

Tema 7

El efecto del pH

Toda reacción enzimática, en general, muestra una gráfica de efectividad a diferentes pH bifásica, como la que se muestra en las hojas. Estas gráficas son fáciles de conseguir, simplemente se representa la actividad enzimática medida a distintos valores de pH. Todas suelen presentar el mismo patrón, con poca actividad a pH ácido y básico, y un máximo entre los dos.

Esta inactivación a pH extremos, puede deberse, en principio a tres causas:

- **Ionización del sustrato:** Pudiera ser que un grupo específico de interacción con el C.A. de la enzima se viera afectado por el pH. Esto podría ocasionar que éste no entrara, o que no se pudiera transformar, viéndose afectada enormemente la actividad. Normalmente estos efectos pueden ser predecibles al poder conocer los pK del sustrato.
- **Cambios conformacionales de la enzima:** Estos efectos suelen producirse en los extremos de la gráfica, a pH muy ácidos o muy básicos. Estos cambios conformacionales, o bien desconfigurarían el C.A. (como efecto más leve) o bien desnaturalizarían total o parcialmente la proteína. Esto haría perder catalizador activo, lo que contribuiría a descender la actividad, como se observa en la gráfica.
- **Ionización de grupos del C.A. que participan en:**
 - Unión del sustrato.
 - Transformación del sustrato.

En cualquiera de estos dos tipos ionizables, estamos excluyendo ya, *a priori*, cualquiera de los dos efectos anteriores, asumiendo que el pH afecta sólo a estos grupos, ni a la conformación de la enzima (que sigue activa), ni al sustrato.

Efecto sobre la velocidad inicial

Los primeros cinéticos que lo estudiaron, llegaron a la conclusión de que la enzima en cuestión, presenta dos grupos laterales antagónicos en el C.A.. Estos dos aminoácidos implicados, serían los responsables de la gráfica bifásica, siempre y cuando **el cambio de pH favoreciera a uno y perjudicara al otro**. Esto no implica necesariamente, que en la forma catalítica, los dos grupos sean un ácido y una base, en la forma ionizada (ej. "COO"; "NH3+"), sino que basta con que un cambio de pH haga que varíen su estado de ionización de forma inversa uno del otro. Para simplificar estudiaremos los aminoácidos implicados sólo en la primera etapa, la formación del complejo ES.

Ya que en una proteína, los grupos amino y carboxilo se encuentran formando el esqueleto, no intervienen en su ionización, lo que nos permitiría realizar unas curvas de valoración de los dos grupos implicados. Seguiremos el ejemplo más claro, el de un carboxilo y un amino (Glu y Lys por ejemplo).

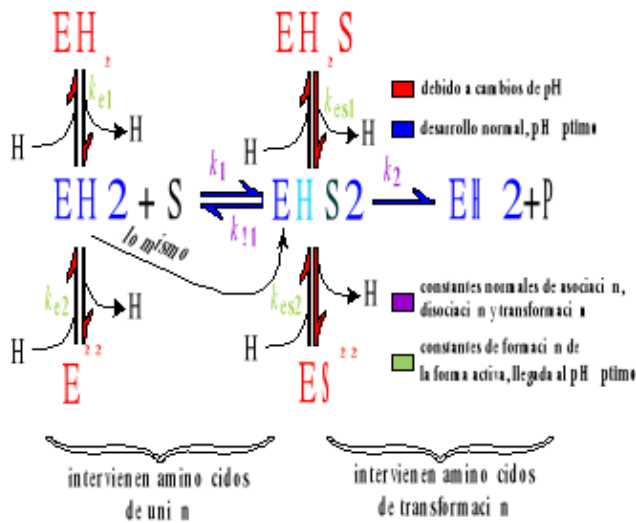
Como se observa en la gráfica % de especie ionizada Vs pH, ambas curvas son casi simétricas, cortándose en el punto al que llamaremos isoelectrónico. No se trata realmente del pI, ya que como hemos dicho antes, las dos especies implicadas no tienen porque ser estas dos, pudiendo ser cualesquiera, lo que podría significar un punto de corte con carga + o - (incluyendo sólo a los dos aminoácidos, no a la enzima en conjunto). El valor de pH resultado de la interpolación sería, por tanto, el pH al que las dos especies se encuentran de forma mayoritaria en el estado de ionización correcto para la catálisis. Esto implica una actividad máxima a ese valor de pH, y por eso se le llama **pH óptimo**. **En el pH óptimo, la enzima no se encontrará al 100% en la forma activa**, ya que alguno residuos de algunos C.A. se habrán ionizado a la forma no activa, haciendo que

el porcentaje de E_a alcance más o menos un 80-85%, pero este porcentaje, función de cada enzima, será el máximo alcanzable.

