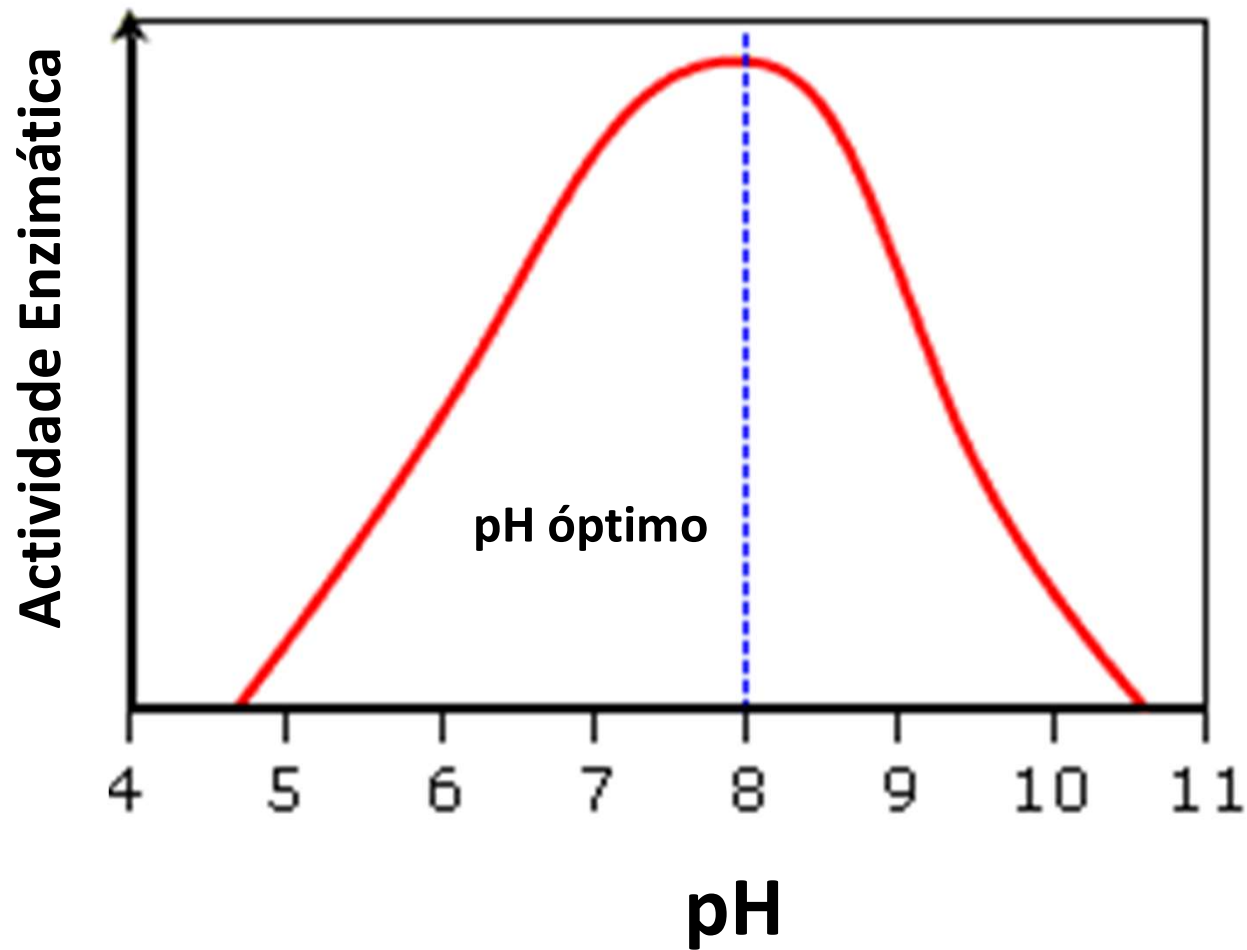


Efeito do pH na actividade enzimática

- O desconhecimento da importância da concentração hidrogeniónica na actividade enzimática foi o maior obstáculo ao sucesso dos primeiros trabalhos 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 pelo químico sueco Sørensen em 1909, num trabalho dedicado à importância do controlo de $[H^+]$ 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 (exemplos de excepções: pepsina, fosfatase alcalina). Neste intervalo as concentrações hidrogeniónicas são muito baixas (10^{-5} – 10^{-9} M) e extremamente sensíveis a impurezas, daí a necessidade do uso de tampões para controlar a concentração do hidrogenião.

Perfil de actividade *versus* pH



pH óptimo de alguns enzimas

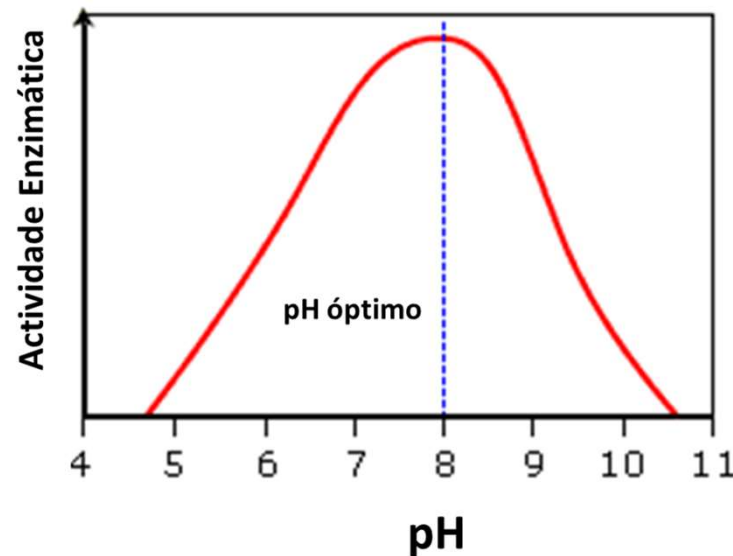
Enzyme	Source	Substrate	pH Optimum
Pepsin	Stomach	Protein	2
Chymotrypsin	Pancreas	Protein	7.8
Papain	Tropical plants	Protein	7–8
Lipase	Microorganisms	Olive oil	5–8
α -Glucosidase (maltase)	Microorganisms	Maltose	6.6
β -Amylase	Malt	Starch	5.2
β -Fructofuranosidase (invertase)	Tomato	Saccharose	4.5
Pectin lyase	Microorganisms	Pectic acid	9.0–9.2
Xanthine oxidase	Milk	Xanthine	8.3
Lipoxygenase, type I ^a	Soybean	Linoleic acid	9.0
Lipoxygenase, type II ^a	Soybean	Linoleic acid	6.5

