



УДК 547.963.32

## НАЧАЛЬНАЯ СКОРОСТЬ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ РЕАГЕНТАМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ АКТИВНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ЧАСТИЦЫ

*Горшкова И. И., Кюрре Д. Г.*

*Институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Выведено уравнение для зависимости начальной скорости,  $v_0$ , аффинной модификации биополимера E реагентом X, образующим в лимитирующей стадии активные промежуточные частицы P в присутствии неактивного аналога реагента L, от начальных концентраций компонентов  $e_0$ ,  $x_0$  и  $l_0$ . Образование продукта модификации E проходит по двум путям (в скобках указаны константы скорости стадий): 1)  $E\bar{X} \rightarrow E\bar{P} (k_0\gamma)$ ,  $E\bar{P} \rightarrow E\bar{Z} (k_1)$ ; 2)  $X \rightarrow P (k_0)$ ,  $P + E \rightleftharpoons EP (k_p, k_{-p})$ ,  $EP \rightarrow EZ$ , причем P может параллельно реагировать с водой ( $k_2$ ). Уравнение для  $v_0$  и для скоростей по отдельным путям  $v_0^{(1)}$  и  $v_0^{(2)}$  содержит в качестве параметров константы ассоциации X и L с E,  $K_x$  и  $K_l$  и величины  $k_0$ ,  $\gamma$ ,  $y_2 = k_{-p}/k_1$  и  $y_1 y_2 = k_p/k_2 K_x$ . Доля реакции по второму пути возрастает с ростом  $y_1 y_2$  и уменьшением  $K_x e_0$ . При  $v_0^{(2)} \gg v_0^{(1)}$

в определенных условиях величина  $v_0$  мало зависит от концентрации  $l_0$ , т. е. отсутствует защитное действие L (субстрата, эффектора) от модификации. Константа диссоциации комплекса EX, определяемая из зависимости  $v_0$  от  $x_0$ , в этом случае может на несколько порядков превышать истинную величину  $1/K_x$ . При преобладании реакции по первому пути возможно наличие максимума на кривой зависимости  $v_0$  от  $x_0$ . Таким образом, некоторые общепринятые критерии и количественные характеристики аффинной модификации, выведенные для случая прямого взаимодействия аффинного реагента с биополимером в комплексе, могут не выполняться в случае механизма, включающего образование активных промежуточных частиц.

Количественная обработка данных по кинетике аффинной модификации биополимера E реагентом X обычно проводится в предположении, что процесс протекает по схеме (1) [1]



где EX — комплекс биополимера с реагентом, EZ — продукт модификации. Согласно этой схеме, единственным химическим превращением, принимаемым во внимание при выводе кинетического уравнения, является реакция биополимера с реагентом в комплексе. Если концентрация EX квазиравновесна, то начальная скорость аффинной модификации равна

$$v_0 = \frac{k_0 e_0}{1 + \frac{K_d}{[X]}}, \quad (2)$$

где  $K_d$  — константа диссоциации комплекса EX,  $k_0$  — константа скорости мономолекулярного превращения в комплексе. В случае, когда реагент присутствует в достаточном избытке по сравнению с биополимером, уравнение (2) приводится к виду

$$v_0 = \frac{k_0 e_0}{1 + K_d/x_0}, \quad (3)$$

где  $x_0$  — полная начальная концентрация реагента.

Это выражение дает возможность из зависимости  $v_0$  от  $x_0$  определить константу диссоциации  $K_d$ , характеризующую сродство реагента к биополимеру, и константу скорости  $k_0$ . Если одновременно с реагентом в системе находится нереакционноспособный лиганд L, аналогом которого является рассматриваемый аффинный реагент, например субстрат, эффектор и т. п., то выражение для начальной скорости аффинной модификации принимает вид

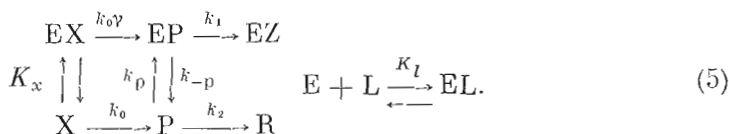
$$v_0 = \frac{k_0 e_0}{1 + \frac{K_d}{x_0} (1 + [L]/K_l)}, \quad (4)$$

где  $K_l$  — константа диссоциации комплекса EL. Из этого выражения следует, что L ведет себя как конкурентный ингибитор, т. е. защищает биополимер от аффинной модификации. На этом основан один из основных критериев, выполнение которого считается неотъемлемым атрибутом аффинной модификации, — защита биополимера от модификации природным лигандом [2].

В последнее время появились фотоаффинные реагенты, в которых процесс модификации включает образование активной промежуточной частицы — возбужденной молекулы или продукта ее превращения (например, бирадикалы нитрена, возникающие при облучении азидов) [3]. Для комплексментарно адресованной аффинной модификации нуклеиновых кислот были предложены и широко использованы производные олигонуклеотидов, содержащие ароматическую 2-хлорэтиламиногруппу, реагирующую через промежуточное образование этилениммониевого катиона [4, 5]. Аналогичные производные тРНК были предложены для аффинной модификации рибосом [6] и аминокил-тРНК-синтезас [7], а производные нуклеозидтрифосфатов — для митохондриальной АТФазы [8], РНК-зависимой ДНК-полимеразы *E. coli* [9] и креатинкиназы [10]. В связи с этим возникла необходимость рассмотреть, в какой степени кинетические уравнения и вытекающие из них качественные критерии, выведенные для реакции, протекающей по схеме (1), могут быть перенесены на этот тип превращений. Настоящая работа посвящена такому анализу.

