



УДК 577.152.273\*2

ИЗУЧЕНИЕ ОБМЕНА АТР — ФОСФОКРЕАТИН, КАТАЛИЗИРУЕМОГО  
КРЕАТИНКИНАЗОЙ. СРАВНЕНИЕ ТЕХНИКИ ПЕРЕНОСА  
НАСЫЩЕНИЯ (ЯМР) И МЕТОДА ИЗОТОПНОЙ МЕТКИ*Курьянов В. В., Люлина Н. В., Штейншнейдер А. Я.,  
Зуева М. Ю., Саке В. А.**Институт экспериментальной кардиологии Всесоюзного кардиологического  
научного центра Академии медицинских наук СССР, Москва*

Однонаправленные потоки от АТР к фосфокреатину, катализируемые ММ-изоферментом креатинкиназой, измеряли как методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (при помощи техники переноса насыщения), так и с применением радиоизотопной метки,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ . Было найдено, что при  $30\text{--}37^\circ\text{C}$  и  $\text{pH } 7,4$  в широком диапазоне отношений  $[\text{фосфокреатин}]/[\text{креатин}]$  от 0,2 до 3,0 оба метода приводили к сходным результатам, показывая тем самым, что перенос намагничённости в «физиологических» условиях позволяет определять потоки, близкие к истинным. Однако при отношениях  $[\text{P Cr}]/[\text{Cr}] > 5$  ( $[\text{ADP}] < 30 \text{ мкМ}$ ) или при пониженных температурах ( $< 15^\circ\text{C}$ ,  $[\text{P Cr}]/[\text{Cr}] \approx 1$ ) потоки, измеренные по переносу насыщения, заметно превышали величины, определённые с изотопной меткой. Эти данные предполагают, что при «физиологических» условиях перенос фосфорильной группы действительно является скоростью-определяющей стадией креатинкиназной реакции. Напротив, при высоких значениях отношения  $[\text{P Cr}]/[\text{Cr}]$  или при пониженной температуре положение регулирующей стадии могло сместиться с переноса фосфорильной группы или же регуляция могла распределяться между другими стадиями реакции.

Одна из разновидностей метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР), метод переноса намагничённости, в настоящее время нашла довольно широкое применение для измерений скоростей (потоков) ферментативных реакций как *in vitro*, так и в «живых» системах [1–9]. Однако существует ряд проблем, касающихся пригодности метода для этих целей, что уже подробно обсуждалось в наших работах [7–9].

Проблему можно сформулировать так: соответствуют ли величины потоков, определённые методом переноса намагничённости, реальным? Для ответа на этот вопрос наиболее прямым подходом является сравнение потоков ферментативных реакций *in vitro*, измеренных методом переноса намагничённости и при помощи изотопной метки. Предполагается, что последний метод даёт истинные величины потоков. Такой подход был использован для анализа креатинкиназной реакции, когда скорости обмена  $\gamma\text{-P(АТР)}$  — фосфокреатин, определённые методом переноса насыщения, сравнивали со скоростями обмена фосфокреатин — креатин, определёнными при помощи меченого  $^{15}\text{N}$  креатина [10]. Однако скорости этих двух обменных реакций не обязательно должны быть равны, так как эти реакции не идентичны и включают в себя различные стадии процесса, катализируемого креатинкиназой, такие, как образование и распад фермент-субстратных комплексов с креатином (стадии 9 и 8 на схеме) и с  $\text{MgАТР}$  (стадии 7 и 10). По этой причине измеренный методом ЯМР перенос насыщения намагничённости ядер  $^{31}\text{P}$  между  $\gamma\text{-P(АТР)}$  и фосфокреатином следует сравнивать с изотонным обменом между  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  и фосфокреатином, что и является предметом данного исследования.

Принятые сокращения:  $\text{PCr}$  — фосфокреатин;  $\text{Cr}$  — креатин;  $\text{Нерес}$  —  $\text{N}$ -2-оксипиридинперазин- $\text{N}'$ -2-этансульфоловая кислота;  $\text{EGTA}$  — этиленгликоль-бис( $\beta$ -ампиотилловый эфир)- $\text{N}$ , $\text{N}'$ , $\text{N}'$ , $\text{N}'$ -тетрауксусная кислота.

