



УДК 577.022

АДЕНИЛАТКИНАЗА ИЗ СЕРДЦА

I. КИНЕТИКА ПРЯМОЙ РЕАКЦИИ

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

*Лаборатория метаболизма миокарда
Всесоюзного кардиологического научного центра
Академии медицинских наук СССР, Москва;*

*Проблемная лаборатория мышечной деятельности
Тартуского государственного университета*

Изучена кинетика прямой аденилаткиназной реакции (использования ADP), катализируемой аденилаткиназой из сердца крысы. Показано, что уравнение Михаэлиса, получаемое в предположении о неупорядоченном присоединении субстратов и наличии квазиравновесия между фермент-субстратными комплексами, непригодно для описания стационарной кинетики этой реакции. Хорошо описываются экспериментальные данные более сложным уравнением, найденным из рассмотрения квазистационарности для указанной системы. Анализ ингибирования фермента высокими концентрациями ADP (~ 10 мМ) показал, что в этих условиях линейризация кривых достигается в координатах $1/v \div [ADP]^2$. Отсюда следует, что, во-первых, образование активного тройного комплекса ADP·E·MgADP происходит существенно быстрее через комплекс E·MgADP, чем через E·ADP. Во-вторых, предполагается, что существует неактивный тройной комплекс ADP·E·ADP. Исследование ингибирующего действия AMP на прямую реакцию позволило заключить, что возможно образование непродуктивных комплексов AMP·E·ADP и AMP·E·MgADP.

Кинетика и механизм действия аденилаткиназы (миокиназы) (КФ 2.7.4.3) из скелетных мышц изучались достаточно подробно рядом авторов [1—6]. В то же время фермент из сердечной мышцы в кинетическом аспекте исследован мало. Считается, что мышечный фермент существует в мономерной форме [5], имеет два центра связывания субстратов: один для магниевых комплексов нуклеотидов (MgADP и MgATP), а другой — для свободных нуклеотидов (ADP и AMP) [1, 2, 5]. Исследуя кинетику изотопного обмена ADP — AMP и ATP — AMP, катализируемого аденилаткиназой, Роадс и Левенштейн [6] пришли к выводу, что имеет место неупорядоченное связывание субстратов с ферментом, причем перенос фосфатной группы не является лимитирующей стадией. По мнению авторов, диссоциация некоторых фермент-субстратных комплексов — наиболее медленный процесс. Это означает, что для описания стационарной кинетики аденилаткиназной реакции вряд ли пригодны уравнения, получаемые на основе предположения о существовании квазиравновесия между фермент-субстратными комплексами. Между тем при анализе кинетики этой реакции очень часто в явной или неявной форме применяются уравнения названного типа [1, 2, 4, 5, 7]. В частности, для сравнительной оценки прочности фермент-субстратных комплексов широко используются величины K_n для субстратов [7], хотя в данном случае это

сложные эффективные величины, непосредственно не характеризующие устойчивости указанных комплексов.

Исследование кинетики этого фермента представляет большой интерес также в связи с тем, что соотношение концентраций АМР, АDР и АТР, которое в значительной степени регулируется миокиназой, играет важную роль в регуляции метаболизма клетки [8].

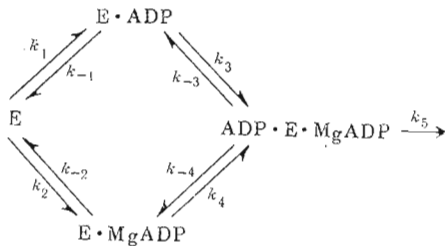
В настоящей работе выведено и проанализировано общее уравнение для скорости прямой аденилаткиназной реакции. Указанное уравнение хорошо описывает полученные экспериментальные зависимости, из которых определялись необходимые кинетические параметры.

Теоретическая часть

Вывод уравнения для скорости прямой реакции

Рассмотрим схему прямой аденилаткиназной реакции (схема 1), считая, что при измерении начальных скоростей в присутствии АТР-улавли-

С х е м а 1



вающей системы можно пренебречь комплексами фермента с продуктами реакции. В такой системе скорость реакции может быть выражена уравнением

$$v_1 = \frac{k_5 E_0 [EX_1 Y_1]}{E + EX_1 + EY_1 + EX_1 Y_1}, \quad (1)$$

где X_1 — [ADP], Y_1 — [MgADP], X_3 — [AMP], X_4 — [Mg²⁺].

Концентрации фермент-субстратных комплексов можно найти, решая систему линейных уравнений, вытекающих из предположения о квази-стационарности процесса:

$$\begin{aligned} dE/dt &= k_{-1} \cdot EX_1 + k_{-2} \cdot EY_1 + k_5 EX_1 Y_1 - (k_1 X_1 + k_2 Y_1) E = 0, \\ dEY_1/dt &= k_2 Y_1 \cdot E + k_{-4} EX_1 Y_1 - (k_{-2} + k_4 X_1) EY_1 = 0, \\ dEX_1/dt &= k_1 X_1 \cdot E + k_{-3} \cdot EX_1 Y_1 - (k_{-1} + k_3 Y_1) EX_1 = 0, \\ dEX_1 Y_1/dt &= k_3 Y_1 \cdot EX_1 + k_4 X_1 \cdot EY_1 - (k_{-3} + k_{-4} + k_5) EX_1 Y_1 = 0. \end{aligned}$$

Обработка этой системы методом Кинга и Альтмана [9] даст следующие выражения для концентраций фермент-субстратных комплексов и свободного фермента:

$$E = k_{-1} k_{-2} (k_{-3} + k_{-4} + k_5) + k_{-1} k_4 (k_{-3} + k_5) X_1 + k_{-2} k_3 (k_{-4} + k_5) Y_1 + k_3 k_4 k_5 X_1 Y_1, \quad (2)$$

$$EX_1 = X_1 [k_1 k_{-2} (k_{-3} + k_{-4} + k_5) + k_1 k_4 (k_{-3} + k_5) X_1 + k_2 k_4 k_{-3} Y_1], \quad (3)$$

$$EY_1 = Y_1 [k_{-1} k_2 (k_{-3} + k_{-4} + k_5) + k_2 k_3 (k_{-4} + k_5) Y_1 + k_1 k_3 k_{-4} X_1], \quad (4)$$

$$EX_1 Y_1 = X_1 Y_1 [(k_{-1} k_2 k_4 + k_{-2} k_1 k_3) + k_3 k_4 (k_1 X_1 + k_2 Y_1)]. \quad (5)$$

