

Estudio cinético de la fase de transición de los mecanismos iso ping pong bi bi e iso ordenado bi bi

J. Gálvez Morillas*, R. Varón Castellanos*, F. García Cánovas**, F. García Carmona**

* Dpto. de Química Física. Universidad de Murcia

** Dpto. de Bioquímica. Universidad de Murcia

Recibido: 17-5-85

Aceptado: 30-10-85

Kinetic study of the transient phase of the iso ping pong bi bi and iso ordered bi bi mechanisms

Summary: The kinetic behaviour during the transient phase of the Iso Ping Pong Bi Bi and Iso Ordered Bi Bi mechanisms has been studied and equations have been obtained which show the dependence with time of the products that are involved in those mechanisms. A procedure to obtain the rate constants is proposed.

Key-words: Transient phase, kinetic, enzyme, iso, mechanism.

INTRODUCCIÓN

En un gran número de sistemas enzimáticos se han encontrado valores anómalos de los parámetros cinéticos (1) y este hecho puede explicarse teniendo en cuenta las posibles isomerizaciones de las formas estables de la enzima. Entre estos sistemas cabe citar algunas deshidrogenasas anaerobias que utilizan nucleótidos de piridina, tales como láctico deshidrogenasa de músculo cardíaco, alcohol deshidrogenasa de levadura, málico deshidrogenasa de corazón de cerdo y alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (1-3), las cuales probablemente experimentan etapas de isomerización en su mecanismo cinético.

Peller y Alberty (4) han demostrado que si las constantes de velocidad calculadas a partir de las correspondientes expresiones son negativas, o si el valor de una constante de una reacción unimolecular en la dirección sustrato \rightarrow producto es menor que V_{max}/E_0 , entonces puede ocu-

rrir isomerización de una o más formas estables de la enzima. Lo mismo puede predecirse si se verifica la relación $\phi_0 < \phi_A \phi_B / \phi_{AB}$.

En todo caso, los test anteriormente descritos para intentar confirmar isomerizaciones en el mecanismo a estudiar implican, necesariamente, reversibilidad experimental.

Una aproximación experimental más asequible sería la determinación de los tipos de inhibición por los productos. En estas condiciones, si deducimos la ecuación de velocidad en estado estacionario para el esquema completo (es decir, suponiendo reversibilidad) y se eliminan los términos de la forma $c_i \times c_j$ (donde c_i y c_j representan concentraciones de productos), se obtiene una ecuación con términos adicionales en el denominador en el caso de los mecanismos Iso con respecto a los no Iso. Esto permite diferenciarlos mediante los distintos tipos de inhibición.

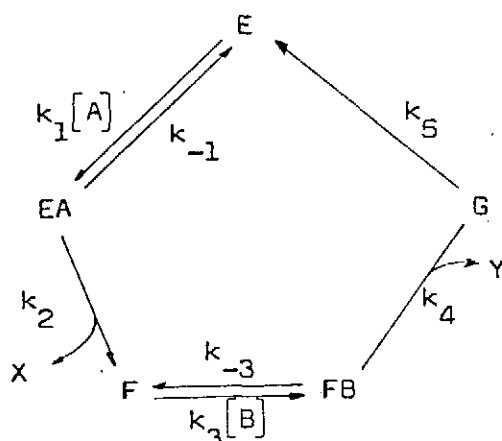
En este trabajo hemos estudiado la fase de transición de dos mecanismos Iso: Iso Ping Pong Bi Bi (mecanismo I) e Iso

Ordenado Bi Bi (mecanismo II). La información que proporciona el estudio de dicha fase permite:

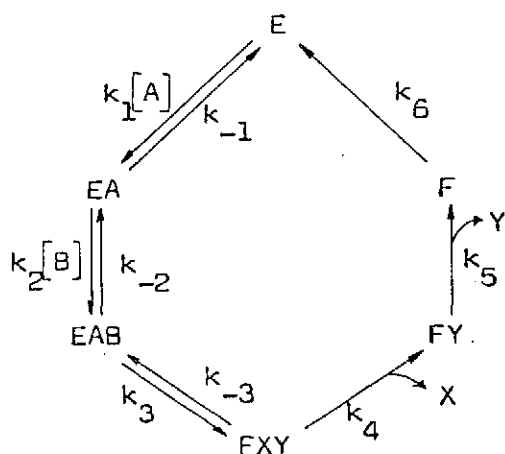
- a) Discriminar estos mecanismos
- b) Diferenciar los mecanismos con etapas Iso de los normales
- c) Calcular las constantes de velocidad.

