



УДК 577.158.45.02

## РАСЧЕТ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АНТРАНИЛАТСИНТЕТАЗОЙ

I. ВОЗМОЖНЫЕ СХЕМЫ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ И ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ  
КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ ПО ДАННЫМ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

*Дрездов-Тихомиров Л. Н., Скурида Г. И.*

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

Получены общие выражения для скорости двухсубстратной ферментативной реакции с неразветвленной цепочкой образования продуктов при упорядоченном и неупорядоченном присоединении субстратов к ферменту. Показано, что в случае последовательного присоединения субстратов данные стационарной кинетики позволяют однозначно определить только константы образования комплекса фермента с первым субстратом. Для случая независимого присоединения субстратов указаны три типа кинетических экспериментов, совокупность данных которых позволяет рассчитать все константы образования тройного фермент-субстратного комплекса, а для реакций, протекающих по механизмам, в которых все продукты, за исключением конечного, образуются обратимо, определить все константы скорости реакции. Предложенный метод может быть использован для уточнения механизма и расчета кинетических констант реакции образования антраниловой кислоты, катализируемой антранилацетатазой.

Знание механизма реакции позволяет получить описывающие кинетику процесса уравнения, в которые входят кинетические константы скоростей элементарных реакций. Сопоставляя реальную кинетику с зависящей от значений констант кинетики построенной математической модели, можно найти такие константы, при которых в обоих случаях данные кинетики совпадают. В качестве реальных кинетических данных могут быть использованы данные стационарной кинетики, данные о полном времени течения реакции, данные о стационарном состоянии системы.

Проще всего использовать данные о стационарном состоянии, поскольку расчет кинетики связан с использованием ЭВМ и требует, как показывает наш опыт и опыт других авторов [1, 2], больших затрат времени. Использование данных о стационарной фазе реакции оправдано еще и тем, что большинство экспериментальных исследований относится именно к этой фазе и состоит в измерении скорости реакции при различных концентрациях субстратов и достаточно малой глубине превращения компонентов реакции. Однако и в этом случае задача определения ряда констант скоростей продолжает оставаться довольно сложной.

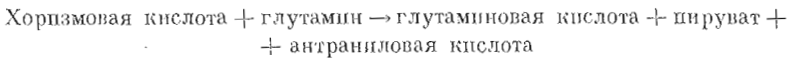
Вместе с тем необходимо использовать и временные характеристики, поскольку именно они часто определяют выбор схемы механизма реакции, как это показано, например, Бэйтсом и Фриденом [3]. Для этой цели ока-

залось весьма полезным применение приближенных методов расчета кинетики, предложенных Дарвеем и соавт. [4, 5] и Хоммесом [6].

В настоящей работе предпринята попытка сделать некоторый вклад в решение задачи определения кинетических констант и в частности выяснить, какой минимальный набор экспериментальных данных необходим для однозначного определения всех констант скоростей двухсубстратной ферментативной реакции, какие константы можно определить только по данным стационарной кинетики и какие, только дополнив эти данные результатами предстационарной кинетики, и т. д.

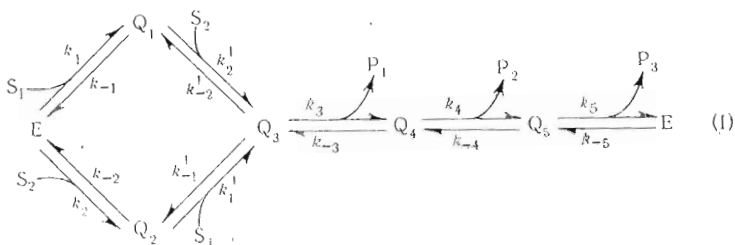
Причиной проведения настоящей работы является попытка построения адекватной математической модели биологического синтеза триптофана; именно этим обстоятельством обусловлен выбор схемы рассматриваемой реакции, однако рассмотрение проведено в общем виде и его результаты могут быть использованы при исследовании других двухсубстратных ферментативных реакций.

