



УДК 577.158.45.02

РАСЧЕТ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АНТРАНИЛАТСИНТЕТАЗОЙ

II. * ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ ПРЕДСТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ
И ДАННЫХ О ВРЕМЕНИ УСТАНОВЛЕНИЯ СТАЦИОНАРНОГО РЕЖИМА

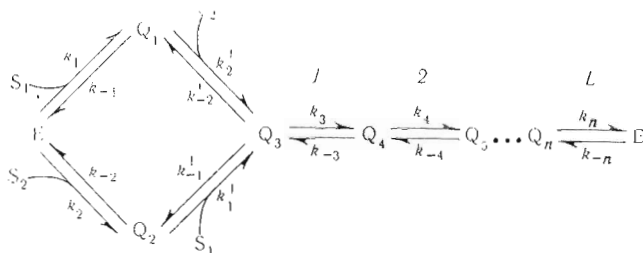
Дроздов-Тихомиров Л. Н., Скурида Г. И.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Предложен метод определения числа стадий превращения (L) тройного фермент-субстратного комплекса, заканчивающегося освобождением фермента, по данным предстационарной кинетики. Получены соотношения, из которых однозначно определяются константы присоединения обратимо образующихся продуктов к ферменту, а для механизмов с последовательным или независимым присоединением субстратов, кроме того, определяются константы образования фермент-субстратных комплексов. Совместное использование результатов исследования предстационарной кинетики и стационарной позволило получить систему уравнений, из которой однозначно определяются все константы для ряда механизмов с произвольным числом продуктов.

Получены характеристические уравнения для механизмов с $L = 3, 4, 5$, позволяющие без просчета системы дифференциальных уравнений, соответствующих механизму, 1) отказаться от предполагаемого механизма, если он ни при каких значениях констант не обеспечивает установление стационарного режима за времена, характерные для ферментативных реакций, 2) оценить константы в тех случаях, когда данных для их однозначного определения недостаточно.

В первой части настоящей работы [1] был проведен анализ выражений для начальной скорости реакции в стационарной фазе, протекающей по одному из механизмов, предложенных для реакций антранилатсинтетазы на основании имеющихся к настоящему времени сведений об этих процессах. Все рассмотренные механизмы можно описать общей схемой, в соответствии с которой на любой из стадий превращения тройного фермент-субстратного комплекса, заканчивающегося освобождением фермента, может выделяться один или несколько продуктов. (На представленной схеме стадии, на которых выделяются продукты, не отмечены.



* Сообщение I см. [1].

так как предполагается, что концентрации последних постоянны и для общности формул могут быть внесены в соответствующие константы с отрицательными индексами.)

Было показано, что все механизмы, за исключением случая, когда число стадий L равно 1, при определенном подборе констант дают одинаковый характер зависимости стационарной скорости реакции от концентраций субстратов. Поэтому осуществить выбор одного из вероятных механизмов, используя только данные стационарной кинетики, нельзя. Можно лишь для каждого случая по-разному интерпретировать кинетические константы. Для простейших механизмов, т. е. таких, в которых исключены стадии внутренней перестройки комплексов фермента, не сопровождающиеся выделением продукта, можно определить все кинетические константы, если субстраты взаимодействуют с ферментом независимо, а все продукты, кроме конечного, образуются обратимо.

В настоящей работе сделана попытка показать, что если имеются данные о предстационарной кинетике, то на изучаемые механизмы полезно распространить подход Дарвея и соавт. [2, 3], заключающийся в представлении временной зависимости концентраций компонентов реакции в начальный период в виде степенного ряда. Такой подход позволяет по характеру зависимости концентрации продукта от времени определить число L (см. схему) для исследуемой реакции, т. е. указать наиболее вероятный механизм и получить ряд соотношений между константами, которые в совокупности с данными стационарной кинетики позволяют в некоторых случаях однозначно определить все параметры этого механизма. Если использовать еще одну характеристику ферментативной реакции — время установления стационарного состояния, то можно получить дополнительные оценки величин констант скорости в тех случаях, когда методами стационарной и предстационарной кинетики нельзя однозначно определить все константы скорости или когда эксперименты по каким-либо причинам не могут быть выполнены в достаточном количестве. Более того, такой подход позволяет исключить из рассмотрения ряд механизмов.

