

Reacciones multisustrato

Hay muchas enzimas de este tipo en la célula ($1S \rightarrow 2P$; $2S \rightarrow 1P$; $2S \rightarrow 2P$; $3S$). Hay que tener en cuenta que los coenzimas se contabilizan como sustratos, así veremos análisis de reacciones con NAD, por ejemplo.

Reacciones bisustrato

Dentro de todas estas, nosotros analizaremos de forma cinética las reacciones bisustrato. Principalmente trataremos de los mecanismos de reacción con la terminología de Cleland. El estudio cinético de estos modelos es sencillo si las enzimas se ajustan a una cinética micaliana. Podemos determinar este comportamiento mediante un estudio de velocidad análogo a los realizados anteriormente, salvo que ahora, al tener varios sustratos, hacemos que varíe uno de ellos, dejando el resto constante y saturante. La velocidad entonces se hace independiente de la concentración de los demás sustratos, dándonos si es el caso, una cinética hiperbólica.

Hay varios modelos, pero estudiaremos estos dos, los mayoritarios.

- **Mecanismo ping-pong**, o de desplazamiento doble. Consiste en la formación de dos complejos binarios, presentando la característica de no requerir que primero entren los sustratos y luego los productos. Se trata, por tanto, de la entrada de uno de los sustratos, quedándose la enzima con alguna parte del sustrato, saliendo el resto como un primer producto. Una vez tengamos E' , se une el segundo sustrato, que recibe esa parte que tomó la enzima, resultando un segundo producto. Hay que tener en cuenta que ese algo que se lleva la enzima para luego pasárselo al segundo sustrato puede ser desde un grupo funcional relativamente grande, hasta un electrón, como ya veremos.
- **Mecanismo secuencial**, o de desplazamiento simple. Se caracteriza por la formación de un complejo ternario y dos binarios, además, de por la entrada de los dos sustratos primero y la salida a continuación de los dos productos. Así como en el modelo anterior no es difícil encontrar un orden, ya que aquel sustrato que posea el grupo a transferir deberá ser el primero, en este caso se complica bastante. De hecho, existen dos tipos. El modelo secuencial ordenado, en el que siempre los sustratos y los productos presentarán un mismo orden de entrada y salida y uno al azar, en el cual podrán entrar y salir los sustratos y productos de forma aleatoria, pudiendo la enzima escoger el camino deseado para escoger sustrato independientemente de la salida que tendrán los productos, que también será aleatoria. En definitiva, podrá elegir el mecanismo de acción.

Estos tres modelos son los mayoritarios y los que estudiaremos.

Cinética de las reacciones bisustrato

Antes de presentar la ecuación de Alberty, que cumplen todos los modelos, hay que hacer hincapié en la cinética micaliana de estas reacciones. Como ya hemos dicho, si hacemos un sustrato variable manteniendo el otro constante y saturante, obtendremos una hipérbola rectangular correspondiente al modelo M&M (siempre que tratemos con una enzima micaliana, si es alostérica evidentemente no nos dará esta representación). En esa curva o mediante linearizaciones podremos determinar las constantes V_{max} y K_m , pero estas serán aparentes si la concentración del sustrato constante no es saturante. Esto es lógico, ya que entonces la velocidad máxima no podrá alcanzarse al no estar ocupada toda la enzima con el sustrato (complejo que consideraríamos E_a).

Teniendo esto claro, veamos ahora la ecuación general de Alberty.

$$V = \frac{V_{max} [A][B]}{K_m^B [A] + K_m^A [B] + [A][B] + (K_s^A K_m^B)}$$

Como dato, decir que el término entre paréntesis del denominador, no aparece en el mecanismo Ping"Pong. Esto nos permitirá en el futuro discriminar un tipo del otro. En esta ecuación aparecen términos, que aunque se entiende de forma conceptual, es conveniente que los describamos:

- **K_mA**: Se trata de la constante de Michaelis para el sustrato A cuando mantenemos constante y saturante [B].
- **K_mB**: Se trata de la constante de Michaelis para el sustrato B cuando mantenemos constante y saturante [A].
- **K_sA**: Se trata de la constante de disociación del primer complejo binario EA, el cual obtenemos en el modelo secuencial ordenado).
- **K_sB**: Se trata de la constante de disociación del complejo primario EB, el cual obtenemos en el modelo secuencial al azar. En el modelo ordenado no tiene ningún sentido describirlo, sólo nos servirá como medio para determinar el orden, aunque habrá otros. Como nota, hay que apuntar que en el mecanismo secuencial al azar se cumple la siguiente relación: **K_sA · K_mB = K_sB · K_mA**. Por tanto, podríamos sustituir un producto por el otro en la ecuación general de Albery, evidentemente, sólo en los casos correspondientes a un modelo secuencial al azar.
- **V_{max}**: Será igual determinada con A o con B variable, siempre y cuando, el otro esté en condiciones constantes y saturantes.