Как известно, первый продукт активности триптофанового оперона — антранилатсинтеза-5-фосфорибозилпирофосфатфосфорибозилтрансфераза — осуществляет две первые реакции при биосинтезе триптофана из хоризмовой кислоты в клетках *E. coli*. Превращение хоризмовой кислоты в антраниловую фермент катализирует по следующей схеме:



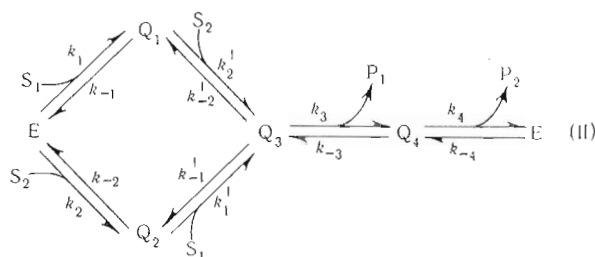
По данным Сринивазана [7], эта реакция включает перенос аминокислотной группы антраниловой кислоты от амидного азота глутамина на атом 2 хоризмовой кислоты, отщепление гидроксильной и енолпировальной групп, что сопровождается протонированием и образованием пирувата. Левин и Спринсон [8] считают, что в процессе превращения хоризмовой кислоты в антраниловую образуется промежуточное соединение — транс-2,3-диоксиантранилат. Поскольку реакцию катализирует только один фермент — антранилатсинтезаза, естественно предположить, что это вещество не выходит в раствор, а остается связанным с ферментом, как это предложил де Мосс [9] при исследовании соответствующего процесса в клетках *Neurospora crassa*. Далее, Тамир и Сринивазан [10, 11, 12] показали, что антранилат — синтезаза может образовывать комплекс с хоризмовой кислотой, а также при наличии хоризмовой кислоты комплекс ацил — фермент через  $\gamma$ -карбоксил глутаминовой кислоты. В общем на основании имеющихся в настоящее время данных, полученных при исследовании антранилатсинтезазы из разных бактерий, по-видимому, можно считать, что механизму реакции, катализируемой этим ферментом в клетках *E. coli*, соответствует схема, предложенная Нагано, Залкиным и Хендерсоном [13] для антранилатсинтезазы из клеток *Salmonella typhimurium*.

Простейшей схемой двухсубстратной ферментативной реакции образования антраниловой кислоты будет схема I.

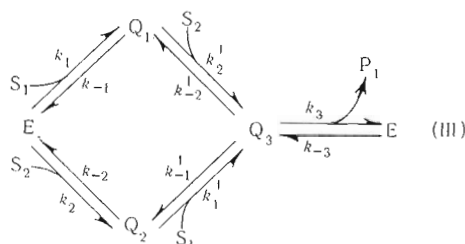


Не исключено, что на определенном этапе превращения  $Q_3 \rightarrow E$  образуется сразу два продукта, тогда кинетика накопления конечного про-

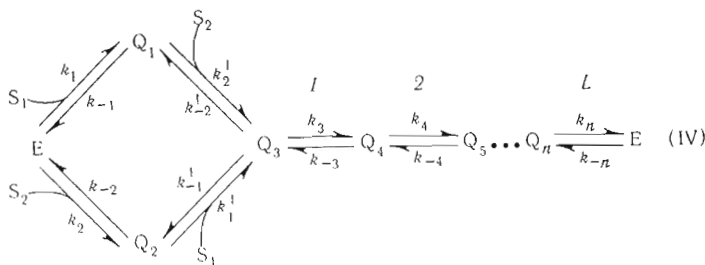
дукта может быть описана схемой II, в которой  $P_1$  или  $P_2$  — сумма двух продуктов.



Возможно, но мало вероятно, что комплекс  $Q_3$  сразу распадается на свободный фермент и продукты. В этом случае наиболее простой механизм реакции может быть представлен схемой III, где  $P_1$  — сумма трех продуктов.



Каждую из простейших схем можно усложнять путем введения стадий, связанных только с перестройкой промежуточных комплексов фермента, не сопровождающейся распадом на продукт и следующий комплекс. Все три представленные схемы можно рассматривать как частные случаи общей схемы IV, когда на любой из стадий превращения  $Q_3 \rightarrow E$  может выделяться один или несколько продуктов.



Необходимо отметить, что константы  $k_2$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_1'$  и  $k_{-1}'$  характеризуют степень упорядоченности присоединения субстратов, не известную пока для антранилатсинтазы, поскольку существующее в настоящее время мнение о том, что хоризмовая кислота является первым субстратом в реакции образования антраниловой кислоты, не достаточно обосновано.

