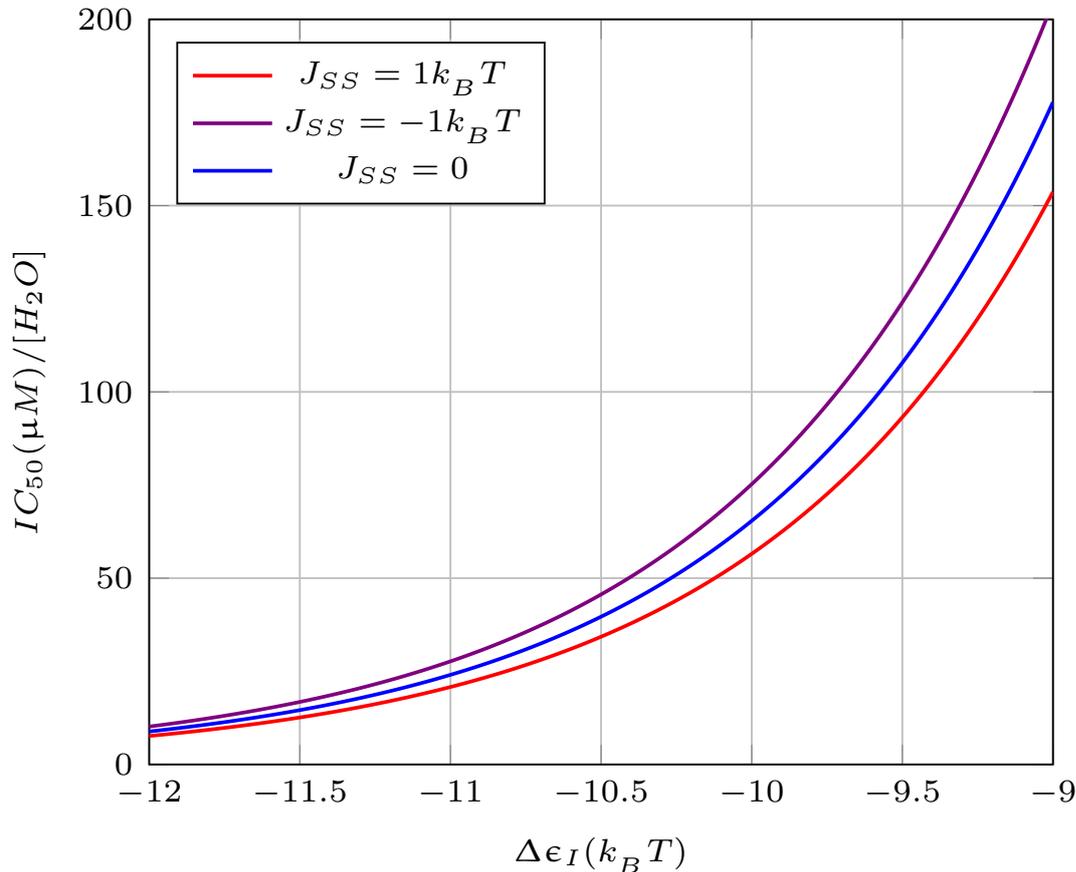


Figura 3.24: Simulação do $IC_{50} \times \Delta\epsilon_I$ no intervalo $[S]/[H_2O] < 48 \cdot 10^{-6}$, mostrando o crescimento exponencial do IC_{50} para variação dos valores de $\Delta\epsilon_I$ próximos dos valores de $\Delta\epsilon_S$. É possível notar que a relação entre os valores de IC_{50} ainda se mantém quando $\Delta\epsilon_I \neq \Delta\epsilon_S$. (Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = -10k_B T$; $[S]/[H_2O] = 20 \cdot 10^{-6}$; $J_{SI} = J_{II} = 0$; $\zeta^m = 1$)

Outro efeito importante, porém menos perceptível, ocorre para $|J_{SI}| \gg J_{mm}$ (Figuras 3.25 e 3.26). Quando $J_{SI} > 0$ a função $IC_{50}([S])$ tem valores consideravelmente mais altos se comparados com o caso sem interação (Figuras 3.25). Isto ocorre devido ao fenômeno da ativação do inibidor, analisado anteriormente para a velocidade de formação de produto (Figuras 3.9, 3.10 e 3.11), que ao promover maior estabilidade do complexo ESI , gera a necessidade de uma grande concentração de inibidor para que a velocidade da

reação tenha a redução dada pela definição do IC_{50} (Eq. 3.45). Já a interação $J_{SI} < 0$ causa redução da estabilidade do complexo ESI , sendo preciso uma concentração menor de inibidor para reduzir a atividade da enzima. Para os dois casos ($J_{SI} > 0$ e $J_{SI} < 0$) concavidade da curva é voltada para cima, com comportamento assintótico para a inclinação da curva sem interação (Figuras 3.26).

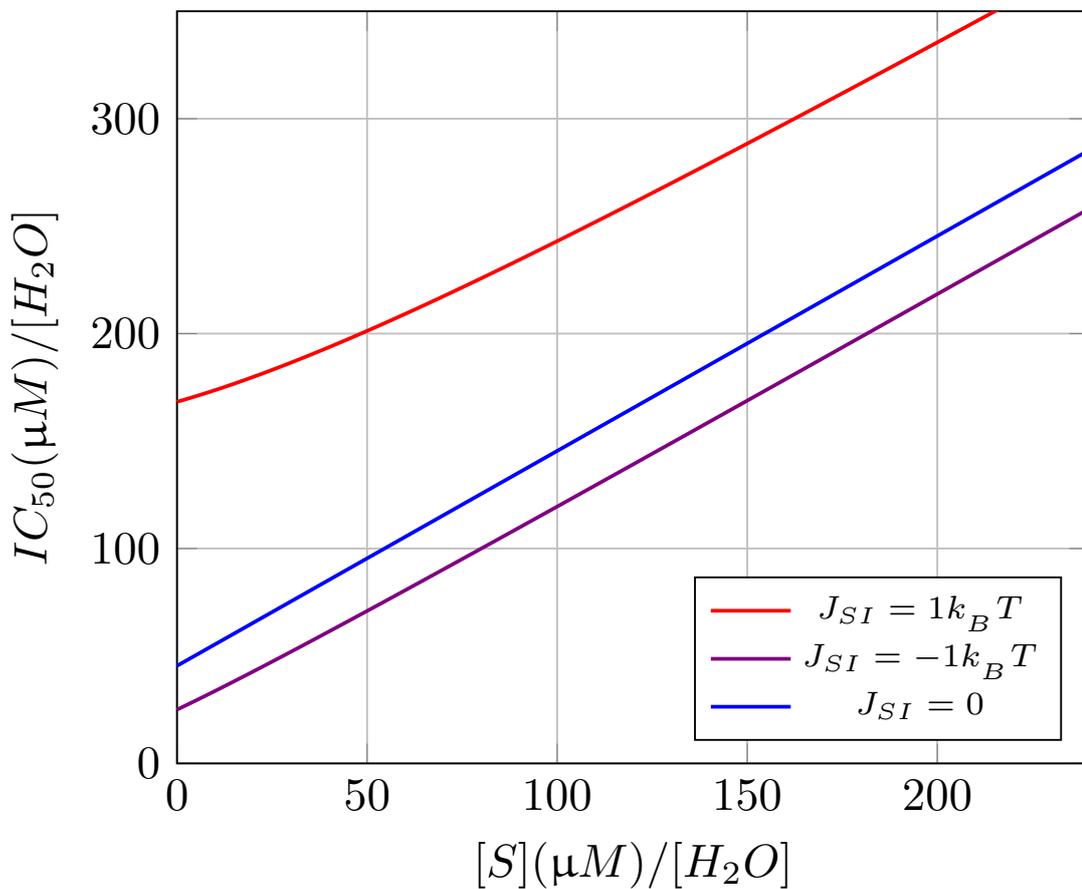


Figura 3.25: Simulação da função IC_{50} para variação da concentração de substrato quando $|J_{SI}| \gg J_{mm}$, mostrando o comportamento aproximadamente linear para $J_{SI} > 0$ ou $J_{SI} < 0$. Para estas duas situações as curvas apresentam concavidade voltada para cima, com uma curvatura pouco perceptível, se tornando necessário analisar a derivada primeira (Figura 3.26). O efeito gerado pela $J_{SI} > 0$ torna o inibidor menos efetivo para qualquer intervalo de concentração de substrato. Por outro lado, a interação negativa ($J_{SI} < 0$) melhora a inibição, porém em ambos os casos o crescimento dos valores de IC_{50} é aproximadamente igual ao do caso sem interação. (Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = \Delta\epsilon_I = -10k_B T$; $J_{SS} = J_{II} = 0$; $\zeta^m = 1$)