Возможности использования данных предстационарной кинетики. В предстационарный период ферментативной реакции зависимость концентраций компонентов от времени можно аппроксимировать [2, 3] степенными функциями:

$$[Q_i] = \sum_{j=0}^{\infty} x_{ij} t^j, \quad (1)$$

коэффициенты x_{ij} в которых легко выразить через константы скорости и концентрации субстратов, подставив значения (1) в систему дифференциальных уравнений, описывающую конкретный механизм. Для механизма, представленного схемой, скорость накопления конечного продукта определится уравнением

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{L+2} [Q_{L+2}] = k_{L+2} \sum_{j=0}^{\infty} x_{L+2, j} t^j.$$

Можно показать, что первый не равный нулю коэффициент степенного ряда, представляющего концентрацию конечного продукта, встречается при t^n , где $n = L + 2$, а L — число стадий на пути превращения тройного фермент-субстратного комплекса, завершающегося образованием конечного продукта и освобождением фермента. Таким образом,

$$[P] = k_n \sum_{i=n}^{\infty} \frac{x_{n, i-1}}{i} t^i, \quad \text{или} \quad \frac{[P]}{t^n} = k_n \sum_{i=n}^{\infty} \frac{x_{n, i-1}}{i} t^{(i-n)}. \quad (2)$$

Нетрудно видеть, что в момент $t = 0$ кривая $[P]/t^n$ имеет касательную, уравнение которой

$$y = -At + B,$$

где $A = -k_n \frac{x_{n,n}}{n+1}$, а $B = k_n \frac{x_{n,n-1}}{n}$,

или

$$A = \frac{E_0 [S_1] [S_2]}{(n+1)!} \left(\prod_{i=1}^n k_i \right) \left\{ \frac{k_2'}{k_2} (k_{-1} + k_2' [S_2]) + \frac{k_1'}{k_1} (k_{-2} + k_1' [S_1]) + \right. \\ \left. + \left(\frac{k_2'}{k_2} + \frac{k_1'}{k_1} \right) [k_1 [S_1] + k_2 [S_2] + k_{-1}' + k_{-2}' + \sum_{i=3}^n (k_i + k_{-i})] \right\},$$

$$B = \frac{E_0 [S_1] [S_2]}{n!} \left(\prod_{i=1}^n k_i \right) \left(\frac{k_1'}{k_1} + \frac{k_2'}{k_2} \right)$$

(E_0 — суммарная концентрация фермента).

В табл. 1 приведены выражения для A и B при $L = 1, 2, 3$ (эти механизмы могут быть простейшими для реакций, катализируемых антриани-

Таблица 1

Коэффициенты разложения в степенной ряд зависимости $P(t)$

| Номер | Механизм | | A | B |
|-------|---|---|--|--|
| | Взаимодействие субстратов с ферментом * | n | | |
| I | Последовательное (а) | 5 | $\frac{E_0}{720} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2' [S_2] \cdot k_3 k_4 k_5 \times$ $\times (k_1 [S_1] + k_2' [S_2] + k_{-1} +$ $+ k_{-2}' + k_3 + k_{-3} + k_4 +$ $+ k_{-4} + k_5)$ | $\frac{E_0}{120} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2' [S_2] \cdot k_3 k_4 k_5.$ |
| | Независимое (б) | 5 | $\frac{E_0}{720} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2 [S_2] \cdot k_3 k_4 k_5 \times$ $\times [3 (k_1 [S_1] + k_2 [S_2] + k_{-1} +$ $+ k_{-2}) + 2 (k_3 + k_{-3} + k_4 +$ $+ k_{-4} + k_5)]$ | $\frac{E_0}{60} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2 [S_2] \cdot k_3 k_4 k_5.$ |
| II | Последовательное (а) | 4 | $\frac{E_0}{120} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2' [S_2] \cdot k_3 k_4 \times$ $\times (k_1 [S_1] + k_2' [S_2] + k_{-1} \times$ $+ k_{-2}' + k_3 + k_{-3} + k_4)$ | $\frac{E_0}{24} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2' [S_2] \cdot k_3 k_4.$ |
| | Независимое (б) | 4 | $\frac{E_0}{120} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2 [S_2] \cdot k_3 k_4 \times$ $\times [3 (k_1 [S_1] + k_2 [S_2] + k_{-1} +$ $+ k_{-2}) + 2 (k_3 + k_{-3} + k_4)]$ | $\frac{E_0}{12} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2 [S_2] \cdot k_3 k_4.$ |
| III | Последовательное (а) | 3 | $\frac{E_0}{24} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2' [S_2] \cdot k_3 \times$ $\times (k_1 [S_1] + k_2' [S_2] + k_{-1} +$ $+ k_{-2}' + k_3)$ | $\frac{E_0}{6} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2' [S_2] \cdot k_3.$ |
| | Независимое (б) | 3 | $\frac{E_0}{24} \cdot k_1 [S_1] \cdot k_2 [S_2] \cdot k_3 \times$ $\times [3 (k_1 [S_1] + k_2 [S_2] +$ $+ k_{-1} + k_{-2}) + 2k_3]$ | $\frac{E_0}{3} \cdot k_1 [S_1] \times$ $\times k_2 [S_2] \cdot k_3$ |

* В случае (а) $k_2 = k_{-2} = k_1' = k_{-1}' = 0$, в случае (б) $k_1' = k_1$, $k_2' = k_2$, $k_{-1}' = k_{-1}$, $k_{-2}' = k_{-2}$.