Подставляя уравнения (2), (3), (4) и (5) в (1), получим выражение для скорости реакции, по форме аналогичное уравнению, найденному Кингом [10]:

$$v_1 = \frac{V_1 (1 + A_1 X_1 + A_2 Y_1) X_1 Y_1}{1 + A_3 X_1 + A_4 Y_1 + A_5 X_1 Y_1 + A_6 X_1^2 + A_7 Y_1^2 + A_8 X_1 Y_1^2 + A_9 X_1^2 Y_1}, \quad (6)$$

коэффициенты которого связаны с кинетическими константами следующим образом:

$$V_1 = \frac{V_{1m}(k_{-1}k_2k_4 + k_{-2}k_1k_3)}{k_{-1}k_{-2}(k_{-3} + k_{-4} + k_5)} = \frac{V_{1m}\beta}{k_{-1}k_{-2}\alpha}, \quad (7)$$

где $\alpha = k_{-3} + k_{-4} + k_5$; $\beta = k_{-1}k_2k_4 + k_{-2}k_1k_3$; $V_{1m} = k_5E_0$.

$$A_1 = \frac{k_1k_3k_4}{\beta}; \quad (7.1)$$

$$A_2 = \frac{k_2k_3k_4}{\beta}; \quad (7.2)$$

$$A_3 = \frac{k_1}{k_{-1}} + \frac{k_4(k_{-3} + k_5)}{k_{-2}\alpha}; \quad (7.3)$$

$$A_4 = k_2/k_{-2} + \frac{k_3(k_{-4} + k_5)}{k_{-1}\alpha}; \quad (7.4)$$

$$A_5 = \frac{k_3k_4k_5 + k_2k_4(k_{-3} + k_{-3}) + k_1k_3(k_{-2} + k_{-4})}{k_{-1}k_{-2}\alpha}; \quad (7.5)$$

$$A_6 = \frac{k_1k_4(k_{-3} + k_5)}{k_{-1}k_{-2}\alpha}; \quad (7.6)$$

$$A_7 = \frac{k_2k_3(k_{-4} + k_5)}{k_{-1}k_{-2}\alpha}; \quad (7.7)$$

$$A_8 = \frac{k_2k_3k_4}{k_{-1}k_{-2}\alpha}; \quad (7.8)$$

$$A_9 = \frac{k_1k_3k_4}{k_{-1}k_{-2}\alpha}. \quad (7.9)$$

Анализ уравнения скорости реакции

При малых концентрациях субстратов X_1 и Y_1 , когда A_1X_1 и $A_2Y_1 \ll 1$ и члены в знаменателе, содержащие X_1^2 и Y_1^2 , много меньше, чем остальные члены, уравнение (6) становится формально эквивалентным уравнению Михаэлиса для этой реакции, выведенному из предположения о равновесном связывании субстратов, которое в двойных обратных координатах имеет вид

$$\frac{1}{v_1} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{K_{2b}}{V_{1m}} \cdot \frac{1}{Y_1} + \frac{K_{1b}}{V_{1m}} \cdot \frac{1}{X_1} + \frac{K_{1a}K_{2b}}{V_{1m}} \cdot \frac{1}{X_1} \cdot \frac{1}{Y_1}; \quad (8)$$

где $K_{1a} = k_{-1}/k_1$; $K_{2a} = k_{-2}/k_2$; $K_{1b} = k_{-4}/k_4$; $K_{2b} = k_{-3}/k_3$, причем $K_{1a}K_{2b} = K_{2a}K_{1b}$. Действительно, из уравнения (6) следует, что

$$\frac{1}{v_1} = \left(\frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_5'}{V_1} \right) + \frac{(A_3 + A_6X_1)}{V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} + \frac{(A_4 + A_7Y_1)}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1} + \frac{1}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1Y_1}. \quad (9)$$

Здесь $A_5' = (k_3k_4k_5 + k_2k_4k_{-3} + k_1k_3k_{-4})/k_{-1}k_{-2}\alpha$.

Однако при этом коэффициенты уравнения (9) не равны константам устойчивости фермент-субстратных комплексов ($1/K_{1a}$, $1/K_{2a}$, $1/K_{2b}$). Из сопоставления уравнений (8) и (9) следует, что

$$1/V_{1m(\text{как})} = 1/V_{1m} + A_5'/V_1;$$

$$K_{2b(\text{как})} = (A_3 + A_6X_1)/(V_1/V_{1m} + A_5') \simeq A_3/(V_1/V_{1m} + A_5');$$

$$K_{1b(\text{как})} = (A_4 + A_7Y_1)/(V_1/V_{1m} + A_5') \simeq A_4/(V_1/V_{1m} + A_5');$$

$$K_{1a(\text{как})} = 1/(A_3 + A_6X_1) \simeq 1/A_3; K_{2a(\text{как})} = 1/(A_4 + A_7Y_1) \simeq 1/A_4.$$

При увеличении концентрации любого из субстратов (X_1 или Y_1) члены с X_1^2 и Y_1^2 увеличиваются и становятся сравнимыми с другими членами знаменателя. Одновременно при определенном соотношении констант A_1X_1 и A_2Y_1 могут оставаться много меньше 1. В этом случае должно наблюдаться снижение скорости реакции. Это очень интересная ситуация,

когда увеличение концентрации одного из субстратов приводит к ингибированию реакции, причем непродуктивные комплексы не образуются. Названный случай анализировался Кингом [10] и более подробно будет обсужден ниже.

Ингибирование реакции при последующем увеличении концентрации любого из двух субстратов означает, что

$$dv_1/dX_1|_{Y_1=\text{const}} \leq 0 \text{ и } dv_1/dY_1|_{X_1=\text{const}} \leq 0.$$

Для анализа эти соотношения представим в виде

$$\frac{d(1/v_1)}{dX_1} = -\frac{1}{v_1^2} \cdot \frac{dv_1}{dX_1} \geq 0 \text{ и } \frac{d(1/v_1)}{dY_1} = -\frac{1}{v_1^2} \cdot \frac{dv_1}{dY_1} \geq 0, \quad X_1, Y_1 \geq 0.$$

Дифференцирование функции $1/v_1$ и анализ получающихся выражений приводят к неравенствам

$$A_6(1/Y_1 + \Lambda_2) - A_1(A_5' + A_3/Y_1) \geq 0 \text{ для } \frac{d(1/v_1)}{dX_1}, \quad (10)$$

$$\Lambda_7(1/X_1 + A_1) - A_2(A_5' + A_4/X_1) \geq 0 \text{ для } \frac{d(1/v_1)}{dY_1}. \quad (11)$$

