

## Cinética Michaeliana

Diz-se que um enzima apresenta uma cinética Michaeliana sempre que a variação da velocidade inicial medida ( $v_i$ ) pode ser ajustada a uma expressão da forma:

$$v = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_m + [A]}$$

- Cinética Michaeliana **não** implica a aderência a um mecanismo do tipo Henri-Michaelis-Menten.
- Cinética Michaeliana designa um comportamento *fenomenológico*.
- $k_0$  tem dimensões de constante de primeira ordem ( $s^{-1}$ ) e representa-se frequentemente como  $k_{cat}$
- O valor de  $[E]_0$  é difícil de determinar em muitas situações, pelo que se usa frequentemente  $V_{max}$  em lugar de  $k_0[E]_0$ . É o valor máximo de velocidade inicial que pode ser medido (saturação) para uma determinada quantidade de  $[E]_0$

## Diferentes mecanismos, a mesma equação



$$\left\{ \begin{array}{l} K_m = \frac{K_s}{1 + K + KK'} \\ k_{cat} = \frac{k_4 KK'}{1 + K + KK'} \end{array} \right.$$



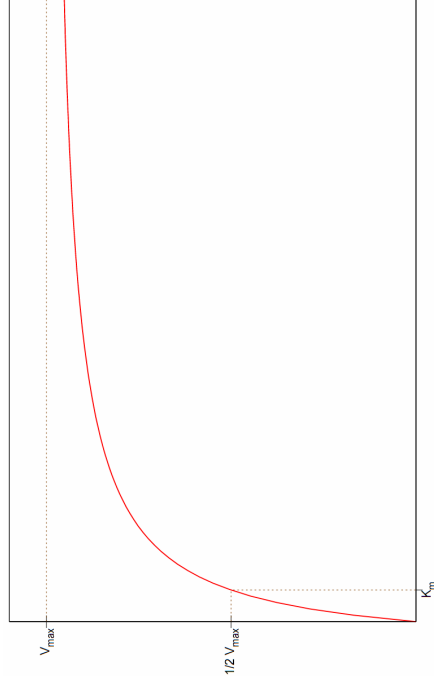
$$\left\{ \begin{array}{l} K_m = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3} \\ k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \end{array} \right.$$

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

Os mecanismos acima, tais como muitos outros, serão impossíveis de distinguir um do outro através de um simples ensaio de equilíbrio ou steady-state

# O significado de $K_m$

- Definição:** a constante de Michaelis,  $K_m$ , é a concentração de substrato para a qual a velocidade inicial medida é igual a metade da velocidade máxima (para uma mesma concentração de enzima).
- O  $K_m$  é uma medida *inversa* da afinidade do enzima para o seu substrato
  - O  $K_m$  é característico de cada enzima e substrato, e independente da concentração deste último
  - Embora  $K_m$  não seja igual a  $K_s$  na maioria das condições, pode ser usado como uma medida relativa de afinidade, já que corresponde à concentração para a qual *metade* dos sítios de ligação do enzima se encontram saturados em condições de *steady state*.
  - Variações no valor de  $K_m$  de um enzima (alterações das condições do meio, mutações, etc), podem normalmente ser atribuídos a uma alteração da capacidade do enzima de ligar o substrato.
  - A expressão do  $K_m$  em termos do mecanismo cinético pode ser mais ou menos complexa, mas este tem que ter sempre *dimensões de concentração*.



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

## $K_m$ 's de alguns enzimas e substratos

Enzyme	Substrate	$K_m$ (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
Carbonic anhydrase	D-Fructose	1.5
	$\text{HCO}_3^-$	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
$\beta$ -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

# O significado de $k_{\text{cat}}$

**Definição:** o  $k_{\text{cat}}$ , constante catalítica ou *turnover number* é igual ao quociente entre a velocidade máxima observada e a quantidade de enzima da amostra

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_0}$$

- O  $k_{\text{cat}}$  não tem que necessariamente corresponder (ou depender) a uma única constante cinética do mecanismo de catálise, mas pode ser visto como uma constante de primeira ordem *aparente* para a dissociação do complexo enzima-substrato
- O  $k_{\text{cat}}$  tem dimensões inversas de tempo (frequência) e pode ser visto como o número de ciclos catalíticos do enzima por unidade de tempo
- $V_{\text{max}}$  **não** é característico de um determinado enzima, pois depende da concentração do mesmo na amostra
- Variações no valor de  $k_{\text{cat}}$  de um enzima (alterações das condições do meio, mutações, etc), podem normalmente ser atribuídos a uma alteração da capacidade *catalítica* do enzima.
- A expressão do  $k_{\text{cat}}$  em termos do mecanismo cinético pode ser mais ou menos complexa, mas este tem que ter sempre *dimensões inversas de tempo*

