

Fase de transición del mecanismo de Theorell-Chance: análisis de datos cinéticos

A. Román Gil, J. Gálvez Morillas, R. Varón Castellanos
Dpto. de Química Física. Universidad de Murcia

Recibido: 17-5-85
Aceptado: 30-10-85

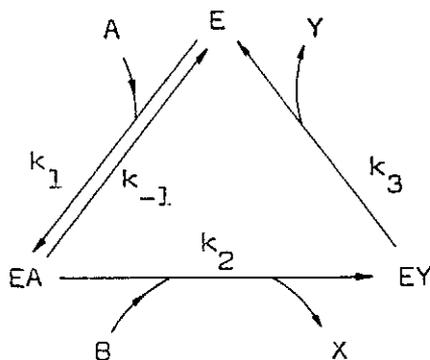
Transient phase of the Theorell-Chance mechanism: kinetic data analysis

Summary: The characteristics of the progress curves of the Theorell-Chance mechanism are shown. A quantitative kinetic data analysis in order to obtain the rate constants is discussed.

Key-words: Transient phase, theorell-chance, rate constants.

INTRODUCCIÓN

Entre los mecanismos bisustrato cabe citar el denominado de Theorell-Chance que viene descrito por el esquema (1-4):



donde A y B son los sustratos, X e Y los productos de la reacción y las especies E, EA y EY son la enzima libre y los complejos enzima-sustrato y enzima-producto, respectivamente.

La dependencia concentración-tiempo durante la fase de transición de las diferentes especies que intervienen en este mecanismo ha sido ya estudiada (5-7) y, además, se han propuesto algunos métodos (5, 8) para la determinación de las diferentes constantes de velocidad. Sin embargo, como han demostrado Gálvez y col. (9) para los mecanismos uni-bi implicando dos intermedios, dichos métodos no resultan apropiados si el polinomio característico presenta raíces complejas. Otra dificultad adicional se plantea (aun en el caso de raíces reales) si la escala de tiempo en que una de las raíces resulta operativa es demasiado pequeña. El objetivo del presente trabajo es, por tanto, describir las características de las curvas de progreso de X e Y y proponer un método de análisis cuantitativo de datos cinéticos que permita el cálculo de las constantes de velocidad de una forma sistemática, evitando los inconvenientes anteriormente citados.

TEORÍA

Por comodidad, utilizaremos la siguiente notación:

$$\left. \begin{aligned} A &\equiv Y_1 \\ B &\equiv Y_2 \\ X &\equiv Y_3 \\ Y &\equiv Y_4 \\ E &\equiv X_1 \\ EA &\equiv X_2 \\ EY &\equiv X_3 \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

x_i : concentración de X_i en el instante t ($i = 1, 2, 3$)

x_i^0 : concentración inicial de X_i ($i = 1, 2, 3$)

y_s : concentración de Y_s en el instante t ($s = 1, 2, 3, 4$)

y_s^0 : concentración inicial de Y_s ($s = 1, 2, 3, 4$)

Si las condiciones iniciales son:

$$\left. \begin{aligned} x_1^0 &\neq 0 \\ x_2^0 = x_3^0 = y_3^0 = y_4^0 &= 0 \\ y_1^0 &\geq x_1^0 \\ y_2^0 &\geq x_1^0 \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

la dependencia de Y_s ($s = 3, 4$) con t puede obtenerse procediendo en la forma descrita en las referencias 5 y 6:

$$y_s/x_1^0 = \beta_s + \alpha t + \sum_{i=1}^n \gamma_{sh} e^{\lambda_i t} \quad (s=3, 4) \quad (3)$$

donde

$$\beta_s = \frac{k_1 k_2 y_1^0 y_2^0 - P \alpha}{Q} \quad (4)$$

$$P = k_{-1} + k_3 + k_1 y_1^0 + k_2 y_2^0 \quad (5)$$

$$Q = k_{-1} k_3 + k_1 k_3 y_1^0 + k_2 k_3 y_2^0 + k_1 k_2 y_1^0 y_2^0 \quad (6)$$

$$\beta_4 = -\frac{P \alpha}{Q} \quad (7)$$

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_3 y_1^0 y_2^0}{Q} \quad (8)$$

$$\gamma_{sh} = -\frac{k_1 k_2 (k_3 + \lambda_h) y_1^0 y_2^0}{\lambda_h^2 (\lambda_p - \lambda_h)} \quad (h=1, 2; p \neq h) \quad (9)$$

$$\gamma_{4h} = -\frac{k_1 k_2 k_3 y_1^0 y_2^0}{\lambda_h^2 (\lambda_p - \lambda_h)} \quad (h=1, 2; p \neq h) \quad (10)$$

