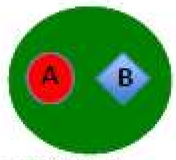
8. GAIA: ZINETIKA ENTZIMATIKO BISUBSTRATOAK



A: substratua
B: kosubstratua, kofaktorea edo aktibatzaile espezifiko bat

Entzima mota hauek 2 substratu batzeko ahalmena dute, eta horietako bakoitzarentzat batura gune bat dute. Erreakzio biologikoetan ematen diren gehienak mota honetakoak dira.

Bi substratu bereizten dira: A eta B. Neurketak egiteko baten kontzentrazioa konstante mantentzen da, eta bestaren kontzentrazioa aldatuz egiten dira neurketak. Horrela, aldagai bakarra izatea lortzen da.

Sailkapena:

1) Konplexu hirutiarren eraketa ekartzen duten erreakzioak (EAB)
    a. Zorizko Mekanismo Sekuentziala
        i. Zentro Menpekoak
        ii. Zentro Independenteak
    b. Ordenatuko Mekanismo Sekuentziala
2) Konplexu bitarren eraketa ekartzen duten erreakzioak (EA edo EB)
    a. Ping-pong mekanismoa
    b. Theorell Chance Mekanismoa

Deskribapen orokorra:

a) <u>Zorizko mekanismo sekuentziala</u>

E, A-ri edo B-ri lotuko zaio lehendabizi eta ondoren bigarren substratua gehituko zaio.

$E+A \rightleftharpoons EA$ $\quad$ $E+B \rightleftharpoons EB$

$EA+B \rightleftharpoons EAB$ $\quad$ $EB+A \rightleftharpoons EAB$

Konplexu bitar eta hirutiarrak eratuko dira. Adb: Kreatina kinasa (transferentzia erreakzioa)

b) <u>Ordenatutako mekanismo sekuentziala (Koshland)</u>

E-ri A batuko zaio, honek aldaketa konformazional bat eragin eta ondoren gehituko zaio B EAB sortzeko. Ezin izango da 1. konplexu modura EB sortu. Mekanismo hau azaltzeko Fisher modeloa ez du balio.

$E+A \rightleftharpoons EA$ → Ez da EB-rik eratuko!

$EA+B \rightleftharpoons EAB$

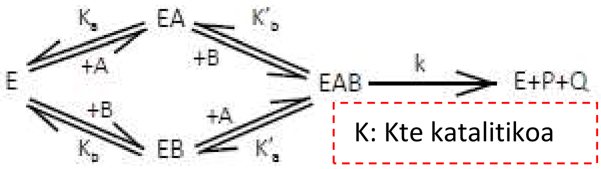
→ Adib.: Malato DH

$Malato+NAD^+ \rightleftharpoons OAA+NADH+H^+$

Malato DH-NAD$^+$-Malato=EAB

ZORIZKO MEKANISMO SEKUENTZIALA

Sekuentziala: susbtratu guztiak entzimari batu behar dira produktua askatu aurretik.



K_a, K_b, K'_b eta K'_a: Disoziazio oreka-Kte.ak
k: Konstante katalitikoa

Zentroak

a. Menpekoak (≠ kooperatiboak, zentroak ezberdinak dira)
  - **a.** Menpekotasun POSITIBOA: A batzerakoan, Bren batuketa errazten da edo alderantziz
  - **b.** Menpekotasun NEGATIBOA: Aren sarrera bere zentroan, Bren sarrera oztopatzen du, edo alderantziz.

b. Zentro INDEPENDIENTEAK
  Ez dute elkarreragiten, bi entzima independente bezala jokatu.

Abiadura ekuazioa

Bi era daude abiadura ekuazioa lortzeko.

1. *Egoera geldikorraren bidez*.
   EAB eratzeko abiadura EA edo EB desagertzearen abiadura bera dela onartuko da.
   $$\frac{d[EAB]}{dt} = \frac{-d[EA]}{dt} = \frac{-d[EB]}{dt}$$
2. *Oreka azkarraren bidez*.
   Modu honetan abiadura ekuazioa lortzea errazagoa da. Ez da benetako orekarik emango. Onartuko da K katalitikoa beste abiadura konstanteak baino askoz txikiagoa izango dela, eta beraz arbuiagarria.

- ✓ Zentroen arteko lotura erlazioa:

$$\boxed{K_A K'_B = K_B K'_A}$$

- ✓ Disoziazio oreka konstanteak:

$$\boxed{K_A = \frac{[E][A]}{[EA]}} \quad \boxed{K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}} \quad \boxed{K_B = \frac{[E][B]}{[EB]}} \quad \boxed{K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}}$$

- ✓ Erreakzioaren abiadura:

$$\boxed{v = k[EAB]}$$

1.1-Zorizko mekanismo sekuentziala: Zentro MENPEKOAK

-Entzimaren espezie bakoitza EAB-rekiko adierazi:

$$[E]=\frac{K'_B K_A[EAB]}{[A][B]} \qquad [EA]=\frac{K'_B[EAB]}{[B]} \qquad [EB]=\frac{K'_A[EAB]}{[A]} \qquad 1$$

-1 ekuazioak entzima totalaren ekuazioan ordeztuz:

$$[E]_{TOT}=[EAB]\left(1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}\right)$$

$$[EAB]=\frac{[E]_{TOT}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}} \qquad 2$$

-2 ekuazioaren bi aldeak k-z biderkatu:

$$\overbrace{k[EAB]}^{v}=\frac{\overbrace{k[E]_{TOT}}^{V_{max}}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}} \qquad 3$$

-Beraz:

$$\boxed{v=\frac{V_{max}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}}} \qquad 4$$

- ✓ Entzima totala:

$$\boxed{[E]_{TOT}=[E]+[EA]+[EB]+[EAB]}$$

Entzima totaleko bitartekari guztiak EAB-ren baitan jarri (disoziazio kteak erabiliz)

$$[E]_{tot} = \underbrace{\frac{K_A \cdot K'_B[EAB]}{[A][B]}}_{[E]} + \underbrace{\frac{K'_B[EAB]}{[B]}}_{[EA]} + \underbrace{\frac{K'_A[EAB]}{[A]}}_{[EB]} + [EAB]$$

Faktore komuna [EAB]

$$[E]_{tot} = [EAB]\left(\frac{K_A \cdot K'_B}{[A][B]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K'_A}{[A]} + 1\right)$$

BATITZEN

$$[EAB] = \frac{[E]_{tot}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A \cdot K'_B}{[A][B]}}$$

