

Nomenclatura de las reacciones catalizadas (Cleland)

- *Número de sustratos o productos: Uni, Bi, Ter, Quad*
– *Ejemplos Uni Uni, Bi Bi, Ter Bi, etc*
- *Sustratos: A, B, C, D*
- *Productos: P, Q, R, S*
- *Enzima libre: E, F, E**

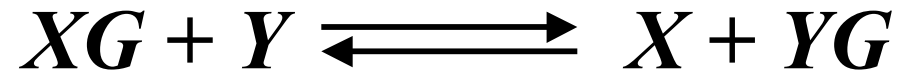
Nomenclatura de las reacciones catalizadas (Cleland)

- ***Formas estables de las enzimas*** son aquellas
 - que cuando se aislan del resto de los componentes de la reacción su vida media es larga comparada con el tiempo que dura la reacción.
 - Los reactantes se unen a ellas en reacciones de orden 2
 - Por ejemplo: la enzima libre E o F
- ***Formas transitorias de las enzimas*** son aquellas
 - que cuando se aislan del resto de los componentes de la reacción su vida media es corta comparada con el tiempo que dura la reacción.
 - Son generalmente complejos de la enzima con los reactantes
 - Por ejemplo: los complejos ES o EP
- ***Las formas transitorias*** son de dos tipos:
 - ***Complejos centrales***, en los que el sitio activo está totalmente ocupado por los sustratos o productos.
 - ***Complejos no centrales*** en los que el sitio activo está parcialmente ocupado

Nomenclatura de las reacciones catalizadas (Cleland)

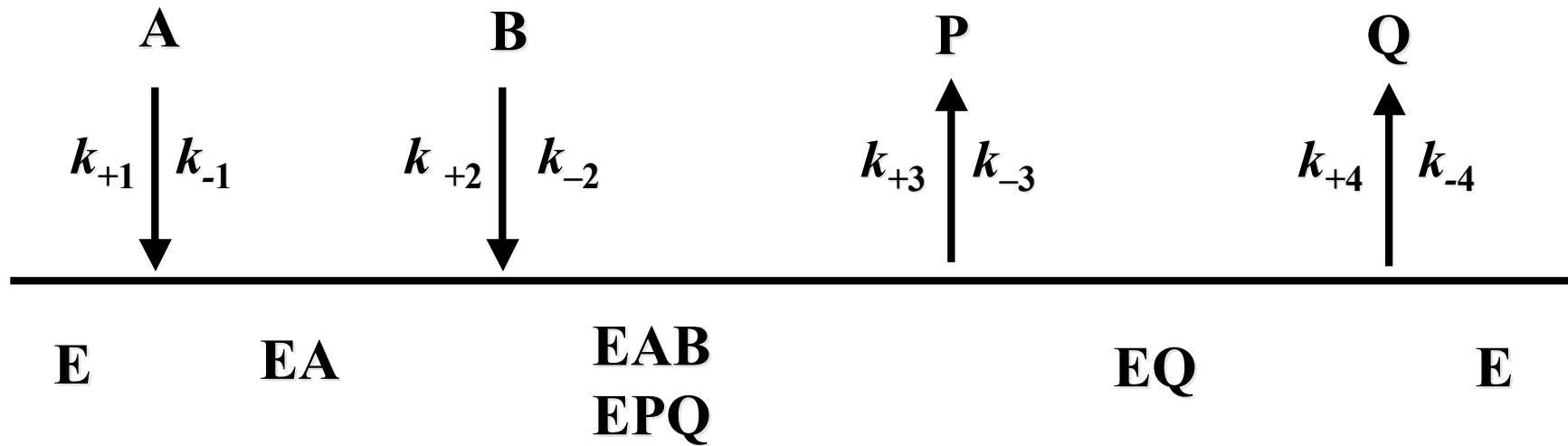
- **Los complejos de las enzimas pueden ser:**
 - *Binarios*, en los que sólo un reactante (sustrato o producto) está unido al sitio activo de la enzima. Por ejemplo, EA.
 - *Ternarios*, en los que la enzima tiene unidas dos moléculas de reactantes ((sustratos o productos). Por ejemplo, EAB.
 - *Cuaternarios*, en los que la enzima tiene unidas tres moléculas de reactantes ((sustratos o productos). Por ejemplo, EPQR,
- **Los complejos centrales pueden ser de cualquiera de estos tipos, depende del número de sustratos o productos de una reacción. Por ejemplo, EA es un complejo central de una reacción monosustrato y EPQR es un complejo central de una reacción que tenga tres productos.**