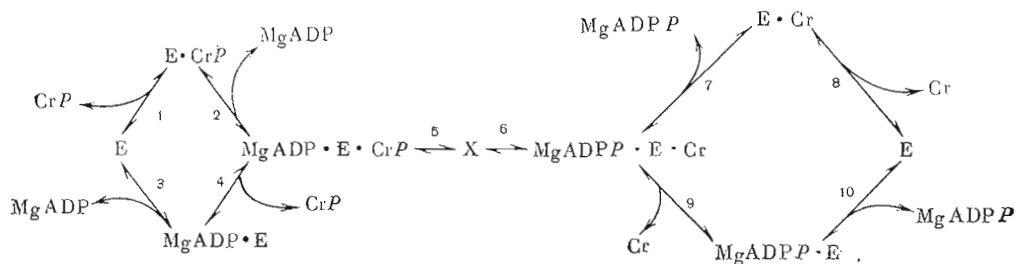


Схема переноса фосфорильной группы в креатинкиназной реакции. X — промежуточный (переходный) комплекс реакции, E·(Cr...PO<sub>3</sub><sup>-</sup>...ADP)

Для лучшего понимания результатов, полученных методом переноса насыщения, целесообразно пояснить суть метода. Сигналы, видимые в спектре ЯМР, возникают благодаря взаимодействию радиочастотного импульса с магнитными моментами ядер (например, <sup>31</sup>P), помещенных в магнитное поле, в результате чего происходит изменение намагниченности этих ядер, которое в конечном итоге и детектируется как сигнал. Если в результате какого-либо воздействия (например, другого радиочастотного импульса) продольная намагниченность ядер, находящихся в том или ином химическом окружении, станет равной нулю, сигналы от этих ядер наблюдаться не будут. Иными словами, они будут «насыщены» и потому невидимы в спектре. Далее, если теперь интересующее нас ядро (<sup>31</sup>P) мигрирует из одного химического окружения в другое вследствие химической реакции, например  $PCr-\gamma-P(ATP)$ , возникает возможность оценить скорость обмена рассматриваемой реакции. Для этой цели достаточно селективно и быстро насыщать сигнал, например  $\gamma-P(MgATP)$ , в течение разного времени и сразу же фиксировать, как при этом изменяется интенсивность сигнала фосфокреатина (рис. 1). В полученных спектрах наблюдаются сигналы фосфокреатина (PCr),  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатов MgATP, а также примесного ортофосфата. Сигналы фосфатов ADP не видны из-за слишком низкой его концентрации, так как в этой системе  $[ATP]/[ADP] \approx 100$ . Из-за переноса фосфорильной группы от фосфокреатина в  $\gamma$ -положение ATP и обратно «насыщенные», не видимые в спектре, ядра  $\gamma$ -<sup>31</sup>P будут переходить в молекулу фосфокреатина, а равное количество намагниченных (ненасыщенных) ядер будет возвращаться в ATP (поскольку система находится в стационарном состоянии) и мгновенно там насыщаться. По этой причине интенсивность сигнала фосфокреатина будет снижаться по мере увеличения времени насыщения так, как показано на рис. 1. Однако благодаря тому, что время жизни «насыщенного» состояния (время продольной релаксации  $T_1$ ) составляет обычно 1–5 с, система ядер <sup>31</sup>P в фосфокреатине стремится восстановить исходную намагниченность. Вследствие этого при длительных временах насыщения (а следовательно, и обмена) потеря намагниченности, вызванная химическим обменом с «насыщенным»  $\gamma-P(MgATP)$ , полностью компенсируется релаксацией, из-за чего намагниченность (интенсивность) <sup>31</sup>P в фосфокреатине достигает постоянной стационарной величины (рис. 1). Из зависимости интенсивности сигнала фосфокреатина от времени насыщения, равного времени обмена «метки», можно вычислить константы скорости псевдопервого порядка и время продольной релаксации, как это описано в «Экспериментальной части». Таким образом, техника переноса намагниченности и ее частный случай — метод переноса насыщения, рассмотренный здесь, в какой-то степени сходен с методом радиоизотопной метки, но только метка в данном случае является «магнитной» и короткоживущей (1–5 с). Более подробное описание рассмотренного метода можно найти в соответствующей литературе [11, 12].

Следует подчеркнуть, что метод переноса намагниченности пригоден только для измерения одноподанных потоков (скоростей) в системах, находящихся в стационарном состоянии или равновесии, когда концентрации реагирующих веществ не изменяются, поэтому суммарный поток ра-