[EAB] eta [E]tot K-rekin biderkatuz Vmax eta V lortzen da.

$$B] \cdot K) \quad V = \frac{V_{max}\ ([E]_{tot} \cdot K)}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A \cdot K'_B}{[B]}}$$

Behin abiadura ekuazioa daukagula, honen limiteak aztertu daitezke 3 kasutan. Batetik [A] saturatzailea denean, bestetik [B] saturatzailea denean, eta bukatzeko bi substratuak direnean saturatzaile. Limiteen azterketa egiteko abiadura ekuazioa [A][B]-gatik biderkatuko da, azterketa errazagoa egiteko. Makromolekula saturatuta ez dagoenean ligandoen kontzentrazioaren menpe egongo da. Aldiz, substratu baten kontzentrazailea saturatzailea izatekotan batuketa gune bakarra edukiko balu bezala jokatuko du beste substratuarentzat. Monosubstratu baten zinetika saturatuta ez dagoen substratuarentzako.

Zentroak menpekoak direnean, haien artean lotura bat egingo da. ERLAZIO FAKTOREA (r) definitu daiteke, eta honek zentroen arteko erlazioa zein den jakitea ahalbidetuko digu.

a) [A]→∞

$$v=\frac{V_{max}[B]}{[B]+K'_B}$$

b) [B]→∞

$$v=\frac{V_{max}[A]}{[A]+K'_A}$$

c) [A] eta [B]→∞

$$v=V_{max}$$

$$\frac{V_{max}[A][B]}{[A][B]+K'_A[B]+K'_B[A]+K_A K'_B}$$

$$K_A K'_B = K_B K'_A$$

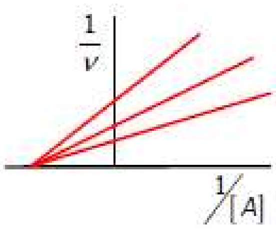
$$\boxed{\frac{K_A}{K'_A}=\frac{K_B}{K'_B}=r}$$

r=1→$K_A=K'_A$ eta $K_B=K'_B$. Ligando baten batuketak ez du bestearena eragiten→Zentro INDEPENDENTEAK.

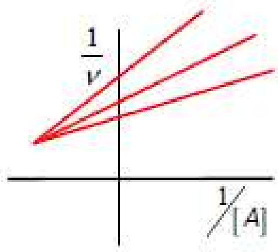
r>1→EAB komplexuaren eraketa faboratuta dago→ MENPEKOTASUN POSITIBOA $K_A>K'_A$ eta $K_B>K'_B$

r<1→EAB eratzea kostatzen da→MENPEKOTASUN NEGATIBOA $K_A<K'_A$ eta $K_B<K'_B$

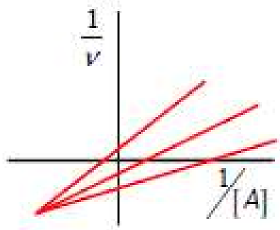
r=1→ INDEPENDENTEAK



r>1→ MENPEKOTASUN POSITIBOA



r<1→ MENPEKOTASUN NEGATIBOA



Erlazio faktore horren arabera gainera lortzen diren irudikapenak ezberdinak izango dira. Lerro bakoitzak [A] kte dagoenean [B] aldatuz adierazten du.

Ekuazioaren LIMITEAK

$$V = \frac{V_{max}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}}$$

Azterketa errazteko [A][B]-z biderkatuko da ekuazio osoa

$$\boxed{V = \frac{V_{max}[A][B]}{[A][B]+K'_A[B]+K'_B[A]+K_A \cdot K'_B}}$$

3 egoera bereizten dira:

1 [A] SATURATZAILEA DENEAN. $[A] \rightarrow \infty$

$$\lim_{[A]\to\infty} V = \text{ind} \xrightarrow[\text{zatituz}]{[A]\text{-rekin}} \lim_{[A]\to\infty} V = \frac{V_{max}[B]}{[B]+\underbrace{\frac{K'_A[B]}{[A]}}_{0}+K'_B+\underbrace{\frac{K_A K'_B}{[A]}}_{0}} = \frac{V_{max}[B]}{[B]+K'_B}$$

Sistema A saturatuta dagoenean B-k monosubstratu modura jokatuko du.

2 [B] SATURATZAILEA DENEAN. $[B] \rightarrow \infty$

$$\lim_{[B]\to\infty} V = \text{ind} \xrightarrow[\text{zatituz}]{[B]\text{-rekin}} \lim_{[B]\to\infty} V = \frac{V_{max}[A]}{[A]+K'_A+\underbrace{\frac{K'_B[A]}{[B]}}_{0}+\underbrace{\frac{K_A K'_B}{[B]}}_{0}} = \frac{V_{max}[A]}{[A]+K'_A}$$

3 [A] eta [B] SATURATZAILEAK direnean

$$\lim_{[A],[B]\to\infty} V = \text{ind} \xrightarrow[\text{zatituz}]{[A],[B]\text{-z}} \lim_{[A],[B]\to\infty} V = \frac{V_{max}}{1+\underbrace{\frac{K'_A}{[A]}}_{0}+\underbrace{\frac{K'_B}{[B]}}_{0}+\underbrace{\frac{K_A K'_B}{[A][B]}}_{0}} = V_{max}$$

$[E]_{tot} = [EAB]$ izango delako

IRUDIKAPEN GRAFIKOAK

Bi motatako irudikapenak bereizten dira, PRIMARIOAK eta SEKUNDARIOAK.

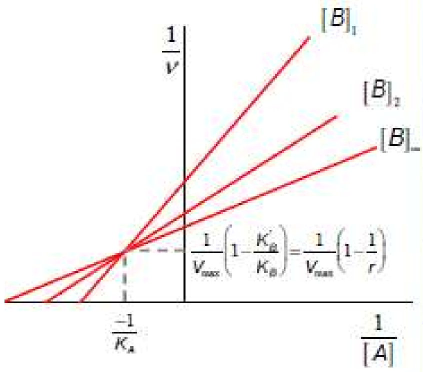
1) Irudikapen primarioak
    a. [B] finkoa: 1/V vs. 1/[A]
    b. [A] finkoa: 1/V vs. 1/[B]
2) Irudikapen sekundarioak
    a. m vs. 1/[X]
    b. b vs. 1/[X]

[A] eta [B]-rentzako irudikapenak egin behar dira kasu guztietan. Gainera, irudikapen primariotik K_A eta K_B lortuko dira, eta irudikapen sekundariotik K'_A eta K'_B.