Reacciones bisustrato

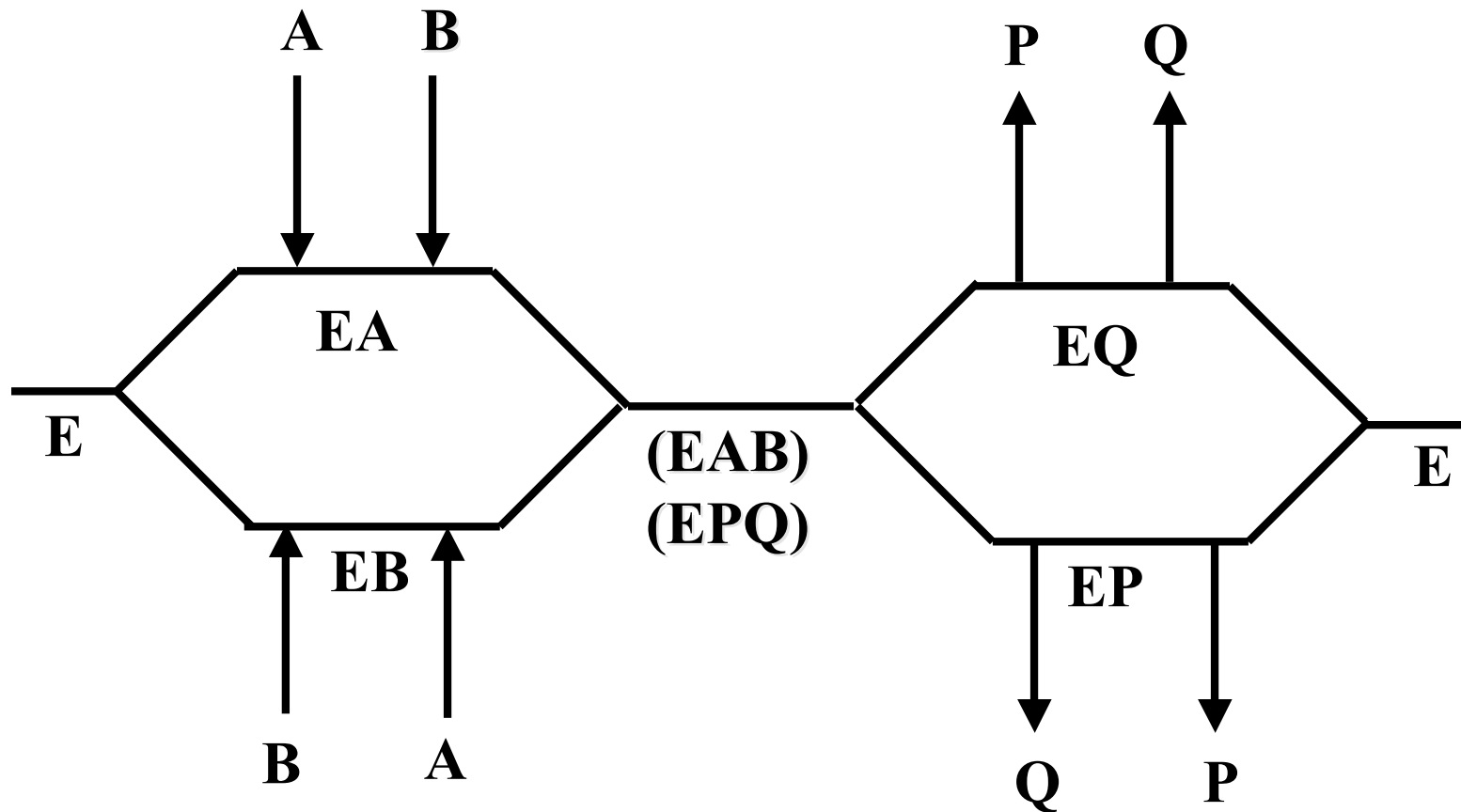


- *Secuencial o de desplazamiento único*
 - *Los productos se forman después de que se han unido a la enzima todos los sustratos.*
 - *El grupo se transfiere de un sustrato a otro.*
 - *Se forma un complejo central ternario.*
 - *Pueden ser ordenadas o al azar*
- *Ping Pong o de desplazamiento doble*
 - *Se forman y se liberan productos antes de que se unan todos los sustratos a la enzima*
 - *El grupo se transfiere de un sustrato a la enzima y de ésta al otro sustrato*
 - *Se produce una forma de enzima modificada (“sustituida”)*

