

ТОЧНОСТЬ РАВНОВЕСНОГО ПРИБЛИЖЕНИЯ В СТАЦИОНАРНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКЕ ДЛЯ ПРОИЗВОЛЬНЫХ МНОГОМАРШРУТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ НАЛИЧИИ МНОГИХ РАВНОВЕСНЫХ СЕГМЕНТОВ

© 2016 г. П.В. Вржеш

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Международный биотехнологический центр, факультет биоинженерии и биоинформатики

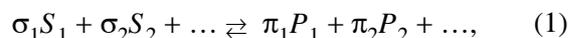
E-mail: biocentr@list.ru

Поступила в редакцию 24.02.16 г.

Получена количественная оценка точности равновесного приближения в стационарной ферментативной кинетике для произвольных многомаршрутных механизмов при наличии многих равновесных сегментов. Выведены явные выражения для оценки вклада произвольного равновесного сегмента в точность равновесного приближения, что позволило определить точность равновесного приближения (Δ) в целом: $1 + \Delta = (1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2) \dots (1 + \Delta_k)$, где $\Delta_1, \Delta_2, \dots, \Delta_k$ – вклад в точность равновесного приближения каждого отдельно взятого индивидуального равновесного сегмента. Точность равновесного приближения определяется только структурой и свойствами учтенных при применении равновесного приближения равновесных сегментов и не зависит от количества маршрутов в механизме ферментативной реакции, от структуры и свойств остальной (стационарной) части кинетической схемы.

Ключевые слова: ферментативная стационарная кинетика, равновесное приближение, многомаршрутные ферментативные механизмы, равновесные сегменты, точность приближения, метод графов.

Ферменты – сложные молекулярные объекты и могут находиться в различных состояниях, следовательно, механизмы катализируемых ими ферментативных реакций (как правило, многосубстратных) априори являются сложными и многомаршрутными. В силу этого возрастает значение рассмотрения обобщенных моделей ферментативных реакций, в частности, вопросов допустимости и точности применения равновесного приближения в ферментативной кинетике. В работах [1–5] доказана правомерность применения метода Ча [6] и определена точность применения равновесного приближения для произвольных одномаршрутных ферментативных реакций при наличии одного равновесного сегмента. В настоящей работе в общем виде получены выражения для оценки погрешности, вносимой произвольным равновесным сегментом при применении равновесного приближения и определена точность равновесного приближения для произвольных многомаршрутных механизмов ферментативных реакций в случае учета многих равновесных сегментов.



где $S_1, S_2 \dots$ – исходные вещества (субстраты), $P_1, P_2 \dots$ – продукты химической реакции, $\sigma_1, \sigma_2 \dots$ и $\pi_1, \pi_2 \dots$ – соответствующие стехиометрические коэффициенты. В данной работе будет использоваться величина константы равновесия (K_{eq}), отражающая равновесное состояние химической реакции (1) (состояния, соответствующие равновесному состоянию, будем обозначать индексом *eq*):

$$K_{eq} = \frac{[P_1]_{eq}^{\pi_1} [P_2]_{eq}^{\pi_2} \dots}{[S_1]_{eq}^{\sigma_1} [S_2]_{eq}^{\sigma_2} \dots}, \quad (2)$$

и величина отношения действующих масс («mass action ratio», Γ), отражающая текущее состояние концентраций реагентов:

$$\Gamma = \frac{[P_1]^{\pi_1} [P_2]^{\pi_2} \dots}{[S_1]^{\sigma_1} [S_2]^{\sigma_2} \dots}. \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходные предпосылки. Стехиометрическое уравнение катализируемой ферментом химической реакции представим в виде:

Положительным направлением реакции будем считать направление «слева направо», т.е. превращение субстратов в продукты (реализуется при условии $\Gamma < K_{eq}$).

Записанная в компактном общем виде кинетическая схема (граф) катализируемой ферментом E химической реакции (1) выглядит следующим образом:



и будет при необходимости детализироваться.