Alderantzizko bikoitzaren irudikapena egiteko 1/V irudikatu behar denez, erabiliko den abiadura ekuazioaren adierazpena ondorengoa izango da:

$$v = \frac{V_{max}}{1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}} \rightarrow \boxed{\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K'_A}{[A]}+\frac{K'_B}{[B]}+\frac{K_A K'_B}{[A][B]}\right)}$$

ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN PRIMARIOA



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(K'_A+\frac{K_AK'_B}{[B]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K'_B}{[B]}\right)}_{b}$$

Ebaki puntuak:

$$\frac{1}{[A]}=\frac{-1}{K_A}$$

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{max}}\left(1-\frac{1}{r}\right)$$

Nola lortu ebaki puntuak?

Lerroak batzen diren puntuan 1/V eta 1/[A]-ren balioak berdinak izango dira.

erroak batzen diren puntuan $\frac{1}{V}$ eta $\frac{1}{[A]}$ balio berdinak zngo dira.

$$\frac{1}{\cancel{V_{max}}}\left(K'_A+\frac{K_A\cdot K'_B}{[B]_1}\right)\cdot\frac{1}{[A]}+\frac{1}{\cancel{V_{max}}}\left(1+\frac{K'_B}{[B]_1}\right)=\frac{1}{\cancel{V_{max}}}\left(K'_A+\frac{K_AK'_B}{[B]_2}\right)\cdot\frac{1}{[A]}+\frac{1}{\cancel{V_{max}}}\left(1+\frac{K'_B}{[B]_2}\right)$$

- V_{max} faktore komuna bi aldeetan → kendu egin daiteke.

$$\frac{1}{[A]}\left[\left(\cancel{K'_A}+\frac{K_A\cdot K'_B}{[B]_1}\right)-\left(\cancel{K'_A}+\frac{K_A\cdot K'_B}{[B]_2}\right)\right]=\cancel{1}+\frac{K'_B}{[B]_2}-\cancel{1}-\frac{K'_B}{[B]_1}$$

$$\frac{1}{[A]}\left(\frac{K_AK'_B}{[B]_1}-\frac{K_AK'_B}{[B]_2}\right)=\frac{K'_B}{[B]_2}-\frac{K'_B}{[B]_1}$$

$$\frac{1}{[A]}\left(\frac{K_AK'_B[B]_2}{[B]_1[B]_2}-\frac{K_AK'_B[B]_1}{[B]_1[B]_2}\right)=\frac{K'_B[B]_1}{[B]_1[B]_2}-\frac{K'_B[B]_2}{[B]_1[B]_2}$$

$$\frac{1}{[A]}=\frac{\cfrac{\cancel{K'_B}[B]_1-\cancel{K'_B}[B]_2}{\cancel{[B]_1[B]_2}}}{\cfrac{K_A\cancel{K'_B}[B]_2-K_A\cancel{K'_B}[B]_1}{\cancel{[B]_1[B]_2}}}=\frac{[B]_1-[B]_2}{K_A([B]_2-[B]_1)}$$

$$\frac{1}{[A]}=\frac{-(\cancel{[B]_2-[B]_1})}{K_A(\cancel{[B]_2-[B]_1})}=-\frac{1}{K_A}$$

$$\boxed{\frac{1}{[A]}=-\frac{1}{K_A}}$$

$x = 0$ denean

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(K_A + \frac{K_A \cdot K'_B}{[B]}\right) \cdot \frac{-1}{K_A} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K'_B}{[B]}\right) =$$

$$\frac{1}{V_{max}}\left(-\frac{K_A}{K_A} - \frac{K_A K'_B}{[B] \cancel{K_A}} + 1 + \frac{K'_B}{[B]}\right) = \boxed{\frac{1}{V_{max}}\left(-\frac{K'_A}{A} + 1\right)}$$

$$-\frac{K'_B}{[B]} + \frac{K'_B}{[B]} = 0$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 - \frac{1}{r}\right) \quad \Delta$$

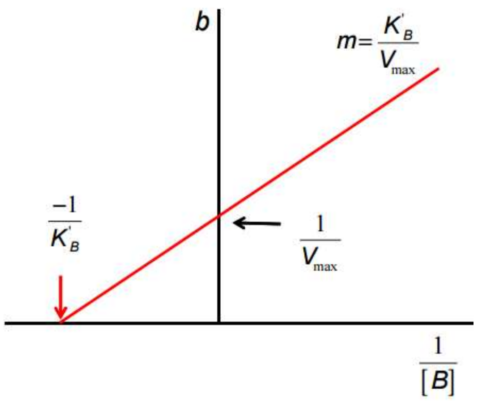
ERLAZIO FAKTOREA

ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN SEKUNDARIOA

Irudikapen primarioko lerro bakoitzak ([B]-ren kontzentrazio ezberdinetako bakoitzak osatutakoa) malda bat (m) eta ebaki-puntu bat (b) izango du. Irudikapen sekundario honetan malda [B]-ren kontzentrazioaren menpe eta ebaki-puntua [B]-ren kontzentrazioaren menpe ipintzen dugu. Hau egitearen arrazoia, honela irudikapen primarioan lortu ezin ditugun konstante katalitikoak lortu ditzakegula da.

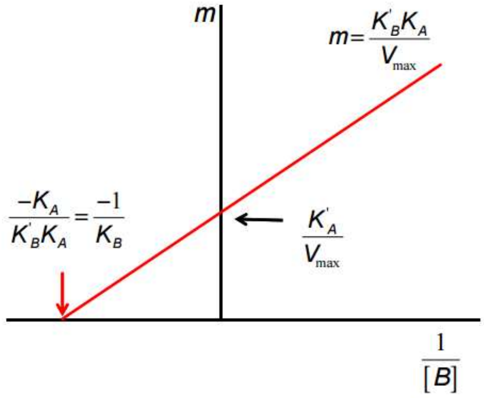
1) [B]-ren kontzentrazio konstanterako, b-ren balioa:

$$b = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K'_B}{[B]}\right) \quad = \underbrace{\frac{K'_B}{V_{max}}}_{m} \underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x} + \underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$



2) [B]-ren kontzentrazio konstanterako, m-ren balioa:

$$m = \frac{1}{V_{max}}\left(K'_A + \frac{K_A K'_B}{[B]}\right) = \underbrace{\frac{K_A K'_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x} + \underbrace{\frac{K'_A}{V_{max}}}_{b}$$



Honela mekanismo honen balio guztiak lortzen ditugu, irudikapen grafikoen malda eta ebaki-puntuei esker.

