

УДК 577.151.01

**СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА
БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ.
УЧЕТ КИНЕТИЧЕСКОЙ ИЕРАРХИИ БЫСТРЫХ
И МЕДЛЕННЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ЦИКЛОВ
В ОБОБЩЕННОЙ МОДЕЛИ***

© 2007 г. П.В. Вржеш

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,
119992 Москва; факс: (495)939-4218, электронная почта: peter@genebee.msu.ru
Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова,
119992 Москва; факс: (495)939-5022

Поступила в редакцию 31.03.07
После доработки 26.05.07

Рассмотрено стационарное приближение для обобщенной двумерной модели бифункционального фермента, катализирующего независимое протекание двух одномаршрутных реакций, в случае взаимовлияния активных центров. Проанализирован случай наличия в реакционной схеме быстрых и медленных каталитических циклов. Определены условия, при которых иерархия быстрых и медленных каталитических циклов позволяет упрощать двумерную модель и редуцировать ее вплоть до одномерных циклических схем. Приведены кинетические уравнения, описывающие такие упрощенные случаи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бифункциональные ферменты, обобщенная кинетическая модель, критерии кинетического поведения.

В природе бифункциональные (полифункциональные) ферменты возникают, по-видимому, в ходе эволюции путем объединения генов, кодирующих функционально тесно связанные ферменты [1, 2]. Бифункциональные ферменты и бифункциональные ферментные комплексы содержат как минимум два активных центра и катализируют, как правило, две последовательные реакции [3, 4]. Эти особенности потенциально позволяют бифункциональным ферментам проявлять ряд новых специфических свойств. Во-первых, это возможный дрейф интермедиата (продукт первой реакции, он же субстрат второй реакции) между двумя активными центрами, без выхода интермедиата в раствор [4–6]. Во-вторых, состояние активного центра первой реакции может влиять на кинетические свойства активного центра второй реакции и наоборот [3, 4]. Для тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *Leishmania major* [3] и из *Toxoplasma gondii* [7], триптофансинтазы из *Salmonella typhimurium* [8], диметилглицинооксидазы из *Arthrobacter globiformis* [9] установлено

наличие дрейфа интермедиата, в то время как для тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *Cryptosporidium hominis* [10], ацетилтрансферазы-уридилатсинтазы из *Escherichia coli* [11] такой дрейф отсутствует. Для тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *L. major* [3], карбамоилфосфатсинтазы из *E. coli* [12], глутаминфосфорибозилпирофосфатамидотрансферазы из *E. coli* [13] отмечено влияние протекания одной реакции на кинетику другой реакции, в то время как для тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы из *C. hominis* [10] и из *T. gondii* [14] такого влияния не обнаружено. Заслуживает также внимания сообщение [15] о преимущественной конверсии эндогенного интермедиата (простагландина G₂) микросомальным бифункциональным ферментом простагландин-Н-синтазой и об исчезновении этого эффекта в случае применения очищенного фермента.

Указанные особенности кинетического поведения бифункциональных ферментов должны иметь адекватное кинетическое описание. Попытки описать кинетические особенности бифункциональных ферментов предпринимались неоднократно. В работах [16, 17] решались проблемы описания лаг-периодов и концентраций промежуточных продуктов при протекании

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 07-089, 05.08.2007.

последовательных реакций, катализируемых бифункциональными ферментами, и дискриминации механизмов, включающих дрейф интермедиата между активными центрами. Проводилось кинетическое описание работы бифункционального фермента тимидилатсинтазы-дигидрофолатредуктазы в случае, когда протекание одной реакции влияет на кинетику другой реакции [3, 14, 18]. Предпринимались попытки описания кинетических закономерностей бифункционального фермента простагландин-Н-синтазы [19, 20]. Следует отметить, что во всех указанных случаях не принимался во внимание факт независимого одновременного протекания двух катализируемых бифункциональным ферментом реакций, а рассматривались по сути модифицированные «одномерные» кинетические модели. Такое рассмотрение абсолютно неадекватно, так как наличие двух активных центров предусматривает независимое протекание двух реакций, что приводит к необходимости в кинетических схемах одновременно учитывать состояния первого и второго активных центров. Как следствие, интермедиаты в кинетических схемах должны характеризоваться двумя индексами (по одному индексу для определения состояния каждого активного центра). Учет независимого изменения двух индексов превращает кинетические схемы в «двумерные». Ранее [21] нами было рассмотрено стационарное приближение для обобщенных моделей многосубстратного бифункционального фермента, включая и двумерную схему. Было показано, что выражения для скорости ферментативных реакций в этом случае являются сложными зависимостями от концентраций субстратов и продуктов катализируемых реакций. Это должно приводить к существенному отклонению от часто встречающихся на практике гиперболических зависимостей типа уравнения Михаэлиса–Ментен.

