

КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИТРАТСИНТАЗЫ *E. COLI*.

Могилевская Е. А., Лебедева Г. В., Демин О. В.

(Россия, Москва)

*На основании литературных экспериментальных данных о функционировании цитратсинтазы *E. coli* построена кинетическая модель этого фермента. Выведено уравнение скорости реакции с учетом ингибиторов, а также влияние pH на функционирование фермента. Определены все неизвестные параметры, входящие в уравнение скорости. По специфической цитратсинтазной активности экстракта клеток *E. coli* определены внутриклеточные концентрации цитратсинтазы при аэробном росте бактерий на ацетате и на глюкозе.*

Цитратсинтаза (EC 2.3.3.1, *gltA*) — фермент цикла Кребса, катализирующий реакцию конденсации ацетил-коэнзима А (*AcCoA*) с оксалоацетатом (*OAA*) с образованием цитрата (*Cit*) и высвобождением коэнзима А (*CoA*) [1]: $AcCoA + OAA = Cit + CoA$.

Методы исследования. Для описания механизма функционирования фермента использовались литературные экспериментальные данные, полученные при исследовании очищенной цитратсинтазы *E. coli in vitro*. Вывод уравнения скорости работы фермента основывался на принципах квазистационарного состояния [2] и состоял из нескольких этапов, описанных в работе [3]. Значения параметров уравнения скорости выбирались из условия наилучшего совпадения экспериментальных данных с соответствующими им результатами численного решения минимodelей с помощью пакета программ DBSolve7.0 [4].

Результаты. Известные экспериментальные данные. Нами были использованы следующие литературные данные по функционированию цитратсинтазы *E. coli*:

1) Цитратсинтаза грам-отрицательных бактерий — гексамер, для которого в одном из экспериментов [5] была получена сигмоидная кривая насыщения по субстрату *AcCoA* [5] при нулевой

концентрации КСl. Эффект исчезал при добавлении 0.1 М КСl [5]. Поскольку 0.1 М КСl является физиологическим для *E. coli*, мы не описывали сигмоидную зависимость, которая наблюдается при КСl = 0.

2) Реакция является практически необратимой: константа равновесия равна $2.24 \cdot 10^6$ [6].

3) В литературе существует разногласие в вопросе о механизме цитратсинтазной реакции — является ли присоединение субстратов произвольным [7] или упорядоченным [5]. При этом ряд авторов считает, что, возможно, первым к ферменту присоединяется ацетил-коэнзим А [7], другие авторы утверждают, что первым субстратом является оксалоацетат [5].

4) НАДН и □-кетоглутарат — ингибиторы цитратсинтазы, являющиеся неконкурентными к оксалоацетату [8].

5) АТФ — ингибитор, конкурентный к ацетил-коэнзиму А и неконкурентный к оксалоацетату [8].

6) Максимальная скорость работы фермента зависит от рН в отсутствие ингибиторов и в присутствии АТФ [8]. Показано, что АТФ сдвигает максимум колоколообразной кривой рН-зависимости вправо и снижает максимальную скорость в точке максимума [8].

7) Известные из литературы кинетические параметры цитратсинтазы *E. coli*:

$$K_m^{AcCoA} = 0.11 \text{ mM};$$

$$K_m^{OAA} = 0.021 \text{ (pH 8.1, } t = 21^\circ\text{C в присутствии 0.1 М КСl)} [9];$$

$$K_d^{AcCoA} = 0.7 \text{ mM (pH 8.0)} [7]; \quad (1)$$

$$k_{cat} = 4860 \text{ 1/min (pH 8.0)} [10];$$

$$\text{pH}_{opt} = 7.3 [8].$$

1) Построение каталитического цикла работы фермента.