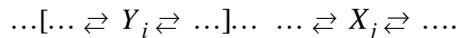
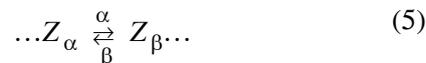
В схеме (4) E_i, E_j – промежуточные формы фермента (интермедиаты), они же узлы графа. Химические превращения (ветви графа) могут отражать как мономолекулярные реакции, так и бимолекулярные реакции взаимодействия интермедиатов с молекулами субстратов, продуктов, модификаторов и прочих участников реакции, при этом для мономолекулярных процессов величины ветвей k_{ij} являются константами скорости реакции первого порядка, для бимолекулярных процессов k_{ij} являются произведениями соответствующих констант скорости второго порядка и концентраций субстрата (или другого участника реакции). В свою очередь для каждой экспериментальной системы, подчиняющейся механизму (4), путем уменьшения общей концентрации фермента (E_0) можно добиться неограниченного приближения к стационарному состоянию по всем промежуточным формам фермента без существенного изменения концентраций участников реакции в пределах достаточного промежутка времени. Найденное решение системы уравнений, соответствующей такому стационарному состоянию механизма (4), будем считать точным решением и обозначать надстрочным индексом ss , точность рассматриваемых в данной работе приближенных решений будет тем выше, чем ближе к этому точному решению будет предлагаемое приближенное решение.

Системы линейных алгебраических уравнений, соответствующие используемым в работе схемам ферментативных реакций в стационарных состояниях, решаются методом Кинга–Альтмана [7] и анализируются с использованием метода графов и терминологии метода графов [8].

Это же касается и схем, соответствующих равновесному приближению, такие схемы также будут рассчитываться в стационарном состоянии, однако решения, полученные для таких схем, будем обозначать надстрочным индексом qe .

Вклад учета отдельно взятого равновесного сегмента в точность равновесного приближения. Пусть в схеме (4) имеется один равновесный сегмент (выделен квадратными скобками) и всего один участок, через который протекает весь поток ферментативной реакции (т.е. механизм ферментативной реакции одномаршрутный).

Показаны два смежных интермедиата такого участка, Z_α и Z_β :



В качестве равновесных сегментов рассматриваются только обратимые [4,5] сегменты. Положительным направлением реакции (1) будем считать направление ветви с константой скорости α .

В работе [4] было показано, что точность равновесного приближения для произвольного механизма ферментативной реакции определяется соотношением величин базовых деревьев первого и второго класса. На примере схемы (5) все базовые деревья X_n (где X_n – произвольный интермедиат, включая интермедиаты равновесного сегмента, а также Z_α и Z_β) разбиты (см. [4]) на два класса: первый класс составляют базовые деревья, которые обладают следующими свойствами: базовые деревья, направленные 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 этого сегмента. Второй класс составляют все остальные базовые деревья X_n . Соответственно величины всех базовых определителей графа (5) (D_{X_n}) могут быть представлены в виде суммы двух величин:

$$D_{X_n} = D_{X_n}^* + D_{X_n}^{**}, \quad (6)$$

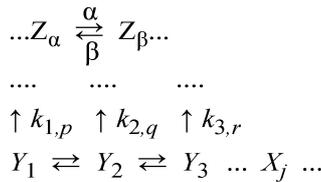
где величины, отмеченные одной звездочкой, представляют собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из первого класса, величины, отмеченные двумя звездочками, представляют собой сумму величин соответствующих базовых деревьев из второго класса.

Для расчета скорости ферментативной реакции необходимо также рассматривать сумму величин базовых деревьев интермедиата Z_α , не содержащих ветвь β (D'_{Z_α}) [4]. В свою очередь D'_{Z_α} состоит из базовых деревьев из первого класса и базовых деревьев из второго класса:

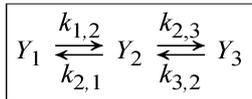
$$D'_{Z_\alpha} = D_{Z_\alpha}^{*'} + D_{Z_\alpha}^{**'}. \quad (7)$$

В работе [4] показано, что применение равновесного приближения к схеме (5), т.е. превращение равновесного сегмента в один узел согласно процедуре Ча [6] и расчет этой новой

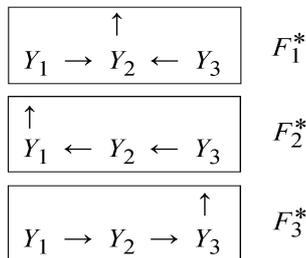
Схема ферментативной реакции:



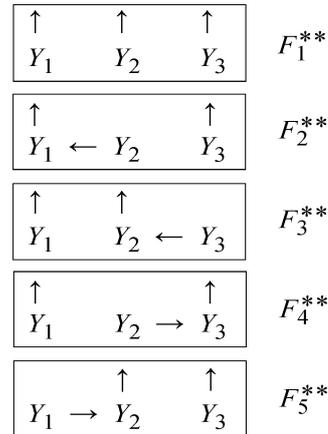
Равновесный сегмент:



Равновесные фрагменты из первого класса:



Равновесные фрагменты из второго класса:



Соответствие между равновесными фрагментами ($F_l^{**} = \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^*$):

$$F_1^{**} = \frac{k_{1,p} k_{3,r}}{k_{1,2} k_{3,2}} F_1^*, \quad F_2^{**} = \frac{k_{3,r}}{k_{3,2}} F_2^*, \quad F_3^{**} = \frac{k_{1,p}}{k_{1,2}} F_1^*,$$

$$F_4^{**} = \frac{k_{1,p}}{k_{1,2}} F_3^*, \quad F_5^{**} = \frac{k_{3,r}}{k_{3,2}} F_1^*$$

Иллюстрация процедуры установления соответствия между равновесными фрагментами из второго класса (F_l^{**}) и равновесными фрагментами из первого класса ($F_{m(l)}^*$) согласно уравнению (8) в случае базы (X_j), расположенной за пределами равновесного сегмента (на примере равновесного сегмента, состоящего из трех интермедиатов). Обозначения см. текст.

схемы в стационарном состоянии, эквивалентно расчету всех величин для исходной схемы (5) с использованием вместо величин D соответствующих им величин D^* .

Покажем, что для произвольного интермедиата из (5) любое базовое дерево из второго класса отличается от соответствующего ему дерева из первого класса только ветвями, принадлежащими равновесному сегменту и выходящими непосредственно из него (обратное утверждение не верно).

Рассмотрим вначале базовые деревья схемы (5), направленные к базе X_j , расположенной за пределами равновесного сегмента. Каждое такое дерево содержит в своем составе соответствующий фрагмент, включающий ветви равновесного сегмента и ветви, выходящие непосредственно из равновесного сегмента. Будем называть такие фрагменты равновесными. Соответственно равновесные фрагменты базовых деревьев из первого класса (будем обозначать их символом F^*) принадлежат к первому классу, равновесные фрагменты базовых деревьев из второго класса (будем обозначать их символом F^{**}) принадлежат ко второму классу.

Каждому равновесному фрагменту из второго класса (F_l^{**}) можно поставить в соответствие равновесный фрагмент из первого класса ($F_{m(l)}^*$) (в общем случае несколько равновесных фрагментов) таким образом, чтобы у фрагмента $F_{m(l)}^*$ не было новых по сравнению с F_l^{**} ветвей, выходящих непосредственно из равновесного сегмента. Между такими фрагментами можно установить следующие равенства:

$$F_l^{**} = \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^*, \tag{8}$$

где $\lambda_{l,m(l)}$ является безразмерной дробью, в которую входят величины ветвей равновесного сегмента и ветвей, выходящих непосредственно из равновесного сегмента (иллюстрация такой процедуры приведена на примере равновесного сегмента, состоящего из трех интермедиатов (см. рисунок)). Для удобства дальнейшего рассмотрения будем считать, что в соотношении (8) каждому значению $l = 1, 2, \dots$ соответствует единственное значение $m(l)$; существует также обратная функция $l(m)$ (в отличие от функции $m(l)$ она неоднозначна, причем для некоторых значений m эта функция может быть не определена).