TEORÍA

Los mecanismos antes citados vienen definidos por los esquemas:



Mecanismo I. Iso Ping Pong Bi Bi



Mecanismo II. Iso Ordenado Bi Bi

En adelante utilizaremos la notación:
 Y_s : especie ligando s-ésima, de modo que

$A \equiv Y_1, B \equiv Y_2, X \equiv Y_3, Y \equiv Y_4$ para ambos mecanismos

y_s : concentración de la especie Y_s ,

y_s^0 : concentración inicial de la especie ligando Y_s ,

Si las condiciones iniciales de la reacción son

$$\left. \begin{aligned} y_s^0 &= 0 \quad (s \neq 1,2) \\ y_1^0 &\gg x_1^0 \\ y_2^0 &\gg x_1^0 \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

donde $x_1^0 = [E]_0$, la solución del sistema de ecuaciones diferenciales (5) que describe la evolución de cada uno de los dos sistemas enzimáticos permite escribir, para la variación de la concentración de los productos con el tiempo:

$$y_s = \beta_s + \alpha_s t + \sum_{h=1}^{n-1} \gamma_{sh} e^{\lambda_h t} \quad (s=3,4) \quad (2)$$

siendo $n = 5$ para el mecanismo I y $n = 6$ para el mecanismo II. Los valores de λ_h ($h = 1, 2, \dots, n-1$) son las raíces de la ecuación

$$\sum_{j=0}^4 c_{1j} \lambda^j = 0 \quad (3)$$

para el mecanismo I y las de la ecuación

$$\sum_{j=0}^5 c_{2j} \lambda^j = 0 \quad (4)$$

para el mecanismo II. Los coeficientes c_{1j} y c_{2j} de las ecs. (3) y (4) están definidos en el Apéndice. A su vez, α_s, β_s y γ_{sh} vienen dados en la tabla I. En la tabla II se indican las expresiones de los períodos de inducción τ_3 y τ_4 de los productos Y_3 e Y_4 ; obsérvese que en ambos mecanismos $\tau_4 > \tau_3$. En la fig. 1 se muestra de forma esquemática una de las posibilidades de la variación de y_s ($s = 3,4$) con t .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya hemos indicado anteriormente, la discriminación entre estos mecanismos y sus homólogos sin etapas Iso

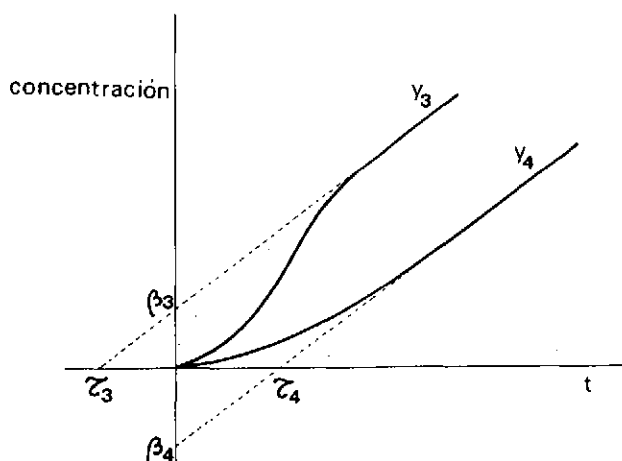


FIGURA 1. Representación esquemática de una posible variación de la concentración de los productos con el tiempo en los mecanismos I y II.



TABLA I
Valores de α_{30} , β_3 y γ_{sh} ($s=3, 4$; $h=1, 2, \dots, n-1$) en los mecanismos I y II

Mecanismo	α_{30}	α_{40}	β_3	β_4	γ_{3h}	γ_{4h}
I	$\frac{F_1}{c_{10}}$	α_{30}	$\frac{F_3}{c_{10}} - \frac{c_{11}}{c_{10}}\alpha_{30}$	$\frac{F_5}{c_{10}} - \frac{c_{11}}{c_{10}}\alpha_{40}$	$\frac{F_7}{\lambda_h^2 \prod_{p=1, p \neq h}^4 (\lambda_p - \lambda_h)}$	$\frac{F_9}{\lambda_h^2 \prod_{p=1, p \neq h}^4 (\lambda_p - \lambda_h)}$
II	$\frac{F_2}{c_{20}}$	α_{30}	$\frac{F_4}{c_{20}} - \frac{c_{21}}{c_{20}}\alpha_{30}$	$\frac{F_6}{c_{20}} - \frac{c_{21}}{c_{20}}\alpha_{40}$	$\frac{F_8}{\lambda_h^2 \prod_{p=1, p \neq h}^4 (\lambda_p - \lambda_h)}$	$\frac{F_{10}}{\lambda_h^2 \prod_{p=1, p \neq h}^4 (\lambda_p - \lambda_h)}$

