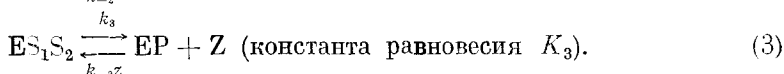
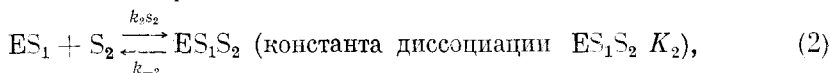
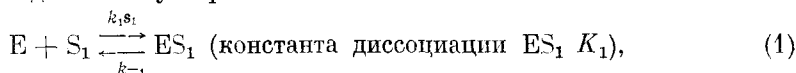


Член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, Э. Г. МАЛЫГИН

ВЕРОЯТНОСТНЫЙ МЕТОД ВЫВОДА КИНЕТИЧЕСКОГО УРАВНЕНИЯ ДЛЯ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА В РАВНОВЕСИИ ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Изучение изотопного обмена в равновесии является одним из важных методов изучения механизма ферментативных реакций. Этот метод впервые был предложен в работе ⁽¹⁾ для установления порядка присоединения субстратов к ферменту. Он также широко применяется для изучения первой стадии процесса, катализируемого аминокислота: тРНК-лигазами (КФ 6.1.1.), приводящей к образованию комплекса фермента с аминокислотаденилатом. Недавно нами было выведено кинетическое уравнение для изотопного обмена АТФ—Р³²-пирофосфат, катализируемого этими ферментами для случая определенного порядка присоединения субстратов ⁽²⁾, с помощью теории направленных графов ⁽³⁾. Вывод основывался на анализе двойного графа, в котором отдельно представлены ферментные формы и стадии, содержащие меченые и немеченые компоненты. Необходимость рассмотрения двойного графа существенно усложняет промежуточные выкладки и в случае анализа более сложных схем приводит к весьма громоздким конечным выражениям. В настоящей работе предлагается вероятностный метод вывода кинетических уравнений для изотопного обмена в равновесии, существенно более простой, чем использованный нами ранее метод.

Запишем схему для обмена АТФ—Р³²-пирофосфат при определенном порядке присоединения субстратов



В этой схеме E — фермент, S_1 — АТФ, S_2 — аминокислота, P — аминокислотаденилат, Z — пирофосфат, k_i , k_{-i} — константы скорости стадий в прямом и обратном направлениях, s_1 , s_2 , z — концентрации S_1 , S_2 , Z . В схему не включена стадия превращения комплекса $ES_1 S_2$ в EPZ , поскольку в квазистационарном приближении стадии внутримолекулярного превращения ферментных форм не изменяют вида конечного кинетического уравнения ⁽⁴⁾. Изотопный обмен регистрируется по появлению Р³²-АТФ в системе, содержащей фермент, АТФ, аминокислоту и Р³²-пирофосфат. Кинетическое уравнение для скорости обмена должно содержать суммарную концентрацию фермента e , концентрации s_1 , s_2 , z и кинетические параметры стадий и не должно содержать концентраций отдельных ферментных форм.

Совокупность ферментных форм E , ES_1 , $ES_1 S_2$, EP можно рассматривать как систему, через которую проходит поток радиоактивности. Скорость поступления радиоактивности в эту систему легко выражается в виде $v_{-3} = k_{-3}[EP]z$, и поскольку концентрация не содержащей радио-

активности ферментной формы EP может быть без труда выражена через суммарную концентрацию фермента и константы равновесия стадий, то легко записывается в виде, пригодном для введения ее в искомое кинетическое уравнение. Однако скорость изотопного обмена v меньше скорости v_{-3} , поскольку часть радиоактивной метки в силу обратимости стадий возвращается в виде P^{32} -пирофосфата. В общем случае возможно расходование части метки на побочные процессы.

В связи со сказанным скорость изотопного обмена можно записать как произведение скорости введения метки в систему ферментных форм v_{-3} и некоторого меньшего единичного множителя ω_{12} , который имеет смысл вероятности прохождения радиоактивной меткой ферментной формы ES_1S_2 в направлении образования продукта обмена. Эта вероятность представляет собой отношение скорости превращения ферментной формы в направлении продукта обмена к сумме скоростей всех превращений ES_1S_2 . Поскольку все превращения ферментной формы являются реакциями первого порядка по концентрации этой формы, то вероятность ω_{12} не зависит от концентрации ES_1S_2 и является удобным множителем для введения ее в окончательное кинетическое уравнение. Чтобы записать выражение для ω_{12} через кинетические параметры стадий и концентрации компонентов реакционной смеси нужно, однако, учесть, что скорость превращения ES_1S_2 в направлении образования продукта обмена меньше скорости v_{-2} ее превращения в $ES_1 + S_2$ в результате обратимости этой стадии. Ее поэтому нужно записать в виде $v_{-2}\omega_1$, где ω_1 — вероятность прохождения радиоактивной меткой в направлении продукта обмена ферментной формы ES_1 . Следовательно,

$$\omega_{12} = (k_{-2}\omega_1) / (k_{-2}\omega_1 + k_3) = 1 / (1 + k_3 / k_{-2}\omega_1).$$