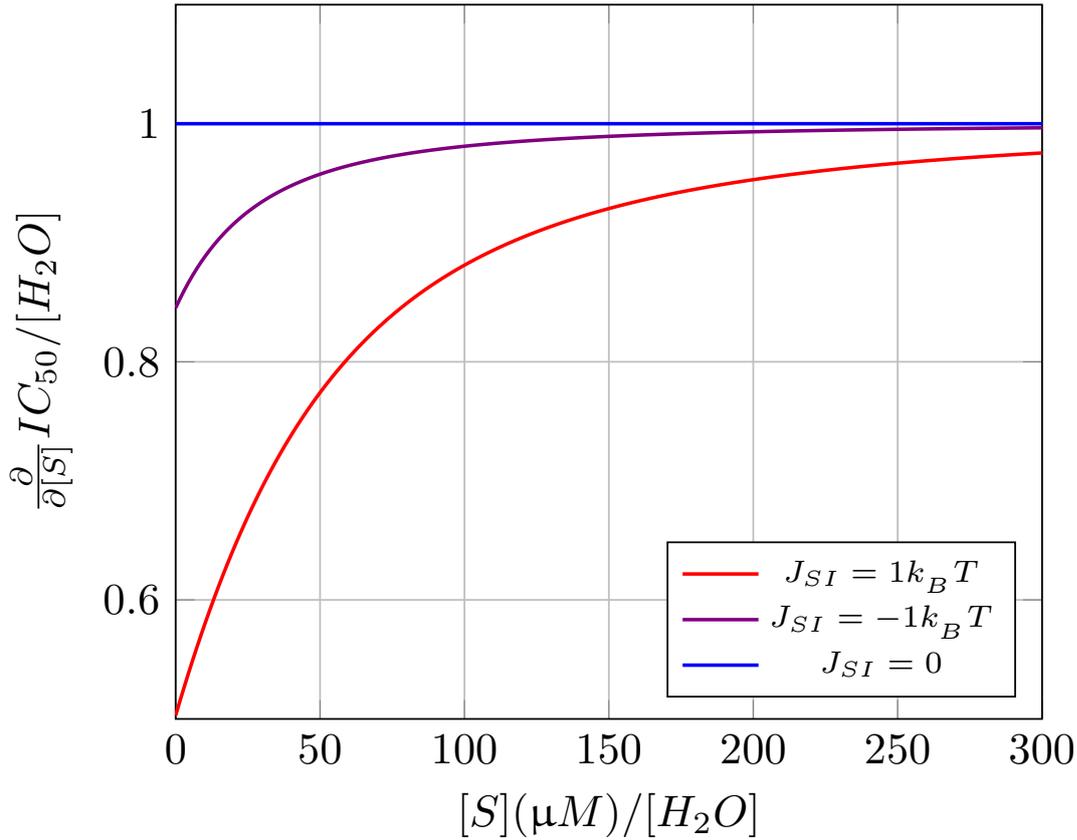


Figura 3.26: Simulação da derivada primeira $\partial_{[S]}IC_{50}$ em função da concentração de substrato para $|J_{SI}| \gg J_{mm}$. As curvas com interação $J_{SI} \neq 0$ possuem valores muito próximos de um, o que torna difícil de se identificar este efeito por um experimento de medição de IC_{50} nas condições utilizadas para a formulação deste modelo.

(Parâmetros mantidos constantes: $\Delta\epsilon_S = \Delta\epsilon_I = -10k_B T$; $J_{SS} = J_{II} = 0$; $\zeta^m = 1$)

3.2.3 Modelo MWC

Das Eqs. 3.43 e 3.45 obtém-se também uma equação do segundo grau, porém agora da concentração de inibidor (y_T e y_R possuem $[I]$ como fator comum). A variável auxiliar y_A , após aplicada a definição do IC_{50} , assume a forma geral $y_A = IC_{50}\lambda_A$ (com $A = R$ ou T), com $\lambda_A = [H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\epsilon_A}$. Isolando o IC_{50} fica:

$$a(IC_{50})^2 + 2b(IC_{50}) - c = 0 \quad (3.49)$$

Os fatores a , b e c são dados por:

$$\begin{cases} a = [x_R(1 + x_R) + \zeta^{RT} Z_{RT} x_T(1 + x_T)] (\lambda_R^2 + Z_{RT} \lambda_T^2) \\ b = Z_{RT} [\zeta^{RT} (1 + x_R) x_T - (1 + x_T) x_R] [\lambda_R(1 + x_T) - Z_{RT} \lambda_T(1 + x_R)] \\ c = [x_R(1 + x_R) + \zeta^{RT} Z_{RT} x_T(1 + x_T)] [(1 + x_R)^2 + Z_{RT}(1 + x_T)^2] \end{cases} \quad (3.50)$$

Assim, a solução geral para o IC_{50} fica:

$$IC_{50} = - \left(\frac{b}{a} \right) \pm \sqrt{\left(\frac{b}{a} \right)^2 + \frac{c}{a}}$$

Mas c , a e b^2 são positivos, de forma que $(b/a) \leq \sqrt{(b/a)^2 + (c/a)}$. Como o IC_{50} é restrito a valores positivos (não existe concentração negativa), existe apenas uma raiz para a equação do segundo grau que satisfaz esta condição:

$$IC_{50} = - \left(\frac{b}{a} \right) + \sqrt{\left(\frac{b}{a} \right)^2 + \frac{c}{a}} \quad (3.51)$$

Para recuperar o modelo de Michaelis-Menten uma das formas R ou T deve ser inacessível. Assim, para existência apenas da forma R o custo de energia para a transição deve ser grande o suficiente para que se possa escrever $\Delta\epsilon_{RT} \rightarrow \infty$, fazendo $Z_{RT} \rightarrow 0$, de forma que a Eq. 3.51 se resumirá à Eq. 3.46

Análise Gráfica e Discussão

Diferentemente do modelo P-KNF, o MWC não traz a possibilidade de estudar interações negativas. Isso porque a enzima, neste caso, não admite transição alostérica individual dos monômeros, de forma que o sinal da energia de transição depende apenas de qual estado alostérico foi tomado como referencial.

Foi mostrado ainda que é possível se recuperar o modelo de Michaelis-Menten fazendo o limite de $\gamma_{RT} \rightarrow \infty$, porém isso não indica qual a velocidade com que o função analisada (IC_{50} ou $\frac{d[P]}{dt}$) se aproxima deste limite ao ponto do efeito cooperativo ser

desprezível. Para analisar o que acontece à medida que γ_{RT} cresce, foi feita uma simulação da Eq. 3.51 para $IC_{50} \times \gamma_{RT}$, tomando o estado R como o mais estável quando os sítios estão desocupado ($\gamma_{RT} > 0$) e fazendo o estado T com maior afinidade para inibidor e substrato ($\Delta\epsilon_m^T < \Delta\epsilon_m^R$), como mostrado na Figura 3.27.

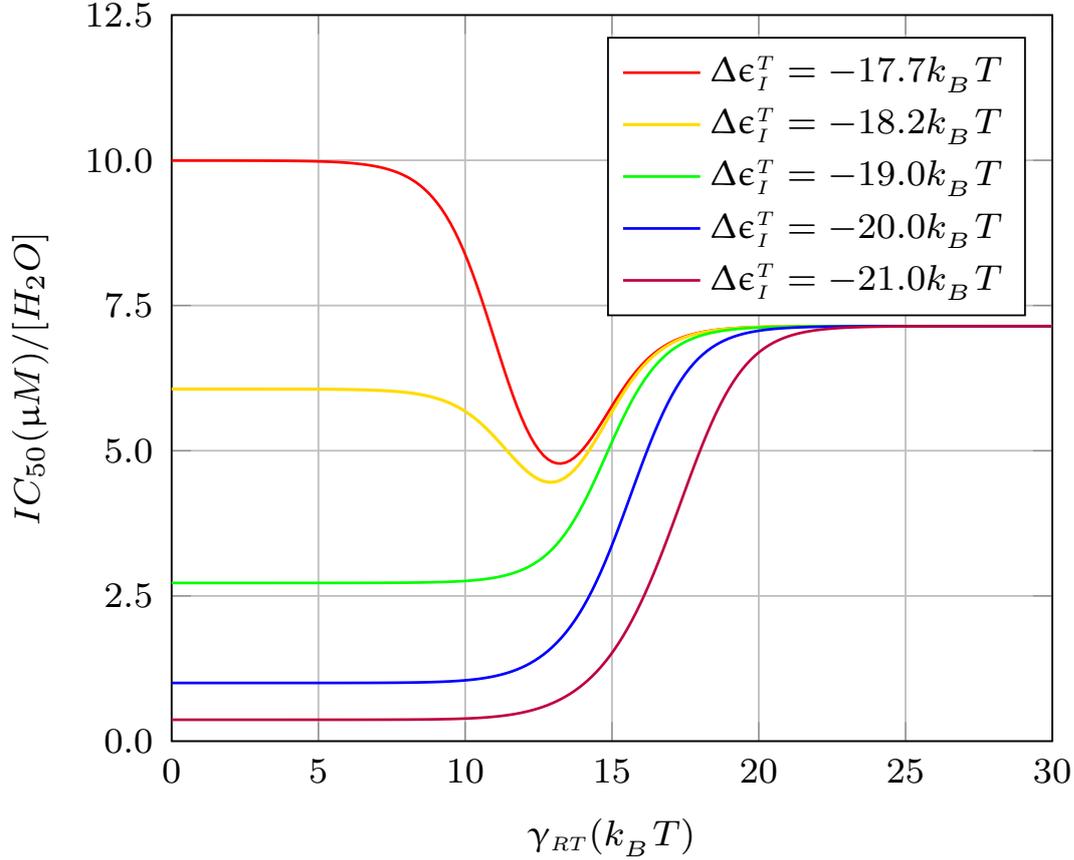


Figura 3.27: Simulação mostrando o comportamento do IC_{50} em função de γ_{RT} para diferentes valores de $\Delta\epsilon_I^T$. Para valores baixos de γ_{RT} o IC_{50} é aproximadamente constante devido à proximidade de energia dos dois estados alostéricos, porém ainda apresenta afeito alostérico, como mostrado na Figura 3.13. Acima de $\gamma_{RT} = 20k_B T$ todas as curvas convergem para um valor fixo de IC_{50} , mostrando que o estado T tem uma participação muito fraca para a dinâmica enzimática.

Os parâmetros mantidos fixos nesta simulação foram: $[S]/[H_2O] = 10^{-6}$; $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Para os parâmetros escolhidos (ver legenda da Figura 3.27) foi possível notar que para $\gamma_{RT} > 25k_B T$ o IC_{50} é aproximadamente constante para diferentes valores de $\Delta\epsilon_I^T$. Nesta situação o sistema terá ainda dois estados alostéricos, porém a maior contribuição

será do estado R , sendo bem difícil de se verificar efeitos de cooperatividade por medidas de IC_{50} . Este resultado indica que não é necessário uma diferença muito grande de energia de transição entre estados alostéricos para que um determinado sistema de enzimas possa ser tratado com a dinâmica de Michaelis-Menten.