$[H^+]$ – um inibidor à parte

- Todos os enzimas são afectados pelos protões, tornando-os automaticamente mais importantes que qualquer outro inibidor
- O protão é a mais pequena de todas as espécies químicas, não sendo por isso causador de efeitos conformacionais. Isto torna possível a ocorrência de fenómenos raros, tais como a inibição competitiva pura.
- A concentração do protão poder ser medida e controlada num intervalo muito superior ao de qualquer outro modificador, pelo que é possível esperar observar-se a presença de quaisquer efeitos devidos à sua presença.
- Ao contrário de outros modificadores, o protão pode ligar-se a múltiplos locais na superfície do enzima, o que pode requerer o uso de um modelo cinético com múltiplos sites de ligação.

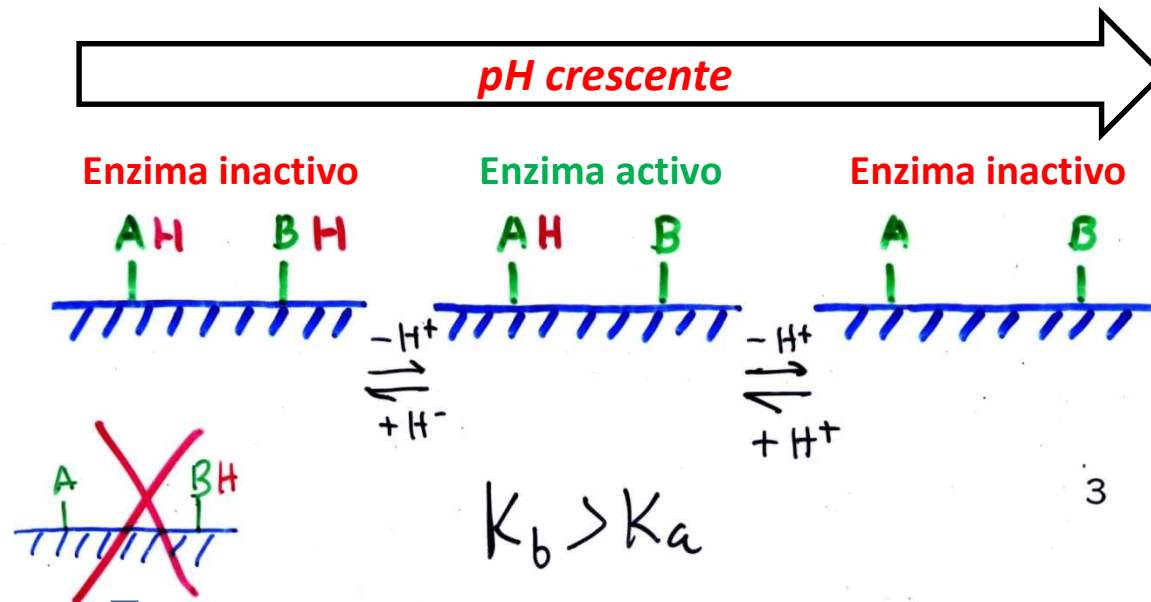
Apesar do efeito do protão poder ser visto como um caso particular de inibição hiperbólica, os aspectos apontados justificam um tratamento independente deste modificador.

A maioria dos enzimas apresenta uma curva de actividade *versus* pH do seguinte tipo:



- O valor máximo de actividade é designado por *pH óptimo*. Este valor não coincide necessariamente com o ponto isoeléctrico da proteína (valor do pH para a qual a carga total da proteína é nula)

- A dependência do pH pode ser explicada pela dissociação de *dois* grupos ionizáveis na superfície do enzima:

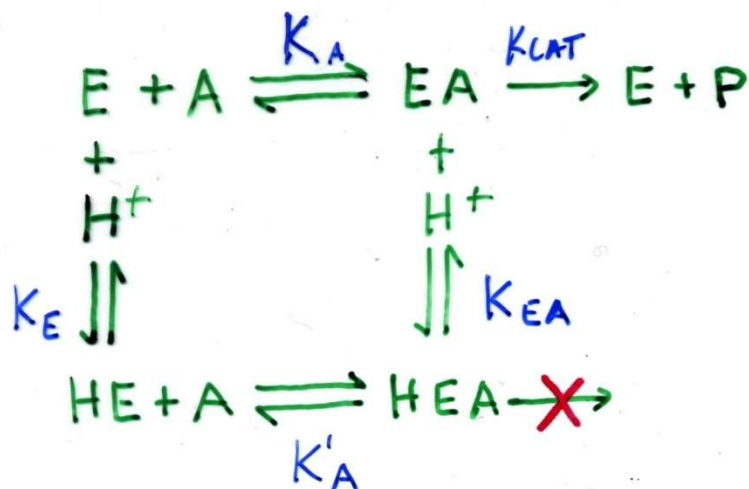


Se K_a e K_b estiverem bem separados esta forma é praticamente inexistente

K_a – cte. de dissociação do grupo A

K_b – cte. de dissociação do grupo B

Mecanismo simples de Michaelis-Menten para a dependência da actividade com o pH



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

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

Este modelo assume que a resposta ácido-base do enzima é controlada por um único grupo.