### Анализ схемы процесса

Схема процесса аффинной модификации биополимера E реагентом X, образующим активные промежуточные частицы P в присутствии нереакционноспособного лиганда, может быть записана в виде



Эта схема является несколько усложненным вариантом схемы, рассмотренной в работе [11] при выводе уравнения для зависимости предельной степени модификации биополимера от избытка аффинного реагента (изотермы химической модификации). Усложнения состоят в

том, что образование активной промежуточной частицы в растворе и в составе комплекса EX рассматривается как два процесса, идущие с различными константами скорости, отношение которых равно  $\gamma$ . Кроме того, учитывается возможность присутствия в смеси наряду с аффинным реагентом X нереакционноспособного природного лиганда или его аналога L. В отличие от схемы, приведенной в работе [11], в настоящую схему не введено образование комплекса E с продуктом превращения X в растворе R, поскольку речь идет о начальной скорости, когда этот продукт еще не успел образоваться.

Ниже нас в основном будет интересовать зависимость начальной скорости модификации  $v_0$  от начальной концентрации реагента  $x_0$  при некоторой суммарной концентрации биополимера  $e_0$ . Прежде чем приводить выражение, описывающее эту зависимость, проанализируем схему (5).

В отличие от схемы (1) у нее два пути образования продукта модификации EZ. Первый путь



представляет собой превращение в комплексе. По второму пути



активная промежуточная частица P образуется в растворе и затем специфично взаимодействует с полимером E, образуя комплекс EP, далее превращающийся в продукт модификации EZ.

Первый путь в значительной мере аналогичен процессу, описываемому схемой (1), с той лишь разницей, что процесс проходит в две стадии, первая из которых является лимитирующей. Однако не весь EP, образовавшийся по этому пути, превращается в EZ. Некоторая часть EP может диссоциировать и превратиться в нереакционноспособный аналог R. Доля EP, непосредственно превращающаяся в EZ, может быть представлена как отношение скорости превращения EP в EZ к сумме скоростей превращения EP в EZ и диссоциации EP на E и P

$$\frac{k_1[\text{EP}]}{k_1[\text{EP}] + k_{-p}[\text{EP}]} = \frac{1}{1 + \frac{k_{-p}}{k_1}},$$

т. е. зависит от отношения констант скоростей  $k_{-p}/k_1$ , которое мы в дальнейшем будем обозначать как  $y_2$ . Заметим, что диссоциация EP на E и P еще не означает безвозвратную потерю для модификации активной промежуточной частицы P, так как эта диссоциация обратима. Однако для обращения этого процесса необходимо наличие свободной, т. е. не связанной с реагентом или его аналогом, формы полимера E. Содержание этой формы на начальной фазе реакции определяется количеством реагента X и аналога L. С увеличением  $x_0$ , т. е. с увеличением избытка реагента, концентрация E будет падать, стремясь к нулю при больших избытках реагента. Отсюда можно заключить:

1) при больших избытках реагента предельная начальная скорость по первому пути должна стать равной скорости превращения EX в EP, умноженной на долю EP, непосредственно превращающегося в продукт модификации. Поскольку при больших избытках реагента практически весь полимер ( $e_0$ ) находится в форме комплекса EX, предельную начальную скорость реакции по первому пути при больших избытках реагента можно записать в виде

$$(v_0^{(1)})_{x_0 \rightarrow \infty} = \frac{k_0\gamma e_0}{1 + y_2};$$

2) увеличение концентрации реагента, с одной стороны, увеличивает долю полимера, находящуюся в форме ЕХ, что способствует увеличению скорости модификации по первому пути. С другой стороны, при этом увеличивается доля ЕР, превращающегося в нереакционноспособный аналог R, поскольку с увеличением  $x_0$  уменьшается количество свободного полимера E и становится все менее обратимым процесс диссоциации ЕР. Это должно приводить к уменьшению скорости накопления ЕЗ. Поэтому можно ожидать, что при некоторых значениях кинетических параметров зависимость  $v_0^{(1)}$  от  $x_0$  будет проходить через максимум;

3) при умеренных избытках X начальная скорость модификации по первому пути в значительной мере должна определяться концентрацией ЕХ и, следовательно, зависимость начальной скорости от  $x_0$ , как и в случае процесса, протекающего по схеме (1), будет отражать сродство X к полимеру. Тем самым из этой зависимости можно оценивать константу диссоциации  $K_d$  по уравнению (2). Аналог L должен конкурировать с X за полимер, его присутствие будет снижать концентрацию ЕХ и тем самым снижать скорость модификации. Следовательно, на первом пути должен наблюдаться эффект защитного действия природного лиганда или его аналогов от модификации (и тем самым инактивации) рассматриваемого биополимера.

