



**Ciências
ULisboa**

Cinética e Regulação Enzimática

Código: 461106

Ano Letivo: 2015/16

Departamento: Biologia Vegetal

ECTS:

Carga horária:

Área Científica: Biologia;

Objetivos da Unidade Curricular

Pretende-se que os estudantes adquiram conhecimentos avançados sobre os mecanismos de acção dos catalisadores biológicos e do transporte membranar e sua regulação, no contexto do funcionamento dos organismos vivos. Serão estudados as bases teóricas para a integração dos mecanismos de regulação e controlo de vias metabólicas, em sistemas biológicos de maior complexidade, desde as células aos organismos.

A aprovação na disciplina corresponderá à compreensão dos conceitos apresentados e à capacidade de utilização, manipulação e exploração de resultados experimentais.

Pré-requisitos

Sem pré-requisitos

Conteúdos

Princípios gerais de catálise. Estrutura da molécula enzimática. Noção de "centro activo". Modelos de Fisher, de Koshland e de Pauling

Cinética Enzimática. Definição de velocidade máxima (V_{max}). Conceito de K_M : modelos de Michaelis-Menten, van Slick-Cullen e Briggs-Haldane. Determinação de parâmetros cinéticos. Inibição: mecanismos de inibição da actividade enzimática e consequências cinéticas. Representações gráficas.

Regulação e controlo da actividade enzimática. Cinética sigmoidal. Alosteria. Modelos explicativos. Regulação a nível das vias e sistemas metabólicos. Determinação experimental da "reação limitante" e consequências teóricas. Teoria da análise do controlo metabólicos (MCA). Definições. Desenvolvimentos subsequentes.

Aplicações.

Laboratoriais: demonstrações laboratoriais dos conceitos adquiridos

Teórico-práticas: utilização e exploração dos conceitos adquiridos

Descrição detalhada dos conteúdos programáticos

Componente Teórica

Cinética Enzimática. Evolução de conceitos em enzimologia. Natureza e função dos enzimas. Características fundamentais da acção enzimática: especificidade na catálise e aceleração da taxa de reacção

Estrutura da molécula enzimática. Cofactores e grupos prostéticos; coenzimas. Configuração e mobilidade conformacional das proteínas enzimáticas

Princípios gerais de catálise, Lei de acção das massas de Guldberg e Waage e acção enzimática. Teoria do estado de transição. Postulado de Hammond

Catálise enzimática. Noção de "centro activo". Teorias explicativas da acção enzimática. Modelos de Fisher, de Koshland e de Pauling. Mecanismos moleculares de reacção no centro activo de um enzima

Cinética enzimática. Efeito de factores físicos e químicos sobre a cinética enzimática. Cinética de Michaelis-Menten. Definição de velocidade máxima. Evolução do conceito de K_M : da cinética de equilíbrio (Michaelis e Menten) à cinética do estado estacionário (Briggs e Haldane). Constante catalítica k_{cat} . Constante de especificidade (k_{cat}/K_M). Determinações gráficas de parâmetros cinéticos. Derivações matemáticas da equação de Michaelis-Menten.

Linearizações e representações gráficas. Cinética de reacções enzimáticas com vários substratos. Mecanismos sequencial, ordenado, ping-pong e de Theorell-Chance. Cinética de reacções reversíveis. Equação de Haldane

Inibição. Mecanismos de inibição da actividade enzimática. Definições. Consequências cinéticas da inibição. Constantes de inibição. Equação de Dixon. Representações gráficas.

Regulação e controlo da actividade enzimática. Regulação ao nível da molécula enzimática. Mecanismos de regulação. Cinética sigmoidal. Alostéria. Modelo concertado de Monod-Wyman-Changeux. Modelo sequencial de Koshland-Némethy-Filmer. Modelo generalizado. Análise dos modelos propostos: utilidade e críticas.

Regulação a nível das vias e sistemas metabólicos. Reacções afastados do equilíbrio numa via metabólica em estado estacionário. Medição do fluxo metabólico. Teorema do *cross-over*. Actividades máximas de enzimas na via. Noção de capacidade enzimática. Alteração experimental dos intermediários metabólicos. Alteração na produção de proteína enzimática. RNA de interferência. Análise do controlo das vias metabólicas. Coeficientes de controlo do fluxo: definição e significado. Teorema da soma (dos coeficientes de controlo de fluxo). Coeficientes de controlo pelo substrato: definição e significado. Elasticidade: definição e exemplos. Coeficientes de resposta

Aplicações. Análise enzimática em medicina e em ciência forense. Alterações congénitas do metabolism. Química clínica. Bioetecnologia. Produção industrial de enzimas. Utilização de enzimas em processos industriais. Enzimas imobilizados. Indústria alimentar

Componente Teórica-Prática

pH e tampões

Introdução a métodos de doseamento de proteínas solúveis

Princípios gerais de extracção de enzimas. Velocidade de reacção: unidades e métodos de determinação

Equação de M-M. Métodos de linearização da equação de M-M e determinação dos parâmetros cinéticos k_m e V_{max}

Inibição reversível e inibição irreversível. Determinação do tipo de inibição e da constante de inibição k_i

Efeito da temperatura na actividade enzimática. Equação de Arrhenius. Cálculo da energia de activação

Componente Prática

pH. Preparação de soluções tampão.

Doseamento de proteínas solúveis pelo método de Bradford.

Extracção e ensaio da catalase por espectrofotometria.

Efeito da concentração de enzima na velocidade de reacção.

Ensaio da catalase a diferentes concentrações de substrato.

Inibição da Fosfoenolpiruvato carboxilase pelo L-malato.

Bibliografia

Recomendada

P. Boyer (1970), *The Enzymes* (student ed.)

C. Branden e J. Tooze (1991), *Introduction to Protein Structure*

A. Cornish-Bowden (1995), *Fundamentals of Enzyme Kinetics*

A. Cornish-Bowden e C. W. Wharton (1988), *Enzyme Kinetics*

D. Fell (1997), *Understanding the Control of Metabolism*

A. Fersht (1999), *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman

J. H. Ottaway (1988), *Regulation of Enzyme Activity*

T. Palmer & P. Bonner (2007), *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*, 2th ed.,

M. Perutz (1990), *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*

N. C. Price e L. Stevens (2000), *Fundamentals of Enzymology*

V. L. Schramm (2011), Ann. Rev.Biochem. 80:703-732, *Enzymatic Transition States, Transition-State Analogs, Dynamics, Thermodynamics, and Lifetimes*

R. Schulz (1994), *Enzyme Kinetics, from Diastase to Multi-Enzyme Systems*

Outros elementos de estudo

Figuras nas aulas teóricas e teórico-práticas

Protocolos nas aulas laboratoriais

Quizes para auto-análise na aulas teóricas

"Papers" escolhidos, em revistas internacionais, publicados nos últimos 5 anos

Métodos de Avaliação

Avaliação contínua e relatórios nas aulas laboratoriais

Prova escrita final

Prova oral (se necessária)

Língua de ensino

Português

Bibliografia basicamente em inglês