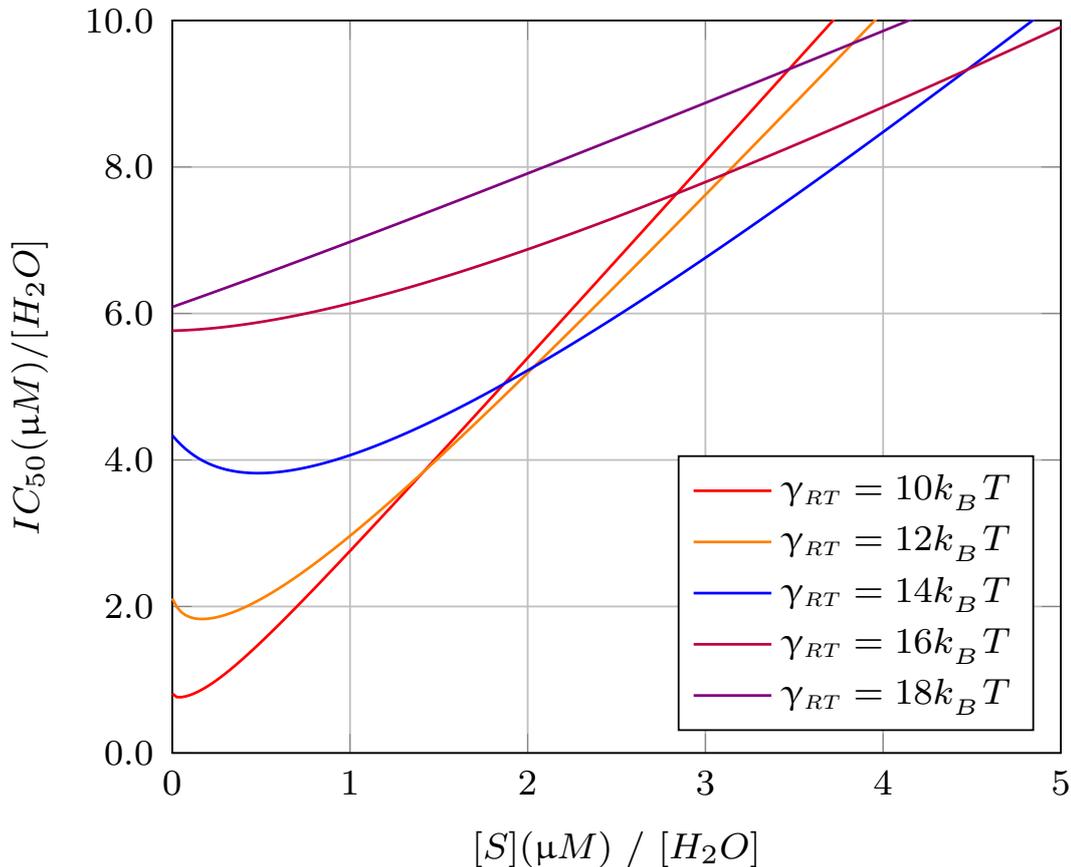


Figura 3.28: Simulação do IC_{50} para variação de concentração de substrato, mostrando concavidade da curva devido a existência de estados alostéricos. O efeito cooperativo positivo se mostra pela concavidade do gráfico voltada para cima e é cada mais aparente para valores de energia de transição mais baixos entre os estados R e T . Para $\gamma_{RT} = 18k_B T$ a curva é praticamente linear se comparada com as demais. Quando a diferença entre $\Delta\epsilon_I^T$ e $\Delta\epsilon_S^T$ é pequena o IC_{50} é menos sensível à variação nas concentrações de substrato se comparado com o a situação onde $\Delta\epsilon_I^T > \Delta\epsilon_S^T$ (ver Figura 3.29)

Os parâmetros mantidos fixos nesta simulação foram: $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -19k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

Notar que algumas curvas no gráfico $IC_{50} \times \gamma_{RT}$ apresentam um mínimo antes de convergirem para um valor constante. Quando a afinidade de inibidor é muito próxima ou

superior à do substrato pelo estado T , a curva não apresenta mais mínimos, apenas um ponto de inflexão. Para ambos os casos o $IC_{50} \times [S]$ tem comportamento não linear (Figuras 3.28 e 3.29) com concavidade mais perceptível para valores no intervalo de $10k_B T < \gamma_{RT} < 20k_B T$ (para os parâmetros da Figura 3.27) e voltada para cima, confirmando resultado obtido anteriormente para cooperatividade positiva pelo modelo P-KNF. Quanto mais próximo de $\gamma_{RT} = 20k_B T$ a curva tende para uma reta, mas para valores intermediários no intervalo considerado acima surge um ponto de mínimo, assim como no modelo P-KNF.

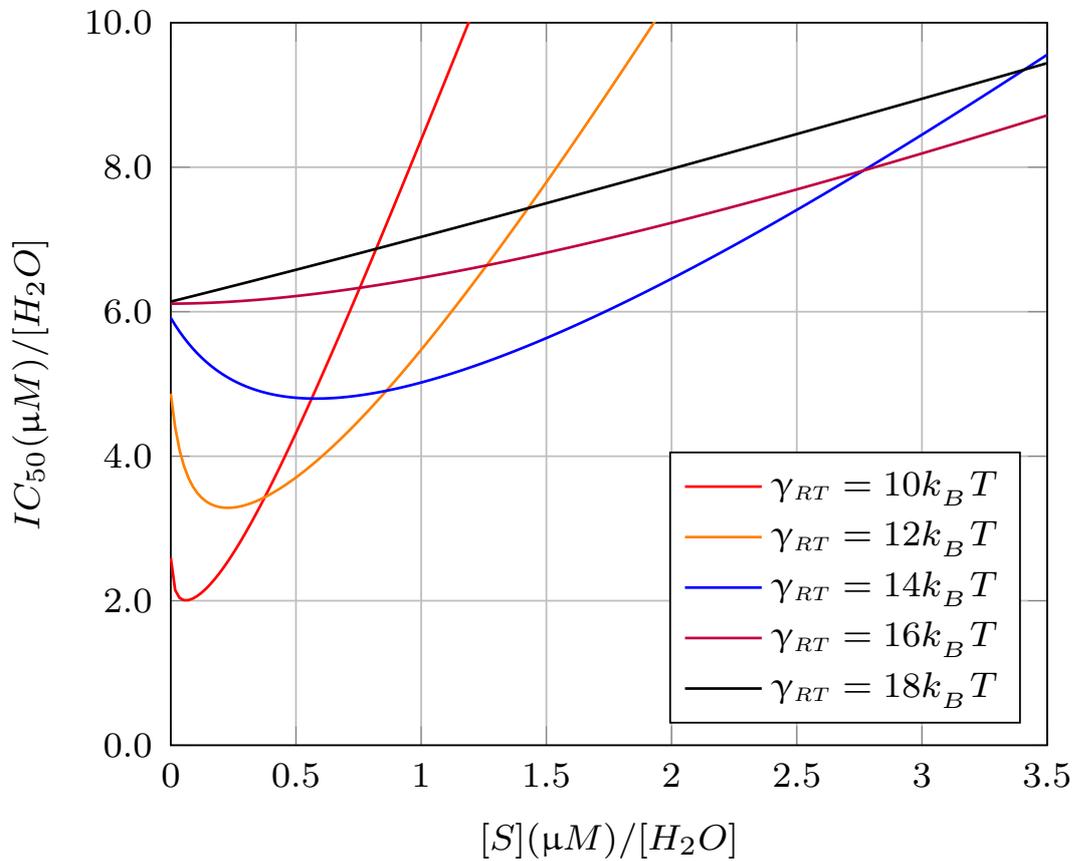


Figura 3.29: Simulação do IC_{50} para variação de concentração de substrato, mostrando concavidade da curva devido a existência de estados alostéricos. O efeito cooperativo positivo se mostra pela concavidade do gráfico voltada para cima e é cada mais aparente para valores de energia de transição mais baixos entre os estados R e T . Para $\gamma_{RT} = 18k_B T$ a curva é praticamente linear se comparada com as demais.

Os parâmetros mantidos fixos nesta simulação foram: $\Delta\epsilon_I^R = \Delta\epsilon_S^R = -12k_B T$; $\Delta\epsilon_S^T = -20k_B T$; $\Delta\epsilon_I^T = -17.7k_B T$; $\zeta^{RT} = 1$

3.3 GENERALIZAÇÃO DOS CONCEITOS E APLICAÇÃO

Partindo das deduções dos modelos tratados anteriormente, é possível extrair características gerais de sistemas que funcionam segundo o regime quase-estacionário (ver Apêndice A). Ao calcular a função de partição como foi apresentado, identifica-se alguns fatores que descrevem características específicas da enzima:

- Cada molécula que é retirada do solvente e encaixa no sítio ativo terá uma distribuição grão-canônica associada à diferença de potencial dessa mudança, dada por $x_L = [L][H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\epsilon_L}$, onde L representa o ligante;
- Cada par de interação devido a formação de um complexo contendo mais de uma molécula será associada a uma distribuição de Boltzman da energia de interação ($-J_{lm}$), dada por $Z_{lm} = e^{\beta J_{lm}}$, com l e m sendo o par de moléculas interagentes;
- Cada estado alostérico da estrutura quaternária da enzima está associada a uma distribuição de Boltzman da energia potencial de configuração do estado, dada por $Z_A = e^{-\beta\gamma_A}$, com A sendo o estado alostérico em questão
- Distribuição estatística total de um dado microestado para uma enzima é o produto de todas as distribuições.

