

ТОЧНОСТЬ РАВНОВЕСНОГО ПРИБЛИЖЕНИЯ В СТАЦИОНАРНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКЕ КАК ХАРАКТЕРИСТИКА РАВНОВЕСНОГО СЕГМЕНТА

© 2015 г. П.В. Вржеш

Международный биотехнологический центр и факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы

E-mail: peter@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 23.01.15 г.

Получена количественная оценка точности равновесного приближения в стационарной ферментативной кинетике в случае произвольного механизма ферментативной реакции. Эта оценка определяется только структурой и свойствами равновесного сегмента и не зависит от структуры и свойств остальной (стационарной) части кинетической схемы. Чем меньше соотношение величин ветвей, идущих наружу равновесного сегмента и ветвей внутри равновесного сегмента, тем выше точность определения концентраций интермедиатов и скорости ферментативной реакции при применении равновесного приближения.

Ключевые слова: ферментативная кинетика, равновесное приближение, точность приближения, метод Ча, быстрое равновесие, стационарная кинетика, метод графов.

Равновесное (квазиравновесное) приближение в стационарной ферментативной кинетике [1] применяется очень широко, так как зачастую позволяет правильно отразить основные закономерности исследуемого механизма ферментативной реакции, при этом выражения для скорости ферментативной реакции и концентраций интермедиатов чрезвычайно просты. Вместе с тем, как показано в работе [2], необоснованное применение равновесного приближения приводит к грубым ошибкам [3–16].

Причина заключается в том, что возможность применения и точность равновесного приближения не были обоснованы должным образом. Как следствие – разногласия по вопросам применения равновесного приближения и сомнения в адекватности этого метода [17–22].

Очевидное для простейшей двухстадийной схемы необратимой ферментативной реакции условие для использования равновесного приближения приведено в работе [23]. Для более сложных конкретных механизмов [3, 17, 18, 24, 25] эта проблема поднималась, однако постулированные в перечисленных работах условия применения равновесного приближения оказались неверными.

Несомненно, по сравнению с рассмотрением конкретных частных механизмов более продуктивным и универсальным является доказательство метода Ча и определение точности рав-

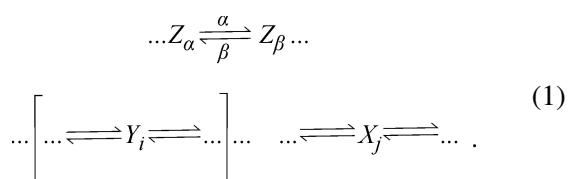
новесного приближения для произвольных механизмов ферментативной реакции.

Ранее для обобщенной схемы упорядоченной ферментативной реакции, содержащей состоящий из двух или трех интермедиатов равновесный сегмент, были определены качественные [26] и количественные [27] условия применения равновесного приближения. В работе [2] на примере упорядоченных двухсубстратных ферментативных реакций показаны ограничения применения равновесного приближения и проанализированы источники ошибок при использовании графических интерпретаций для установления механизма ферментативной реакции. В работе [28] проанализирована зависимость точности определения стационарных концентраций для различных равновесных сегментов от соотношения констант скоростей в произвольном механизме ферментативной реакции. В работе [29] для произвольного механизма ферментативной реакции и для произвольного равновесного сегмента получены новые соотношения для стационарной ферментативной кинетики, с помощью которых определена точность равновесного приближения как для концентраций интермедиатов, так и для скорости ферментативной реакции. В работе [29] точность определена как функция от соотношения величин базовых определителей и является идеальной характеристикой обобщенной, но конкретной модели. Эта характеристика имеет аб-

страктивный характер, незаменима при доказательствах общих закономерностей, но имеет ограниченное практическое применение и не может быть использована в качестве основы для конструирования кинетических моделей с заданными свойствами. В настоящей работе показано, что имеется верхняя оценка точности равновесного приближения – эта оценка определяется только соотношением величин ветвей, идущих наружу равновесного сегмента, и ветвей внутри равновесного сегмента, и не зависит от структуры и количественных характеристик остальной (стационарной) части кинетической схемы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В целях настоящего исследования произвольный механизм ферментативной реакции представим в виде схемы (графа) (1), в которой все ветви соответствуют элементарным реакциям первого (псевдопервого) порядка. Величина каждой ветви равна соответствующей константе скорости реакции первого (псевдопервого) порядка:



Система линейных алгебраических уравнений, соответствующая схеме ферментативной реакции в стационарном состоянии, может быть решена методом Кинга–Альтмана [30] и проанализирована с использованием метода графов [31].