Легко показать (см. Приложение), что соотношение между базовыми деревьями X_j из первого и второго класса определяется выражением:

$$D_{X_j}^{**} < \Lambda D_{X_j}^*, \tag{9}$$

где Λ представляет собой максимальную из величин Λ_m , определяемых выражениями:

$$\Lambda_m = \sum_{l=l(m)} \lambda_{l,m(l)}. \tag{10}$$

Если такие же рассуждения применить к базовым деревьям, составляющим величину D'_{Z_α} , то получим:

$$D_{Z_\alpha}^{**'} < \Lambda D_{Z_\alpha}' . \tag{11}$$

Отметим, что значение Λ зависит от характеристик равновесного сегмента и способа установления соотношения между равновесными фрагментами (соотношение (8)), и не зависит от выбранной базы X_j и от свойств остальной части схемы (5). Путем оптимизации соотношения между равновесными фрагментами и учета вырожденности в соотношениях (8) можно минимизировать величину Λ , после чего эта величина уже не будет зависеть от способа установления соотношения между равновесными фрагментами (соотношение (8), а будет функцией исключительно характеристик равновесного сегмента).

Рассмотрим теперь базовые деревья схемы (5), направленные к базе Y_i , расположенной внутри равновесного сегмента. В результате аналогичных рассуждений приходим к выводу о том, что и в этом случае соотношение суммы величин базовых деревьев из первого класса к сумме величин базовых деревьев из второго класса определяется исключительно свойствами равновесного фрагмента и выражается аналогичным образом:

$$D_{Y_i}^{**} < M(Y_i) D_{Y_i}^*. \tag{12}$$

Следует заметить, что значение величины $M(Y_i)$ (соотношение (12)) зависит от выбранной базы (Y_i), в отличие от значения величины Λ (соотношение (9)), которое от выбранной базы (X_j) не зависит.

Остается выбрать из множества величин Λ и $M(Y_i)$ наибольшую величину, обозначить ее через Δ :

$$\Delta = \max\{\Lambda, M(Y_i)\}, \tag{13}$$

и использовать ее в качестве характеристики равновесного сегмента, не зависящей от остальной части схемы (5):

$$\frac{D_{X_n}^{**}}{D_{X_n}^*} < \Delta, \tag{14}$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (5), включая интермедиаты равновесного сегмента, Z_α и Z_β .

Также справедливо:

$$\frac{D_{Z_\alpha}^{**'}}{D_{Z_\beta}^{*'}} < \Delta. \tag{15}$$

В этом случае с использованием результатов [4] точность равновесного приближения в случае схемы (5) будет определяться выражениями:

$$\frac{1}{(1 + \Delta)} \frac{[Y_k]^{ss}}{[Y_l]^{ss}} < \frac{[Y_k]^{eq}}{[Y_l]^{eq}} < (1 + \Delta) \frac{[Y_k]^{ss}}{[Y_l]^{ss}}, \tag{16}$$

где Y_k и Y_l – интермедиаты из равновесного сегмента схемы (5), $[Y_k]^{eq}$ и $[Y_l]^{eq}$ – равновесные концентрации этих интермедиатов в отдельно взятом равновесном сегменте.

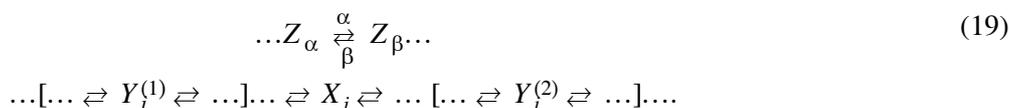
$$\frac{1}{(1 + \Delta)} [X_n]^{ss} < [X_n]^{qe} < (1 + \Delta) [X_n]^{ss}, \tag{17}$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (5), включая интермедиаты равновесного сегмента, а также Z_α и Z_β .

$$\frac{v^{ss}}{(1 + \Delta)} < v^{qe} < v^{ss}(1 + \Delta), \tag{18}$$

где v^{ss} и v^{qe} – стационарная скорость ферментативной реакции для схемы (5) и для равновесного приближения схемы (5) соответственно.