Para asegurar esta representación hiperbólica a [B] constante, realizamos la transformación de la ecuación general de Albery, al igual que lo habíamos hecho en otras ocasiones. El resultado nos muestra claramente la dependencia de V_{max} de la concentración de sustrato al igual que K_mA. Estas constantes corresponderían a las obtenidas cuando el sustrato constante no llega a la saturación. Si hacemos [B] constante y saturante:

- K_mB del denominador (para V_{max}) se hace despreciable frente a [B], de modo, que podemos eliminarla.

El resultado, $\lim_{[B] \rightarrow Sat} V_{max} = V_{max}$

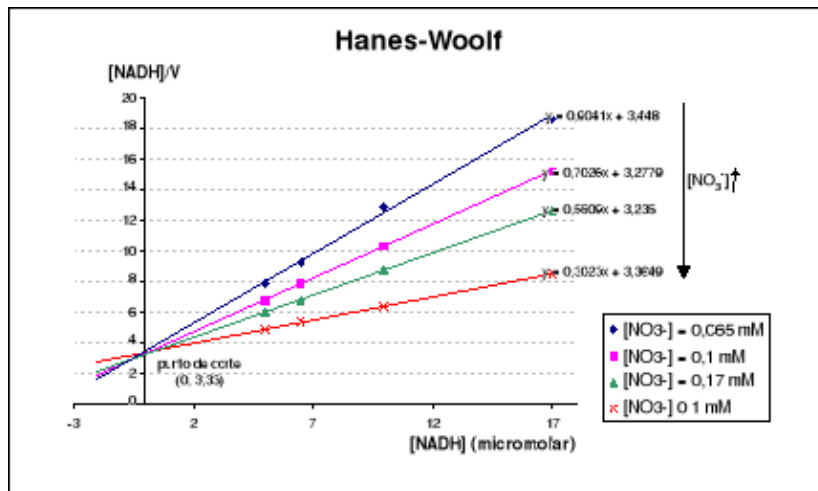
- El producto K_sA · K_mB (para K_mA) y K_mA del numerador y K_mA del denominador se hacen despreciables frente a [B], pudiendo eliminar esta concentración. El resultado, $\lim_{[B] \rightarrow Sat} K_m^A = K_m^A$

Discriminación entre Ping"Pong y secuencial. Determinación de los parámetros cinéticos

Como ya hemos visto en la inhibición, mejor que en la representación hiperbólica, utilizamos las linealizaciones para estos menesteres. Al igual que durante toda la asignatura, utilizaremos la representación de Hanes" Woolf.

Ping"Pong

Recordemos que en este modelo, no aparece en el divisor el producto (K_sA · K_mB) con lo que la linealización sería la siguiente para el ejercicio 5 de la hoja 2, donde [NADH] = [A] y [NO₃"] = [B].



$$\frac{[NADH]}{V} = \frac{K_m^{[NO_3^-]}}{V_{max}} \frac{1}{[NO_3^-]} + \frac{1}{V_{max}} \left[\frac{[NADH]}{K_m^{[NADH]}} + \frac{K_m^{[NADH]}}{V_{max}} \right]$$

Se observa como **la ordenada en el origen no es dependiente de [B], y por eso las rectas tomadas a diferentes valores constantes de NO₃⁻ se cortan en el eje Y**. Se asemeja, por tanto, al patrón de inhibición acompetitiva, pero no tiene absolutamente nada que ver, ya que en este caso, y como marcan las flechas, la pendiente decrece al aumentar la [B].

