

Efeito do pH na actividade enzimática

- O desconhecimento da importância da concentração hidrogeniónica na actividade enzimática foi o maior obstáculo dos primeiros estudos de cinética enzimática.
- Grande amplitude da variação de $[H^+]$, desde cerca de 1M até $10^{-14}M$
- O conceito de tampão para controlar a concentração hidrogeniónica e a escala de pH foram introduzidos por Sorenson em 1909, num trabalho dedicado à importância do controlo do $[H^+]$ nos estudos enzimáticos.
- Michaelis e Davis publicam em 1911 o primeiro de uma série de trabalhos sobre o efeito da concentração hidrogeniónica nas reacções enzimáticas.
- A maioria dos enzimas são activos para valores de pH no intervalo 5–9 (excepções: pepsina, fosfatase alcalina). Neste intervalo as concentrações hidrogeniónicas são muito baixas (10^{-5} – $10^{-9}M$) e extremamente sensíveis a impurezas, dai a necessidade do uso de tampões para controlar os valores de $[H^+]$.

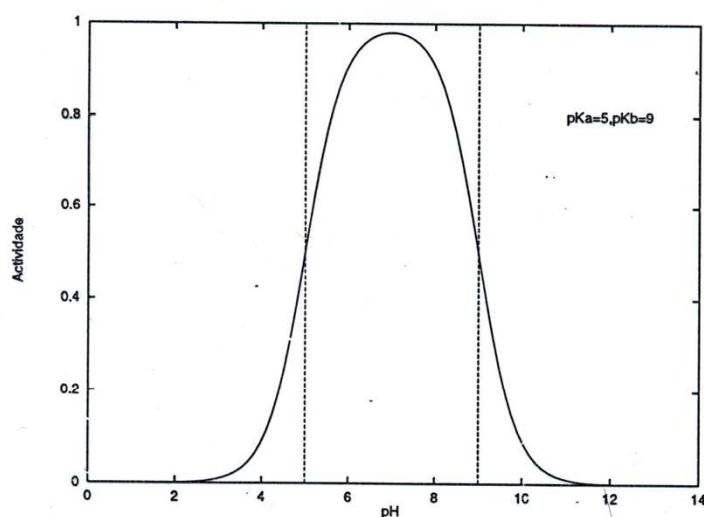
Efeito do pH na actividade enzimática

O efeito do hidrogenião sobre o enzima pode ser visto como um caso particular de inibição hiperbólica, ou seja, a ligação de um modificador a um site específico no enzima. No entanto, o protão possuí características únicas que justificam um tratamento independente:

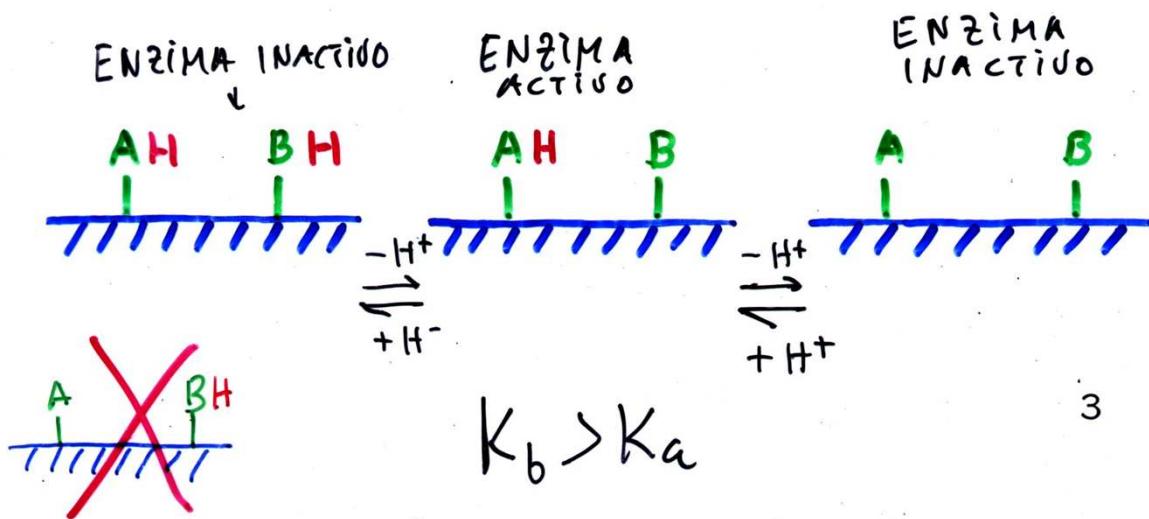
- Todos os enzimas são afectados pelos protões, tornando-os automaticamente mais importantes que qualquer outro modificador.
- O protão é mais pequeno que qualquer outra espécie química, não sendo causador de efeitos conformacionais (isto torna possível a ocorrência de fenómenos muito raros noutros contextos, como a inibição ~~N_AO~~ competitiva pura).
- A concentração de protões pode ser medida e controlada num intervalo grandemente superior ao de qualquer outra modificador, pelo que é possível esperar medir quaisquer efeitos que possam produzir-se devido à presença de protões.
- Ao contrário de outros modificadores, o protão pode ligar-se a muitos sítios no enzima, podendo ser necessário usar um modelo com múltiplos sítios de ligação.

