



УДК 577.022

АДЕНИЛАТКИНАЗА ИЗ СЕРДЦА

II. СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ОБРАТНОЙ РЕАКЦИИ
(ОБРАЗОВАНИЕ ADP)

Сеппет Э. К., Курьянов В. В., Сакс В. А.

*Лаборатория метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического центра
Академии медицинских наук СССР, Москва;**Проблемная лаборатория мышечной деятельности
Тартуского государственного университета*

Изучено кинетическое поведение аденилаткиназы из сердца крысы в обратной реакции образования ADP. Показано, что высокие концентрации каждого из субстратов AMP и MgATP вызывают довольно заметное ингибирование реакции. Экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретическим уравнением, аналогичным тому, которое было получено в предшествующей работе из рассмотрения квазистационарности для случая неупорядоченного присоединения субстратов к ферменту. Свободный ATP вызывал существенное ингибирование реакции (K_1 0,4 мМ), образуя ингибиторные комплексы E·ATP и, возможно, ATP·E·AMP. По-видимому, MgAMP также в некоторой степени взаимодействует с ферментом, так как довольно высокие концентрации этого комплекса проявляли слабое, но отчетливое ингибирующее действие ($K_1 \approx 14$ мМ). Анализ имеющихся экспериментальных данных позволяет определить (или оценить) все коэффициенты теоретического уравнения и, таким образом, количественно описать поведение системы.

Аденилаткиназа (КФ 2.7.4.3) катализирует обратимую реакцию превращения ADP в ATP и AMP. Считается, что фермент из мышц имеет два центра связывания: один для комплексов нуклеотидов с Mg^{2+} (MgADP и MgATP), а другой — для свободных нуклеотидов (ADP и AMP) [1—3].

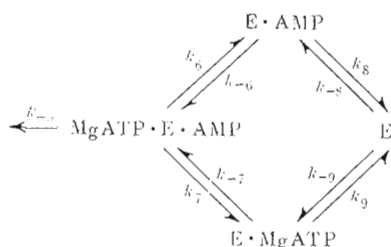
Для описания кинетики обратной аденилаткиназной реакции (синтез ADP), катализируемой мышечной аденилаткиназой, широко используется уравнение Михаэлиса для двухсубстратной реакции с неупорядоченным присоединением субстратов [1—6]. В то же время для этого фермента известно, что перенос фосфатной группы не является лимитирующей стадией [7]. Кроме того, как было показано в нашей предыдущей работе [8], классическое уравнение Михаэлиса мало пригодно для полного анализа кинетики прямой аденилаткиназной реакции (использование ADP), осуществляемой ферментом из сердечной мышцы. В связи со сказанным представлялось целесообразным исследовать кинетику обратной реакции. Количественное изучение этого процесса важно еще и потому, что соотношение концентраций ATP, ADP и AMP играет существенную роль в регуляции клеточного метаболизма [9].

В настоящей работе изучена кинетика обратной реакции. Показано, что эта реакция хорошо описывается более сложным уравнением, чем уравнение Михаэлиса, по форме сходным с уравнением для прямой реакции. Из эксперимента найдены коэффициенты этого уравнения.

Теоретическая часть

1. Основное уравнение для скорости реакции. Обратная аденилаткина реакция может быть изображена схемой 1, где $X_3 = [\text{AMP}]$, $Y_2 = [\text{MgATP}]$ и $X_2 = [\text{ATP}]$.

С х е м а 1



Уравнение скорости реакции может быть записано в виде

$$v_{-1} = \frac{k_{-5} E_0 \cdot E X_3 Y_2}{E + E X_3 + E Y_2 + E X_3 Y_2}. \quad (1)$$

Знаменатель этого выражения не что иное, как уравнение материального баланса для фермента. Из условия стационарности для рассматриваемой системы следует, что концентрации фермент-субстратных комплексов выражаются соотношениями

$$E = k_8 k_9 (k_6 + k_7 + k_{-5}) + k_3 k_{-7} (k_6 + k_{-5}) X_3 + k_9 k_{-6} (k_7 + k_{-5}) \cdot Y_2 + k_{-5} k_{-6} k_{-7} X_3 Y_2, \quad (2)$$

$$E X_3 = X_3 [k_{-8} k_9 (k_6 + k_7 + k_{-5}) + k_{-8} k_{-7} (k_6 + k_{-5}) X_3 + k_{-9} k_{-7} k_6 Y_2], \quad (3)$$

$$E Y_2 = Y_2 [k_8 k_{-9} (k_6 + k_7 + k_{-5}) + k_{-6} k_{-9} (k_7 + k_{-5}) Y_2 + k_{-8} k_{-6} k_7 X_3], \quad (4)$$

$$E X_3 Y_2 = X_3 Y_2 [(k_8 k_{-9} k_7 + k_9 k_{-8} k_6) + k_{-6} k_{-7} (k_{-8} X_3 + k_{-9} Y_2)]. \quad (5)$$

Исходя из системы уравнений (1) — (5), можно написать уравнение для скорости реакции:

$$v_{-1} = \frac{V_{-1} (1 + B_1 X_3 + B_2 Y_2) X_3 Y_2}{1 + B_3 X_3 + B_4 X_2 + B_5 X_3 Y_2 + B_6 X_3^2 + B_7 Y_2^2 + B_8 X_3 Y_2^2 + B_9 X_3^2 Y_2}. \quad (6)$$

Из уравнений (1), (2), (3), (4) следует, что коэффициенты уравнения (6) даются соотношениями

$$V_{-1} = \frac{V_{-1m} (k_8 k_{-9} k_7 + k_9 k_{-8} k_6)}{k_8 k_9 (k_6 + k_7 + k_{-5})} = \frac{V_{-1m} \beta'}{k_8 k_9 \alpha'}, \quad (6.1)$$

где $\alpha' = k_6 + k_7 + k_{-5}$; $\beta' = k_8 k_{-9} k_7 + k_9 k_{-8} k_6$ и $V_{-1m} = k_{-5} E_0$

$$B_1 = k_{-6} k_{-7} k_{-8} / \beta', \quad (6.2)$$

$$B_2 = k_{-7} k_{-8} k_{-9} / \beta', \quad (6.3)$$

$$B_3 = \frac{k_{-8}}{k_8} + \frac{k_{-7} (k_6 + k_{-5})}{k_9 \alpha'}, \quad (6.4)$$

$$B_4 = \frac{k_{-9}}{k_9} + \frac{k_{-6} (k_7 + k_{-5})}{k_8 \alpha'}, \quad (6.5)$$

$$B_5 = \frac{k_{-6} k_{-7} k_{-5} + k_{-9} k_{-7} k_6 + k_{-9} k_7 k_8 - k_{-6} k_{-8} k_7 + k_6 k_{-8} k_9}{k_8 k_9 \alpha'}, \quad (6.6)$$

$$B_6 = k_{-7} k_{-8} (k_6 + k_{-5}) / k_8 k_9 \alpha', \quad (6.7)$$

$$B_7 = k_{-6} k_{-9} (k_7 + k_{-5}) / k_8 k_9 \alpha', \quad (6.8)$$

$$B_8 = \frac{k_{-7} k_{-8} k_{-9}}{k_8 k_9 \alpha'}, \quad (6.9)$$

$$B_9 = \frac{k_{-6} k_{-7} k_{-8}}{k_8 k_9 \alpha'}. \quad (6.10)$$

Коэффициенты V_8 и V_2 , а также V_9 и V_1 связаны соотношениями

$$V_8 = \frac{B_2\beta'}{k_8k_9\alpha'}, \quad (6.11)$$

$$V_9 = \frac{B_1\beta'}{k_8k_9\alpha'}. \quad (6.12)$$

Рассмотрим некоторые практически полезные частные случаи уравнения (5). При достаточно малых концентрациях субстратов, когда одновременно $V_1X_3 \ll 1$ и $V_2Y_2 \ll 1$, выражение для обратной скорости выглядит таким образом:

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_{-1}} = & \left(\left[\frac{1}{V_{-1m}} + \frac{B'_5}{V_{-1}} \right] + \frac{B_3}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2} \right) + \\ & + \left(\frac{B_4}{V_{-1}} + \frac{B_7}{V_{-1}} Y_2 + \frac{1}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2} \right) \frac{1}{X_3} + \frac{B_6}{V_{-1}Y_2} \cdot X_3 \end{aligned} \quad (6.13)$$

относительно X_3 и

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_{-1}} = & \left[\left(\frac{1}{V_{-1m}} + \frac{B'_5}{V_{-1}} \right) + \frac{B_4}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3} \right] + \\ & + \left(\frac{B_3}{V_{-1}} + \frac{B_6}{V_{-1}} X_3 + \frac{1}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3} \right) \frac{1}{Y_2} + \frac{B_7}{V_{-1}X_3} \cdot Y_2 \end{aligned} \quad (7)$$

относительно Y_2 . Здесь

$$B'_5 = \frac{k_{-5}k_{-6}k_{-7} + k_6k_{-7}k_{-9} + k_7k_{-6}k_{-8}}{k_8k_9\alpha'}.$$

Наличие в этих уравнениях для $1/v_{-1}$ членов, содержащих X_3 и Y_2 , предполагает, что при достаточно высоких значениях X_3 или Y_2 ($1/X_3$ и $1/Y_2$ малы, но $V_1X_3 \ll 1$ и $V_2Y_2 \ll 1$) можно ожидать увеличения $1/v_{-1}$ с ростом X_3 или Y_2 , т. е. ингибирования реакции одним из субстратов. Математически названная ситуация означает наличие максимумов у функции $v_{-1}(X_3, Y_2)$ и отрицательные значения частных производных этой функции, т. е.

$$\left. \frac{dv_{-1}}{dX_3} \right|_{Y_2=\text{const}} \leq 0 \quad \text{и} \quad \left. \frac{dv_{-1}}{dY_2} \right|_{X_3=\text{const}} \leq 0, \quad X_3 \geq 0, \quad Y_2 \geq 0.$$

Из двух последних уравнений могут быть найдены те соотношения между кинетическими константами, при которых будет наблюдаться ингибирование высокими концентрациями субстратов.

Эти соотношения выглядят следующим образом: 1) для ингибирования АМР (X_3) при любых концентрациях MgATP $k_{-9} > k_{-6}$, $k_{-8} > k_{-6}$, $k_6 > k_{-6}$ и $k_7 \geq k_{-7}$; 2) для ингибирования MgATP (Y_2) при любых концентрациях АМР (X_3) $k_{-9} > k_{-7}$, $k_{-8} > k_{-7}$, $k_6 > k_{-6}$ и $k_7 \geq k_{-7}$. Приведенные неравенства получаются в результате анализа значений частных производных точно таким же образом, как и в предыдущей работе [8].

В случае очень высоких концентраций одного из субстратов, когда $V_1X_3 \gg 1$, но $V_2Y_2 \ll 1$ или $V_2Y_2 \gg 1$, а $V_1X_3 \ll 1$, скорость реакции и ее обратная величина стремятся к предельному значению:

$$\frac{1}{v_{-1}} \rightarrow \frac{1}{V_{-1, X_3 \rightarrow \infty}} = \frac{1}{V_{-1m}} + \frac{B_8}{B_1V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2} = \frac{1}{V_{-1m}} + \frac{k_6 + k_{-5}}{k_{-6}V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2} \quad (8)$$

и

$$\frac{1}{v_{-1}} \rightarrow \frac{1}{V_{-1, Y_2 \rightarrow \infty}} = \frac{1}{V_{-1m}} + \frac{B_7}{B_2V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3} = \frac{1}{V_{-1m}} + \frac{k_7 + k_{-5}}{k_{-7}V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3}. \quad (9)$$

Таким образом, из сказанного следует, что зависимость скорости реакции от концентрации одного субстрата при не слишком большой концентрации второго может иметь три участка. Когда концентрация суб-

страта увеличивается от нуля, наблюдается возрастание скорости реакции, затем эта величина достигает максимума и начинается снижение скорости процесса до некоторого постоянного уровня, который в дальнейшем практически не изменяется. Кроме того, из сопоставления выражений для $1/v_{-1}$ (6.13), (7), (8) и (9) ясно, что определяемые обычным путем максимальные скорости и K_m неодинаковы для разных диапазонов концентраций субстратов.

2. *Ингибирование обратной реакции.* Рассмотрим влияние некоторого эффектора Z , конкурирующего с АМР и/или MgАТР за место связывания с ферментом. Будем считать, что образующиеся фермент-ингибиторные комплексы находятся в равновесии с E , EX_3 и EY_2 . Иначе говоря, концентрации этих комплексов равны:

$$EZ_1 = \frac{E \cdot Z}{K_z}; \quad ZEX_3 = \frac{EX_3 \cdot Z}{K_z} \quad \text{и} \quad ZEY_2 = \frac{EY_2 \cdot Z}{K_z},$$

где K_z — константа ингибирования, принятая одинаковой для всех приведенных здесь комплексов. Обратная величина скорости реакции для этого случая выражается уравнением

$$\frac{1}{v_{-11}} = \frac{1}{v_{-1}} + \frac{E + EX_3 + EY_2}{EX_3Y_2} \cdot \frac{Z}{K_z}. \quad (10)$$

Последнее уравнение может быть представлено в виде

$$1/v_{-11} = 1/v_{-1} + (1/v_{-1} - 1/V_{-1m}) \frac{Z}{K_z}. \quad (11)$$

Ясно, что величина K_z определяется из зависимости тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-11}$ против Z от $1/v_{-1}$, которая также представляет собой прямую с тангенсом угла наклона $1/K_z$. Если же эффектор Z образует комплексы не со всеми формами фермента, а только с одной или двумя из них, в уравнении (10) в множителе перед Z исчезают концентрации соответствующих комплексов, не реагирующих с эффектором.

