

UDC 577.3

## КОНЦЕПЦІЯ СУБСТРАТНОГО ПРОТЕКТУВАННЯ У ФЕРМЕНТАТИВНОМУ КАТАЛІЗІ: МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ

Ю.І. Прилуцький, П.О. Бориско

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01033 Київ

Надійшла до редакції 12 грудня 2005 р.

Математично обґрунтована концепція субстратного протектування у ферментативному каталізі. В залежності від величини параметру протектування розраховані кінетичні залежності концентрації продукту хімічної реакції, які в цілому добре якісно відтворюють її фазу наростання, а далі вихід на стаціонарний режим (нащеплення). Отримані теоретичні результати можуть бути цікавими як при конкретному аналізі експериментів з субстратного протектування у ферментативному каталізі, так і при дослідженні дії АТФ як протектора стосовно АТФ-азної активності міозину в процесі м'язового скорочення.

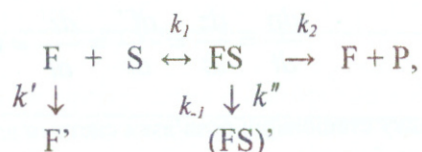
**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ферментативний каталіз, субстратне протектування, математична модель

Однією з головних задач при вивченні ферментативної активності білків є визначення молекулярного механізму каталітичного перетворення субстрату. При цьому принципово важливим є дослідження кінетичних та термодинамічних властивостей ферментативної реакції, зокрема, особливостей взаємодії ферменту з реагентами - субстратами, активаторами тощо. На теперішній час існує широкий спектр експериментальних фізико-хімічних методів, які застосовуються при дослідженні фермент-субстратної взаємодії [1]. Поруч з такими методами доцільним є також застосування математичного моделювання при вивченні кінетичних закономірностей протікання ферментативних реакцій [2-3].

У цій роботі зроблена спроба математично обґрунтувати концепцію субстратного протектування, яка є важливим інструментом у дослідженні механізмів протікання реакцій ферментативного каталізу, а також при вирішенні деяких нагальних питань інженерної ензимології.

### МОДЕЛЬ

Запишемо реакцію ферментативного каталізу у такій формі



де P - продукт хімічної реакції; S - субстрат; F і F' - ферменти; FS і FS' - проміжні фермент-субстратні

комплекс;  $k_2, k_1, k_{-1}, k'$  і  $k''$  - сталі швидкості відповідних хімічних реакцій.

Система нелінійних диференціальних рівнянь, яка описує кінетику цієї хімічної реакції має такий вигляд:

$$\frac{dp}{dt} = k_2 z \quad (1)$$

$$\frac{dz}{dt} = k_1 f \cdot s - (k_{-1} + k_2 + k'')z = k_1 f \cdot s - (k_{-1} + k_2 + \pi k')z \quad (2)$$

$$\frac{df'}{dt} = k' f \quad (3)$$

$$\frac{dz'}{dt} = k'' z = \pi k' z \quad (4)$$

де  $p$  і  $s$ ,  $f$  і  $f'$ ,  $z$  і  $z'$  - концентрації продукту хімічної реакції  $P$  і субстрату  $S$ , ферментів  $F$  і  $F'$ , проміжних фермент-субстратних комплексів  $FS$  і  $FS'$ , відповідно.

Наступні алгебраїчні рівняння враховують загальний баланс концентрації ферменту  $F$  ( $f_0$ ) і субстрату  $S$  ( $s_0$ ), які беруть участь у цій реакції:

$$f_0 = f + z + f' + z', \quad (5)$$

$$s_0 = s + z + p + z' \cong s + p. \quad (6)$$

Тут також введений параметр протектування  $\pi = \frac{k''}{k'}$ , в залежності від величини якого маємо:

1)  $0 < \pi < 1$  - субстрат є протектор; 2)  $\pi > 1$  - субстрат є антипротектор і 3)  $\pi = 1$  - субстрат є індеферентор.