Все кинетические схемы в настоящей работе будут рассматриваться в стационарном состоянии, рассчитываться и анализироваться с использованием метода графов.

Назовем схему (1) стационарной схемой для произвольного механизма ферментативной реакции. Все величины, полученные для схемы (1), будем считать точными стационарными значениями для механизма ферментативной реакции и отмечать надстрочными индексами *ss*.

Схема (1) имеет произвольный характер, но для простоты приведены всего несколько интермедиатов с ограниченным количеством ветвей.

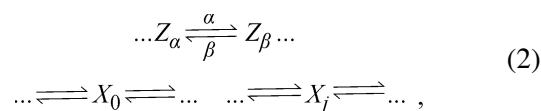
В схеме (1) квадратными скобками выделен один сегмент (совокупность интермедиатов и ветвей), который будем рассматривать в качестве потенциального равновесного сегмента для равновесного приближения. В качестве равно-

весных будем рассматривать только обратимые сегменты, т.е. сегменты, внутри которых нет необратимых стадий, все интермедиаты из такого сегмента связаны друг с другом обратимо посредством интермедиатов и ветвей из этого сегмента, в таком сегменте отсутствуют ветви, выходящие за рамки сегмента и входящие в него извне. При наличии возможности циклического движения внутри обратимого сегмента завершение любого цикла возвращает систему в исходное состояние (не происходит появления или исчезновения участников реакции). В силу этого в отдельно взятом обратимом сегменте при любых заданных концентрациях участников реакции стационарное состояние является состоянием истинного равновесия.

Предполагается, что в схеме (1) имеется один участок, через который проходит весь поток продукта (субстрата) ферментативной реакции, так что скорость ферментативной реакции равна скорости этого потока. На схеме (1) показаны два смежных интермедиата такого участка, Z_α и Z_β .

Один из двух интермедиатов Z_α и Z_β (или оба эти интермедиата) могут принадлежать равновесному сегменту, но ветви с величинами α и β расположены за пределами равновесного сегмента. Пусть направлению ферментативной реакции (1) в сторону образования продуктов из субстратов соответствует направление ветви с константой скорости α . Для простоты дальнейшего изложения предположим, что соотношение концентраций продуктов и субстратов ферментативной реакции таково, что скорость ферментативной реакции – положительная величина (в противном случае достаточно считать продукты ферментативной реакции субстратами и наоборот).

Применение равновесного приближения в случае схемы (1) означает расчет в стационарном состоянии новой кинетической схемы (2):



отличающейся от исходной схемы (1) тем, что согласно Ча [1] равновесный сегмент стянут в один интермедиат X_0 , а величина каждой ветви, выходящей из X_0 , умножена на долю соответствующего интермедиата в находящемся в истинном равновесии отдельно взятом равновесном сегменте (3):

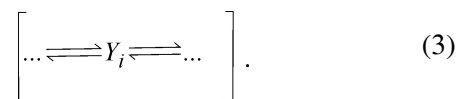


Схема (2) отображает равновесное приближение для механизма ферментативной реакции (1). Назовем ее схемой равновесного приближения. Все величины, полученные для стационарного состояния схемы (2), будем отмечать надстрочными индексами qe .

На схеме (3) изображен отдельно взятый равновесный сегмент схемы (1). Исходя из вышеизложенного, стационарное состояние для интермедиатов в сегменте на схеме (3) является состоянием истинного равновесия. Все величины, рассчитанные для стационарного состояния схемы (3), будем отмечать надстрочными индексами eq .