Ферментативную реакцию можно считать стационарной, если концентрации субстратов значительно превышают концентрацию фермента и скорость изменения концентраций всех комплексов фермента равна нулю [14]. В этом случае величину скорости накопления продукта можно получить, решая систему алгебраических уравнений или применяя метод Кинга и Альтмана [15]. Для схем I—IV в соответствии с результатами Уонга и Ханеса [16] эта величина представляет собой дробь, числитель и знаменатель которой состоят из большого числа термов. Каждый терм — произведение констант скоростей элементарных реакций, представленных на

схемах, на концентрации субстратов в нулевой, первой и второй степенях и на концентрации продуктов в нулевой и первой степенях. Так как термов очень много, такое уравнение трудно анализировать. Обычно измеряют начальную стационарную скорость реакции, когда глубина превращения субстратов достаточно мала и концентрации продуктов можно положить равными нулю. Тогда уравнение скорости реакции упрощается и при определенных условиях может быть представлено в виде линейного уравнения типа

$$\frac{E_0}{v} = \Phi_0 + \frac{\Phi_1}{[S_1]} + \frac{\Phi_2}{[S_2]} + \frac{\Phi_3}{[S_1][S_2]}, \quad (1)$$

где  $E_0$  — концентрация фермента или активных центров, если их несколько на ферменте. Одним из обычно применяемых условий является предположение о быстром установлении равновесия между субстратами и двойными фермент-субстратными комплексами по сравнению с остальными стадиями реакции. Зависимость кинетических констант  $\Phi_0 - \Phi_3$  от констант скоростей при этом условии для схем II и III можно найти в работах Дальция [17] и Фридена [18]. Дальциль [19] рассмотрел еще одно условие, приводящее выражение для скорости к уравнению (1), которое может быть выполнено, если вести эксперимент при достаточно низких концентрациях субстратов:

$$k_2' [S_2] \ll k_{-1} \text{ и } k_1' [S_1] \ll k_{-2}. \quad (2)$$

В настоящей работе к полученным полным уравнениям начальной стационарной скорости реакции к схеме IV для двух предельных случаев: а) когда сродство фермента к субстрату не изменяется при присоединении к нему другого субстрата и б) когда второй субстрат не может связываться со свободным ферментом — применено условие (2), а также рассмотрены экспериментальные условия, при которых можно пользоваться предположением о «быстром равновесии», и проанализирован еще один тип условий проведения эксперимента, также обеспечивающий сведение этих уравнений к уравнению (1). Уравнения получены при следующих предположениях: 1) концентрация конечного продукта близка к нулю и 2) концентрации остальных продуктов поддерживаются постоянными. Это дает возможность ввести концентрации продуктов в соответствующие константы с отрицательными индексами, при этом равенство нулю константы  $k_{-i}$  может быть как следствием необратимости  $i$ -й стадии реакции, так и отсутствия продукта  $P_i$ .

Для случая а) получено уравнение (7), в котором  $T_0$  и  $T_1$  определены из уравнений (3) — (5), представленных в таблице, а  $\varphi([S_1], [S_2])$  — нелинейная функция концентраций субстратов.

$$\begin{aligned} \varphi([S_1], [S_2]) = & \frac{1}{k_1 [S_1] \left[ 1 + \frac{k_1 (K^1 + [S_1])}{k_2 (K^2 + [S_2])} \right]} + \frac{1}{k_2 [S_2] \left[ 1 + \frac{k_2 (K^2 + [S_2])}{k_1 (K^1 + [S_1])} \right]} + \\ & + \frac{1}{k_1 [S_1] \cdot k_2 [S_2] \left[ \frac{1}{k_1 (K^1 + [S_1])} + \frac{1}{k_2 (K^2 + [S_2])} \right]}, \end{aligned} \quad (6)$$

где  $K^i = k_{-i}/k_i$ . Если в уравнение

$$\frac{E_0}{v} = T_0 + T_1 \left( 1 + \frac{K^1}{[S_1]} \right) \left( 1 + \frac{K^2}{[S_2]} \right) + \varphi([S_1], [S_2]) \quad (7)$$

подставить приведенные в таблице значения (4) или (5), получим уравнения, полностью соответствующие приведенным ранее другими авторами [19, 20].