Sobre esta gráfica, si que es preceptivo el determinar las constantes cinéticas, algo que no podremos hacer directamente al carecer de datos. Si nos fijamos en la pendiente y en la ordenada en el origen, ambas dependen de V_{max}, dato que no tenemos y que habrá que calcular mediante las representaciones secundarias.

En este caso, ya que no nos interesa el corte en X, representaremos la otra variación que observamos, la de la pendiente, y la representamos frente a la inversa del sustrato que la hace variar, [B]. Siguiendo con el ejercicio 5, el resultado sería el siguiente.

Gracias a la ecuación de la recta podemos determinar:

- V_{max}: Por la ordenada en el origen, 1/V_{max}.
- K_{mB}: Por el corte en X, "1/ K_{mB}".

Todo esto, sobre todo V_{max}, nos permitirá calcular el valor de K_{mA} por la ordenada en el origen de la representación primaria, K_{mA}/V_{max}.

Y con esto, ya tendríamos todas las constantes. También se explica este procedimiento en el propio ejercicio 5 de la hoja 2.

Además de la enzima del ejercicio, también presenta este modelo cinético la "cetoacil"CoA"transferasa, que pasa CoA del succinil"CoA al acetato, dando como productos ácido succínico y acetoacetil"CoA. Evidentemente, como ya dijimos, este modelo no deja muchas dudas acerca del orden, ya que la molécula que porta el grupo a transferir debe ser la primera en entrar dejándose a la enzima, que pasará a ser E' al soltar el primer producto. Después E' pasará a recoger el segundo sustrato, aquel que tiene recibir en grupo.

Secuencial

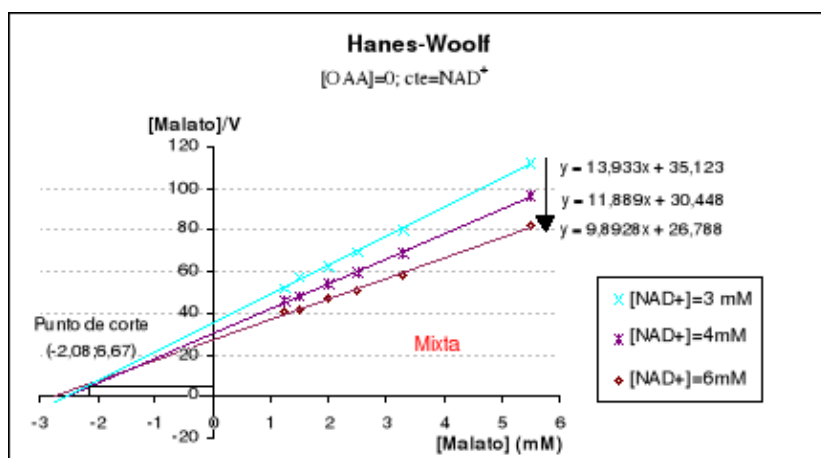
Si para distinguir el modelo Ping"Pong, decíamos que linearizábamos la ecuación general de Alberty, es

evidente que debemos hacer lo mismo en este caso. La gran diferencia que podemos visualizar mediante la representación, es la ordenada en el origen, que varía al ser dependiente de la concentración de cosustrato constante. Esto es debido a la aparición del producto ($K_{sA} \cdot K_{mB}$) en la ecuación general. Para poner un ejemplo, escogemos el ejercicio 6 de la hoja 2, donde $[Malato] = [A]$ y $[NAD^+] = [B]$.

$$\frac{[Malato]}{V} = [Malato] \left[\frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m^{NAD^+}}{V_{max} [NAD^+]} + \frac{K_m^{Malato}}{V_{max}} + \frac{K_s^{Malato} K_m^{NAD^+}}{V_{max} [NAD^+]} \right]$$

El término entre paréntesis será entonces la pendiente de la recta, mientras la ordenada en el origen incluye los dos últimos sumandos, que incorporan, como ya hemos dicho $[B]$.