Seguindo este procedimento, o cálculo da função de partição se torna mais simples, pois o trabalho restante será o de contar todos os estados possíveis pra uma enzima e somar todas as distribuições. Tal cálculo envolve ferramentas fundamentais, como análise combinatória e álgebra, mas pode se tornar complexo caso a enzima escolhida para o estudo tenha um grande número de sítio e baixa simetria. Por outro lado, em cálculos numéricos, onde não se tenha interesse de saber forma explícita da função de partição, pode-se utilizar ferramentas computacionais que consiga contar e somar os estados do sistema, tendo como resultado um valor numérico da função de partição.

Em seguida, para os modelos tratados neste trabalho foi realizado o cálculo da velocidade de uma reação catalisada por enzimas. O padrão notado ao construir tais equações se resume em:

- Calcular a probabilidade estatística dos estados que contenham pelo menos um substrato no sítio ativo usando a função de partição e igualar cada uma à fração de enzimas nos respectivos estados;
- Escrever uma equação da velocidade de formação de produto como proporcional à soma da concentração de enzimas que contenham pelos menos um sítios catalítico ocupado por substrato, sendo a contante de catálise a constante de proporcionalidade;
- Combinar as equações anteriores para se obter a taxa de formação de produto dependente das distribuições;

De forma geral, a taxa de formação de produto assumirá a forma genérica:

$$\frac{d[P]}{dt} = [E_{tot}] \frac{\sum_i K_{cat}^{A_i} \cdot n_i \cdot g_i \cdot w_i}{\Xi_1} \quad (3.52)$$

onde i é o microestado uma enzima do sistema, sendo A_i a sua forma alostérica, n o número de substratos ligados à enzima, g a degenerescência e w_i a distribuição estatística total do estado i .

Para exemplificar o procedimento explicado acima será tratado a seguir do caso da catálise da frutose pela enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1).

3.3.1 Catálise da Frutose pela Fosfofrutoquinase-1

A PFK-1 é a enzima mais importante na regulação da glicólise, catalisando a conversão da frutose-6-fosfato (F6P) em frutose-1,6-fosfato (FBP) pela transferência de um grupo fosfato por uma molécula de ATP. Trata-se de uma enzima alostérica formada por quatro subunidades (tetrâmero), sendo duas a duas similares de modo que pode se dizer que esta é um dímero de dímero (o que se assemelha à estrutura da hemoglobina) [1]. Cada monômero possui um sítio ativo e um sítio alostérico, onde se ligam os substratos (F6P+ATP) e reguladores alostéricos, respectivamente (Fig. 3.30). Tais reguladores incluem inibidores (citratos, ATP) e ativadores (ADP, AMP).

No sítio ativo existe uma região preferencial para o ATP e outra para a F6P, modo que a reação ocorre pela transferência direta do grupo fosfato do ATP para a molécula de frutose. Assim a reação se caracteriza como uma catálise bissubstrato e gera dois produtos: ADP e FBP:



Como a reação tem todos os coeficientes estequiométricos iguais a um, a velocidade da reação pode ser definida variação temporal da concentração tanto do ADP quanto da FBP.

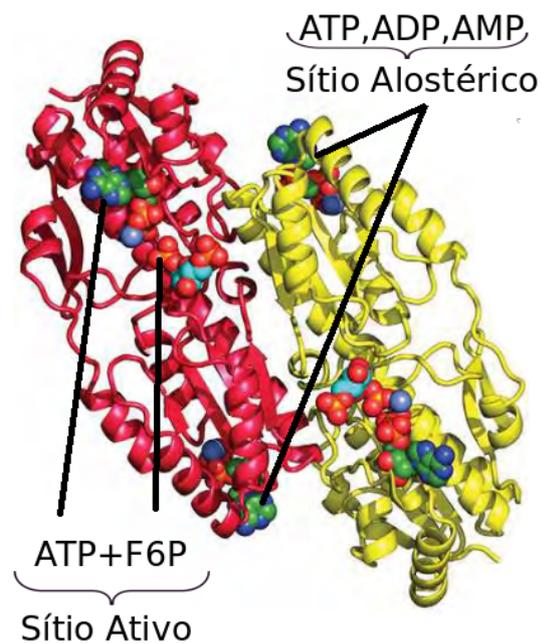


Figura 3.30: Dímero da PFK-1, mostrando os sítios catalíticos com ATP e F6P e os sítios alostéricos, onde é possível ligar moléculas como ATP, ADP e AMP além de outros reguladores alostéricos.

Fonte: Figura adaptada da referência [1]

A PFK-1 possui dois estados alostéricos bem definidos, onde a transição de um para o outro envolve uma modificação significativa na posição dos aminoácidos do sítio catalítico na região da F6P e do sítio alostérico (Fig. 3.32), resumida no modelo da Figura 3.31.

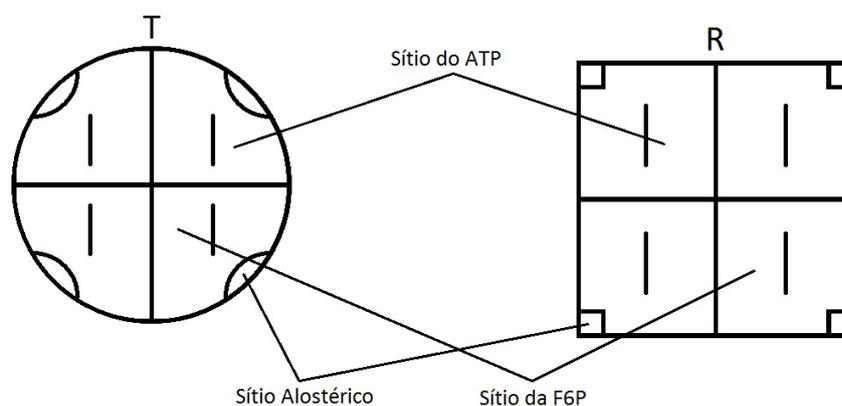


Figura 3.31: Modelo dos estados alostéricos *R* e *T* da PFK-1. A barra divide o sítio ativo em duas regiões, uma específica do ATP e outra da F6P.

A F6P se liga muito bem ao estado alostérico *R* porém tem baixa afinidade pelo estado *T*. Já o ATP se liga bem ao sítio ativo de ambas as formas alostéricas, porém tem maior afinidade pelo sítio alostérico do estado *T* do que pelo do *R*. Isso possibilita tratar da situação em que se tem apenas ATP e F6P em solução diluída com a PFK-1, de forma a reduzir os graus de liberdade do sistema da seguinte forma:

- O estado *R* só liga ATP e F6P no sítio ativo;
- O estado *T* só liga ATP no sítio ativo e no sítio alostérico

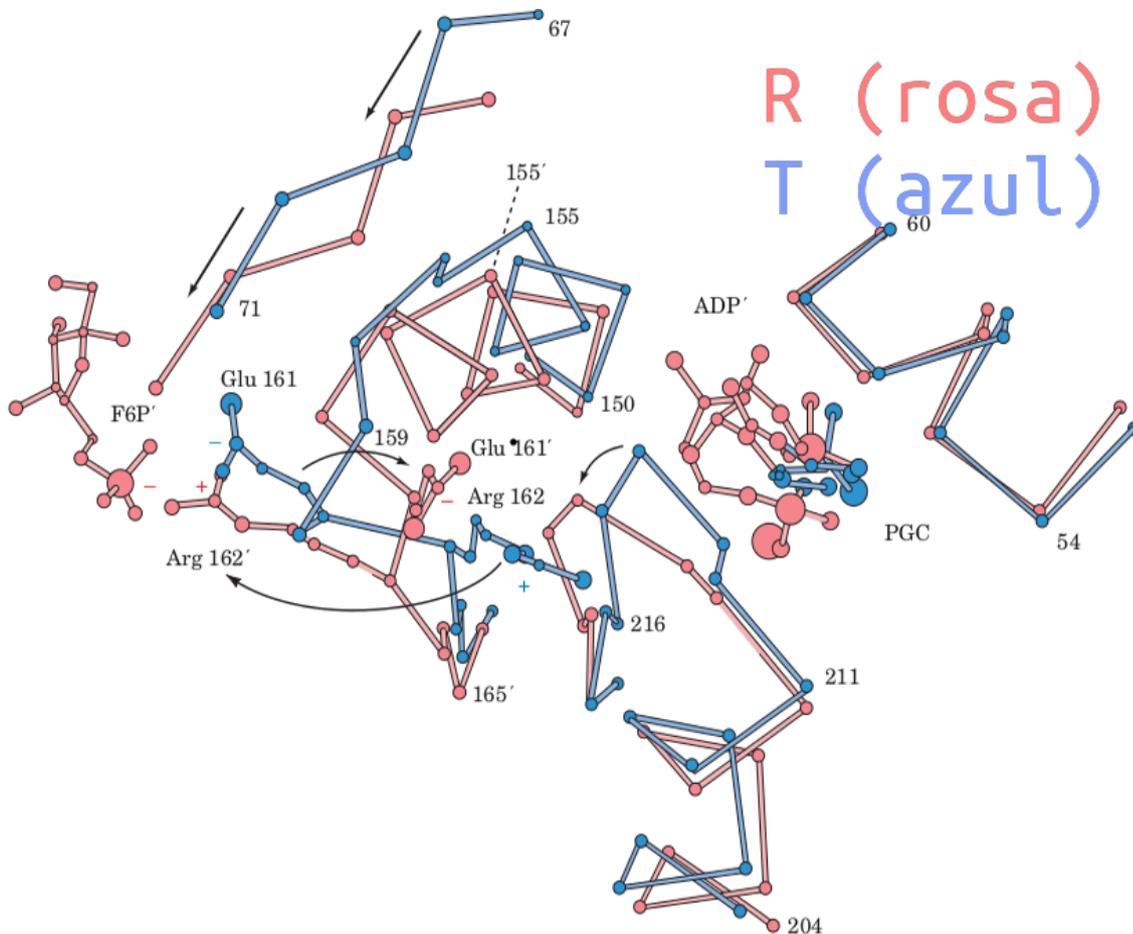


Figura 3.32: Modelo mostrando a reorganização das posições dos resíduos de aminoácidos nos sítios da PFK-1 devido à transição alostérica. A transição do estado *R* para o estado *T* provoca o deslocamento de uma arginina (Arg 162) por um ácido glutâmico (Glu 161), substituindo uma interação atrativa por repulsiva com a F6P, o que reduz significativamente a afinidade da frutose pelo sítio catalítico.