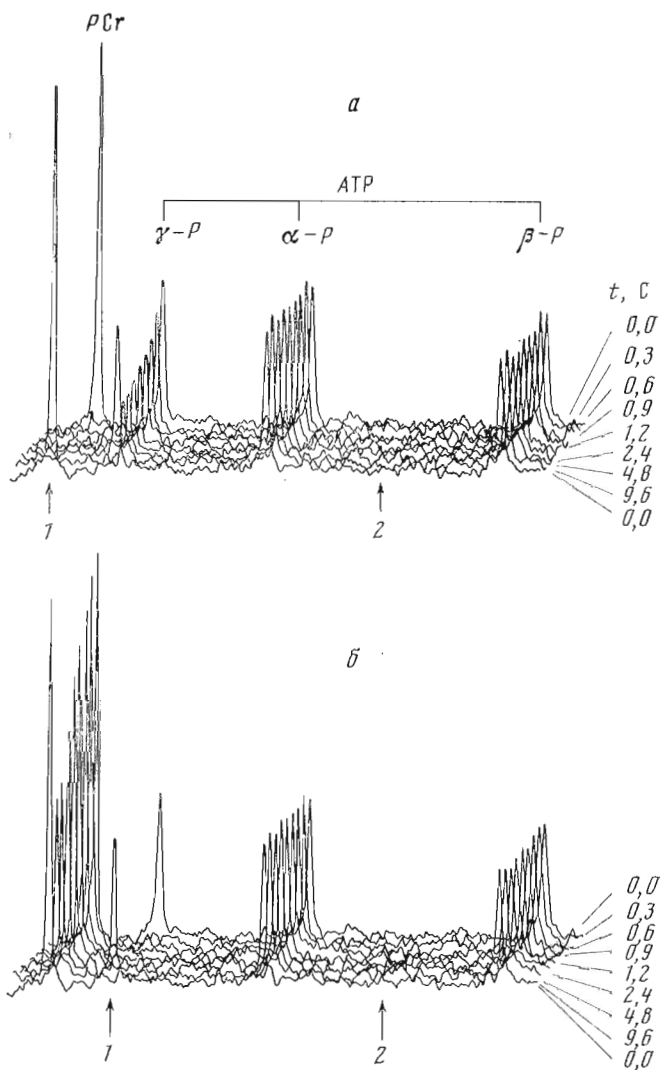


Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР равновесной смеси субстратов креатинкиназы при разных временах селективного насыщения сигнала  $\text{PCr}$  (а) и  $\gamma\text{-P}(\text{MgATP})$  (б). Условия инкубации и регистрации спектров приведены в «Экспер. части». Концентрация креатинкиназы 10 мг белка/мл (2000 МЕ/мл). Стрелки 1 и 2 соответствуют положению частоты насыщающего импульса, когда она совпадает (1) или не совпадает (2) с резонансной частотой насыщаемого сигнала ( $\text{PCr}$  или  $\gamma\text{-P}(\text{ATP})$ ). Время насыщения (в) указано справа

вен нулю, а прямой поток равен обратному. По этой причине названный метод, точно так же как и метод изотопного обмена, позволяет получать информацию принципиально иного характера, чем метод стационарных скоростей, когда реакция протекает в одном направлении, концентрации веществ изменяются, а суммарный поток через систему не равен нулю и в общем случае представляет собой разность прямого и обратного потоков (для обратимых систем).

Зависимость однонаправленного потока от  $\text{MgATP}$  к фосфокреатину  $\{\gamma\text{-P}(\text{MgATP}) \rightarrow \text{PCr}\}$ , катализируемого креатинкиназой *in vitro*, от отношения  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$  при фиксированном фонде общего креатина  $[\text{PCr}] + [\text{Cr}] = 30 \text{ mM}$ , в условиях, имитирующих физиологические (см. «Экспер. часть»), была получена, во-первых, при помощи  $^{31}\text{P}$ -ЯМР с применением техники переноса насыщения и, во-вторых, классическим методом изотопной метки с использованием АТФ, меченного  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  (рис. 2). Можно видеть, что обе группы данных близки друг другу в широком диапазоне, причем они совпадают с колоколообразной кривой, рассчитанной теорети-

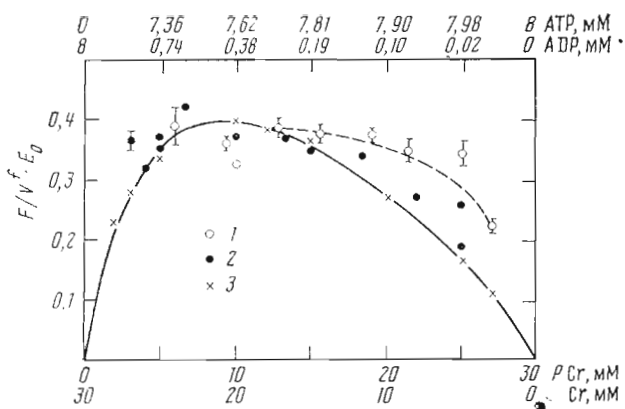


Рис. 2. Зависимость катализируемого креатинкиназой однонаправленного потока  $\text{ATP} \rightarrow \text{PCr}$  от отношения  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$ : 1 — потоки, измеренные при помощи ЯМР методом переноса насыщения; 2 — потоки, измеренные с изотопной меткой  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; 3 — теоретически вычисленные величины. Описание этих экспериментов см. в «Экспер. части»

чески из кинетического уравнения для креатинкиназной реакции и известных величин кинетических констант, найденных для этих экспериментальных условий [7].