MENPEKOTASUNA, IRUDIKAPENA ZEIN KOADRANTEETAN MOZTEN DENAREN ARABERA:

-Bigarren koadrantean mozten bada, menpekotasun positiboa izango da, izan ere mozketa puntuaren ordenatua (1/v) positibo izango da.

$$\left.\begin{array}{l} \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 - \frac{1}{r}\right) \\ r > 1 \end{array}\right] \quad \begin{array}{l} K_A > K'_A \\ K_B > K'_B \end{array}$$

Eta hau honela bada, EAB-ren sorrera faboratzen dela esan nahi du.

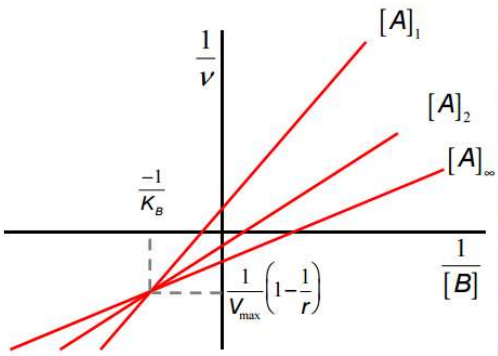
-Hirugarren koadrantean mozten badu, menpekotasun negatiboa izango da, mozketa puntuaren ordenatua (1/v) negatiboa izango baita.

$$\left.\begin{array}{l} \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 - \frac{1}{r}\right) \\ r < 1 \end{array}\right] \quad \begin{array}{l} K_A < K'_A \\ K_B < K'_B \end{array}$$

Eta beraz, EAB-ren sorrera eragotziko da, au da, menpekotasun negatiboa izango dute.

ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN PRIMARIOA [A] KONSTANTE MANTENTZEN DUGUNEAN.

Kasu honetan, ebaki puntuak modu beretsuan lortzen ditugu, baina kasu honetan [A]-ren kontzentrazioa izango da konstantea.



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(K'_B+\frac{K_AK'_B}{[A]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K'_A}{[A]}\right)}_{b}$$

Ebaki puntuak:

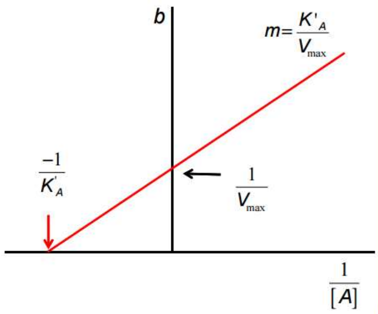
$$\frac{1}{[B]}=\frac{-1}{K_B}$$

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{max}}\left(1-\frac{1}{r}\right)$$

IRUDIKAPEN SEKUNDARIOA:

[B] konstantea zenean egin dugun modu beretsuan:

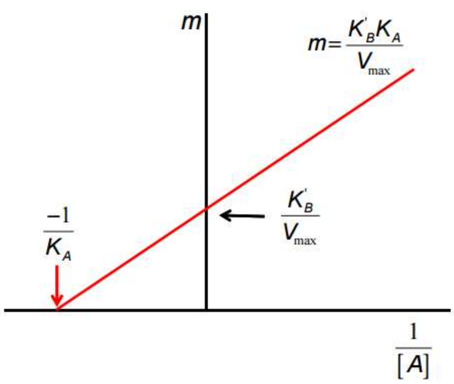
b vs 1/[A]



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{K'_A}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

m vs 1/[A]



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_AK'_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{K'_B}{V_{max}}}_{b}$$

1.1 ZORIZKO MEKANISMO SEKUENTZIALAK: ZENTRO INDEPENDIENTEAK

Kasu honetan, zentroen lotura erlazioa 1 da (r=1) eta beraz $K_A = K'_A$ eta $K_B = K'_B$ emango da. Hortaz, abiadura ekuazioa aterako dugu, ondorengo datuak kontuan hartuz:

-Zentroen arteko lotura erlazioa (r=1):

$$\boxed{\begin{matrix} K_A = K'_A \\ K_B = K'_B \end{matrix}}$$

-Orekako disoziazio kte.-ak:

$$\boxed{K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}} \qquad \boxed{K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}}$$

-Erreakzioaren abiadura:

$$\boxed{v = k[EAB]}$$

-Entzima totala:

$$\boxed{[E]_{TOT} = [E] + [EA] + [EB] + [EAB]}$$

$$[E]_{TOT} = [E] + [EA] + [EB] + [EAB]$$

$$[E]_{TOT} = [EAB] + \frac{[EAB]\,K_A'}{[A]} + \frac{[EAB]\cdot K_B}{[B]} + \frac{[EAB]\cdot K_A K_B}{[A][B]}$$

$$[E]_{TOT} = [EAB]\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right.$$

$$[EAB] = \frac{[E]_{TOT}}{\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right.}$$

$v = k \cdot [EAB]$

$V_{max} = k \cdot [E]_{TOTALA}$

$\cdot k$

$$v = \frac{V_{max}\ (k\cdot[E]_{TOT.})}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}$$

$(k\cdot[EAB])$

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{[A][B]}{[A][B]} + \frac{K_A\cdot[B]}{[A][B]} + \frac{K_B\cdot[A]}{[A][B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}} = \frac{V_{max}\ [A][B]}{[A][B] + K_A[B] + K_B[A] + K_A K_B}$$

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

Ekuazioa ikusiz bi substratuak modu independente batean jokatzen dutela ikus daiteke, izan ere bi monosubstratu elkartzen direla dirudi abiadura ekuazioan (bakoitzaren Michaelis Menten-en ekuazioa independenteki elkartuta).