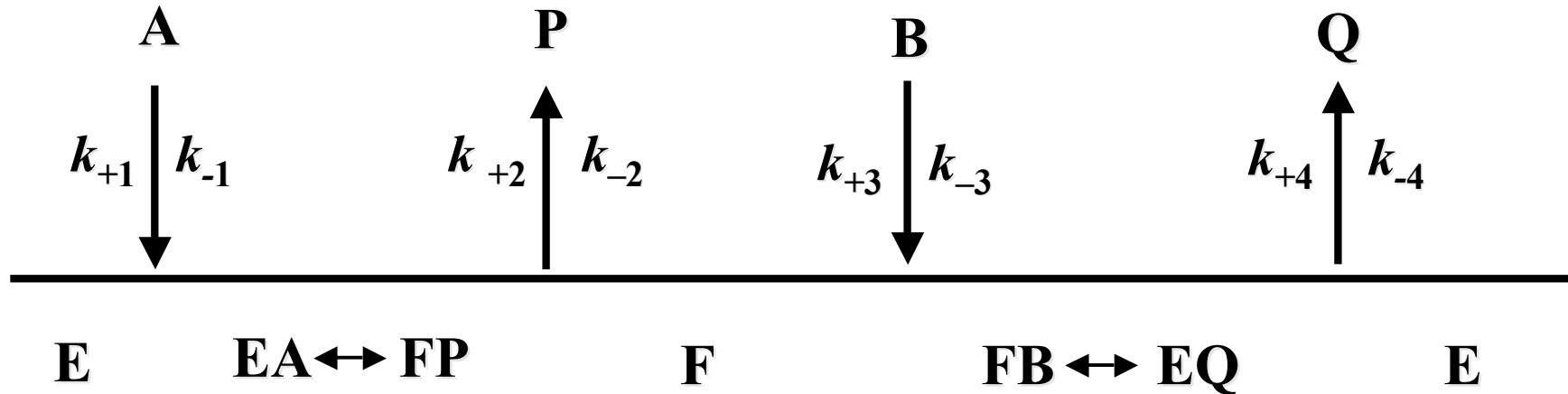
Mecanismo Bi Bi Ordenado



Mecanismo Bi Bi al Azar



Mecanismo Bi Bi Ping Pong



Determinación de los parámetros cinéticos en reacciones bisustrato

- **Se hace una cinética de saturación de la enzima variando un sustrato (sustrato variable) y manteniendo fija la concentración del otro (sustrato fijo variable)**
- **En cada curva de saturación se obtienen parámetros cinéticos aparentes**
- **Los parámetros cinéticos reales se obtienen a saturación del sustrato fijo variable**

Parámetros cinéticos aparentes

- Son aquellos cuyo valor depende de la concentración de otro ligando (sustrato, inhibidor, activador) de la enzima
- Cuando se sigue una cinética de Michaelis Menten, la dependencia del valor del parámetro cinético aparente de este ligando es casi siempre hiperbólica:

- Si el valor del parámetro cinético aumenta con la [L]

$$apC = C [L] / ([L] + K_d) \quad \text{o} \quad apC = C / (1 + K_d / [L])$$

- Si el valor del parámetro cinético disminuye con la [L]

$$apC = C K_d / ([L] + K_d) \quad \text{o} \quad apC = C / (1 + [L] / K_d)$$

Propiedades de los mecanismos cinéticos en Equilibrio Rápido

- **Cualquier K_m es una constante de disociación (K_d).**
- **El paso limitante de la velocidad de la reacción es el paso químico de conversión de los sustratos a productos, y la constante de velocidad asociada es la k_{cat} .**
- **Bajo condiciones de velocidad inicial, en ausencia de productos añadidos al medio de ensayo, los productos se disocian de la enzima tan pronto se forman.**
- **Por esto, bajo estas condiciones de velocidad inicial no existen los complejos de la enzima con los productos.**
- **Un complejo de la enzima con un producto sólo existirá si este producto se añade al medio de reacción.**

Tipos de mecanismos cinéticos en Equilibrio Rápido

En este curso vamos a estudiar:

- ***Bi Bi ordenado***
 - La ecuación de velocidad inicial es característica de este mecanismo
- ***Bi Bi al azar***
 - La ecuación de velocidad inicial tiene la misma forma que la de un mecanismo bi bi ordenado en estado estacionario, por lo que hay que usar estudios de inhibición para distinguirlos.

Mecanismo Bi Bi Ordenado Equilibrio Rápido

REVERSIBLE



IRREVERSIBLE



Ecuación de velocidad inicial
Mecanismo Bi Bi Ordenado



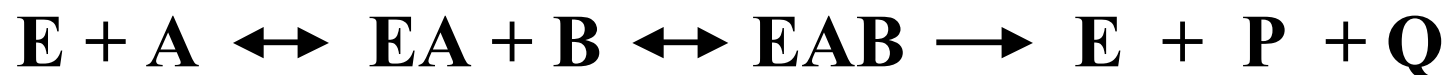
Equilibrio rápido

$$v = k_{cat}[E]_{total}[A][B] / (K_A K_B + K_B[A] + [A][B])$$

Estado estacionario

$$v = k_{cat}[E]_{total}[A][B] / (K_{iA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B])$$

Patrones de velocidad inicial
Mecanismo Bi Bi Ordenado en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (K_A K_B + K_B [A] + [A][B])$$