Только при высоких отношениях  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$  ( $\geq 5$ ) и поэтому при высоких отношениях  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  потоки, измеренные методом переноса насыщения, были до некоторой степени больше, чем потоки, измеренные по изотопной метке и вычисленные теоретически. Эти небольшие расхождения частично можно объяснить различиями в концентрациях фермента, использованных для определения кинетических констант методом начальных скоростей (0,05–1,0 мкг белка/мл) и скоростей потоков при помощи изотопной метки (0,04–0,4 мг белка/мл), а также методом переноса намагниченности (2–10 мг белка/мл). Отметим лишь, что при использовании всех трех диапазонов концентрации фермента скорость реакции и величины потоков были пропорциональны концентрации фермента и хорошо соответствовали друг другу при отношениях  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$  от 0,2 до 3,0 (см. рис. 2, а также [7]).

Таким образом, возможное образование олигомерных форм фермента при многократном изменении (в  $10^5$  раз) его концентрации существенно не влияло на его кинетическое поведение в условиях наших экспериментов. Укажем также, что наиболее «физиологическая» концентрация креатинкиназы была использована для измерения потоков методом ЯМР, так как в сердце она составляет  $\sim 3\text{--}5$  мг/мл, а в красных скелетных мышцах — 10 мг/мл [13]. Кроме того, полученные нами данные показывают, что кинетические параметры креатинкиназной реакции, найденные многими авторами, использовавшими крайне разбавленные растворы фермента, по-видимому, существенно не отличаются от тех, которые характеризуют поведение фермента в «физиологическом» диапазоне его концентраций.

Обращает на себя внимание удивительная устойчивость потока в широком диапазоне соотношений  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$ . Так, изменение этой величины от 0,12 до 2,5, т. е. в 20 раз, привело к уменьшению потока лишь на 30% по отношению к максимуму. Уменьшение потока вдвое имело место при отношениях  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$ , меньших 0,08 или больших 5. Кроме того, результаты настоящей работы свидетельствуют, что, во-первых, потоки, катализируемые креатинкиназой и определенные методом переноса насыщения, действительно соответствуют истинным величинам, измеренным при помощи изотопного обмена в условиях, близких к физиологическим. Поэтому можно считать, что метод переноса намагниченности обеспечивает получение адекватной информации о скоростях креатинкиназной реакции *in vitro* и, по всей вероятности, в живых системах в соответствующих условиях.

Во-вторых, эти данные представляют новые доказательства старой точки зрения Моррисона и Клеянда [14], согласно которой собственно перенос фосфорильной группы (превращение тройных комплексов, стадии 5 и 6 на схеме) является скоростью определяющей стадией креатинкиназной реакции при 30°С и рН 7,4. Аналогичный вывод был сделан в нашей недавней работе [8], в которой было обнаружено, что скорости обмена  $ATP \rightarrow PCr$  и  $ATP \rightarrow ADP$ , измеренные по переносу насыщения в тех же условиях, близки. Действительно, потоки между фосфокреатином и АТР, измеренные при помощи метки ( $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ ), в общем зависят от всех «элементарных» констант скоростей, включая константы скорости диссоциации и ассоциации фосфокреатина и АТР (см. схему). Напротив, потоки, измеренные техникой переноса насыщения, определяются главным образом стадиями переноса фосфорильной группы (стадии 5 и 6 на схеме) благодаря тому, что химические сдвиги сигналов  $^{31}P$  свободного и связанного с ферментом фосфокреатина близки между собой так же, как и химические сдвиги сигналов  $\gamma\text{-}^{31}P$  свободного и связанного  $MgATP$  (см. работы Рао и Кон [15] и наши [7–9]). Следовательно, если бы перенос фосфорильной группы не был скоростью определяющим, истинный поток был бы меньше измеренного при помощи метода переноса насыщения и, следовательно, последний был бы завышен, так как реальный суммарный поток зависит также и от стадий 1–4 и 7–10 (схема), неизбежно уменьшающих его. Однако тенденция к этому отмечается при высоких отношениях  $[PCr]/[Cr] (>5)$ , когда концентрация свободного  $MgADP$  ниже 20–30 мкМ, что равно или ниже концентрации добавленного фермента (10–100 мкМ). На этом основании можно предположить, что стадии диссоциации и (или) ассоциации  $MgADP$  с ферментом становятся более значимыми в регуляции общего потока через фермент, когда концентрации  $MgADP$  становятся чрезвычайно низкими.