Названная ситуация может анализироваться двумя способами. Первый из них заключается в том, чтобы из зависимостей $1/v_{-11}$ от Z при разных значениях X_3 и Y_2 найти тангенсы углов наклона, выражающиеся разными функциями X_3 и Y_2 , и проанализировать зависимости этих величин от $1/X_3$ и $1/Y_2$. Второй подход состоит в том, чтобы представить упомянутые тангенсы углов наклона в виде функции $1/v_{-1}$, которая в данном случае представляет собой кривую, описываемую уравнением

$$s = \frac{1}{v_{-1}} \cdot \frac{1}{K_z} - \left(\frac{1}{V_{-1m}} + F(X_3, Y_2) \right) \frac{1}{K_z}, \quad (12)$$

где $F(X_3, Y_2)$ — функция X_3 и Y_2 , равная отношению концентраций комплексов, не реагирующих с эффектором Z , к концентрации EX_3Y_2 . При тех значениях $1/v_{-1}$, когда $F(X_3, Y_2) \ll (1/v_{-1} - 1/V_{-1m})$, касательная к этой части кривой имеет тангенс угла наклона, примерно равный $1/K_z$.

Результаты исследования

1. *Влияние концентрации АМР на скорость обратной реакции.* Из рассмотрения кривых зависимостей скорости реакции от концентрации АМР при разных концентрациях MgАТР (рис. 1а) следует, что все кривые имеют восходящие начальные участки, максимумы и нисходящие ветви при относительно высоких концентрациях АМР, как это и предсказывает теория. Восходящие участки названных кривых в двойных обратных координатах дают серию прямых (рис. 1б). В то же время, как показано на рис. 2а, нисходящие ветви кривых линеаризуются в координатах $1/v_{-1}$ от [АМР]. Приведенные зависимости полностью описываются тео-

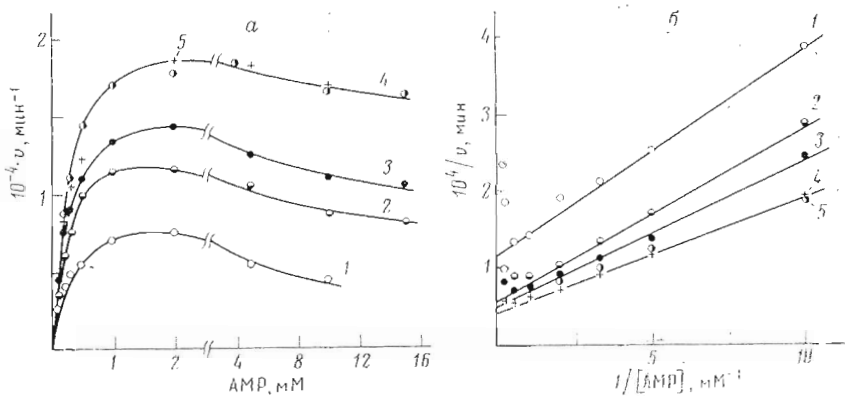


Рис. 1. Влияние АМР на скорость обратной аденилаткиназной реакции. а — зависимость скорости от [АМР] при разных концентрациях MgАТР; б — эти же зависимости в двойных обратных координатах. [АТР], мМ: 1 — 0,05; 2 — 0,1; 3 — 0,2; 4 — 0,5; 5 — 2,0. Для кривых 1—4 общая концентрация Mg²⁺ в среде была 1 мМ, в случае кривой 5 — 2,2 мМ

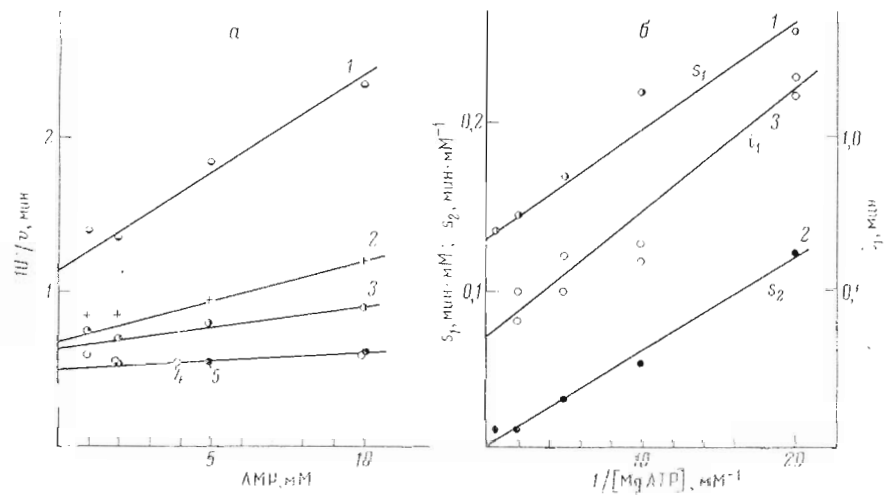


Рис. 2. а — зависимости $1/v_{-1}$ от концентрации АМР (1—15 мМ). [АТР], мМ: 1 — 0,05; 2 — 0,1; 3 — 0,2; 4 — 0,5; 5 — 2,0. б — вторичные зависимости тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[АМР]$ (s_1 , кривая 1) и $1/v_{-1}$ от $[АМР]$ (s_2 , кривая 2), а также ординат пересечений этих прямых (i_1 , кривая 3) от $1/[MgATP]$

решеточным уравнением (6.13). Из этого уравнения следует, что ординаты пересечений прямых с осью ординат и в тех и других координатах одинаковы и даются соотношением

$$i_1 = (1/V_{-10} + B_5'/V_{-1}) + \frac{B_3}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2}. \quad (13)$$

Тангенсы углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[АМР]$ и $1/v_{-1}$ от $[АМР]$ выражаются уравнениями (14) и (15) соответственно:

$$s_{1v} = \frac{B_4}{V_{-1}} + \frac{B_7}{V_{-1}} \cdot Y_2 + \frac{1}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_3}, \quad (14)$$

$$s_2 = \frac{B_6}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{Y_2}. \quad (15)$$

Из рис. 2б видно, что в соответствии с уравнениями (13), (14) и (15) величины i_1 , s_1 и s_2 линейно связаны с отношением $1/[MgATP]$. Что касается члена с Y_2 в выражении для s_1 , то, по-видимому, при малых значениях Y_2 (0,05—0,5 мМ) он мал по сравнению с $1/V_{-1} \cdot 1/Y_2$. Обращает на себя

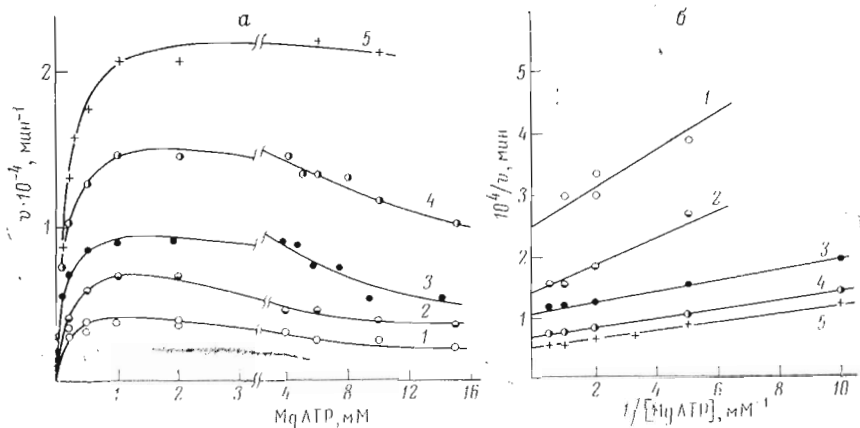


Рис. 3. Влияние концентрации MgATP на скорость реакции. *a* — зависимость скорости от концентрации MgATP при разных концентрациях AMP; *б* — те же данные в двойных обратных координатах при концентрациях AMP: 1 — 0,05; 2 — 0,1; 3 — 0,2; 4 — 0,4; 5 — 2,0 мМ. Общая концентрация Mg^{2+} в среде во всех случаях на 1 мМ больше, чем соответствующая общая концентрация ATP