Поскольку превращение ES_1 в продукт обмена P^{32} -АТФ можно на начальной стадии рассматривать как необратимый процесс (происходит разбавление образовавшейся P^{32} -АТФ большим избытком исходной нерадиоактивной АТФ), то выражение для ω_1 можно записать в виде

$$\omega_1 = k_{-1} / (k_{-1} + k_2s_2) = 1 / (1 + k_2s_2 / k_{-1}). \quad (4)$$

Выражение для ω_{12} после этого записывается в виде

$$\omega_{12} = 1 / \left(1 + \frac{k_3}{k_{-2}} \left(1 + \frac{k_2s_2}{k_{-1}} \right) \right).$$

Поскольку концентрация EP может быть выражена через e и константы равновесия отдельных стадий в виде

$$[EP] = e \left/ \left(1 + \frac{z}{K_3} + \frac{z}{K_3} \frac{K_2}{s_2} + \frac{z}{K_3} \frac{K_2}{s_2} \frac{K_1}{s_1} \right) \right.,$$

то после несложных преобразований кинетическое уравнение для изотопного обмена можно записать в виде

$$v = k_{-3} [EP] z \omega_{12} = e \left/ \left(\frac{1}{k_{-3}z} + \frac{1}{k_3} + \frac{K_2z}{k_3s_2} + \frac{K_1K_2z}{k_3s_1s_2} \right) \left(1 + \frac{k_3}{k_{-2}} + \frac{k_3k_2}{k_{-2}k_{-1}} s_2 \right) \right..$$

Нетрудно убедиться, что для одномолекулярных реакций предлагаемый вероятностный подход эквивалентен применению уравнения для скорости изотопного обмена, предложенного М. И. Темкиным⁽³⁾. Это уравнение в рассматриваемом случае можно записать в виде

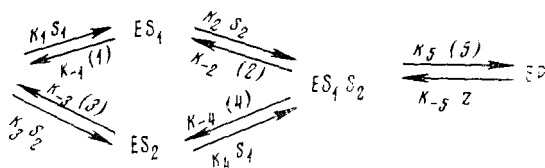
$$v \left(\frac{1}{v_{-3}} + \frac{v_3}{v_{-3}v_{-2}} + \frac{v_3v_2}{v_{-3}v_{-2}v_{-1}} \right) = 1,$$

где v , v_{-i} — скорости соответствующих стадий. Подстановка вместо v , v_{-i} их выражений через кинетические параметры и концентрации и сокращение концентраций промежуточных ферментных форм приводит к выражению

$$\frac{v}{v_{-3}} \left(1 + \frac{k_3}{k_{-2}} + \frac{k_3k_2}{k_{-2}k_{-1}} s_2 \right) = 1. \quad (5)$$

Поскольку отношение v/v_{-3} есть вероятность ω_{12} , видно, что получается выражение, идентичное (5).

В то же время предлагаемый нами вероятностный метод вывода кинетических уравнений для изотопного обмена в равновесии в равной мере применим к многомаршрутным реакциям. В качестве примера рассмотрим вывод кинетического уравнения для скорости изотопного обмена АТФ — P^{32} -пирофосфат при произвольном порядке присоединения субстратов. Схему реакции запишем в виде графа



В этом случае обмен происходит по двум маршрутам — одному, состоящему из стадий 5, 2, 1, и второму, состоящему из стадий 5, 4. Выражение для скорости обмена можно записать в виде

$$v = k_{-5} [EP] z (\omega_{12}^{(1)} + \omega_{12}^{(2)}),$$

где $\omega_{12}^{(1)}, \omega_{12}^{(2)}$ — вероятности прохождения изотопной меткой ферментной формы ES_1S_2 в направлении образования P^{32} -АТФ по первому и второму маршрутам. Эти вероятности равны

$$\omega_{12}^{(1)} = k_{-2}\omega_1/(k_{-2}\omega_1 + k_{-4} + k_5), \quad \omega_{12}^{(2)} = k_{-4}/(k_{-2}\omega_1 + k_{-4} + k_5),$$

где ω_1 — вероятность прохождения ферментной формы ES_1 , определяемая из (4). Концентрация EP в рассматриваемой схеме равна

$$[EP] = e \left/ \left(1 + \frac{z}{K_5} + \frac{K_4}{K_5} \frac{z}{s_1} + \frac{K_2}{K_5} \frac{z}{s_1} + \frac{K_1K_2}{K_5} \frac{z}{s_1s_2} \right) \right.$$

(K_i — константы диссоциации соответствующих стадий) и выражение для скорости изотопного обмена после несложных преобразований записывается в виде

$$v = e \left(1 + \frac{k_{-4}}{k_{-2}} + \frac{k_{-4}k_2}{k_{-1}k_{-2}} s_2 \right) \left/ \left[\left(\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_{-5}z} + \frac{K_4}{k_5s_1} + \frac{K_2}{k_5s_2} + \frac{K_1K_2}{k_5} \cdot \frac{1}{s_1s_2} \right) \left(1 + \frac{k_{-4} + k_5}{k_{-2}} + \frac{k_{-4} + k_5}{k_{-2}} \cdot \frac{k_2}{k_{-1}} s_2 \right) \right] \right.$$

Институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
10 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. D. Boyer, Arch. Biochem. and Biophys., 83, 387 (1959). ² Д. Г. Кнорре, Э. Г. Малыгин, Молекулярная биология, 5, 361 (1971). ³ М. В. Волькенштейн, Б. И. Гольдштейн, Биохимия, 31, 541 (1966). ⁴ W. W. Cleland, Biochim. et biophys. acta, 67, 104 (1963). ⁵ М. И. Темкин, Сборн. Научные основы подбора и производства катализаторов, Новосибирск, 1964, стр. 46.