Проблема чрезмерно сложных кинетических выражений общая для ферментативной кинетики [22–24]. Практика показывает, что учет иерархии скоростей частных реакций позволяет в ряде случаев существенно упрощать системы уравнений и получать хорошо согласующиеся с экспериментом кинетические выражения. Это относится к нашедшему свое обоснование в теореме Тихонова [25] широко распространенному квазистационарному приближению в химической кинетике (так называемый принцип стационарности Боденштейна), а также к квазиравновесному приближению в ферментативной кинетике [24].

Задачи данной работы – рассмотреть обобщенную кинетическую двумерную модель бифункционального фермента [21] и определить

условия, при которых наличие иерархии быстрых и медленных каталитических циклов позволяет двумерную модель редуцировать до одномерных циклических схем, анализ которых проведен в работах [26–29].

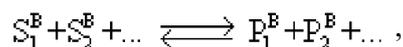
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Описание двумерной кинетической модели бифункционального фермента. Рассмотрим механизм действия бифункционального фермента [21] в общем виде. Такое рассмотрение, несмотря на некоторую громоздкость, имеет свои преимущества, так как априори нельзя точно сказать, сколько (и каких) различных промежуточных фермент-субстратных комплексов участвует в механизме действия того или иного фермента.

Пусть бифункциональный фермент E катализирует две реакции: реакцию А

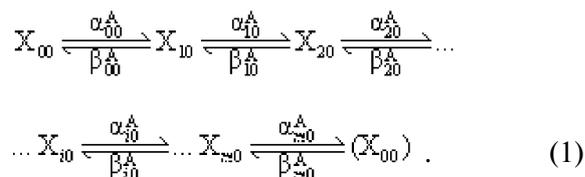


и реакцию В



где S_i^A и P_i^A – субстраты и продукты реакции А соответственно, S_i^B и P_i^B – субстраты и продукты реакции В соответственно. Один из продуктов катализируемой бифункциональным ферментом E реакции А может быть субстратом реакции В. В данной работе рассматривается случай, когда бифункциональный фермент E имеет два активных центра, на которых осуществляется катализ реакций А и В. При этом реакции А и В могут протекать независимо. Возникающие в ходе катализа промежуточные формы бифункционального фермента E будем обозначать символами X_{ij} , в которых первый и второй индексы отражают состояния активных центров реакций А и В соответственно.

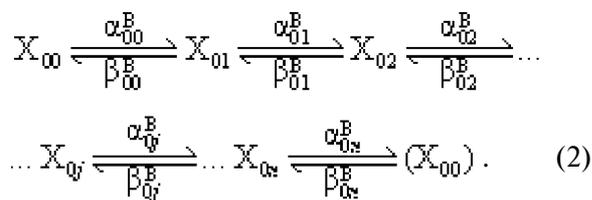
Предусматривается, что реакции А и В протекают по одномаршрутным механизмам. Механизм реакции А в отсутствие компонентов (т.е. субстратов и продуктов) реакции В будет иметь тогда следующий вид:



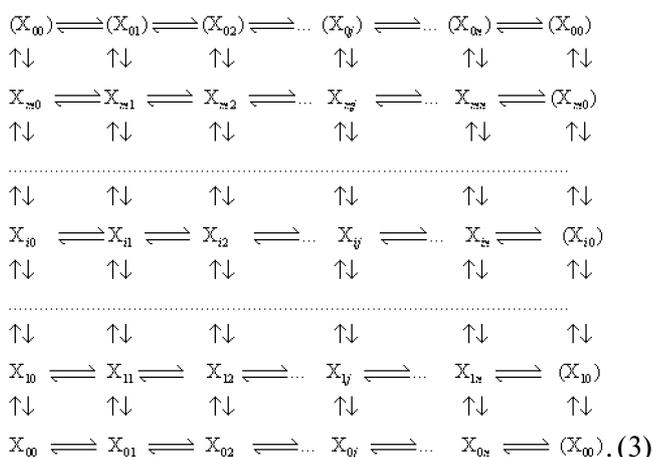
В данной записи состоянию активного центра реакции В присвоен индекс 0 (численное зна-

чение этого индекса не принципиально, принципиально то, что этот индекс не изменяется).