A priori, podríamos determinar el pH óptimo de la enzima, ya que conocemos los pK de los grupos laterales, pero esto no es así. La explicación viene dada por las características de C.A., el cual se trata de un bolsillo con características totalmente diferentes de las de la disolución acuosa que le rodean y a las de otros centros de otras enzimas. Esto hace que en cada caso tengamos que estudiar las características de los grupos, siendo imposible hallar el pH óptimo simplemente hallando el pI de los dos aminoácidos implicados, suponiendo que sepamos cuales son.

A parte de esto, hay que decir que realmente no se trata de solamente dos aminoácidos, sino que podría haber más que se pueden ionizar, sólo que en este tipo de gráficas **solo vemos el efecto que causan dos de ellos, aquellos que presenten unos pK más próximos al pH óptimo.**

Efectuaremos ahora un análisis cinético:



Entrando un poco más profundamente en el tema, empezamos por distinguir dos tipos de aminoácidos, los implicados en la unión del sustrato a la enzima (de los que hemos tratado hasta ahora) y de los implicados en la transformación del mismo (con un desarrollo teórico exactamente igual). A continuación explicaremos lo que significan cada una de las especies y las constantes que aparecen en el esquema, recordando que utilizamos un ejemplo de cargas, por lo que los signos no tienen por que ser siempre así:

• Especies enzimáticas

- **EH:** Enzima libre a pH óptimo. El H implica el protón del aminoácido más básico y el signo " al residuo más ácido, que debe perder el protón para encontrarse en forma activa. Estamos hablando de la enzima libre, por tanto, estamos haciendo hincapié en los aminoácidos implicados en la unión.
- **EH₂:** Enzima libre a pH más ácido que el óptimo, de modo, que la especie más ácida se protona. Seguimos tratando con la enzima libre, con los aminoácidos de unión del sustrato.
- **EH₂:** Enzima libre a pH más básico que el óptimo, con lo que la especie más básica ha perdido el protón, y eso lo que representamos como 2. Siguen siendo los aminoácidos de unión.
- **EH₂S:** Complejo ES, salvo que ahora adjuntamos la ionización de los aminoácidos implicados en transformación. El protón y el signo " que se marcan corresponden, por tanto, a estos grupos, mientras que la E engloba los de unión, como se marca en el gráfico ($E = EH$).
- **EH₂S:** Al igual que sucedía antes de la unión del sustrato, esta especie se encontraría a un pH más ácido, con lo que el aminoácido más ácido de los dos con un pK más cercano al pH óptimo, implicados en transformación, habría ganado un protón.

- **ES2:** se trata de la especie derivada del complejo ES a un pH más básico que el óptimo, con lo que la especie más básica pierde un protón.

• Constantes

- **k_1 y k^{-1} :** Son las constantes de formación y disociación del complejo conocidas por todos, salvo que ahora se producen al pH óptimo.
- **ke_1 :** Es la constante de formación de la especie *enzima libre a pH óptimo* (EH). Rige el paso de desprotonación de la especie ácida implicada en la unión de sustrato.
- **ke_2 :** Es la constante de formación de la especie óptima del aminoácido más básico desde un pH superior al óptimo.
- **kes_1 :** constante equivalente a ke_1 , pero ahora implica al aminoácido ácido necesario para la transformación.
- **kes_2 :** equivalente a ke_2 , pero referente al aminoácido más básico de la transformación.
- **k_2 :** se trata de la constante de la reacción a la que consideramos irreversible. Esta tomada a pH óptimo.