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

$$K_E \neq K_{EA} \Rightarrow K_A = K'_A \frac{K_E}{K_{EA}} \quad [E]_0 = [E] + [HE]$$

$$[E]_0 = [E] + [HE] + [EA] + [HEA]$$

$$V_H = \frac{K_{CAT} [E]_0 [A]}{K_A \left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} \right) + [A] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EA}} \right)}$$

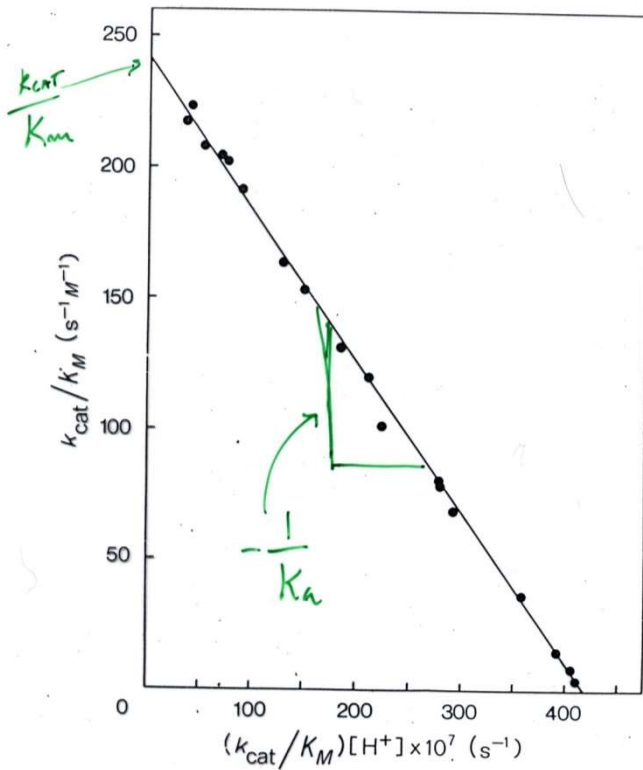
K_{CAT} :

$$V_{max,H} = [E]_0 K_{CAT,H} = \frac{K_{CAT} K_{EA}}{K_{EA} + [H^+]} [E]_0$$

K_m :

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

Determinação de K_a no modelo simples de Michaelis-Menten



$$\left(\frac{K_{CAT}}{K_M}\right)_H = \frac{(K_{CAT}/K_M) + K_a}{K_a + [H^+]}$$

$$\left(\frac{K_{CAT}}{K_M}\right)_H = \frac{K_{CAT}}{K_M} - \left(\frac{K_{CAT}}{K_M}\right)_H [H^+] \frac{1}{K_a}$$

K_{cat} e K_m são determinados para diferentes valores de pH. (como ?)

Gráfico de k_{cat}/K_m versus $(k_{cat}/K_m)[H^+]$ com declive $-1/K_a$

O valor de K_a estimado correspondente à constante de dissociação do grupo ionizável no modelo simples de Michaelis-Menten.

Substrate	pK_a		Ref.
	k_{cat}/K_M	k_{cat}	
Acetyl-L-phenylalanine alaninamide ^a	6.80	6.6	1
Formyl-L-phenylalanine semicarbazide ^a	6.84	6.32	1
Acetyl-L-tyrosine <i>p</i> -acetylanilide ^a	6.77	—	1
<i>p</i> -Nitrophenyl acetate ^a	6.85	—	2
Acetyl-L-phenylalanine ethyl ester ^a	6.8	6.85	3
Acetyl-L-tyrosine <i>p</i> -acetylanilide ^b	6.83	—	4
Acetyl-L-tryptophan <i>p</i> -nitrophenyl ester ^b	6.50	6.9	4

^a α -Chymotrypsin, 25°C, ionic strength 0.1 *M*.

^b δ -Chymotrypsin, 25°C, ionic strength 0.95 *M*.

1 A. R. Fersht and M. Renard, *Biochemistry* **13**, 1416 (1974).

2 M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kézdy, and H. d'A. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 3680 (1964).

3 B. R. Hammond and H. Gutfreund, *Biochem. J.* **61**, 187 (1955).

4 M. Renard and A. R. Fersht, *Biochemistry* **12**, 4713 (1973).

O valor de pH óptimo varia com o substrato.

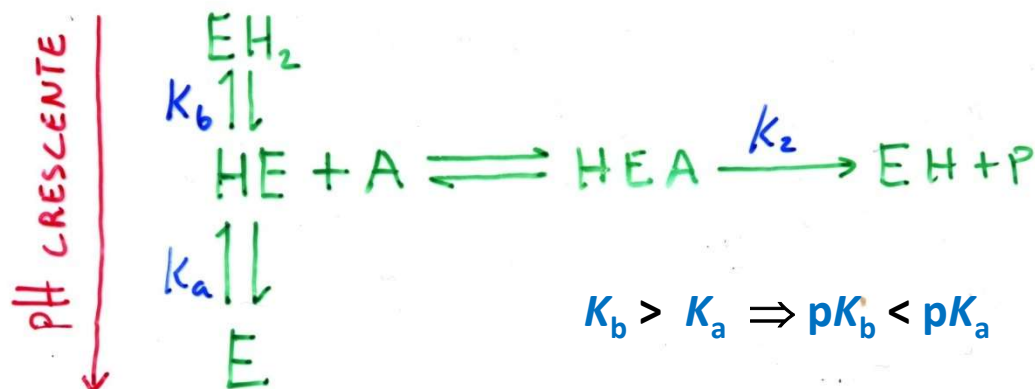
pK_a 's de grupos ionizáveis

Group	pK_a	
	Model compounds (small peptides)	Usual range in proteins
Amino acid α -CO ₂ H	3.6	2–5.5
Asp (CO ₂ H)	4.0	
Glu (CO ₂ H)	4.5	
His (imidazole)	6.4	5–8
Amino acid α -NH ₂	7.8	~8
Lys (ϵ -NH ₂)	10.4	~10
Arg (guanidine)	~12	—
Tyr (OH)	9.7	9–12
Cys (SH)	9.1	8–11
Phosphates	1.3, 6.5	—

^a Data mainly from C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* **17**, 69 (1962); C. Tanford and R. Roxby, *Biochemistry* **11**, 2192 (1972); Z. Shaked, R. P. Szajewski, and G. M. Whitesides, *Biochemistry* **19**, 4156 (1980).