Efeito do pH na actividade enzimática

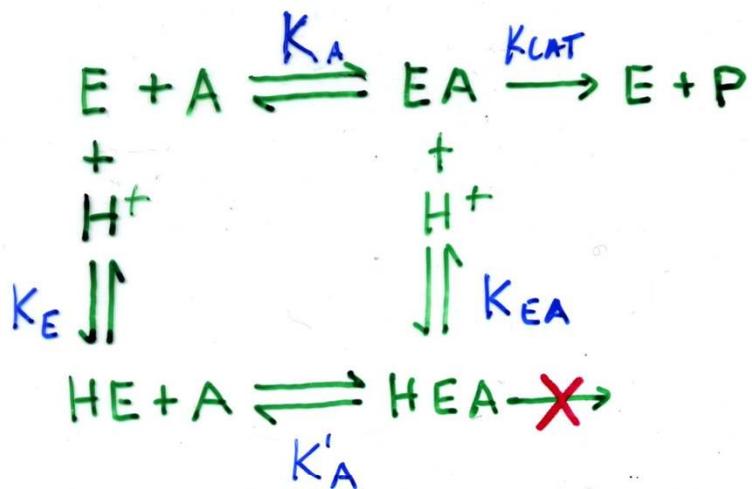
A maioria dos enzimas obedece a uma curva de actividade enzimática em função do pH do seguinte tipo:



- O máximo de actividade é denominado pH óptimo. Este valor não coincide necessariamente com o ponto isoélectrico da proteína (valor de pH para o qual a carga total da proteína é nula). A dependência da actividade deve, portanto, depender de grupos específicos para cada enzima.
- Mecanismo para a dependência do pH controlado pela dissociação de dois grupos (K_a e K_b , com $K_b > K_a$):



MECANISMO SIMPLES DE M.-M.



$$K_E K'_A = K_{EA} K_A$$

$K_E = K_{EA} \Rightarrow$ BINDING INDEPENDENTE DO PH

$$K_E \neq K_{EA} \Rightarrow K_A = K'_A \frac{K_E}{K_{EA}} \quad [E]_o = [E] + [HE] + [EA] + [HEA]$$

$$V_H = \frac{K_{CAT} [E]_o [A]}{K_A \left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} \right) + [A] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EA}} \right)}$$

K_{CAT} :

$$V_{max, H} = [E]_o \quad K_{CAT, H} = \frac{K_{CAT} K_{EA}}{K_{EA} + [H^+]} [E]_o$$

$$K_m: \quad K_{m, H} = \frac{K_A K_{EA} + [H^+] K_A K_{EA} / K_E}{K_{EA} + [H^+]}$$

$$\left(\frac{K_{CAT}}{K_m} \right)_H = \frac{\left(\frac{K_{CAT}}{K_A} \right) K_E}{K_E + [H^+]}$$

pK_a DA α -QUIMOTRIPSINA

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_H = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right) + K_a}{K_a + [H^+]}$$

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_H = \frac{k_{cat}}{K_m} - \left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_H [H^+] \frac{1}{K_a}$$