La representación será, al igual que en el caso anterior, $[A]/V$ Vs $[A]$. Al depender la ordenada en el origen de $[B]$ su valor se modificará en cada recta, como se observa en la gráfica. **Esto será, por tanto, lo que utilizaremos para diferenciar el modelo secuencial, el hecho de modificarse las pendiente y las ordenadas en el origen en función de la concentración de cosustrato.**



Al igual que sucedía en el modelo Ping"Pong, la complejidad de la pendiente y de la ordenada en el origen, hace que no podamos calcular ninguna constante en esta representación, si exceptuamos K_{sA} . Esta constante se determina mediante el valor de x en el punto de corte de las rectas. Para conseguir estos valores debemos recurrir, por tanto, a la representación secundaria. En este caso tenemos dos parámetros que varían con respecto a $[B]$, la pendiente y la ordenada en el origen, siendo necesaria la representación de ambas rectas para determinar todos los parámetros. Esto es así ya que no obtenemos un valor limpio para V_{max} hasta la representación de las pendientes.

La determinación de las constantes, para el mecanismo secuencial, se resume en la siguiente tabla.

V_{max}	En la representación secundaria pendiente (1ria) Vs $1/[B]$. Por el corte de la recta con el eje Y. Otras muchas formas, pero en este caso es un cálculo directo, necesario para calcular las demás constantes.
K_{mA}	En la representación secundaria ordenada (1ria) Vs $1/[B]$. Por el corte de la recta con el eje Y. Mediante el valor de la y del punto de corte de las rectas a distintas concentraciones de B en la representación primaria
K_{sA}	En la representación primaria $[A] V$ Vs $[A]$. Valor de la x del punto de corte de las rectas a distintas concentraciones de B. Por la pendiente de la representación secundaria ordenada (1ria) Vs $1/[B]$.
K_{mB}	Pendiente de la representación 1ria, de la secundaria ordenada (1ria) Vs $1/[B]$ y secundaria pendiente (1ria) Vs $1/[B]$, además de corte con el eje X de la representación secundaria pendiente (1ria) Vs $1/[B]$.

Discriminación entre ordenado y al azar

Ya sabemos entonces que la representación [sustrato variable]/V Vs [sustrato variable] nos sirve para distinguir entre el modelo Ping"Pong y secuencial, pero dentro de este último hay dos posibles forma de organización, el modelo secuencial ordenado y al azar.

Una forma de discriminar ente uno y otro es la inhibición, es decir, el tipo de inhibición reversible que produce un producto de la reacción, manteniendo un sustrato variable y el otro constante. Estas variaciones son dependientes del orden. Esto nos permite formar un patrón de inhibición, el cual se representa en la tabla de las hojas. La más característica es, sin duda la del secuencial al azar, que presenta todas las variantes como competitiva. Esto es fácil de explicar, ya que si los dos sustratos y los dos productos no tienen una disposición de entrada y salida fija, querrá decir que P y Q podrán salir y unirse a la enzima aleatoriamente, o lo que es lo mismo, que ambos serán complementarios del C.A. Esto mismo sucederá con los sustratos. Nos encontramos entonces que tanto A como Q como P serán competidores por el C.A. manteniendo constante B al igual que B como P como Q manteniendo constante A. Sin embargo, no habrá inhibición si B está en condiciones saturantes, ya que la reacción se verá desplazada hacia la formación de productos

Esto es diferente para el mecanismo secuencial ordenado, que necesita de un orden definido, por lo que ya, en un principio no competirán A y B ni P y Q. Si competirán, sin embargo, el primer sustrato con el último producto, ya que ambos podrán unirse a al enzima libre. El patrón de inhibición variando el par A"Q será, por tanto, competitivo, mientras que con otros pares será mixta. El porqué de este patrón de inhibición mixta no es tan fácil de explicar. En el caso de variar el par A"P, la inhibición se produciría al potenciarse la captura de P por la enzima para dar B, por eso, si se añade B a concentración saturante, se obtiene un patrón incompetitivo, porque la enzima se vería bloqueada en los pasos centrales, sin dar opción a formarse el producto. En el caso de variar el par B"Q, el efecto es el mismo, ya que Q competirá con A (efecto competitivo) mientras que B a concentraciones bajas de A provocaría un orden erróneo de entrada en el C.A., algo que ya explicamos en el tema de inhibición, por esto, si añadimos A saturante, la competencia con Q quedaría a su favor y no habría entrada errónea, con lo que no hay inhibición. La prueba con el par B"P es evidente, el añadir el producto intermedio hace que la reacción avance hacia el sustrato, y aún añadiendo A a concentraciones saturantes, es efecto sería el mismo.