- 25-30% dos aminoácidos constituintes dos enzimas possuem cadeias laterais ionizáveis.
- Os pK_a 's dos grupos ionizáveis apresentam desvios em relação aos valores “ideais” que dependem do seu micro-ambiente estrutural no enzima.

Modelo de Michaelis (2 grupos)



Assume-se que a forma mono-protonada (HE) é a única capaz de interagir com o substrato para formar o complexo enzima-substrato (EA).

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

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2] + [\text{HEA}]$$

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

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

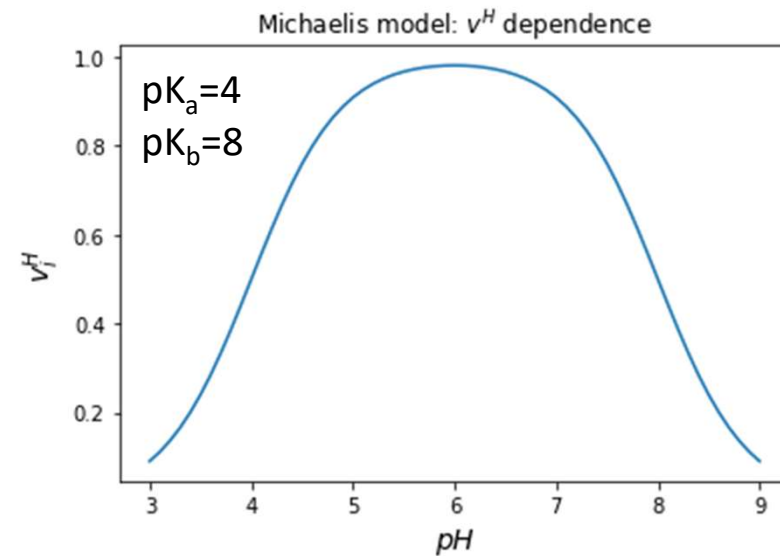
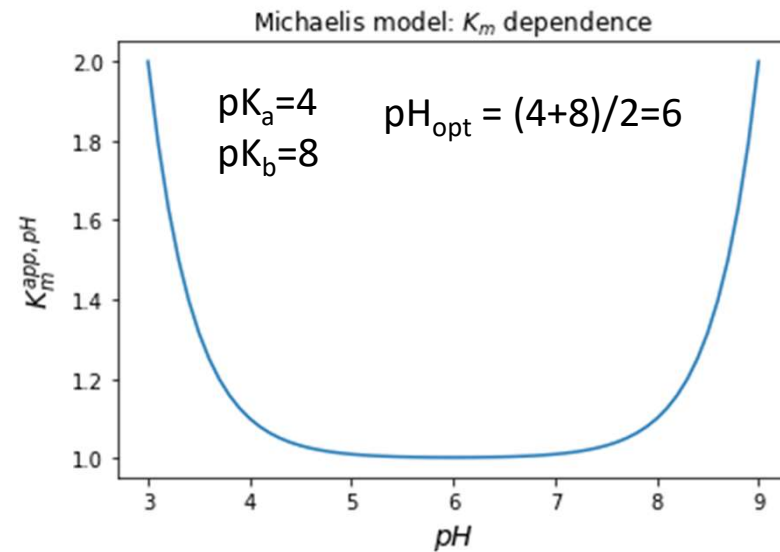
$$K_m^{app,H} = Km \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right)$$

Minimum:

$$[H^+]_{opt} = \sqrt{K_a * K_b}$$

$$pH_{opt} = \frac{pK_a + pK_b}{2}$$

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



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

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

SE K_a E K_b ESTIVEREM SUFICIENTEMENTE ESPAÇADOS,

TEMOS $K_a \ll K_b \Rightarrow$

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

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

(2)

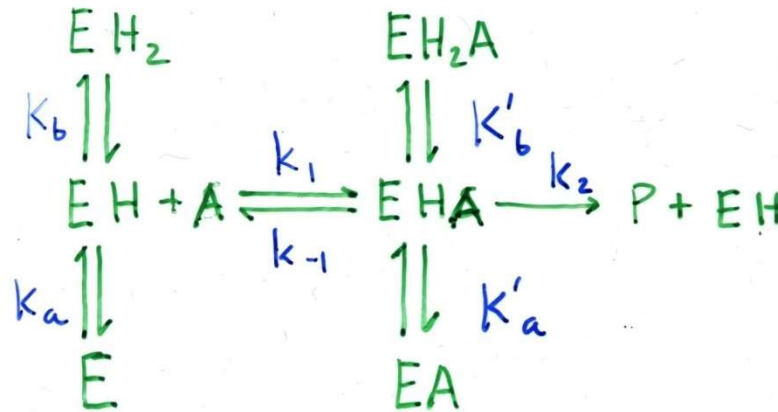
$$V = \frac{V_{max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[H^+]}{K_b} \right) + [A]}$$

DIXON
PLOTS

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

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

Modelo de Waley



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

No modelo de Michaelis V_{\max} (k_{cat}) é independente do pH, mas essa limitação desaparece neste modelo, graças à existência de equilíbrios de protonação envolvendo o complexo enzima-substrato (constantes K'_b e K'_a).

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

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

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

V_{max}^{app} é dependente do pH !