Parámetros cinéticos

$$V_{\max}, K_A, K_B$$

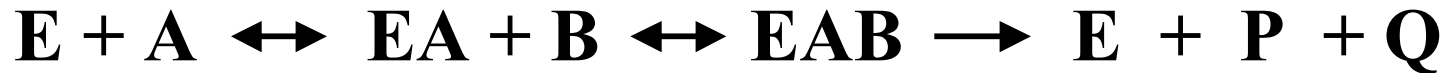
V_{\max} = Velocidad máxima

K_A = Constante de disociación de A del complejo EA

K_B = Constante de disociación de B del complejo EAB

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi Ordenado en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (K_A K_B + K_B [A] + [A][B])$$

Si [A] es variable y [B] constante:

$$v = {}_{\text{ap}}V_{\max} [A] / ({}_{\text{ap}}K_A + [A])$$

En donde:

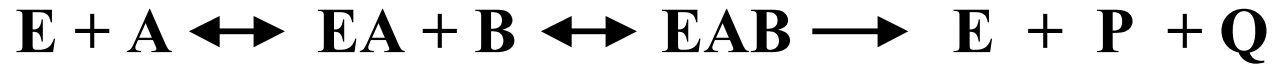
$${}_{\text{ap}}V_{\max} = V_{\max} / (1 + K_B/[B]) = V_{\max} [B] / (K_B + [B])$$

$${}_{\text{ap}}K_A = K_A K_B / [B] (1 + K_B/[B]) = K_A K_B / (K_B + [B])$$

$${}_{\text{ap}}(V_{\max}/K_A) = (V_{\max}/K_A) [B]/K_B$$

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi Ordenado en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (K_A K_B + K_B [A] + [A][B])$$

Si [A] es variable y [B] constante:

$$v = {}_{\text{ap}}V_{\max} [A] / ({}_{\text{ap}}K_A + [A])$$

- Tanto la pendiente como el intersepto de una gráfica de dobles recíprocos dependen de [B]
- Por ello se obtiene un patrón de líneas que se cruzan en un punto a la izquierda del eje de ordenadas cuando A es el sustrato variable y B el fijo variable

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi Ordenado en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (K_A K_B + K_B [A] + [A][B])$$

Si [B] es variable y [A] constante:

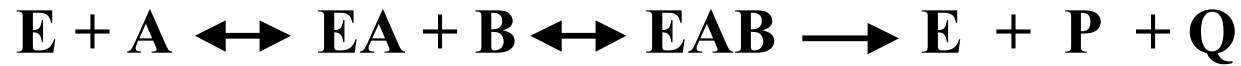
$$v = V_{\max} [B] / ({}_{\text{ap}}K_B + [B])$$

En donde:

$$\begin{aligned} {}_{\text{ap}}K_B &= K_B (1 + K_A/[A]) = K_B ([A] + K_A)/[A] \\ {}_{\text{ap}}(V_{\max}/K_B) &= (V_{\max}/K_B)/(1 + K_A/[A]) = \\ &= (V_{\max}/K_B)[A]/(K_A + [A]) \end{aligned}$$

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi Ordenado en Equilibrio Rápido