Таблица значений для  $T_0$  и  $T_1$  к уравнению (7) ( $L$  — число стадий на пути превращения  $Q_3 \rightarrow E$ )

| Механизм         | Число стадий на пути $Q_3 \rightarrow E$ | $T_0$  | $T_1$  |
|------------------|--|--|--|
| Схема I          | 3  | $\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_5}(1 + K^4)$   | $\frac{1}{k_3} + \frac{K^3}{k_4} + \frac{K^3 \cdot K^4}{k_5}$ (3)  |
| Схема II         | 2  | $\frac{1}{k_4}$  | $\frac{1}{k_3} + \frac{K^3}{k_4}$ (4)                              |
| Схема III        | 1  | 0  | $\frac{1}{k_3}$ (5)  |
| Общий (схема IV) | $L$                                      | $\frac{1}{k_4} + \sum_{i=5}^n \frac{1}{k_i} \left( 1 + \sum_{l=4}^{i-1} \prod_{m=l}^{i-1} K^m \right)$ | $\frac{1}{k_3} + \sum_{i=4}^n \frac{1}{k_i} \prod_{l=3}^{i-1} K^l$ |

Рассмотрим экспериментальные условия, при которых справедливо неравенство:

$$k_1 [S_1] + k_{-1} \ll k_2 [S_2] + k_{-2}. \quad (8)$$

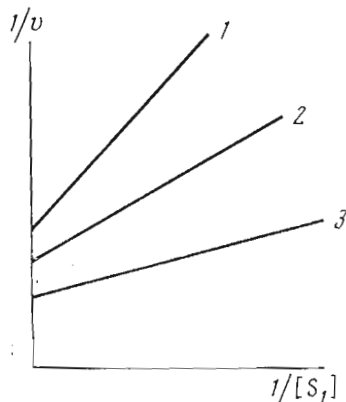
В этом случае уравнение (7) преобразуется в уравнение

$$\frac{E_0}{v} = T_0 + T_1 \left( 1 + \frac{K^1}{[S_1]} \right) \left( 1 + \frac{K^2}{[S_2]} \right) + \frac{1}{k_1 [S_1]} + \frac{1}{k_2 [S_2]} \left( 1 + \frac{K^1}{[S_1]} \right), \quad (9)$$

которое описывает семейство прямых, изображенных на рисунке. Нетрудно видеть, что эти прямые пересекаются в одной точке  $\left( -K^1, \frac{T_0 - \frac{1}{k_{-1}}}{E_0} \right)$ .

Для реакций, когда  $T_0 = \frac{1}{k_{-1}}$ , точка пересечения лежит на оси абсцисс.

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка при трех фиксированных концентрациях субстрата  $S_2$  для реакции, протекающей по схеме IV, если выполняется одно из условий: (2), (8), (12) или (13).  $[S_2]_1 < [S_2]_2 < [S_2]_3$ .



Уравнение (9) можно представить в виде  $1/v = A/[S_1] + B$ , где  $A$  и  $B$  являются функциями  $[S_2]$  — концентрации второго субстрата. В свою очередь зависимость  $A$  и  $B$  от  $[S_2]$  может быть представлена в виде  $A = \theta_a \cdot 1/[S_2] + Q_a$  и  $B = \theta_b 1/[S_2] + Q_b$ , где

$$\theta_a = \frac{K^1}{E_0} \left( \frac{1}{k_2} + T_1 K^2 \right), \quad \theta_b = \frac{1}{E_0} \left( \frac{1}{k_2} + T_1 K^2 \right),$$

$$Q_a = \frac{1}{E_0} \left( \frac{1}{k_1} + T_1 K^1 \right), \quad Q_b = \frac{1}{E_0} (T_0 + T_1). \quad (10)$$

Параметры  $\theta_a$ ,  $\theta_b$ ,  $Q_a$  и  $Q_b$  легко получить экспериментально, поэтому из системы уравнений (10) однозначно определяется константа равновесия  $K^1 = \theta_a/\theta_b$ , а константы  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $T_0$  можно выразить через  $T_1$  и  $K^2$ :

$$\frac{1}{k_2} = \theta_b E_0 - T_1 K^2, \quad \frac{1}{k_1} = Q_a E_0 - T_1 K^1, \quad T_0 = Q_b E_0 - T_1. \quad (11)$$