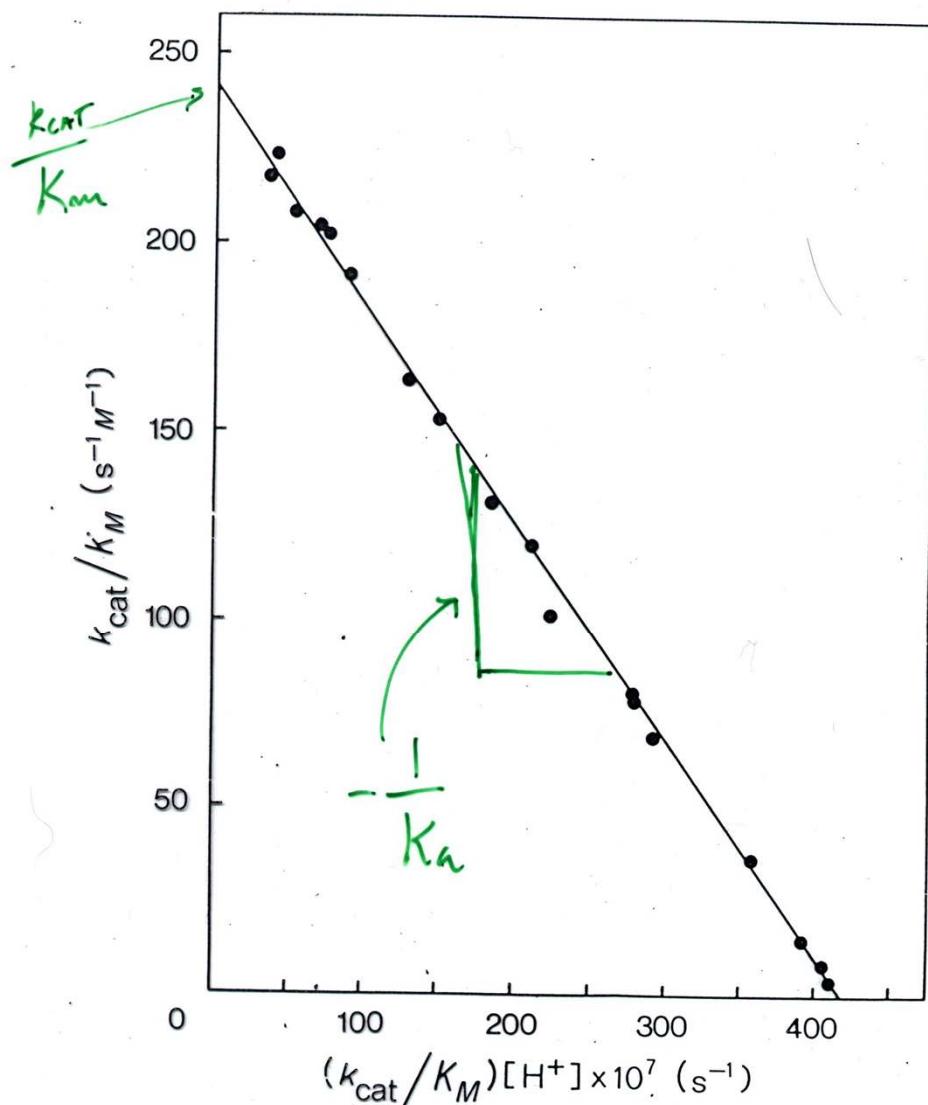


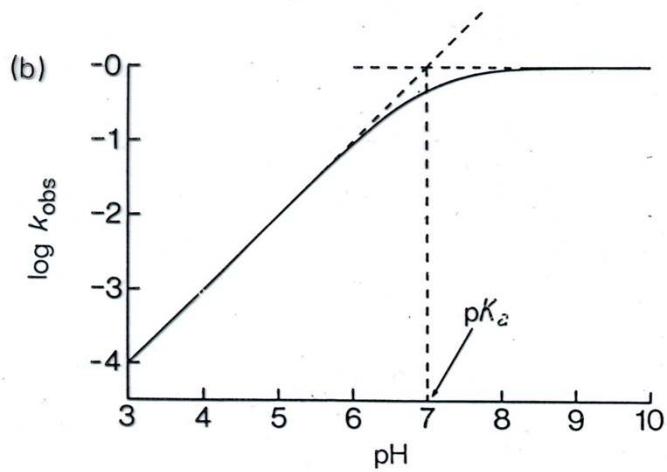
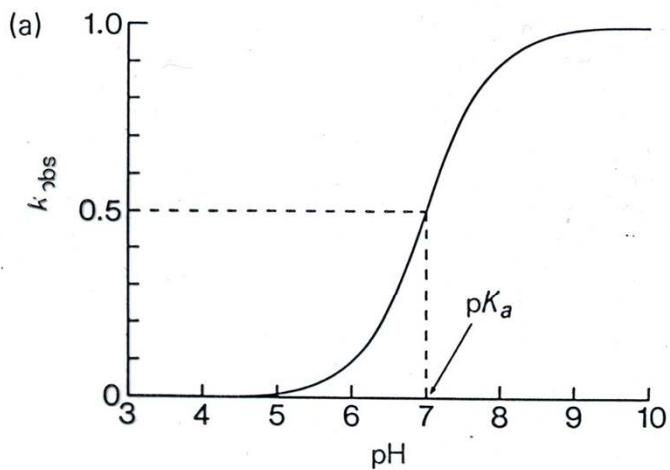
FIGURE 5·4. Illustration of the use of equation 5·34 for determining the pK_a of the active site of an enzyme. This example is the hydrolysis of acetyl-L-tyrosine *p*-acetylanilide by α -chymotrypsin at 25°C. Note that k_{cat}/K_M rather than k_{cat} is used here. [From A. R. Fersht and M. Renard, *Biochemistry* 13, 1416 (1974).]