Диференціальні рівняння (2) і (3) з урахуванням алгебраїчних співвідношень (5)-(6) можна переписати так:

$$\frac{dz}{dt} = k_1(f_0 - z - f' - z') \cdot (s_0 - p) - (k_{-1} + k_2 + \pi k')z, \quad (2^*)$$

$$\frac{df'}{dt} = k'(f_0 - z - f' - z') \quad (3^*)$$

Для того, щоб однозначно розв'язати систему нелінійних диференціальних рівнянь першого порядку (1), (2\*), (3\*) і (4), врахуємо початкові умови (задача Коші)

$$p(0) = z(0) = f'(0) = z'(0) = 0, \quad (7)$$

а також "базові" значення загальних концентрацій ферменту -  $f_0=1$  мкМ, субстрату -  $s_0=1$  мМ і сталих швидкості хімічних реакцій:  $k_2=(10^5-10^1) \text{ c}^{-1}$ ,  $k_1=(10^9-10^2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-1}=(10^5-10^1) \text{ c}^{-1}$  і  $k'=(10^3-10^3) \text{ c}^{-1}$  [4].

Спочатку проаналізуємо стаціонарний випадок, тобто коли виконується умова:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{dz}{dt} = \frac{df'}{dt} = \frac{dz'}{dt} = 0.$$

Легко бачити, що у цьому випадку стаціонарні розв'язки системи алгебраїчних рівнянь (1), (2\*), (3\*) і (4) будуть такими:  $z=0$ ,  $f' + z' = f_0$ , тобто значення величин  $f'$  і  $z'$  не є однозначними. Нарешті, значення величини  $p$  може наближатися до  $s_0$  ( $p \rightarrow s_0$ ), але не обов'язкове виконання умови:  $p = s_0$ .

Лінійні диференціальні рівняння (1) і (4) з урахуванням початкової умови (7) легко розв'язати аналітично

$$p(z) = \frac{k_2}{\pi k'} \cdot z, \quad (8)$$

тобто концентрація продукту хімічної реакції  $P$  зростає лінійно з концентрацією проміжного фермент-субстратного комплексу  $FS$ . Враховуючи співвідношення (5) і (6), можна накласти такі обмеження на концентрації продукту і проміжного фермент-субстратного комплексу:  $0 < p \leq s_0$  і  $0 < z \leq f_0$ . Далі за формулою (8) оцінимо межі зміни значення параметру протектування  $\pi$ :

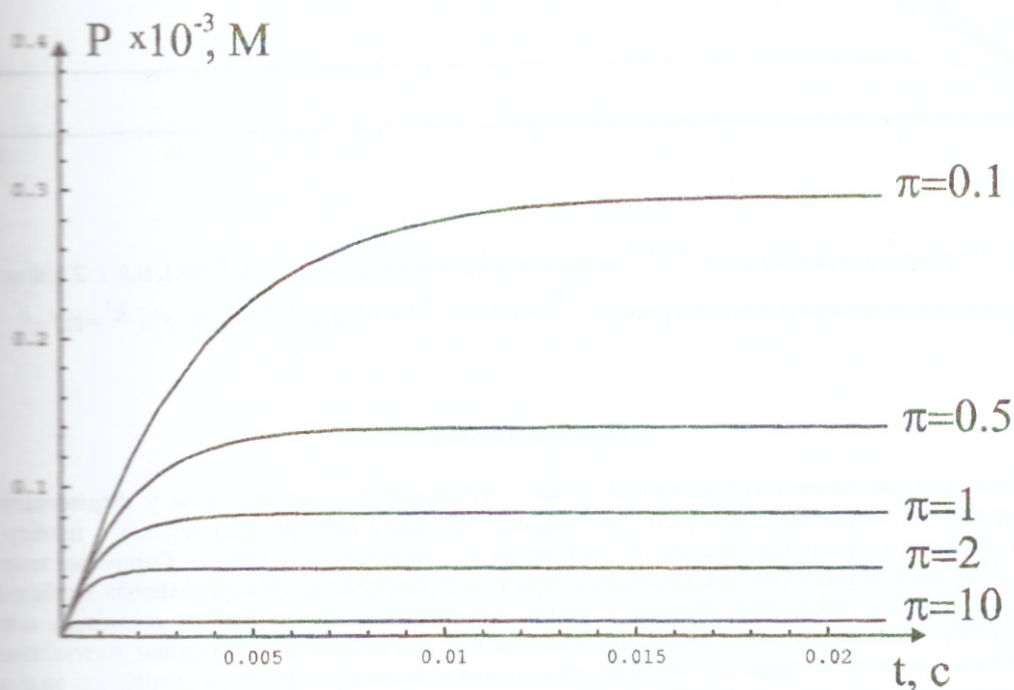
## Концепція субстратного протектування у ферментативному каталізі...