Las diferencias de patrones son, por tanto, evidentes, pero normalmente no hace falta realizar todos los ensayos, ya que con encontrarnos uno de ellos mixto, ya sabríamos que corresponde a un mecanismo secuencial ordenado.

Las premisas que aparecen al principio de la tabla son importantes, ya que indican el procedimiento a seguir. Para ilustrar esto, volvemos al ejercicio 6 de la hoja 2, cuyo patrón de inhibición del par Malato"OAA, (independientemente de a quien llamemos A, B, P o Q) nos dio la siguiente gráfica.

Hay que recordar que los diferentes tipos de nhibición reversible se diferenciaban de forma visible en las linearizaciones, como esta de H"W, en la cual se inhibe a diferentes concentraciones. Las diferencias en la pendiente, la ordenada en el origen o ambas nos mostrarán el tipo de inhibición. En el ejemplo hemos inhibido con OAA manteniendo constante el cosustrato NAD+. Es importante no adjudicar a nadie las letras, ya que imaginémonos que llamamos al malato A y al OAA Q, entonces no nos encajaría en patrón mixto en ningún modelo, y aunque en este caso, nos diría de forma evidente que el malato no entra primero, o que el OAA no es el último en salir, también podría llevarnos a un error muy grave. Es, por tanto, importante el mantener el orden a un lado, y hacer únicamente referencia a los nombres reales de los sustratos.

Volviendo al ejemplo, el patrón mixto, sabiendo por el apartado anterior que es secuencial nos muestra de forma inequívoca, independientemente del orden, que se trata de un proceso ordenado, al no presentar el modelo al azar inhibición mixta.

Orden de entrada y salida: Intercambio isotópico en el equilibrio

Una vez sabido si es Ping"Pong o secuencial ordenado (es una estupidez intentar determinar el orden del modelo al azar ¿no creéis?), hay que intentar encontrar el orden. Ya dijimos que en el modelo Ping"Pong era más fácil pero, aún así, hay veces en los que es necesario un estudio más.

Par determinar el orden cuando no es tan sencillo (en ambos modelos) nació la prueba llamada **intercambio isotópico en el equilibrio**. Esta prueba consiste en dejar que la reacción llegue al equilibrio. Una vez en ese estado, donde la velocidad neta es 0, se añade una marca radiactiva y un par, (producto"sustrato) a unas concentraciones que no alteren el equilibrio, es decir, que si la razón en el equilibrio entre dos especies es 1:10, habrá que añadir el par en esa razón. En cuanto al sustrato caliente, debe encontrarse en una concentración tan ínfima que no altere de forma susceptible el equilibrio. De esa forma. La velocidad neta seguirá siendo 0, pero habrá algo que podemos medir, la velocidad de intercambio isotópico (ej. AQ; velocidad de intercambio isotópico= $\frac{d[Q]}{dt}$)

). Ya que se ha añadido sólo una especie marcada (siempre uno de los sustratos), esa molécula se transformará a su producto correspondiente a una velocidad que dependerá de las concentraciones. Esta dependencia de las concentraciones deriva de las propias ecuaciones cinéticas ($v = K[A][B]$ Vs $v = K[P][Q]$)

). De forma conceptual, es fácil de entender que [Q] aumentaría ya que:

- Hay velocidad de formación de Q, con lo que parte de la marca en A se transformaría.
- Hay velocidad de desintegración de Q, pero estas que se desintegrarían a t=0 (momento en el que se añade la marca y el par) no estarían marcadas, por lo tanto, la velocidad irá aumentando.
- El aumento en la velocidad no es muy rápido, por el secuestro de la enzima (inhibición competitiva con este par, tanto en ordenado como en el azar).
- Se llega a la saturación, ya que habrá un momento en el que la marca llegue a su equilibrio (no químico, pero sí probabilístico) con lo que la concentración y la velocidad de formación se detendrán, como se observa en las hojas.
- Si añadimos más concentración del par, el equilibrio se mantendrá, pero las concentraciones de ese par aumentarán. Esta es la razón del aumento de pendiente que se observa en la gráfica [Q] Vs t, o lo que es lo mismo, la velocidad neta será 0, pero hemos dicho que las velocidades de formación y desintegración son directamente proporcionales a las concentraciones, de modo, que un aumento de las mismas hará aumentar también a las velocidades, lo que se traducirá en una velocidad de intercambio también mayor.