5.1. pK_a 's of ionizing groups^a

Model compounds (small peptides)	pK_a	Usual range in prot
acid $\alpha\text{-CO}_2\text{H}$	3.6	
$\text{O}_2\text{H})$	4.0	2-5.5
$\text{O}_2\text{H})$	4.5	
(imidazole)	6.4	5-8
acid $\alpha\text{-NH}_2$	7.8	~8
$\text{NH}_2)$	10.4	~10
(imididine)	~12	—
H)	9.7	9-12
H)	9.1	8-11
ates	1.3, 6.5	—

mainly from C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* **17**, 69 (1962); C. Tanford and R. J. P. Williams, *J. Phys. Chemistry* **76**, 2192 (1972); Z. Shaked, R. P. Szajewski, and G. M. Whiteside, *J. Phys. Chemistry* **84**, 4156 (1980).

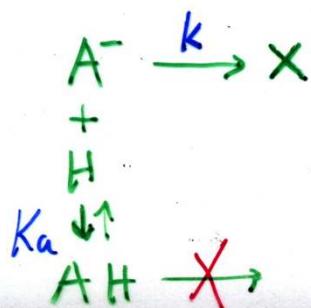
PROPRIEDADES DEPENDENTES DO pH



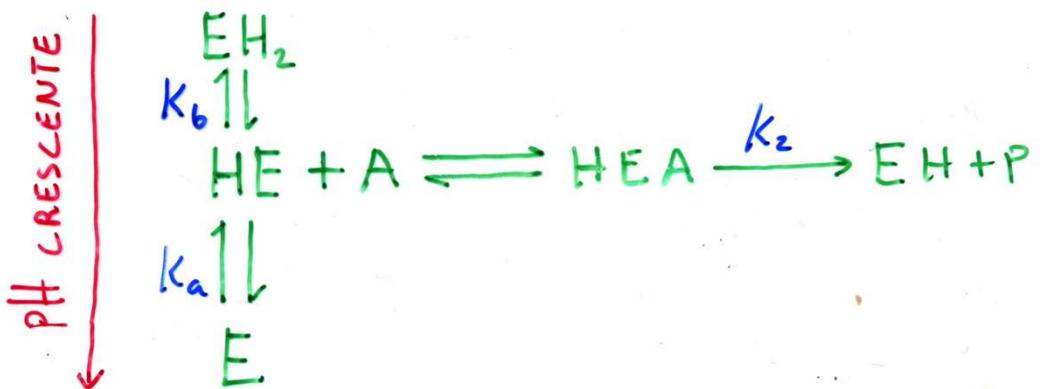
$$K_{obs} = \frac{L_A \cdot K}{K_a + [H^+]}$$

$$L_A^- = 1$$

$$K_a = 1 \times 10^{-7} M$$



MODELO DE MICHAELIS



ASSUME-SE QUE A FORMA MONOPROTONADA $\text{A}-\text{H} \quad \text{B}$
 É A ÚNICA CAPAZ DE INTERAGIR COM O SUBSTRATO
 PARA FORMAR O COMPLEXO ENZIMA-SUBSTRATO

$$K_a = \frac{[\text{E}] [\text{H}^+]}{[\text{HE}]} \quad K_b = \frac{[\text{EH}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2]} \quad K_m = \frac{[\text{HE}][\text{A}]}{[\text{HEA}]}$$

$$[\text{E}]_o = [\text{E}] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2] + [\text{HEA}]$$

$$V_H = \frac{V_{max} [\text{A}]}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} + \frac{[\text{H}^+]}{K_b} \right) + [\text{A}]}$$