Схема ферментативной реакции содержит более одного равновесного сегмента. Предположим, что в схеме ферментативной реакции (4) имеются два сегмента, которые могут быть признаны равновесными:



Равновесный сегмент 1 (его интермедиаты помечены надстрочным индексом (1)) имеет определяемую выражением (13) характеристику Δ_1 , равновесный сегмент 2 (его интермедиаты помечены надстрочным индексом (4)) имеет соответственно характеристику Δ_2 . Все величины, полученные для стационарного состояния схемы (19), будем отмечать надстрочными индексами *ss*. В схеме (19) стянем равновесный сегмент 1 в узел $X_0^{(1)}$. Все величины, полученные для стационарного состояния этой новой схемы, будем отмечать надстрочными индексами *qe1*, саму схему тоже обозначим как *qe1*. Тогда справедливо следующее:

$$\frac{1}{(1 + \Delta_1)} [X_n]^{ss} < [X_n]^{qe1} < (1 + \Delta_1) [X_n]^{ss}, \quad (20)$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (19), включая интермедиаты равновесных сегментов, Z_α и Z_β .

$$\frac{v^{ss}}{(1 + \Delta_1)} < v^{qe1} < v^{ss}(1 + \Delta_1). \quad (21)$$

Рассмотрим схему *qe1* в качестве исходной стационарной схемы. В схеме *qe1* равновесный сегмент 2 стянем в узел $X_0^{(2)}$. Все величины, полученные для стационарного состояния этой новой схемы, будем отмечать надстрочными индексами *qe12*, саму схему тоже обозначим как *qe12*. Как было показано выше, характеристика равновесного сегмента 2 (Δ_2) не зависит от структуры и свойств стационарной части схемы и, следовательно, не изменится после процедуры стягивания равновесного сегмента 1 в узел $X_0^{(1)}$. Поэтому справедливо следующее:

$$\frac{1}{(1 + \Delta_2)} [X_n]^{qe1} < [X_n]^{qe12} < (1 + \Delta_2) [X_n]^{qe1}, \quad (22)$$

где X_n – произвольный интермедиат схемы (*qe1*), включая интермедиаты равновесного сегмента, Z_α и Z_β .

$$\frac{v^{qe1}}{(1 + \Delta_2)} < v^{qe12} < v^{qe1}(1 + \Delta_2). \quad (23)$$

С использованием соотношений (20) и (21) получим:

$$\frac{1}{(1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2)} [X_n]^{ss} < [X_n]^{qe12} < (1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2) [X_n]^{ss}, \quad (24)$$

$$\frac{v^{ss}}{(1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2)} < v^{qe12} < v^{ss}(1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2). \quad (25)$$

Таким образом, при учете в равновесном приближении двух равновесных сегментов с характеристиками Δ_1 и Δ_2 точность применения равновесного приближения будет описываться выражениями (17) и (18), в которых значения Δ подчиняются следующему соотношению:

$$1 + \Delta = (1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2). \quad (26)$$

Разумеется, если мы проведем эту процедуру в другой последовательности (вначале стянем в узел равновесный сегмент 2, за ним равновесный сегмент 1), то получим тот же результат (26).

Те же рассуждения в случае учета произвольного (*k*) количества равновесных сегментов приведут к выражению:

$$1 + \Delta = (1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2) \dots (1 + \Delta_k). \quad (27)$$

Так как отклонение исходных стационарных концентраций интермедиатов какого-либо равновесного сегмента от равновесных значений для этого сегмента не зависит от манипуляций с другими равновесными сегментами, в случае учета *k* равновесных сегментов справедливо:

$$\frac{1}{(1 + \Delta_1)} \frac{[Y_k^{(1)}]^{ss}}{[Y_l^{(1)}]^{ss}} < \frac{[Y_k^{(1)}]^{eq}}{[Y_l^{(1)}]^{eq}} < (1 + \Delta_1) \frac{[Y_k^{(1)}]^{ss}}{[Y_l^{(1)}]^{ss}}, \quad (28)$$

$$\frac{1}{(1 + \Delta_2)} \frac{[Y_k^{(2)}]^{ss}}{[Y_l^{(2)}]^{ss}} < \frac{[Y_k^{(2)}]^{eq}}{[Y_l^{(2)}]^{eq}} < (1 + \Delta_2) \frac{[Y_k^{(2)}]^{ss}}{[Y_l^{(2)}]^{ss}}, \quad (29)$$

.....