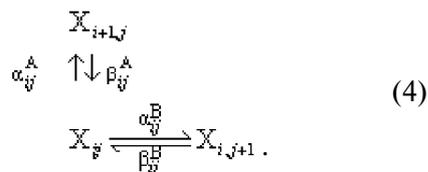
Механизм реакции В в отсутствие компонентов реакции будет иметь вид



В данной записи неизменному состоянию активного центра реакции А присвоен индекс 0. В присутствии компонентов реакций А и В обе реакции будут протекать одновременно и суммарный механизм процесса будет отражаться двумерной схемой:



Предусматривается, что в результате завершения каталитических циклов в вертикальном и горизонтальном направлениях происходит по одному обороту реакций А и В соответственно. Направлением реакции считается движение в сторону увеличения значений подстрочных индексов. Очевидно, что при таком определении ни одна из констант скорости α не равна нулю, в то время как некоторые константы скорости β могут принимать нулевые значения. Обозначения констант скорости реакции (3) (на примере промежуточной формы X_{ij}) следующие:



Рассмотрим кинетику реакций, протекающих в соответствии с механизмом (3), в случае установления стационарного состояния по про-

межуточным формам фермента. Анализ стационарного состояния кинетической схемы (3) может быть существенно облегчен за счет применения теории графов (граф – совокупность точек (вершин) и соединяющих их линий (ветвей)) [30]. Здесь под вершинами подразумеваются промежуточные интермедиаты X_{ij} , а каждая ветвь графа отражает элементарную химическую реакцию, и этой ветви приписывается численное значение, равное константе скорости первого (псевдопервого) порядка для соответствующей химической реакции. В нашем случае это $\alpha_{ij}^A, \beta_{ij}^A, \alpha_{ij}^B, \beta_{ij}^B$. Для анализа кинетических схем с помощью теории графов вводится понятие «базовое дерево». Для любой произвольной вершины графа X_{kl} (назовем ее базой) совокупность ветвей, проходящих через все вершины графа (за исключением X_{kl}) и направленных к базе, составляет базовое дерево. Базовое дерево не содержит циклов. Величина базового дерева равна произведению величин ветвей, составляющих это базовое дерево. Базовый определитель – это совокупность всех базовых деревьев данной базы. Для базы X_{kl} величина базового определителя (D_{kl}) равна сумме величин всех базовых деревьев данной базы. Важным свойством базового дерева, вытекающим из определения базового дерева, является то, что каждое базовое дерево содержит по одной ветви, выходящей из каждой вершины графа (за исключением, разумеется, вершины, которая представляет собой базу). Соотношение стационарных концентраций любых промежуточных форм фермента X_{kl} и X_{op} равно соотношению значений соответствующих базовых определителей D_{kl} и D_{op} [30]:

$$[X_{kl}]/[X_{op}] = D_{kl}/D_{op}. \quad (5)$$

Следовательно, стационарная концентрация любой промежуточной формы фермента (X_{kl}) составит

$$[X_{kl}] = E_0 D_{kl} / \sum_i \sum_j D_{ij}, \quad (6)$$

где E_0 – общая концентрация фермента (сумма концентраций всех промежуточных форм фермента E).

Стационарные скорости реакций А (v^A) и В (v^B) для механизма (3) могут быть записаны соответственно в виде

$$v^A = \sum_j (\alpha_{mj}^A [X_{mj}] - \beta_{mj}^A [X_{0j}]), \quad (7)$$

$$v^B = \sum_i (\alpha_{in}^B [X_{in}] - \beta_{in}^B [X_{i0}]), \quad (8)$$

или, пользуясь понятиями теории графов и уравнением (6),

$$v^A = E_0 \sum_j (\alpha_{mj}^A D_{mj} - \beta_{mj}^A D_{0j}) / \sum_i \sum_j D_{ij}, \quad (9)$$

$$v^A = E_0 \sum_i (\alpha_{in}^B D_{in} - \beta_{in}^B D_{i0}) / \sum_i \sum_j D_{ij}. \quad (10)$$