Fonte: Figura adaptada da referência [1]

Partindo desses dados da literatura, para um reservatório de moléculas de ATP + F6P em solução diluída é possível usar o modelo da Figura 3.31 na seguinte forma: o ATP poderá ocupar o lado esquerdo da barra nos estados R e T e a F6P ocupará o lado direito da barra apenas no estado R ; já para os sítios alostéricos, só o estado T ligará o ATP. Para cada microestado de uma enzima, tem-se:

- Cada sítio ativo ocupado com F6P terá peso $x_F = [F][H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\epsilon_F}$;
- Cada sítio ativo ocupado com ATP terá peso $x_A^R = [A][H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\epsilon_A^R}$ e $x_A^T = [A][H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\epsilon_A^T}$;
- Cada sítio ativo ocupado com F6P e ATP terá peso $x_{FA} = x_F x_A^R Z_{FA}$, onde Z_{FA} é devido à interação entre as duas moléculas;
- Cada sítio alostérico ocupado com ATP terá peso $u_A = [A][H_2O]^{-1}e^{-\beta\Delta\alpha_A}$;
- Cada estado alostérico terá peso $Z_R = e^{-\beta\gamma_R}$ e $Z_T = e^{-\beta\gamma_T}$;

onde F , A , R e T representam a F6P, o ATP e os estados alostéricos, respectivamente. A letra grega α foi usada para simplificar a notação, sendo $\Delta\alpha$ a variação de energia potencial para se tirar uma molécula da solução e colocar em um sítio alostérico (semelhante a $\Delta\epsilon$).

Usando todas as considerações acima, auxiliado pelo esquema mostrado na Figura 3.31, é possível contar todos os microestados de cada forma alostérica de uma enzima e montar a função de partição:

$$\Xi_1 = \Xi_{R,1} + \Xi_{T,1} = Z_R(1 + x_F + x_A^R + x_{FA})^4 + Z_T(1 + u_A + x_A^T + x_A^T u_A)^4 \quad (3.53)$$

A redução dos graus de liberdade permitiram gerar um padrão nos microestados do sistema, produzindo um função de partição relativamente simples (Eq. 3.53). Ao expandir as potências da função de partição pode-se coletar todos os estados contendo a variável x_{FA} e usá-los para calcular a velocidade da reação. Nesta etapa é possível evitar a construção de equações de equilíbrio químico se, com base forma expandida da função de partição, as seguintes regras forem seguidas:

- Apenas os fatores que possuem a variável x_{FA} contribuem para a catálise;

- O expoente da variável x_{FA} é igual o número de substrato (ATP|F6P) (denotado por n_{FA});
- A multiplicidade desses fatores é igual a degenerescência de cada microestado (denotado por g_{FA}).

Utilizando este procedimento e a Eq. 3.52, obtém-se:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{Z_{TR}x_{FA}(1 + x_F + x_A^R + x_{FA})^3}{(1 + u_A + x_A^T + x_A^T u_A)^4 + Z_{TR}(1 + x_F + x_A^R + x_{FA})^4} \quad (3.54)$$

onde $Z_{TR} = Z_R Z_T^{-1}$, $v = d[P]/dt$ e $V_{\max} = 4K_{cat}[E_{tot}]$

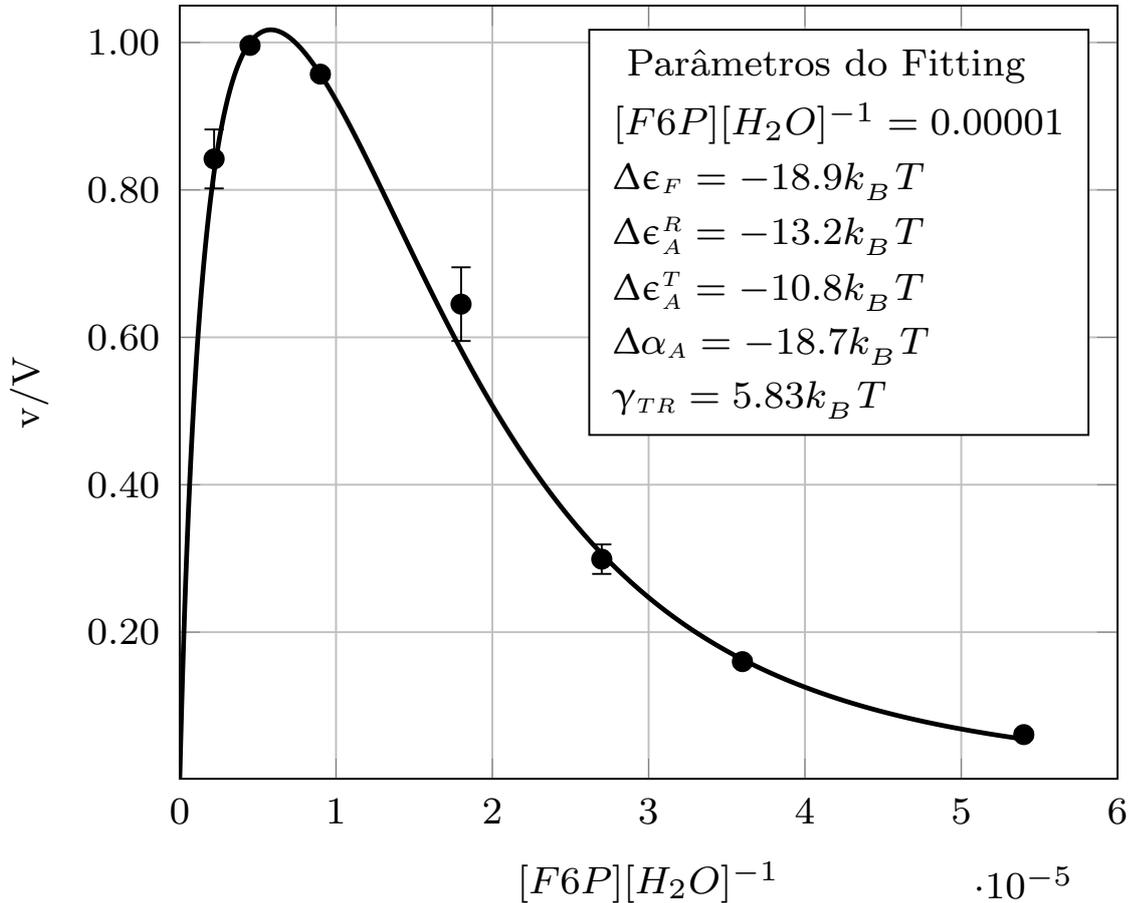


Figura 3.33: Dados experimentais para variação de concentração de ATP ajustados com a Eq. 3.54. O ATP age tanto como inibidor alostérico para altas concentrações e ativador para concentrações baixas.

Com a Eq. 3.54 foi possível ajustar dados experimentais de um estudo realizado

em 2015 por WEBB, B. A. et. al [36], para atividade enzimática da PFK-1 em relação a variação de concentração de ATP (Fig. 3.33) e F6P (Fig. 3.34)