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} + \frac{[\text{H}^+]}{K_b} \right)$$

SE K_a E K_b ESTIVEREM SUFICIENTEMENTE ESPAÇADOS,

TEMOS $\Rightarrow K_a \ll K_b \Rightarrow \begin{cases} [\text{H}^+] \approx K_b \Rightarrow \frac{[\text{H}^+]}{K_b} \gg \frac{K_a}{[\text{H}^+]} & (1) \\ [\text{H}^+] \approx K_a \Rightarrow \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \gg \frac{[\text{H}^+]}{K_b} & (2) \end{cases}$

(1) $[\text{H}^+] \rightarrow \text{INIBIDOR COMPETITIVO}$

(2)

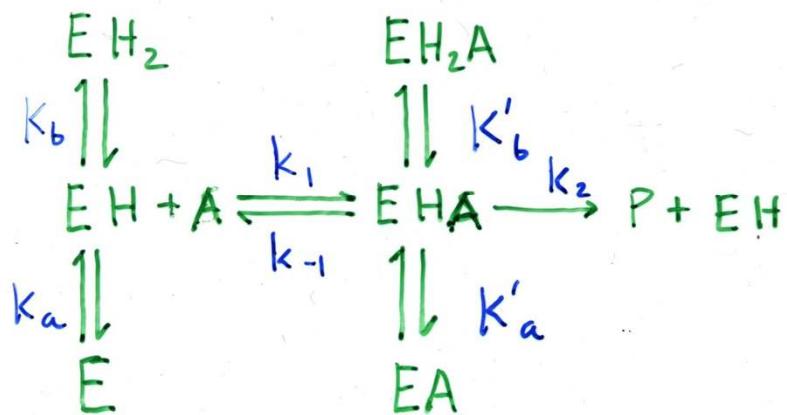
$$V = \frac{V_{max} [\text{A}]}{K_m \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_b} \right) + [\text{A}]}$$

PIXON PLOTS $\frac{1}{V}$ VERSUS $[\text{H}^+]$

$$V = \frac{V_{max} [\text{A}]}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) + [\text{A}]} \quad \frac{[\text{OH}^-]}{10^{-4} / K_a}$$

MODELO DE WALEY

MODELO DE MICHAELIS ASSUME V_{max} INDEPENDENTE DO pH.
ESTA LIMITAÇÃO DESAPARECE AQUI!



$$V = \frac{V_{max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right) + [A] \left(1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right)}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$V_{max}^{app} = V_{max} / \left(1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right)$$

$$K_m^{app} = \frac{\left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right)}{\left(1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right)} \times K_m$$

$$\frac{V_{max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V_{max}}{K_m} \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right)$$

QUANDO $K_b \gg K_a$ E $K'_b \gg K'_a$ TEMOS

$$(1) \text{ pH BAIXO: } \Rightarrow \frac{[H^+]}{K_b} \gg \frac{K_a}{[H^+]}$$

$$(2) \text{ pH ALTO: } \Rightarrow \frac{[H^+]}{K_b} \ll \frac{K_a}{[H^+]}$$

MODELO DE WALEY (CONT.)

(1)

$$V = \frac{V_{\max} [A] / (1 + [H^+] / K'_b)}{K_m \left(\frac{1 + [H^+] / K_b}{1 + [H^+] / K'_b} \right) + [A]}$$

$[H^+] \rightarrow$ INIBIDOR MISTO

(2)

$$V = \frac{V_{\max} [A] / (1 + K'_a / [H^+])}{K_m \left(\frac{1 + K_a / [H^+]}{1 + K'_a / [H^+]} \right) + [A]}$$

$[OH^-] \rightarrow$ INIBIDOR MISTO ($[H^+] = 10^{-14} / [OH^-]$)