Пусть субстрат реакции А (S^A) взаимодействует со всеми промежуточными формами фермента E_{kj} , где k фиксировано ($0 \leq k \leq m$), а j пробегает все значения $0 \leq j \leq n$. Субстрат реакции В (S^B) взаимодействует со всеми промежуточными формами фермента E_{il} , где l фиксировано ($0 \leq l \leq n$), а i пробегает все значения $0 \leq i \leq m$. Это означает, что S^A в отсутствие компонентов реакции В принимает участие в каталитическом цикле 1 раз, взаимодействуя с E_{k0} . В присутствии компонентов реакции В S^A взаимодействует в каталитическом цикле с $(n+1)$ промежуточными формами фермента E_{kj} , $0 \leq j \leq n$. В отсутствие компонентов реакции А S^B принимает участие в каталитическом цикле 1 раз, взаимодействуя с E_{0l} . В присутствии компонентов реакции А S^B взаимодействует в каталитическом цикле с $(m+1)$ промежуточными формами фермента E_{il} , $0 \leq i \leq m$.

Чтобы иметь представление о характере зависимости скоростей реакций А и В от концентраций субстратов, рассмотрим частный случай, когда реакции А и В протекают необратимо. Отсутствие обратной реакции может достигаться, например, когда в реакционной среде нет одного из продуктов прямой реакции. Необратимость предусматривает равенство нулю по меньшей мере одной константы скорости обратной реакции в ферментативном механизме.

Для определенности пусть $\beta_{mj}^A = 0$ для всех $0 \leq j \leq n$, $\beta_{in}^B = 0$ для всех $0 \leq i \leq m$. В этом случае в отсутствие компонентов реакции В стационарная скорость ферментативной реакции А (v^A) как функция концентрации S^A представляет собой простую гиперболу:

$$v^A = a^A [S^A] / (b^A + [S^A]). \quad (11)$$

В отсутствие компонентов реакции А стационарная скорость ферментативной реакции В (v^B) как функция концентрации S^B также представляет собой простую гиперболу:

$$v^B = a^B [S^B] / (b^B + [S^B]). \quad (12)$$

Это справедливо, поскольку в отсутствие компонентов альтернативной реакции механизмы реакций А и В представляют собой однопутьные механизмы необратимой ферментативной реакции [28].

При одновременном присутствии в реакционной смеси всех компонентов реакций А и В целесообразно рассмотреть два крайних случая.

Первый случай. Протекание одной реакции не меняет значения кинетических констант другой реакции, т.е. для реакции А справедливы равенства

$$\alpha_{ii}^A = \alpha_{ij}^A, \quad \beta_{ii}^A = \beta_{ij}^A \quad (13)$$

для всех $0 \leq l \leq m$, $0 \leq i \leq n$, $0 \leq j \leq n$, а для реакции В справедливы равенства

$$\alpha_{ii}^B = \alpha_{il}^B, \quad \beta_{ii}^B = \beta_{il}^B \quad (14)$$

для всех $0 \leq l \leq n$, $0 \leq i \leq m$, $0 \leq j \leq m$.

В этом случае реакции А и В протекают строго независимо, кинетика протекания этих реакций формально описывается в рамках механизмов (1) и (2), зависимости v^A и v^B от $[S^A]$ и $[S^B]$ имеют вид (11) и (12) соответственно, v^A не зависит от $[S^B]$, а v^B не зависит от $[S^A]$.

Второй случай. Протекание одной реакции меняет значения кинетических констант для другой реакции, т.е. условия (13) и (14) нарушаются. В этом случае зависимости v^A и v^B от $[S^A]$ и $[S^B]$ имеют вид дробно-рациональных функций:

$$v^A = \frac{c_1 [S^A] + c_2 [S^A]^2 + \dots + c_{n+1} [S^A]^{n+1}}{d_0 + d_1 [S^A] + d_2 [S^A]^2 + \dots + d_{n+1} [S^A]^{n+1}}, \quad (15)$$