Начальная скорость модификации по второму пути определяется скоростью образования промежуточных частиц P, равной  $k_0 x_0$ , и долей этих частиц, образующих комплекс ЕР. Последняя может быть представлена как отношение скорости образования комплекса ЕР из E и P к сумме скоростей образования комплекса и скорости превращения P в R

$$\frac{k_p [E] [P]}{k_p [E] [P] + k_2 [P]} = \frac{k_p [E]}{k_p [E] + k_2}$$

При не очень малых значениях [E] эта доля может быть близка к единице; следовательно, скорость реакции по второму пути может быть близка к величине  $k_0 x_0$  и на ней не должно сказываться присутствие природного лиганда или его аналога L.

Таким образом, можно ожидать, что при определенных значениях кинетических параметров L не будет оказывать защитного действия от инактивации полимера реагентом X. Если второй путь преобладает, то в целом при этих значениях параметров процесс аффинной модификации не будет чувствителен к присутствию природного лиганда, т. е. не будет выполняться один из критериев, считающихся неотъемлемым признаком аффинной модификации.

Поскольку концентрация свободного полимера должна быть тем выше, чем ниже сродство реагента X к полимеру, т. е. чем ниже  $K_x$ , то можно ожидать, что доля второго пути в общем превращении будет возрастать с уменьшением  $K_x$ , а также с уменьшением константы скорости  $k_2$  и увеличением константы скорости  $k_p$ .

### Кинетическое уравнение для начальной скорости аффинной модификации

Вывод кинетического уравнения дан в приложении. Он проведен в предположении, что концентрация ЕХ квазиравновесна, а концентрации активных промежуточных частиц P и ЕР квазистационарны. При выводе применен вероятностный метод, предложенный в работе [12], поскольку он дает возможность отдельно получить для скоростей выражения по двум путям. Обычный вывод, основанный на применении условия квазистационарности, естественно, приводит к тому же выражению для суммарной скорости аффинной модификации. Кинетическое уравнение

записывается в виде

$$v_0 = \frac{k_0 x_0 K_x [E]_0}{1 + K_x [E]_0} \cdot \frac{\gamma(1 + K_x [E]_0 y_1 y_2) + y_1 y_2}{1 + y_2 + K_x [E]_0 y_1 y_2}, \quad (8)$$

где  $[E]_0$  определяется из соотношения

$$[E]_0 + \frac{K_x [E]_0 x_0}{1 + K_x [E]_0} + \frac{l_0 K_l [E]_0}{1 + K_l [E]_0} = e_0, \quad (9)$$

а параметры  $y_1$  и  $y_2$  равны

$$y_1 = \frac{k_1}{k_2} \cdot \frac{k_p}{k_{-p} K_x}, \quad y_2 = \frac{k_{-p}}{k_1},$$

в уравнении (9)  $l_0$  — полная концентрация L.

Выражения (8) и (9) дают зависимость начальной скорости  $v_0$  от  $x_0$  и  $e_0$  и от параметров  $K_x$ ,  $K_l$ ,  $k_0$ ,  $\gamma$ ,  $y_1$ ,  $y_2$ .

Скорости по отдельным маршрутам равны

$$v_0^{(1)} = \frac{k_0 \gamma x_0 K_x [E]_0}{1 + K_x [E]_0} \cdot \frac{1 + K_x [E]_0 y_1 y_2}{1 + y_2 + K_x [E]_0 y_1 y_2}, \quad (10)$$

$$v_0^{(2)} = \frac{k_0 x_0 K_x [E]_0}{1 + K_x [E]_0} \cdot \frac{y_1 y_2}{1 + y_2 + K_x [E]_0 y_1 y_2}. \quad (11)$$

По мере увеличения концентрации реагента концентрация свободного полимера  $[E]_0$  стремится к нулю. Отсюда из уравнения (9) нетрудно получить

$$\lim_{x_0 \rightarrow \infty} (K_x [E]_0 x_0) = e_0. \quad (12)$$

Это позволяет из уравнений (8), (10) и (11) получить выражение для предельной (при больших избытках реагента) скорости процесса в целом и скоростей по отдельным путям

$$(v_0)_{x_0 \rightarrow \infty} = \frac{k_0 \gamma e_0}{1 + y_2} \left(1 + \frac{y_1 y_2}{\gamma}\right); \quad (v_0^{(1)})_{x_0 \rightarrow \infty} = \frac{k_0 \gamma e_0}{1 + y_2};$$

$$(v_0^{(2)})_{x_0 \rightarrow \infty} = \frac{k_0 e_0 y_1 y_2}{1 + y_2}. \quad (13)$$

Выражение для  $(v_0^{(1)})_{x_0 \rightarrow \infty}$  совпадает с полученными ранее из полуколичественного рассмотрения схемы.

При традиционном рассмотрении процесса аффинной модификации по схеме (1) значение максимальной начальной скорости, рассчитываемое по (3), равно произведению константы скорости реакции в комплексе на полную концентрацию биополимера. В рассматриваемом случае такой величиной является  $k_0 \gamma e_0$ . Из выражения (13) видно, что наблюдаемая максимальная скорость может существенно отличаться от этой величины как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения в зависимости от величины отношения  $y_1/\gamma$ . Например, если  $y_1/\gamma \ll 1$ , а  $y_2 \gg 1$ , то  $(v_0)_{x_0 \rightarrow \infty} \ll k_0 \gamma e_0$ .