К настоящему времени в литературе отсутствуют единые представления о последовательности присоединения субстратов к ферменту в ходе цитратсинтазной реакции. Вместе с тем, имеются экспериментальные данные по ингибированию фермента АТФ, который является конкурентным к *AcCoA* и неконкурентным к оксалоацетату [8]. Такая ситуация может наблю-

даться только в случае, когда $AcCoA$ присоединяется первым. Таким образом, мы предположили, что цитратсинтаза работает по механизму необратимого Ordered Bi Bi по классификации Келланда [11] с первым субстратом $AcCoA$. Схема каталитического цикла представлена на рис. 1. Мы также учли влияние ингибиторов α -кетоглутарата и НАДН, которые связываются с двумя формами фермента — связанной с $AcCoA$ и связанной с $AcCoA$ и OAA (см. рис. 1), что позволяет описать экспериментальные данные по ингибированию фермента. Также учтено влияние ингибитора АТФ, который связывается со свободной формой фермента. Кроме того, мы описали зависимость активности фермента от pH (далее pH-зависимость), исходя из классического предположения [2], что фермент может протонироваться в активном сайте, причем активной является единожды протонированная форма, а депротонированная и дважды протонированные формы являются неактивными (рис. 1). Для учета эффекта АТФ на pH-зависимость (см. п. 6) мы предположили, что АТФ связывается с дважды протонированной формой фермента, т.к. только в данном случае будет наблюдаться сдвиг максимума pH-зависимости и уменьшение скорости в точке максимума.

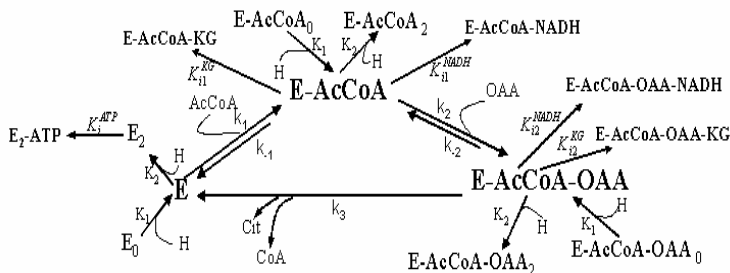


Рис. 1. Схема каталитического цикла цитратсинтазы *E. coli*.

2) Уравнение стационарной скорости работы фермента:

Уравнение скорости работы цитратсинтазы (ПЗ) и этапы его вывода представлены в Приложении 1.

Определение кинетических параметров, входящих в уравнение скорости. В уравнение скорости (П3) входят 12 параметров: 3 из них были известны из литературы (1), 8 параметров определялись по экспериментальным данным, концентрация фермента в клетке не могла быть определена по *in vitro* данным и оценивалась далее по специфической активности клеточного экстракта. Поскольку число оборотов фермента было известно из литературы для фиксированного значения pH ($k_{cat} = 4860 \text{ мин}^{-1}$, pH 8.0 [10]) мы использовали его для определения параметра k_{cat0} :

$$k_{cat0} = k_{cat} * \left(1 + \frac{K_{d1}^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} \right).$$

Таким образом, число неизвестных параметров было редуцировано до 7. Далее мы определили часть параметров в отсутствие ингибиторов. Мы использовали зависимости начальной скорости от субстрата *AcCoA* из двух источников [7, 9]: пять кривых при различных концентрациях оксалоацетата (рис. 2а,б), две кривые зависимости начальной скорости от оксалоацетата при фиксированных концентрациях *AcCoA* [9] (рис. 2в), а также pH-зависимость [8] (рис. 2г). При этом был найден такой набор параметров, который позволил уравнением скорости (П3) описать все перечисленные эксперименты. Результаты фиттинга представлены на рис. 2. Значения оцененных параметров:

$$K_{d1}^H = 1e - 5 \text{ мМ}; K_{d2}^H = 2e - 4 \text{ мМ}; K_m^{AcCoA} = 0.18 \text{ мМ}; K_m^{OAA} = 0.04 \text{ мМ}; \\ K_d^{AcCoA} = 0.1 \text{ мМ}; K_i^{ATP} = 0.58 \text{ мМ}.$$

Далее для определения констант ингибирования мы использовали экспериментальные зависимости начальной скорости реакции от концентраций субстратов в присутствии различных концентраций ингибиторов — α -кетоглутарата и НАДН [7]:

$$K_{i1}^{KG} = 0.015 \text{ мМ}; K_{i2}^{KG} = 0.256 \text{ мМ}; \\ K_{i1}^{NADH} = 3.3e - 4 \text{ мМ}; K_{i2}^{NADH} = 8.4e - 3 \text{ мМ}.$$