$$v^B = \frac{e_0 + e_1 [S^A] + e_2 [S^A]^2 + \dots + e_{n+1} [S^A]^{n+1}}{d_0 + d_1 [S^A] + d_2 [S^A]^2 + \dots + d_{n+1} [S^A]^{n+1}}, \quad (16)$$

$$v^B = \frac{f_1 [S^B] + f_2 [S^B]^2 + \dots + f_{m+1} [S^B]^{m+1}}{g_0 + g_1 [S^B] + g_2 [S^B]^2 + \dots + g_{m+1} [S^B]^{m+1}}, \quad (17)$$

$$v^A = \frac{h_0 + h_1 [S^B] + h_2 [S^B]^2 + \dots + h_{m+1} [S^B]^{m+1}}{g_0 + g_1 [S^B] + g_2 [S^B]^2 + \dots + g_{m+1} [S^B]^{m+1}}. \quad (18)$$

В уравнениях (15)–(18) положительные параметры c_i ($1 \leq i \leq n+1$), d_i , e_i ($0 \leq i \leq n+1$) зависят от $[S^B]$, а положительные параметры f_i ($1 \leq i \leq m+1$), g_i , h_i ($0 \leq i \leq m+1$) зависят от $[S^A]$.

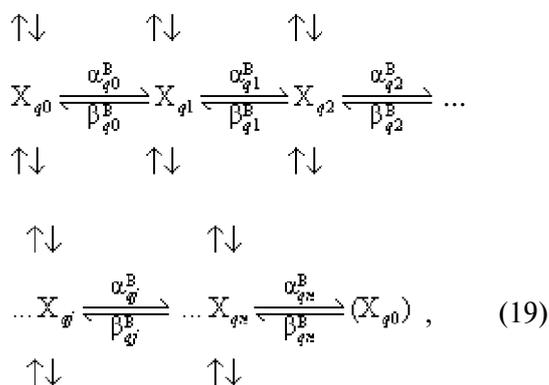
Таким образом, реализация второго случая проявляется в отклонении от гиперболичности скорости ферментативной реакции в присутствии в реакционной среде компонентов альтернативной реакции, а также в появлении зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата альтернативной реакции.

Бифункциональные ферменты обычно катализируют сложные многосубстратные реакции, механизмы которых содержат много различных промежуточных форм фермента (см., например, [4, 6]). Вследствие этого зависимости скорости от концентрации субстратов (15)–(18) должны представлять собой сложные дробно-рацио-

нальные функции с высокими значениями m и n . Однако на практике получаемые в эксперименте зависимости намного проще и часто описываются в рамках уравнения Михаэлиса–Ментен даже для тех бифункциональных ферментов, кинетика действия которых характеризуется взаимным влиянием реакций [13]. Следовательно, реализуется рассмотренный выше второй случай. Здесь мы сталкиваемся с общей для кинетики, в том числе ферментативной кинетики, проблемой, когда теоретические зависимости неоправданно сложны и практика требует разумных упрощений. Как указывалось выше, существенный прогресс достигался при учете иерархии скоростей отдельных элементарных реакций, составляющих реакционный механизм (квазистационарное приближение в химической кинетике, квазиравновесное приближение в ферментативной кинетике). Имеет смысл проанализировать, позволит ли упростить используемые кинетические схемы факт наличия иерархии скоростей элементарных реакций в механизме действия бифункционального фермента.

Учет иерархии быстрых и медленных циклов.

Допустим, что один из циклов реакции В, представленный фрагментом схемы (3)



быстрый. Вполне оправданным интуитивным представлением о быстром цикле будет представление о том, что реакции в этом цикле быстрые по отношению к остальным реакциям и соотношение концентраций интермедиатов в быстром цикле не зависит от концентраций компонентов альтернативной реакции. Из уравнений (9), (10) следует, что значимыми будут строгие и количественные определения быстрого и обратимо-быстрого циклов:

цикл (19) быстрый, если для положительно-го, но по возможности малого значения числа ε справедлив следующий набор неравенств для всех $0 \leq j \leq n$:

$$\frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)}{\alpha_{qj}^B} \leq \varepsilon,$$