A su vez, λ_1 y λ_2 son raíces de la ecuación

$$\lambda^2 + P\lambda + Q = 0 \quad (11)$$

y, en consecuencia,

$$\lambda_1 = -\frac{P}{2} + \frac{\sqrt{P^2 - 4Q}}{2} \quad (12)$$

$$\lambda_2 = -\frac{P}{2} - \frac{\sqrt{P^2 - 4Q}}{2} \quad (13)$$

$$\lambda_1 + \lambda_2 = -P \quad (14)$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = Q \quad (15)$$

Las raíces λ_h ($h = 1, 2$) son reales negativas si $P^2 \geq 4Q$ y complejas conjugadas si $P^2 < 4Q$. En este último caso una raíz sera $a + bi$ y la otra $a - bi$. Esto puede escribirse como sigue:

$$P^2 \geq 4Q : \lambda_h < 0 \quad (16)$$

$$P^2 < 4Q : \lambda_h = a \pm bi \quad (17)$$

donde

$$a = -\frac{P}{2} \quad (18)$$

$$b = \frac{\sqrt{4Q - P^2}}{2} \quad (19)$$

En las condiciones en que las raíces λ_h ($h = 1, 2$) son complejas, es evidente que la ec. (3) no es apropiada para el cálculo. En este caso debe escribirse la ec. (1) de modo que sólo intervengan magnitudes reales. Esto se consigue teniendo en cuenta la identidad $e^{a \pm bi} = e^a (\cos bt \pm i \sin bt)$ y sustituyendo las ecs. (8), (14), (15), (17), (18) y (19) en la ec. (1). De este modo se obtiene, después de algunas manipulaciones:

$$y_4/x_1^0 = \beta_4 + \alpha t + \alpha \tau_4 \left(\cos bt - \frac{1 + a \tau_4}{b \tau_4} \sin bt \right) e^{at} \quad (20)$$

donde τ_4 es el período de inducción de Y_4 y viene definido por:

$$\tau_4 = -\frac{\beta_4}{\alpha} = \frac{P}{Q} \quad (21)$$

A su vez, de las ecs. (19) y (21) obtenemos

$$b = \sqrt{-\frac{2a + a^2 \tau_4}{\tau_4}} \quad (22)$$

Para $t \gg 1$, tanto la ec. (3) como la ec. (20) se transforman en

$$y_4^0/x_1^0 = \beta_4 + \alpha t \quad (23)$$

que corresponde a la curva de progreso en el estado estacionario.

ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS

Las ecs. (13) y (14), junto con las ecs. (5) y (6), indican que $\lambda_1 + \lambda_2$ y $\lambda_1\lambda_2$ dependen linealmente de y_1^0 y de y_2^0 , por lo que una representación de $-(\lambda_1 + \lambda_2)$ y de $\lambda_1\lambda_2$ vs. y_1^0 ($i = 1,2$) manteniendo y_j^0 ($j = 1,2; j \neq i$) constante, permite calcular todas las constantes de velocidad.

Para la determinación de λ_1 y λ_2 como funciones de y^0 , e y^0 , Laidler y col. (8, 9) han propuesto el siguiente procedimiento: de la ec. (3) se define la magnitud U_s ($s = 3,4$) por

$$U_s = y_s/x_1^0 - \beta_s - \alpha t = \gamma_{s1}e^{\lambda_1 t} + \gamma_{s2}e^{\lambda_2 t} \quad (s=3, 4) \quad (24)$$

La determinación de U_s ($s = 3,4$) en fase de transición puede realizarse a partir del perfil concentración-tiempo (p.c.t.) de Y_s ($s = 3,4$) y de los parámetros β_s ($s = 3,4$) y α obtenidos, estos últimos, en la fase estacionaria.

Dado que $\lambda_h < 0$ ($h = 1,2$) y, supuesto $|\lambda_1| < |\lambda_2|$, a partir de cierto instante, t_p , se verifica:

$$U_s \approx \gamma_{s1}e^{\lambda_1 t} \quad (s=3, 4; t \geq t_p) \quad (25)$$

En estas condiciones, una representación de $\ln U_s$ ($s = 3,4$) vs. t deberá ser lineal de pendiente λ_1 y ordenada en el origen $\ln \gamma_{s1}$ ($s = 3,4$).

Una vez conocidos λ_1 y γ_{s1} , se define la magnitud V_s ($s = 3,4$) como:

$$V_s = U_s - \gamma_{s1}e^{\lambda_1 t} \quad (s=3, 4) \quad (26)$$

por lo que, según la ec. (24), tenemos:

$$V_s = \gamma_{s2}e^{\lambda_2 t} \quad (s=3, 4) \quad (27)$$

Una segunda representación de $\ln V_s$ vs. t ($s = 3,4$) para $t \leq t_p$ será lineal con pendiente λ_2 y ordenada en el origen $\ln \gamma_{s2}$ ($s = 3,4$).