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

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

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

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

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

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

———— ✕ ——— ✕ ———

$$K_a = K'_a, K_b = K'_b$$

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

INIBIÇÃO NÃO COMPETITIVA

Análise de perfis de pH (1)

Considerando os parâmetros cinéticos do modelo de Waley:

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

Se os valores de K_a e K_b estiverem suficiente separados, deverão existir valores de $[H^+]$ tais que $K_b \gg [H^+] \gg K_a$

o que irá implicar: $K_b \gg [H^+] \gg K_a \Rightarrow 1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \approx 1$

Daqui conclui-se que, para esta gama de valores de $[H^+]$, deverão ser válidas as seguintes relações:

$$V_{\max}^{app,pH} \approx V_{\max} \quad \left(\frac{V_{\max}}{K_m} \right)^{app,pH} \approx \frac{V_{\max}}{K_m}$$

ou seja, deverá existir uma gama de valores de pH para a qual o efeito dos equilíbrios de ionização sobre os parâmetros cinéticos do enzima é negligível, sendo os valor dos parâmetros aproximadamente constante.

Análise de perfis de pH (2)

pK's suficientemente afastados podem ser estimados a partir do perfil de pH!

Zona "plana" do perfil de pH

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

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

pH baixo

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

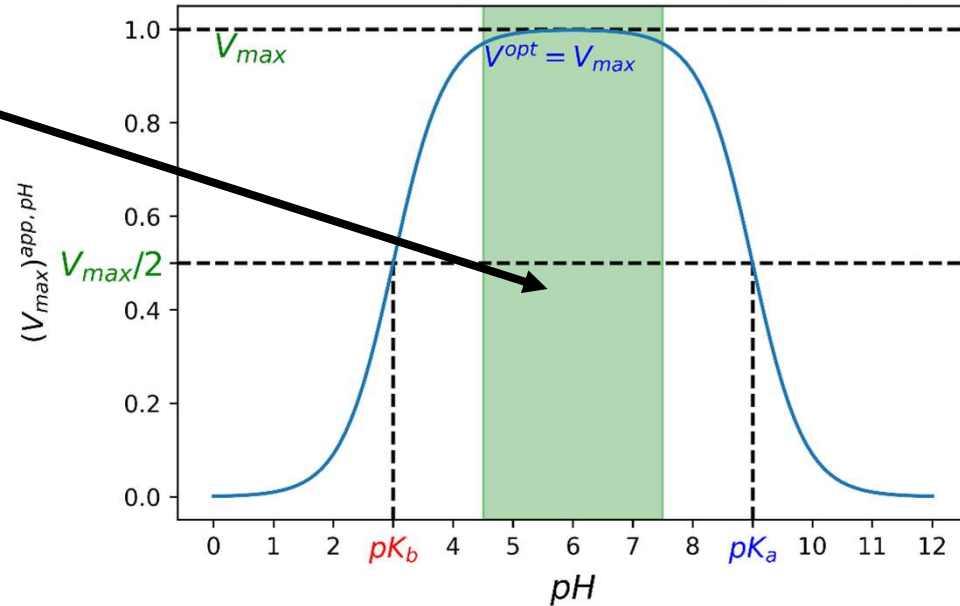
$$\boxed{\text{pH} = \text{pK}'_b}$$

pH alto

$$V_{\max}^{\text{app}, \text{pH}} \approx \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K'_a}{[H^+]}}$$

$$\boxed{\text{pH} = \text{pK}'_a}$$

Modelo de Waley: variação de V_{\max} com o pH



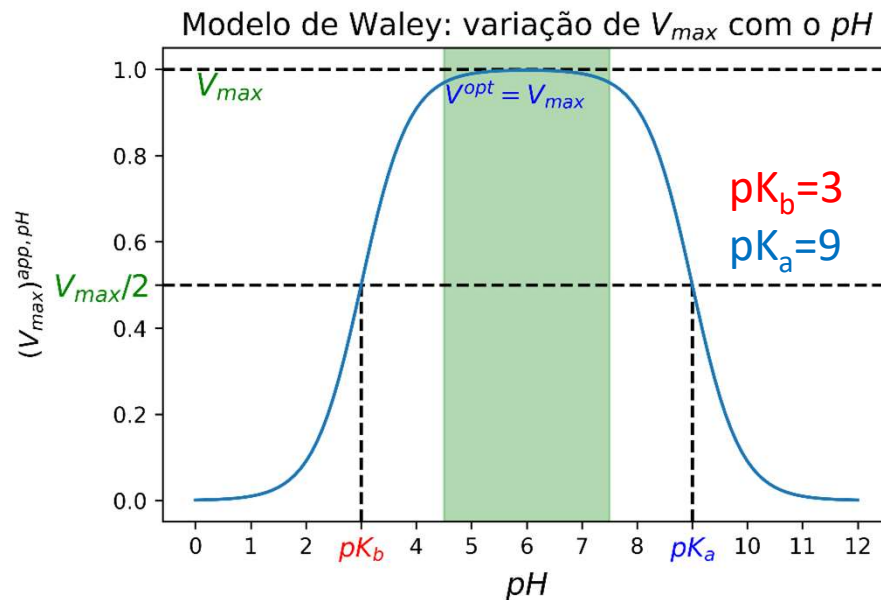
$$\textcircled{1} \quad V_{\max}^{\text{app}, \text{pH}} = \frac{V_{\max}}{2} \Rightarrow \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_b}} \Rightarrow [H^+] = K'_b$$

$$\textcircled{2} \quad V_{\max}^{\text{app}, \text{pH}} = \frac{V_{\max}}{2} \Rightarrow \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K'_a}{[H^+]}} \Rightarrow [H^+] = K'_a$$