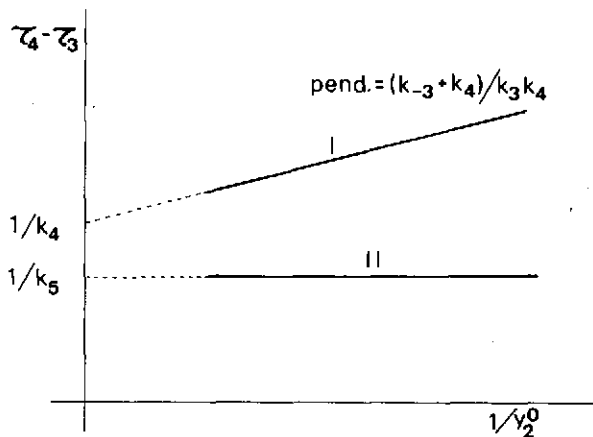
Los valores de F_i vienen dados en el apéndice.

TABLA II
Período de inducción de los productos y su diferencia

Mecanismo	τ_3	τ_4	$\tau_4 - \tau_3$
I	$-\left(\frac{k_4+k_5}{k_4k_5} + \frac{k_{-3}+k_4}{k_3k_4} \frac{1}{y_2^0}\right) + \frac{c_{11}}{c_{10}}$	$-\frac{1}{k_5} + \frac{c_{11}}{c_{10}}$	$\frac{1}{k_4} + \frac{k_{-3}+k_4}{k_3k_4} \frac{1}{y_2^0}$
II	$-\frac{k_5+k_6}{k_5k_6} + \frac{c_{21}}{c_{20}}$	$-\frac{1}{k_6} + \frac{c_{21}}{c_{20}}$	$\frac{1}{k_5}$

puede hacerse por el estudio de los tipos de inhibición por los productos en estado estacionario.

Por su parte, la fase de transición permite discriminar entre estos mecanismos y aquéllos sin etapas Iso por la aparición de un término exponencial adicional en las expresiones que determinan la dependencia de y_c con t , debido a la etapa de isomerización extra que se presenta en este caso, según se desprende de la ec. (2). Sin embargo, la determinación de los períodos de inducción no permite llevar a cabo dicha discriminación (7), si bien permite diferenciar entre distintos mecanismos Iso (véase tabla II). En este caso, la discriminación entre los mecanismos I y II es inmediata si representamos $\tau_4 - \tau_3$ vs. $1/y_2^0$ y así se obtiene en el mecanismo I una recta de pendiente $(k_{-3} + k_4)/k_3k_4$ y ordenada $1/k_4$, mientras que en el mecanismo II esta misma representación daría una recta paralela al eje de abscisas de ecuación $\tau_4 - \tau_3 = 1/k_5$ como se muestra en la fig. 2.



Determinación de las constantes
Mecanismo I

Los períodos de inducción τ_3 ó τ_4 pueden utilizarse para la estimación de todas las constantes de velocidad siguiendo un procedimiento similar al descrito en la referencia (6) para

FIGURA 2. Representación de $\tau_4 - \tau_3$ como función de $1/y_2^0$ para los mecanismos I y II.



mecanismos bisustrato. Así, τ_4 puede expresarse en función de y_1^0 en la forma siguiente (ver tabla II):

$$\tau_4 = \frac{A_1 + A_2 y_1^0}{A_3 + A_4 y_1^0} \quad (5)$$

donde:

$$A_1 = a_{11} + a_{12} y_2^0 \quad (6)$$

$$A_2 = a_{21} + a_{22} y_2^0 \quad (7)$$

$$A_3 = a_{32} y_2^0 \quad (8)$$

$$A_4 = a_{41} + a_{42} y_2^0 \quad (9)$$

con

$$\left. \begin{aligned} a_{11} &= k_2^2(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4) \\ a_{12} &= k_3 k_5^2(k_{-1} + k_2 + k_4) \\ a_{21} &= k_1 k_2^2(k_{-3} + k_4 + k_5) \\ a_{22} &= k_1 k_3(k_2^2 - k_2 k_4) \\ a_{32} &= k_3 k_4 k_5^2(k_{-1} + k_2) \\ a_{41} &= k_1 k_2 k_5^2(k_{-3} + k_4) \\ a_{42} &= k_1 k_3 k_5(k_4 k_5 + k_2 k_5 + k_2 k_4) \end{aligned} \right\} \quad (10)$$