При $Y_1 \rightarrow 0$ первое неравенство дает $A_6/A_1A_3 \geq 1$, а при $Y_1 \rightarrow \infty$ $A_6A_2/A_5'A_1 \geq 1$. Когда выполняются одновременно оба последних неравенства, неравенство (10) справедливо для любых положительных значений Y_1 . Аналогично, из второго неравенства (11) следует, что когда $X_1 \rightarrow 0$, то $A_7/A_4A_2 \geq 1$, и при $X_1 \rightarrow \infty$ $A_7A_1/A_5'A_2 \geq 1$. Подстановка значений коэффициентов $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_6$ и Λ_7 в полученные неравенства дает следующие соотношения между кинетическими константами, при которых должно наблюдаться субстратное ингибирование: $k_2k_{-4} > k_3k_4$; $k_{-3} > k_3$ и $k_1k_2 > k_3^2$ при $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$, для зависимости скорости от X_1 (ADP) или, в упрощенном варианте, $k_2 > k_3$; $k_{-4} \gg k_4$; $k_{-3} \geq k_4$; $k_1 \geq k_3$ и $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$. Для зависимости v_1 от Y_1 (MgADP) условие ингибирования реакции MgADP выглядит таким образом: $k_1k_{-3} > k_3k_4$, $k_{-3} > k_3$ и $k_1k_2 > k_4^2$ при $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$ или $k_1 > k_4$, $k_2 \geq k_4$, $k_{-3} \geq k_4$, $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$. Неравенство $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$ следует из того факта, что перенос фосфатной группы не является лимитирующей стадией аденилаткиназной реакции. Обе системы полученных неравенств не противоречат друг другу и поэтому могут быть объединены в одну систему: $k_1, k_2, k_{-3} > k_3$; $k_1, k_2, k_{-4} > k_4$; $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$. Если между кинетическими константами наблюдаются указанные соотношения, реакция должна ингибироваться избытком любого из двух субстратов: ADP и MgADP.

При дальнейшем увеличении X_1 или Y_1 величины A_1X_1 или A_2Y_2 становятся много больше 1 и скорость реакции практически перестает изменяться. Сказанное можно проиллюстрировать следующим образом, трансформируя уравнение (6):

$$\frac{1}{v_1} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{\left[\left(\frac{A_3}{Y_1} + \frac{A_4}{X_1} \right) + A_5' + A_6 \frac{X_1}{Y_1} + \Lambda_7 \frac{Y_1}{X_1} \right] + \frac{1}{X_1Y_1}}{V_1(1 + A_4X_1 + A_2Y_1)}. \quad (12)$$

Отсюда видно, что при $X_1 \rightarrow \infty$ и $A_2Y_2 \ll 1 + A_1X_1$

$$\frac{1}{v_1} \rightarrow \frac{1}{V_{1, X_1 \rightarrow \infty}} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_6}{A_1V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{k_{-3} + k_5}{k_3V_1} \cdot \frac{1}{Y_1}, \quad (13)$$

а при $Y_1 \rightarrow \infty$ и $A_1X_1 \ll 1 + A_2Y_1$

$$\frac{1}{v_1} \rightarrow \frac{1}{V_{1, Y_1 \rightarrow \infty}} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_7}{A_2V_1} \cdot \frac{1}{X_1} = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{k_{-4} + k_5}{k_4V_1} \cdot \frac{1}{X_1}. \quad (14)$$

Из уравнений (13) и (14) вытекает, что предельные значения обратной скорости линейно зависят от обратной концентрации второго субстрата, причем ординаты пересечений прямых этих зависимостей равны $1/V_{1m}$.

Сопоставляя соотношения (13) и (14) с уравнением типа Михаэлиса (8) при $Y_1 \rightarrow \infty$ или $X_1 \rightarrow \infty$, получаем значения кажущихся K_m ;

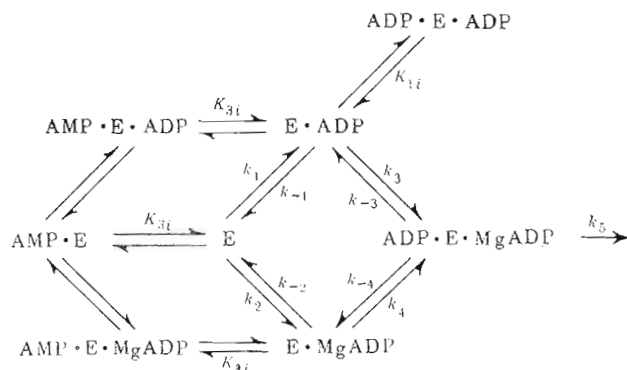
$$K_{1b}(\text{каж}) = A_7 V_{1m} / A_2 V_1 \quad \text{и} \quad K_{2b}(\text{каж}) = A_6 V_{1m} / A_1 V_1.$$

Таким образом, сравнение уравнений (9), (13), (12) с уравнением (8) показывает, что кажущиеся величины K_m и V_m , определяемые традиционным методом из зависимостей $1/v$ от $1/S$, в данном случае неодинаковы и зависят от исследуемого диапазона концентраций субстратов.

Ингибирование реакции ADP и AMP

До сих пор, анализируя кинетику этой реакции, мы не принимали во внимание возможности существования непродуктивных комплексов. Рассмотрим два случая: 1) образование неактивного тройного комплекса фермента с двумя молекулами ADP, т. е. $X_1 E X_1$, и 2) возникновение комплексов продукта реакции — AMP со всеми формами фермента, исключая тройные комплексы $X_1 E Y_1$ и $X_1 E X_1$, т. е. с E, $E X_1$, $E Y_1$ (схема 2). Допу-

С х е м а 2



стим, что названные ингибиторные комплексы находятся в равновесии с соответствующими формами фермента. Иначе говоря, концентрации этих комплексов равны:

$$\begin{aligned} X_1 E X_1 &= E X_1 \cdot X_1 / K_{1i}; & E X_3 &= E \cdot X_3 / K_{3i}; \\ X_1 E X_3 &= E X_1 \cdot X_3 / K_{3i}; & Y_1 E X_3 &= E Y_1 \cdot X_3 / K_{3i}. \end{aligned}$$

В первом приближении считаем, что константы диссоциации (K_{3i}) всех комплексов фермента с AMP (X_3) одинаковы. Очевидно, что концентрации указанных комплексов войдут в виде дополнительных членов в знаменатель выражения для скорости реакции (1), представляющий собой уравнение материального баланса. Новое уравнение скорости будет иметь вид

$$v_1 = \frac{V_{1m} \cdot X_1 E Y_1}{(E + E X_1 + E Y_1) \left(1 + \frac{X_3}{K_{3i}}\right) + E X_1 \cdot \frac{X_1}{K_{1i}} + X_1 E Y_1}. \quad (15)$$

Рассмотрим вначале подробнее случай ингибирования только ADP, т. е. когда $X_3 = 0$. Для получения окончательного уравнения скорости достаточно умножить уравнение (3) для комплекса $E X_1$ на величину X_1 / K_{1i} и прибавить полученное значение к знаменателю уравнения (6). Добавятся следующие члены:

$$k_1 k_{-2} \alpha X_1^2 / K_{1i}; \quad k_1 k_4 (k_{-3} + k_5) X_1^3 / K_{1i} \quad \text{и} \quad k_2 k_3 k_{-3} X_1^2 Y_1 / K_{1i}.$$

Ясно, что изменятся коэффициенты A_6 и A_9 , а также появится новый член, содержащий X_1^3 , коэффициент при котором обозначим через A_{10} .