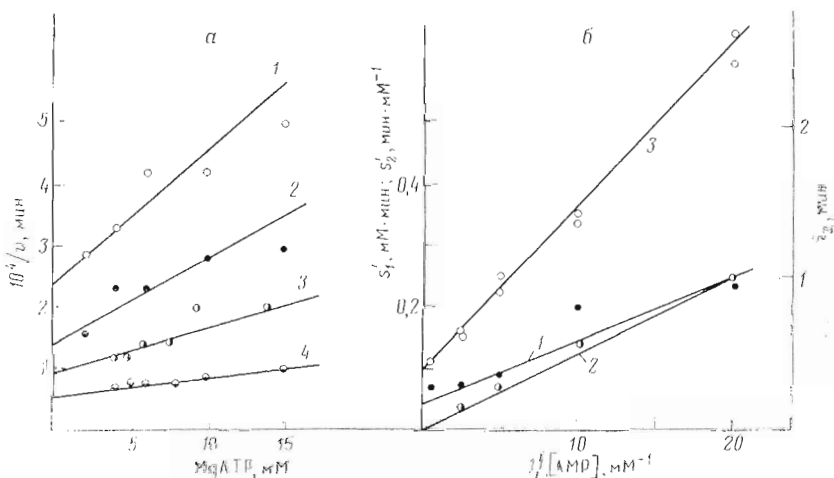


Рис. 4. *a* — $1/v_{-1}$ как функция концентрации MgATP (2—15 мМ). [AMP], мМ: 1 — 0,05; 2 — 0,1; 3 — 0,2; 4 — 0,4. *б* — зависимости тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$ (s_1' , кривая 1) и $1/v_{-1}$ от $[MgATP]$ (s_2' , кривая 2), а также ординат пересечений этих прямых (i_2 , кривая 3) от $1/[AMP]$

внимание тот факт, что прямая зависимость s_2 от $1/[MgATP]$ идет в начало координат в соответствии с уравнением (15). Очевидно, что ординаты пересечений с осью ординат и тангенсы углов наклона прямых во вторичных координатах дают значения коэффициентов уравнений (13), (14) и (15), а значит, и уравнения (6). Эти коэффициенты равны: $1/V_{-1m} + B_5/V_{-1} = 35 \cdot 10^{-6}$ мин; $B_3/V_{-1} = 4 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ; $B_4/V_{-1} = 13,5 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ; $1/V_{-1} = 0,8 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ²; $B_6/V_{-1} = 0,6 \cdot 10^{-6}$ мин.

2. Влияние концентрации MgATP на скорость реакции. Зависимости скорости обратной реакции от концентрации MgATP при разных концентрациях AMP (0,05—2,0 мМ) (рис. 3а) имеют максимумы и по форме аналогичны кривым зависимостей скорости от концентрации AMP (рис. 1а). Восходящие участки кривых (низкие концентрации MgATP) дают прямые в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$ (рис. 3б), а нисходящие участки (высокие концентрации MgATP) — прямые в координатах $1/v_{-1}$ от $[MgATP]$ (рис. 4а).

В принципе в соответствии с теорией при очень высоких концентрациях MgATP (Y_2) линейность зависимости $1/v_{-1}$ от [MgATP] должна нарушаться и стремиться к предельному значению $1/V_{-1}$, $v_2 \rightarrow \infty$. Действительно, при 15 мМ концентрации MgATP наблюдается «запределивание» прямых, особенно при малых концентрациях AMP (рис. 4а, 1—3). Кроме того, линейность нарушается и при низких концентрациях MgATP, когда член с $1/[MgATP]$ велик и кривые резко поднимаются вверх. Эти обстоятельства затрудняют точное определение тангенса угла наклона зависимости $1/v_{-1}$ от [MgATP], который, строго говоря, представляет собой тангенс угла наклона касательной в точке перегиба. Тем не менее эти величины могут быть оценены приближенно, если еще принять во внимание ординаты пересечений с осью ординат прямых в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$, которые должны быть одинаковы и в тех и других координатах. Как следует из уравнения (7), величины отрезков, отсекаемых на оси ординат, равны

$$i_2 = (1/V_{-1m} + B_5'/V_{-1}) + \frac{B_3}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3}. \quad (16)$$

Тангенсы углов наклона в соответствии с этим же уравнением в координатах $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$ и $1/v_{-1}$ от [MgATP] соответственно выражаются уравнениями

$$s_1' = \frac{B_3}{V_{-1}} + \frac{B_6}{V_{-1}} X_3 + \frac{1}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3}, \quad (17)$$

$$s_2' = \frac{B_7}{V_{-1}} \cdot \frac{1}{X_3}. \quad (18)$$

Экспериментальные зависимости i_2 , s_1' и s_2' от обратной концентрации AMP ($1/X_3$) (рис. 4б) хорошо аппроксимируются прямыми, причем прямая доля s_2' проходит через начало координат, как этого и требует теория (ур-ние (18)). Согласно теории (ур-ния (16), (17) и (18)), величины отрезков, отсекаемых на оси ординат, и тангенсов углов наклона этих прямых во вторичных координатах (i_2 , s_1' и s_2' от $1/[AMP]$) позволяют найти комбинации коэффициентов уравнения (7): $1/V_{-1m} + B_5'/V_{-1} = 40 \cdot 10^{-6}$ мин; $B_4/V_{-1} = 10 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ; $B_3/V_{-1} = 4 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ; $1/V_{-1} = 1 \cdot 10^{-6}$ мин·мМ²; $B_7/V_{-1} = 1,3 \cdot 10^{-6}$ мин.

Интересно сравнить приведенные здесь величины с теми, которые были получены в предыдущей серии экспериментов, поскольку, за исключением величин B_6/V_{-1} и B_7/V_{-1} , в обеих сериях определялись одни и те же параметры. Сравнение показывает, что наблюдается хорошее совпадение названных величин.

Таким образом, из этих экспериментальных данных определяется ряд коэффициентов уравнения (5), исключая B_1 , B_2 , B_8 и B_9 . Для нахождения указанных величин достаточно определить две из них: B_1 и B_2 или B_8 и B_9 , так как B_1 и B_9 , а также B_2 и B_8 связаны между собой соотношениями (5.11) и (5.12). Из уравнений (8) и (9) следует, что зависимости $1/v_{-1}$ от обратной концентрации одного субстрата при очень высокой (теоретически бесконечной) концентрации второго позволяет определить искомые коэффициенты (B_1 и B_2), а также $1/V_{-1m}$. Прямые зависимости $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$ (рис. 5) и $1/v_{-1}$ от $1/[MgATP]$ пересекаются с осью ординат в одной точке, давая величину $1/v_{-1m}$, равную $0,3 \cdot 10^{-4}$ мин. Тангенсы углов наклона этих прямых равны для функции от $1/[MgATP]$: $s_3 = B_6/B_1 V_{-1} = 0,4 \cdot 10^{-4}$ мин·мМ, а для функции от $1/[AMP]$: $s_4 = B_7/B_2 V_{-1} = 0,26 \cdot 10^{-4}$ мин·мМ. Очевидно, что значения B_1 и B_2 могут быть легко найдены из этих выражений путем деления их на уже известные величины B_6/V_{-1} и B_7/V_{-1} . После этой операции получим $B_1 = 0,06$ мМ⁻¹ и $B_2 = 0,05$ мМ⁻¹.