El hecho de encontrarnos especies distintas para diferentes etapas, es fruto de que, normalmente, hay distintos aminoácidos para la unión del sustrato que para la posterior transformación. Pudiera ser, sin embargo, que aquellos implicados en la unión del sustrato, fueran también los responsables de la transformación. Entonces, las constantes ke y kes , serían las mismas. Esto puede no ser así, ya que **la unión del sustrato puede modificar los pK de los aminoácidos implicados en transformación y/o unión.**

Ecuación de velocidad

Partimos de la ecuación genérica de velocidad, salvo que ahora, el complejo ES, se reduce sólo a la forma activa, ESH. En ella sustituiremos el resultado de despejar esta especie en la ecuación de $[E]_T$, al igual que hacemos siempre. Ya que el pH ejerce una variación sobre la concentración de las especies catalíticamente activas, y no sobre las constantes cinéticas, siempre, al contar con el pH disminuirán las especies activas: $[E]_T > [Ea]$.

La ecuación que nos definirá la enzima total contará, por tanto, con todas las especies no activas de los aminoácidos implicados en la unión ($[EH_2]$ y $[EH_2]$); con las especies inactivas de los aminoácidos implicados en la transformación ($[EH_2S]$ y $[EHS]$), además de, por supuesto, la enzima libre activa ($[EH]$) y el complejo catalíticamente activo ($[EHS]$). De este modo, se observa claramente como variarán las concentraciones relativas de las especies, dependiendo de a qué pH trabajemos, obteniendo el máximo de concentraciones de enzima activa al pH óptimo.

Sobre este sumatorio de concentraciones, sustituimos las especies inactivas, por lo que resultaría de despejarlas en sus respectivas constantes de disociación del protón:

-
- $ke_1 [EH_2]$.
- $ke_2 [EH_2]$.
- $kes_1 [EH_2S]$.
- $kes_2 [EHS]$.

Una vez sustituido, se despeja la enzima libre activa ($[EH]$) y se lleva a la expresión de K_m . Esta expresión (en concentraciones) es la misma que hemos estado viendo hasta ahora, salvo que ahora, definimos sobre ella

las especies activas. Sobre el resultado se despeja el complejo activo [EHS], para sustituirlo en la ecuación genérica.

El resultado es el siguiente:

$$V = \frac{\frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{kes1} + \frac{kes2}{[H^+]}} [S]}{Km \frac{1 + \frac{[H^+]}{ke1} + \frac{ke2}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{kes1} + \frac{kes2}{[H^+]}} + [S]}$$

En esta representación hiperbólica, se observa algo similar a lo que ocurría en la inhibición reversible mixta, es decir, que aparecen efectos antagónicos e uno y otro miembro. Recuadrado en azul, se encuentran los efectos de la transformación, afectando tanto a Km como a Vmax, estando definido por la relación entre kes1 y kes2. En rojo, se encuentran los efectos del pH sobre la unión del sustrato, que como es lógico, no afecta a la Vmax (recordemos que la transformación la considerábamos la etapa lenta, y por lo tanto, responsable de la velocidad).

Aparecen unas constantes cinéticas aparentes, que se describen de forma equivalente a las que obteníamos para la inhibición.

Ese efecto antagónico es el que se observa en las gráficas bifásicas, en las que aumenta el porcentaje de Ea al aumentar el pH, disminuyendo una vez sobrepasado el pH óptimo. Esto es el resultado de los dos aminoácidos implicados (tanto en unión como en transformación), ya que un aumento de pH favorecerá que el más ácido, mientras que perjudicará al más básico. En definitiva, se trata de llegar a un compromiso, el máximo de [Ea], que se da al pH óptimo. También se observa como las constantes Vmax y Km serían reales si pudiéramos tener un 100% de enzima activa. Los valores de V'max serán siempre menores que los de la Vmax, ya que, como hemos explicado, no tenemos un 100% de enzima activa. Km, sin embargo, puede ser mayor, igual o menos, dependiendo de la relación entre las constantes de disociación de las especies implicadas en transformación y en unión.