Таким образом, уравнение (6) превращается в уравнение

$$v_1 = \frac{V_1(1 + A_1X_1 + A_2Y_1)X_1Y_1}{1 + A_3X_1 + A_4Y_1 + A_5X_1Y_1 + A_6'X_1^2 + A_7Y_1^2 + A_8X_1Y_1^2 + A_9^1X_1^2Y_1 + A_{10}X_1^3}, \quad (16)$$

где

$$A_6' = A_6 + k_1/k_{-1}K_{11}, \quad (16.1)$$

$$A_9' = A_9 + k_2k_4k_{-3}/k_{-1}k_{-2}\alpha K_{11}, \quad (16.2)$$

$$A_{10} = k_1k_4(k_{-3} + k_5)/k_{-1}k_{-2}\alpha K_{11}. \quad (16.3)$$

При концентрациях ADP, когда $A_1X_1 \ll 1$, выражение для обратной скорости будет иметь вид

$$\frac{1}{v_1} = \left(\frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_5'}{V_1} \right) + \frac{A_3}{V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} + \left(\frac{A_4}{V_1} + \frac{A_7}{V_1} Y_1 + \frac{1}{V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} \right) \cdot \frac{1}{X_1} + \left(\frac{k_2k_4k_{-3}}{k_{-1}k_{-2}\alpha K_{11}} + \frac{k_1}{k_{-1}K_{11}} + \frac{A_6}{Y_1} \right) \frac{X_1}{V_1} + \frac{A_{10}}{V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} \cdot X_1^2. \quad (17)$$

Для случая ингибирования AMP из уравнения (15) получается соотношение

$$\frac{1}{v_{1i}} = \frac{1}{v_1} + \left(\frac{1}{v_1} - \frac{1}{V_{1m}} - \frac{A_{10}}{V_1} \cdot \frac{1}{Y_1} X_1^2 \right) \frac{X_3}{K_{3i}}, \quad (18)$$

где v_{1i} — скорость реакции в присутствии AMP; v_1 — скорость реакции в отсутствие AMP (уравнение (16)).

Получение зависимостей скорости реакции от начальных концентраций ADP и Mg^{2+}

В выведенных выше уравнениях для скорости прямой реакции последняя выражалась как функция концентраций ADP (X_1) и MgADP (Y_1). Между тем эти величины связаны между собой и концентрацией ионов Mg^{2+} (X_4) в среде соотношениями

$$X_1 = X_1^0 / (1 + K_1^c X_4), \quad (19)$$

$$Y_1 = K_1^c X_1^0 X_4 / (1 + K_1^c X_4), \quad (20)$$

$$X_4 = X_4^0 / (1 + K_1^c X_1), \quad (21)$$

где X_1^0 и X_4^0 — суммарные концентрации ADP и Mg^{2+} в свободной форме и в виде комплексов, а K_1^c — константа устойчивости комплекса MgADP.

Рассмотрим два простейших случая, когда общая концентрация ADP (X_1^0) существенно больше общей концентрации Mg^{2+} (X_4^0) и, наоборот, так, что $(X_1^0 - X_4^0) \gg 1/K_1^c$ или $(X_4^0 - X_1^0) \gg 1/K_1^c$.

Концентрация ADP больше концентрации Mg^{2+} , причем $(X_1^0 - X_4^0) \gg \gg 1/K_1^c \simeq 0,3$ мМ [11]. Тогда концентрация свободного ADP (X_1) практически равна разности общих концентраций ADP и Mg^{2+} , а концентрация MgADP (Y_1) приблизительно равна общей концентрации Mg^{2+} , т. е. $X_1 \simeq X_1^0 - X_4^0$ и $Y_1 \simeq X_4^0$.

Подстановка этих выражений в уравнение (17) дает

$$\frac{1}{v_1} = \left(\frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_5'}{V_1} + \frac{A_3}{V_1} \cdot \frac{1}{X_4^0} \right) + \left(\frac{A_4}{V_1} + \frac{A_7}{V_1} X_4^0 + \frac{1}{V_1} \cdot \frac{1}{X_4^0} \right) \frac{1}{X_1} + \left[\left(\frac{k_2k_4k_{-3}}{k_{-1}\alpha} + k_1 \right) \frac{1}{k_{-1}K_{11}} + \frac{A_6'}{X_4^0} \right] \frac{X_1}{V_1} + \frac{A_{10}}{V_1 X_4^0} \cdot X_1^2. \quad (22)$$

Концентрация Mg^{2+} больше концентрации ADP, причем $(X_4^0 - X_1^0) \gg \gg 1/K_1^c$. В этом случае концентрации свободных ADP (X_1) и Mg^{2+} (X_4), а также MgADP (Y_1) выражаются соотношениями

$$Y_1 \simeq X_1^0, \quad X_4 \simeq X_4^0 - X_1^0 \text{ и } X_1 = X_1^0 / K_1^c X_4.$$

Подставляя выражения для X_1 и Y_1 в уравнение (17), получим

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_1} = & \left(\frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_5'}{V_1} + \frac{A_3}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1^0} \right) + \\ & + \left(\frac{A_7}{V_1} + \frac{A_4}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1^0} + \frac{1}{V_1} \cdot \frac{1}{(X_1^0)^2} \right) \cdot K_1^c X_4 + \\ & + \left[\left(\frac{k_2 k_4 k_{-3}}{k_{-2} \alpha} + k_1 \right) \frac{1}{k_{-1} K_{11}} X_1^0 + A_6' \right] \cdot \frac{1}{V_1 K_1^c} \cdot \frac{1}{X_4} + \frac{A_{10} X_1^0}{V_1 K_1^c} \cdot \frac{1}{X_4^2}. \quad (23) \end{aligned}$$

Уравнение (22) позволяет определить входящие в него кинетические параметры из зависимостей скорости реакции от концентрации ADP при разных фиксированных общих концентрациях Mg^{2+} , когда $([ADP]_0 - [Mg^{2+}]_0) \gg 1/K_1^c$. Аналогично, с помощью уравнения (23) из зависимостей скорости реакции от концентрации Mg^{2+} при разных общих концентрациях ADP могут быть найдены содержащиеся в нем коэффициенты, если $([Mg^{2+}]_0 - [ADP]_0) \gg 1/K_1^c$.