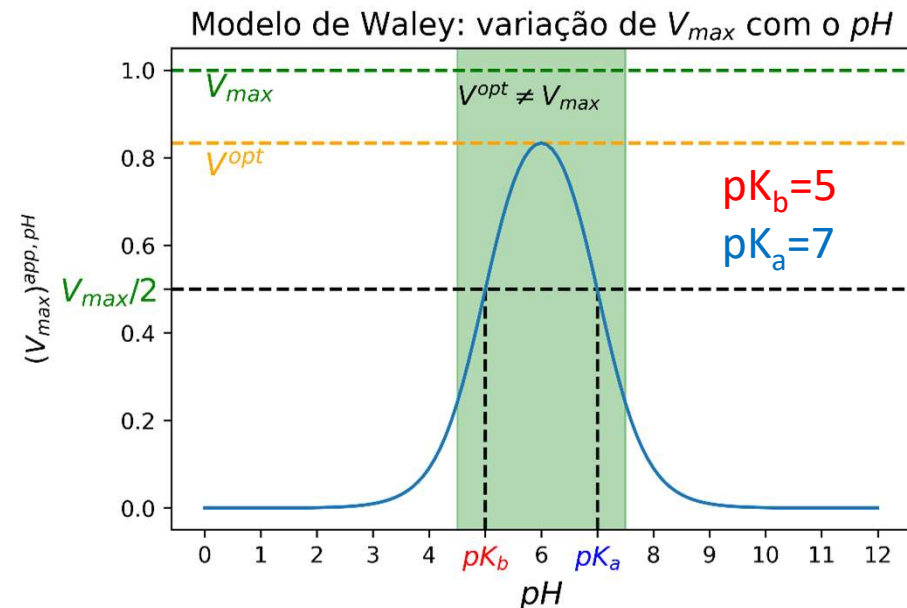
Análise de perfis de pH (3)

A estimativa de pK's só é possível se os pK's estiverem bem separados, com a existência de uma zona em $V^{\text{opt}} = V_{\text{max}}$.

Para pK's próximos, o perfil já não permite este processo.

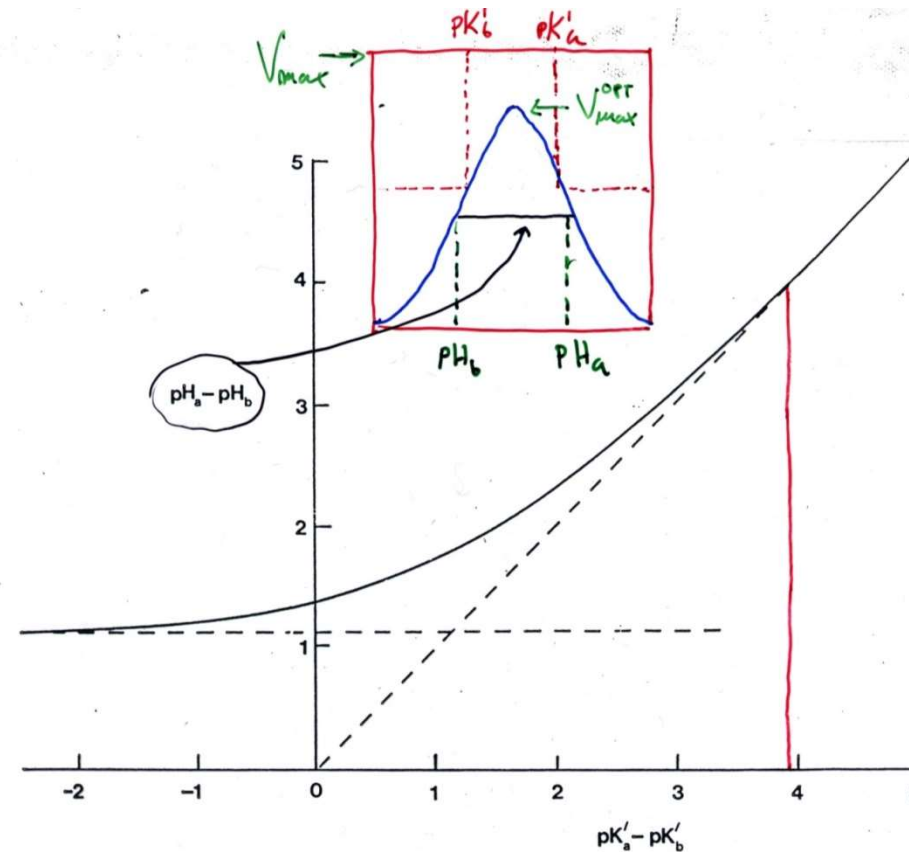


pK's bem separados, V^{opt} atinge V_{max} , pK's podem ser estimados a partir do valor $V_{\text{max}}/2$



pK's próximos, V^{opt} é inferior a V_{max} , pK's não podem ser estimados a partir do valor $V_{\text{max}}/2$

Análise de perfis de pH (4)



- Quando $V_{max}^{opt} \neq V_{max}$ não é possível estimar pK'_a e pK'_b a partir de $V_{max} / 2$.
- O gráfico de abertura do perfil a $1/2 V^{opt}$ indica que $pK'_b - pK'_a$ deve > 3.5 para que os pK 's possam ser estimados de modo fiável.

Gráficos de Dixon (1)

V_{max}^{app} :

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

pH BAIXO pH ALTO

Válido APENAS
quando os pK's estão
bem separados

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

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

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

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

Gráficos de Dixon (2)

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

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

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

pH INTERMÉDIO

$$\log V_{\text{max}}^{\text{app}} \simeq \log V_{\text{max}} \quad (3)$$

Gráficos de Dixon (3)