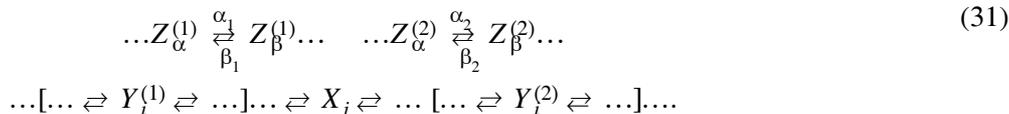
$$\frac{1}{(1 + \Delta_k)} \frac{[Y_k^{(k)}]^{ss}}{[Y_l^{(k)}]^{ss}} < \frac{[Y_k^{(k)}]^{eq}}{[Y_l^{(k)}]^{eq}} < (1 + \Delta_k) \frac{[Y_k^{(k)}]^{ss}}{[Y_l^{(k)}]^{ss}}. \quad (30)$$

Таким образом, отклонение соотношения стационарных концентраций интермедиатов равновесного сегмента от соотношения равновесных концентраций этих интермедиатов определяется характеристикой этого равновесного сегмента и не зависит от учета других равновесных сегментов.

Схема ферментативной реакции содержит более одного маршрута. Предположим, что в схеме ферментативной реакции (4) имеются два участка, через которые параллельно проходит весь поток продукта (субстрата) ферментативной реакции, так что скорость ферментативной

реакции равна сумме скоростей этих потоков, также в схеме имеются два равновесных сег-

мента. Соответственно, схема (4) будет иметь вид:



Скорость ферментативной реакции в этом случае для исходной схемы v^{ss} и для равновесного приближения v^{qe} будет определяться выражениями [4]:

$$v^{ss} = E_0 \frac{(\alpha_1 D_{Z_{\alpha}^{(1)}}^{ss'} + \alpha_2 D_{Z_{\alpha}^{(2)}}^{ss'})(1 - \Gamma/K_{eq})}{\sum_n D_{X_n}^{ss}}, \quad (32)$$

$$v^{qe} = E_0 \frac{(\alpha_1 D_{Z_{\alpha}^{(1)}}^{ss*} + \alpha_2 D_{Z_{\alpha}^{(2)}}^{ss*})(1 - \Gamma/K_{eq})}{\sum_n D_{X_n}^{ss*}}. \quad (33)$$

Воспользуемся описанной в предыдущем разделе процедурой поочередного стягивания равновесных сегментов в узлы. С учетом того, что соотношения (15) определяются только характеристикой соответствующего равновесного сегмента, получим:

$$\frac{v^{ss}}{(1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2)} < v^{qe} < v^{ss}(1 + \Delta_1)(1 + \Delta_2). \quad (34)$$

Продолжив эти рассуждения для произвольного количества маршрутов ферментативной реакции и произвольного количества равновесных сегментов, убедимся в справедливости выражения (27) и в случае произвольного количества маршрутов ферментативной реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе в явном виде получена количественная оценка точности равновесного приближения для наиболее общего случая произвольного многомаршрутного механизма ферментативной реакции в случае учета многих равновесных сегментов. В пределах такой оценки точность определяется только структурой и свойствами учтенных при применении равновесного приближения равновесных сегментов и не зависит от количества маршрутов ферментативной реакции, структуры и свойств остальной (стационарной) части кинетической схемы. Качественная интерпретация этой оценки следующая: чем меньше значения величин ветвей,

выходящих из каждого равновесного сегмента, по сравнению с величинами ветвей, направленных внутрь этого же равновесного сегмента, тем выше точность применения равновесного приближения.

Оценка точности равновесного приближения имеет большое значение при принятии решения о применении такого приближения на практике. Пренебрежение такой оценкой может приводить к ошибкам, в том числе системным. В качестве такой системной ошибки можно привести довольно часто используемый в экспериментах по ферментативной кинетике [11–24] способ определения очередности присоединения субстратов с использованием появляющихся в результате применения равновесного приближения асимметричных по отношению к концентрациям субстратов выражений для стационарной скорости ферментативной реакции [9,10]. Как показано в работе [2], такой способ является принципиально неверным, а причиной ошибки является применение равновесного приближения в тех условиях, при которых такое применение недопустимо.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Для доказательства (9) рассмотрим все базовые деревья X_j (схема (5)) из второго класса, содержащие равновесный фрагмент F_l^{**} : $T_k^{**}(F_l^{**})$. Каждое такое дерево можно представить как суперпозицию равновесного фрагмента F_l^{**} и его дополнения ($S_k(F_l^{**})$), состоящего из оставшихся ветвей дерева $T_k^{**}(F_l^{**})$. Величина дерева $T_k^{**}(F_l^{**})$ будет равна произведению величин равновесного фрагмента и его соответствующего дополнения:

$$T_k^{**}(F_l^{**}) = S_k(F_l^{**})F_l^{**}. \quad (35)$$

С учетом (8) справедливо:

$$T_k^{**}(F_l^{**}) = S_k(F_l^{**})\lambda_{l,m(l)}F_m^{**}. \quad (36)$$

Обратим внимание на то, что все дополнения T_k^{**} к равновесному фрагменту F_l^{**} ($S_k(F_l^{**})$) являются одновременно дополнениями к соот-

ветствующему (по (8)) по отношению к F_l^{**} равновесному фрагменту $F_{m(l)}^*$. Обратное утверждение неверно, так как имеются дополнения к $F_{m(l)}^*$, не являющиеся одновременно дополнениями к F_l^{**} . Поэтому $S_k(F_l^{**})F_{m(l)}^*$ являются различными базовыми деревьями первого класса (обозначим их через $T_k^*(F_{m(l)}^*/F_l^{**})$), образованными равновесным фрагментом из первого класса, $F_{m(l)}^*$, и дополнением к равновесному фрагменту F_l^{**} из второго класса, $S_k(F_l^{**})$, однако в совокупности они не дают набор всех возможных деревьев с равновесным фрагментом $F_{m(l)}^*$. Все содержащие равновесный фрагмент $F_{m(l)}^*$ базовые деревья X_j ($T_p^*(F_{m(l)}^*)$) могут быть представлены как произведения равновесного фрагмента $F_{m(l)}^*$ и всех возможных дополнений к нему же ($S_p(F_{m(l)}^*)$). Суммирование по всем k и p с учетом вышесказанного дает:

$$\sum_k T_k^*(F_{m(l)}^*/F_l^{**}) = \sum_k S_k(F_l^{**})F_{m(l)}^* < \quad (37)$$

$$< \sum_p S_p(F_{m(l)}^*)F_{m(l)}^* = \sum_p T_p^*(F_{m(l)}^*).$$

Суммируем (36) по всем k , далее по l и с использованием (37) получим:

$$\sum_k T_k^{**}(F_l^{**}) = \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^* \sum_k S_k(F_l^{**}) = \quad (38)$$

$$= \lambda_{l,m(l)} \sum_k T_k^*(F_{m(l)}^*/F_l^{**}) < \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^* \sum_p S_p(F_{m(l)}^*) =$$

$$= \lambda_{l,m(l)} \sum_p T_p^*(F_{m(l)}^*),$$

$$D_{X_j}^{**} = \sum_k T_k^{**} = \sum_l \sum_k T_k^{**}(F_l^{**}) = \quad (39)$$

$$= \sum_l \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^* \sum_k S_k(F_l^{**}) =$$

$$= \sum_l \lambda_{l,m(l)} \sum_k T_k^*(F_{m(l)}^*/F_l^{**}) <$$

$$< \sum_l \lambda_{l,m(l)} F_{m(l)}^* \sum_p S_p(F_{m(l)}^*) = \sum_l \lambda_{l,m(l)} \sum_p T_p^*(F_{m(l)}^*).$$

С учетом (8) можно произвести в выражении (39) переход от $m(l)$ непосредственно к m :

$$\sum_l \lambda_{l,m(l)} \sum_p T_p^*(F_{m(l)}^*) = \quad (40)$$

$$= \sum_m \Lambda_m \sum_p T_p^*(F_m^*) = \sum_m \Lambda_m D_{X_j}^*(F_m^*),$$

где $D_{X_j}^*(F_m^*)$ – совокупность всех базовых деревьев X_j из первого класса, содержащих равновесный фрагмент F_m^* , Λ_m определяется выражением:

$$\Lambda_m = \sum_{l=l(m)} \lambda_{l,m(l)}. \quad (41)$$

Если выбрать из всех Λ_m максимальное значение и обозначить его Λ , то справедливо следующее:

$$\sum_m \Lambda_m \sum_p T_p^*(F_m^*) = \sum_m \Lambda_m D_{X_j}^*(F_m^*) < \quad (42)$$

$$< \Lambda \sum_m \sum_p T_p^*(F_m^*) = \Lambda \sum_m D_{X_j}^*(F_m^*) = \Lambda D_{X_j}^*.$$