Результаты исследования

1. *Зависимость скорости реакции от концентрации ADP.* Из рис. 1а следует, что увеличение концентрации ADP ($[Mg^{2+}] = 0,5$ мМ) сопровождается возрастанием скорости реакции, которая при дальнейшем увеличении концентрации ADP (1,0—8,0 мМ) начинает значительно снижаться.

При рассмотрении кривых ингибирования прямой аденилаткиназной реакции высокими концентрациями ADP (2—12 мМ) при разных общих концентрациях Mg^{2+} (0,1—0,5 мМ), когда $([ADP]_0 - [Mg]_0) K_1^c \gg 1$ ($K_1^c = 3,37$ мМ⁻¹ [11]), (рис. 1б), видно, что увеличение концентрации ADP от 2 мМ сопровождается существенным снижением скорости реакции. При обработке данных в координатах $1/v$ от $[ADP]$ (рис. 1в) начальные участки кривых имеют линейный характер; дальнейшее увеличение концентрации ADP приводит к более резкому подъему кривых вверх. Линеаризация этих кривых в координатах $1/v$ от $[ADP]^2$ (рис. 1г) свидетельствует о том, что наблюдаемая зависимость — параболическая. Из этого предварительного анализа ясно, что по крайней мере формально мы имеем дело со случаем, который представлен уравнением (22), считая, что член с $1/X_1$ мал по сравнению с другими.

Для нахождения коэффициентов указанного уравнения удобно представить результаты в координатах $1/v \cdot [ADP]$ от $1/[ADP]$ и $1/v \cdot [ADP]$ от $[ADP]$ (рис. 2а, б). Согласно теории, отрезок, отсекаемый на оси ординат (i_1), в обоих случаях имеет одно и то же значение:

$$i_1 = \left(\frac{k_2 k_4 k_{-3}}{k_{-2} \alpha} + k_1 \right) \frac{1}{k_{-1} K_{11} V_1} + \frac{A_6}{V_1} \cdot \frac{1}{X_4^0}. \quad (24)$$

Тангенс угла наклона прямых в координатах $1/v \cdot [ADP]$ от $1/[ADP]$ должен быть равен

$$s_1 = \frac{1}{V_{1m}} + \frac{A_5'}{V_1} \cdot \frac{1}{X_4^0}. \quad (25)$$

В координатах $1/v [ADP]$ от $[ADP]$ тангенс (s_2) выражается соотношением

$$s_2 = \frac{A_{10}}{V_1} \cdot \frac{1}{X_4^0}. \quad (26)$$

Из уравнений (24), (25) и (26) следует, что если теория верна, то величины отсекаемых отрезков на оси ординат (i_1) и величины наклонов (s_1 и s_2) должны линейно зависеть от $1/[Mg^{2+}]_0$ ($1/X_4^0$). Как показано на рис. 3, названные величины действительно связаны между собой линейно. Из этих зависимостей определяются коэффициенты уравнений (24), (25) и (26):

$$\frac{k_2 k_4 k_{-3}/k_{-2} \alpha + k_1}{V_1 k_{-1} K_{11}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ мин} \cdot \text{мМ}^{-1};$$

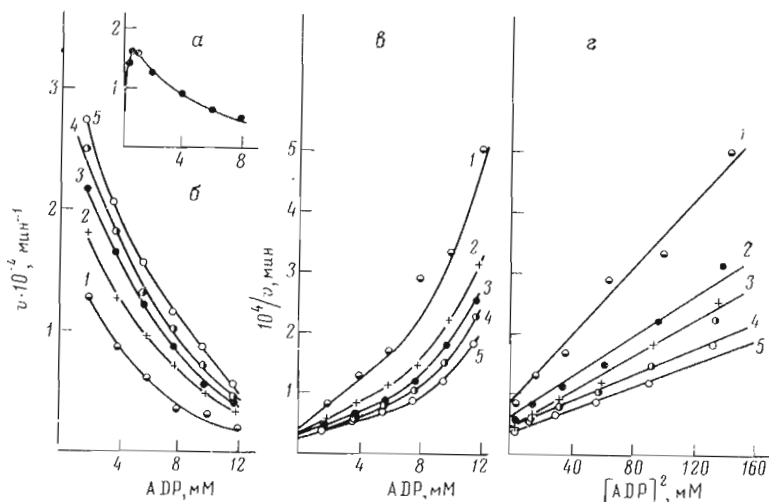


Рис. 1. Ингибирование прямой аденилаткиназной реакции высокими концентрациями ADP при концентрациях $[Mg^{2+}]$ (мМ): 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,3; 4 — 0,4; 5 — 0,5. а, б — кривые зависимости скорости реакции от концентрации свободного ADP; в — $1/v_1$ как функция $[ADP]$; г — линейные анаморфозы этих кривых в координатах $1/v_1$ от $[ADP]^2$

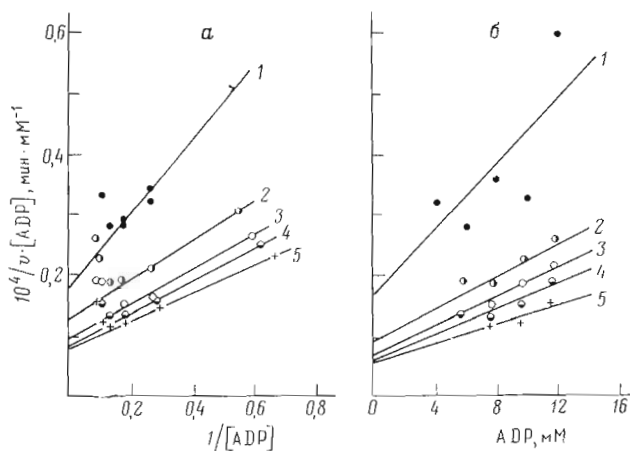


Рис. 2. Линейризация зависимостей скорости реакции от концентрации ADP в координатах $1/v_1[ADP]$ от $1/[ADP]$ (а) и $1/v_1[ADP]$ от $[ADP]$ (б) при общих концентрациях Mg^{2+} ($MgADP$): 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,3; 4 — 0,4; 5 — 0,5 мМ

$A_6'/V_1 = 1,8 \cdot 10^{-6}$ мин; $1/V_{1m} + A_5'/V_1 = 11 \cdot 10^{-6}$ мин; $A_3/V_1 = 5,3 \cdot 10^{-6}$ мин · мМ; $A_{10}/V_1 = 2,7 \cdot 10^{-6}$ мин · мМ⁻¹.