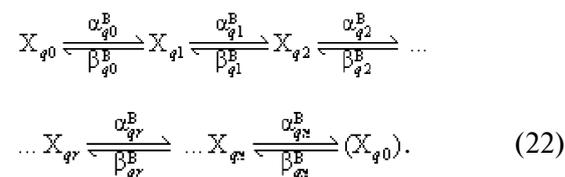
$$\begin{aligned}
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\beta_{qj}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^B} \leq \varepsilon, \\
 & \dots \dots \dots \\
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\beta_{qj}^B \beta_{q,j+1}^B \dots \beta_{q,j+k-2}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^B \dots \alpha_{q,j+k-1}^B} \leq \varepsilon, \quad (20) \\
 & \dots \dots \dots \\
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\beta_{qj}^B \beta_{q,j+1}^B \dots \beta_{q,j-3}^B}{\alpha_{qj}^B \alpha_{q,j+1}^B \dots \alpha_{q,j-2}^B} \leq \varepsilon,
 \end{aligned}$$

где $1 \leq k \leq n$, причем, поскольку второй подстрочный индекс пробегает значения от 0 до n , справедливо равенство $j+k = j+k-n-1$, если $j+k > n$; цикл (19) обратимо-быстрый, если наряду с набором неравенств (20) выполняются также неравенства

$$\begin{aligned}
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+2}^B}{\beta_{q,j+1}^B \beta_{q,j+2}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon, \\
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+3}^B}{\beta_{q,j+2}^B \beta_{q,j+3}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon, \\
 & \dots \dots \dots \\
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)\alpha_{q,j-1}^B \alpha_{q,j-2}^B \dots \alpha_{q,j+k+1}^B}{\beta_{q,j+k}^B \beta_{q,j+k+1}^B \dots \beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon, \\
 & \dots \dots \dots \\
 & \frac{(\alpha_{qj}^A + \beta_{q-1,j}^A)}{\beta_{q,j-1}^B} \leq \varepsilon,
 \end{aligned} \quad (21)$$

где j, k и ε имеют тот же смысл, что и в (20). Разумеется, значение ε является количественным критерием «быстроты» цикла: чем меньше ε , тем «быстрее» цикл.

Для удобства дальнейших рассуждений рассмотрим новый отдельный цикл V_q (22), который формально получается из цикла (19) путем удаления всех ветвей, принадлежащих к реакции А:



а величины f_{ij} определены в (29).

При $\varepsilon \rightarrow 0$ всеми членами, кроме первого, в (25) можно пренебречь, и практическое значение имеет оценка

$$\delta = P_1 \varepsilon, \quad (32)$$

где P_1 определяется выражениями (26) и (27).

Допустим, что два цикла реакции В в схеме (3) являются одновременно быстрыми (или одновременно обратимо-быстрыми), т.е. для них выполняются соотношения типа (20) (или (20), (21)). Тогда, повторяя приведенные выше рассуждения, можно для описания реакции А модифицировать исходную схему (3), заменив в ней каждый быстрый цикл реакции В на одну промежуточную форму по изложенному выше алгоритму.

Точность приближения в этом случае равна $(1 + \delta)^2 - 1$, и при $\varepsilon \rightarrow 0$ практическое значение имеет оценка

$$\frac{|[X_{ij}]^{**} - [X_{ij}]|}{[X_{ij}]} < 2\delta, \quad (33)$$

где $[X_{ij}]^{**}$ – стационарные концентрации промежуточных форм фермента X_{ij} , рассчитанные для новой модифицированной схемы. Справедлива также оценка (32).

Если все циклы реакции В в схеме (3) являются одновременно быстрыми (или одновременно обратимо-быстрыми), то для описания реакции А исходная схема (3) принимает вид

$$\alpha_i^A = \sum_j \alpha_{ij}^A f_{ij}, \quad (34)$$

$$\alpha_i^A = \sum_j \alpha_{ij}^A f_{ij}, \quad (35)$$

$$\beta_i^A = \sum_j \beta_{ij}^A f_{i+1,j}, \quad (36)$$

где величины f_{ij} определяются по аналогии с (29).

Таким образом, двумерная исходная схема (3) при условии более быстрого протекания реакции В для описания реакции А сводится к одномерной схеме (34), в которой зависимость скорости реакции А от концентрации субстратов и продуктов реакции В отражается зависимостями (35), (36).

Точность приближения в этом случае равна $(1 + \delta)^n - 1$, и при $\varepsilon \rightarrow 0$ практическое значение имеет оценка

$$\frac{|[X_{ij}]^{***} - [X_{ij}]|}{[X_{ij}]} < n\delta, \quad (37)$$

где

$$[X_{ij}]^{***} = f_{ij}[Y_i]. \quad (38)$$

Справедлива также оценка (32).