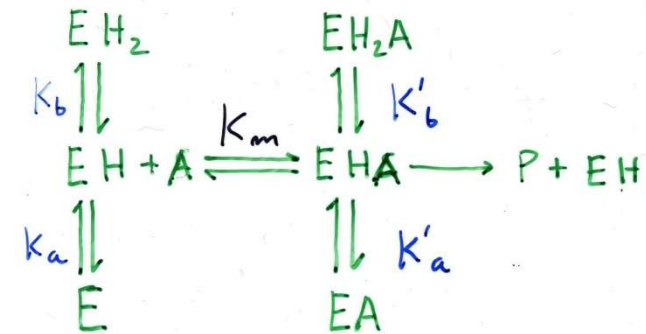
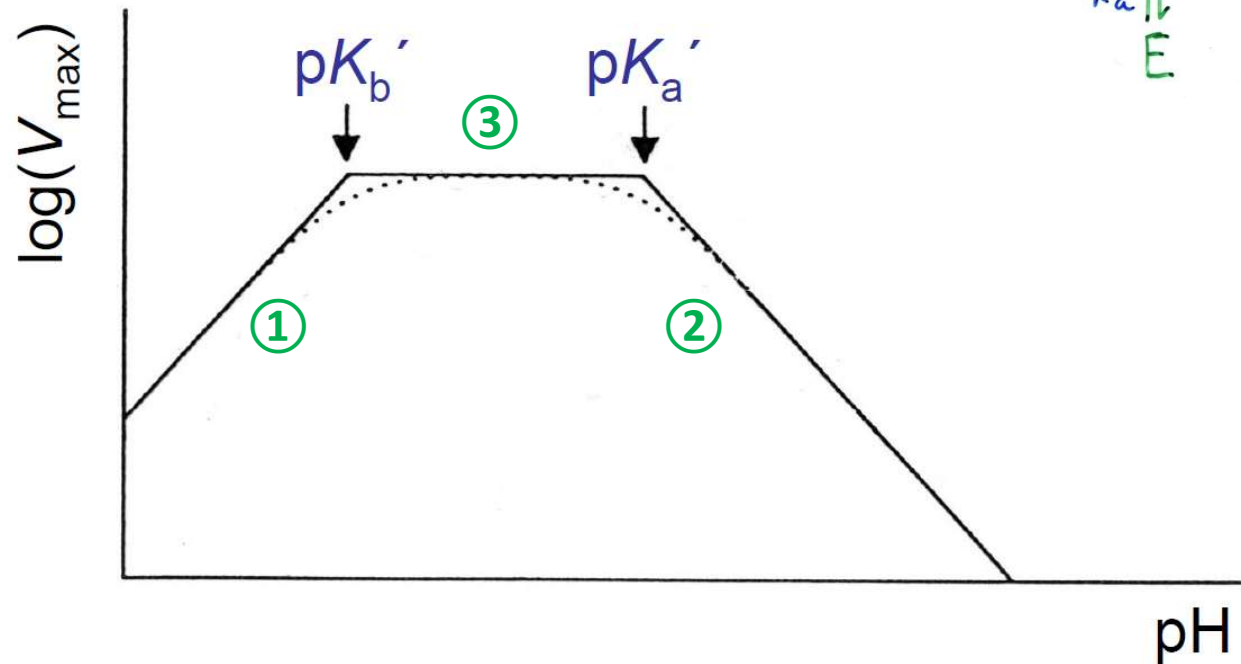
Intersecção das rectas 1 e 3:

$$\begin{cases} \log V_{\max}^{app,pH} = \log V_{\max} + pH - pK'_b \\ \log V_{\max}^{app,pH} = \log V_{\max} \end{cases} \Rightarrow \log V_{\max} = \log V_{\max} + pH - pK'_b \Rightarrow pH = pK'_b$$

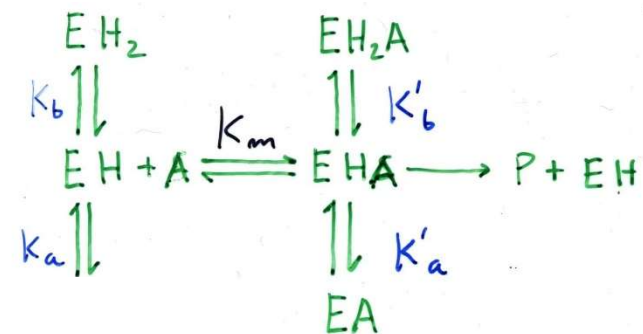
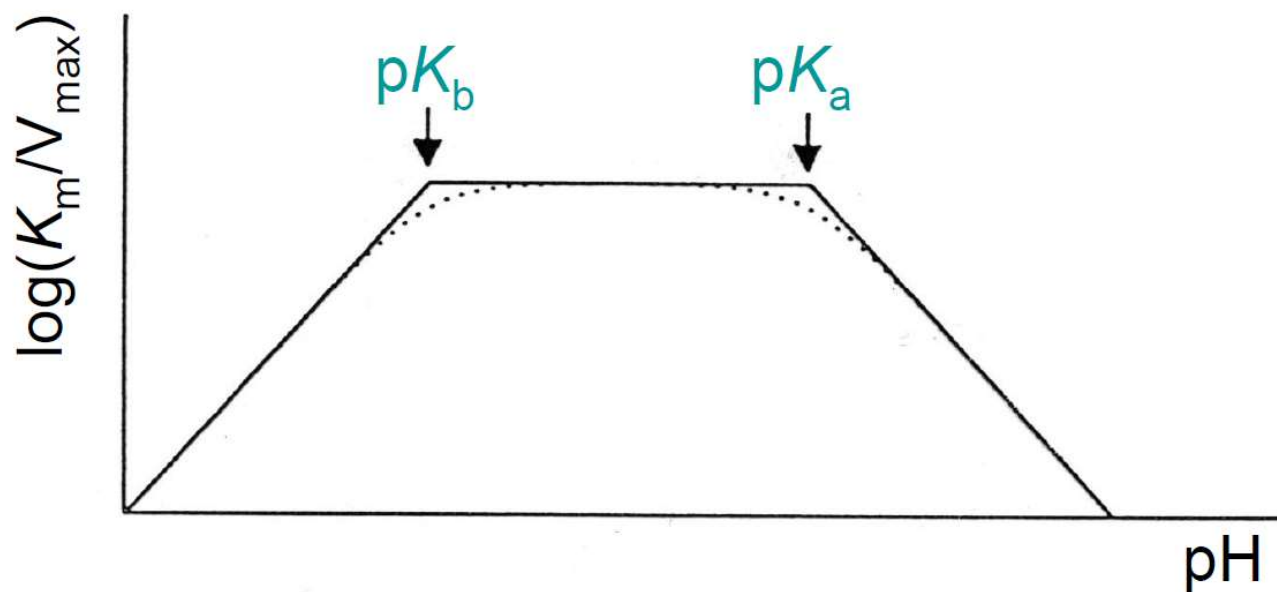
Intersecção das rectas 2 e 3:

$$\begin{cases} \log V_{\max}^{app,pH} = \log V_{\max} + pH - pK'_a \\ \log V_{\max}^{app,pH} = \log V_{\max} \end{cases} \Rightarrow \log V_{\max} = \log V_{\max} + pH - pK'_a \Rightarrow pH = pK'_a$$