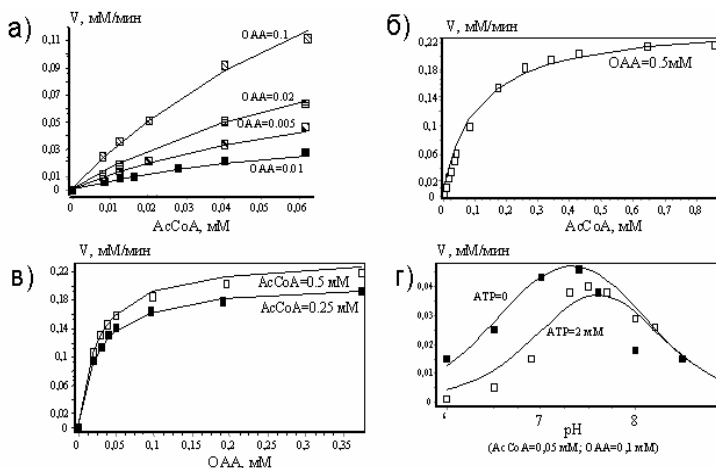


Рис. 2. Зависимости начальной скорости цитратсинтазы от концентраций субстратов и pH, описываемые экспериментальными точками и уравнением скорости (ПЗ)

Результаты фитинга представлены на рис. 3.

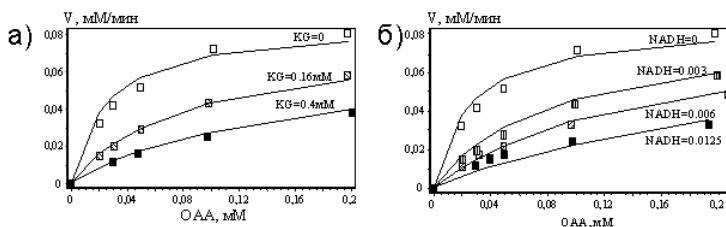


Рис. 3. Зависимости начальной скорости цитратсинтазы от концентраций субстратов в присутствии ингибиторов, описываемые экспериментальными точками и уравнением скорости (ПЗ)

На следующем этапе мы провели верификацию разработанной нами модели функционирования цитратсинтазы на экспериментальных данных, которые не использовались ранее для определения параметров модели. А именно, мы использовали данные о зависимости начальной скорости реакции от концен-

траций субстратов в присутствии ингибитора АТФ [8]. Было показано, что уравнение скорости (ПЗ) и найденные нами значения входящих в него параметров позволяют описать новый набор экспериментальных кривых (рис. 4).

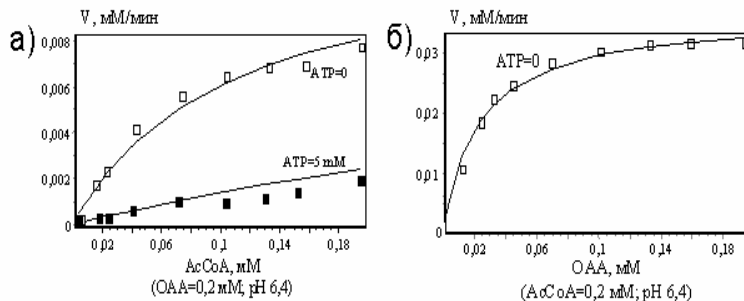


Рис. 4. Верификация модели. Зависимости начальной скорости цитратсинтазы от концентраций субстратов, описываемые экспериментальными точками и уравнением скорости (ПЗ)

Определение концентрации цитратсинтазы в зависимости от условий роста культуры *E. coli*. Нами была определена концентрация фермента по данным о специфической цитратсинтазной активности экстракта клеток *E. coli*, которые росли на двух различных субстратах (см. Приложение 2).

Таким образом, нами была построена кинетическая модель функционирования цитратсинтазы *E. coli* — выведено уравнение скорости работы фермента, определены все входящие в него параметры. Мы учли влияние ингибиторов и pH на функционирование фермента, что позволило описать большой набор разнородных экспериментальных данных, которые были получены при различных pH. Правильность полученной модели работы фермента была подтверждена тем, что с ее помощью нам удалось описать независимые экспериментальные данные [8], которые не использовались ранее при построении модели. Также были оценены концентрации фермента, которые присутствуют в клетках *E. coli*, растущих аэробно на ацетате и глюкозе.