~~Ka = K'a, Kb = K'b~~

$$V = \frac{V_{\max} [A] / (1 + K_a / [H^+] + [H^+] / K_b)}{K_m + [A]}$$

INIBIÇÃO NÃO COMPETITIVA

ANÁLISE DE PERFIS DE pH

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}}$$

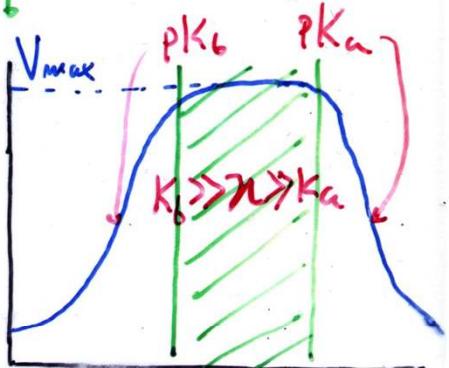
$$\frac{V_{max}^{app}}{K_m} = \frac{\frac{V_{max}}{K_m}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}}$$

SE K_a E K_b ESTÃO SUFICIENTEMENTE SEPARADOS

TEN-SE $K_b \gg K_a$

$$n: K_b \gg n \gg K_a \Rightarrow 1 + \frac{K_a}{n} + \frac{n}{K_b} \approx 1$$

$[H^+] = n \Rightarrow$ ZONA PLANA DO PERFIL



pH baixo:

$$V_{max}^{app} \approx \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_b}} \quad (1)$$

pH alto:

$$V_{max}^{app} \approx \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} \quad (2)$$

$$V_{max}^{opt} = V_{max}$$

↑
SE OS PK's ESTIVEREM
BEM SEPARADOS!

(2)

$$V_{max}^{app} = \frac{1}{2} V_{max}$$

(1)