Из величин $(1/V_{-1m} + B_5'/V_{-1})$ и $1/V_{-1m}$ нетрудно вычислить значения B_5'/V_{-1} , равные 0,05 и 0,10 мин. С помощью величины $1/V_{-1}$ можно найти остальные коэффициенты: $B_3 = 5$ и 4 мМ⁻¹; $B_4 = 16,9$ и 10 мМ⁻¹;

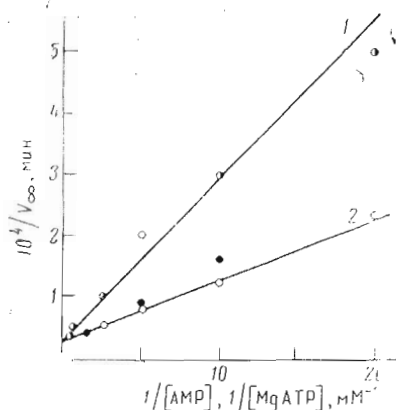


Рис. 5. Зависимость обратной величины предельной скорости ($V_{-1,\infty}$) от обратной концентрации субстратов. 1 — зависимость от $1/[AMP]$ при фиксированной (15 мМ) концентрации $MgATP$ и общей концентрации Mg^{2+} 16 мМ; 2 — зависимость от $1/[MgATP]$ при 10 (●) и 15 мМ (○) концентрациях АМР

$V_5' = 6,2$ и 10 мМ^{-2} ; $V_6 = 0,75 \text{ мМ}^{-2}$; $V_7 = 1,3 \text{ мМ}^{-2}$; $\beta'/k_8k_9\alpha' = V_{-1}/V_{-1m} = 33,3 \text{ мМ}^{-2}$; $V_8 = V_2\beta'/k_8k_9\alpha' = 1,67 \text{ мМ}^{-3}$; $V_9 = V_1\beta'/k_8k_9\alpha' = 2,0 \text{ мМ}^{-3}$. Значения V_1 и V_2 являются приближенными, так как в действительности мы не имеем предельных значений $1/V_{-1,\infty}$ (при $X_3 \rightarrow \infty$ или $Y_2 \rightarrow \infty$), а лишь некоторые приближенные величины, меньшие, чем $1/V_{-1,\infty}$, поскольку они получены при высоких фиксированных значениях концентраций второго субстрата (X_3 или Y_2).

3. *Ингибирование реакции свободным АТР.* Как следует из данных рис. 6а и б, свободный АТР оказывает существенное ингибирующее действие на обратную аденилаткиназную реакцию. Концентрации АТР и $MgATP$ вычисляли, принимая константу устойчивости комплекса $MgATP$ (K_2^c) равной 59 мМ^{-1} [10]. На начальных участках кривых, соответствующих малым концентрациям свободного АТР (0,05—0,1 мМ), концентрация $MgATP$ в некоторой степени варьировалась и была немного меньше максимально возможной, определяемой концентрацией ионов Mg^{2+} в среде, так как $[АТР] \cdot K_2^c = 3-6$. Именно поэтому на начальных участках кривых для малых концентраций Mg^{2+} , а значит, и $MgATP$ (0,1—0,2 мМ) ингибирование свободным АТР частично маскируется некоторым увеличением концентрации $MgATP$. При концентрации свободного АТР 0,2 мМ и более, когда $[АТР] K_2^c \geq 10$, концентрация $MgATP$ практически достигает своего предельного значения. На рис. 6а пунктиром показан начальный участок кривой ингибирования для 0,1 мМ концентрации Mg^{2+} , экстраполированный к концентрации $MgATP$ 0,1 мМ, в предположении, что в этом диапазоне концентраций скорость зависит от концентрации $MgATP$ приблизительно линейно.

Кривые ингибирования, о которых идет речь, спрямляются в координатах $1/v_{-1} - [АТР]$ (рис. 6з, г). Отклонения от линейности наблюдаются в области низких концентраций свободного АТР (0,03—0,1 мМ) по причинам, обсуждавшимся выше. Согласно рис. 7а, тангенсы углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1}$ от $[АТР]$ линейно зависят от $1/[MgATP]$ при постоянной концентрации АМР (0,2 мМ) и от $1/[AMP]$ при фиксированной концентрации $MgATP$ (0,2 мМ).

Теоретический анализ показывает, что вышеупомянутые тангенсы углов наклона должны выражаться разными функциями в зависимости от того, с какими формами фермента дает комплексы свободный АТР. Имеет смысл рассмотреть два случая: 1) образование комплекса только со свободным ферментом ($EX_2 = E \cdot X_2/K_{21}$); 2) взаимодействие АТР не только со свободным ферментом, но и с комплексом $E \cdot АМР$ ($X_3EX_2 = EX_3 \cdot X_2/K_{21}$). Возникновение комплекса с двумя молекулами АТР (АТР и $MgATP$) представляется маловероятным по структурным соображениям. Если АТР образует комплекс только со свободным ферментом, то тангенс угла наклона в координатах $1/v_{-1}$ от АТР равен (см. ур-ние (10))

$$s_5 = \frac{E}{EX_3Y_2} \cdot \frac{1}{K_{21}} = \left[\frac{k_8k_9\alpha'}{V_{-1m}\beta'} \cdot \frac{1}{X_3} \cdot \frac{1}{Y_2} + \frac{k_8k_{-7}(k_6^* + k_{-5})}{V_{-1m}\beta'} \cdot \frac{1}{Y_2} + \frac{k_9k_{-6}(k_7 + k_{-5})}{V_{-1m}\beta'} \cdot \frac{1}{X_3} + \frac{k_{-5}k_{-6}k_{-7}}{V_{-1m}\beta'} \right] \frac{1}{K_{21}} \quad (19)$$