латсинтегазой). Используя (2), можно определить число стадий превращения тройного фермент-субстратного комплекса. Действительно, если $[P]$ поделить на $t^{n'}$, то из (2) следует: 1) в случае $n' > n$ кривая $[P]/t^{n'}$ при $t \rightarrow 0$ стремится к $+\infty$; 2) в случае $n' < n$ величина $[P]/t^{n'}$ при $t \rightarrow 0$ стремится к нулю и 3) в случае $n' = n$ $[P]/t^{n'}$ при $t \rightarrow 0$ стремится к конечной положительной величине. Очевидно, что, определив n , можно указать число стадий L и, исследуя далее зависимость отношения A/B от концентраций субстратов

$$A/B = R[S_1] + H,$$

где $H = R_1[S_2] + H_1$ (R, R_1 и H_1 не зависят от концентраций субстратов), получить соотношения

$$(n+1)R_1 = k_2 + \frac{(k_2')^2 k_1}{k_2' k_1 + k_1' k_2}, \quad (n+1)R = k_1 + \frac{(k_1')^2 k_2}{k_2' k_1 + k_1' k_2},$$

$$(n+1)H = \frac{k_1 k_2' k_{-1} + k_2 k_1' k_{-2}}{k_2' k_1 + k_1' k_2} + k_{-1}' + k_{-2}' + \sum_{i=3}^n (k_i + k_{-i}').$$

Для механизмов с независимым присоединением субстратов и для последовательных механизмов при этом однозначно определяются константы образования фермент-субстратных комплексов. Если кроме конечного продукта в реакции на стадии l образуется продукт P_l , то, исследуя зависимость A/B от концентрации этого продукта

$$A/B = C[P_l] + D$$

при фиксированных $[S_1]$ и $[S_2]$, получим $k_{-l}' = C(n+1)$.

Комбинируя эксперименты по стационарной и предстационарной кинетике и пользуясь соотношениями, полученными выше и в работе [1], нетрудно получить единственные значения для каждой константы цикла (см. схему), если субстраты образуют комплексы с ферментом независимо, и конечное число значений для каждой константы, если присоединение субстратов происходит зависимо (доказательство этого факта и формулы для определения кинетических констант будут приведены в другой работе).

Далее будем исходить из того, что константы цикла известны. Определив из предстационарной кинетики B и H , вычислим величины U и V , где

$$U = \prod_{i=3}^n k_i \quad \text{и} \quad V = \sum_{i=3}^n (k_i + k_{-i}').$$

С другой стороны, в этом случае методами стационарной кинетики легко определить при различных концентрациях продуктов величины T_0 и T_1 , пользуясь уравнением начальной стационарной скорости накопления конечного продукта

$$\frac{E_0}{v} = T_0 + T_1 \varphi_1([S_1], [S_2]) + \varphi_2([S_1], [S_2]),$$

где функции φ_1 и φ_2 зависят от концентраций субстратов и констант стадий, принадлежащих циклу,

$$\begin{cases} T_0 = \frac{1}{k_4} + \sum_{i=5}^n \frac{1}{k_i} \left(1 + \sum_{l=4}^{i-1} \prod_{m=l}^{i-1} K^m \right), \\ T_1 = \frac{1}{k_3} + \sum_{i=4}^n \frac{1}{k_i} \prod_{l=3}^{i-1} K^l. \end{cases} \quad (3)$$

(При $n=3$ $T_0=0$, $T_1=1/k_3$; при $n=4$ $T_0=1/k_4$, $T_1=1/k_3 + \frac{K^3}{k_4}$.) В выражениях для T_0 и T_1 $K^i = k_{-i}'/k_i$, в стадиях, на которых выделяются продукты, k_{-i}' является эффективной константой, представляющей произведение истинной константы k_{-i} на концентрацию соответствующего продукта ($[P_i]$).

Из (3) следует, что для обратимо образующегося j -го продукта при фиксированных концентрациях остальных продуктов выражения для T_0 и T_1 будут иметь вид