El hecho de que V'max sólo dependa de las variaciones de pH sobre las especies implicadas en la transformación del sustrato, tiene otra explicación a parte de la anterior. Esta consiste en el desplazamiento que sufren todos los equilibrios, aún dependiendo del pH, al potenciarse la eliminación de la especie EH por la adición de condiciones saturantes de sustrato. En esas condiciones de desplazamiento hacia la formación del complejo, éste se aproxima a [E]T, y por eso Vmax sólo depende de las variaciones de pH en transformación (recordemos que Vmax = k2 [E]T).

K'm, sin embargo, depende de los efectos sobre ambas etapas, debido a que a la concentración a la que medimos Km no es saturante. Además, esto se refleja en su propia expresión, que incluye las concentraciones de las especies activas de enzima libre (unión) y de complejo (transformación).

Hemos venido diciendo, que el efecto del pH se basaba en la ionización antagónica sobre dos aminoácidos implicados bien en transformación, bien en unión del sustrato, los cuales presentaban un pK interno más cercano al pH óptimo. Pues bien, podríamos plantearnos: ¿Cuál sería la distancia, en unidades de pH, que nos daría un mayor porcentaje de Ea en el pH óptimo?. Esta pregunta se contesta en base a la ecuación de velocidad expuesta anteriormente. Como ejemplo, tomaremos la siguiente hipótesis: {(pkes1 = pkes2) " (kes1

= kes_2)), lo que nos definiría el pH óptimo, que sería igual al valor de los pKs. Si llevamos esta igualdad a la ecuación de V_{max} aparente, obtendríamos que, con esas condiciones, y al pH óptimo (la mayor actividad posible), la velocidad no sobrepasará 1/3 de V_{max} (ya que los términos $[H^+]/kes_1$ y $kes_2/[H^+]$ se hacen iguales a 1 en el pH óptimo). Esto supondría que sólo tenemos 1/3 de la enzima total formando complejos activos para la transformación de producto. De modo equivalente se obtendría que el mayor alejamiento posible de los pKs haría que la enzima se hiciera casi independiente del pH.

- **pKs muy cercanos entre si:** V_{max} , al descender la concentración de especies activas.
- **pKs muy alejados entre si:** $V_{max} \approx V'_{max}$, haciéndose casi independiente del pH.

Estas variaciones se muestran en la siguiente gráfica V Vs pH.

Determinación de los pK

Hay varias formas de hallar los valores de estas constantes, pero esta es, tal vez, una de las más sencillas. Tiene la importante peculiaridad que **es válida para cualquier supuesto experimental**, al no partir de ninguna premisa especial.

Se basa en la siguiente ecuación (desarrollada en las hojas), donde aparece una de las constantes implicadas en unión:

$$1[H^+]_{1/2} + 2[H^+]_{1/2} = k_{es1} + 4[H^+]_{opt}$$

En ella hay que describir algunos términos nuevos:

- $1[H^+]_{1/2}$: El valor de la concentración de protones hallado en la primera interpolación (primer corte) del valor de $V'_{max}/2$ sobre el eje del pH en la gráfica V'_{max} Vs pH.
- $2[H^+]_{1/2}$: El valor de la concentración de protones hallado en la segunda interpolación (segundo corte) del valor de $V'_{max}/2$ sobre el eje del pH en la gráfica V'_{max} Vs pH.
- $[H^+]_{opt}$: El valor de la concentración de protones hallado en la interpolación de V'_{max} sobre el eje del pH en la gráfica V'_{max} Vs pH.

Estos tres valores, se sustituyen en la ecuación, de modo, que tenemos una sola incógnita kes_1 . Una vez hallada la constante de disociación del protón del aminoácido más ácido de los dos implicados en transformación, y puesto que sabemos el pH óptimo, podemos hallar la otra constante de disociación en transformación, kes_2 , por medio de la expresión; $pH_{opt} = (pK_{es1} + pK_{es2})/2$.

Pero aún nos queda hallar las constantes de disociación de los aminoácidos implicados en la unión del sustrato. Para ello utilizaremos la misma expresión, salvo que ahora, las interpolaciones no se harán en la gráfica V'_{max} Vs pH, sino en la representación de la razón V'_{max}/K_m Vs pH.