Sistema honen limiteak aztertuko ditugu:

$$v=\frac{V_{\max}}{1+\frac{K_A}{[A]}+\frac{K_B}{[B]}+\frac{K_AK_B}{[A][B]}} \xrightarrow{x[A][B]} \boxed{v=\frac{V_{\max}[A]}{K_A+[A]}\frac{[B]}{K_B+[B]}}$$

1) [A]→ ∞ denean:

1) lim

$$\lim_{[A]\to\infty} v = \frac{V_{max}[B]}{[B]+\cancel{\frac{K_A[B]}{[A]}}+K_B+\cancel{\frac{K_AK_B}{[A]}}} = \frac{V_{max}[B]}{[B]+K_B}$$

2) [B] → ∞ denean:

2)

$$\lim_{[B]\to\infty} v = \frac{V_{max}[A]}{[A]+K_A}$$ (aurreko berdina)

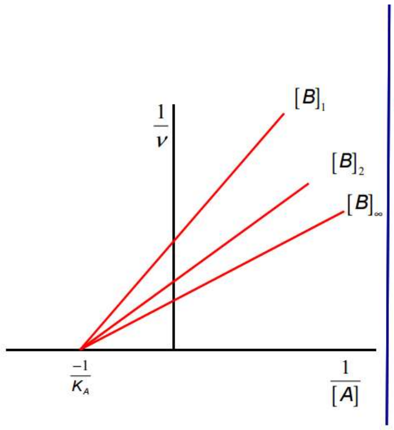
3) [A] eta [B] → ∞ direnean:

$$3)\ \lim_{[A]+[B]\to\infty} v = \frac{V_{max}}{1+\cancel{\frac{K_A}{[A]}}+\cancel{\frac{K_B}{[B]}}+\cancel{\frac{K_AK_B}{[A][B]}}} = V_{max}$$

Sistemak bi monosubstratu bezala jokatzen du, independenteki.

IRUDIKAPEN GRAFIKOAK: IRUDIKAPEN PRIMARIOA

1.- [B]-ren kontzentrazio konstanterako:



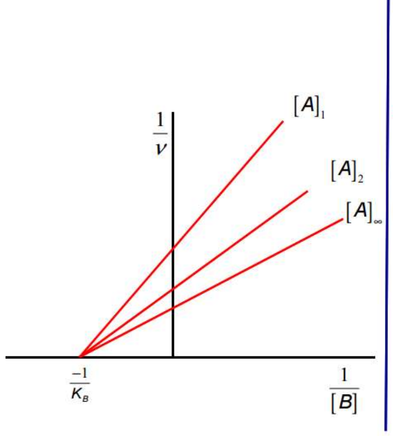
$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{1}{V_{\max}}\left(K_A+\frac{K_AK_B}{[B]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{\max}}\left(1+\frac{K_B}{[B]}\right)}_{b}$$

Ebaki puntuak:

$$\frac{1}{[A]}=\frac{-1}{K_A}$$
$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{\max}}\left(1-\frac{1}{r}\right)$$

Kasu honetan, lerroak x ardatzean ebakitzen dute elkar. Honek zentzu du, izan ere zentro independenteak dituztenez r=1 da eta beraz 1/v=0 izango zen.

2.- [A]-ren kontzentrazio konstanterako:



$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{1}{V_{\max}}\left(K_B+\frac{K_AK_B}{[A]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{\max}}\left(1+\frac{K_A}{[A]}\right)}_{b}$$

Ebaki puntuak:

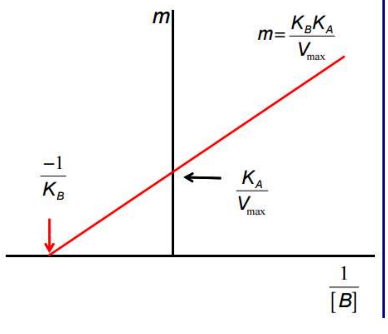
$$\frac{1}{[B]}=\frac{-1}{K_B}$$
$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{\max}}\left(1-\frac{1}{r}\right)$$

Lehengo gauza bera gertatzen da.

IRUDIKAPEN SEKUNDARIOAK.

Kasu honetan nahikoa da substratu bakar batekin egitea irudikapena, irudikapen primarioan biak egin behar baditugu ere. Kasu honetan [B] erabiliko dugu.

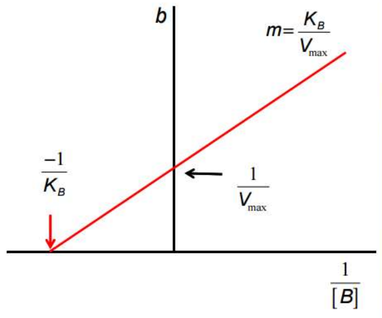
1.- m vs 1/[B]



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_AK_B}{V_{\max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{K_A}{V_{\max}}}_{b}$$

2.- b vs 1/[B]



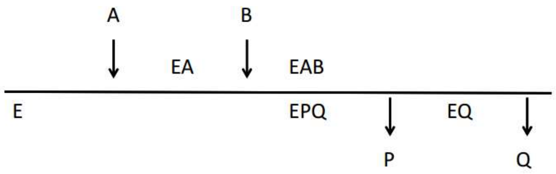
[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{K_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

1.2 <u>MEKANISMO SEKUENTZIAL ORDENATUA</u>

$$E \underset{K_A}{\overset{+A}{\rightleftharpoons}} EA \underset{K_B}{\overset{+B}{\rightleftharpoons}} EAB \longrightarrow E+P+Q$$

Ez da EB-rik sortuko, Koshlan-en teoria jarraituz, Aren baturak aldaketa konformazional bat eragingo du, beharrezkoa dena B lotzeko.
Cleland-en nomenklatura erabil dezakegu erreakzioa irudikatzeko. Bertan, lerro bat irudikatuko dugu ea entzimarekin hasiko gara. Ondoren substratuak non batzen diren aztertuko dugu eta gero produktuak non askatzen diren. Azkenik entzimarekin geratuko gara berriz.



Ondokoa kontuan hartuz abiadura ekuazioa lortuko dugu, aurretik egin dugun bezala bitartekari guztiak [EAB]-ren menpe jarriz ekuazio totalaren ekuazioan:

-Orekako disoziazio kte.-ak:

$$\boxed{K_A=\frac{[E][A]}{[EA]}} \qquad \boxed{K_B=\frac{[EA][B]}{[EAB]}}$$

-Erreakzioaren abiadura:

$$\boxed{v=k[EAB]}$$

-Entzima totala:

$$\boxed{[E]_{TOT}=[E]+[EA]+[EAB]}$$

Beraz,

$$[E]_{TOT} = [EAB]\left(1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right)$$

$$[EAB] = \frac{[E]_{TOT}}{\left(1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right)}$$

-2 ekuazioaren bi aldeak k-rengaitik bidertuz:

$$\overbrace{k[EAB]}^{v} = \frac{\overbrace{k[E]_{TOT}}^{V_{max}}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}$$

-Beraz:

$$\boxed{v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}}$$

Sistema honen limiteak kalkulatuko ditugu:

$$\boxed{v = \frac{V_{\max}[A][B]}{[A][B] + K_B[A] + K_A K_B}}$$

1) [A]→ ∞ denean:

$$\lim_{[A]\to\infty} v = \frac{V_{max}[B]}{[B] + k_B + \cancel{\frac{k_A k_B}{[A]}}} = \frac{V_{max}[B]}{[B] + k_B}$$

[A] saturatzailea denean dena [EA] moduan egongo da, eta beraz [B]-ren baitan egongo da, [B] substratuaren zinetikaren itxura hartuz.