Таким образом, если реакция В протекает существенно быстрее, чем реакция А (т.е. выполняются соотношения (20) или (20), (21) для всех $m + 1$ циклов реакции В), то кинетику протекающей реакции А будет описывать один цикл (34), в котором влияние компонентов реакции В учтено в соотношениях (35), (36).

Следует отметить, что характер зависимости скорости реакции (34) от концентрации субстратов реакции А будет такой же, как и для скорости реакции А в отсутствие компонентов реакции В, т.е. для механизма (1), и бифункциональный характер фермента Е будет проявляться для реакции А только в зависимости констант скорости реакции А (α_i^A и β_i^A) от концентраций компонентов реакции В.

С использованием наших предыдущих результатов [27] приведем зависимость скорости реакции А для механизма (34) в явном виде как функцию констант скорости α_i^A и β_i^A :

$$v^A = E_0 (\alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_m^A - \beta_0^A \beta_1^A \beta_2^A \dots \beta_m^A) / \sum_i \sum_j b_{ij}, \quad (39)$$

$$b_{ij} = \alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_{i-1}^A \beta_i^A \beta_{i+1}^A \dots \beta_{j-1}^A 1 \alpha_{j+1}^A \dots \alpha_m^A \quad (i < j),$$

$$b_{ij} = \alpha_0^A \alpha_1^A \alpha_2^A \dots \alpha_{i-1}^A 1 \alpha_{i+1}^A \dots \alpha_m^A \quad (i = j),$$

$$b_{ij} = \beta_0^A \beta_1^A \beta_2^A \dots \beta_{j-1}^A 1 \alpha_{j+1}^A \dots \alpha_{i-1}^A \beta_i^A \beta_{i+1}^A \dots \beta_m^A \quad (i > j). \quad (40)$$

Величины α_i^A и β_i^A как функции элементарных констант исходного механизма (3) определены в формулах (35), (36).

Если все циклы реакции В в схеме (3) быстрые (или все обратимо-быстрые), то механизм реакции (3) для описания реакции В будет представлять собой $m + 1$ независимых циклов и скорость реакции В будет описываться уравнением

$$v^B = E_0 \sum_t e_t \frac{\alpha_{t0}^B \alpha_{t1}^B \alpha_{t2}^B \dots \alpha_{tm}^B - \beta_{t0}^B \beta_{t1}^B \beta_{t2}^B \dots \beta_{tm}^B}{\sum_i \sum_j b_{ij}^t}, \quad (41)$$

$$b_{ij}^t = \alpha_{t0}^B \alpha_{t1}^B \alpha_{t2}^B \dots \alpha_{t,i-1}^B \beta_{t,i}^B \beta_{t,i+1}^B \dots \beta_{t,j-1}^B 1 \alpha_{t,j+1}^B \dots \alpha_{tm}^B \quad (i < j),$$

$$b_{ij}^t = \alpha_{t0}^B \alpha_{t1}^B \alpha_{t2}^B \dots \alpha_{t,i-1}^B 1 \alpha_{t,i+1}^B \dots \alpha_{tm}^B \quad (i = j),$$

$$b_{ij}^t = \beta_{t0}^B \beta_{t1}^B \beta_{t2}^B \dots \beta_{t,j-1}^B 1 \alpha_{t,j+1}^B \dots \alpha_{t,i-1}^B \beta_{t,i}^B \beta_{t,i+1}^B \dots \beta_{tm}^B \quad (i > j), \quad (42)$$

$$e_t = \sum_j b_{ij} / \sum_i \sum_j b_{ij}, \quad (43)$$

где b_{ij} определены в уравнении (40), t принимает значения от 0 до m .