Поскольку температурные коэффициенты для разных стадий ферментативной реакции могут быть различны, положение скоростью определяющей стадии может смещаться при изменении температуры. Поэтому мы исследовали температурные зависимости катализируемых креатинкиназой потоков от АТР к фосфокреатину, определяя их как при помощи техники переноса насыщения, так и с радиоизотопной меткой и сравнивая их с аналогичными зависимостями для максимальных скоростей этой реакции, найденными из стационарной кинетики.

Результаты этих экспериментов показаны на рис. 3. Видно, что все три прямые аррениусовских зависимостей почти параллельны, а кажущаяся энергия активации, вычисленная из их наклонов, составляет 12–15 ккал/моль. Эти величины близки к тем, которые были найдены при исследовании ММ-изофермента креатинкиназы из скелетных мышц кролика [16]. Потоки в равновесных условиях были измерены при следующих концентрациях субстратов (мМ):  $[PCr]=15$ ,  $[Cr]=15$ ,  $[ATP] \approx 8$  и  $ADP \approx 0,25$  или ниже в зависимости от температуры. Концентрации креатина и особенно АDP не являются насыщающими, так как соответствующие величины  $K_m$  при 30–37°С равны 10 и 0,2 мМ, а величины  $K_m$  для  $MgATP$  и фосфокреатина составляют 1 и 4,6 мМ соответственно. По этой причине зависимости  $K_m$  для креатина и  $MgADP$  от температуры могут давать вклад в наблюдаемую температурную зависимость потока через креатинкиназу вместе с зависимостями для максимальных скоростей ( $V$ ).

Однако близость кажущихся величин энергий активации для  $V$  и изотопных потоков показывает, что вклад  $K_m$  в температурную зависимость этого потока незначителен, вероятно, из-за слабого влияния температуры на эти параметры в исследованном диапазоне. Этот вывод справедлив, если перенос фосфорильной группы (стадии 5 и 6 на схеме) является скоростью определяющей стадией итоговой реакции в использованном температурном интервале. Если это не так, регуляция может перемещаться на другую стадию или распределяться между несколькими стадиями по мере снижения температуры, в результате чего величина  $V$  не может быть отнесена исключительно к переносу фосфорильной группы.

С этой точки зрения некоторые расхождения в кажущихся средних ве-

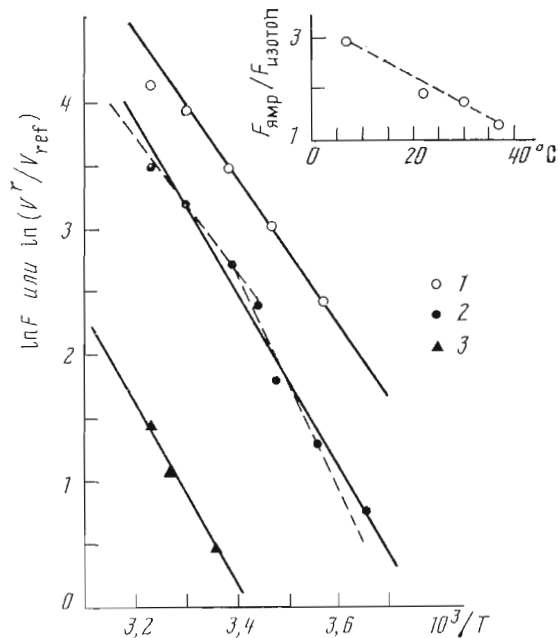


Рис. 3. Температурная зависимость скоростей обмена АТР→Р Сг и максимальных скоростей «обратной» реакции, катализируемых креатинкиназой: 1 — потоки, измеренные по переносу насыщения ( $F_{\text{ямр}}$ ); 2 — потоки, измеренные с радионуклидной меткой [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]АТР ( $F_{\text{изотоп}}$ ); 3 — максимальная скорость «обратной» реакции, отнесенная к активности фермента, определенной в стандартных условиях ( $V^r/V_{\text{ref}}$ ). Каталятическая активность служила мерой содержания активного фермента. На вставке показана зависимость отношения  $F_{\text{ямр}}/F_{\text{изотоп}}$  от температуры