$$T_{0j} = A_j^0 + B_j^0 [P_j]; \quad T_{1j} = A_j^1 + B_j^1 [P_j],$$

где $A_j^0, B_j^0, A_j^1, B_j^1$ — функции концентраций всех продуктов, кроме j -го. Параметры этих линейных уравнений определяются экспериментально. Нетрудно показать, что если число обратимо образующихся продуктов равно p и все стадии механизма, кроме последней, обратимы, вместо (3) будем иметь $2(p+1)$ независимых уравнений, связывающих константы k_i и k_{-i} , $i = 3, 4, \dots, n$. Присоединив к полученным уравнениям уравнения для U и V и учитывая, что константы с отрицательными индексами для стадий, на которых образуются обратимо продукты, определяются из предстационарной кинетики, получим систему из q ($q = 2 \cdot (p+1) + 2$) уравнений, связывающих r ($r = (n-2) \cdot 2 - 1 - p$) констант. Однако такая система в общем случае нелинейна и о существовании единственного решения нельзя говорить, даже если $q \geq r$. Более того, при наличии в механизме необратимых стадий или если продукты выделяются подряд на нескольких стадиях часть уравнений становится линейнонезависимыми. Тем не менее в ряде случаев много констант, а иногда и все, можно определить однозначно. Покажем это на следующем примере. Рассмотрим механизм, в котором тройной фермент-субстратный комплекс в начале цепочки превращений проходит через стадии внутренней перестройки, не сопровождающейся выделением продукта, а начиная со стадии j_1 один за другим обратимо отщепляются p продуктов, затем снова возможны стадии внутренней перестройки фермент-продуктного комплекса, завершающиеся освобождением фермента и образованием конечного продукта.

В этом случае при $m < j_1$ $K^m = \frac{k_{-m}}{k_m} = K^{(m)}$, при $j_p \geq m \geq j_1$. $K^m = \frac{k_{-m} [P_l]}{k_m} = K^{(m)} [P_l]$, ($l = m - j_1 + 1$). Из (3) следует

$$T_{11} = A_1^1 + B_1^1 [P_1],$$

где

$$A_1^1 = \frac{1}{k_3} + \sum_{i=4}^{j_1} \frac{1}{k_i} \prod_{m=3}^{i-1} K^{(m)}, \quad B_1^1 = \prod_{m=3}^{j_1} K^{(m)} \left(\frac{1}{k_{j_2}} + \sum_{i=j_3}^n \frac{1}{k_i} \prod_{m=j_3}^{i-1} K^{(m)} \right).$$

В свою очередь

$$B_1^1 = A_2^1 + B_2^1 [P_2],$$

$$A_2^1 = \frac{1}{k_{j_2}} \prod_{m=3}^{j_2} K^{(m)}, \quad B_2^1 = \prod_{m=3}^{j_2} K^{(m)} \left(\frac{1}{k_{j_3}} + \sum_{i=j_4}^n \frac{1}{k_i} \prod_{m=j_3}^{i-1} K^{(m)} \right).$$

Далее аналогично получим

$$A_l^1 = \frac{1}{k_{j_l}} \prod_{m=3}^{j_{l-1}} K^{(m)} \quad (l = 3, 4, \dots, p), \quad B_p^1 = \prod_{m=3}^{j_p} K^{(m)} \left(\frac{1}{k_{j_{p+1}}} + \sum_{i=j_{p+2}}^n \frac{1}{k_i} \prod_{m=j_{p+1}}^{i-1} K^{(m)} \right).$$

Очевидно, что

$$\frac{A_l^1}{A_{l-1}^1} = \frac{k_{-j_{l-1}}}{k_{j_l}}, \quad l = 3, 4, \dots, p$$

и, следовательно, константы с индексами j_3, j_4, \dots, j_p определяются однозначно. Если, кроме того, $n = j_p + 1$, т. е. после стадии образования

p -го продукта есть только одна стадия, на которой освобождается фермент и образуется конечный продукт, однозначно определяются константы всех стадий, начиная со стадии j_3 , так как в этом случае

$$B_p^1 = \frac{1}{k_n} \prod_{m=3}^{j_p} K^{(m)}, \quad \frac{B_p^1}{A_p^1} = \frac{k_{-j_p}}{k_n}.$$

Аналогичное исследование зависимости T_0 от концентраций продуктов приводит к более сложным выражениям для констант. Однако если полагать концентрации всех продуктов, кроме l -го, равными нулю, при $n = j_p + 1$, исходя из $T_{0l} = A_l^0 + B_l^0 [P_l]$, получим

$$A_1^0 = \sum_{i=4}^n \frac{1}{k_i} + \sum_{i=5}^{j_1} \frac{1}{k_i} \sum_{l=4}^{i-1} \prod_{m=l}^{i-1} K^{(m)}, \quad B_1^0 = \frac{1}{k_{j_2}} \sum_{l=1}^{j_1} \prod_{m=l}^{j_1} K^{(m)}, \quad B_l^0 = \frac{1}{k_{j_{l+1}}} K^{j_l},$$

$$l = 2, 3, \dots, p.$$

Из уравнений для B_l^0 кроме уже определенных из A_l^1 констант найдем $k_{j_2} = A_1^1 / (B_2^0 A_2^1)$. Для того чтобы определить константы $k_3, k_4, \dots, k_{j_1}, k_{-3}, k_{-4}, \dots, k_{j_1-1}$, можем воспользоваться только уравнениями для $A_1^0, B_1^0, A_1^1, A_2^1, U, V$. Всего шесть уравнений. Следовательно, если $j_1 \leq 5$, можно пытаться определить все константы механизма. Действительно, при $j_1 = 3$ получим $k_3 = 1/A_1^1$. При $j_1 = 4$ также все константы определяются однозначно:

$$k_3 = w^{-1}, \quad \text{где } w = A_1^1 - \frac{A_3^1}{k_{-4} B_2^0}, \quad k_4 = \frac{k_{-4} B_2^0 A_2^1}{B_1^0 A_3^1}, \quad k_{-3} = \frac{A_2^1}{B_1^0 w}.$$