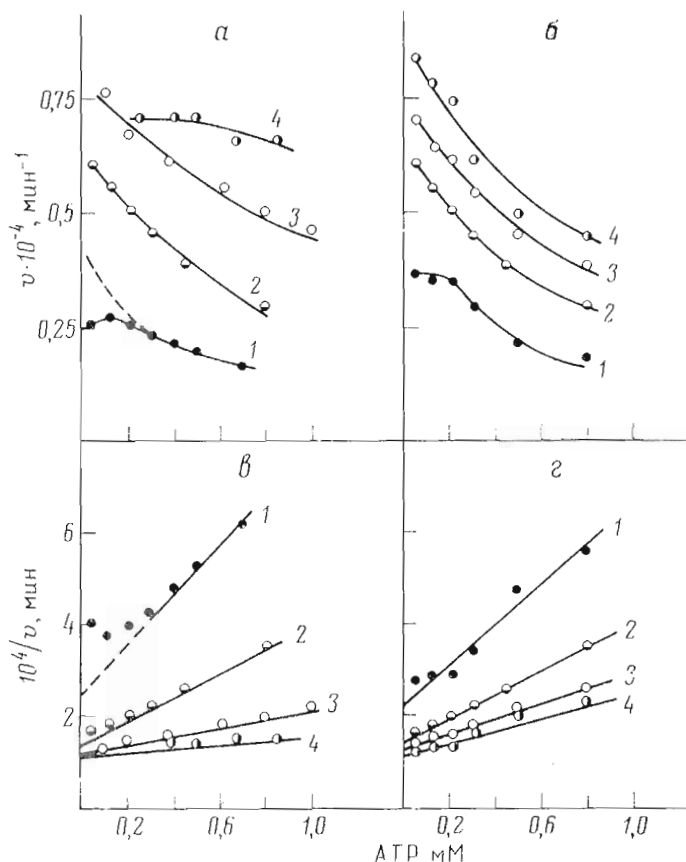


Рис. 6. Ингибирование аденилаткиназной реакции свободным АТР: *a* — при концентрациях MgATP: 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,5; 4 — 2,0 мМ ([AMP] 0,2 мМ); *б* — кривые ингибирования АТР при концентрациях AMP: 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,35; 4 — 0,5 мМ ([MgATP] 0,2 мМ); *в* и *г* — кривые ингибирования в координатах $1/v_{-11}$ от [АТР]. Концентрация (мМ): *в* — AMP 0,2; 1 — MgATP 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,5; 4 — 2; *г* — MgATP 0,2; 1 — AMP 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,35; 4 — 0,5

Очевидно, что величина s_5 линейно связана с $1/[MgATP]$ ($1/Y_2$) и с $1/[AMP]$ ($1/X_3$). В случае существования еще одного ингибиторного комплекса АТР с E·AMP тангенс угла наклона будет выражаться уравнением (см. (10))

$$s_6 = \left\{ \frac{k_8 k_9 \alpha'}{V_{-1m} \beta'} \cdot \frac{1}{X_3} \cdot \frac{1}{Y_2} + \left[\frac{k_8 k_{-7} (k_6 + k_{-5}) + k_{-8} k_9 \alpha'}{V_{-1m} \beta'} \right] \cdot \frac{1}{Y_2} + \frac{k_{-8} k_{-7} (k_6 + k_{-5})}{V_{-1m} \beta'} \cdot \frac{X_3}{Y_2} + \frac{k_{-5} k_{-6} k_{-7} + k_6 k_{-7} k_{-9}}{V_{-1m} \beta'} \right\} \cdot \frac{1}{K_{2i}} \quad (20)$$

Сравнение уравнений (19) и (20) показывает, что по форме они аналогичны, с той лишь разницей, что второе уравнение содержит член с X_3 . Это означает, что если последнее уравнение справедливо, то для зависимости s_6 от $1/X_3$ ($1/[AMP]$) следует ожидать отклонений от линейности в области относительно высоких концентраций AMP. Как показано на рис. 7б, названная зависимость хорошо аппроксимируется прямой в исследованном диапазоне концентраций AMP (0,1—0,5 мМ). На этом основании можно заключить, что по крайней мере в условиях наших экспериментов комплекс АТР·E·AMP практически не образуется в концентрациях, способных заметно влиять на кинетику обратной реакции. Однако зависимости тангенсов угла наклона от $1/[MgATP]$ и $1/[AMP]$ не позволяют оценить величину константы ингибирования K_{2i} . Для этой цели полезно представить

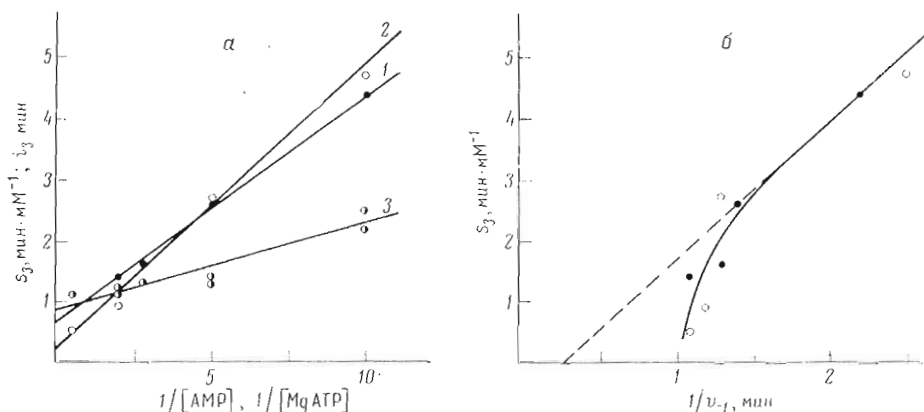


Рис. 7. а — вторичные зависимости тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1} \div [\text{АТР}]$ от $1/[\text{АМР}]$ (1) и $1/[\text{MgАТР}]$ (2), а также ординат пересечений этих прямых (3); б — зависимость этих же тангенсов углов наклона от $1/v_{-1}$. Величина $1/v_{-1}$ равна ординатам пересечений тех же прямых в координатах $1/v_{-1}$ от [АТР] и представляет собой обратную величину скорости реакции в отсутствие ингибитора АТР

тангенсы углов наклона (s), прямых в координатах $1/v_{-1}$ от [АТР], в виде зависимости от $1/v_{-1}$, где v_{-1} — скорость реакции в отсутствие свободного АТР. Согласно теории, эта функция выглядит так (ур-ние (12)):

$$s = \frac{1}{K_{2i}} \cdot \frac{1}{v_{-1}} - [1/V_{-1m} + F(X_3, Y_2)] \frac{1}{K_{2i}},$$

где

$$F(X_3, Y_2) = \frac{EX_3 + EY_2}{V_{-1m} \beta' X_3 Y_2}.$$

Очевидно, что

$$\frac{F(X_3, Y_2)}{1/v_{-1} - 1/V_{-1m}} = \frac{EX_3 + EY_2}{E + EX_3 + EY_2}. \quad (21)$$

Данное отношение стремится к нулю при $X_3 \rightarrow 0$ и $Y_2 \rightarrow 0$, т. е. оно мало при малых X_3 и Y_2 . Это значит, что если X_3 и Y_2 малы, то $(1/v_{-1} - 1/V_{-1m}) \gg F(X_3, Y_2)$ и

$$s \simeq (1/K_{2i}) 1/v_{-1} - (1/K_{2i}) 1/V_{-1m}.$$

Экспериментальная зависимость s от $1/v_{-1}$ представляет собой кривую (рис. 7б). Тангенс угла наклона касательной, проведенной через точки, соответствующие наибольшим значениям $1/v_{-1}$ (т. е. малым значениям X_3 и Y_2), в соответствии с теорией должен быть приблизительно равен $1/K_{2i}$, а абсцисса пересечения — $1/V_{-1m}$. Найденная отсюда величина K_{2i} составляет $\sim 0,4$ мМ.

4. Влияние MgAMP на скорость обратной аденилаткиназной реакции.