Совместное рассмотрение выражений (39)–(42) доказывает справедливость (9).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00737) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. П. В. Вржеш, Биохимия **73**, 1390 (2008).
2. П. В. Вржеш, Биохимия **75**, 1560 (2010).
3. П. В. Вржеш, Биохимия **76**, 603 (2011).
4. П. В. Вржеш, Биофизика **58**, 953 (2011).
5. П. В. Вржеш, Биофизика **60**, 262 (2015).
6. S. Cha, J. Biol. Chem. **243**, 820 (1968).
7. E. L. King and C. Altman, J. Phys. Chem. **60**, 1375 (1956).
8. M. V. Volkenstein and B. N. Goldstein, Biochim. Biophys. Acta **115**, 471 (1966).
9. V. Lescovac, *Comprehensive Enzyme Kinetics* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y., 2003)
10. М. Диксон и Э. Уэбб, *Ферменты* (Мир, Москва, 1982).
11. R. Cassels, R. Fears, and R. A. G. Smith, Biochem. J. **247**, 395 (1987).
12. P. R. Young and C. M. Waickus, Biochem. J. **250**, 221 (1988).
13. J. S. Campbell and H. J. Karavolas, J. Steroid Biochem. **32**, 283 (1989).

14. T. M. Glendening and J. E. Poulton, *Plant. Physiol.* **94**, 811 (1990).
15. O. Cunningham, M. G. Gore, and T. J. Mantle, *Biochem. J.* **345**, 393 (2000).
16. P. Khanna and J. M. Schuman, *Biochemistry* **40**, 1451 (2001).
17. I. Imrishkova, E. Langley, R. Arreguin-Espinosa, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 137 (2001).
18. I. Imrishkova, R. Arreguin-Espinosa, S. Guzman, et al., *Res. Microbiol.* **156**, 351 (2005).
19. C.-F. Chou, C.-L. Lai, Y.-C. Chang, G. Duester, and S.-J. Yin, *J. Biol. Chem.* **277**, 25209 (2002).
20. R. N. Vogt, D. J. Steenkamp, R. Zheng, and J. S. Blanchard, *Biochem. J.* **374**, 657 (2003).
21. B. Gao and H. R. Ellis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1137 (2005).
22. M. Gargouri, B. Gallois, and J. Chaudiere, *Arch. Biochem. Biophys.* **491**, 61 (2009).
23. V. Bulusu, B. Srinivasan, M. P. Bopanna, and H. Balaram, *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 642 (2009).
24. J. Oria-Hernandez, N. Cabrera, R. Perez-Montfort, and L. Ramirez-Silva, *J. Biol. Chem.* **280**, 37924 (2005).

The Accuracy of Rapid Equilibrium Assumption in Steady-State Enzyme Kinetics in the Case of a Multipath Arbitrary Enzyme Mechanism with a Number of Equilibrium Segments

P.V. Vrzheschch

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

A quantitative evaluation of the accuracy of the rapid equilibrium assumption in steady-state enzyme kinetics was obtained for a multipath arbitrary enzyme mechanism with a number of equilibrium segments. The explicit expressions for estimating the contribution of any equilibrium segment to the accuracy of the rapid equilibrium assumption were obtained. This allowed us to determine the accuracy of the rapid equilibrium assumption (Δ) in general: $1 + \Delta = (1 + \Delta_1) \times (1 + \Delta_2) \dots (1 + \Delta_k)$, where $\Delta_1, \Delta_2, \dots, \Delta_k$ is the contribution of each individual equilibrium segment. The accuracy depends only on the structure and properties of equilibrium segments, which have been accounted in rapid equilibrium assumption, but it is independent on a number of paths in the mechanism of the enzymatic reaction and on the structure and properties of the remaining part (steady-state) of the kinetic scheme.

Key words: steady-state enzyme kinetics, rapid equilibrium assumption, multipath enzyme mechanisms, equilibrium segments, accuracy of approximation, graph theory