2) [B] → ∞ denean:

$[B] \to \infty$

$$\lim_{[B]\to\infty} v = \frac{V_{max}[A]}{[A] + \underbrace{\cancel{\frac{k_B[A]}{[B]}}}_{0} + \cancel{\frac{k_A k_B}{[B]}}} = V_{max}$$

B] saturatzailea dugunean erreakzioa bultzatzen du, V_{max} lortuz.

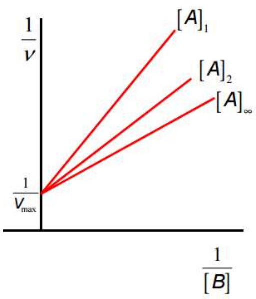
3) [A] eta [B] → ∞ direnean:

$$\lim_{[A]+[B]\to\infty} v = \frac{V_{max}}{1+\underbrace{\cancel{\frac{K_B}{[B]}}}_{0}+\underbrace{\cancel{\frac{K_A K_B}{[A][B]}}}_{0}} = V_{max}$$

ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN PRIMARIOA

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_B}{[B]}+\frac{K_A K_B}{[A][B]}\right)$$

1.-[A]- ktea mantenduz.



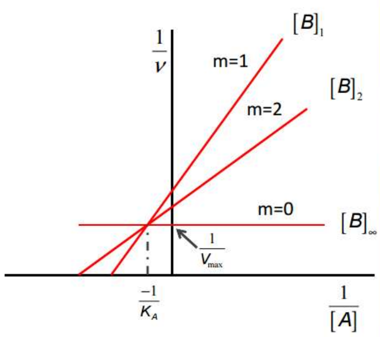
$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{K_B}{V_{max}}\left(1+\frac{K_A}{[A]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

Beti egin behar dira bi alderantzizko bikoitzak!!!

Lerroak 1/[B] = 0 denean elkartuko dira, hau da y ardatzean. Puntu horretan $1/V_{max}$ izango da y (b).

2.-[B]- ktea mantenduz.

1. Substratoa

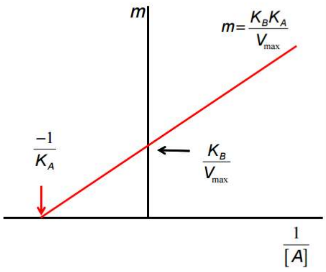


[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\left(\frac{K_A K_B}{V_{max}[B]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_B}{[B]}\right)}_{b}$$

Bigarren substratuaren kontzentrazioa → ∞-ra doanean → zuzenaren m=0 izango da.

[B]-ren kontzentrazioa saturatzailea denean m=0 izango da eta b= $1/V_{max}$.



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

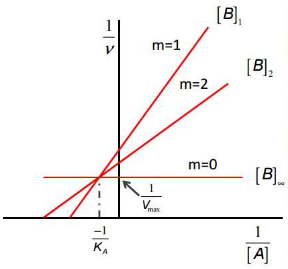
$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_A K_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{K_B}{V_{max}}}_{b}$$

Ez da b vs. 1/[A] egin behar➔ irudikapen primarioan zuzen guztiek "y" ardatza gune berean ebakitzen dutenez ez daude "b" balio desberdinak.

IRUDIKAPEN SEKUNDARIOA:

1. [A] ktea. m vs 1/[A]

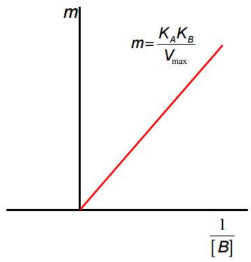
1. Substratoa



$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\left(\frac{K_A K_B}{V_{max}[B]}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_B}{[B]}\right)}_{b}$$

Bigarren substratuaren kontzentrazioa ➔ ∞-ra doanean ➔ zuzenaren m=0 izango da.

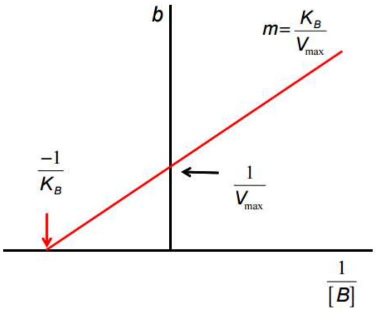
2. [B] ktea. m vs 1/[B]



$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_A K_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}$$

b=0

3. [B] ktea. b vs 1/[B]



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{K_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

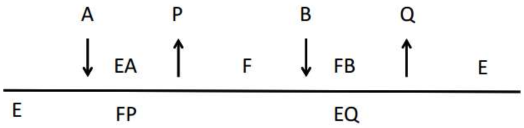
2.1 PING-PONG MEKANISMOA:

$$E+A \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} (EA \rightleftharpoons FP) \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} F+B \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} (FB \rightleftharpoons EQ) \underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} E+Q$$

Lehen produktuarekin E-ren forma egonkorra

Bigarren produktuarekin E-ren forma egonkorra

Entzimak bi forma egonkorren artean oszilatzen du, A substratua lotzean formaz aldatzen da, F forma egonkorrera eta lehen P produktua askatzen du. Bigarren substratua B lotzean, berriz E forma egonkorrera itzultzen da eta azkenik Q produktua askatzen du, hasierako egoerara (E) itzuliz.



Erreakzioa Cleland-en nomenklaturaren bidez adierazita.

Hau hobe ulertzeko adibide erreal bat erabiliko dugu, Hexokinasarena (HK):

$$E+A \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} (EA \rightleftharpoons FP) \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} F+B \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} (FB \rightleftharpoons EQ) \underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} E+Q$$

➔ Mekanismo hau transferasetan: Adb. Hexokinasa (HK)

$$\text{Glukosa+ATP-Mg}^{+2} \rightleftharpoons \text{Glukosa-6P+ADP-Mg}^{+2}$$

$$\text{ENZ:HK} \rightleftharpoons \text{F:HK•P}$$

A=ATP-Mg^{+2}
B=Glukosa
EA=HK•ATP-Mg^{+2}
P=ADP-Mg^{+2}
Q=Glukosa-6P
FP=HK•P:ADP-Mg^{+2}
FB=HK•P:Glukosa
EQ=HQ•Glukosa-6P

Lehenik ATP-aren P-a entzimari lotzen zaio, HK-P forma egonkorra lortuz. Ondoren ADP-Mg askatu eta glukosa (B) lotzen da. Azkenik fosfatoa glukosari transferitu eta Glukosa-6P (Q) askatzen da, HK hasierako egoerara itzuliz.

