

# ESTUDIO CINETICO DEL MECANISMO ENZIMATICO BI BI PING PONG

R. Varón, A. Román Gil,  
F. García Cánovas y A. Vázquez

Ramón Varón Castellanos es doctor en Ciencias Químicas, catedrático de Escuelas Universitarias.  
Centro de Trabajo: E.U. Politécnica de Albacete.

## Resumen

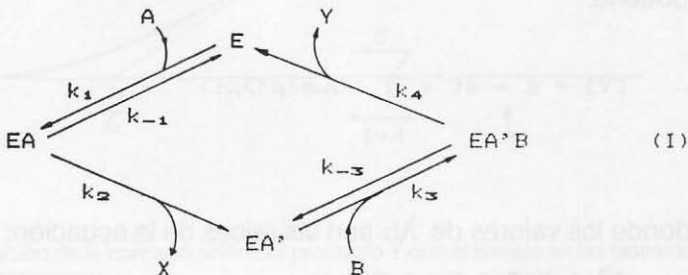
En este trabajo se obtienen las ecuaciones cinéticas correspondientes a la fase de transición de sistemas enzimáticos que evolucionen según el mecanismo Bi Bi Ping Pong, y se propone un método para la determinación de todas sus constantes de velocidad.

## Summary

In this paper the kinetic equations corresponding to transient phase of enzyme systems which evolve according to the Bi Bi Ping Pong mechanism are obtained and a method to determine all their rate constants is proposed.

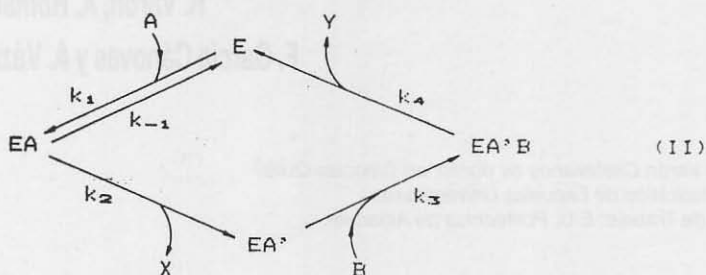
## 1. INTRODUCCION

Un gran número de reacciones enzimáticas [1-7] siguen en su desarrollo el mecanismo Bi Bi Ping Pong que viene descrito, en ausencia inicial de productos, por el siguiente esquema [8,9]:



siendo E la enzima libre, EA, EA' y EA'B los intermedios de la reacción, A y B los sustratos de la reacción y X e Y los productos de la misma.

Las ecuaciones cinéticas correspondientes a la fase de transición del mecanismo (I) aún no han sido obtenidas, aunque sí se han deducido [10-12] las correspondientes al mecanismo:



que se diferencia del (I) en que la etapa de incorporación del segundo producto de la reacción es irreversible ( $k_{-3} = 0$ ).

El objetivo fundamental de este trabajo es proponer un método que, a partir de la determinación experimental de la velocidad de formación,  $\alpha$ , y del periodo de inducción,  $\tau$ , del producto Y y de las ecuaciones cinéticas obtenidas teóricamente, permita la determinación de las constantes de velocidad del mecanismo (I).

## 2. TEORIA

Si suponemos que las condiciones iniciales son tales que las concentraciones de ambos sustratos, A y B, están en exceso respecto a la de enzima libre y que las concentraciones iniciales de los productos, X e Y, son nulas (lo que equivale a considerar irreversibles las etapas de formación de los mismos [13], puesto que su contribución cinética es despreciable durante la fase de transición) y aplicamos los métodos descritos en las referencias 13 y 14 para la cinética de la fase de transición de reacciones enzimáticas, se obtiene:

$$[Y] = \beta + \alpha t + \sum_{h=1}^3 \gamma_h \exp(\lambda_h t) \quad (1)$$

donde los valores de  $\lambda_h$  son las raíces de la ecuación:

$$\lambda^3 + N\lambda^2 + F\lambda + Q = 0 \quad (2)$$

con

$$N = n_1 + n_2 a_0 + n_3 b_0 \quad (3)$$

$$P = p_1 + p_2 a_0 + p_3 b_0 + p_4 a_0 b_0 \quad (4)$$

$$Q = q_1 a_0 + q_2 b_0 + q_3 a_0 b_0 \quad (5)$$

y siendo  $a_0$  y  $b_0$  las concentraciones iniciales de A y B, respectivamente. Por su parte, los parámetros  $n_i$  ( $i=1,2,3$ ),  $p_i$  ( $i=1,2,3,4$ ) y  $q_i$  ( $i=1,2,3$ ) dependen de las constantes de velocidad como se indica en la ecs (A1) – (A10) del Apéndice. A su vez, las expresiones de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $h=1,2,3$ ) están indicadas también en el Apéndice. Finalmente, el periodo de introducción,  $\tau$ , del producto Y viene identificado por:

$$\tau = \frac{P}{Q} \quad (6)$$

Una representación esquemática de la variación de la concentración de Y con el tiempo se da en la Fig. 1.