Выполняя аналогичный эксперимент при условии

$$k_1 [S_1] + k_{-1} \gg k_2 [S_2] + k_{-2}, \quad (12)$$

можно определить константу равновесия  $K^2$ . Добиться выполнения неравенств (8) и (12) можно, например, выбирая концентрацию одного субстрата на 2—3 порядка, а другого на 5—6 порядков больше концентрации фермента. Если при этом все же будет наблюдаться нелинейность, следует дальше увеличивать концентрацию второго субстрата. Если использовать концентрации обоих субстратов на 2—3 порядка больше, чем концентрация фермента, то, выбирая последнюю достаточно малой, можно удовлетворить условиям (2) и, следовательно, получить линейную зависимость, подобную той, что изображена на рис. 1. Экспериментальные значения наклонов вторичных прямых и отсекаемых ими на оси ординат отрезков дают следующие зависимости:

$$K^1 = \theta_a'/\theta_b', \quad K^2 = \theta_a'/Q_a',$$

$$T_0 = Q_b' E_0' - T_1, \quad k_{-1} + k_{-2} = \left( \frac{\theta_a' Q_a' E_0'}{\theta_a'} - T_1 \right)^{-1}.$$

Все прямые снова пересекаются в одной точке, координаты которой

$$-K^1, \frac{1}{E_0'} \left( T_0 - \frac{1}{k_{-1} + k_{-2}} \right).$$

Экспериментальные условия

$$\begin{aligned} k_1 [S_1] &\gg k_{-1} + k_{-2} \gg k_3, \\ k_2 [S_2] &\gg k_{-1} + k_{-2} \end{aligned} \quad (13)$$

позволяют пренебречь нелинейной частью  $\varphi([S_1], [S_2])$  в уравнении (7) и определить однозначно константы равновесия  $K^1$  и  $K^2$  и кинетические константы  $T_0$  и  $T_1$ :

$$K^1 = \theta_a''/\theta_b'', \quad K^2 = \theta_a''/Q_a'',$$

$$T_0 = E_0'' (Q_b'' - \theta_b'' Q_a''/\theta_a''), \quad T_1 = \theta_b'' E_0'' Q_a''/\theta_a''$$

и, следовательно, из уравнений (11) определить константы  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$ :

$$k_1 = (Q_a E_0 - Q_a'' E_0'')^{-1}, \quad k_{-1} = k_1 K^1,$$

$$k_2 = (\theta_b E_0 - \theta_b'' E_0'')^{-1}, \quad k_{-2} = k_2 K^2.$$

Условия (13) эквивалентны предположению о «быстром равновесии», так как при их выполнении выражение для скорости реакции имеет такой вид, какой получается, если кроме существования стационарного состояния предположить детальное равновесие на стадиях взаимодействия фермента с субстратами.

Таким образом, используя только зависимость начальной стационарной скорости реакции от концентраций субстратов, можно однозначно определить все константы уравнения (7), т. е. константы скорости стадий, когда непосредственно участвуют субстраты, и два уравнения, связывающие константы скорости остальных стадий реакции.

В случае б), т. е. когда субстраты последовательно присоединяются к ферменту, для схемы IV также имеем общее уравнение:

$$\frac{E_0}{v} = T_0 + T_1 \left[ 1 + \frac{K^2}{[S_2]} \left( 1 + \frac{K^1}{[S_1]} \right) \right] + \frac{1}{k_1 [S_1]} + \frac{1}{k_2 [S_2]} \left( 1 + \frac{K^1}{[S_1]} \right), \quad (14)$$

где  $T_0$  и  $T_1$  имеют прежние значения. Это уравнение линейно при любых концентрациях субстратов. Линии зависимости  $E_0/v$  от  $1/[S_1]$  пересекаются в точке, координаты которой

$$-K^1, (T_0 + T_1 - 1/k_{-1}),$$

а линии зависимости  $E_0/v$  от  $1/[S_2]$  — в точке с координатами

$$-K^1 (1 + k_{-2}T_1), (T_0 + T_1 - 1/k_{-1}).$$

Выражение (14) отличается от выражения (9) термом  $K^1 T_1 / [S_1]$ , поэтому теперь получим другие уравнения:

$$K^1 = \theta_a / \theta_b, k_1 = 1/Q_a,$$

$$T_0 + T_1 = Q_b, 1/k_2 + K^2 T_1 = \theta_b,$$

из которых видно, что экспериментов по изучению скорости реакции при изменении концентраций субстратов недостаточно для однозначного определения всех констант уравнения (14). Даже в случае механизма реакции, протекающей по схеме III, невозможно одновременно определить константы  $k_2$  и  $K^2$ , т. е. константы стадии образования тройного комплекса.