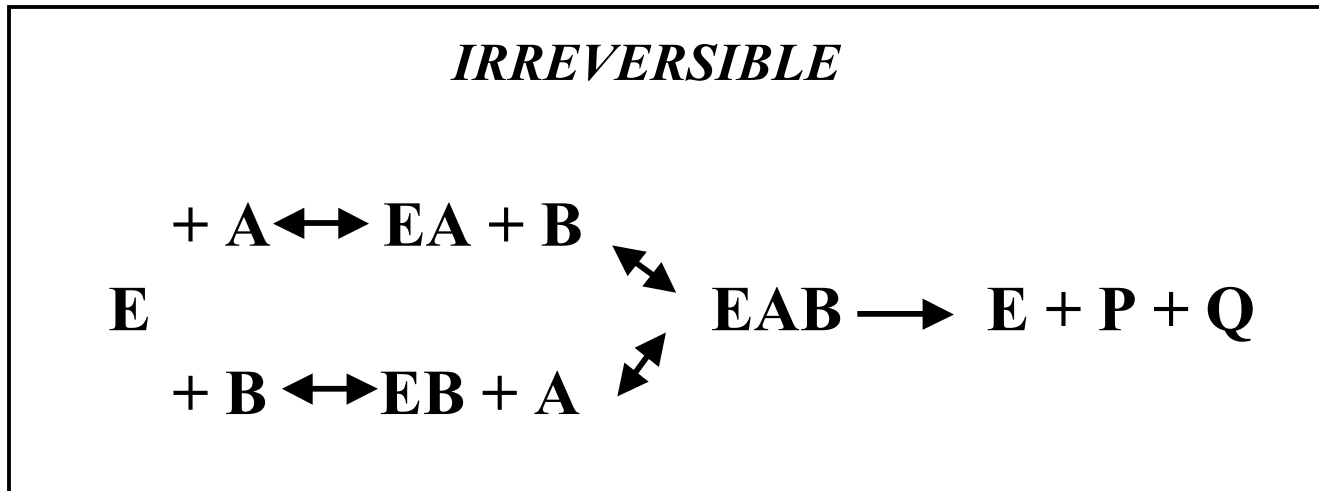
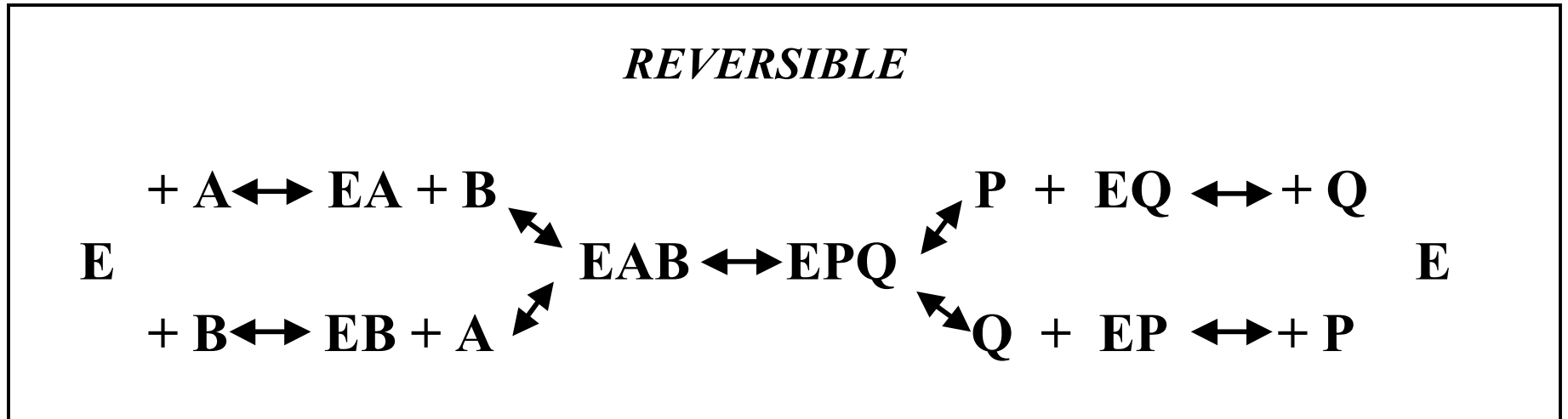
$$v = V_{\max} [A][B] / (K_A K_B + K_B [A] + [A][B])$$

Si [B] es variable y [A] constante:

$$v = V_{\max} [B] / (K_B + [B])$$

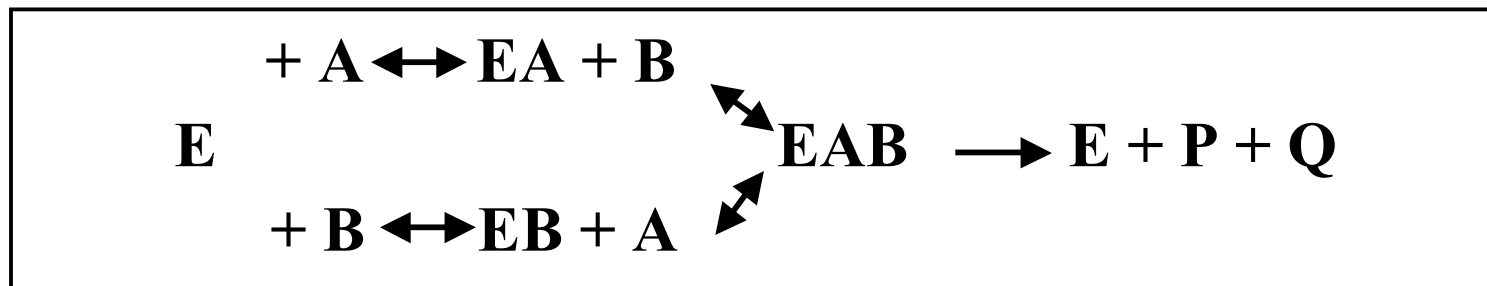
- Sólo la pendiente de una gráfica de dobles recíprocos depende de [A]
- Por tanto se obtiene un patrón de líneas que se cruzan en el eje de ordenadas cuando B es el sustrato variable y A el fijo variable