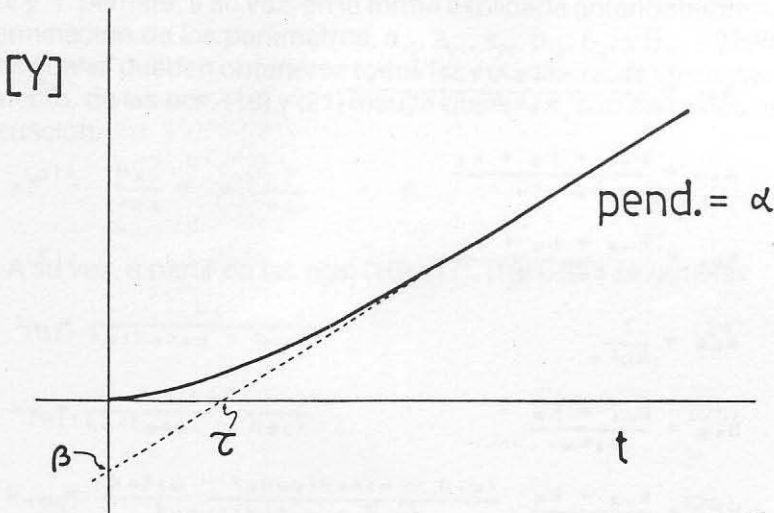


Figura 1. Variación de la concentración del producto Y con el tiempo en las fases de transición y estacionaria.

Si definimos las magnitudes:

$$v = \frac{\tau a_0 b_0 e_0}{\alpha} \quad (7)$$

$$w = \frac{a_0 b_0 e_0}{\alpha} \quad (8)$$

donde  $e_0$  es la concentración inicial de la enzima libre, E, y si tenemos en cuenta las expresiones de  $\alpha$  y  $\tau$  definidas por las ecs. (A11), (6), (5) y (4), obtenemos:

$$v = A_1 + A_2 a_0 \quad (9)$$

$$w = B_1 + B_2 a_0 \quad (10)$$

con:

$$A_1 = a_{11} + a_{12} b_0 \quad (11)$$

$$A_2 = a_{21} + a_{22} b_0 \quad (12)$$

$$B_1 = b_{12} b_0 \quad (13)$$

$$B_2 = b_{21} + b_{22} b_0 \quad (14)$$

siendo:

$$a_{11} = \frac{(k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4)}{k_1 k_2 k_3 k_4} \quad (15)$$

$$a_{12} = \frac{k_{-1} + k_2 + k_4}{k_1 k_2 k_4} \quad (16)$$

$$a_{21} = \frac{k_{-3} + k_2 + k_4}{k_2 k_3 k_4} \quad (17)$$

$$a_{22} = \frac{1}{k_2 k_4} \quad (18)$$

$$b_{12} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2} \quad (19)$$

$$b_{21} = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3 k_4} \quad (20)$$

$$b_{22} = \frac{k_2 + k_4}{k_2 k_4} \quad (21)$$

Una representación del observable experimental  $v$  vs.  $a_0$  permite determinar,  $A_1$  y  $A_2$ . A su vez, la representación de  $A_1$  vs.  $b_0$  y de  $A_2$  vs.  $b_0$  permite determinar los coeficientes  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ ,  $a_{21}$  y  $a_{22}$ . Análogamente, a partir del observable experimental  $w$  se determinan los coeficientes  $b_{12}$ ,  $b_{21}$  y  $b_{22}$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

La ec. (1) muestra la dependencia de la concentración del producto  $Y$  con el tiempo durante todo el curso de la reacción. Para valores de  $t$  suficientemente grandes como para que los términos exponenciales puedan despreciarse frente a los demás, la ec. (1) se simplifica a:

$$[Y] = \beta + \alpha t \quad (22)$$

que es la ecuación de una recta que muestra la acumulación de producto en el estado estacionario, siendo  $\alpha$  la velocidad inicial de formación de  $Y$  en este estado. La intersección,  $\tau$ , de la recta de c. (22) con el eje de abscisas, así como  $\alpha$  y  $\beta$ , se pueden determinar experimentalmente a partir del perfil concentración-tiempo del producto  $Y$ , como se indica en la Fig. 1. Obsérvese que la determinación experimental de  $\tau$  exige la utilización de técnicas de cinética rápida que permitan seguir la acumulación del producto durante los primeros instantes de la reacción. La determinación experimental de  $\alpha$  y  $\tau$  permite, a su vez, en la forma explicada anteriormente, la determinación de los parámetros,  $a_{12}$ ,  $a_{21}$ ,  $a_{22}$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{21}$  y  $b_{22}$ , a partir de los cuales pueden obtenerse todas las constantes de velocidad. En efecto, de las ecs. (18) y (21) resulta que  $k_2$  y  $k_4$  son las raíces de la ecuación:

$$x^2 - \frac{b_{22}}{a_{22}} x + \frac{1}{a_{22}} = 0 \quad (23)$$

A su vez, a partir de las ecs. (16), (17), (19) y (20) se obtiene:

$$k_1 = \frac{k_4}{k_2(k_4 a_{12} - b_{12})} \quad (24)$$

$$k_3 = \frac{k_2}{k_4(k_2 a_{21} - b_{21})} \quad (25)$$

$$k_{-1} = \frac{k_4 a_{12} - k_2 b_{22}(k_4 a_{12} - b_{12})}{k_2 a_{22}(k_4 a_{12} - b_{12})} \quad (26)$$

$$k_{-3} = \frac{k_2 a_{21} - k_4 b_{22}(k_2 a_{21} - b_{21})}{k_4 a_{22}(k_2 a_{21} - b_{21})} \quad (27)$$

ecuaciones que permiten determinar todas las constantes de velocidad.

Obsérvese que a la hora de asignar las raíces de la ec. (23) a las constantes  $k_2$  y  $k_4$  podemos obtener dos conjuntos de valores para las constantes de velocidad. Esto puede dar lugar a una ambigüedad sólo en el caso de que todos los valores de cada uno de los conjuntos sean positivos. En estas condiciones la indeterminación puede resolverse recurriendo al perfil concentración-tiempo del producto X y utilizando un método similar al descrito por Román [15].

Señalemos, finalmente, que si en las ecuaciones cinéticas obtenidas en este trabajo hacemos  $k_{-3} = 0$  se obtienen las ecuaciones cinéticas correspondientes al mecanismo (II) y que coinciden, naturalmente, con las dadas en la bibliografía [10–12] para este mecanismo.

## REFERENCIAS

1. E. Garces y W. W. Cleland (1969). *Biochemistry* **8**, 633.
2. M. Cascales y S. Grisolia (1966). *Biochemistry*, **5**, 3116.
3. T. L. Hanson y J. J. Fromm (1965). *J. Biol. Chem.* **240**, 4133.
4. V. C. Joshi y S. J. Wakil (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 439.
5. S. Oi, M. Inamusu y K. T. Yasunobu (1970). *Biochemistry* **9**, 3378.
6. J. K. Reed (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 4834.
7. M. Grossand y S. E. Folk (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 1301.
8. I. H. Segel (1975). *Enzyme Kinetics*, New York, J. Wiley & Sons.
9. W. W. Cleland (1970). *The Enzymes*, New York, Academic Press.
10. N. H. Hijazi y K. J. Laidler (1973). *Can. J. Biochem.* **51**, 822.
11. J. Gálvez, R. Varón y F. García Cánovas (1981). *J. Theor. Biol.* **89**, 19.
12. J. Gálvez, A. Román, R. Varón, F. García Cánovas y F. García Carmona (en prensa). *Anales de Química de la R.S.E.Q.*
13. I. G. Darvey (1977). *J. Theor. Biol.* **65**, 465.
14. J. Gálvez y R. Varón (1981). *J. Theor. Biol.* **89**, 1.
15. A. Román (1984). Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

## APENDICE

Expresiones de  $n_i$  ( $i=1,2,3$ ),  $p_i$  ( $i=1,2,3,4$ ) y  $q_i$  ( $i=1,2,3$ ),  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\%_h$  ( $h=1,2,3$ ).

$$n_1 = k_{-1} + k_{-3} + k_2 + k_4 \quad (A1)$$

$$n_2 = k_1 \quad (A2)$$

$$n_3 = k_3 \quad (A3)$$

$$p_1 = (k_{-1} + k_2)(k_{-3} + k_4) \quad (A4)$$

$$p_2 = k_1(k_2 + k_{-3} + k_4) \quad (A5)$$

$$p_3 = k_3(k_{-1} + k_2 + k_4) \quad (A6)$$

$$p_4 = k_1 k_3 \quad (A7)$$

$$q_1 = k_1 k_2 (k_{-3} + k_4) \quad (A8)$$

$$q_2 = k_3 k_4 (k_{-1} + k_2) \quad (A9)$$

$$q_3 = k_1 k_3 (k_2 + k_4) \quad (A10)$$

$$\alpha = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 a_0 b_0 e_0}{Q} \quad (A11)$$

$$\beta = - \frac{\alpha F}{Q} \quad (A12)$$

$$\%_h = \frac{\alpha Q}{\lambda_h^2 \prod_{\substack{p=1 \\ p \neq h}}^3 (\lambda_p - \lambda_h)} \quad (h=1,2,3) \quad (A13)$$