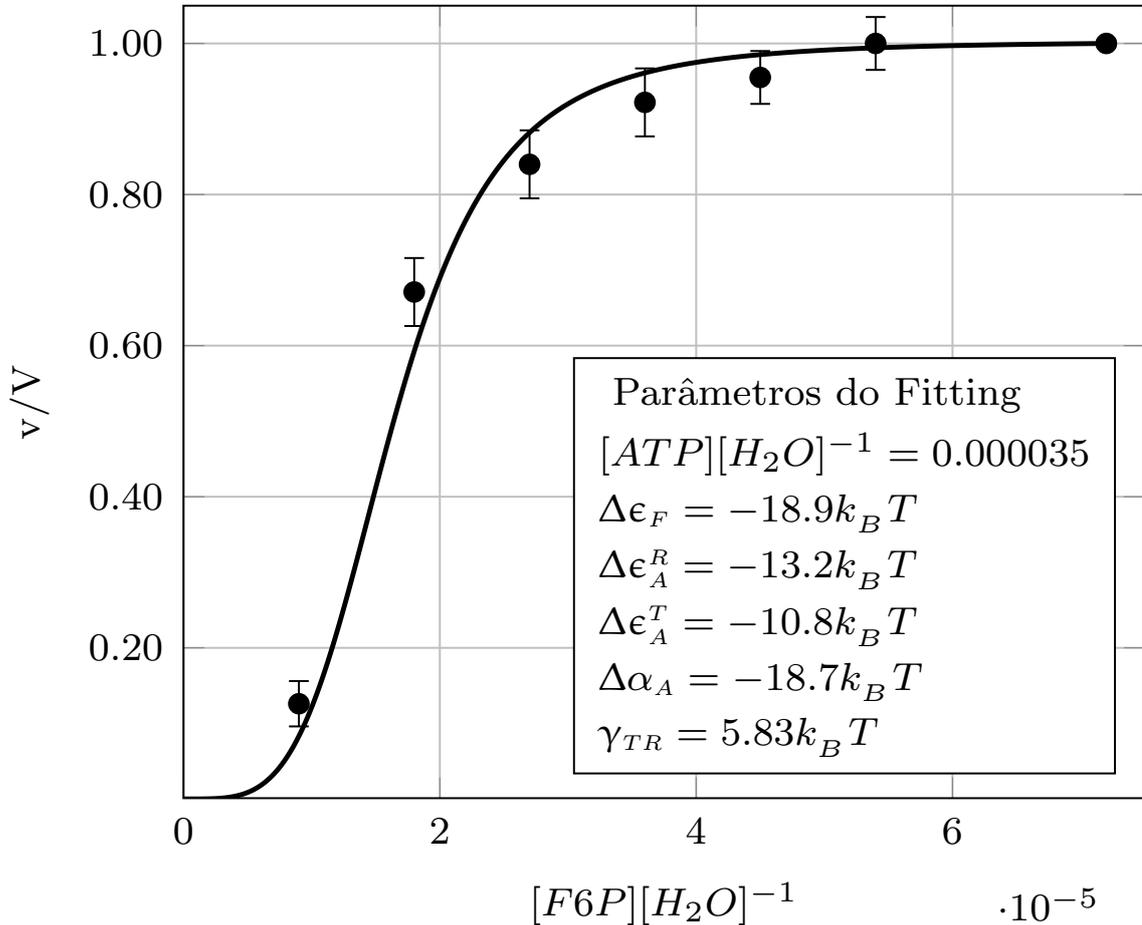


Figura 3.34: Dados experimentais para variação de concentração de F6P ajustados com a Eq. 3.54.

A curva foi primeiro ajustada aos dados experimentais para variação de concentração de ATP (Fig 3.33), onde se obteve os melhores parâmetros do fitting para energia de ligação de cada molécula nos respectivos sítios e da transição dos estados alostéricos, mantendo-se fixa a concentração de F6P. Estes parâmetros foram mantidos para os dados experimentais de velocidade da reação em relação a variação de concentração de F6P (Fig. 3.34), produzindo um bom ajuste se consideradas as incertezas de medida.

Os parâmetros que melhor ajustam as curvas podem ser considerados como valores de referência para estudar casos de mutação apresentados no estudo de WEBB et al (2015). Para melhores resultados, seria importante estudar estrutura da enzima e obter

informações sobre onde tais mutações ocorrem para que se restrinjam os graus de liberdade do fitting. Com isso, até possível estimar alterações nos valores de energias de interação com os sítios e de transição entre os estados alostéricos com melhor exatidão.

Por meio deste exemplo fica clara a vantagem da formulação via Mecânica Estatística de equações para a velocidade de reações catalisadas por enzimas. Aqui é possível notar que a construção de tais equações pode ser resumida em etapas para vários tipos de enzimas, de modo a facilitar os cálculos. Além disso, obtém-se parâmetros microscópicos que possibilitam relacionar os dados de atividade da enzima com informações da sua estrutura. Para casos que incluem inibidores a discussão pode ser levada mais adiante, podendo ser construída uma equação para o IC_{50} e, utilizando os parâmetros da curva de velocidade, é possível prever a forma desta função para variação de concentração de substrato.

CONCLUSÃO

A Física Estatística possibilita descrever comportamentos complexos de sistemas biológicos, observados em medidas macroscópicas dos experimentos, levando em conta suas características microscópicas. Sua aplicação na enzimologia permite trocar parâmetros experimentais utilizados pela Química e Bioquímica, como constantes de equilíbrio, por variáveis teóricas da Física mais adequadas em simulações computacionais ou estudos qualitativos.

A principal vantagem dos modelos desenvolvidos neste trabalho é a facilidade de se introduzir interações cooperativas como pesos estatísticos e avaliar suas consequências para a inibição enzimática. Neste sentido foi possível obter resultados já discutidos na literatura, como o surgimento de pontos de inflexão nos gráficos do tipo $v \times [S]$ em enzimas alostéricas, mostrando que o tratamento é compatível com os métodos utilizados na bioquímica. Feita esta verificação de consistência, mostrou-se que o mesmo efeito ocorre caso exista inibição competitiva e que a curva $v \times [I]$ também apresenta ponto de inflexão, onde para cada um dos modelos estudou-se, com base em situações numéricas, as condições para a ocorrência de pontos de inflexão.

As equações deduzidas foram usadas para modelar o efeito de ativação do inibidor, onde em uma situação específica a velocidade de formação de produto é ampliada pela adição de uma certa concentração de inibidor. Nesta aplicação, foi proposta ainda uma interpretação do mecanismo biológico baseado na linguagem da mecânica estatística dos modelos KNF e MWC usados para descrever as reações em biomoléculas.

Usaram-se as equações de velocidade de cada modelo para se deduzir equações para o IC_{50} , parâmetro experimental relacionados à atividade biológica. As simulações dessas equações mostraram algumas particularidades das enzimas alostéricas que não foram encontradas na bibliografia consultada até o momento em que este texto foi escrito, onde se destaca a curva $IC_{50} \times [S]$ não linear por consequência de efeitos cooperativos,

em particular, mostrou-se que a cooperatividade negativa apresenta curva $IC_{50} \times [S]$ com concavidade voltada para baixo. Este resultado possibilita o uso do IC_{50} na identificação de interações negativas entre sítios catalíticos, o que não é possível apenas pela análise da curva $v \times [S]$.

Por fim, os cálculos realizados para enzimas de dois sítios possibilitaram identificar um padrão de construção da função de partição e das equações de velocidade de reação, sendo possível generalizar o procedimento para se trabalhar com enzimas que possuam mais de dois sítios. O procedimento descrito foi usado para estudar a catálise da frutose-6-fosfato pela enzima fosfofrutoquinase-1, onde se calculou a velocidade da reação de ATP+frutose. O modelo proposto para este caso foi usado para analisar dados experimentais, gerando um bom ajuste das curvas de velocidade em função da variação de concentrações de ATP e de frutose.

Em resumo, este trabalho propôs um método para se deduzir equações de velocidade de reação e IC_{50} para uma enzima genérica por meio da construção da função de partição grão-canônica, introduzindo uma linguagem de estados de energia usada na Física para descrever uma função biológica. O mesmo procedimento pode ser usado para se estudar proteínas que possuem sítios de ligação, como no caso da albumina do plasma sanguíneo e da hemoglobina, com a distinção de que no lugar de calcular velocidade de uma reação se trabalharia apenas as probabilidades de ocupação dos sítios.

Referências Bibliográficas

- [1] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley and Sons, Inc, 4th ed., 2013.
- [2] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Wiley-Blackwell, 4th ed., 2012.
- [3] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot, and H. G. Garcia, *Physical Biology of the Cell*. Garland Science, 2nd ed., 2012.
- [4] A. Cornish-Bowden, “Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes,” *FEBS Journal*, vol. 281, p. 621–632, 2014.
- [5] Q. Cui and M. Karplus, “Allostery and cooperativity revisited,” *Protein Science*, vol. 17, p. 1295–1307, 2008.
- [6] J. Monod, J. Changeux, and F. Jacob, “Allosteric proteins and cellular control systems,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 6, pp. 306–329, 1963.
- [7] D. Gonze and M. Kaufman, “Chemical and enzyme kinetics,” Master’s thesis, 2016.
- [8] A. Bidon-Chanal, A. Fuertes, D. Alonso, D. I. Pérez, A. Martínez, F. J. Luque, and M. Medina, “Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, pp. 479–489, 2013.
- [9] Y.-C. Cheng and W. H. Prusoff, “Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 22, pp. 3099–3108, 1973.
- [10] A. Bag and P. K. Ghorai, “Development of Quantum Chemical method to calculate half maximal inhibitory concentration (IC_{50}),” *Molecular Informatics*, vol. 35, p. 199 – 206, 2016.
- [11] S. R. A. Salinas, *Introdução a Física Estatística*. Edusp, 2th ed., 2005.

- [12] T. Einav, L. Mazutis, and R. Phillips, “Statistical Mechanics of allosteric enzymes,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, pp. 6021–6037, 2016.
- [13] A. D. Beavis and H. Davatol-Hag, “The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS,” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 28, 1996.
- [14] A. D. Beavis and M. Powers, “Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, p. 4045–4050, 2004.
- [15] S. D. Ramalho, L. R. F. D. Sousa, L. Nebo, S. H. Maganhi, I. Caracelli, J. Zukerman-Schpector, M. I. S. Lima, M. F. M. Alves, M. F. das G. F. Da Silva, J. B. Fernandes, and P. C. Vieira, “Triterpenoids as novel natural inhibitors of human cathepsin L.,” *Chemistry & Biodiversity*, vol. 11, p. 1354–1363, 2014.
- [16] P. O. Scherer and S. F. Fischer, *Theoretical Molecular Biophysics*. Springer, 2nd ed., 2017.
- [17] L. Michaelis and M. L. Menten, “Die kinetik der invertinwirkung,” *Biochem Z*, vol. 49, pp. 333–369, 1913.
- [18] K. A. Johnson and R. S. Goody, “The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper,” *Biochemistry*, vol. 50, pp. 8264–8269, 2011.
- [19] A. V. Hill, “The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves,” *Journal of Physiology*, vol. 40, pp. 4–7, 1910.
- [20] L. Pauling, “The oxygen equilibrium of hemoglobin and its structural interpretation.,” *Proceedings the National Academy of Sciences*, vol. 21, pp. 186–191, 1935.
- [21] J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux, “On the nature of allosteric transitions: a plausible model.,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 12, p. 88–118, 1965.
- [22] J. D. E. Koshland, G. Némethy, and D. Filmer, “Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits,” *Biochemistry* 5, vol. 5, pp. 365–385, 1966.
- [23] S. Marzen, H. G. Garcia, and R. Phillips, “Statistical Mechanics of Monod-Wyman-Changeux,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 425, pp. 1433–1460, 2013.