Так как коммерческие препараты ADP содержат довольно большое количество AMP (~10%), можно было бы думать, что ингибирование высокими концентрациями ADP по квадратичному закону является следствием присутствия примеси AMP в результате образования тройного ингибиторного комплекса ADP · E · AMP. Однако эксперимент со специально очищенным ADP (см. «Экспериментальную часть»), содержавшим всего 2% AMP, дал аналогичные результаты.

2. *Влияние концентрации ионов Mg на скорость реакции.* Возрастание общей концентрации Mg^{2+} в среде при фиксированной концентрации ADP 2 мМ сопровождается увеличением скорости реакции, а затем плавным падением последней при концентрациях Mg^{2+} более 1,5 мМ (рис. 4).

Анализ кривых зависимостей скорости прямой аденилаткиназной реакции от концентрации ионов магния в среде, когда $([Mg^{2+}]_0 -$

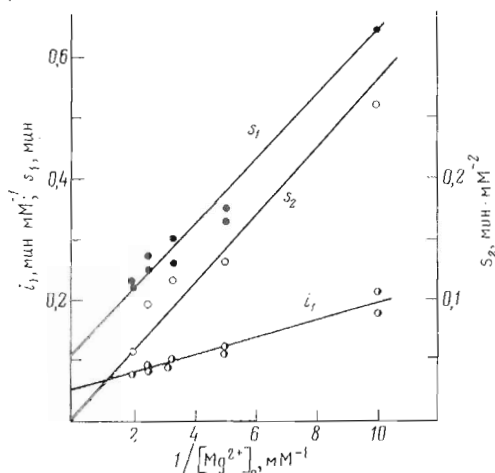


Рис. 3

Рис. 3. Вторичные зависимости наклонов (s_1 и s_2) и пересечений с осью ординат (i_1) линейных участков кривых в координатах $1/v_1$ [ADP] от $1/[ADP]$ и $1/v_1$ [ADP] от [ADP] от обратной общей концентрации Mg^{2+} ($MgADP$)

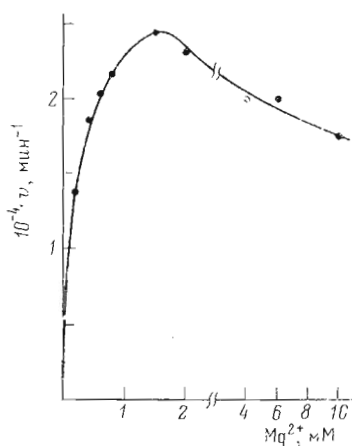


Рис. 4

Рис. 4. Влияние концентрации Mg^{2+} на скорость прямой аденилаткиназной реакции при 0,2 мМ концентрации ADP

— $[ADP]_0 K_1^c \gg 1$, при разных концентрациях $[ADP]_0$ (рис. 5а) показывает, что по мере увеличения концентрации Mg^{2+} наблюдается некоторое ингибирование реакции. Линеаризация этих зависимостей в координатах $1/v$ от $[Mg^{2+}]$ дает серию прямых (рис. 5б), соответствующих теоретическому уравнению (23), в котором члены с $1/X_4^2$ и $1/X_4$ малы по сравнению с другими членами. В соответствии с этим выражением отрезки, отсекаемые на оси ординат, даются уравнением

$$i_2 = (1/V_{1m} + A_5'/V_1) + (A_3/V_1) \cdot 1/X_1^0. \quad (27)$$

Тангенс угла наклона в этих координатах равен

$$s_3 = \frac{A_7 K_1^c}{V_1} + \frac{A_4 K_1^c}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1^0} + \frac{K_1^c}{V_1} \cdot \frac{1}{(X_1^0)^2}. \quad (28)$$

Из рис. 6 ясно, что i_2 и s_3 линейно зависят от $1/[ADP]$ ($1/X_1^0$). В случае соотношения (28) член с $1/(X_1^0)^2$ не проявляется, по-видимому, из-за того, что он мал по сравнению с $\frac{A_4 K_1^c}{V_1} \cdot \frac{1}{X_1^0}$. Отрезки, отсекаемые на оси абсцисс, и наклоны прямых, изображенных на рис. 6, позволяют определить следующие комбинации коэффициентов:

$$1/V_{1m} + A_5'/V_1 = 16 \cdot 10^{-6} \text{ мин}; \quad A_3/V_1 = 9 \cdot 10^{-6} \text{ мин} \cdot \text{мм};$$

$$A_7 K_1^c/V_1 = 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ мин} \cdot \text{мм}^{-1}; \quad A_4 K_1^c/V_1 = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ мин}.$$

Первые две величины определялись также в предыдущей серии экспериментов с высокими концентрациями ADP. Сравнение показывает, что эти величины несколько различаются, но в целом совпадение довольно хорошее.

3. *Ингибирование реакции АМР.* При анализе прямых в координатах $1/v_{11}$ от [AMP], каждая из которых соответствует определенной концентрации ADP (0,2—2,0 мМ) (рис. 7а), обращает на себя внимание тот факт, что они имеют разные наклоны и пересекаются в одной точке, абсцисса которой в классическом рассмотрении процесса ингибирования

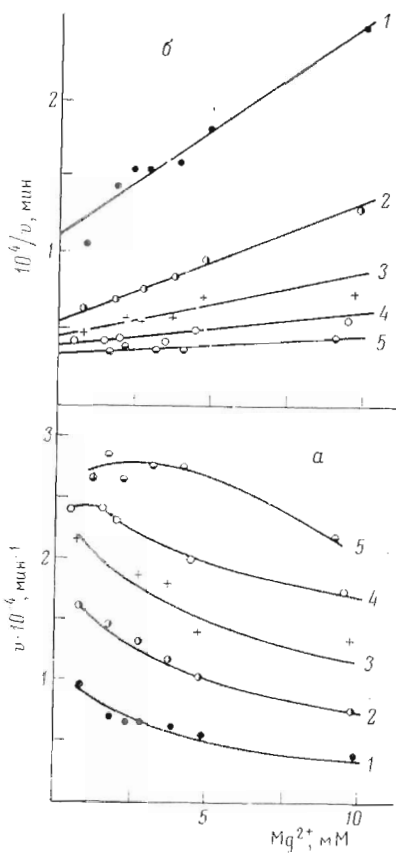


Рис. 5

Рис. 5. Влияние высоких концентраций Mg^{2+} на скорость прямой реакции при разных концентрациях ADP. *a* — кривые зависимости скорости реакции от концентрации свободного Mg^{2+} ; *b* — линейные анаморфозы этих кривых в координатах $1/v_1$ от $[Mg^{2+}]$ при концентрациях ADP ($MgADP$): 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,3; 4 — 0,5; 5 — 0,8 мМ