Отношение скоростей по маршрутам составляет

$$\frac{v_0^{(2)}}{v_0^{(1)}} = \frac{y_1 y_2}{\gamma(1 + K_x [E]_0 y_1 y_2)}. \quad (14)$$

Вклад второго пути в общую скорость образования продукта аффинной модификации падает по мере увеличения  $K_x [E]_0$ . Эта величина растет с увеличением  $x = K_x e_0$  (см. приложение). Поскольку величина  $[E]_0$  тем больше, чем меньше  $x_0$ , то при малых избытках реагента и при больших

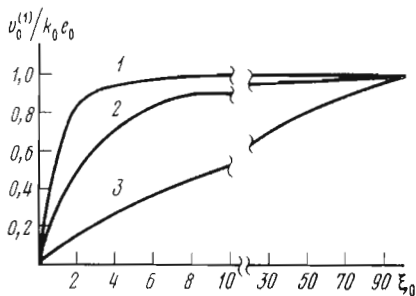


Рис. 1

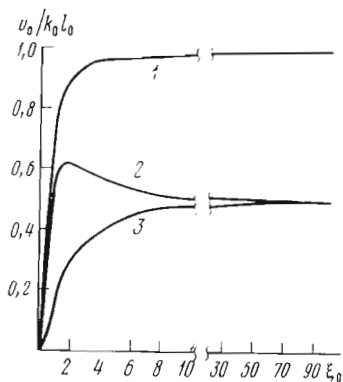


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость начальной скорости аффинной модификации, протекающей по схеме (5) по первому пути, от избытка реагента  $\xi_0$  в отсутствие лиганда (1) и в присутствии природного лиганда при  $\eta_0=1$  и 10 (2 и 3 соответственно) для случая  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=0,01$ ,  $y_2=0,01$ ,  $\kappa=10$  (преобладание первого пути, нормальный защитный эффект природного лиганда)

Рис. 2. Зависимость общей начальной скорости аффинной модификации, протекающей по схеме (5) (1), и скоростей по первому и второму путям (2 и 3 соответственно) от избытка реагента  $\xi_0$  при  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=1$ ,  $y_2=1$ ,  $\kappa=10$  (преобладание первого пути при малых  $\xi_0$ , равный вклад двух путей при больших  $\xi_0$ )

и преобладает первый путь. Из уравнения (12) следует, что при больших избытках реагента  $x_0 \rightarrow \lim K_x [E]_0 = 0$  и, следовательно, вклад второго пути существенно определяется только величиной произведения параметров, которое равно

$$y_1 y_2 = \frac{k_p}{k_2 K_x}$$

и увеличивается по мере увеличения этого произведения, особенно при малых значениях  $K_x [E]_0$ . Увеличение коэффициента  $\gamma$  приводит к увеличению вклада первого пути.

### Рассчитанные зависимости начальной скорости аффинной модификации от избытка реагента

Из сказанного в предыдущем разделе видно, что особенности кинетики аффинной модификации определяются особенностями пути, который преобладает при заданных значениях  $y_1, y_2, \xi_0^*, \eta_0^*, \kappa, y_2$  и  $\gamma$ . Описанные явления могут быть продемонстрированы следующими примерами. Из выражения (14) следует, что при малых значениях  $y_1, y_2$  должен преобладать первый путь образования продукта аффинной модификации. Рассчитанная зависимость начальной скорости по первому пути  $v_0^{(1)}/k_0 e_0$  от  $\xi_0$  практически совпадает с зависимостью общей начальной скорости модификации  $v_0/k_0 e_0$  от  $\xi_0$  при данных значениях параметров (рис. 1, 1). Наличие в этом случае в реакционной смеси природного лиганда, взятого в эквивалентном количестве и в 10-кратном избытке по отношению к биополимеру, приводит к уменьшению скорости аффинной модификации при таких же избытках реагента над биополимером ( $\xi_0=1, \xi_0=10$ ) (рис. 1, 2 и 3)

\*  $\xi_0 = x_0/e_0$  — начальный мольный избыток аффинного реагента X по отношению к биополимеру.

\*\*  $\eta_0 = l_0/e_0$  — начальный мольный избыток субстрата (эффектора) L по отношению к биополимеру.

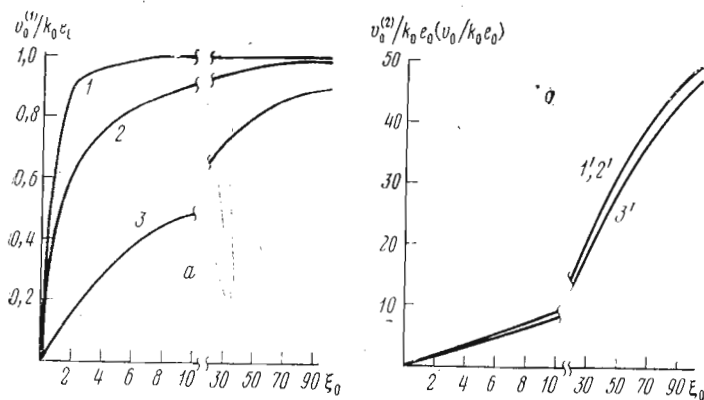


Рис. 3. Зависимость начальной скорости аффинной модификации, протекающей по схеме (5) по первому (а) и второму путям (б), от избытка реагента  $\xi_0$  в отсутствие (1 и 1') и в присутствии природного лиганда при  $\eta_0=1$  и 10 (2 и 2', 3 и 3' соответственно) при  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=100$ ,  $y_2=0,01$  и  $x=10$  (преобладание второго пути, отсутствие защитного эффекта природного лиганда)