При $j_1 = 5$ для k_4 получим единственное значение:

$$k_4 = \left(A_1^0 - \sum_{i=6}^n \frac{1}{k_i} - \frac{B_1^0 k_6}{k_{-5}} \right)^{-1},$$

константы k_3, k_{-3}, k_{-4}, k_5 будут иметь не более чем по два значения из системы уравнений

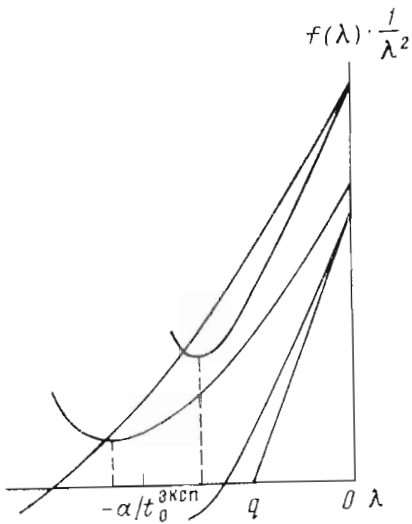
$$\begin{cases} A_1^1 = \frac{1}{k_3} + K^3 \left(\frac{1}{k_4} + \frac{K^1}{k_5} \right), \\ A_2^1 k_6 = K^3 K^4 K^5, \\ B_1^0 k_6 = K^5 (K^4 + 1), \\ \frac{U}{n} = k_3 k_4 k_5, \\ \prod_{i=6}^n k_i \end{cases}$$

Использование критерия стационарности. Известно, что для большинства ферментативных реакций, протекающих при концентрациях субстратов, значительно превышающих концентрацию фермента, стационарное состояние наступает за время $\sim 10^{-3}$ с [4], если в ходе реакции субъединичная структура фермента не изменяется. В общем случае ферментативная реакция, протекающая при определенных экспериментальных условиях, характеризуется некоторым временем $t_0^{\text{стационар}}$ необходимым для установления стационарного состояния. Позволяют ли константы выбранной модели получить $t_0^{\text{теор}}$, близкое к экспериментальному, можно узнать, решив соответствующую систему дифференциальных уравнений, но такой подход неудобен, так как требует больших затрат вычислительного времени. Чтобы обойти эту трудность, можно воспользоваться следующей оценкой. Решение системы дифференциальных уравнений, описывающих изменение концентраций компонентов (y_i) для любого механизма при

Коэффициенты характеристического уравнения $f(\lambda) = 0$

Обозначения: $a = k_1 S_1$ $d = a + b + k_{-1} + k_{-2}$ $l = k_3 k_5 + k_{-3}(k_{-4} + k_3)$
 $b = k_2 S_2$ $f = (a + k_{-1})(b + k_{-2})$ $m = a(a + k_{-1}) + b(b + k_{-2}) + f$
 $c = k_{-3} + k_4 + k_{-4} + k_5$ $g = k_{-4} + k_3 + k_5$ $n = ab + k_{-2}(a + k_{-1})$
 $p = a + b + k_{-1}$