Por supuesto, la constante kes_1 que aparece en la ecuación será ahora ke_1 . La gráfica se realizará, como la anterior, midiendo valores de V'_{max} y K_m a cada pH. Después de la interpolación para hallar los valores de las concentraciones de protones, se sustituyen en la ecuación, dándonos el valor de la constante ke_1 . Al igual que en el proceso anterior, hallaremos ke_2 mediante la ecuación del pH óptimo, que será ahora la semisuma de estas dos constantes. Esto es así porque la relación V'_{max}/K_m sólo depende de los aminoácidos implicados en la transformación:

$$\frac{V'_{max}}{K_m} = \frac{V'_{max}}{K_m} \left/ 1 + \frac{[H^+]}{ke_1} + \frac{ke_2}{[H^+]} \right.$$

Para aclarar un poco las ideas, desmenuzaremos todos los pasos:

- Hallar los valores de V'_{max} a diferentes valores de pH.
- Representar la gráfica V'_{max} Vs pH, que dará como resultado una curva bifásica.
- Hallar los valores de $[H^+]_{1/2}$ (1! corte a la izquierda; 2 ! corte a la derecha) interpolando $V'_{max}/2$ y de $[H^+]_{opt}$ interpolando V'_{max} .
- Sustituir todos los valores de concentraciones de protones sobre la ecuación

$$1[H^+]_{1/2} + 2[H^+]_{1/2} = k_{es1} + 4[H^+]_{opt}$$

y despejar la constante.

- Hallar $kes2$ sustituyendo los valores de $kes1$ y pH_{opt} conocidos en la ecuación

$$pH_{opt} = \frac{pKes1 + pKes2}{2}$$

Una vez conocidos los valores de las constantes implicadas en la transformación, hallaremos las de los implicados en unión.

- Hallamos la relación $V'_{max}/K'm$ a diferentes pH y lo representamos en una gráfica, que también será bifásica, $V'_{max}/K'm$ Vs pH.

- Hallar los valores de $[H^+]_{1/2}$ (1! corte a la izquierda; 2 ! corte a la derecha) interpolando $\frac{V'_{max}}{K'm} / 2$

y de $[H^+]_{opt}$ interpolando el máximo de la relación $V'_{max}/K'm$.

- Sustituimos estos valores en la ecuación $1[H^+]_{1/2} + 2[H^+]_{1/2} = k_{e1} + 4[H^+]_{opt}$

y despejamos la constante.

- Hallar $ke2$ sustituyendo los valores de $ke1$ y pH_{opt} conocidos en la ecuación $pH_{opt} = \frac{pKe1 + pKe2}{2}$

Una vez terminado esto, tendremos las cuatro constantes, que como ya sabemos no tienen que coincidir con las de los pK de los 20 aminoácidos en medio acuoso, al ser pKs internos. Esta identificación de las constantes no es, por tanto, una identificación real, ya que sólo nos muestra las constantes de ionización de las especies, que no sabemos cuales son, al no poseer una tabla fiable (ya dijimos que cada C.A. es un mundo). Esto se utiliza entonces como un mero inicio de las investigación, que deberá proseguir con inhibidores irreversibles, cristalografía, difracción de rayos X, mutagénesis dirigida y otras pruebas.

Representación de Nixon"Webbs

A diferencia del anterior método de identificación, este no es universal, ya que requiere para ser efectivo que los dos pKs implicados transformación no estén diferenciados por más de 3.5 unidades {pKes1"pKe2 3,5}. Su mecanismo es diferente, aunque también presenta un componente gráfico y una ecuación donde sustituir los datos.

La ecuación y la representación gráfica (log V'_{max} Vs pH) son:

$$V'_{max} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{kes1} + \frac{kes2}{[H^+]}}$$

Para que la representación sea válida, debe cumplirse la condición anterior. Esta, nos dará unas pendientes 1 y "1, cuyas rectas debemos trazar. Una vez hecho esto, se traza una paralela al eje X que pase por el máximo de

$\log V'_{\max}$. La interpolación de los cortes con las dos rectas nos dará los valores de pK_{es1} y pK_{es2} , dependiendo si se trata del corte a la derecha del que sería pH óptimo o del de la izquierda.