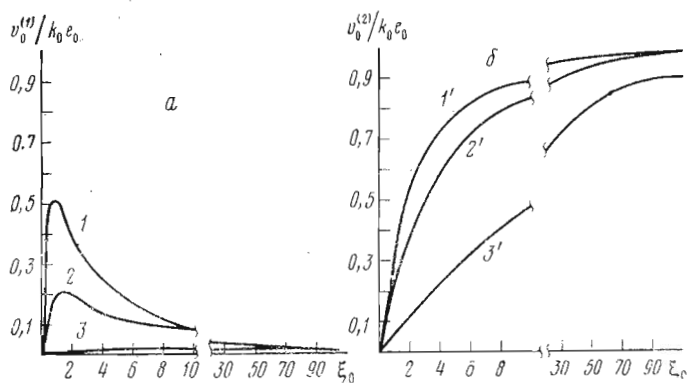
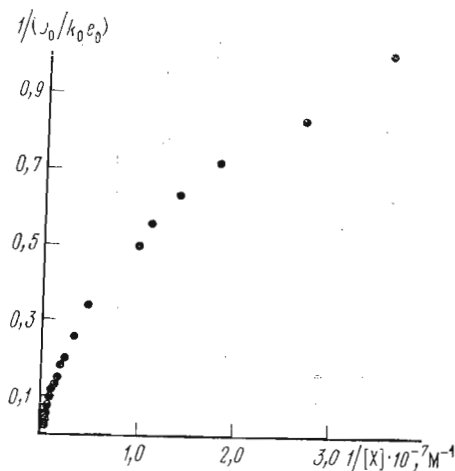


Рис. 4. Зависимость начальной скорости аффинной модификации, протекающей по схеме (5) по первому (а) и второму путям (б), от избытка реагента  $\xi_0$  в отсутствие (1 и 1') и в присутствии природного лиганда  $\eta_0=1$  и 10 (2 и 2', 3 и 3' соответственно) при  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=100$ ,  $y_2=100$  и  $x=10$  (равный вклад первого и второго путей при малых избытках реагента, преобладание второго пути при больших избытках реагента, защитный эффект природного лиганда на втором пути)

соответственно). Предельное значение  $v_0/k_0 e_0$  при  $\xi_0 \rightarrow \infty$  стремится к 1 в присутствии и в отсутствие лиганда, что соответствует значению, которое может быть получено по формуле (13). Из рис. 1 видно, что природный лиганд в этом случае ведет себя как конкурентный ингибитор аффинной модификации. При данных значениях параметров предельное значение  $v_0^{(2)}/k_0 e_0$  при  $\xi_0 \rightarrow \infty$  около 0,01.

Из уравнения (14) следует, что вклад второго пути в общую скорость модификации возрастает по мере увеличения  $y_1 y_2$  и при больших значениях  $x$  существенно зависит от величины избытка реагента  $\xi_0$ . Из рис. 2 видно, что при малых избытках реагента ( $\xi_0 < 5$ ) преобладает первый путь образования продукта модификации, а при  $\xi_0 > 5$  вклад от обоих путей примерно одинаков. Предельные значения общей начальной скорости и начальных скоростей по отдельным путям при  $\xi_0 \rightarrow \infty$  равны 1, 0,5 и 0,5 и соответствуют значениям, которые могут быть получены из уравне-

Рис. 5. Зависимость начальной скорости аффинной модификации, протекающей по схеме (5), от концентрации свободного реагента  $[X]$  в обратных координатах при  $l_0=0$ ,  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=100$ ,  $y_2=0,01$  и  $\kappa=10$ .



ния (13). Из рис. 2 видно также, что при данных значениях параметров на зависимости  $v_0^{(1)}/k_0 e_0$  от  $\xi_0$  наблюдается небольшой максимум, который, однако, не сказывается в этом случае на зависимости общей скорости модификации от  $\xi_0$ . Строгое доказательство наличия максимума в определенном диапазоне параметров дано в приложении.

Из уравнения (14) также следует, что дальнейшее увеличение  $y_1 y_2$  при прочих равных условиях должно приводить к резкому возрастанию доли второго пути в общем превращении. Из рис. 3 видно, что при заданных значениях параметров преобладает второй путь образования продукта модификации: предельное значение скорости модификации по второму пути при  $\xi_0 \rightarrow \infty$ , как следует из уравнения (13), около 100, в то время как по первому — около 1 (рис. 3а, 1). Из рис. 3 также видно, что на первом пути присутствие природного лиганда приводит к уменьшению скорости модификации (рис. 3а, 2, 3), в то время как скорость по второму пути, а следовательно, и общая скорость модификации при заданных значениях  $\gamma$ ,  $y_1 y_2$ ,  $y_2$  и  $\kappa$  практически не зависят от присутствия в реакционной смеси природного лиганда (рис. 3б, 1', 2' и 3'). Таким образом, при данном наборе параметров не выполняется один из критериев аффинной модификации, а именно защита полимера от модификации в присутствии природного субстрата, что подтверждает предположение, высказанное при анализе схемы процесса. Заметим, что отсутствие защитного действия не связано с тем, что рассматривается случай с довольно высоким значением  $\kappa$ . Такая же картина наблюдается при рассмотрении зависимости при тех же значениях параметров  $\gamma$ ,  $y_1$  и  $y_2$  и при  $\kappa=0,1$  (данные не приведены).