Esto se observa mejor en la gráfica de velocidad de aparición del producto radiactivo con respecto del par. También se ve que el aumento llega a un estacionario, debido a la limitación en la cantidad de enzima, que estará completamente saturada no pudiéndose aumentar la velocidad.

Hay varios ensayos, todos coinciden en el marcaje de un sustrato, no de los productos, con un patrón de par, o el suyo, o el contrario. Todos ellos darán un patrón saturante como el de la gráfica, exceptuando uno. Esta diferencia se dará en el modelo secuencial ordenado, cuando ensayemos $\frac{d[Q]}{dt}$

frente al par B"P. En este caso, se observará un aumento en la velocidad de formación del producto radiactivo al aumentar el par, pero a diferencia de los demás ensayos, llegará un punto en la que la velocidad descenderá, no se mantendrá.

La gráfica será, por tanto, como la que se expone en el ejercicio 6 de la página 2. Esto nos indicaría de forma clara que el par con el que estamos trabajando (el contrario del que tiene la marca) es el central, y por eso, un exceso en su concentración haría que la enzima quedará secuestrada en los pasos centrales. Al disminuir los equilibrios que nos dan la enzima libre, el poco primer sustrato marcado que pueda unirse a ella, quedará atrapado en esos pasos centrales, disminuyéndose la velocidad de intercambio. El par A"Q en este caso actuarían como limitantes, y habría que aumentar también su concentración si queremos que aumente la velocidad de intercambio. El modelo de Cleland, siguiendo con el ejercicio 6 será el siguiente:

En definitiva, esta prueba nos permite obtener el orden de sustratos y productos, en el caso de obtener un efecto de descenso de la velocidad de intercambio al trabajar con el par contrario de la marca añadida.

Puede que no haya quedado claro que la determinación del par no es aleatoria, sino que responde a cuestiones químicas. Para una mejor comprensión debemos fijarnos en los ejercicios 5 y 6 de la hoja 2, en los cuales los pares son $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$; $\text{NO}_3^- \rightleftharpoons \text{NO}_2^-$ y $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADH}$; succinato $\rightleftharpoons$ OAA respectivamente, ya que es evidente que el NADH no dará como resultado OAA no el NAD^+ al NO_2^- y viceversa.

Método de King & Alman

He apartado esto del desarrollo del tema porque considero que no nos vale para nada, pero evidentemente no puede pasarlo por alto.

Sirve para determinar las ecuaciones de velocidad en reacciones con varios complejos intermedios, como ya avanzamos en anteriores temas. Se trata de un método para resolver los sistemas de determinantes que se nos formarían. La diferencia con los métodos utilizados por nosotros, es que ahora se tienen en cuenta las constantes individuales. De este método deriva la ecuación general de Alberty.

En la hoja que dio la profesora, se dilucida la ecuación para el mecanismo Ping"Pong, y se nos dice que la ejecución del método sería muy similar a la que habría que realizar para el modelo secuencial.

Todo comienza dibujando el ciclo de la reacción en forma de figura geométrica (en este caso nos dará un cuadrado) teniendo mucho cuidado de marcar todas las constantes individuales. En segundo lugar se representan las posibles figuras con un lado menos, y llevando esas figuras sobre la del ciclo vamos determinando cuales serían posibles. Esta posibilidad no es otra de la de alcanzar E, es decir, si mediante la figura con un lado menos podríamos conseguir E libre a partir de las otras especies. Para ello debemos seguir las flechas, teniendo muy en cuenta la irreversibilidad (consideramos, al igual que en el modelo M&M que las etapas de formación de producto sin irreversibles al tiempo de medida), que será la que nos permita eliminar algunas. En nuestro caso, las dos primeras no serían posibles, ya que no hay continuidad en las flechas, al ser el lado k_2 irreversible y hacia abajo. Se determina entonces $[E]$ (especie que buscábamos) mediante las dos figuras restantes posibles. De cada uno de esos cuadros se multiplican todas las constantes y las concentraciones de las especies entrantes (para el sentido que nos interesa, así A no entra en la reacción k_1 del tercer cuadrado), y se suman a la de las demás figuras posibles (en nuestro caso y como se ve en la hoja se multiplican todas las constantes de los tres lados y por $[B]$ que entra en k_3 y se suman a la multiplicación de las constantes de los tres lados y la $[B]$ de la cuarta figura.