В работе [29] найдено, что точность равновесного приближения для схемы (1) определяется следующими соотношениями:

$$\frac{1}{(1 + \delta)} \frac{[Y_k]^{ss}}{[Y_l]^{ss}} < \frac{[Y_k]^{eq}}{[Y_l]^{eq}} < (1 + \delta) \frac{[Y_k]^{ss}}{[Y_l]^{ss}}, \quad (4)$$

где Y_k и Y_l – интермедиаты из равновесного сегмента схемы (1);

$$\frac{1}{(1 + \delta)} [X_n]^{ss} < [X_n]^{qe} < (1 + \delta) [X_n]^{ss}, \quad (5)$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (1), включая интермедиаты равновесного сегмента, а также Z_α и Z_β ;

$$\frac{v^{ss}}{(1 + \mu)} < v^{qe} < v^{ss}(1 + \delta), \quad (6)$$

где v^{ss} и v^{qe} – стационарные скорости ферментативной реакции для схемы (1) и схемы (2) соответственно.

Величины μ и δ определяются следующим образом:

$$\frac{D_{X_n}^{ss**}}{D_{X_n}^{ss*}} < \delta, \quad (7)$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (1), включая интермедиаты равновесного сегмента, а также Z_α и Z_β .

$$\frac{D_{Z_\alpha}^{ss**'}}{D_{Z_\alpha}^{ss*'}} = \frac{D_{Z_\beta}^{ss**'}}{D_{Z_\beta}^{ss*'}} = \mu. \quad (8)$$

Все базовые деревья произвольного интермедиата X_n разбиты на два класса [29]: первый класс составляют принадлежащие равновесному сегменту базовые деревья, которые обладают следующими свойствами: базовые деревья, на-

правленные к базе внутри равновесного сегмента, не содержат в своем составе ветвей, выходящих из равновесного сегмента; базовые деревья, направленные к базе вне равновесного сегмента, содержат в своем составе только одну ветвь, выходящую из равновесного сегмента. Второй класс составляют все остальные базовые деревья, не принадлежащие равновесному сегменту. Соответственно величины всех базовых определителей графа (1) представлены в виде суммы двух величин:

$$D_{X_n}^{ss} = D_{X_n}^{ss*} + D_{X_n}^{ss**}, \quad (9)$$

где величины, отмеченные одной звездочкой, представляют собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из первого класса, величины, отмеченные двумя звездочками, представляют собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из второго класса.

В выражении (8) $D_{Z_\alpha}^{ss**'}$ представляет собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из второго класса и не содержащих ветвь β ; $D_{Z_\alpha}^{ss*'}$ представляет собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из первого класса и не содержащих ветвь β ; $D_{Z_\beta}^{ss**'}$ представляет собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из второго класса и не содержащих ветвь α ; $D_{Z_\beta}^{ss*'}$ представляет собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из первого класса и не содержащих ветвь α .

Величины μ и δ определены в общем виде и являются адекватной характеристикой точности равновесного приближения, присущей каждой конкретной схеме [29]. Покажем, что эти величины в свою очередь можно оценить исходя из структуры и свойств равновесного сегмента.

Равновесный сегмент, состоящий из двух интермедиатов. Предположим, что равновесный сегмент схемы (1) состоит из двух интермедиатов Y_A и Y_B :



Ни один из этих интермедиатов не является тупиковым комплексом. Интермедиат Y_A в схеме (1) связан внутри равновесного сегмента с помощью ветви $k_{A,B}$ с интермедиатом Y_B , а также связан с некоторыми другими интермедиатами вне равновесного сегмента: $X_{A1}, X_{A2}, \dots, X_{Ai}, \dots$ с помощью ветвей $k_{A,A1}, k_{A,A2}, \dots, k_{A,Ai}$. Аналогично, интермедиат Y_B в схеме (1) связан внутри равновесного сегмента с помощью ветви

$k_{B,A}$ с интермедиатом Y_A , а также связан с некоторыми другими интермедиатами вне равновесного сегмента: $X_{B1}, X_{B2}, \dots, X_{Bj} \dots$ с помощью ветвей $k_{B,B1}, k_{B,B2} \dots k_{B,Bj}$.