| Механизм | | a_1 | a_2 | a_3 | a_4 | a_5 |
|----------|---|---|---|--|--|---|
| L | Тип взаимодействия субстратов с ферментом и $f(\lambda)$ | | | | | |
| 3 | (a) $\lambda^2(\lambda^4 + a_1\lambda^3 + a_2\lambda^2 + a_3\lambda + a_4)$ (б) $\lambda^2(\lambda^5 + a_1\lambda^4 + a_2\lambda^3 + a_3\lambda^2 + a_4\lambda + a_5)$ | $d + \sum_{i=3}^5 (k_i + k_{-i})$ $2d + \sum_{i=3}^5 (k_i + k_{-i})$ | $l + dc + n + k_3(p + g)$ $f + d^2 + k_3(a + b) + l + k_3(d + g) + 2dc$ | $lp + mc + k_3(ab + pg + k_4k_5)$ $d^2c + f(c + d) + 2dl + k_3[m + 2ab + k_3k_5 + g(a + b + d)]$ | $nl + k_3(abg + k_4k_5p)$ $l(q^2 + f) + dcf + k_3[k_4k_5(a + b + d) + mg + ab(2g + d)]$ | a_5 $dlf + k_3abd_5g + k_3k_4k_5m$ |
| 2 | (a) $\lambda^2(\lambda^3 + a_1\lambda^2 + a_2\lambda + a_3)$ (б) $\lambda^2(\lambda^4 + a_1\lambda^3 + a_2\lambda^2 + a_3\lambda + a_4)$ | $d + \sum_{i=3}^4 (k_i + k_{-i})$ $2d + \sum_{i=3}^4 (k_i + k_{-i})$ | $(k_{-1} + a)(k_{-2} + k_3) + ab + k_3(b + k_4) + d(k_{-3} + k_4)$ $f + d^2 + k_3(a + b + d) + k_3 + 2d(k_{-3} + k_4)$ | $k_3k_3p + k_3ab + n(k_{-3} + k)$ $d^2(k_{-3} + k_4) + f(d + k_{-3} + k_4) + k_3[m + k_3(a + b + d)]$ | $df(k_{-3} + k_4) + k_3(k_4m + abd)$ | |
| 4* | (a) $\lambda^2(\lambda^2 + a_1\lambda + a_2)$ (б) $\lambda^2(\lambda^3 + a_1\lambda^2 + a_2\lambda + a_3)$ | $d + k_3$ $2d + k_3$ | $(k_{-1} + a)(k_{-2} + k_3) + b(a + k_3)$ $f + d^2 + k_3(a + b) + k_3d$ | $fd + k_3m$ | | |



Решение характеристических уравнений, представленных в табл. 2

чаях: а) субстраты взаимодействуют с ферментом последовательно, б) независимо: $k_1 = k_1'$, $k_{-1} = k_{-1}'$, $k_2 = k_2'$, $k_{-2} = k_{-2}'$ (см. схему). На первый взгляд полученные уравнения трудно анализировать, но ясно, что все они имеют отрицательные корни (не считая нулевых) [5], что дает возможность представить ход кривых для соответствующих полиномов и составить простой алгоритм для численной оценки максимального корня при заданном наборе констант скорости. В области $[-\alpha/t_0^{\text{аксп}}, 0]$ функции $f(\lambda) \cdot \frac{1}{\lambda^2}$, задаваемые табл. 2, имеют вид, показанный на рисунке. Касательные к кривым в нуле пересекают абсциссу в точке $q = -a_n/a_{n-1}$ (где a_n — коэффициент при λ^2 в характеристическом уравнении). Константы, при которых $q < -\alpha/t_0^{\text{аксп}}$, удовлетворяют условию (4). В противном случае необходимо исследовать характер функции на отрезке $[-\alpha/t_0^{\text{аксп}}, q]$ и, если на этом участке найдется точка, в которой функция $f(\lambda) \cdot \frac{1}{\lambda^2}$ меняет знак или имеет минимум, данный набор констант следует отбросить, так как он не обеспечивает выполнение условия (4).

Хотя вывести характеристическое уравнение довольно трудно, легкость, с которой при этом отбрасываются заведомо невероятные значения констант, оправдывает использование такого подхода. Оценить время установления стационарного режима можно и другими способами. Во-первых, существуют методы, позволяющие найти собственные значения матрицы. Но доступные нам соответствующие программы работают далеко не при всех мыслимых значениях констант (если значения констант находятся в интервале $[0-10^{12}]$) и, кроме того, требуют значительных затрат вычислительного времени. Во-вторых, перебирая все вероятные значения для каждой константы, можно проследить за ходом расчетной кинетической кривой в течение первых $t_0^{\text{аксп}}$ секунд и отбросить все наборы констант, при которых стационарный режим за указанное время не наступает. Такое решение проблемы также очень дорого обошлось бы в смысле затрат вычислительного времени, так как в настоящее время не существует (Гарфинкель и соавт. [6]) методов, которые бы достаточно быстро при возможностях современных ЭВМ позволяли получать решения «жестких уравнений», какими являются почти все уравнения, описывающие ферментативные реакции.

условиях, обеспечивающих установление стационарного состояния, сводится к уравнению

$$y_i = \sum_j c_{ij} e^{\lambda_j t},$$

где c_{ij} — коэффициенты, λ_j — корни характеристического уравнения системы. Условие $t_0^{\text{теор}} \leq t_0^{\text{аксп}}$ будет выполнено, если для всех $\lambda \neq 0$:

$$\begin{cases} \lambda_j < 0, \\ \frac{\alpha}{|\lambda_{\text{макс}}|} < t_0^{\text{аксп}}, \end{cases} \quad (4)$$

где α определяется точностью, с которой процесс можно считать стационарным.