Lo peor de este método es, sin duda, el necesitar de la condición $\{pK_{es1} < pK_{es2} < 3,5\}$ para que la representación se ajuste al modelo expuesto, de pendientes 1 y -1.

Valores de pK_e y pK_{es}

Bases de las variaciones de pK_s internos

La base de estas variaciones se debe al microambiente existente en los centros activos de las enzimas, cuya función es la de acelerar los procesos de catálisis o favorecer interacciones que a la F.I. del agua no se darían.

A pesar de estas variaciones tan grandes, se pueden construir unas reglas más o menos básicas que nos ayuden a entender estos procesos:

- **Medio hidrofóbico:** En este medio se estabilizan las especies no cargadas, como es lógico, para aumentar la entropía disminuyendo la superficie de solvatación.
- **Proximidad de grupos:** Si tenemos un residuo con carga y al lado otro también cargado, se estabilizarán si son de cargas opuestas, teniendo tendencia a cambiar su estado de ionización si presentan el mismo signo.
- **Establecimiento de puentes de hidrógeno:** Se verán favorecidas aquellas especies que puedan formar puentes.

Todas estas reglas se basan en la ecuación de Hendersson-Hasselbach, de modo, que un aumento de una de las especies repercutirá sobre el pK del mismo, estabilizándolo o desestabilizándolo dependiendo de las circunstancias.

$$pK = pH - \log \frac{[base]}{[cido]}$$

Si $[cido]$	$\frac{[base]}{[cido]}$	$\log$	pK
Si $[base]$	$\frac{[base]}{[cido]}$	$\log$	pK
Si $[base]$	$\frac{[base]}{[cido]}$	$\log$	pK
Si $[base]$	$\frac{[base]}{[cido]}$	$\log$	pK

Lo que nos indican las constantes halladas es, por tanto, la existencia de dos aminoácidos en cada caso (transformación y unión), pero no nos dicen nada acerca de su identidad. Esto se ilustra muy bien en la tabla de las hojas, donde se ven variaciones en los pK de hasta 5 unidades, viéndose cosas curiosas como pK de glutámico en 6,5 o de lisina en 5,9. La tabla indica que estos valores no son típicos y, por tanto, no extrapolables a estos aminoácidos en otros centros activos, algo a lo que ya hemos hecho referencia.

Los pK_s pueden ser aparentes

Puede pasar que en reacciones con varios complejos intermedios, los valores obtenidos para pK_{es} , no sean individuales. El resultado de esto serían unos pK_{es} media de los efectos individuales del pH sobre cada una de las etapas (que son varias) de transformación del sustrato. A pesar de esto, los valores de pK_e si implicarán solamente a dos aminoácidos, ya que este paso se realizaría en una sola etapa.

Sin embargo, tampoco podemos fiarnos, ya que pudiera ser que en el C.A. hubiera tres o más aminoácidos implicados, bien en transformación, bien en unión, pero que dos de ellos tuvieran un pK interno igual (algo que no es ni mucho menos imposible, aún pudiéndose tratar de un grupo amino y un carboxilo). Evidentemente nosotros, *a priori*, no podemos saber si los pKs más cercanos al pH óptimo implican a 2 ó 3 aminoácidos, de modo, que realizamos el tratamiento de datos con el método explicado, con el fin de hallar los pK_e y pK_s. Al hacerlo, no sabemos si los datos obtenidos para los pK pertenecen, por tanto, a 1 o a 2, con lo que complicamos aún más la identificación.

Esta expresión es cierta ya que si recordamos, V'_{max} sólo depende de los efectos sobre la transformación, y el pH óptimo se ha hallado con esa V'_{max}.

Simplemente saber que existe, ya que no es precisamente bueno.

1

Unión

Transformación

Casi independiente del pH

Muy dependiente del pH

(pK_{s1} " pK_{s2}) y muy lejanos

(pK_{s1} = pK_{s2})

V_{max}

1/3V_{max}

pH

V

pH

pK_{s2}

pK_{s1}

Log V'_{max}

tg = "1

tg = 1