В случае увеличения значения  $y_2$  до 100 при малых избытках реагента ( $\xi_0 < 5$ ) скорости модификации по отдельным путям сравнимы (рис. 4). При  $\xi_0 > 5$  существенно преобладает второй путь: предельное значение скорости модификации по второму пути, как следует из уравнения (13), около 1, в то время как по первому — около 0,01. Из рисунка также видно, что на обоих путях присутствие лиганда, взятого в эквивалентном количестве и в 10-кратном избытке по отношению к биополимеру, приводит к уменьшению скорости модификации. Следовательно, и общая скорость модификации при данных значениях параметров уменьшается в присутствии природного лиганда, несмотря на преобладание второго пути.

Обычно количественные данные по кинетике аффинной модификации обрабатываются в предположении, что процесс протекает по схеме (1). Тогда, если концентрация ЕХ квазиравновесна, выполняется соотношение (2). Совпадение полученной из расчета по уравнению (2) константы диссоциации  $K_d$  с пайденной независимыми методами рассматривается как



Значения  $K_d$  и  $k_0$ , рассчитанные по уравнению (2) \* для зависимости  $v_0$  от  $[X]$  при  $\gamma=1$ ,  $K_x=10^8$  ( $K_d=10^{-8}$ ),  $e_0=10^{-7}$  ( $\kappa=10$ ) и указанных значениях  $y_1 y_2$  и  $y_2$

№ п.п.	$y_1 y_2$	$y_2$	$K_d^{\text{рассчит.}}/K_d$	$k_0^{\text{рассчит.}}/k_0$	Преобладающий путь
1	0,01	0,01	1	1	1
2	0,01	1	0,95	0,50	1
3	1	0,01	2,92	1,87	Сравнимы
4	1	1	1	1	»
5	100	0,01	136	22	2
6	100	1	110	18	2
7	100	100	1	1	2

\* Расчеты проводили на ЭВМ БЭСМ-6 с использованием стандартной программы минимизации функций D516. Зависимость  $v_0$  от  $[X]$  находили, решая систему уравнений (8) и (9) при  $x_0=1-100$ ,  $t_0=0$ .

важный аргумент в пользу того, что модификация является аффинной [2]. Выше мы показали, что процесс аффинной модификации с помощью реагентов, образующих активные промежуточные частицы, протекает по более сложной схеме (5) и включает два пути образования продукта модификации. Можно ожидать, что в условиях существования второго пути характер зависимости  $v_0$  от  $[X]$  будет существенно отличаться от уравнения (2) и расчет по нему может оказаться некорректным. В качестве примера мы приводим на рис. 5 рассчитанную по уравнениям (8), (9) зависимость  $v_0([X])$  для значений  $\gamma=1$ ,  $y_1 y_2=100$ ,  $y_2=0,01$ ,  $\kappa=10$  в координатах  $1/v_0$  и  $1/[X]$ , в которых зависимость (2) должна изображаться прямой линией. Видно, что эта зависимость резко отличается от прямолинейной. Уже из этого ясно, что формулой (2) для расчета констант диссоциации комплекса EX пользоваться нельзя. Более того, попытка использовать формулу (2) в качестве аппроксимации наблюдаемой зависимости  $v_0[X]$  может привести к параметру  $K_d$ , не имеющему ничего общего со сродством реагента к биополимеру. Мы провели минимизацию суммы квадратов относительных отклонений

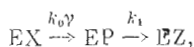
$$\sum \left[ \frac{v_0([X]) - k_0 e_0 / (1 + K_d/[X])}{v_0([X])} \right]^2$$

по параметрам  $k_0$  и  $K_d$  для нескольких рассчитанных зависимостей  $v_0([X])$ , выбирая для расчета по 10 точек на возрастающей части кривых. Результаты такого сопоставления приведены в таблице. Видно, что в двух случаях (№ 5 и 6) отношение рассчитанных значений  $K_d$  и  $k_0$  к истинным составляет 2–3 порядка. Отметим, что эти случаи соответствуют высоким значениям параметра  $y_1$ . В этих же случаях отсутствует заметное защитное действие природного лиганда на процесс модификации. В то же время в условиях преобладания первого пути (№ 1, 2) и в случае преобладания второго пути при  $y_1=1$  аппроксимация истинной зависимости с помощью уравнения (2) даст разумные величины  $K_d$  и  $k_0$ .

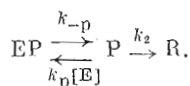
Авторы приносят благодарность Т. А. Чимитовой за интерес к работе и ценные замечания и А. Л. Куперштоху за помощь в составлении программ.