личинах энергий активации ( $\sim 3$  ккал/моль) потоков, измеренных по переносу насыщения ( $\sim 12$  ккал/моль) и с радионуклидной меткой ( $\sim 15$  ккал/моль), могут быть приписаны смещению регуляции со стадии переноса фосфорильной группы. Действительно, как указывалось выше, процесс переноса насыщения зависит только от стадий 5 и 6 (схема) переноса фосфорильной группы [8, 9], и поэтому смещение или распределение регуляции на другие стадии, приводящее к увеличению кажущейся энергии активации итоговой реакции, не влияет на наблюдаемый перенос намагниченности. Напротив, изотопный обмен чувствителен к этим изменениям в положении регулирующей стадии. Действительно, на вставке к рис. 3 можно видеть, что отношение величин потоков, измеренных методом переноса насыщения и с изотопной меткой, растет по мере снижения температуры от 37 до 7° С от 1,25 до 3,0. Более того, при внимательном рассмотрении арренциусовской зависимости для изотопного обмена можно обнаружить некоторый излом на этой прямой при 25° С (рис. 3, пунктир). При этом верхняя прямая характеризуется кажущейся энергией активации  $\sim 12$  ккал/моль, а нижняя  $\sim 18$  ккал/моль. Это может быть объяснено появлением другой скоростьлимитирующей стадии из-за снижения температуры. Вклад этой стадии проявляется в увеличении кажущейся величины энергии активации итоговой реакции. Этот вывод не противоречит данным Рао и Коу [15], которые нашли, что при низких температурах (4–7° С) перенос фосфорильной группы не является скоростьюопределяющей стадией креатинкиназной реакции.

Таким образом, из данной работы следует, что перенос фосфорильной группы — это стадия, контролирующая скорость креатинкиназной реакции в «физиологических» условиях, т. е. при 30–37° С, рН 7,4 и отношении  $[PCr]/[Cr]=0,2\text{--}2,0$ . Однако при низких температурах или высоких отношениях  $[PCr]/[Cr]$  ( $>5$ , низкая концентрация АДФ) проявляется тенденция к смещению положения регулирующей стадии итоговой реакции или к распределению регуляции между несколькими стадиями. Отсюда следует: 1) метод переноса намагниченности позволяет определять ве-

личины потоков между фосфокреатином и АТФ, близкие к истинным, в условиях, сходных с физиологическими; 2) сочетание методов переноса намагниченности и изотопного обмена может быть полезным при анализе механизма других ферментативных реакций, в частности для выявления стадий, определяющих скорость этих процессов; 3) измерение потоков методом переноса намагниченности может приводить к завышению величин потоков в исследуемых реакциях (см. вставку к рис. 3). По этой причине в каждом отдельном случае требуется тщательный анализ полученных данных.

### Экспериментальная часть

В работе использовали креатин, нуклеотиды, дитиотреит, Нерес, триэтиламин (Sigma, США); фосфокреатин, динатриевую соль (Schiapparelli Farmaceutici, Италия), [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ (Amersham, Англия). ММ-Изофермент креатинкиназы выделяли из скелетных мышц крысы так, как описано ранее [17].

*Измерения скоростей  $^{31}\text{P}$ -обмена между фосфокреатином и АТФ методом переноса насыщения* выполняли на спектрометре ЯМР WM-500 (Bruker, ФРГ), используя стандартную частоту 202,45 МГц для ядер  $^{31}\text{P}$  так, как это описано ранее [7]. Селективное насыщение нужных сигналов в спектре производили по методу «Dante» [12]. Типичные параметры импульсной последовательности «Dante» были следующими: длительность импульса — 1,0–1,5 мкс (1,5–3°); задержка между импульсами 100–200 мкс; число импульсов в последовательности минимальной длительности (0,3 с) — 1500–3000. Времена насыщения большей длительности (0,6–15 с) получали повторением целого числа (от 2 до 50) минимальных последовательностей с периодом 300 мкс. За насыщающей последовательностью через 1 мс следовал регистрирующий импульс (90°, 40–56 мкс). Релаксационная задержка составляла 10–15 с; число сканирований — 16–32; размер памяти — 8–16 К.