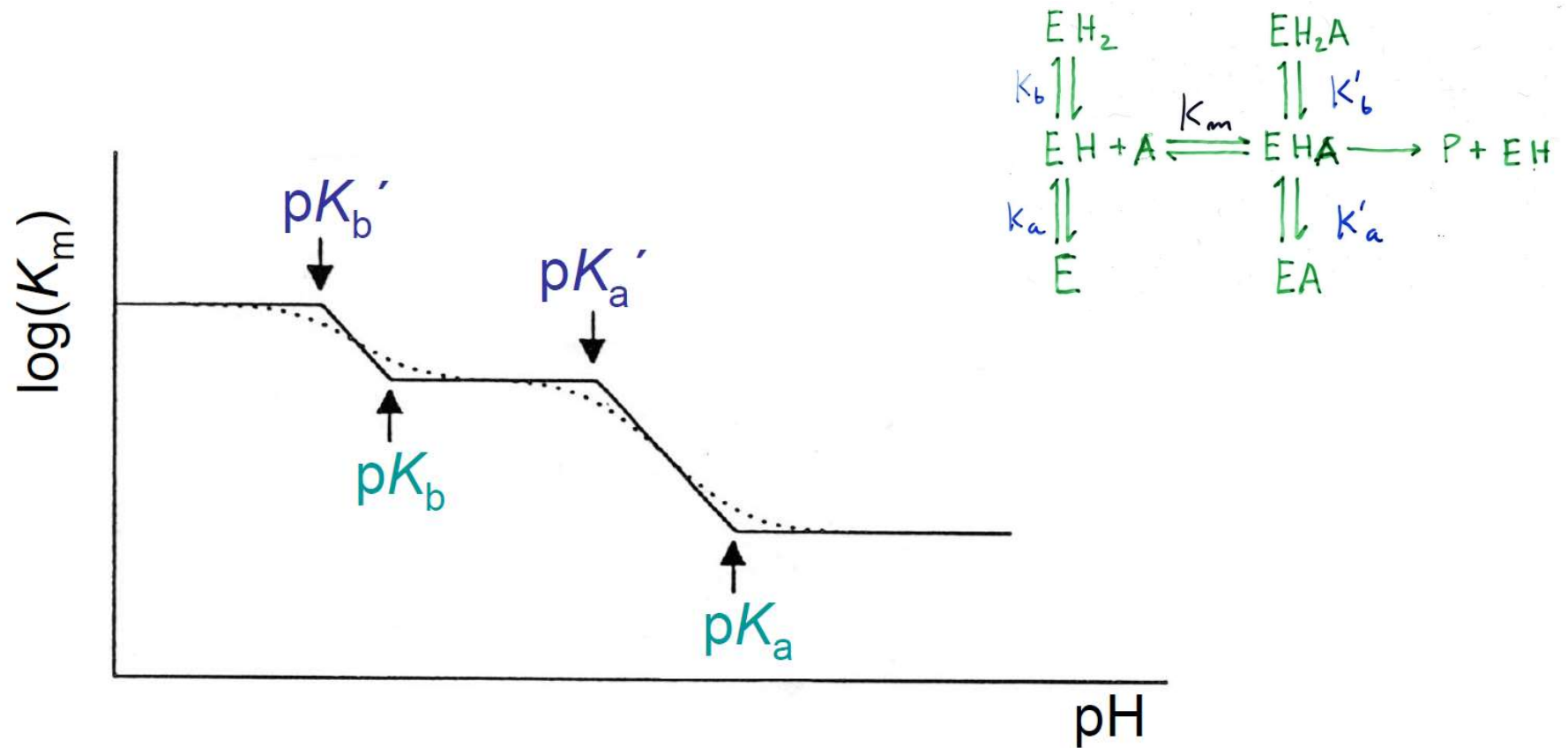
Gráficos de Dixon (4)



Gráficos de Dixon (5)



Gráficos de Dixon (6)



Método de Alberty e Massey

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b}} \quad \left(\frac{dV_{\max}^{app, pH}}{d[H^+]} \right)_{[H^+] = [H^+]_{opt}} = 0 \Rightarrow [H^+]_{opt} = \sqrt{K'_a K'_b}$$

$$pH_{opt} = -\log_{10}[H^+]_{opt}$$

$$V_{\max}^{opt} = \frac{V_{\max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K'_a}{K'_b}}}$$

$$[H^+] \in \{[H^+]_a, [H^+]_b\} \Rightarrow V_{\max}^{app} / V_{\max}^{opt} = 1/2$$

$$\frac{V_{\max}^{app}}{V_{\max}^{opt}} = \frac{1}{2} = \frac{1 + 2\sqrt{K'_a K'_b}}{1 + K'_a/[H^+] + [H^+]/K'_b} \Rightarrow \begin{cases} K'_b = [H^+]_a + [H^+]_b + 4[H^+]_{opt}^2 \\ K'_a = [H^+]_{opt}^2 / K'_b \end{cases}$$

K'_a e K'_b podem ser estimados a partir de $[H^+]_a$ e $[H^+]_b$ e de $[H^+]_{opt}$

Método de Friedenwald

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

$$\frac{1}{V_{\max}^{app}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max} K'_b} \left(\frac{[H^+]_{opt}^2}{[H^+]} + [H^+] \right)$$

abscissa na origem: $-K'_b$
ordenada na origem: V_{\max}