#### ПРИЛОЖЕНИЕ

Образование EZ по схеме (5) проходит по двум независимым путям. Первый путь



причем EP частично превращается в R по реакциям



Согласно предложенному в работе [12] вероятностному методу, скорость по этому пути  $v^{(1)}$  равна скорости превращения EX в EP, умноженной на вероятность  $\omega_1$  превращения EP в EZ. Последняя равна

$$\omega_1 = \frac{k_1}{k_1 + k_{-p}\omega_2},$$

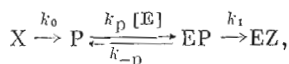
где  $\omega_2$  — множитель, учитывающий обратимость превращения EP в P,

$$\omega_2 = \frac{k_2}{k_2 + k_p[E]}.$$

Отсюда

$$v^{(1)} = k_0\gamma[\text{EX}]\omega_1 = k_0\gamma[\text{EX}] \frac{k_1}{k_1 + \frac{k_2k_{-p}}{k_2 + k_p[E]}} = k_0\gamma[\text{EX}] \frac{k_1(k_2 + k_p[E])}{k_1k_2 + k_2k_{-p} + k_1k_p[E]}. \quad (15)$$

Второй путь



причем P частично превращается в R с константой скорости  $k_2$ . Скорость по этому пути равна скорости превращения X и P, умноженной на вероятность  $\omega_3$  превращения P в EP. Последняя равна

$$\omega_3 = \frac{k_p[E]\omega_4}{k_2 + k_p[E]\omega_4},$$

где  $\omega_4$  — множитель, учитывающий обратимость превращения P в EP, равный

$$\omega_4 = \frac{k_1}{k_1 + k_{-p}},$$

и, следовательно,

$$v^{(2)} = k_0[X]\omega_3 = \frac{k_0k_1k_p[E][X]}{k_1k_2 + k_2k_{-p} + k_1k_p[E]}. \quad (16)$$

Величины  $[E][\text{EX}]$  и  $[X]$  связаны соотношением

$$\frac{[\text{EX}]}{[E][X]} = K_x.$$

Обозначая полную концентрацию X в растворе и в комплексе, т. е. сумму  $[X] + [\text{EX}]$  через  $x$ , получаем

$$[\text{EX}] = \frac{K_x[E]x}{1 + K_x[E]},$$

$$[E][X] = \frac{[E]x}{1 + K_x[E]}.$$

Подставляя эти выражения в уравнения (15) и (16), получаем выражения для скоростей по обоим путям в виде

$$v^{(1)} = \frac{k_0k_1\gamma K_x[E]x(k_2 + k_p[E])}{(1 + K_x[E])(k_1k_2 + k_2k_{-p} + k_1k_p[E])},$$

$$v^{(2)} = \frac{k_0k_1k_p[E]x}{(1 + K_x[E])(k_1k_2 + k_2k_{-p} + k_1k_p[E])},$$

или, выражая  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_p$ ,  $k_{-p}$  через параметры  $y_1 = k_1 k_p / k_2 k_{-p} K_x$  и  $y_2 = k_{-p} k_1$ ,

$$v^{(1)} = \frac{k_0 \gamma K_x [E] x}{1 + K_x [E]} \cdot \frac{1 + K_x [E] y_1 y_2}{1 + y_2 + K_x [E] y_1 y_2},$$

$$v^{(2)} = \frac{k_0 K_x [E] x}{1 + K_x [E]} \cdot \frac{y_1 y_2}{1 + y_2 + K_x [E] y_1 y_2}.$$

Из этих выражений непосредственно после замены  $[E]$  и  $x$  на значения  $[E]_0$  и  $x_0$ , соответствующие началу реакции, вытекает уравнение (8).

Выражение для  $E$  рассчитываем из соотношения материального баланса

$$[E] + [EX] + [EZ] + [EP] + [EL] = e_0,$$

где  $e_0$  — полная концентрация биополимера. Для начального момента времени, когда  $[EZ] = 0$  и  $[EP] = 0$ , с учетом того, что

$$[EL] = \frac{K_l l_0 [E]_0}{1 + K_l [E]_0},$$

получаем уравнение (9).

Поскольку зависимость  $[E]_0$  — концентрации свободного биополимера — от концентрации  $x_0$  монотонна (чем больше  $x_0$  при прочих равных условиях, тем, естественно, меньше остается свободного биополимера), наличие или отсутствие максимума на зависимости  $v_0$  от  $x_0$  или  $v_0^{(1)}$  от  $x_0$  означает наличие или отсутствие максимума на зависимости  $v_0$  от  $[E]_0$  или соответственно  $v_0^{(1)}$  от  $[E]_0$ . В случае монотонного увеличения  $v_0$  или  $v_0^{(1)}$  с ростом  $x_0$  функции  $v_0([E]_0)$  или  $v_0^{(1)}([E]_0)$  являются убывающими в интервале изменений  $[E]_0$  от 0 (этому соответствует  $x_0 = \infty$ ) до  $e_0$  при  $l_0 = 0$  или до величины положительного корня квадратного уравнения

$$K_l [E]_0^2 + (1 + l_0 K_l - e_0 K_l) [E]_0 - e_0 = 0,$$

если  $l_0$  отличается от нуля (этому соответствует  $x_0 = 0$ ), следовательно, их производные по  $[E]_0$  отрицательны во всем указанном интервале. Если же функции  $v_0([E]_0)$  или  $v_0^{(1)}([E]_0)$  имеют в этом интервале максимум, то их производные должны быть при  $[E]_0 = 0$  положительны. Выполняя дифференцирование и приравнявая в выражении для производных  $[E]_0$  нулю, нетрудно показать, что функция  $v_0^{(1)}([E]_0)$  имеет максимум при условии

$$K_x e_0 y_1 y_2^2 > (1 + l_0 K_l) (1 + y_2),$$

а функция  $v_0([E]_0)$  при условии

$$K_x e_0 \gamma y_1 y_2^2 > K_x e_0 y_1^2 y_2^2 + (\gamma + y_1 y_2) (1 + l_0 K_l) (1 + y_2).$$