$$V_{max}^{app} = \frac{1}{2} V_{max}$$

$$\frac{1}{2} V_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}}$$

$$[H^+] = K_a'$$

$$pH = pK_a'$$

$$\frac{1}{2} V_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_b}}$$

$$[H^+] = K_b'$$

$$pH = pK_b'$$

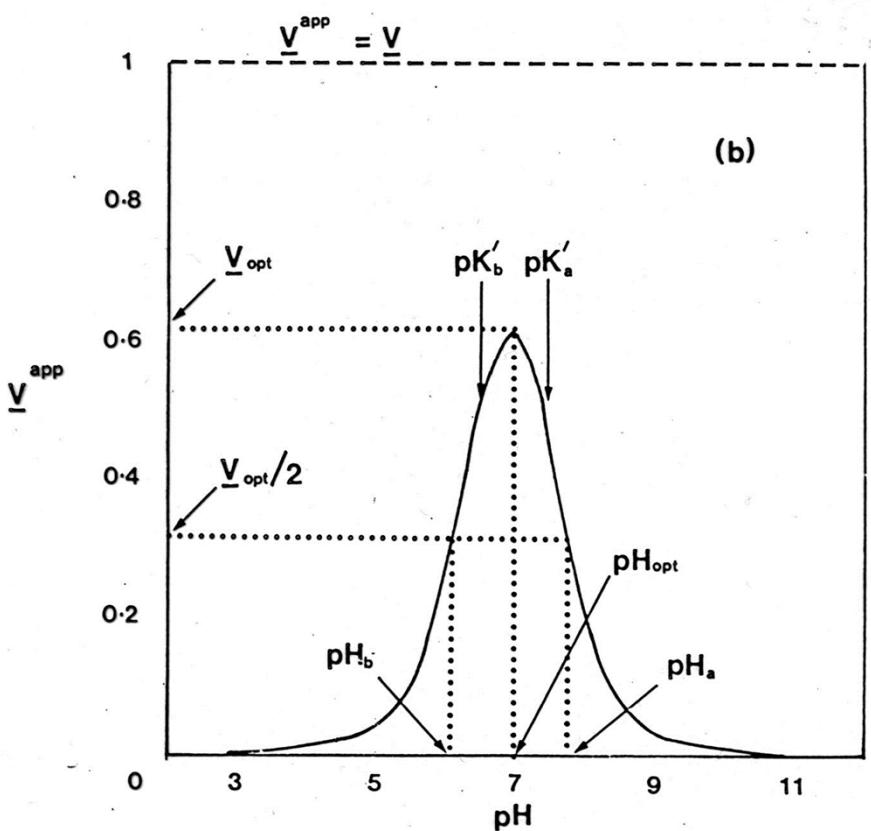
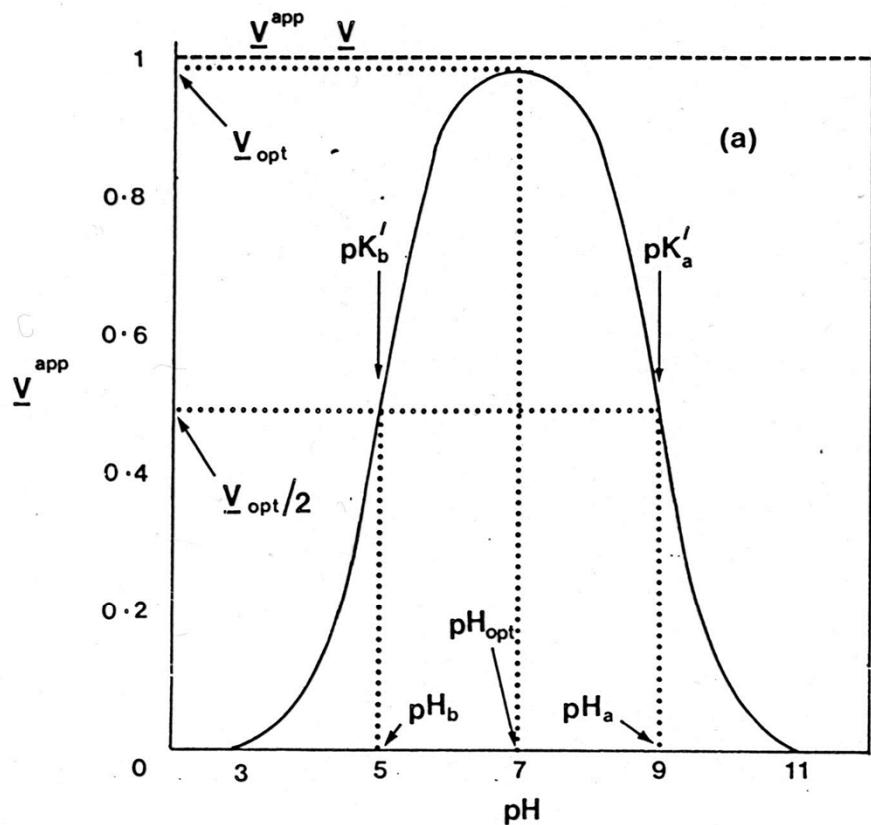
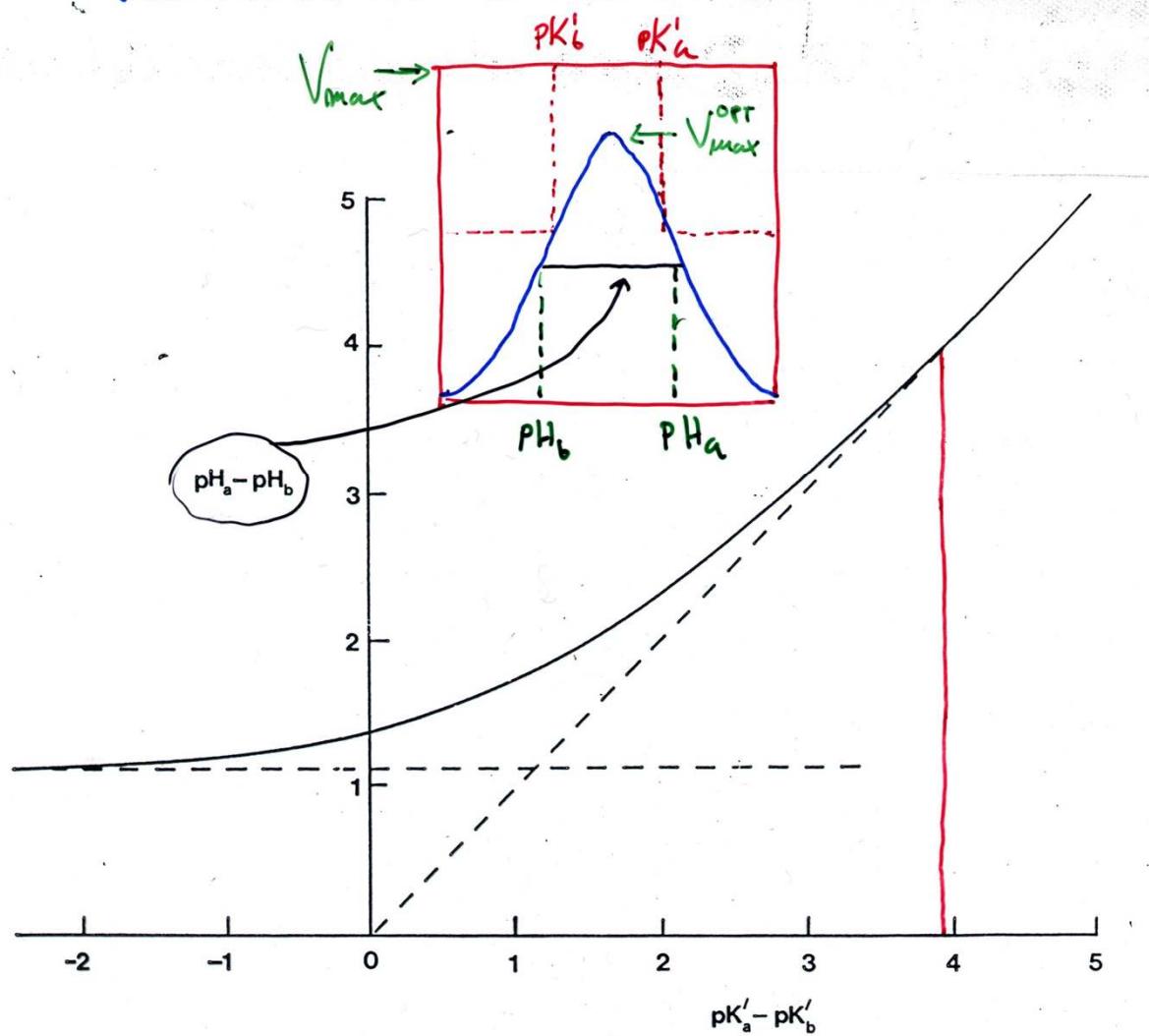