Рассмотрим базовый определитель интермедиата Y_B ($D_{Y_B}^{ss}$). С учетом того, что любое базовое дерево, относящееся к некоторой базе (к примеру Y_B), содержит в своем составе одну и только одну ветвь, выходящую из другой конкретной вершины (к примеру Y_A), справедливо следующее:

$$D_{Y_B}^{ss} = (k_{A,B})^B + (k_{A,A1})^B + (k_{A,A2})^B + \dots = (k_{A,B})^B + \sum_{Ai} (k_{A,Ai})^B, \quad (11)$$

где $(k_{A,B})^B$ – сумма величин базовых деревьев Y_B , содержащих $k_{A,B}$; $(k_{A,A1})^B$ – сумма величин базовых деревьев Y_B , содержащих $k_{A,A1}$, и т.д.

В случае базового определителя базы Y_A ($D_{Y_A}^{ss}$), по аналогии с $D_{Y_B}^{ss}$:

$$D_{Y_A}^{ss} = (k_{B,A})^A + (k_{B,B1})^A + (k_{B,B2})^A + \dots = (k_{B,A})^A + \sum_{Bj} (k_{B,Bj})^A. \quad (12)$$

Легко показать, что:

$$\frac{(k_{A,B})^B}{k_{A,B}} = \frac{(k_{B,A})^A}{k_{B,A}}. \quad (13)$$

Действительно, каждая из величин $\left(\frac{(k_{A,B})^B}{k_{A,B}} \right)$ и $\left(\frac{(k_{B,A})^A}{k_{B,A}} \right)$ равна сумме величин всех деревьев графа (1), каждое из которых направлено к Y_A и/или к Y_B и не содержит ветвей, выходящих из Y_A и Y_B .

Более того, сравнение базовых деревьев Y_B , содержащих $k_{A,B}$, и базовых деревьев Y_B , содержащих $k_{A,Ai}$, показывает, что

$$\frac{(k_{A,Ai})^B}{k_{A,Ai}} = \frac{(k_{A,B}/k_{A,Ai})^B}{k_{A,B}}, \quad (14)$$

где $(k_{A,B}/k_{A,Ai})^B$ – сумма величин базовых деревьев Y_B , содержащих $k_{A,B}$, но не содержащих $k_{A,Ai}$. В силу этого

$$\frac{(k_{A,B})^B}{k_{A,B}} > \frac{(k_{A,Ai})^B}{k_{A,Ai}} \quad (15)$$

для всех Ai , и подобные рассуждения относительно Y_A позволяют записать:

$$\frac{(k_{B,A})^A}{k_{B,A}} > \frac{(k_{B,Bj})^A}{k_{B,Bj}} \quad (16)$$

для всех Bj .

Сопоставление уравнений (11)–(12) и неравенств (15)–(16) позволяет записать:

$$(k_{A,B})^B < D_{Y_B}^{ss} < (k_{A,B})^B \left(1 + \frac{\sum k_{A,Ai}}{k_{A,B}} \right), \quad (17)$$

$$(k_{B,A})^A < D_{Y_A}^{ss} < (k_{B,A})^A \left(1 + \frac{\sum k_{B,Bj}}{k_{B,A}} \right). \quad (18)$$

Поскольку все константы скорости в схеме (1) в выбранном диапазоне изменения концентраций участников ферментативной реакции являются положительными ограниченными величинами, без уменьшения общности может быть записано:

$$\frac{\sum k_{A,Ai}}{k_{A,B}} \leq \varepsilon, \quad \frac{\sum k_{B,Bj}}{k_{B,A}} \leq \varepsilon. \quad (19)$$

Здесь $\varepsilon > 0$, и ε может быть просто равным большей из двух величин в левых частях неравенств (19). В этом случае неравенства (17) и (18) могут быть переписаны:

$$(k_{A,B})^B < D_{Y_B}^{ss} < (k_{A,B})^B (1 + \varepsilon), \quad (20)$$

$$(k_{B,A})^A < D_{Y_A}^{ss} < (k_{B,A})^A (1 + \varepsilon). \quad (21)$$

Поскольку величина $(k_{A,B})^B$ является ничем иным, как $D_{Y_B}^{ss*}$, а величина $(k_{B,A})^A$ – $D_{Y_A}^{ss*}$, то неравенства (17) и (18) приобретают следующий вид:

$$\frac{D_{Y_B}^{ss**}}{D_{Y_B}^{ss*}} < \varepsilon, \quad (22)$$

$$\frac{D_{Y_A}^{ss**}}{D_{Y_A}^{ss*}} < \varepsilon. \quad (23)$$

Рассмотрим произвольную вершину X_m за пределами равновесного сегмента графа (1) и