Метод определения собственно потоков основан на следующем. Насыщая разное время (0,3–9,6 с) один из сигналов  $\gamma$ -P(MgАТФ) или фосфокреатин, наблюдали уменьшение интенсивности другого сигнала, фосфокреатина или  $\gamma$ -P(MgАТФ) соответственно (см. рис. 1), происходящее благодаря химическому обмену фосфокреатин  $\xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}}$  MgАТФ, катализируемому креатинкиназой. Относительная интенсивность наблюдаемого сигнала, например  $\gamma$ -P(MgАТФ), описывается экспонентой вида [11]:

$$I/I_0 = A_0 + A_1 \exp[-(k_{-1} + 1/T_1)t],$$

где  $t$  — время насыщения, равное времени обмена;  $A_0 = (1 + k_{-1}T_1)^{-1}$ ;  $A_1 = k_{-1}T_1(1 + k_{-1}T_1)^{-1}$ . Здесь  $k_{-1}$  — константа скорости псевдопервого порядка,  $T_1$  — время продольной релаксации ядра  $\gamma$ - $^{31}\text{P}$ (MgАТФ). По определению, поток от АТФ к фосфокреатину и обратно равен:  $F(\text{АТФ} \rightarrow \text{PCr}) = -k_{-1}[\text{АТФ}] = k_{+1}[\text{PCr}] = F(\text{PCr} \rightarrow \text{АТФ})$ .

Величины потоков (скоростей) нормировали к концентрации фермента ( $E_0$ ) и максимальной скорости прямой реакции ( $V'$ ) при pH 7,4 и 37° С, так как эксперименты выполняли с разными партиями фермента, имевшими разную удельную активность. Абсолютные значения удельной активности варьировали от 150 до 250 мкмоль/мин на 1 мг белка.

Среда инкубации исходно содержала 20–30 мМ Нерес-NaOH-буфер (pH 7,4), 110 мМ ацетат калия, 30 мМ KCl, 10 мМ ацетат магния, 8 мМ АТФ, [PCr] + [Cr] = 30 мМ, 0,5 мМ дитиотреит, 0,5 мМ EGTA и 20% D<sub>2</sub>O для стабилизации магнитного поля (ионная сила 180 мМ, концентрация свободного Mg<sup>2+</sup> ~ 2 мМ). Концентрация креатинкиназы в большинстве случаев составляла 2–10 мг/мл (0,05–0,25 мМ по активным центрам). Только при изучении температурной зависимости для получения достоверных величин потоков при низких температурах (7° С) концентрацию фермента увеличивали до 30 мг/мл (0,75 мМ по активным центрам).

*Измерения потоков (АТФ → PCr), катализируемых креатинкиназой, при*

помощи радиоизотопной метки ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ) проводили в той же среде, что и перепос насыщения, с той лишь разницей, что концентрация креатинкиназы составляла 0,04–0,4 мг/мл (80 МЕ/мл). Инкубационную смесь нагревали 15 мин при 37°C, а затем уравнивали при требуемой для измерений температуре (до 2 ч при 0°C) для того, чтобы достичь положения, близкого к термодинамическому равновесию. Затем обмен иницировали введением малого объема  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  так, чтобы общая концентрация АТФ в реакционной смеси практически не изменялась. Реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси равного объема холодной 6%  $\text{HClO}_4$ . После депротенизации кислотный экстракт разбавляли вдвое равным объемом 6%  $\text{HClO}_4$ , содержащей 100 мМ фосфокреатин и 100 мг/мл активированного угля (Norit А) для удаления АТФ [18]. Такая обработка при 0°C приводила к удалению из экстракта 97% АТФ и уменьшала содержание фосфокреатина не более чем на 10%. Радиоактивность этих образцов после удаления угля просчитывалась в воде на сцинтилляционном счетчике ЛКВ (Швеция).

Константы скорости вычисляли или из тангенсов углов наклона начальных участков кривых включения радиоактивности в фосфокреатин, или из зависимостей  $\ln(J-J_1)$  от времени, где  $J_1$  и  $J$  — текущая радиоактивность (интенсивность излучения) в момент времени  $t$  и равновесная радиоактивность при длительных временах инкубации (имп./мин). Тангенсы углов наклонов прямых в полупологарифмических координатах ( $S$ ) равны сумме констант ( $k_{+1}+k_{-1}$ ), которые, по определению, в условиях равновесия соотносятся следующим образом:

$$k_{-1}[\text{ATP}]_{\text{равн}}=k_{+1}[\text{PCr}]_{\text{равн}}=F,$$

где  $F$  — поток, выраженный в мкмоль/мин. Отсюда константа псевдонервого порядка  $k_{+1}=S/(1+[\text{PCr}]_{\text{равн}}/[\text{ATP}]_{\text{равн}})$ . Оба способа вычисления констант дали сходные результаты.