Los parámetros A_i ($i = 1, 2, 3, 4$) pueden obtenerse mediante ajuste por regresión no lineal de τ_4 vs. y_1^0 a la ec. (5). La dependencia lineal de A_i con respecto a y_2^0 permite obtener a_{ij} ($j = 1, 2; i = 1, 2, 3, 4; a_{31} = 0$). La resolución del sistema de ecuaciones (10) permite calcular todas las constantes de velocidad. La constante k_4 podría haberse obtenido también de una representación de $\tau_4 - \tau_3$ vs. $1/y_2^0$ que como ya se ha indicado da una recta de pendiente $(k_{-3} + k_4)/k_3 k_4$ y ordenada $1/k_4$.

En los casos donde no sea posible seguir el perfil concentración-tiempo del producto Y_4 y, por tanto, la determinación de τ_4 , puede realizarse un análisis análogo con el período de inducción τ_3 .

Mecanismo II

Un análisis de datos cinéticos a partir del período de inducción τ_4 (ó τ_3) como el realizado en el mecanismo anterior, permite obtener todas las constantes de velocidad. En este mecanismo $\tau_4 - \tau_3$ coincide con $1/k_5$.

El método utilizado en estos dos mecanismos para la determinación de las constantes de velocidad no es, evidentemente, el único, pudiendo emplearse cualquiera de los demás métodos sugeridos por Román (6) para reacciones enzimáticas.

Desde el punto de vista experimental la determinación de los períodos de inducción τ_3 y τ_4 tiene el condicionamiento de necesitar medidas en fase de transición lo que exige la utilización de técnicas de cinética rápida (8). Otro condicionamiento experimental viene impuesto por la necesidad de medir pequeñas concentraciones de productos de reacción lo que obliga a usar sustratos con características apropiadas

(alto coeficiente de extinción, alta solubilidad, etc.) y elevadas concentraciones de enzima (8).

BIBLIOGRAFÍA

- 1 BLOOMFIELD, V.; PELLER, L. y ALBERTY, R. A., J. Am. Chem. Soc., **84**, 4375 (1962).
- 2 WRATTEN, C. C. y CLELAND, W. W., Biochemistry, **2**, 935 (1963).
- 3 ZEWE, V. y FROMM, H. J., Biochemistry, **4**, 782 (1965).
- 4 PELLER, L. y ALBERTY, R. A., J. Am. Chem. Soc., **81**, 5907 (1959).
- 5 GÁLVEZ, J. y VARÓN, R., J. Theor. Biol., **89**, 1 (1981).
- 6 ROMÁN GIL, J. A., Tesis Doctoral, Universidad de Murcia (1984).
- 7 GÁLVEZ, J.; VARÓN, R. y GARCÍA CÁNOVAS, F., J. Theor. Biol., **89**, 19 (1981).
- 8 HIROMI, K., Kinetics of Fast Enzyme Reactions, John Wiley & Sons, New York (1979).

APÉNDICE

Coefficientes c_{ij} (Mecanismo I: $i=1; j=0, 1, \dots, 4$. Mecanismo II: $i=2; j=0, 1, \dots, 5$).

$$c_{10} = k_1 k_2 k_5 (k_{-3} + k_4) y_1^0 + k_3 k_4 k_5 (k_{-1} + k_2) y_2^0 + k_1 k_5 (k_4 k_5 + k_2 k_5 + k_2 k_4) y_1^0 y_2^0 \quad (A1)$$

$$c_{11} = k_5 (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4) + k_1 (k_{-3} k_2 + k_{-3} k_5 + k_2 k_4 + k_4 k_5 + k_2 k_5) y_1^0 + k_3 (k_{-1} k_4 + k_{-1} k_5 + k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_4 k_5) y_2^0 + k_1 k_3 (k_2 + k_4 + k_5) y_1^0 y_2^0 \quad (A2)$$

$$c_{12} = k_1 (k_{-3} + k_2 + k_4 + k_5) y_1^0 + k_3 (k_{-1} + k_2 + k_4 + k_5) y_2^0 + k_1 k_3 y_1^0 y_2^0 \quad (A3)$$