ее базовый определитель ($D_{X_m}^{ss}$). Поскольку каждое базовое дерево X_m содержит одну и только одну ветвь, выходящую из другой вершины (Y_A или Y_B в данном случае), то можно записать:

$$D_{X_m}^{ss} = \sum_{Ai} (k_{B,A} k_{A,Ai})^m + \sum_{Bj} (k_{A,B} k_{B,Bj})^m + \sum_{Ai} \sum_{Bj} (k_{A,Ai} k_{B,Bj})^m, \quad (24)$$

где $(k_{B,A} k_{A,Ai})^m$ – сумма величин базовых деревьев X_m , содержащих одновременно $k_{B,A}$ и $k_{A,Ai}$; $(k_{A,B} k_{B,Bj})^m$ – сумма величин базовых деревьев X_m , содержащих одновременно $k_{A,B}$ и $k_{B,Bj}$; $(k_{A,Ai} k_{B,Bj})^m$ – сумма величин базовых деревьев X_m , содержащих одновременно $k_{A,Ai}$ и $k_{B,Bj}$.

Анализ структуры базовых деревьев X_m , содержащих возможные комбинации $k_{B,A}$, $k_{A,B}$, $k_{A,Ai}$ и $k_{B,Bj}$, показывает, что:

$$\frac{(k_{A,Ai} k_{B,Bj})^m}{k_{A,Ai} k_{B,Bj}} < \frac{(k_{B,A} k_{A,Ai})^m}{k_{B,A} k_{A,Ai}}, \quad (25)$$

$$\frac{(k_{A,Ai} k_{B,Bj})^m}{k_{A,Ai} k_{B,Bj}} < \frac{(k_{A,B} k_{B,Bj})^m}{k_{A,B} k_{B,Bj}} \quad (26)$$

для всех Ai и Bj .

Уравнение (24) вместе с неравенствами (19), (25), (26) дает:

$$\sum_{Ai} (k_{B,A} k_{A,Ai})^m + \sum_{Bj} (k_{A,B} k_{B,Bj})^m < D_{X_m}^{ss} < \left[\sum_{Ai} (k_{B,A} k_{A,Ai})^m + \sum_{Bj} (k_{A,B} k_{B,Bj})^m \right] (1 + \epsilon/2) \quad (27)$$

и, используя очевидные соотношения:

$$\sum_{Ai} (k_{B,A} k_{A,Ai})^m = (k_{B,A})^m, \quad (28)$$

$$\sum_{Bj} (k_{A,B} k_{B,Bj})^m = (k_{A,B})^m, \quad (29)$$

можем переписать (27) в форме:

$$(k_{B,A})^m + (k_{A,B})^m < D_{X_m}^{ss} < \left[(k_{B,A})^m + (k_{A,B})^m \right] \left(1 + \frac{1}{2} \epsilon \right). \quad (30)$$

С учетом того, что

$$(k_{B,A})^m + (k_{A,B})^m = D_{X_m}^{ss*}, \quad (31)$$

неравенство (30) означает:

$$\frac{D_{X_m}^{ss**}}{D_{X_m}^{ss*}} < \frac{\epsilon}{2}. \quad (32)$$

С учетом уравнений (7), (15), (16), (22), (23), (25), (26) и (32) получим, что для этого равновесного сегмента

$$\delta < \epsilon, \quad (33)$$

где значения ϵ определены в (19).