В табл. 2 приведены полные характеристические уравнения для трех механизмов с $L = 1, 2$ и 3 , которые получены в двух предельных случаях:

а) субстраты взаимодействуют с ферментом последовательно, б) независимо: $k_1 = k_1'$, $k_{-1} = k_{-1}'$, $k_2 = k_2'$, $k_{-2} = k_{-2}'$ (см. схему). На первый взгляд полученные уравнения трудно анализировать, но ясно, что все они имеют отрицательные корни (не считая нулевых) [5], что дает возможность представить ход кривых для соответствующих полиномов и составить простой алгоритм для численной оценки максимального корня при заданном наборе констант скорости.

В области $[-\alpha/t_0^{\text{аксп}}, 0]$ функции $f(\lambda) \cdot \frac{1}{\lambda^2}$, задаваемые табл. 2, имеют вид, показанный на рисунке. Касательные к кривым в нуле пересекают абсциссу в точке $q = -a_n/a_{n-1}$ (где a_n — коэффициент при λ^2 в характеристическом уравнении). Константы, при которых $q < -\alpha/t_0^{\text{аксп}}$, удовлетворяют условию (4). В противном случае необходимо исследовать характер функции на отрезке $[-\alpha/t_0^{\text{аксп}}, q]$ и, если на этом участке найдется точка, в которой функция $f(\lambda) \cdot \frac{1}{\lambda^2}$ меняет знак или имеет минимум, данный набор констант следует отбросить, так как он не обеспечивает выполнение условия (4).

Хотя вывести характеристическое уравнение довольно трудно, легкость, с которой при этом отбрасываются заведомо невероятные значения констант, оправдывает использование такого подхода. Оценить время установления стационарного режима можно и другими способами. Во-первых, существуют методы, позволяющие найти собственные значения матрицы. Но доступные нам соответствующие программы работают далеко не при всех мыслимых значениях констант (если значения констант находятся в интервале $[0-10^{12}]$) и, кроме того, требуют значительных затрат вычислительного времени. Во-вторых, перебирая все вероятные значения для каждой константы, можно проследить за ходом расчетной кинетической кривой в течение первых $t_0^{\text{аксп}}$ секунд и отбросить все наборы констант, при которых стационарный режим за указанное время не наступает. Такое решение проблемы также очень дорого обошлось бы в смысле затрат вычислительного времени, так как в настоящее время не существует (Гарфинкель и соавт. [6]) методов, которые бы достаточно быстро при возможностях современных ЭВМ позволяли получать решения «жестких уравнений», какими являются почти все уравнения, описывающие ферментативные реакции.

Прямой поиск констант скоростей. Константы скорости для любого механизма можно определять и не приводя выражение стационарной скорости или зависимость концентрации продукта от времени к простым, легко анализируемым формам. Для этого можно воспользоваться минимизацией функционала

$$\Phi = \Phi_1 + \Phi_2,$$

$$\Phi_1 = \sum_{i,j} \left(\frac{v_T^{ij} - v_0^{ij}}{v_T^{ij} + v_0^{ij}} \right)^2, \quad \Phi_2 = \sum_{i,j,k} \left(\frac{[P_T^{ijk}] - [P_0^{ijk}]}{[P_T^{ijk}] + [P_0^{ijk}]} \right)^2, \quad (5)$$

где v_0 — экспериментальное значение начальной стационарной скорости накопления продукта при концентрациях субстратов $[S_1^i]$ и $[S_2^j]$; $[P_0^{ijk}]$ — экспериментальное значение концентрации одного из продуктов реакции в момент времени t_k при концентрациях субстратов $[S_1^i]$ и $[S_2^j]$. (Можно включить аналогично данные о влиянии концентраций других продуктов на $[P_0^{ijk}]$ и v_0^{ij} .) Теоретические значения v и $[P]$ вычисляются, решая систему дифференциальных уравнений модели при фиксированных $[S_1]$ и $[S_2]$.

Поскольку параметрами модели являются константы скорости, $[P]$ и v будут функциями констант скоростей и, следовательно, минимизируя функционал Φ по указанным параметрам, можно добиться наилучшего совпадения теоретических и экспериментальных величин. Вид минимизируемого функционала выбран с учетом опыта работ многих исследователей, и особенно Дэвиса и Оттавея [7] и Оттавея [8, 9], специально занимавшихся вопросами влияния нормализации на поиск констант.

Согласно литературе [7, 10—12], наилучшими методами для отыскания минимума функционала (по эффективности) являются метод сопряженных градиентов Флетчера и Поуэлла [13] и метод сопряженных направлений Поуэлла [14]. Нами использовался с некоторыми изменениями метод Поуэлла, хотя и менее эффективный, чем метод сопряженных градиентов, но не требующий оценки ни первой, ни второй производных минимизируемой функции, что очень важно в тех случаях, когда получение явной зависимости этой функции от параметров модели связано с большими трудностями.