Таким образом, если реакция В протекает существенно быстрее, чем реакция А (т.е. выполняются соотношения (20) или (20), (21) для всех $m + 1$ циклов реакции В), то общий механизм действия бифункционального фермента сводит-

ся к одному циклу для медленной реакции А и к нескольким независимым циклам для быстрой реакции В. Для каждой из этих реакций получены в явном виде уравнения скорости и дана количественная оценка данного приближения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yourno, J., Kohno, T., and Roth, J.R. (1970) *Nature*, **228**, 820–825.
- Smith, S. (1994) *FASEB J.*, **8**, 1248–1259.
- Liang, P.H., and Anderson, K.S. (1998) *Biochemistry*, **37**, 12195–12205.
- Huang, X., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2001) *Annu Rev. Biochem.*, **70**, 149–180.
- Meek, T.D., Garvey, E.P., and Santi, D.V. (1985) *Biochemistry*, **24**, 678–686.
- Miles, E.W., Rhee, S., and Davies, D.R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12193–12196.
- Trujillo, M., Donald, R.G.K., Roos, D.S., Greene, P.J., and Santi, D.V. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6366–6374.
- Schneider, T.R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P.H., Anderson, K.S., and Schlichting, I. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5394–5406.
- Leys, D., Basran, J., and Scrutton, N.S. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4038–4048.
- Atreya, C.E., and Anderson, K.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18314–18322.
- Gehring, A.M., Lees, W.J., Mindiola, D.J., Walsh, C.T., and Brown, E.D. (1996) *Biochemistry*, **35**, 579–585.
- Miles, B.W., Banzon, J.A., and Raushel, F.M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 16773–16779.
- Kim, J.H., Krahn, J.M., Tomchick, D.R., Smith, J.L., and Zalkin, H. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 15549–15557.
- Johnson, E.F., Hinz, W., Atreya, C.E., Maley, F., and Anderson, K.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43126–43136.
- Eling, T.E., Glasgow, W.C., Curtis, J.F., Hubbard, W.C., and Handler, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 12348–12355.
- Easterby, J.S. (1981) *Biochem. J.*, **199**, 155–161.
- Easterby, J.S. (1984) *Biochem. J.*, **219**, 843–847.
- Liang, P.H., and Anderson, K.S. (1998) *Biochemistry*, **37**, 12206–12212.
- Vakovic, M., and Dunford, H.B. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6475–6482.
- Kulmacz, R.J., Pendleton, R.B., and Lands, W.E.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5527–5536.
- Вржеш П.В. (1999) *Биохимия*, **64**, 502–512.
- Волькенштейн М.В., Магаршак Ю.Б. (1970) *Биофизика*, **15**, 777–784.
- Корниш-Боуден Э. (1979) *Основы ферментативной кинетики*, Мир, Москва.
- Ча, С. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 820–825.
- Тихонов А.Н. (1952) *Математический сборник*, **31**, 575–586.
- Вржеш П.В., Варфоломеев С.Д. (1985) *Биохимия*, **50**, 139–147.
- Вржеш П.В. (1988) *Биохимия*, **53**, 1704–1711.
- Вржеш П.В. (1996) *Биохимия*, **60**, 2069–2083.
- Vrzheshch, P.V., Batanova, E.A., Mevkh, A.T., Varfolomeev, S.D., Gazaryan, I.G., and Thorneley, R.N.F. (2003) *Biochem. J.*, **372**, 713–724.
- Волькенштейн М.В., Гольдштейн Б.Н. (1966) *Биохимия*, **31**, 541–547.

STEADY-STATE KINETICS OF BIFUNCTIONAL ENZYMES. TAKING INTO ACCOUNT KINETIC HIERARCHY OF FAST AND SLOW CATALYTIC CYCLES IN GENERALISED MODEL

P. V. Vrzheshch

Department of Bioengineering and Bioinformatics,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992,
Russia; fax: (495)939-4218, E-mail: peter@genebee.msu.ru
International Biotechnological Center, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow 119992, Russia;
fax: (495)939-5022

Received March 31, 2007

Revision received May 26, 2007

The steady-state approximation of the generalized two-dimension model of the bifunctional enzyme has been considered. The cases when the ordered reactions catalyzed by the bifunctional enzyme proceed independently of one another and the proceeding of one reaction exerts influence on the proceeding of the other reaction have been considered. Existence of fast and slow catalytic cycles in reaction mechanism has been analyzed. The conditions when the hierarchy of fast and slow catalytic cycles allows the simplification of the two-dimension model and its reduction into the one-dimension cyclic schemes have been determined. The equations describing that simplified schemes have been deduced, too.

Key words: bifunctional enzymes, generalized kinetic model, criteria of kinetic behavior