Для оценки величины μ в уравнении (8) запишем:

$$D_{Z_\alpha}^{ss*} = \sum_{Ai} (k_{B,A} k_{A,Ai} / \beta)^\alpha + \sum_{Bj} (k_{A,B} k_{B,Bj} / \beta)^\alpha, \quad (34)$$

$$D_{Z_\alpha}^{ss**} = \sum_{Ai} \sum_{Bj} (k_{A,Ai} k_{B,Bj} / \beta)^\alpha, \quad (35)$$

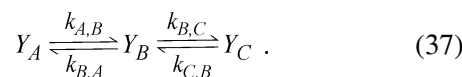
где $(k_{B,A} k_{A,Ai} / \beta)^\alpha$ – сумма величин базовых деревьев Z_α , содержащих одновременно $k_{B,A}$ и $k_{A,Ai}$ и не содержащих β ; $(k_{A,B} k_{B,Bj} / \beta)^\alpha$ – сумма величин базовых деревьев Z_α , содержащих одновременно $k_{A,B}$ и $k_{B,Bj}$ и не содержащих β ; $(k_{A,Ai} k_{B,Bj} / \beta)^\alpha$ – сумма величин базовых деревьев Z_α , содержащих одновременно $k_{A,Ai}$ и $k_{B,Bj}$ и не содержащих β .

Анализ структуры этих соответствующих Z_α базовых деревьев, содержащих возможные комбинации $k_{B,A}$, $k_{A,B}$, $k_{A,Ai}$ и $k_{B,Bj}$, а также сопоставление выражений (34) и (35) с учетом неравенств (15) и (16) показывает, что для этого равновесного сегмента

$$\mu < \epsilon, \quad (36)$$

где значения ϵ определены в (19).

Равновесный сегмент, состоящий из трех интермедиатов. Предположим, что равновесный сегмент схемы (1) состоит из трех интермедиатов Y_A , Y_B и Y_C :



Ни один из этих интермедиатов не является тупиковым комплексом. По аналогии с предыдущим разделом легко показать, что условия признания этого обратимого сегмента равновесным и точность равновесного приближения в этом случае определяются малостью следующих соотношений величин ветвей, идущих на-

ружу равновесного сегмента и ветвей внутри равновесного сегмента:

$$\frac{\sum k_{A,Ai}}{k_{A,B}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{B,Bj}}{k_{B,A}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{B,C}}{k_{B,C}} \leq \epsilon, \quad (38)$$

$$\frac{\sum k_{C,Ck}}{k_{C,B}} \leq \epsilon, \frac{k_{B,A} \sum k_{A,Ai}}{k_{A,B} k_{B,C}} \leq \epsilon, \frac{k_{B,C} \sum k_{C,Ck}}{k_{C,B} k_{B,A}} \leq \epsilon.$$

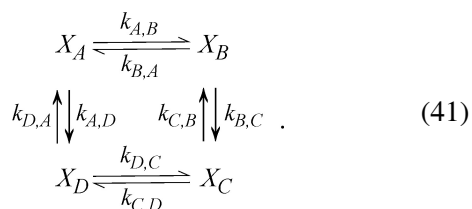
Применение развитых в предыдущем разделе подходов дает оценку точности применения равновесного приближения в случае равновесного сегмента из трех интермедиатов (37) для отклонений в определении концентраций интермедиатов и скорости ферментативной реакции (4)–(6):

$$\delta < 3\epsilon + \epsilon^2, \quad (39)$$

$$\mu < 3\epsilon + \epsilon^2, \quad (40)$$

где значения ϵ определены в (38).

Равновесный сегмент, состоящий из четырех интермедиатов (замкнутый сегмент). Пусть равновесный сегмент механизма (1) имеет вид (41):



По аналогии с предыдущими разделами легко показать, что условия признания этого обратимого сегмента равновесным и точность равновесного приближения и в этом случае определяются малостью следующих соотношений величин ветвей, идущих наружу равновесного сегмента и ветвей внутри равновесного сегмента:

$$\frac{\sum k_{A,Ai}}{k_{A,B}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{A,Ai}}{k_{A,D}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{B,Bj}}{k_{B,A}} \leq \epsilon, \quad (42)$$

$$\frac{\sum k_{B,Bj}}{k_{B,C}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{C,Ck}}{k_{C,B}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{C,Ck}}{k_{C,D}} \leq \epsilon, \frac{\sum k_{D,DI}}{k_{D,A}} \leq \epsilon,$$

$$\frac{k_{D,A} \sum k_{A,Ai}}{k_{A,D} k_{D,C}} \leq \epsilon, \frac{k_{A,B} \sum k_{B,Bj}}{k_{B,A} k_{A,D}} \leq \epsilon, \frac{k_{B,C} \sum k_{C,Ck}}{k_{C,B} k_{B,A}} \leq \epsilon.$$