Для нахождения зависимости  $K_x [E]_0$  от  $x = K_x e_0$  уравнение баланса можно преобразовать к виду

$$\frac{K_x [E]_0}{K_x} + \frac{x_0 K_x [E]_0}{1 + K_x [E]_0} + \frac{l_0 K_l [E]_0}{1 + K_l [E]_0} = e_0$$

или

$$\frac{K_x [E]_0}{x} + \frac{\xi_0 K_x [E]_0}{1 + K_x [E]_0} + \frac{l_0 \alpha K_x [E]_0}{1 + \alpha K_x [E]_0} = 1; \quad K_l = \alpha K_x.$$

Выполняя дифференцирование по  $K_x [E]_0$ , нетрудно получить

$$\frac{1}{x} - \frac{1}{x^2} \cdot \frac{dx}{d(K_x [E]_0)} + \frac{\xi_0}{(1 + K_x [E]_0)^2} + \frac{l_0 \alpha^2}{(1 + \alpha K_x [E]_0)^2} = 0,$$

$$\frac{dx}{d(K_x [E]_0)} = x + \frac{x^2 \xi_0}{(1 + K_x [E]_0)^2} + \frac{x^2 l_0 \alpha}{(1 + \alpha K_x [E]_0)^2}.$$

Следовательно,  $\frac{dx}{d(K_x [E]_0)} > 0$ , т. е. с ростом  $x$  растет величина  $K_x [E]_0$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kitz R., Willson J. B. (1962) J. Biol. Chem., 237, 3245—3249.
2. Theory and Practice in Affinity Techniques (1978) Sundaram P. V., Eckstein F., eds., pp. 239—241, Acad. Press, London — New York — San Francisco.
3. Knowles J. R. (1972) Accounts Chem. Res., 5, 155—160.

4. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1968) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., **12**, 118–124.
5. Grineva N. I., Karova G. G. (1973) FEBS Lett., **32**, 351–355.
6. Vochkareva E. S., Budker V. G., Girschovich A. S., Knorre D. G., Teplova N. M. (1971) FEBS Lett., **19**, 121–124.
7. Lavrik O. I., Khutoryanskaya L. P. (1974) FEBS Lett., **39**, 287–290.
8. Budker V. G., Kozlov I. A., Kurbatov V. A., Milgrom Ya. M. (1977) FEBS Lett., **83**, 11–14.
9. Бунева В. Н., Кудряшова Н. В., Курбатов В. А., Ромащенко А. Г. (1978) Биохимия, **43**, 2261–2263.
10. Газарянц М. Г., Мкртчян З. С., Персесова Л. С., Курбатов В. А., Кнорре Д. Г., Аюлян Ж. И. (1978) Докл. АН Арм. ССР, **3**, 160–163.
11. Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А. (1978) Молекулярн. биология, **12**, 814–821.
12. Кнорре Д. Г., Малыгин Э. Г. (1972) Докл. АН СССР, **207**, 1391–1393.

Поступила в редакцию  
11.V.1979

## INITIAL RATE OF AFFINITY LABELING BY THE REAGENTS FORMING ACTIVE INTERMEDIATES

GORSHKOVA I. I., KNORRE D. G.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The equation is derived for the initial rate of the affinity labeling a biopolymer E by reagent X, forming an active intermediate P at the rate-limiting step, in the presence of reagent unreactive analog L, as a function of the initial concentrations of the components  $e_0$ ,  $x_0$  and  $l_0$ . The formation of modification product E proceeds via two routes (the rate constants of the stages are given in brackets): 1.  $EX \rightarrow EP$  ( $\gamma k_0$ ),  $EP \rightarrow EZ$  ( $k_1$ ); 2.  $X \rightarrow P$  ( $k_0$ ),  $P + E \rightleftharpoons EP$  ( $k_p$ ,  $k_{-p}$ ),  $EP \rightarrow EZ$ , with P also reacting with water ( $k_2$ ). The equation for  $v_0(x_0)$  and that for the rates  $v_0^{(1)}$  and  $v_0^{(2)}$  of separate routes contain association constants of X and L with E,  $K_x$  and  $K_l$ , and values  $k_0$ ,  $\gamma$ ,  $y_2 = k_{-p}/k_1$  and  $y_1 y_2 = k_p/k_2 K_x$ , as parameters. The contribution of the second route into the total reaction rate grows with the increase in  $y_1 y_2$  and decrease in  $K_x e_0$ . At  $v_0^{(2)} \gg v_0^{(1)}$  under certain conditions  $v_0$  weakly depends on  $l_0$ , i. e. there is no protection of E by L (substrate, effector) against modification. The dissociation constant for EX calculated from the  $v_0$  dependence on  $x_0$  using traditional approaches may be several orders of magnitude higher than the true  $1/K_x$  value. If the first route prevails, the dependence of  $v_0$  versus  $x_0$  may have a maximum. Thus, some conventional criteria and quantitative characteristics of the affinity labeling deduced for a simple case of the affinity reagent direct interaction with a biopolymer in the complex, may not be valid for the cases involving the formation of reactive intermediate particles.