Очевидно, что механизмы с  $L > 1$  неразличимы с точки зрения скорости протекания реакции при изменении концентраций субстратов (что согласуется с исследованиями Блумфилда и соавт. [21]), поскольку для них путем подбора констант могут быть получены одни и те же величины  $T_0$  и  $T_1$ , и, следовательно, стационарная кинетика усложненного механизма будет совпадать с кинетикой простейшего механизма. Механизм реакции с  $L = 1$ , представленный на схеме III, может быть легко установлен, так как для него экспериментально определяемая величина  $T_0$  равна нулю.

Если теперь учесть, что на любой из стадий процесса  $Q_3 \rightarrow E$  могут образовываться продукты, то, исследуя зависимость стационарной скорости реакции от концентраций этих продуктов, т. е. исследуя процесс, называемый Клеландом [22] «ингибированием продуктами», нетрудно установить простейший механизм реакции и попытаться определить хотя бы некоторые константы. Допустим, что на стадии  $j$  обратимо образуется продукт  $P_j$ . Тогда, заменив в выражениях для  $T_0$  и  $T_1$  константу  $K^j$  на произведение  $P_j \cdot K^j$ , получим:

$$T_0 = \frac{1}{k_4} \sum_{i=5}^n \frac{1}{k_i} + \sum_{i=5}^j \frac{1}{k_i} \sum_{l=4}^{i-1} \prod_{m=l}^{i-1} K^m + [P_j] \sum_{i=j+1}^n \frac{1}{k_i} \sum_{l=4}^{i-1} \prod_{m=l}^{i-1} K^m,$$

$$T_1 = \frac{1}{k_3} + \sum_{i=4}^j \frac{1}{k_i} \prod_{m=3}^{i-1} K^m + [P_j] \sum_{i=j+1}^n \frac{1}{k_i} \prod_{m=3}^{i-1} K^m.$$

Для независимых механизмов  $T_0$  и  $T_1$  можно определить экспериментально при нескольких значениях  $[P_j]$  и, поступая аналогично для всех обратимо выделяющихся продуктов, получим дополнительные уравнения, связывающие константы. Нетрудно видеть, что в случае простейших механизмов этих уравнений достаточно, чтобы определить все параметры механизма реакции. Остановимся подробнее на механизмах реакций, представленных на схемах I и II, как наиболее вероятных для антранилатсинтетазы.

*Механизм I (схема I).* Используя уравнение (3), перепишем уравнение (7) следующим образом:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_5} + \frac{K^4 [P_2]}{k_5} + T_2 \left( \frac{1}{k_3} + \frac{K^3 [P_1]}{k_4} + \frac{K^3 K^4 [P_1] [P_2]}{k_5} \right) + T_3, \quad (15)$$

где концентрации продуктов вынесены из констант  $K^3$  и  $K^4$ , а величины  $T_2$  и  $T_3$  определяются только стадиями прямого взаимодействия фермента с субстратами и могут быть легко вычислены, так как представляют собой функции уже известных констант. Рассмотрим несколько возможных случаев.

1. Продукты  $P_1$  и  $P_2$  выделяются обратимо. Очевидно, что при фиксированном  $[P_2]$  уравнение (15) дает линейную зависимость  $1/v = A \cdot [P_1] + B$ , где  $A = X_a [P_2] + Y_a$ , а  $B = X_b [P_2] + Y_b$ . Нетрудно видеть, что между  $X_a, Y_a, X_b, Y_b$  и коэффициентами уравнения (15) существуют следующие соотношения, в которых  $[P_2^0]$  обозначает концентрацию продукта  $P_2$ , использованную при определении величины  $T_0$ :

$$K^3 = X_a/X_b/T_2, \quad K^4 = (T_0/X_b - [P_2^0] - Y_a/X_a)^{-1},$$

$$k_3 = [(Y_b - T_3 - T_0 + [P_2^0]X_b)/T_2]^{-1},$$

$$k_4 = X_a/X_b/Y_a, \quad k_5 = [T_0 - X_b([P_2^0] + Y_a/X_a)]^{-1}.$$

Все константы механизма I с независимым присоединением субстратов определяются однозначно.