Список литературы:

1. Neidhardt F.C. *E. coli* and *Salm. typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. V.1. P.3–6.

2. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. (Пер. Курганова Б.И.) —М: Изд-во «Мир», 1979. 282с.
3. О.В. Демин, И.И. Горянин, С. Дронов, Г.В. Лебедева. Кинетическая модель имидазолглицеролфосфат синтетазы из *Escherichia coli* // Биохимия. 2004. V.69. P.1625–1638.
4. Goryanin I., Hodgman T.C., and Selkov E. Mathematical simulation and analysis of cellular metabolism and regulation // Bioinformatics. 1999 V.15. P.749–758.
5. D.S. Pereira, L.J. Donald, D.J. Hosfield, H.W. Duckworth. Active site mutants of *Escherichia coli* citrate synthase. Effects of mutations on catalytic and allosteric properties // J. Biol. Chem. 1994. V.269 N.1 P.412–417.
6. Guynn R.W., Gelberg H.J., Veech R.L. Equilibrium Constants of the Malate Dehydrogenase, Citrate Synthase, Citrate Lyase, and Acetyl Coenzyme A Hydrolysis Reactions under Physiological Conditions // J. Biol. Chem. 1973. V.248. N.20. P.6957–6965.
7. Wright J.A., Sanwal B.D. Regulatory Mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors // J. Biol. Chem. 1971 V.246 N.6. P.1689–1699.
8. Jangaard N.O., Unkeless J., Atkinson D.E. The inhibition of Citrate Synthase by adenosine triphosphate // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V.151. P.225–235.
9. Faloona G.R., Srere P.A. *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties //Biochemistry. 1969 V.8. N.11. P.4497–4503.
10. Donald L.J., Crane B.R., Anderson D.H., Duckworth H.W. The role of cysteine 206 in allosteric inhibition of *Escherichia coli* citrate synthase // J. Biol. Chem. 1991. V.266. N.31. P.20709–20713.
11. Cleland W.W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations // Biochim. Biophys. Acta. 1963. V. 67, P.104–137.
12. Peng L., Shimizu K. Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003 V.61. P.163–178.
13. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria // Biochim. Biophys. Acta. 1981 V.650. P.151–166.

Приложение 1. Вывод уравнения стационарной скорости работы цитратсинтазы.

1) Вывод уравнения стационарной скорости работы фермента с использованием параметров каталитического цикла:

Поскольку реакция является практически необратимой [6], мы описывали работу фермента только в прямом направлении в виде зависимости скорости от субстратов и эффекторов. На схеме (рис. 1) стадии присоединения субстратов изображены обратимыми, а стадия образования продуктов необратимая с константой скорости k_3 . При выводе уравнения скорости мы предполагали, что все реакции присоединения ингибиторов и протонов происходят намного быстрее, чем каталитическая стадия и стадии связывания субстратов. Для стадий присоединения протонов мы предполагали, что они характеризуются двумя параметрами — константой диссоциации протона от дважды протонированной формы фермента и константой диссоциации протона от одиножды протонированной формы протона независимо от того, какие субстраты присоединены к ферменту. Учитывая эти предположения, мы вывели уравнение скорости:

$$\begin{aligned}
 V = CS * k_1 k_2 k_3 * AcCoA * OAA & \left/ \left[(k_{-1} k_3 + k_{-1} k_2 + k_2 k_3 * OAA) \left(1 + \frac{K_{d1}^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} * \left(1 + \frac{ATP}{K_i^{ATP}} \right) \right) + \right. \right. \\
 + AcCoA * (k_1 k_3 + k_1 k_2) & * \left(1 + \frac{K_{d1}^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} + \frac{KG}{K_{i1}^{KG}} + \frac{NADH}{K_{i1}^{NADH}} \right) + \\
 \left. \left[+ k_1 k_2 * AcCoA * OAA * \left(1 + \frac{K_{d1}^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} + \frac{KG}{K_{i2}^{KG}} + \frac{NADH}{K_{i2}^{NADH}} \right) \right] \right], & \quad (П1)
 \end{aligned}$$

где $k_{1,-1}$, $k_{2,-2}$, k_3 — константы скорости соответствующих стадий каталитического цикла, CS — концентрация фермента, K_{d1}^H , K_{d2}^H , K_i^{ATP} , K_{i1}^{KG} , K_{i2}^{KG} , K_{i1}^{NADH} , K_{i2}^{NADH} — константы диссоциации соответствующих ингибиторов и протонов. Константы диссоциации и константы скорости показаны на рис. 1 около соответствующих им реакций.