- [24] C. Mortici and H. M. Srivastava, “A product approximation of the gamma function,” *Springer Science + Business Media New York*, 2014.
- [25] T. Williams, C. Kelley, and many others, “Gnuplot 4.6: an interactive plotting program.” <http://gnuplot.sourceforge.net/>, Setembro 2014.
- [26] R. Zwanzig, *Nonequilibrium Statistical Mechanics*. Oxford University Press, 1st ed., 2001.
- [27] G. E. Briggs and J. B. A. Haldane, “A note on the kinetics of enzyme action,” *Biochemical Journal*, vol. 19, pp. 338–339, 1925.
- [28] D. J. Griffiths, *Introduction to Quantum Mechanics*. Prentice Hall, 1st ed., 1995.
- [29] F. Ayres, *Theory and Problems of Matrices*. McGraw-Hill, 1st ed., 1962.
- [30] S. Lipschutz and M. L. Lipson, *Linear Algebra*. McGraw-Hill, 4th ed., 2009.
- [31] H. Bisswanger, *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2nd ed., 2008.
- [32] S. Kuusk and P. Våljamäe, “When substrate inhibits and inhibitor activates: implications of β -glucosidases,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 1-15, 2017.
- [33] J. Kyte and R. F. Doolittle, “A simple method for displaying the hydropathic character of a protein,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 157, pp. 105–132, 1982.
- [34] A. Ben-Naim, “Inversion of the hydrophobic/hydrophilic paradigm demystifies the protein folding and self-assembly of problems,” *International Journal of Physics*, vol. 1, pp. 66–71, 2013.
- [35] J.-S. Kang and M.-H. Lee, “Overview of therapeutic drug monitoring,” *Korean J Intern Med*, vol. 24, pp. 1–10, 2009.
- [36] B. A. Webb, F. Forouhar, F.-E. Szu, J. Seetharaman, L. Tong, and D. L. Barber, “Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations,” *Nature*, pp. 1–16, 2015.
- [37] C. V. Rao and A. P. Arkin, “Stochastic chemical kinetics and the quasi-steady-state assumption: Application to the gillespie algorithm,” *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*, vol. 118, pp. 4999–5010, 2003.

- [38] L. A. Segel and M. Slemrod, “The quasi-steady-state assumption: A case study in perturbation,” *Society for Industrial and Applied Mathematics*, vol. 31, pp. 446–477, 1989.

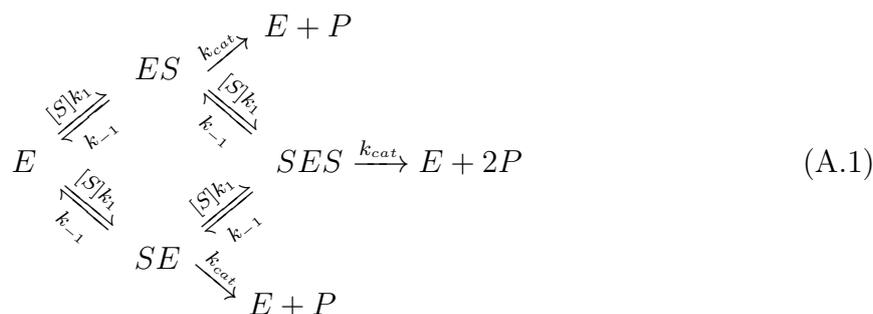
Apêndice

APROXIMAÇÃO QUASI-ESTÁTICA

Como já foi dito, os modelos para a cooperatividade assumem equilíbrio termodinâmico dos complexos, assim como é feito na hipótese de Michaelis-Menten. Para tratar esse problema é possível fazer uma abordagem estocástica, onde se resolve a versão química da equação mestra [37], ou determinística a partir das equações diferenciais que descrevem a reação química [38]. Em ambos os casos os trabalhos citados se limitaram a tratar o caso mais simples, onde a catálise ocorre segundo a cinética de Michaelis-Menten para uma enzima de um sítio ativo. Porém é possível generalizar os cálculos para enzimas de dois sítios equivalentes e, com isso, estabelecer algumas condições de validade dos modelos desenvolvidos nesse trabalho.

Enzima de Michaelis-Menten

Considere primeiramente o caso de enzimas de dois sítios catalíticos independentes e equivalentes. Quando a concentração de substrato é muito maior do que a concentração total de enzima ($[S] \gg [E]_{tot}$) é possível considerar $[S] \approx [S_{tot}]$ (sendo $[S_{tot}]$ a concentração total de substrato). Nesta configuração, é possível escrever a seguinte reação simplificada:



onde k_1 , k_{-1} e k_{cat} são as constantes de formação, dissociação, catálise e inibição, respecti-

vamente. Os estados ES e SE representam a ocupação de um dos sítios catalíticos e são degenerados para o tipo de enzima considerado. Já SES representa a ocupação dos dois sítios e contribui com o dobro de produto para a reação.

Com base na Eq. A.1 a velocidade de formação de produto será dada por:

$$\frac{d[P]}{dt} = 2k_{cat}([ES] + [SES]) \quad (\text{A.2})$$

Para os demais estados tem-se a equação diferencial:

$$\frac{d\mathbf{E}}{dt} = \mathbf{K}\mathbf{E} \quad (\text{A.3})$$

onde \mathbf{K} é a matriz das constantes, dada por:

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -2[S]k_1 & k_{-1} + k_{cat} & k_{-1} + k_{cat} & k_{cat} \\ [S]k_1 & -(k_{-1} + [S]k_1 + k_{cat}) & 0 & k_{-1} \\ [S]k_1 & 0 & -(k_{-1} + [S]k_1 + k_{cat}) & k_{-1} \\ 0 & [S]k_1 & [S]k_1 & -(2k_{-1} + k_{cat}) \end{pmatrix} \quad (\text{A.4})$$

e \mathbf{E} é o vetor das concentrações dos estados possíveis da enzima:

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} [E] \\ [ES] \\ [SE] \\ [SES] \end{pmatrix} \quad (\text{A.5})$$

É possível reescrever a Eq. A.3 da seguinte forma:

$$\frac{d(\mathbf{U}^{-1}\mathbf{E})}{dt} = \mathbf{U}^{-1}\mathbf{K}\mathbf{U}(\mathbf{U}^{-1}\mathbf{E}) = \mathbf{D}(\mathbf{U}^{-1}\mathbf{E}) \quad (\text{A.6})$$

onde \mathbf{U} é a matriz dos autovetores de \mathbf{K} , escrita como

$$\mathbf{U} = [\mathbf{V}_1|\mathbf{V}_2|\mathbf{V}_3|\mathbf{V}_4],$$

e D é a matriz diagonal dos autovalores de \mathbf{K}

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \lambda_4 \end{pmatrix}.$$

A solução para o sistema com autovalores reais fica:

$$\mathbf{E} = \mathbf{U}e^{Dt}\mathbf{U}^{-1}\mathbf{E}_o \quad (\text{A.7})$$

onde \mathbf{E}_o é a condição inicial do sistema e a exponencial da matriz diagonal é definida por:

$$e^{Dt} = \begin{pmatrix} e^{\lambda_1 t} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & e^{\lambda_2 t} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & e^{\lambda_3 t} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & e^{\lambda_4 t} \end{pmatrix} \quad (\text{A.8})$$

As matrizes \mathbf{U} e \mathbf{D} da matriz \mathbf{K} dada pela Eq. A.4 são:

$$\mathbf{U} = \begin{pmatrix} \frac{2k_{-1}^2 + 3k_{-1}k_{cat} + k_{cat}^2 + [S]k_1k_{cat}}{2[S]^2k_1^2} & 0 & \frac{-k_{-1}}{[S]k_1} & 1 \\ \frac{2k_{-1} + k_{cat}}{2[S]k_1} & -1 & \frac{k_{-1} - [S]k_1}{[S]k_1} & -1 \\ \frac{2k_{-1} + k_{cat}}{2[S]k_1} & 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.9})$$

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -k_{-1} - k_{cat} - [S]k_1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -k_{-1} - k_{cat} - [S]k_1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -2k_{-1} - k_{cat} - 2[S]k_1 \end{pmatrix} \quad (\text{A.10})$$

Devido ao fato de os autovalores obedecerem a relação $\lambda_i \leq 0$ ($i = 1, \dots, 4$), o autovalor nulo será responsável pelo estado estacionário pois os demais gerarão exponenciais

reais que se anulam para t muito grande. Para aplicar a Eq. A.7 para esse conjunto de autovalores e autovetores, considere que em $t = 0$ exista apenas as formas livres E e S , de modo que não ocorreu formação de produto no início do experimento. Assim, a condição inicial é:

$$\mathbf{E}_o = \begin{pmatrix} [E_{tot}] \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.11})$$

Antes de calcular o vetor de estados intermediários da enzima \mathbf{E} note que o sistema já mostra a existência de estados estacionários, como pode ser visto pela matriz de autovalores, mas para comparar com o desenvolvimento feito pelo ensemble grão-canônico é preciso considerar que a probabilidade de dissociação do substrato é consideravelmente maior do que a probabilidade de catálise. Isso possibilita fazer a separação de escalas de tempo da reação de forma que se possa calcular a probabilidade de cada estado das enzimas do sistema como um equilíbrio termodinâmico, o que implica em impor a aproximação $K_M \approx K_D$, onde $K_D = k_{-1}/k_1$. Com essa aproximação, a solução dada pela Eq. A.7 com a condição inicial A.11 fica:

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} \frac{[E_{tot}]}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} [1 + [S]K_M^{-1}e^{-tk_1(K_M+[S])}]^2 \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} [1 - (1 - [S]K_M^{-1})e^{-tk_1(K_M+[S])} - [S]K_M^{-1}e^{-2tk_1(K_M+[S])}] \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} [1 - (1 - [S]K_M^{-1})e^{-tk_1(K_M+[S])} - [S]K_M^{-1}e^{-2tk_1(K_M+[S])}] \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} [1 - e^{-tk_1(K_M+[S])}]^2 \end{pmatrix} \quad (\text{A.12})$$

A constante de tempo do estado transiente é $\tau_{trans} = [k_1(K_M + [S])]^{-1}$. Para um tempo $t \gg \tau_{trans}$ o sistema relaxa para o estado estacionário:

$$\mathbf{E}_{est} = [E_{tot}] \begin{pmatrix} \frac{1}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{([S]K_M^{-1})^2}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \end{pmatrix} \quad (\text{A.13})$$

Igualando o vetor dos estados estacionários com o calculado pelo ensemble grão-canônico, obtém-se:

$$\begin{pmatrix} \frac{1}{(1 + [S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1})^2} \\ \frac{[S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1}}{(1 + [S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1})^2} \\ \frac{[S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1}}{(1 + [S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1})^2} \\ \frac{([S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1})^2}{(1 + [S] ([H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s})^{-1})^2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[S]K_M^{-1}}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{([S]K_M^{-1})^2}{(1 + [S]K_M^{-1})^2} \end{pmatrix} \quad (\text{A.14})$$

De forma que é possível obter a seguinte aproximação para a constante de Michaelis:

$$K_M \approx [H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s} \quad (\text{A.15})$$

Para que o estado estacionário seja estável é preciso que a contante de tempo relacionada a este estado seja muito maior do que a do transiente:

$$\tau_{est} \gg \tau_{trans} \quad (\text{A.16})$$

Uma maneira eficiente de garantir a relação entre as constantes de tempo é definir τ_{est} como o tempo mínimo para que todo o substrato seja consumido (veja a referência [38]), que pode ser expresso da forma:

$$\tau_{est} = \frac{[S_{max}] - [S_{min}]}{\left| \frac{d[S]}{dt} \right|_{max}} \quad (\text{A.17})$$

onde $[S_{min}] = 0$ e a velocidade de consumo do substrato será calculada no estado estacionário. Para isso, considere que não ocorre destruição de moléculas de substrato, nem de produto, de forma que será sempre válida a relação:

$$[S] = [S_{max}] - [ES] - [SE] - [SES] - [P] \quad (\text{A.18})$$

Como no estado estacionário a concentração dos complexos são aproximadamente contantes, o vínculo dado pela Eq. A.18 implica em:

$$\left| \frac{d[S]}{dt} \right| = \left| \frac{d[P]}{dt} \right| \quad (\text{A.19})$$

Das Eqs. A.2, A.13, A.17 e A.19 obtém-se:

$$\tau_{est} = \frac{1 + [S]K_M^{-1}}{2[E_{tot}]k_{cat}K_M^{-1}} \quad (\text{A.20})$$

Aplicando a relação A.16 para os valores de τ_{trans} e τ_{est} calculados até aqui, é possível ver que para a formação de um estado estacionário é preciso estabelecer a seguinte relação entre as quantidades do sistema:

$$2 \frac{k_{cat}}{k_{-1}} \frac{[E_{tot}]}{K_M} \ll \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)^2 \quad (\text{A.21})$$

Com as aproximação $K_M \approx K_D$ está implícito que $k_{-1} > k_{cat}$. Como consequência disto, é possível estabelecer uma condição mais forte para ocorrência de estado estacionário usando o fato de que $(k_{cat}k_{-1}^{-1})([E_{tot}]K_M^{-1}) < ([E_{tot}]K_M^{-1})$. Como já foi comentado, para sistemas que se comportam dessa forma é válida a aproximação dada pela Eq. A.15, e

pode-se usar a formulação da mecânica estatística para estimar uma relação de validade para a aproximação estacionária, reconhecendo que

$$\Xi_1 = \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)^2 = \left(1 + \frac{[S]}{[H_2O]} e^{-\beta\Delta\epsilon_S}\right)^2,$$

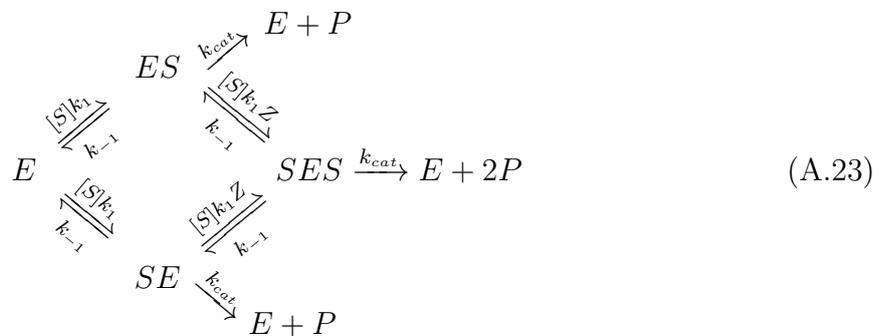
o que resulta em:

$$2 \frac{[E_{tot}]}{[H_2O]} e^{-\beta\Delta\epsilon_S} \ll \Xi_1 \quad (\text{A.22})$$

Sendo, dessa forma, possível fazer uma estimativa teórica de quando o sistema terá estados estacionários estáveis com base no cálculo de $\Delta\epsilon_S$, nas concentrações de enzima e de substrato utilizadas na catálise.

Modelo P-KNF

Para o caso em que existe interação entre os sítios na reação de catálise (modelo P-KNF), uma maneira simples de se introduzir o aumento de afinidade de ocupação do segundo sítio é de multiplicar a constante k_1 por um parâmetro Z na reação de formação do complexo SES . Assim, a equação química fica:



A Eq. A.23 implica na seguinte matriz das constantes para a equação diferencial A.3::

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -2[S]k_1 & k_{-1} + k_{cat} & k_{-1} + k_{cat} & k_{cat} \\ [S]k_1 & -(k_{-1} + [S]k_1Z + k_{cat}) & 0 & k_{-1} \\ [S]k_1 & 0 & -(k_{-1} + [S]k_1Z + k_{cat}) & k_{-1} \\ 0 & [S]k_1Z & [S]k_1Z & -(2k_{-1} + k_{cat}) \end{pmatrix} \quad (\text{A.24})$$

Seguindo o mesmo desenvolvimento feito para o caso sem interação, chega-se à seguinte solução aproximada:

$$\mathbf{E} \approx \begin{pmatrix} \frac{[E_{tot}]}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \left[1 + 2[S]K_M^{-1}e^{-k_1gt} + Z([S]K_M^{-1})^2e^{-2k_1gt} \right] \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \left[1 - (1 - [S]K_M^{-1})e^{-k_1gt} - [S]K_M^{-1}e^{-2k_1gt} \right] \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \left[1 - (1 - [S]K_M^{-1})e^{-k_1gt} - [S]K_M^{-1}e^{-2k_1gt} \right] \\ \frac{[E_{tot}]Z([S]K_M^{-1})^2}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \left[1 - e^{-k_1gt} \right]^2 \end{pmatrix} \quad (\text{A.25})$$

Para a qual g é uma função que relaciona todas as constantes do sistema, dada por:

$$g = (Z^2S^2 - 4ZS^2 + 6ZSK_M + 4S^2 - 4SK_M + K_M^2)^{1/2} \quad (\text{A.26})$$

No caso em que $Z = 1$ a solução sem interação é recuperada, de modo que a Eq. A.25 pode ser usada em ambos os casos. Nesta situação, a contante de tempo da fase transiente fica definida por:

$$\tau_{trans} = (k_1g)^{-1} \quad (\text{A.27})$$

Da mesma forma que antes, quando $t \gg \tau_{trans}$, o sistema relaxa para um estado estacionário dado por:

$$\mathbf{E}_{est} = \begin{pmatrix} \frac{[E_{tot}]}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[E_{tot}][S]K_M^{-1}}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \\ \frac{[E_{tot}]Z([S]K_M^{-1})^2}{1 + 2[S]K_M^{-1} + Z([S]K_M^{-1})^2} \end{pmatrix} \quad (\text{A.28})$$

Ao comparar esta solução com a obtida via mecânica estatística é possível estabelecer as seguintes relações:

$$K_M \approx [H_2O]e^{\beta\Delta\epsilon_s} \quad ; \quad Z = e^{\beta J_{SS}} \quad (\text{A.29})$$

Aplicando a Eq. A.16, obtém-se:

$$2[E_{tot}] \left(\frac{1 + ([S]/[H_2O])e^{-\beta(\Delta\epsilon_s - J_{SS})}}{g} \right) \ll \Xi_1 \quad (\text{A.30})$$

A Eq. A.30 estabelece um condição mais geral que a A.22, pois inclui informações sobre a cooperatividade no sistema no parâmetro g , onde ao impor $J_{SS} = 0$ recupera-se a condição para um sistema sem interação.

Vale comentar que a Eq. A.26 não é exatamente o que se obtém da solução geral A.7 para o modelo P-KNF. Nela optou-se por resumir a solução aproximando alguns termos que se aproximavam da unidade assumindo que $0.5 < Z < 2$, de modo que a energia de interação não ultrapasse a das interações entre o substrato e os resíduos de aminoácidos do sítio. Porém é importante observar que a condição A.30 (assim como a A.22) superestima a relação entre os parâmetros do sistema devido aproximação $K_D \approx K_M$ e pela definição de τ_{est} . Por outro lado, a partir deste método não fica claro quantas ordens de grandeza τ_{est} deve ser maior do que τ_{trans} , de modo que o estado estacionário será cada vez mais à medida que τ_{est}/τ_{trans} cresce.