2. Стадия 3 необратима. Тогда  $A = 0$  и однозначно определяются

$$k_3 = 1/T_1; \quad K^4/k_5 = X_b; \quad 1/k_4 + 1/k_5 = Y_b - T_1 T_2 - T_3.$$

3. Стадия 4 необратима, т. е.  $K^4 = 0$ . Тогда  $A$  и  $B$  постоянны и получим

$$k_3 = T_2/(B T_0 - T_3); \quad K^3/k_4 = A/T_2; \quad 1/k_4 + 1/k_5 = T_0.$$

4. Необратимы стадии 3 и 4 ( $K^3 = 0, K^4 = 0$ ). В этом случае  $A \equiv 0, B \equiv 0$  и

$$k_3 = 1/T_1; \quad 1/k_3 + 1/k_5 = T_0.$$

*Механизм II (схема II).* Поскольку теперь  $T_0 = 1/k_4$ , то  $k_4$  вычисляется однозначно из зависимости  $v$  от  $[S_1]$  и  $[S_2]$ . Если же  $k_{-3} = 0$ , найдем последнюю константу:  $k_3 = 1/T_1$ . В противном случае можно построить линейную зависимость  $1/v$  от  $[P_1]$  и определить константы  $k_3$  и  $k_{-3}$  из наклона  $A$  и отрезка  $B$ , отсекаемого этой прямой на оси ординат:

$$K^3 = A/T_0/T_2; \quad k_4 = 1/T_0; \quad k_3 = T_2/(B - T_3 - T_0); \quad k_{-3} = k_3 K^3.$$

Итак, когда продукты выделяются обратимо, для реакции, протекающей по механизмам I и II, можно однозначно определить все константы скорости. Однако, если в реакции, протекающей по механизму I или по более сложному механизму, продукты выделяются необратимо или если истинный механизм реакции отличается от простейшего хотя бы на одну стадию, полученные константы нельзя интерпретировать как истинные, и однозначное определение последних возможно лишь с использованием других методов, отличных от методов стационарной кинетики. В дальнейшем (работа в печати) нами будет показано, что, изучая кинетику реакции в предстационарный период, можно понять, за сколько стадий ( $L$ ) тройной фермент-субстратный комплекс  $Q_3$  преобразуется до свободного фермента и какие константы можно при этом определить.



Таким образом, механизмы последовательных двухсубстратных реакций с неразветвленным образованием продуктов характеризуются линейной зависимостью обратной величины скорости накопления конечного продукта реакции от обратных величин концентраций субстратов при любом числе стадий ( $L$ ) преобразования тройного комплекса до свободного фермента. При этом константы скорости входят в выражение для скорости реакции таким образом, что даже для самого простого механизма реакции (схема III;  $L = 1$ ) не удастся однозначно определить все константы.

Аналогичная зависимость для механизмов реакции с независимым присоединением субстратов имеет нелинейный характер, однако по крайней мере три типа экспериментальных условий обеспечивают сведение общей для всех  $L$  нелинейной части к линейному виду: а) концентрации обоих субстратов достаточно малы, б) концентрации обоих субстратов достаточно велики, так чтобы выполнялись условия (13) (тогда будет справедливо предположение о «быстром равновесии»), в) концентрация одного субстрата значительно превышает концентрацию другого. Каждый отдельно взятый тип эксперимента не дает возможности определить более 4 кинетических констант, но, комбинируя а) и в) или б) и в), можно однозначно определить все константы скорости, относящиеся к стадиям непосредственного взаимодействия фермента с субстратами. Кроме того, определяются кинетические константы  $T_0$  и  $T_1$ , представляющие собой алгебраические функции только констант оставшихся стадий. (Для механизма реакции III это означает, что вообще все константы определяются однозначно.) Интересно, что при выполнении любого из условий а) — в) прямые зависимости  $1/v$  от  $1/[S_1]$  пересекаются в одной точке, координаты которой представлены одинаковыми, равными  $-K^1$ , абсциссами, но разными, равными соответственно для условий а), б), в):  $(T_0 - \frac{1}{k_{-1} + k_{-2}}) / E_0$ ,  $T_0/E_0$ ,  $(T_0 - \frac{1}{k_{-1}}) / E_0$  ординатами. Аналогичные результаты получаются для зависимости  $1/v$  от  $1/[S_2]$ .