Точность применения равновесного приближения в случае равновесного сегмента из четырех интермедиатов (41) для отклонений в определении концентраций интермедиатов и скорости ферментативной реакции (4)–(6), с учетом соблюдения принципа детального равновесия для констант скорости равновесных стадий в термодинамическом боксе, в этом случае будет определяться выражениями:

$$\delta < \frac{7}{2}\epsilon + \frac{11}{6}\epsilon^2 + \frac{1}{4}\epsilon^3, \quad (43)$$

$$\mu < \frac{7}{2}\epsilon + \frac{11}{6}\epsilon^2 + \frac{1}{4}\epsilon^3, \quad (44)$$

где значения ϵ определены в (42).

Равновесный сегмент в общем виде. Разумеется, невозможно перечислить все возможные конфигурации всех равновесных сегментов, однако можно изложить алгоритм расчета точности равновесного приближения для любого равновесного сегмента. Для этого достаточно рассмотреть только равновесный сегмент и фрагменты всех возможных базовых деревьев схемы (1) в пределах этого равновесного сегмента.

Путем сравнения конфигураций фрагментов базовых деревьев, принадлежащих равновесному сегменту, и фрагментов базовых деревьев, не принадлежащих равновесному сегменту, выявляются соотношения величин ветвей, определяющие точность пренебрежения величинами базовых деревьев, не принадлежащих равновесному сегменту, и рассчитывается точность равновесного приближения в каждом конкретном случае.

Метод определения необходимых для применения равновесного приближения ограничений на соотношения величин ветвей в общем случае выглядит следующим образом.

Представим равновесный сегмент произвольной структуры. Возьмем принадлежащий равновесному сегменту интермедиат Y_k , имеющий ветви (как минимум одну ветвь), выходящие из Y_k и направленные наружу равновесного сегмента. Рассмотрим какой-либо другой интермедиат равновесного сегмента (Y_l). Имеется по меньшей мере один маршрут, соединяющий Y_k и Y_l и лежащий внутри равновесного сегмента. Совершим путь от Y_k к Y_l по этому маршруту. Произведение величин ветвей, на-

правленных по ходу движения, на этом пути обозначим «denominator». Затем отступим в рамках выбранного маршрута от Y_l на одну стадию назад (по направлению к Y_k) и совершим путь по тому же маршруту в обратном направлении до интермедиата Y_k . Произведение величин ветвей, направленных по ходу движения, на этом пути (количество этих ветвей меньше на одну по сравнению с предыдущим путем) обозначим «nominator». Сумму величин всех ветвей, выходящих из Y_k и направленных наружу равновесного сегмента, обозначим «sum». Необходимым условием применения равновесного приближения в случае произвольного сегмента будет малость ϵ , где ϵ определяется выражениями

$$\text{sum} \frac{\text{nominator}}{\text{denominator}} \leq \epsilon \quad (45)$$

для всех принадлежащих равновесному сегменту Y_k и Y_l и для всех возможных маршрутов между ними внутри равновесного сегмента. Точность применения равновесного приближения (4)–(6) на основании соотношений (45) может быть определена в каждом отдельном случае.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная в настоящей работе оценка точности равновесного приближения зависит только от конфигурации равновесного сегмента и соотношения величин ветвей, направленных наружу равновесного сегмента, и ветвей внутри равновесного сегмента и не зависит от характеристик остальной (стационарной) части кинетической схемы.