Este procedimiento tiene dos importantes limitaciones:

- a) La representación de $\ln U_s$ ($s = 3,4$) vs. t solamente es lineal cuando λ_h ($h = 1,2$) son raíces reales de la ec. (10), pero dependiendo de los valores relativos de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales de los sustratos, las raíces λ_h ($h = 1,2$) pueden ser complejas, en cuyo caso la dependencia de $\ln U_s$ ($s = 3,4$) presenta una curvatura sistemática, como veremos más adelante. En estas condiciones, si λ_1 se determina a partir de la pendiente de esa representación, el valor obtenido es evidentemente erróneo.
- b) Incluso en los casos en que las λ_h ($h = 1,2$) sean reales, otra dificultad surge al considerar el rango de valores de t ($t \leq t_p$) para los que habría que determinar experimentalmente el p.c.t. de Y_s ($s = 3,4$), para poder calcular λ_2 a partir de la ec. (27) (Gálvez y col. (10) y Román (7) han demostrado que t_p puede ser de un orden de magnitud tal que haga inoperante el procedimiento descrito, si no se dispone de un equipo instrumental adecuado a esta escala de tiempo).

Sin embargo, estas limitaciones pueden evitarse si-

guiendo un procedimiento similar al descrito para los mecanismos que implican un sustrato y dos intermedios (véase referencia 10). En nuestro caso, el procedimiento a seguir consta de las siguientes etapas:

- a) A partir del p.c.t. de Y_4 correspondiente a la fase estacionaria se determinan β_4 , α y τ_4 , como se indica en la fig. 1.

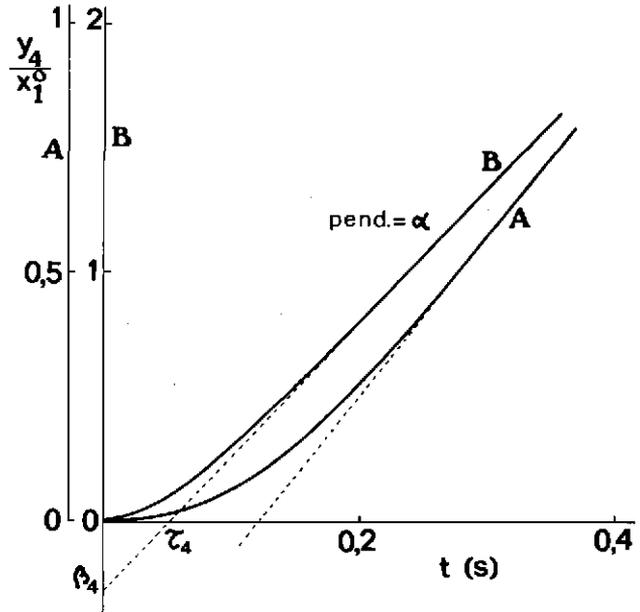


FIGURA 1. Curvas de progreso para los casos 1 y 2 (véase Tabla I). Nótese que los ejes son diferentes para ambas curvas. A representa el caso 1 y B el 2. Se indican, para el caso 2, los valores de β_4 , α y τ_4 .

- b) Se representa, en fase de transición, $\ln U_4$ vs. t . Si esta representación es lineal, se continúa en la etapa c). Si se obtiene una curva, se continúa en la etapa d).
- c) En este caso λ_1 y λ_2 son raíces reales. La pendiente y la ordenada en el origen de la representación de $\ln U_4$ vs. t son, respectivamente, los valores de λ_1 y de γ_{41} . La estimación de λ_2 se realiza mediante la expresión:

$$\frac{\lambda_2}{\lambda_1} = \frac{\gamma_{41}\lambda_1}{\gamma_{41}\lambda_1 + \alpha} \quad (28)$$

que se deduce fácilmente a partir de las ecs. (8), (9), (15), (11) y (12). Obsérvese que la ec. (28) permite obtener λ_2 sin necesidad de una segunda representación gráfica.