Рассмотрение зависимости скорости реакции от общей концентрации Mg^{2+} в среде при высокой (15 мМ) общей концентрации АМР и разных концентрациях АТР (рис. 8а) показывает, что по мере повышения концентрации Mg^{2+} вначале наблюдается увеличение скорости реакции, затем она достигает максимума и начинает постепенно снижаться. Для вычисления влияния изменения концентрации MgAMP с ростом Mg^{2+} константа устойчивости комплекса MgAMP (K_3^c) принималась равной $0,1 \text{ мМ}^{-1}$ [11].

Спадающие ветви кривых (высокие концентрации Mg^{2+}) дают прямые в координатах $1/v_{-1}$ от [Mg AMP] (рис. 8б). Зависимость тангенсов углов наклона указанных прямых от $1/v_{-1}$ (ординаты пересечений тех же прямых, соответствующие обратной величине скорости реакции, в отсутствие

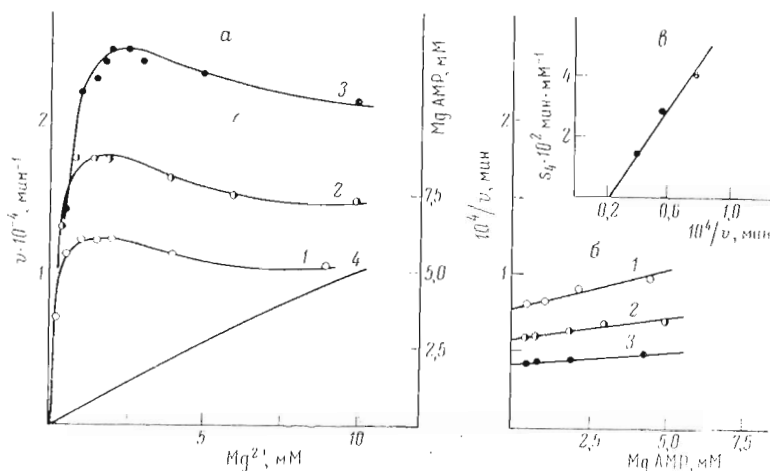


Рис. 8. Ингибирование реакции MgATP. *a* — зависимость скорости реакции от общей концентрации Mg^{2+} в среде при разных общих концентрациях АТР: 1 — 0,2; 2 — 0,4; 3 — 1,5 мМ ($[AMP]$ 15 мМ); 4 — вычисленная кривая зависимости концентрации MgATP в среде от общей концентрации Mg^{2+} при 15 мМ концентрации АТР; *б* — линеаризация сходящихся участков кривых рис. 8*a* в координатах $1/v_{-1i}$ от MgATP; *в* — зависимость тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1i}$ — $[MgAMP]$ от ординат пересечений тех же прямых ($1/v_{-1}$)

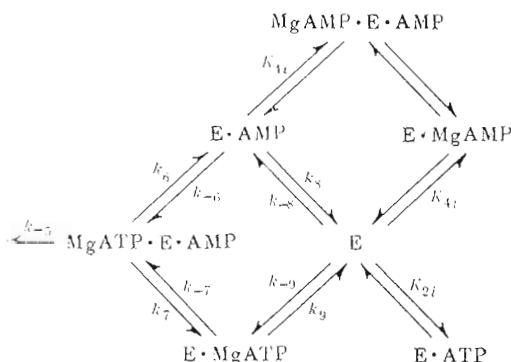
MgATP), изображенная на рис. 8*в*, позволяет оценить величину константы ингибирования для MgATP. По теории тангенс угла наклона этой прямой равен обратной величине константы ингибирования ($1/K_{4i}$), которая составляет примерно 14 мМ, а абсцисса пересечения — $1/V_{-1m}$. Значение константы K_{4i} , по-видимому, в некоторой степени завышено, так как параллельно с ростом концентрации MgATP происходило уменьшение концентрации свободного АТР от 15 до 10 мМ. Это снижение должно было частично компенсировать ингибирующий эффект MgATP, поскольку в указанном диапазоне концентраций свободного АТР уменьшение последней приводит к возрастанию скорости реакции (см. рис. 1*a*). Наличие линейной связи между величинами тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-1i}$ от $[MgAMP]$ и $1/v_{-1}$ предполагает, что MgATP образует непродуктивные комплексы по крайней мере с $E \cdot AMP$ и со свободным ферментом. Что касается комплекса с $E \cdot MgATP$, то в условиях наших экспериментов его концентрация, по-видимому, была слишком малой, чтобы можно было сделать определенные заключения по этому поводу.

Обсуждение результатов

Результаты настоящей работы показывают, что, как и в случае прямой аденилаткиназной реакции, обратный процесс описывается уравнением более сложным, чем обычная Михаэлисовская зависимость. В частности, это проявляется в том, что высокие концентрации обоих субстратов (АТР и MgATP) в некоторой степени ингибируют реакцию. Однако в отличие от прямой реакции глубина ингибирования обоими субстратами примерно одинакова. Это означает, что оба пути реакции через комплексы $E \cdot AMP$ и $E \cdot MgATP$ приблизительно эквивалентны, что отличается от ситуации для прямой реакции, когда путь через комплекс $E \cdot ADP$ был существенно более медленным. Причина ингибирования кроется в том, что при избытке одного из субстратов практически весь фермент существует в виде комплекса с АТР или MgATP и реакция идет преимущественно по одному пути, через один из названных комплексов. При этом предполагается, что скорость реакции, протекающей через один путь, меньше, чем

сумма скоростей реакций по двум направлениям. Для этого необходимо, чтобы нуклеотиды реагировали быстрее со свободным ферментом, чем с двойными комплексами $E \cdot AMP$ и $E \cdot MgATP$. Иными словами, $k_{-8}, k_{-9} > k_{-7}$ и $k_{-8}, k_{-9} > k_{-6}$ (см. схему 2 и «Теоретическую часть»).

Схема 2



Необходимо заметить, что ингибирование реакции свободным AMP можно было бы объяснить еще и образованием тройного комплекса $ATP \cdot E \cdot AMP$. Однако из теоретического рассмотрения следует, что в этом случае должна была бы наблюдаться параболическая зависимость $1/v_{-11}$ от $[AMP]$, чего в действительности не происходит.

Во второй части работы изучалось ингибирование реакции свободным ATP и MgAMP. Оказалось, что ATP является довольно сильным ингибитором с $K_{21} 0,4$ мМ, тогда как MgAMP — весьма слабый ингибитор с $K_i \approx 14$ мМ. Анализ зависимостей тангенсов углов наклона прямых в координатах $1/v_{-11} \div [ATP] - 1/[MgATP]$ и $1/[AMP]$ (рис. 6 и 7) показал, что, по всей вероятности, существует один фермент-ингибиторный комплекс $E \cdot ATP$. При этом ATP борется с AMP за место связывания с ферментом, так как комплекс $ATP \cdot E \cdot AMP$ не проявляется в кинетике реакции в исследованном диапазоне концентраций AMP. Кроме того, ATP конкурирует с MgATP, несмотря на то что они связываются с разными участками молекулы фермента. Причина такой конкуренции становится ясной, если учесть структурные соображения. Действительно, активные тройные комплексы фермента содержат либо две молекулы ADP, либо ATP и AMP. Иными словами, между центрами связывания субстратов нормально помещается 4 фосфатных остатка. В случае двух молекул ATP таких остатков 6, они вряд ли смогут разместиться на молекуле фермента.