Рис. 6. Вторичные зависимости наклонов (s_3) и пересечений (i_2) с осью ординат прямых в координатах $1/v_1$ от $[Mg^{2+}]$ от обратной концентрации ADP ($MgADP$)

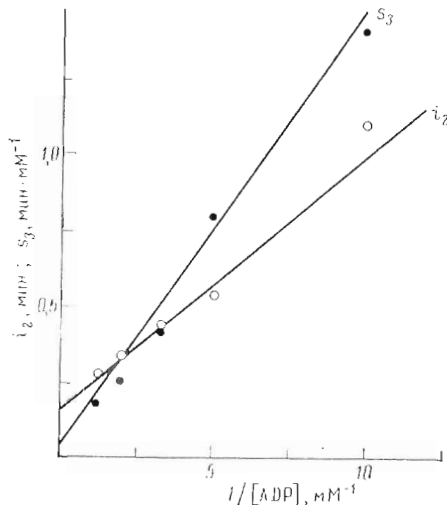


Рис. 6

есть константа ингибирования. В случае высоких ингибирующих концентраций ADP (2,0—10 мМ) зависимости $1/v$ от $[AMP]$ также имеют вид прямых, однако в отличие от предыдущего случая эти прямые приблизительно параллельны (рис. 7б). Ингибирование AMP описывается теоретическим уравнением (18), согласно которому $1/v_{1i}$ должна линейно зависеть от концентрации AMP, а тангенс угла наклона прямых выражается следующим образом:

$$s_4 = \frac{1}{K_{3i}} \cdot \frac{1}{v_1} - \frac{1}{K_{3i}} \cdot \frac{1}{V_{1m}} - \frac{\Lambda_{10}}{V_1 K_{3i} Y_1} \cdot X_1^2, \quad (29)$$

где v_1 — скорость реакции в отсутствие AMP. При небольших концентрациях ADP (до 2 мМ) членом, содержащим X_1^2 , можно пренебречь и тогда величина s_4 должна быть линейно связана с $1/v_1$. Действительно, как следует из рис. 8а, наблюдается хорошая линейная зависимость между s_4 и $1/v_1$. Тангенс угла наклона этой прямой, очевидно, равен $1/K_{3i}$, а абсцисса точки пересечения с осью абсцисс — $1/V_{1m}$. Названные величины составляют: $K_{3i} \approx 0,25$ мМ и $V_{1m} = 3,1 \cdot 10^4$ мин⁻¹.

При больших концентрациях ADP имеет смысл представить результаты в виде функции $(1/v_1 - s_4 \cdot K_{3i})$ от X_1 , используя найденное значение K_{3i} . Согласно рис. 8б, между этими величинами существует линейная связь, которая нарушается при высоких концентрациях ADP, переходя в параболическую. В частности, это лишний раз свидетельствует о том, что ингибирование реакции высокими концентрациями ADP по параболическому закону не является следствием наличия примеси AMP в ADP.

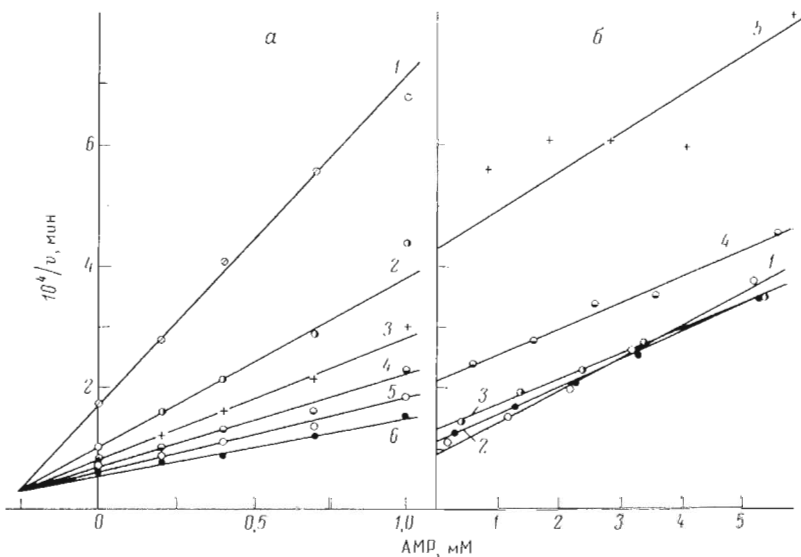


Рис. 7. Ингибирующее действие AMP на прямую аденилаткиназную реакцию при разных концентрациях ADP и MgADP. *a* — низкие общие концентрации ADP (мМ): 1 — 0,2; 2 — 0,4; 3 — 0,6; 4 — 0,8; 5 — 1,0; 6 — 1,4. Общая концентрация Mg^{2+} 10 мМ. *б* — высокие концентрации ADP (мМ): 1 — 1,5; 2 — 2,5; 3 — 3,5; 4 — 5,5; 5 — 7,5. Общая концентрация ионов магния 0,5 мМ