*Кинетические измерения.* Начальные скорости креатинкиназной реакции (концентрация креатинкиназы 0,05–1,0 мкг/мл) в обоих направлениях определяли спектрофотометрическим методом при 340 нм, используя сопряженные ферментные системы: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и гексокиназу (обратная реакция образования АТФ) или пируваткиназу и лактатдегидрогеназу (прямая реакция образования АДФ) [19]. Варьируя концентрацию субстратных пар, определяли величины  $K_m$  и максимальных скоростей ( $V$ ) графическим методом двойных обратных координат.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brown T. R., Gadian D. G., Garlic P. B., Radda G. K., Scely J. P., Styles P. B. *Frontiers Biol. Energetics*. N. Y.: Acad. Press, 1978, v. 2, p. 1344–1349.
2. Nunnally R. L., Hollis D. P. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 16, p. 3642–3646.
3. Matthews P. M., Bland J. L., Radda G. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 721, № 2, p. 312–320.
4. Kantor H. L., Ferreti J. A., Balaban R. S. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 789, № 1, p. 128–135.
5. Bittle J. A., Ingwall J. S. J. *Biol. Chem.*, 1985, v. 280, № 6, p. 3512–3518.
6. Degani M., Laughlin M., Campbell S., Shulman R. G. *Biochemistry*, 1985, v. 24, № 20, p. 5510–5517.
7. Kupriyanov V. V., Steinschneider A. Ya., Ruuge E. K., Kapel'ko V. I., Zueva M. Yu., Lakomkin V. L., Smirnov V. N., Saks V. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 805, № 4, p. 319–331.
8. Kupriyanov V. V., Balaban R. S., Steinschneider A. Ya., Lakomkin V. L., Ruuge E. K., Smirnov V. N., Saks V. A. *Proc. 5th Joint USSR – USA Symposium Myocardial Metabolism*, Baku, 1984/Eds Smirnov V. N., Katz A. M. N. Y.: Gordon and Breach Sci. Publ., 1986, p. 120–130.
9. Kupriyanov V. V., Balaban R. S., Steinschneider A. Ya., Saks V. A., Ruuge E. K., Smirnov V. N. *Proc. 16th Conference of FEBS*, Moscow, 1984, p. 150.
10. Brindle K. M., Porteous R., Radda G. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 786, № 1/2, p. 18–24.
11. Forsen S., Hoffman R. A. *J. Chem. Phys.*, 1963, v. 39, № 11, p. 2892–2901.
12. Morris G. A., Freeman R. G. *J. Magn. Res.*, 1978, v. 29, № 4, p. 397–417.
13. Сакс В. А., Сеннер Э. К., Любуна Н. В. *Биохимия*, 1977, т. 42, № 4, p. 579–588.
14. Morrison J. F., Cleland W. W. J. *Biol. Chem.*, 1966, v. 241, № 3, p. 673–683.
15. Rao B. D. N., Cohn M. J. *Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 4, p. 1716–1721.



16. *Watts D. C.* In: *The Enzymes*, 2nd edn/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 8, p. 383-455.
17. *Keutel H. J., Jacobs H. K., Ziter E., Mahland L., Kuby S. A.* *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1972, v. 150, № 3, p. 648-678.
18. *Savabi F., Geiger P. J., Bessman S. P.* *Anal. Biochem.*, 1984, v. 137, № 2, p. 374-379.
19. *Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I.* *Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 57, p. 273-290.

Поступила в редакцию  
21.III.1986  
После доработки  
24.VI.1986

## ATP-PHOSPHOCREATINE EXCHANGE CATALYZED BY CREATINE KINASE: COMPARISON OF $^{31}\text{P}$ -NMR SATURATION TRANSFER AND RADIOISOTOPE TECHNIQUES

KUPRIYANOV V. V., LYULINA N. V., STEINSCHNEIDER A. Ya.,  
ZUEVA M. Yu., SAKS V. A.

*Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Centre,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Unidirectional fluxes from ATP to phosphocreatine (PCr) catalyzed by MM-isoenzyme of creatine kinase (CK) were measured by using  $^{31}\text{P}$ -NMR saturation transfer technique and by means of radioactively labeled  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . At 30-37°C and pH 7.4 in a wide range of  $[\text{PCr}]/[\text{creatine}]$  ( $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$ ) ratios (0.2 to 3.0) both of these methods gave similar results, thus showing that magnetization (saturation) transfer allows to determine fluxes close to real ones under «physiological» conditions. However, at  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$  ratio higher than 5 ( $[\text{ADP}] < 30 \mu\text{M}$ ) or at decreased temperatures (7-15°C,  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}] \sim 1$ ) fluxes determined by saturation transfer substantially exceeded those measured with the radioactive label. These data imply that under «physiological» conditions phosphoryl group transfer is actually rate-determining step of the CK reaction. On the contrary, at high  $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$  values or at low temperature the control step could be shifted from the phosphoryl group transfer or distributed among other steps of the reaction.