В этой связи имеет смысл обратиться к другому фосфотрансферазному ферменту — креатинфосфокиназе (КФ 2.7.3.2). Для этого фермента активными тройными комплексами являются $MgATP \cdot E \cdot CP$ и $MgADP \cdot E \cdot CP$, содержащие 3 фосфатных остатка [12]. В то же время комплекс с 4 фосфатными остатками ($MgATP \cdot E \cdot CP$) не существует [10, 12]. Что касается MgAMP, то он по крайней мере борется с MgATP за место связывания на аденилаткиназе, давая два ингибиторных комплекса ($E \cdot MgAMP$ и $AMP \cdot E \cdot MgAMP$), о чем свидетельствует наличие линейной связи между тангенсами углов наклона прямых в координатах $1/v_{-11} \div [MgAMP]$ и $1/v_{-1}$ (v_{-1} — скорость реакции в отсутствие MgAMP).

Экспериментальная часть

Выделение аденилаткиназы. Частичную очистку аденилаткиназы из сердца крысы производили так же, как и в предыдущей работе [8], согласно описанным ранее методам [13—15].

Определение скорости обратной аденилаткиназной реакции. Скорость реакции определяли спектрофотометрически с помощью ADP-улавливающей системы на основе пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. Опытные пробы содержали 20 мМ Трис-HCl-буфер (pH 8), 15 мМ KCl, 0,8 мМ фосфоенолпируват, 0,13 мМ NADH, 0,33 мМ дитиотреит, 6 МЕ/мл пируваткиназы и 3 МЕ/мл лактатдегидрогеназы. В среде присутствовали также AMP, ATP и ацетат Mg в различных концентрациях. Реакцию начинали либо аденилаткиназой (0,02—0,05 МЕ/мл), либо AMP, после того как заканчивалось изменение оптической плотности при 340 нм, вызванное небольшими примесями AMP (0,6 мол. %/моль) и ADP (1,2 мол. %/моль) в использованном препарате ATP.

В тех случаях, когда измерения выполняли в экстремальных условиях, например при очень малых концентрациях свободного Mg^{2+} ($[ATP]_{\text{общ}} > [Mg^{2+}]_{\text{общ}}$), специально проверялась эффективность работы улавливающей системы. Наличие линейной зависимости скорости реакции от концентрации аденилаткиназы и независимость скорости от концентрации ферментов улавливающей системы свидетельствовали о том, что улавливающая система не была лимитирующей в этих условиях. При этом концентрация пируваткиназы в 3—4 раза превышала обычно применявшуюся концентрацию. Все измерения выполняли при 30° и pH 8, для того чтобы $MgATP$, ATP и AMP находились в полностью депротонированной форме, поскольку величины pK для этих форм нуклеотидов соответственно составляют 5,24; 7,16 и менее чем 6,7 [10, 16] при 30° и ионной силе 0,04 M.

Скорость реакции выражали в мин^{-1} , с тем чтобы облегчить сравнение результатов, полученных для разных препаратов фермента, различающихся по удельной активности. Для этой цели данные, найденные в мкмольх/мин·мг, умножали на величину отношения максимальной скорости, известной из литературы ($25\ 000\ \text{мин}^{-1}$ [1]), к максимальной скорости, определенной для данного препарата фермента в мкмольх/мин·мг. Концентрацию $MgAMP$ находили по вычисленной кривой зависимости концентрации $MgAMP$ от общей концентрации Mg^{2+} в среде, принимая для расчета последнюю равной разности общей концентрации добавленного Mg^{2+} и общей концентрации ATP ($K_2^c/K_3^c = 600$).

Концентрацию Mg^{2+} определяли, как и в предыдущей работе [8], по методу, описанному в [17]. Концентрации растворов ATP и AMP измеряли ферментативно. Определение концентрации белка выполняли по модифицированному методу Лоури [18].

В работе применялись ATP (Serva, ФРГ); AMP, NADH (Calbiochem, США); Трис, фосфоенолпируват, пируваткиназа и аденилаткиназа из мышц кролика (Sigma, США); лактатдегидрогеназа из мышц свиньи (Реанал, Венгрия). Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометрах DW-2UV/VIS Aminco (США) и Perkin-Elmer-402 (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Noda L. (1973) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), 3rd edn., v. 8, pp. 279—305, Acad. Press, N. Y.
2. Noda L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **232**, 237—250.
3. Kuby S. A., Mahowald T. A., Noltmann E. A. (1962) *Biochemistry*, **1**, 748—762.
4. Callaghan O. H., Weber H. (1959) *Biochem. J.*, **73**, 473—485.
5. Четверикова Е. П. (1975) *Успехи биол. химии*, **16**, 43—67.
6. Pradhan T. K., Criss W. E., Morris H. (1974) *Cancer Res.*, **34**, 3058—3061.
7. Roads D. G., Lowenstein J. M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3963—3972.
8. Куприянов В. В., Сеппет Э. К., Сарс В. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1682—1695.
9. Atkinson D. E. (1970) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), 3rd edn., v. 1, pp. 91—146, Acad. Press, N. Y.
10. Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **57**, 273—290.
11. O'Sullivan W. J., Ferrin D. D. (1964) *Biochemistry*, **3**, 18.
12. Morrison J. P., Cleland W. W. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 673—683.
13. Kubo S., Noda L. H. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 325—331.

14. Heil A., Müller G., Noda L. H., Pinder T., Schirmer R. H., Schirmer I., von Zaben J. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **43**, 131—144.
15. Thuma E., Schirmer R. H., Shirmer I. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 81—91.
16. Phillips R. C., George S. G. P., Rutman R. J. (1963) *Biochemistry*, **2**, 501—508.
17. Крешков А. П. (1971) *Основы аналитической химии*, ч. 2, с. 372, «Химия», М.
18. Hartree E. F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422—427.

Поступила в редакцию
31.III.1977

ADENYLATE KINASE FROM HEART. II. STEADY-STATE KINETICS OF THE REVERSE REACTION (ADP FORMATION)

SEPPET E. K., KUPRIYANOV V. V., SAKS V. A.

*Laboratory of Myocardial Metabolism, National Cardiology Research Center, Moscow;
Laboratory of Muscular Activities, Tartu State University, Tartu*

The kinetics of the reverse adenylate kinase reaction, viz. ADP formation, catalyzed by heart adenylate kinase (EC 2.7.4.3) have been studied. Both substrates, AMP and MgATP, were shown to inhibit the reaction if present in a high concentration. Experimental data fit the equation derived for the quasi steady-state in the case of random binding of the substrates to the enzyme. Free ATP caused significant inhibition of the reaction ($K_i = 0.4$ mM) due to the formation of the dead-end E·ATP and, possibly, ATP·E·AMP complexes. The binding of MgAMP to the enzyme seems also possible: in high concentrations it manifested weak inhibitory activity ($K_i = 14$ mM). The analysis of experimental data provided all the coefficients of the equation which are necessary for quantitative description of the enzymatic system.