De este modo se calcula $[E]$, y de la misma forma se calculan $[EA]$, $[E']$ y $[E'B]$, desechando las figuras que no permitan llegar a esa especie, en cada caso y sumando los productos de las constantes y de las especies entrantes de cada una de las figuras posibles. Estas expresiones no nos dan las concentraciones reales, sólo serán un paso hacia lo que queremos llegar.

Cuando ya tenemos todas las especies en las que se divide $[E]_T$, hacemos lo de siempre, despejar la especie que se encuentra en la ecuación genérica de velocidad, que en este caso es $v = k_4 \cdot [E'B]$ por el hecho de ser la última etapa reversible. Hemos dicho que las concentraciones halladas no son reales, ya que lo que hay de definir es la razón con la enzima total, y por eso dividimos $[E'B]$ por el sumatorio de todas las especies anteriores ($[E]_T$).

Una vez formada la razón, agrupamos las cosas comunes y sacamos una fracción, la cual multiplicada por $[E]_T$, nos dará $[E'B]$ para sustituir en la ecuación de velocidad. Después de una serie de transformaciones obtenemos la ecuación para el mecanismo Ping"Pong, donde se pueden observar los valores de las constantes cinéticas:

- **Kcat**: Constantes implicadas en transformación. Es la fracción del numerador. Esa fracción multiplicada por $[E]_T$ nos da V_{max} .
- **KmA**: Primera fracción de constantes, multiplica a $[B]$ en el denominador.
- **KmB**: Segunda fracción de constantes, multiplica a $[A]$ en el denominador.

Se observa que no aparece el producto $K_sA \cdot K_mB$, que sí lo hará en el modelo secuencial. En definitiva, saber de donde sale la ecuación general de Albery, nada más.

Cuidado, en el mecanismo ping"pong hay mixta. Hablamos de hacerlo sabiendo que es secuencial.

Revisar el tema de inhibición reversible.

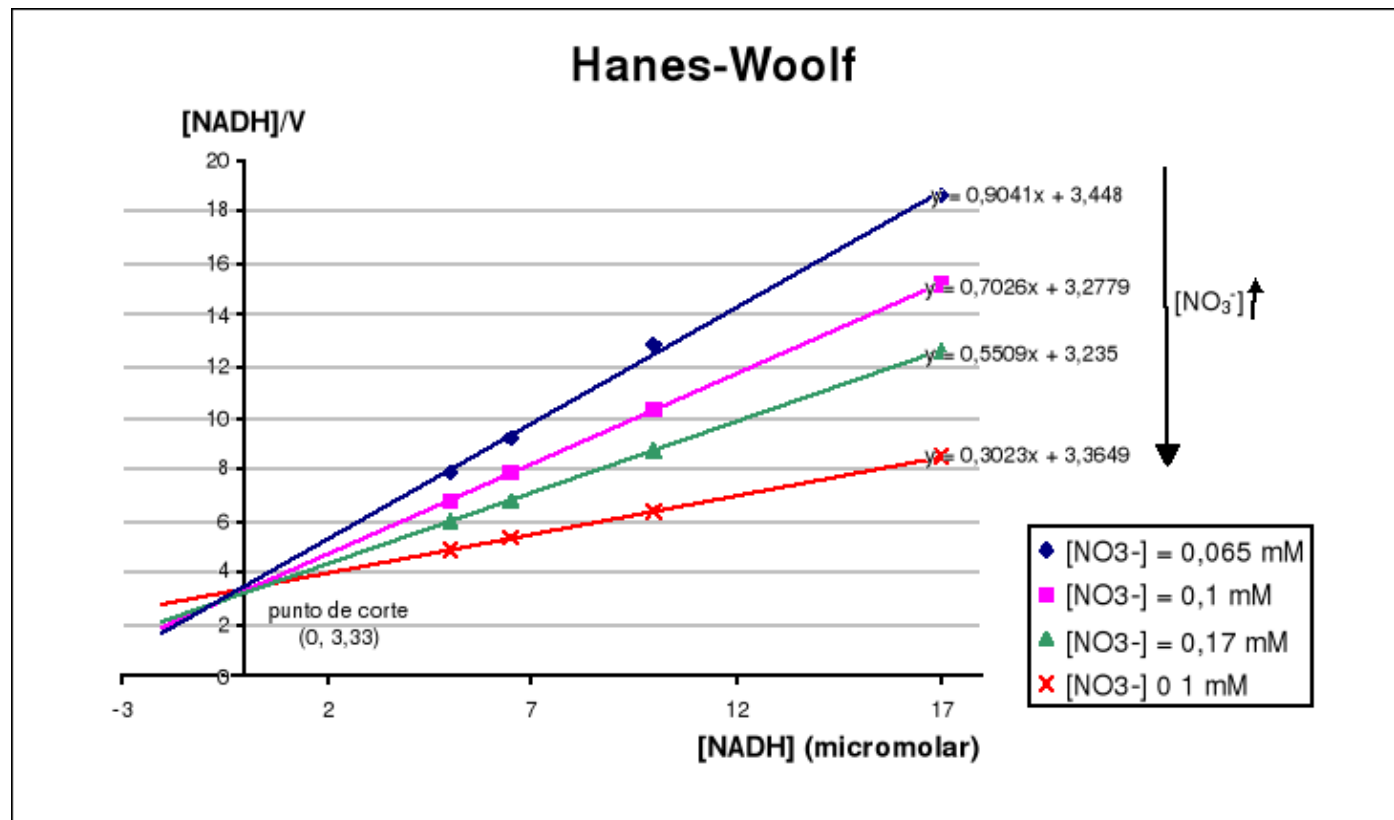
Pondremos en ejemplo de las hojas, pero como veremos más adelante hay varias posibilidades