Примененные в работе [29] оценки точности равновесного приближения (δ и μ), с одной стороны, являются идеальными характеристиками точности, с другой стороны, зависят от конкретной кинетической схемы и не предполагают иного способа их оценки помимо непосредственного расчета. Полученные в настоящей работе оценки точности равновесного приближения являются более грубой оценкой, так как при выводе соответствующих формул используются строгие неравенства типа (15), (16), (25), (26), однако эти оценки справедливы для всего семейства кинетических схем для данного равновесного сегмента, носят универсальный и практический характер и могут быть использованы как для оценки точности в конкретных случаях, так и для конструирования (в том числе компьютерного) кинетических схем с заранее заданными свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследова-

ований (грант 12-04-01596-а) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Cha, *J. Biol. Chem.* **243**, 820 (1968).
2. П. В. Вржещ, *Биохимия* **75**, 1560 (2010).
3. V. Lescovac, *Comprehensive enzyme kinetics* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003).
4. R. Cassels, R. Fears, and R. A. G. Smith, *Biochem. J.* **247**, 395 (1987).
5. P. R. Young and C. M. Waickus, *Biochem. J.* **250**, 221 (1988).
6. J. S. Campbell and H. J. Karavolas, *J. Steroid Biochem.* **32**, 283 (1989).
7. T. M. Glendening and J. E. Poulton, *Plant. Physiol.* **94**, 811 (1990).
8. O. Cunningham, M. G. Gore, and T. J. Mantle, *Biochem. J.* **345**, 393 (2000).
9. P. Khanna and J. M. Schuman, *Biochemistry* **40**, 1451 (2001).
10. I. Imrishkova, E. Langley, R. Arreguin-Espinosa, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 137 (2001).
11. I. Imrishkova, R. Arreguin-Espinosa, S. Guzman, et al., *Res. Microbiol.* **156**, 351 (2005).
12. C.-F. Chou, C.-L. Lai, Y.-C. Chang, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 25209 (2002).
13. R. N. Vogt, D. J. Steenkamp, R. Zheng, and J. S. Blanchard, *Biochem. J.* **374**, 657 (2003).
14. B. Gao and H. R. Ellis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1137 (2005).
15. M. Gargouri, B. Gallois, and J. Chaudiere, *Arch. Biochem. Biophys.* **491**, 61 (2009).
16. V. Bulusu, B. Srinivasan, M. P. Bopanna, and H. Balaram, *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 642 (2009).
17. R. Varon, M. Garcia-Moreno, C. Garrido, and F. Garcia-Canovas, *Biochem. J.* **288**, 1072 (1992).
18. I. H. Segel and R. L. Martin, *J. Theor. Biol.* **135**, 445 (1988).
19. C. M. Topham and K. Brocklehurst, *Biochem. J.* **282**, 261 (1992).
20. M. J. Selwyn, *Biochem. J.* **295**, 897 (1993).
21. K. Brocklehurst and C. M. Topham, *Biochem. J.* **295**, 898 (1993).
22. A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (Portland Press, London, 2004).
23. G. E. Briggs and J. B. S. Haldane, *Biochem. J.* **19**, 338 (1925).
24. H. Kijima and S. Kijima, *Biophys. Chem.* **16**, 181 (1982).
25. T. Keleti, *FEBS Lett.* **208**, 109 (1986).
26. П. В. Вржещ, *Биохимия* **61**, 2069 (1996).
27. П. В. Вржещ, *Биохимия* **73**, 1390 (2008).
28. П. В. Вржещ, *Биохимия* **76**, 603 (2011).
29. П. В. Вржещ, *Биофизика* **56**, 953 (2013).

30. E. L. King and C. Altman, J. Phys. Chem. **60**, 1375 (1956). 31. M. V. Volkenstein and B. N. Goldstein, Biochim. Biophys. Acta **115**, 471 (1996).

The Accuracy of Rapid Equilibrium Assumption in Steady-state Enzyme Kinetics is the Function of Equilibrium Segment Structure and Properties

P.V. Vrzheschch

*International Biotechnological Center and Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia*

Quantitative evaluation of the accuracy of the rapid equilibrium assumption in the steady-state enzyme kinetics was obtained for an arbitrary mechanism of an enzyme-catalyzed reaction. This evaluation depends only on the structure and properties of the equilibrium segment, but doesn't depend on the structure and properties of the rest (stationary part) of the kinetic scheme. The smaller the values of the edges leaving equilibrium segment in relation to values of the edges within the equilibrium segment, the higher the accuracy of determination of intermediate concentrations and reaction velocity in a case of the rapid equilibrium assumption.

Key words: enzyme kinetics, rapid equilibrium assumption, accuracy of approximation, Cha method, steady-state kinetics, graph theory