Kasu honetan, abiadura ekuazioa lortzeko ezin dugu orain arte erabili dugun oreka azkarraren hurbilketa egin eta ekuazioa lortzeko mekanismoa konplikatuegia denez jarraian ekuazioa ematen digu:

$$\boxed{v=\frac{V_{\max}}{1+\frac{K_A}{[A]}+\frac{K_B}{[B]}}}$$

Limiteak kalkulatzeko:

$$\boxed{v=\frac{V_{\max}[A][B]}{[A][B]+K_A[B]+K_B[A]}}$$

1) [A] → ∞ denean:

$$v=\frac{V_{\max}[B]}{[B]+K_B}$$

2) [B] → ∞ denean:

$$v=\frac{V_{\max}[A]}{K_A+[A]}$$

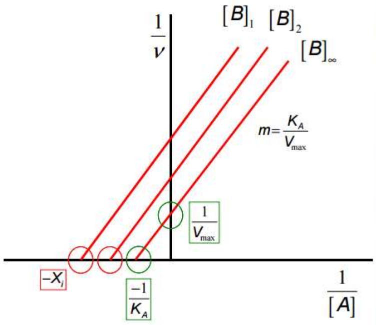
Bi kasu haeutan, substratu bat asea denean besteak monosubstratu moduan jokatzen du.

3) [A] eta [B] → ∞ direnean:

$$v=V_{\max}$$

IRUDIKAPEN GRAFIKOA: ALDERANTZIZKO BIKOITZA, IRUDIKAPEN PRIMARIOA

1.- [B]ren kontzentrazio ktea:



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

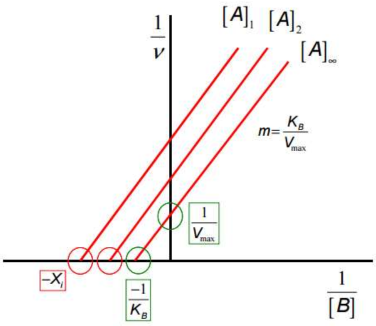
$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\left(\frac{K_A}{V_{max}}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_B}{[B]}\right)}_{b}$$

Ez dakigunez [B] saturatzailea den ➔ irudikapen sekundarioak.

Kasu honetan lerroak ez dira elkartzen, izan ere, denek malda berdina dute (K_A/ V_{max}).

B-ren kontzentrazioa saturatzailea denean y ardatzean ebaki puntua $1/V_{max}$ da. Esperimentalki, ordea oso zaila da kalkulatzea saturazio puntura iritsi garen ala ez, hori dela eta irudikapen sekundarioak erabiliko ditugu.

2.- [A]ren kontzentrazio ktea:

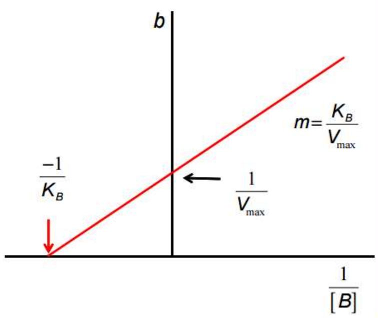


$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\left(\frac{K_B}{V_{max}}\right)}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_A}{[A]}\right)}_{b}$$

Ez dakigunez [A] saturatzailea den ➔ irudikapen sekundarioak.

IRUDIKAPEN SEKUNDARIOA:

1.- b vs 1/[B]



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{K_B}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

2.- Xi vs 1/[B]

Kasu honetan irudikapen sekundarioa egiterako orduan ezin dugu malda erabili, lerro guztiek malda bera baitute. Ondorioz X ardatza ebakitzen duten puntuak erabiliko ditugu (Xi). Ebaki puntu hau ateratzeko ekuazioan y=o denean 1/[A] ren balioa aterako dugu. Puntu honi Xi deituko diogu:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

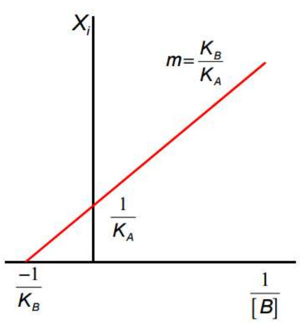
$$\frac{1}{V} = \frac{K_A}{V_{max}} \cdot \underbrace{\frac{1}{[A]}}_{\to -X_1 \text{ (y=0 denean puntua)}} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$0 = \frac{K_A}{V_{max}} \cdot -X_1 + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$X_1 \cdot \frac{K_A}{\cancel{V_{max}}} = \frac{1}{\cancel{V_{max}}}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$X_1 = \frac{1}{K_A} + \frac{K_B}{[B]\,K_A}$$

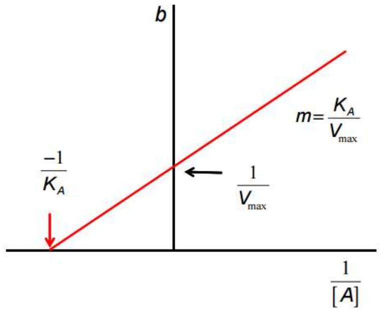
Honela, badakigu Xi-ren balio bakoitza 1/[B] ren balio bakoitzerako, eta beraz:



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$\underbrace{X_i}_{y} = \underbrace{\frac{K_B}{K_A}}_{m} \underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x} + \underbrace{\frac{1}{K_A}}_{b}$$

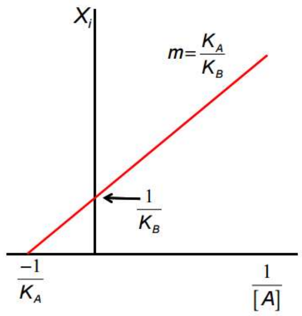
3.- b vs 1/[A]:



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{K_A}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{b}$$

4.- Xi vs 1/[A]:



$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_A}{[A]}+\frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$\underbrace{X_i}_{y}=\underbrace{\frac{K_A}{K_B}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{K_B}}_{b}$$