$$0 < \pi = \frac{k_2}{k'} \cdot \frac{z}{p} \leq \frac{k_2}{k'} \cdot \frac{f_0}{s_0} = 10^{-3} \cdot \frac{k_2}{k'} \quad (9)$$

В результаті, за максимальних значень зміни величин  $k_2=10^5 \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^3 \text{ c}^{-1}$ , їх оптимальних значень  $k_2=10^2 \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^{-1} \text{ c}^{-1}$  та мінімальних значень  $k_2=10^{-1} \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^{-3} \text{ c}^{-1}$ , отримуємо:  $0 < \pi \leq 10$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Система рівнянь (1), (2\*), (3\*) і (4) розв'язувалася чисельно з використанням пакету програми "Математика". Концентрація продукту хімічної реакції як функція часу  $P(t)$  в залежності від значення параметру протектування  $0 < \pi \leq 10$  за різних можливих значень сталих швидкості хімічних реакцій  $k_2, k_1, k_{-1}$  і  $k'$  представлені на рисунку 1 (максимальні значення:  $k_2=10^5 \text{ c}^{-1}$ ,  $k_1=10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-1}=10^5 \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^3 \text{ c}^{-1}$ ) і рисунку 2 (оптимальні значення:  $k_2=10^2 \text{ c}^{-1}$ ,  $k_1=10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-1}=10^4 \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^{-1} \text{ c}^{-1}$ ).



Рисунки 1. Розраховані кінетичні криві  $P(t)$  як функції параметру протектування  $\pi=0.1, 0.5, 1, 2$  і  $10$  за таких значень сталих швидкості хімічних реакцій:  $k_2=10^5 \text{ c}^{-1}$ ,  $k_1=10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-1}=10^5 \text{ c}^{-1}$  і  $k'=10^3 \text{ c}^{-1}$ .

Справу слід зазначити, що розраховані залежності  $P(t)$  в цілому добре якісно відтворюють фазу наближення концентрації продукту  $P$ , а далі її вихід на стаціонарний режим (насичення), що має місце в експерименті. Як бачимо з рисунків 1 і 2, зі зменшення значень сталих швидкості хімічних реакцій рівно (на три порядки) зростає час виходу кінетичних кривих на стаціонарний режим, причому завжди

виконується умова  $0 < p < s_0$ . Кінетичні криві  $p(t)$ , які відповідають субстрату-протектору ( $0 < \pi < 1$ ) лежать вище кінетичних кривих, що відповідають субстрату-антипротектору ( $\pi > 1$ ). У випадку великих значень сталих швидкості хімічних реакцій кінетичні криві  $p(t)$ , які відповідають субстрату-протектору ( $0 < \pi < 1$ ), лежать щільніше і ближче до кінетичної кривої, що відповідає субстрату-індеферентору ( $\pi = 1$ ) (Рис. 1). Навпаки, зі зменшенням значень сталих швидкості хімічних реакцій щільніше і ближче до кінетичної кривої, яка відповідає субстрату-індеферентору ( $\pi = 1$ ), лежать кінетичні криві  $p(t)$ , що відповідають субстрату-антипротектору ( $\pi > 1$ ) (Рис. 2).