2) Вывод соотношений, связывающих кинетические параметры ферментативной реакции (константы Михаэлиса, константы ингибирования, каталитические константы и др.) с параметрами каталитического цикла

Для того, чтобы записать уравнение скорости (П1) в терминах общепринятых и измеряемых в эксперименте кинетических параметров,

мы использовали определения этих параметров и нашли их выражения из уравнения (П1):

$$V_{\max} = CS * k_3 / \left(1 + \frac{K^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} \right); \quad K_m^{AcCoA} = \frac{k_3}{k_1}; \quad K_m^{OAA} = \frac{k_3 + k_{-2}}{k_2}. \quad (\text{П2})$$

3) Вывод уравнения скорости с использованием классических кинетических параметров ферментативной реакции:

Используя соотношения (П2), выведенные для кинетических параметров, уравнение скорости было записано в следующем виде:

$$V = CS * k_{cat0} * AcCoA * OAA / \left[\left(K_d^{AcCoA} * K_m^{OAA} + K_m^{AcCoA} * OAA \right) \left(1 + \frac{K^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} * \left(1 + \frac{ATP}{K_i^{ATP}} \right) \right) \right] +$$

$$+ AcCoA * K_m^{OAA} * \left(1 + \frac{K^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} + \frac{KG}{K_{i1}^{KG}} + \frac{NADH}{K_{i1}^{NADH}} \right) +$$

$$+ AcCoA * OAA * \left(1 + \frac{K^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} + \frac{KG}{K_{i2}^{KG}} + \frac{NADH}{K_{i2}^{NADH}} \right), \quad (\text{П3})$$

где $k_{cat0} = k_3$; $K_d^{AcCoA} = \frac{k_{-1}}{k_1}$.

Приложение 2. Определение концентрации цитратсинтазы в зависимости от условий роста культуры *E. coli*.

Специфическая цитратсинтазная активность (SA) экстракта клеток *E. coli* на ацетате была определена в работе [12]:

$$SA = 0.25 \text{ мкмоль/мин} * \text{мг белка экстракта}.$$

Исходя из того, что 1 мг белка клеток *E. coli* соответствует 5.5 мкЛ внутриклеточного объема [1] мы из специфической активности рассчитали максимальную скорость работы фермента: $V_{\max} = 45.5 \text{ мМ/мин}$. Далее концентрацию цитратсинтазы можно рассчитать, поделив максимальную скорость на число оборотов фермента. Однако, при этом необходимо использовать оценку числа оборотов при физиологическом внутриклеточном pH 7.3 [13], которая и была получена нами с помощью выведенной ранее pH-зависимости скорости работы цитратсинтазы:

$$k_{cat}^{pH7.3} = k_{cat0} / \left(1 + \frac{K_{d1}^H}{H} + \frac{H}{K_{d2}^H} \right) = 9941 / \left(1 + \frac{1e-5}{1e-4.3} + \frac{1e-4.3}{2.2e-4} \right) = 6966 \text{ мин}^{-1}.$$

Таким образом, была рассчитана концентрация цитратсинтазы для *E. coli*, растущей аэробно на ацетате:

$$CS_{\text{acetate}} = V_{\text{max}}^{\text{acetate}} / k_{cat}^{pH7.3} = 6.5 \text{ мкМ}.$$

Аналогично, используя значение специфической активности экстракта клеток *E. coli*, растущей на глюкозе аэробно ($SA = 0.05 \text{ мкмоль/мин} \cdot \text{мг}_{\text{белка}} \text{ экстракта}$ [12], из которой рассчитывается максимальная скорость $V_{\text{max}} = 9 \text{ мМ/мин}$), мы оценили концентрацию фермента, которая присутствует в клетке в этих условиях:
 $CS_{\text{glucose}} = V_{\text{max}}^{\text{glucose}} / k_{cat}^{pH7.3} = 1.3 \text{ мкМ}.$

KINETIC MODEL OF *E. COLI* CITRATE SYNTHASE

Mogilevskaya E. A., Lebedeva G. V., Demin O. V.

(Russia, Moscow)

Kinetic model of E. coli Citrate Synthase has been constructed on the base of literature experimental data. Rate equation has been derived. Inhibitors and pH influence on the enzyme functioning was taken into account. All unknown parameters of rate equation have been determined. Citrate Synthase concentrations in E. coli cells grown aerobically on acetate and glucose have been defined using data on cell extracts specific activities.