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

## $k_{\text{cat}}$ 's de alguns enzimas

Enzyme	Substrate	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	40,000,000
Carbonic anhydrase	$\text{HCO}_3^-$	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
$\beta$ -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.4

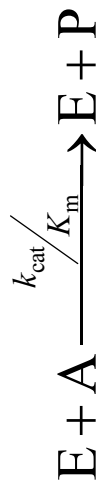
## Constante de especificidade e eficiência catalítica

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

quando  $[A] \ll K_m$  tem-se também  $[E]_0 \approx [E]$  e a eq. de M.-M. fica

$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E][A]$$

e o termo  $k_{\text{cat}}/K_m$  pode ser visto como uma constante de segunda ordem para o processo:



A muito baixas concentrações de substrato o passo limitante do processo de catálise passa a ser o encontro entre enzima e substrato!

Em condições *in vivo* é frequente ter valores de  $[A]$  entre 0.1-1  $K_m$

## Constante de especificidade e eficiência catalítica

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \longrightarrow \text{eficiência catalítica (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$$



$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{k_2}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad \text{logo:} \quad k_2 \rightarrow \infty \quad \Rightarrow \quad \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = k_1$$

Quando  $k_2$  é muito grande, a catálise torna-se efetivamente um processo colisional de segunda ordem, controlado apenas por  $k_1$

constante de especificidade  $\equiv$  eficiência catalítica

representa-se usualmente como  $k_A$



## Equação de Michaelis-Menten em termos de $k_A$

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

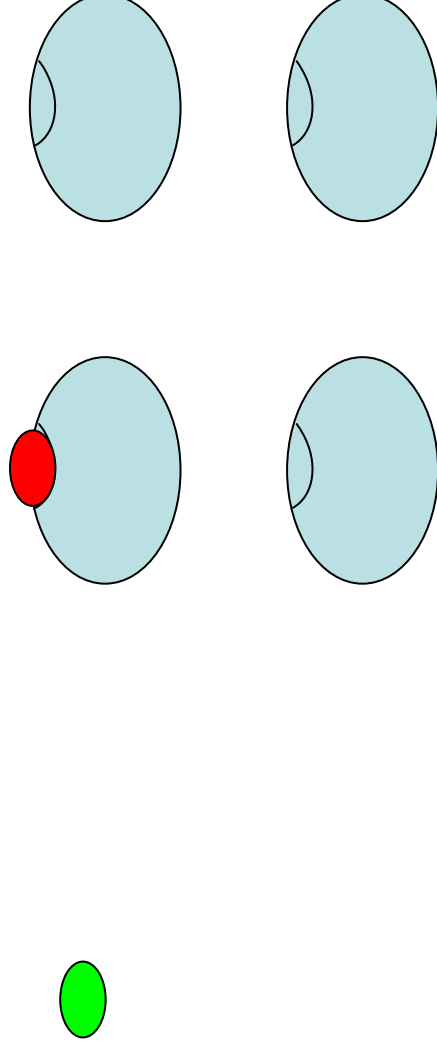
$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [A]}{K_m + [A]} = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + \frac{[A]}{K_m}}$$

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

A cinética enzimática pode ser formulada usando como quantidades fundamentais  $k_A$  e  $K_m$  em vez de  $k_{\text{cat}}$  e  $K_m$ . Muitas relações tornam-se mais simples quando expressas desta forma.

# Constante de especificidade e eficiência catalítica

Existe um limite superior teórico para  $k_{\text{cat}}/K_m$



O substrato tem que encontrar o centro activo por difusão. Para moléculas típicas em solução, a constante difusiva tem um valor da ordem de  $10^8$ - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

# Constante de especificidade para alguns enzimas

Enzima	Substrato	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
Acetil colina esterase	Acetilcolina	9.50E-05	1.40E+04	1.5E+08
Anidrase carbónica	CO2	1.20E-02	1.00E+06	8.3E+07
Catalase	H2O2	2.50E-02	1.00E+07	4.0E+08
Fumarase	Fumarato	5.00E-06	8.00E+02	1.6E+08
Urease	Ureia	2.50E-02	1.00E+04	4.0E+05
Crotonase	Crotonil-CoA	2.00E-05	5.70E+03	2.9E+08
b-lactamase	Benzilpenicilina	2.00E-05	2.00E+03	1.0E+08
Triose-P-isomerase	Gliceraldeido-3-P	4.70E-04	4.30E+03	9.1E+06
Quimotripsina	N-Ac-Gly Ester	4.40E-01	5.10E-02	1.2E-01
	N-Ac-Val Ester	8.80E-02	1.70E-01	1.9E+00
	N-Ac-Tyr Ester	6.60E-04	1.90E+02	2.9E+05

Os valores a vermelho denotam constantes de especificidade próximas do limite difusivo do substrato.