Необходимо отметить, что экспериментально определяемая величина  $T_0$  равна нулю, только когда реакция протекает по самому простому механизму (схема III;  $L = 1$ ), и что если экспериментально наблюдается линейная зависимость  $1/v$  от величин  $1/[S_1]$  и  $1/[S_2]$ , но нет уверенности в том, какие именно условия (а, б или в) выполняются, то, применив последовательно все три подхода, это нетрудно будет понять. В дальнейшем (работа в печати) на конкретном примере нами будет показано, что это действительно возможно.

Зависимость начальной скорости реакции от концентраций продуктов при фиксированных концентрациях субстратов имеет смысл исследовать для выяснения простейшего механизма реакции и для определения констант скоростей стадий, в которых субстраты прямого участия не принимают. Зависимость  $1/v$  от  $[P_j]$  во всех рассмотренных механизмах реакций линейна при любых концентрациях субстратов и продуктов; поэтому удастся однозначно (с точностью до порядка образования продуктов) определить все константы скорости реакций; протекающих по простейшим механизмам, в которых продукты выделяются обратимо (для механизмов реакций, представленных на схеме II и III, это можно сделать и в случае необратимости стадий образования продуктов), если субстраты взаимодействуют с ферментом независимо. Изучение ингибирования продуктами реакций, идущих по усложненным схемам, не приводит к однозначному определению констант скоростей стадий на пути превращения  $Q_3 \rightarrow E$  (схема IV).

Чтобы использовать на практике полученные соотношения для расчета констант по данным эксперимента, необходимо знать, какие ошибки в определении констант такими методами вносят погрешности эксперимента. Этот вопрос будет освещен в последующих публикациях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vergonet G., Berendsen H. J. C. (1970) *J. Theor. Biol.*, **28**, 155—173.
2. Garlinkel D. et al. (1970) *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 473—498.
3. Bates D. J., Frieden C. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7878—7884.
4. Darvey J. G. et al. (1966) *J. Theor. Biol.*, **11**, 459—464.
5. Darvey J. G. et al. (1968) *J. Theor. Biol.*, **19**, 215—231.
6. Hommes F. A. (1962). *Arch. Biochem. and Biophys.*, **95**, 28—31, 32—36.
7. Srinivasan P. R. (1965) *Biochemistry*, **4**, 2860—2865.
8. Levin J. G., Sprinson D. B. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 1142—1150.
9. De Moss J. A., (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1231—1235.
10. Tamir H., Srinivasan P. R. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **66**, 547—551.
11. Tamir H., Srinivasan P. R. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 1153—1155.
12. Tamir H., Srinivasan P. R. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3024—3029.
13. Nagano H., Zalkin H., Henderson E. J. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3810—3820.
14. Уэстли Дж. (1972) Ферментативный катализ, «Мир», М.
15. King E. L., Altman C. (1956) *J. Phys. Chem.*, **60**, 1375—1378.
16. Woung J. T., Hanes C. S. (1962) *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 763—804.
17. Delziel K. (1957) *Acta chem. scand.*, **11**, 1706—1723.
18. Frieden C. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1894—1896.
19. Dalziel K. (1958) *Trans. Faraday Society*, **54**, 1247—1253.
20. Ingraham L. L., Makower B. (1954) *J. Phys. Chem.*, **58**, 266—270.
21. Bloomfield V. et al. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4367—4374.
22. Cleland W. W. (1963) *Biochim. et biophys. acta*, **67**, 173—187.

Поступила в редакцию  
12.II.1975

### THE CALCULATION OF KINETIC CONSTANTS FOR THE ANTHRANILATE SYNTHETASE CATALYZED FORMATION OF ANTHRANILATE I. POSSIBLE REACTION MECHANISMS AND DETERMINATION OF KINETIC CONSTANTS FROM THE STEADY STATE KINETICS DATA

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

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

The general equations were derived for the rate of bireactant enzymatic reaction with unbranched process of product formation in both ordered and random substrate binding mechanisms. It is established that in the former case the steady state kinetics data allow to determine the rate constants only for the first enzyme-substrate complex. There are three types of kinetic experiments which enable one to calculate all the constants for the ternary enzyme-substrate complex in the case of random substrate binding. These methods were used to investigate the mechanism and to determine the kinetic constants of the anthranilate formation catalyzed by the anthranilate synthetase.