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B])$$

Parámetros cinéticos

$$V_{\max}, K_A, K_B, \alpha K_A, \alpha K_B$$

V_{\max} = Velocidad máxima

K_A = Constante de disociación del complejo EA

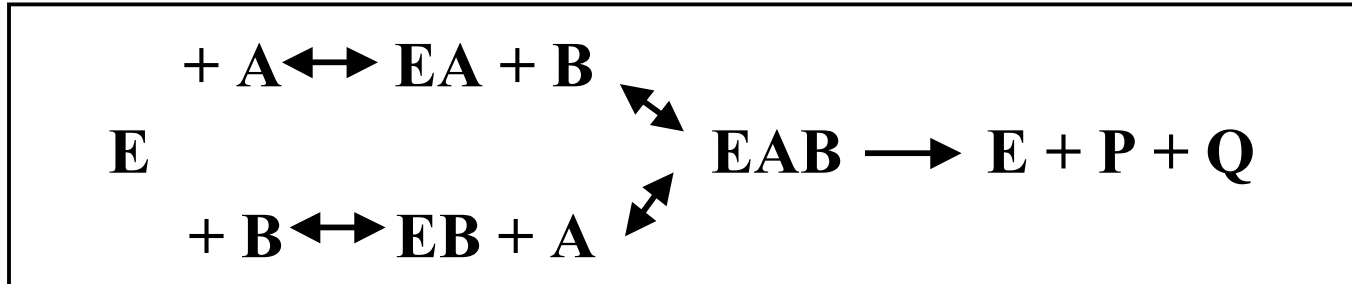
K_B = Constante de disociación del complejo EB

αK_A = Constante de disociación de A del complejo EAB

αK_B = Constante de disociación de B del complejo EAB

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B])$$

Si [A] es variable y [B] constante (fijo variable):

$$v = {}_{ap}V_{\max} [A] / ({}_{ap}K_A + [A])$$

En donde:

$${}_{ap}V_{\max} = V_{\max} [B] / (\alpha K_B + [B])$$

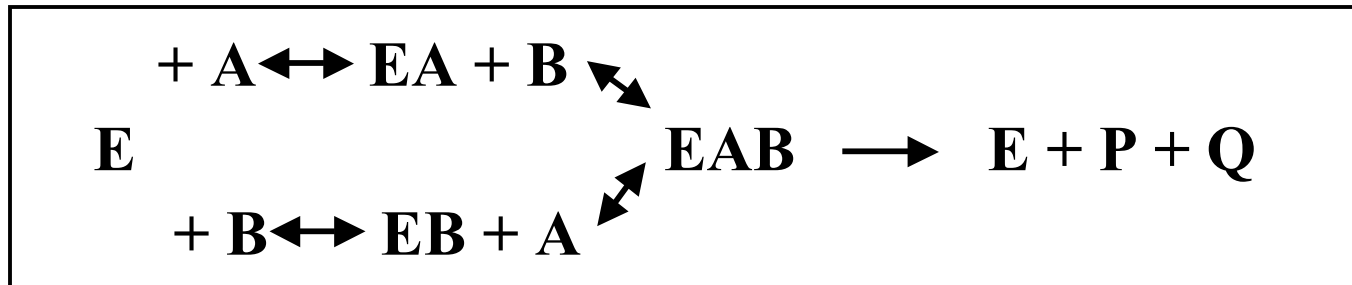
$${}_{ap}K_A = \alpha K_A (K_B + [B]) / (\alpha K_B + [B])$$

$${}_{ap}(V_{\max}/K_A) = (V_{\max}/K_A) [B] / (K_B + [B])$$

Los verdaderos parámetros cinéticos se obtienen cuando [B] es saturante o mediante regráficos de ${}_{ap}V_{\max}$ o ${}_{ap}(V_{\max}/K_A)$ vs [B] (V_{\max} , αK_B y K_B)

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B])$$

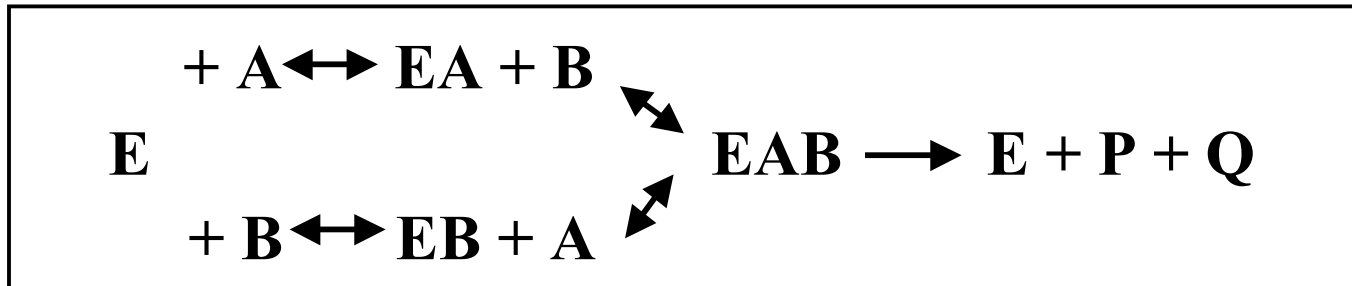
Si [A] es variable y [B] constante (fijo variable):

$$v = {}_{ap}V_{\max} [A] / ({}_{ap}K_A + [A])$$

- Tanto la pendiente como el intersepto de una gráfica de dobles recíprocos dependen de [B].
- Por tanto se obtiene un patrón de líneas que se cruzan a la izquierda del eje de ordenadas cuando A es el sustrato variable y B el fijo variable.
- Los valores reales de los parámetros cinéticos se pueden obtener en gráficos secundarios, o regráficos, de los parámetros aparentes vs la concentración del sustrato fijo variable.