Figure 6.21 pH profiles of V^{app} ($V=1$). (a) Calculated assuming $pK'_b=5.0$, $pK'_a=9.0$. (b) Calculated assuming $pK'_b=6.5$, $pK'_a=7.5$. $pH_{\text{opt}} (= (pK'_a + pK'_b)/2)$ is 7.0 in both cases. Note the effect of pK difference on the shape of the curves.

ANÁLISE DE PERFIS DE pH



QUANDO $V^{\text{opt}} \neq V_{\text{max}}$ NÃO É POSSÍVEL ESTIMAR pK'_a E pK'_b A PARTIR DE $V_{\text{max}}/2$

O GRÁFICO DA ABERTURA DO PROFILE A $\frac{1}{2}V^{\text{opt}}$
 INDICA QUE $pK'_a - pK'_b$ DEVE SER > 3.5 PARA
 QUE OS pK' 'S POSSAM SER ESTIMADOS DE MODO
 FIDUVEL.

GRÁFICOS DE DIXON

(VÁLIDO QUANDO OS PK'S ESTÃO BEM SEPARADOS!)

V_{\max}^{app} :

$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K'_b}} \quad , \quad V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K'_a}{[\text{H}^+]}}$$

$\underbrace{\qquad\qquad\qquad}_{\text{pH BAIXO}}$ $\underbrace{\qquad\qquad\qquad}_{\text{pH ALTO}}$

pH BAIXO $\rightarrow \log V_{\max}^{\text{app}} = \log V_{\max} - \log \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K'_b} \right)$

QUANDO $[\text{H}^+] \gg K'_b$

$$\boxed{\log V_{\max}^{\text{app}} = \log V_{\max} + \text{pH} - \text{p}K'_b} \quad (1)$$

pH ALTO $\rightarrow \log V_{\max}^{\text{app}} = \log V_{\max} - \log \left(1 + \frac{K'_a}{[\text{H}^+]} \right)$

$[\text{H}^+] \ll K'_a$

$$\boxed{\log V_{\max}^{\text{app}} = \log V_{\max} - \text{pH} + \text{p}K'_a} \quad (2)$$

pH INTERMÉDIO

$$\boxed{\log V_{\max}^{\text{app}} \approx \log V_{\max} \quad (1)} \quad (3)$$

INTERSEÇÃO DE 1 COM 3

$$\log V_{\max} = \log V_{\max} + \text{pH} - \text{p}K'_b$$

$$\boxed{\text{pH} = \text{p}K'_b}$$

Gráficos de Dixon