2.2 <u>THEORELL-CHANCE MEKANISMOA:</u>

Bisubstratu erreakzio bat da, baina kasu honetan, EAB-tik EAP-rako bizi denbora arbuiagarria da. Honen ondorioz ez dira kontuan hartuko EB eta EAB, ez dira sortuko.

$$E+A \underset{K_A}{\rightleftharpoons} EA$$

$$EA+B \overset{k}{\rightleftharpoons} E+P+Q$$

-Orekako disoziazio kte.-ak:

$$\boxed{K_A=\frac{[E][A]}{[EA]}}$$

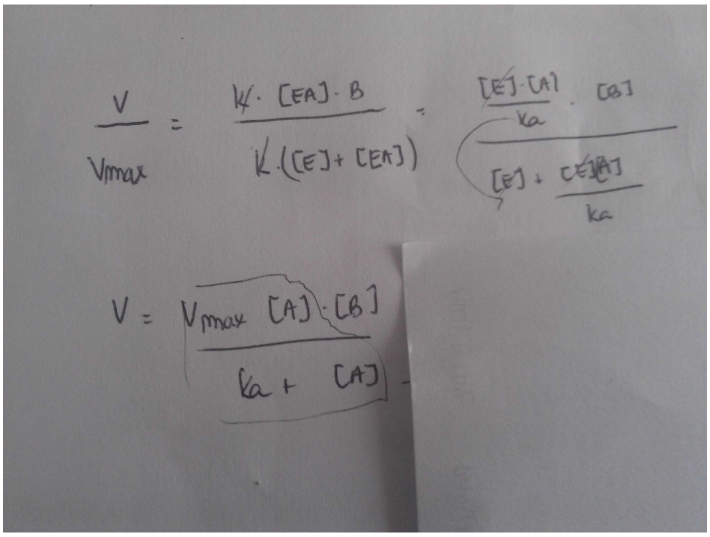
-Erreakzioaren abiadura:

$$\boxed{v=k[EA][B]}$$

-Entzima totala:

$$\boxed{[E]_{TOT}=[E]+[EA]}$$

Ondorengoa kontuan hartuz, abiadura ekuazioa aterako dugu, bitartekarial [E]-ren baitan jarriz:

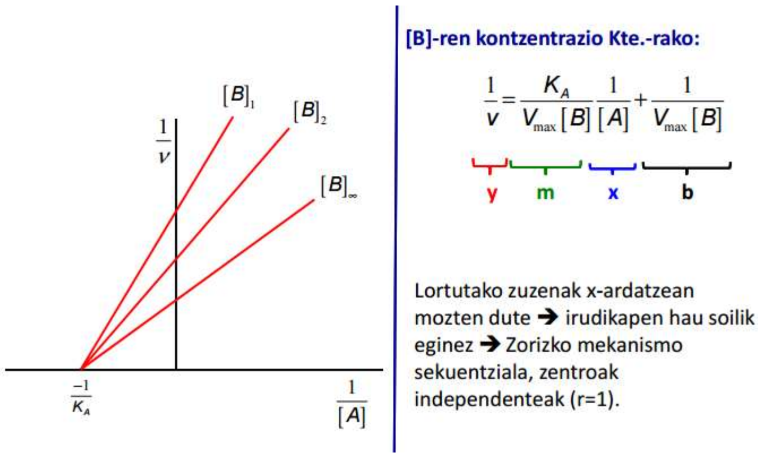


Abiadura ekuazioa, [A] monosubstratuaren abiadura ekuazioaren itxura dauka baina [B]-z biderkatua (nahiz eta bizi denbora laburra izan eta bitartekaririk ez eman, abiadura ekuazioan eragina du).

$$\boxed{v = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_A + [A]}}$$

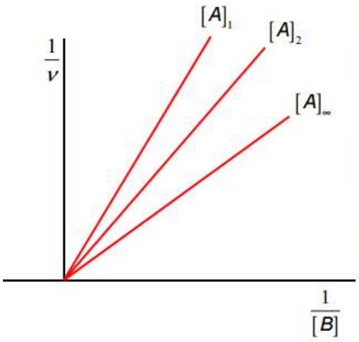
ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN PRIMARIOA.

1.- [B]-ren kontzentrazio konstanterako:



Irudikapen honekin bakarrik, zorizko mekanismo sekuentziala dela pentsa dezakegu, zentro independentekoak, zuzenek x ardatzean ebakitzen baitute elkar. Horregatik bigarren irudikapena egin behar dugu.

2.- [A]-ren kontzentrazio konstanterako:



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

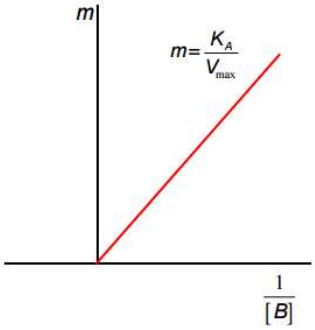
$$\underbrace{\frac{1}{v}}_{y}=\underbrace{\frac{K_A+[A]}{V_{max}[A]}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}$$

Irudikapen honekin Theorell-Chance dela dakigu➔ parametro zinetikoak lortzeko beste irudikapenak egin behar dira.

b=0 da, eta beraz (0,0) puntuan dute ebaki puntua.

ALDERANTZIZKO BIKOITZA: IRUDIKAPEN SEKUNDARIOA.

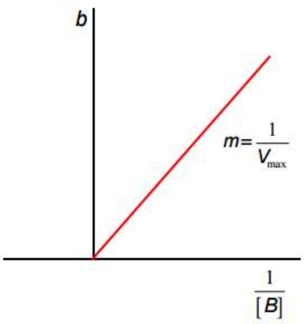
1.- m vs 1/[B]



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_A}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}$$

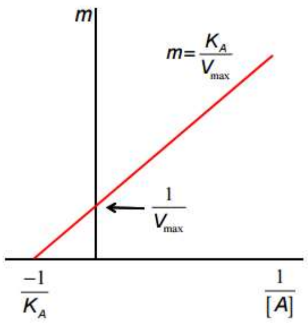
2.- b vs 1/[B]



[B]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{b}_{y}=\underbrace{\frac{1}{V_{max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[B]}}_{x}$$

3.- m vs 1/[A]



[A]-ren kontzentrazio Kte.-rako:

$$\underbrace{m}_{y}=\underbrace{\frac{K_A}{V_{\max}}}_{m}\underbrace{\frac{1}{[A]}}_{x}+\underbrace{\frac{1}{V_{\max}}}_{b}$$