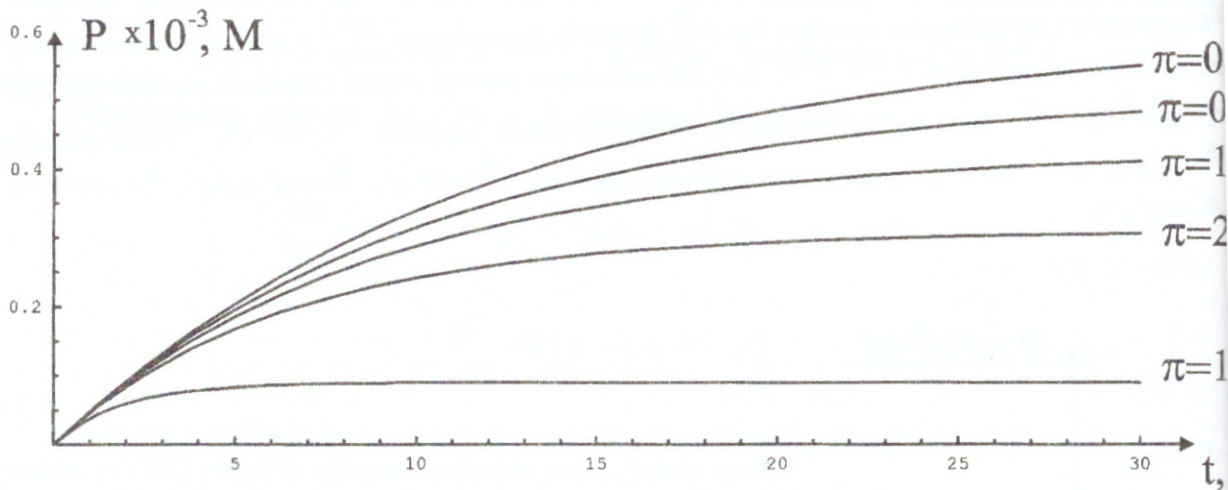


Рисунок 2. Розраховані кінетичні криві  $p(t)$  як функції параметру протектування  $\pi = 0.1, 0.5, 1, 2$  і  $10$  за таких значень сталих швидкості хімічних реакцій:  $k_2 = 10^2 \text{ c}^{-1}$ ,  $k_1 = 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-1} = 10^4 \text{ c}^{-1}$  і  $k' = 10^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

### ЗАКЛЮЧЕННЯ

В рамках запропонованої математичної моделі субстратного протектування у ферментативному каталізі розраховані кінетичні залежності концентрації продукту хімічної реакції, які в цілому добре якісно відтворюють її фазу наростання, а далі вихід на стаціонарний режим. Отримані теоретичні результати можуть бути цікавими для дослідників при конкретному аналізі експериментів з субстратного протектування у ферментативному каталізі, а також при вивченні молекулярних механізмів м'язового скорочення [5-6]. Оскільки процес м'язового скорочення пов'язаний з утворенням актоміозинового комплексу та наступними конформаційними змінами цього комплексу за рахунок енергії, що виділяється при ферментативному розщепленні АТФ міозином, то АТФ-азна активність актоміозину або міозину є такою характеристикою, за якою можна судити про скорочувальну активність м'язів. В інтактних м'язах ізометричне напруження прямо пропорційне  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азній активності, а максимальна швидкість ферментативної реакції корелює з  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азною активністю [7]. Тому, безперечно, заслуговує перевірки можливість дії АТФ як протектора стосовно АТФ-азної активності міозину. Існує можливість того, що надлишок АТФ може зв'язуватися з міозином більш, ніж в одному місці, спричинивши, таким чином, конформаційні зміни і, відповідно, змінити активність міозину.

Автори щиро вдячні проф. Костеріну С.О. за постановку задачі дослідження.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа, 1977. - 280 с.
2. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можаяев В.В., Хмельницкий Ю.Л. Имобилизованные ферменты, 1987.-157 с.
3. Liu K.C., Patrick T.B. A kinetic study of cyclodextrin glycosyltransferase: Substrate and product inhibitions // *Biotechnol. and Appl. Biochem.* - 1995. - 21 - P. 111-121.
4. Kusterin S.A., Burdyga T.V., Fomin V.P., Grover A.K. In: Control of Uterine Contractility, 1994. - P. 129-153.
5. Pedersen H., Hulder S., Sutherlin D.P., Schwitter U., King D.S., Schultz P.G. A method for directed evolution and functional cloning of enzymes // *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* - 1998. - 95 - P. 1118-1121.
6. Fucci L., Oliver C.N., Coon M.J., Stadtman E.R. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing // *Proc.Natl. Acad.Sci.USA.* - 1983. - 80 - P. 1521-1525.
7. Westerblad H., Lunnergren J., Allen D.G. Slowed Relaxation in Fatigued skeletal Muscle Fibers of Xenopus and Mouse Contribution of  $[Ca^{2+}]_i$  and Cross-bridges // *J.Gen.Physiol.* - 1997. - 109 - P. 385 - 399.