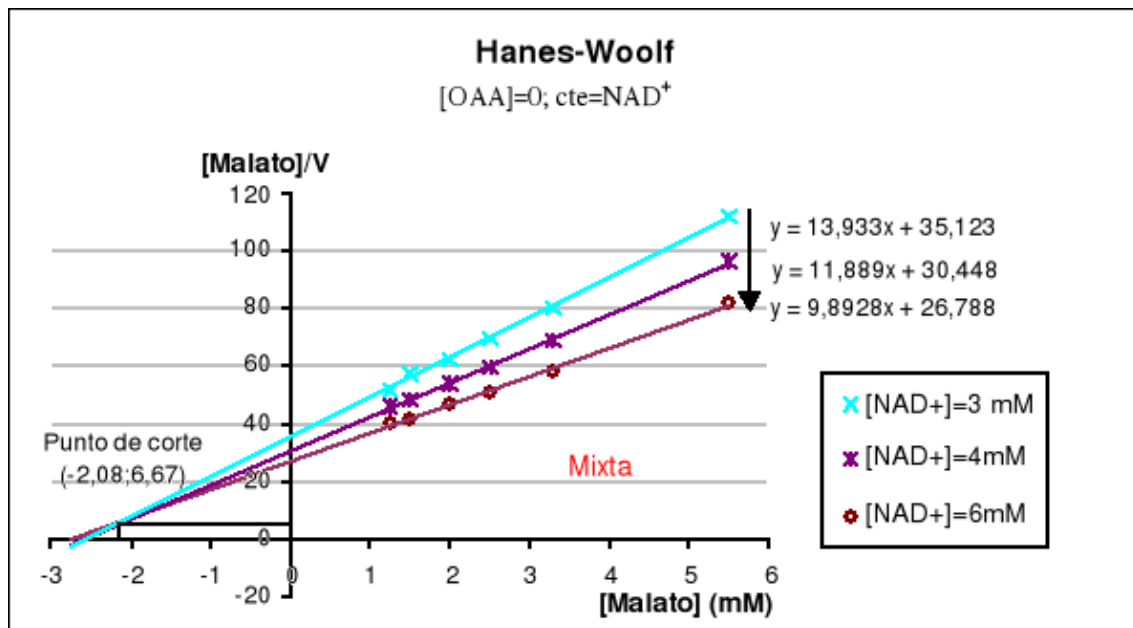
Si no es así desmentidmelo, pero creo que la enzima no diferencia isótopos, pero la probabilidad nos dice que la marca se distribuirá al 50%.

ENZIMOLOGÍA

77

Reacciones multisustrato





Ered E"NAD⁺ Eox"NADH Eox"Mal Ered"NADH Ered

NADH

OAA

Malato

NAD⁺