$$c_{13} = k_{-1} + k_2 + k_{-3} + k_4 + k_5 + k_1 y_1^0 + k_2 y_2^0 \quad (A4)$$

$$c_{14} = 1 \quad (A5)$$

$$c_{20} = k_{-1} k_5 k_6 (k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4) + k_1 k_5 k_6 (k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4) y_1^0 + k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 y_2^0 + k_1 k_2 (k_{-3} k_5 k_6 + k_4 k_5 k_6 + k_3 k_5 k_6 + k_3 k_4 k_6 + k_3 k_4 k_5) y_1^0 y_2^0 \quad (A6)$$

$$c_{21} = (k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4)(k_5 k_6 + k_{-1} k_6 + k_{-1} k_5) + k_{-1} k_5 k_6 (k_{-3} + k_{-2} + k_3 + k_4) + k_1 [k_5 k_6 (k_{-2} + k_{-3} + k_3 + k_4) + (k_5 + k_6)(k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4)] y_1^0 + k_2 [k_5 k_6 (k_{-3} + k_3 + k_4) + k_3 k_4 (k_5 + k_6)] y_2^0 + k_1 k_2 [k_5 k_6 + (k_{-3} + k_4)(k_5 + k_6) + k_3 (k_4 + k_5 k_6)] y_1^0 y_2^0 \quad (A7)$$

$$c_{22} = (k_{-1} + k_5 + k_6)(k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4) + (k_{-3} + k_4)(k_5 k_6 + k_{-1} k_6 + k_{-1} k_5) + k_6 (k_{-2} + k_3)(k_5 + k_6) + k_{-1} k_5 (k_{-2} + k_3 + k_6) + k_1 [k_5 k_6 (k_{-2} + k_{-3} + k_3 + k_4) + (k_5 + k_6)(k_{-2} k_{-3} + k_{-2} k_4 + k_3 k_4)] y_1^0 + k_2 [k_5 k_6 (k_{-3} + k_3 + k_4) + k_3 k_4 (k_5 + k_6) + k_{-3} k_5 + k_{-3} k_6 + k_4 k_5 + k_4 k_6 + k_3 k_4 + k_3 k_5 + k_3 k_6] y_2^0 + k_1 k_2 (k_{-3} + k_3 + k_4 + k_5 + k_6) y_1^0 y_2^0 \quad (A8)$$

$$c_{23} = k_{-1}(k_{-2} + k_{-3} + k_3 + k_4 + k_5) + k_{-2}(k_{-3} + k_4) + k_3 k_4 + k_5 k_6 + (k_5 + k_6)(k_{-2} + k_{-3} + k_3 + k_4) + k_1(k_{-2} + k_{-3} + k_3 + k_4 + k_5 + k_6) y_1^0 + k_2(k_{-3} + k_3 + k_4 + k_5 + k_6) y_2^0 + k_1 k_2 y_1^0 y_2^0 \quad (A9)$$

$$c_{24} = k_{-1} + k_{-2} + k_{-3} + k_4 + k_5 + k_6 + k_1 y_1^0 + k_2 y_2^0 \quad (A10)$$

$$c_{25} = 1 \quad (A11)$$

Las F_i ($i=1, 2, \dots, 10$) de la tabla I vienen dadas por:

$$\begin{aligned} F_1 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_2 &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_3 &= k_1 k_2 [k_5(k_{-3} + k_4) + k_3(k_4 + k_5)] y_2^0 y_1^0 x_1^0 \\ F_4 &= k_1 k_2 k_3 k_4 (k_5 + k_6) y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_5 &= k_1 k_2 k_3 k_4 y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_6 &= F_1 \\ F_7 &= k_1 [k_3 k_4 k_5 y_2^0 + \{k_5(k_{-3} + k_4) + k_3(k_4 + k_5)\} \lambda_h + (k_{-3} + k_4 + k_5 + k_3) \lambda_h^2 + \lambda_h^3] y_1^0 x_1^0 \\ F_8 &= k_1 k_2 k_3 k_4 [k_5 k_6 + (k_5 + k_6) \lambda_h + \lambda_h^2] y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_9 &= k_1 k_2 k_3 (k_5 + \lambda_h) y_1^0 y_2^0 x_1^0 \\ F_{10} &= k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 (k_6 + \lambda_h) y_1^0 y_2^0 x_1^0 \end{aligned} \quad (A12)$$