Наш опыт поиска констант скоростей для механизмов различной сложности показал, что поиск минимизацией функционала Φ себя не оправдывает по следующим причинам: 1) даже использование полного набора экспериментальных данных, обеспечивающих однозначность нахождения констант, не исключает трудностей отыскания глобального минимума, 2) затраты вычислительного времени при этом чрезвычайно велики из-за сильной зависимости успеха поиска от начального приближения, причем поиск осуществлять тем труднее, чем больше экспериментальных данных принимается во внимание и чем сложнее предполагаемый механизм.

Заключение. В настоящей работе предлагаются подходы к обработке экспериментальной информации, которые позволяют свести к минимуму долю подгонки параметров модели, описывающей механизм, представленный на схеме. Показано, что из серии зависимостей $\frac{[P]}{t^l}$ ($l = 1, 2, \dots$) от времени, построенных по экспериментальным значениям концентрации конечного продукта в различные моменты времени, можно определить число стадий (n) ферментативной реакции. Получен ряд соотношений между константами и данными предстационарной кинетики, позволяющих однозначно определить константы присоединения обратимо образующихся продуктов. Для предельных случаев схемы, когда субстраты присоединяются к ферменту независимо или последовательно, однозначно определяются константы образования фермент-субстратных комплексов. Получены формулы, которые дают возможность, комбинируя эксперименты по стационарной и предстационарной кинетике, 1) однозначно определить константы всех стадий, на которых обратимо образуются продукты, если

эти стадии идут одна за другой (в любом месте цепочки), кроме первой, 2) однозначно определить все константы, если цепь превращения тройного фермент-субстратного комплекса, заканчивающаяся освобождением фермента, содержит (у начала) не более одной стадии внутренней перестройки комплекса, не сопровождающейся выделением продукта (если таких стадий две, для четырех констант получим не более чем по два значения, остальные константы определятся однозначно).

Получены характеристические уравнения для механизмов с $L = 3, 4, 5$, позволяющие без просчета системы дифференциальных уравнений, соответствующих механизму, 1) отказаться от предполагаемого механизма, если он ни при каких значениях констант не обеспечивает установление стационарного режима за времена, характерные для ферментативных реакций, 2) оценить константы в тех случаях, когда данных для их однозначного определения недостаточно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дроздов-Тихомиров Л. Н., Скурида Г. И. (1975) Биорган. химия, 1, 1505—1515.
2. Darvey J. G. (1968) J. theor. biol., 19, 215—231.
3. Darvey J. G., Prokhovnik S. J., Williams J. F. (1966) J. theor. biol., 11, 459—464.
4. Уэстли Дж. (1972) Ферментативный катализ, (Мир), М.
5. Кори Г., Кори Т. (1974) Справочник по математике для научных работников и инженеров, с. 40, «Наука», М.
6. Garfinkel D., Garfinkel L., Pring M., Green S. B., Chance B. (1970) Annual. Rev. Biochem., 39, 473—498.
7. Davis R. H., Ottaway J. H. (1972) Math. Biosci., 13, 265—282.
8. Ottaway J. H. (1971) Biochem. J., 125, 44—45.
9. Ottaway J. H. (1973) Biochem. J., 134, 737—743.
10. Atkins G. L. (1973) Eur. J. Biochem., 33, 175—180.
11. Atkins G. L. (1971) Biochim. et biophys. acta, 252, 405—420.
12. Silvers A., Hess R. E., Sanders W. J. (1970) Math. Biosci., 7, 421—434.
13. Fletcher R., Powell M. J. D. (1963) Computer J., 6, 163—168.
14. Powell M. J. D. (1964) Computer J., 7, 155—162.

Поступила в редакцию
7.V.1975

THE CALCULATION OF KINETIC CONSTANTS FOR THE ANTHRANILATE SYNTHETASE CATALYZED FORMATION OF ANTHRANILATE. II. THE USE OF PRESTEADY STATE KINETICS AND THE DATA ON THE LENGTH OF THE STEADY STATE SETTLING

DROZDOV-TIKHOMIROV L. N., SCOURIDA G. I.

*All-Union Research Institute of Genetics and Selection
of Industrial Microorganisms, Moscow*

Presenting time dependence of the concentration of components of a two — substrate enzymic reaction with sequential products formation as a power function, correlations between kinetic constants in the presteady state period of the reaction can be obtained from which the rate constants for enzyme-substrate and enzyme-product complexes formation can be determined. Combining steady state and presteady state experiments, it is possible to find out the most probable mechanism and to determine all the pertinent constants for the mechanisms including only the enzyme—substrate complex conversion steps connected with product formation. Characteristic equations are drawn for mechanisms with $L = 3, 4$ or 5 , which allow: 1) to estimate lower and upper limits of possible constant values in the cases with lack of adequate data for their unambiguous determination, 2) to reject a proposed mechanism of steady state if it cannot be achieved with any constant values within the intervals found in the experiment.