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [A][B] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B])$$

Si [A] es variable y [B] constante (fijo variable):

$$v = {}_{ap}V_{\max} [A] / ({}_{ap}K_A + [A])$$

En donde:

$${}_{ap}V_{\max} = V_{\max} [B] / (\alpha K_B + [B])$$

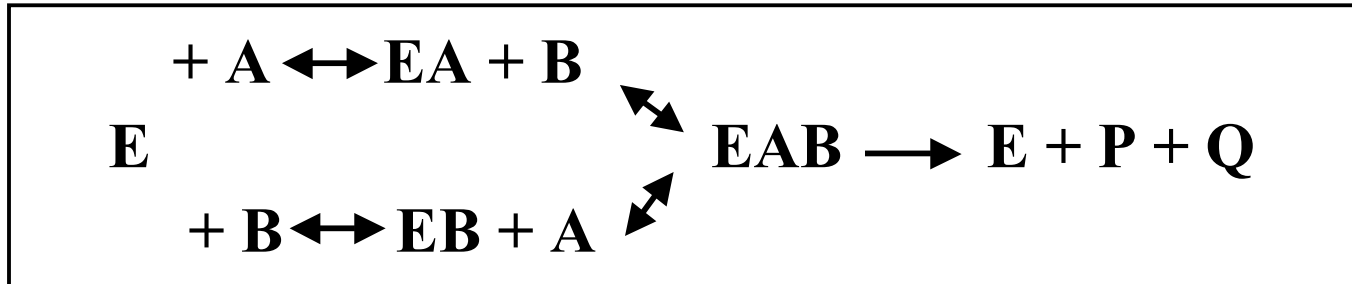
$${}_{ap}K_A = \alpha K_A (K_B + [B]) / (\alpha K_B + [B])$$

$${}_{ap}(V_{\max}/K_A) = (V_{\max}/K_A) [B] / (K_B + [B])$$

Los verdaderos parámetros cinéticos se obtienen cuando [B] es saturante o mediante regráficos de ${}_{ap}V_{\max}$ o ${}_{ap}(V_{\max}/K_A)$ vs [B] (V_{\max} , αK_B y K_B)

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



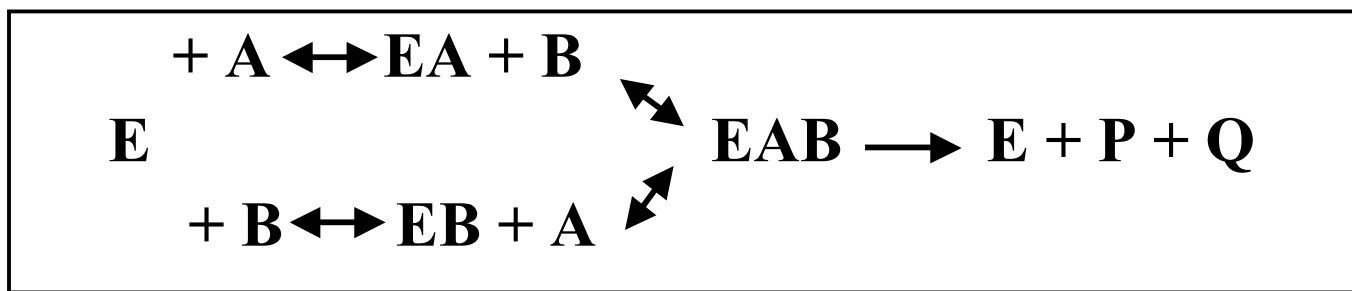
$$v = V_{\max} [A][B] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [A] + \alpha K_A [B] + [A][B])$$

- *Los patrones de velocidad inicial de ambos sustratos (usando como sustrato variable cualquiera de ellos dos) son simétricos puesto que bajo condiciones de equilibrio rápido.*

$$\alpha K_A K_B = K_A \alpha K_B$$

Patrones de velocidad inicial

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max}[A][B]/(\alpha K_A K_B + \alpha K_B[A] + \alpha K_A[B] + [A][B])$$

Valores del intersepto en el eje $1/v$ de la gráfica de dobles recíprocos:

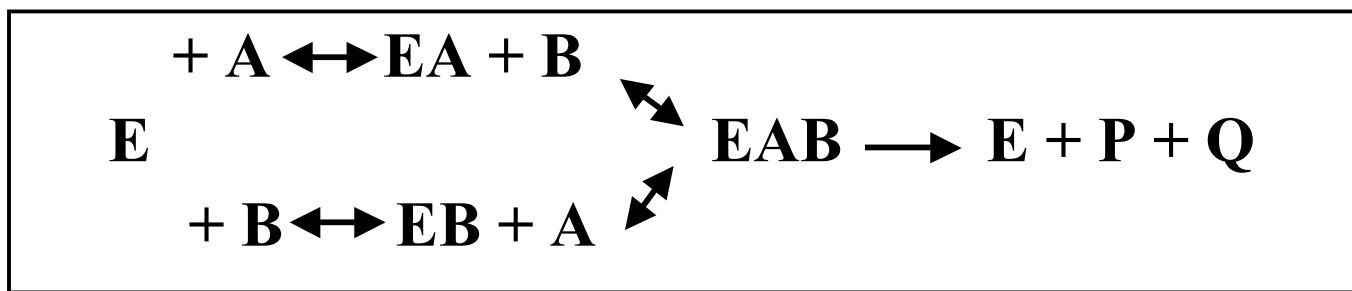
$$(1/V_{\max})(1 - \alpha K_A / K_A) \quad \text{o} \quad (1/V_{\max})(1 - \alpha K_B / K_B)$$

$$(1/V_{\max})(1 - \alpha)$$

- Si $\alpha < 1$ tenemos un patrón intersectante en el segundo cuadrante
- Si $\alpha = 1$ tenemos un patrón intersectante en el eje de abscisas
- Si $\alpha > 1$ tenemos un patrón intersectante en el tercer cuadrante
- Si $\alpha \gg 1$ tenemos un patrón de líneas aparentemente paralelas

Nomenclatura de Dalziel

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = [E]_{\text{total}}[S_1][S_2]/(\Phi_{12} + \Phi_2[S_1] + \Phi_1[S_2] + \Phi_0[S_1][S_2])$$

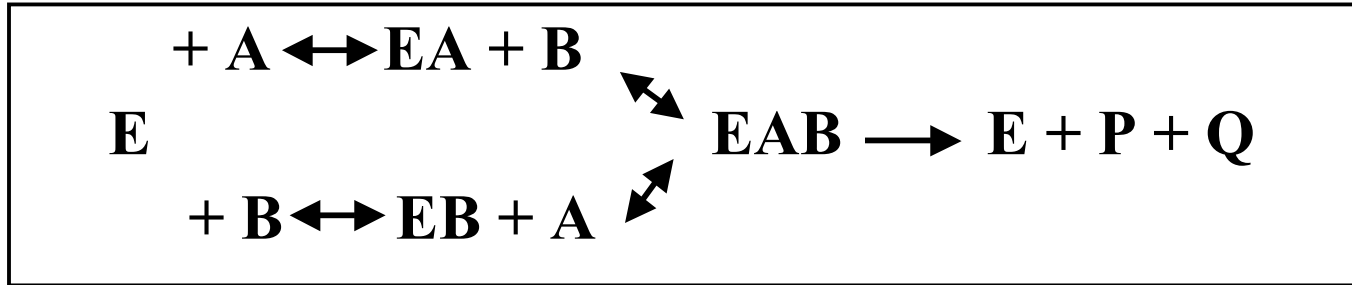
$$[E]_{\text{total}} / v = \Phi_0 + (\Phi_1/[S_1]) + (\Phi_2/[S_2]) + (\Phi_{12}/[S_1][S_2])$$

En donde,

$$\Phi_0 = 1/k_{\text{cat}} ; \quad \Phi_1 = \alpha K_A/k_{\text{cat}} ; \quad \Phi_2 = \alpha K_B/k_{\text{cat}} ; \quad \Phi_{12} = \alpha K_A K_B/k_{\text{cat}}$$

Ecuaciones de distribución

Mecanismo Bi Bi al Azar en Equilibrio Rápido



$$v = V_{\max} [\text{A}][\text{B}] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [\text{A}] + \alpha K_A [\text{B}] + [\text{A}][\text{B}])$$

$$[\text{E}] / [\text{E}]_{\text{total}} = \alpha K_A K_B / \{(\alpha K_A K_B + \alpha K_B [\text{A}] + \alpha K_A [\text{B}] + [\text{A}][\text{B}])\}$$

$$[\text{EA}] / [\text{E}]_{\text{total}} = [\text{A}] / \{K_A (1 + [\text{B}] / K_B) + [\text{A}] (1 + [\text{B}] / \alpha K_B)\}$$

$$[\text{EB}] / [\text{E}]_{\text{total}} = [\text{B}] / \{K_B (1 + [\text{A}] / K_A) + [\text{B}] (1 + [\text{A}] / \alpha K_A)\}$$

$$[\text{EAB}] / [\text{E}]_{\text{total}} = [\text{A}][\text{B}] / (\alpha K_A K_B + \alpha K_B [\text{A}] + \alpha K_A [\text{B}] + [\text{A}][\text{B}])$$