- d) En este caso, λ_h ($h = 1,2$) son raíces complejas. Los parámetros a y b pueden determinarse resolviendo numéricamente las ecs. (20) y (22). Una vez conocidos a y b , de las ecs. (14) y (15) obtenemos:

$$\lambda_1 + \lambda_2 = 2a \quad (29)$$

$$\lambda_1\lambda_2 = -\frac{2a}{\tau_4} \quad (30)$$

- e) Finalmente, las constantes k_i ($i = 1,2,3,-1$) se obtienen



TABLA I

Dependencia de y_4 con t . Los valores de las constantes de velocidad en ambos casos son: $k_1=55 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_2=166 \times 10^2 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_3=77 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{-1}=26 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el caso 1 es $y_1^0=y_2^0=10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. En el caso 2 es $y_1^0=10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ e $y_2^0=8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

Caso	y_4/x_1^0	(t en s)
1	$-0,22189 + 5,2094 t + 0,22233 e^{-24,52 t} - 0,00044 e^{-550,30 t}$	
2	$-0,31170 + 2,5604 t + 0,31170 (\cos 6,39 t + 0,8068 \sin 6,39 t) e^{-13,37 t}$	

a partir de la dependencia lineal de $-(\lambda_1 + \lambda_2)$ y $\lambda_1 \lambda_2$ respecto de las concentraciones iniciales y_i^0 ($i = 1, 2$), como se indicó anteriormente (véanse las ecs. (5), (6), (13) y (14)).

En la tabla I se muestran dos ejemplos que ilustran este procedimiento. En ambos casos los valores de las constantes son:

$$\begin{aligned} k_1 &= 55 \times 10^4 && \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1} \\ k_2 &= 166 \times 10^2 && \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1} \\ k_3 &= 77 \times 10^{-1} && \text{s}^{-1} \\ k_{-1} &= 26 \times 10^{-2} && \text{s}^{-1} \end{aligned}$$

En el primer caso $y_1^0 = y_2^0 = 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ y las raíces λ_1 y λ_2 son reales. En el segundo caso $y_1^0 = 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, $y_2^0 = 8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ y las raíces λ_1 y λ_2 resultan complejas. La variación con el tiempo de la concentración del producto Y_4 se muestra en la fig. 1 y en la fig. 2 se representa $\ln U_4$ vs. t . Obsérvese que en el primer caso esta representación es lineal, mientras que en el segundo se presenta una curvatura sistemática. A partir de estas representaciones y procediendo como se acaba de explicar, es posible obtener los valores de λ_1 y λ_2 que muestran una excelente concordancia con los valores de λ_h ($h = 1, 2$), determinados analíticamente.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 THEORELL, H. and CHANCE, B., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127 (1951).
- 2 DALZIEL, K., *Biochem. J.*, **84**, 244 (1962).
- 3 DUNCAN, R. J. S.; and TIPTON, K. F., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 538 (1971).
- 4 ZEWE, V. and FROMM, H. J., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1668 (1962).
- 5 HIJAZI, N. H. and LAIDLER, K. J., *Can. J. Biochem.*, **51**, 822 (1973).
- 6 GÁLVEZ, J. VARÓN, R. and GARCÍA CÁNOVAS, F. J., *Theor. Biol.*, **89**, 37 (1981).
- 7 ROMÁN GIL, J. A., Tesis Doctoral, Universidad de Murcia (1984).
- 8 SADAR, M. H. and LAIDLER, K. J., *Can. J. Biochem.*, **53**, 380 (1975).
- 9 MAGUIRE, R. J.; HIJAZI, N. H. and LAIDLER, K. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 1 (1974).
- 10 GÁLVEZ, J.; VARÓN, R.; GARCÍA CÁNOVAS, F., y GARCÍA CARMONA, F., *An. Quím.*, **79**, 523 (1983).

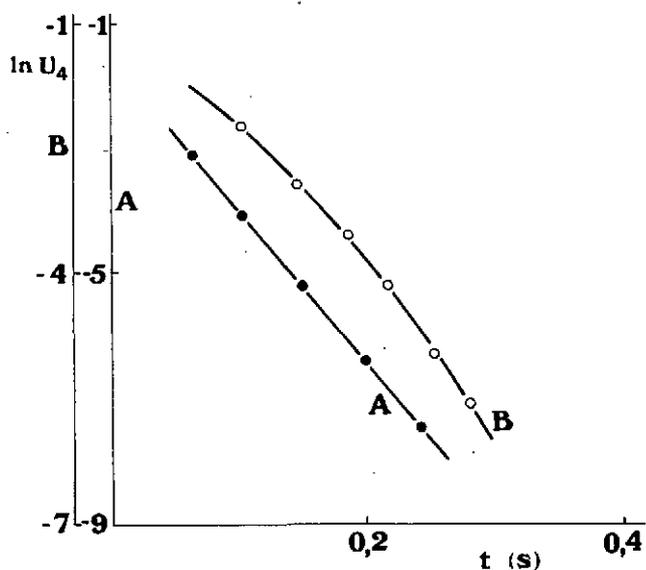


FIGURA 2. $\ln U_4$ vs. t para las curvas de progreso mostradas en la fig. 1.