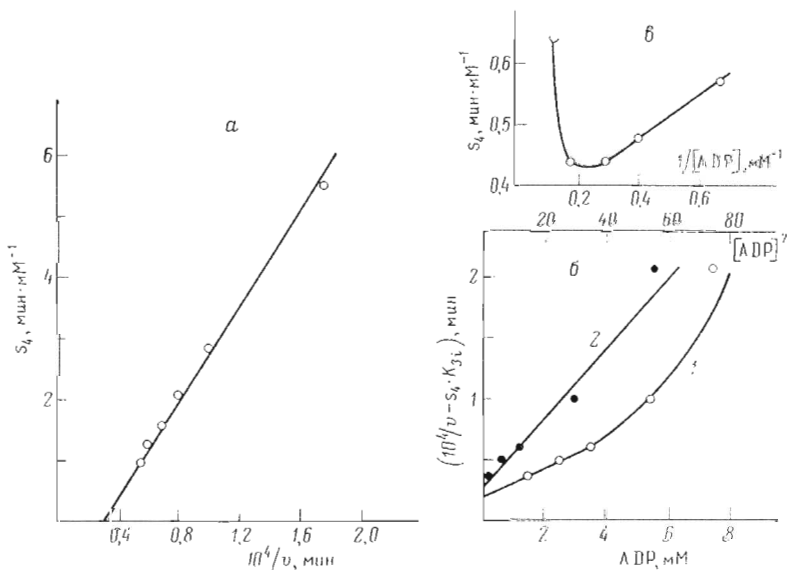


Рис. 8. *a* — вторичные зависимости наклонов прямых в координатах $1/v_{11}$ от AMP (s_4 , см. рис. 7*a*) от величины обратной скорости в отсутствие AMP ($1/v_1$); *б* — величины $(10^4/v_1 - s_4 K_{3i})$ как функции $[ADP]$ (1) и $[ADP]^2$ (2). v_1 — скорость реакции в отсутствие AMP; s_4 — наклоны прямых в координатах $1/v_{11}$ от $[AMP]$ (из данных рис. 7*б*). K_{3i} , найденная из рис. 8*a*, равна 0,25 мМ. *в* — кривая вторичной зависимости наклонов прямых в координатах $1/v_{11}$ от $[AMP]$ от обратной концентрации свободного ADP для случая высоких концентраций ADP (данные рис. 7*б*)

Обсуждение результатов

В разделе «Теоретическая часть» было показано, что уравнение (6) по форме трансформируется в уравнение Михаэлиса относительно концентрации одного субстрата, когда концентрация второго очень мала или очень велика, т. е. когда $k_1 k_3 k_4 X_1 / \beta$, или $k_2 k_3 k_4 Y_1 / \beta \ll 1$, или

$k_1 k_3 k_4 X_1 / \beta$, или $k_2 k_3 k_4 Y_1 / \beta \gg 1$ соответственно. Определяемые обычным способом значения максимальной скорости и констант Михаэлиса представляли собой сложные комбинации констант скорости, не равные константам диссоциации фермент-субстратных комплексов. При этом значения кажущихся V_m и K_m различались и зависели от исследуемого диапазона концентраций субстратов. В случае промежуточных концентраций субстратов можно было ожидать снижения скорости реакции, т. е. появления максимума на кривой зависимости «скорость — концентрация» при определенных соотношениях между кинетическими константами. Как показал детальный анализ (см. неравенства (10) и (11)), ингибирование обоими субстратами должно наблюдаться при следующих соотношениях констант: $k_1, k_2, k_{-3} > k_3$; $k_{-4} \geq k_4$ и $k_5 \gg k_{-3}, k_{-4}$. Последнее неравенство вытекает из того факта, что перенос фосфатной группы не является лимитирующим. Как показал эксперимент, кривые зависимости скорости реакции от концентрации свободного ADP при фиксированных концентрациях MgADP действительно имеют четкие максимумы. Из анализа спадающего участка кривой следовало, что ингибирование высокими концентрациями обусловлено не только образованием непродуктивного комплекса ADP·E·ADP, но и чисто кинетическими причинами, предсказываемыми теорией.

Рассмотрим этот эффект подробнее. Суть его заключается в том, что два возможных пути образования активного тройного комплекса ADP·E·MgADP оказываются существенно неэквивалентными. Реакция протекает заметно медленнее через комплекс E·ADP, чем путем образования комплекса E·MgADP. По этой причине при высоких концентрациях ADP почти весь фермент существует в виде комплекса E·ADP, реакция идет практически только по этому пути, наблюдается существенное ингибирование, которое, кроме того, усиливается благодаря образованию тройного непродуктивного комплекса ADP·E·ADP.

Такая интерпретация хорошо согласуется с результатами формально-кинетического анализа. Действительно, неравенство $k_2 > k_3$ означает, что MgADP быстрее присоединяется к свободному ферменту, чем к E·ADP; при этом ADP взаимодействует с E так же быстро или даже быстрее, чем MgADP с E·ADP ($k_1 \geq k_3$). В пользу этой точки зрения свидетельствуют также результаты экспериментов по влиянию высоких концентраций ионов Mg^{2+} на скорость реакции. Увеличение концентрации Mg^{2+} до 10 мМ сопровождается падением скорости реакции не более чем на 50% по сравнению с максимальной при данной общей концентрации ADP (0,1—0,8 мМ). Между тем расчет показывает, что в этих условиях концентрация свободного ADP снижается до очень низкого уровня: 3—26 мкМ. Иными словами, при достаточно высоких концентрациях MgADP снижение концентрации свободного ADP существенно не сказывается на скорости реакции, протекающей в этом случае преимущественно через комплекс E·MgADP. Следует подчеркнуть, что описанная здесь ситуация в принципе невозможна, когда фермент-субстратные комплексы находятся в равновесии и оба пути реакции совершенно эквивалентны, т. е. когда справедливо обычное уравнение типа Михаэлиса для двухсубстратной ферментативной реакции.

При анализе ингибирующего действия AMP на прямую реакцию предполагалось, что AMP борется за место связывания и с ADP, и с MgADP, причем константы связывания ингибитора одинаковы. В пользу этого предположения свидетельствовало совпадение теории и результатов эксперимента, а именно линейная связь между тангенсом угла наклона зависимости $1/v_1$ от [AMP] (см. рис. 8а) и $1/v_1$ при сравнительно малых [ADP]₀, где v_1 — скорость реакции в отсутствие AMP. Однако такого рода совпадение могло наблюдаться и в отсутствие конкуренции между MgADP и AMP, поскольку в условиях названных экспериментов концентрация свободного ADP, а значит, и комплекса E·ADP была мала. Из анализа инги-

бирующего действия АМР в присутствии высоких ингибирующих концентраций АДФ (2—10 мМ) следует, что, по-видимому, комплекс АДФ·Е·АМР все же существует. На основании уравнения (3) для $E X_1$ можно заключить, что если такой комплекс образуется, то тангенс угла наклона прямых в координатах $1/v_{11}$ от [АМР] (см. рис. 7б) должен содержать член не только с $1/X_1$, но и с X_1 , проявляющийся при высоких концентрациях АДФ. Действительно, как демонстрирует рис. 8в, зависимость названной величины от $1/X_1$ при высоких концентрациях АДФ нелинейна и проходит через минимум.

Экспериментальная часть

Частичная очистка аденилаткиназы из сердца крысы. Очистку и выделение фермента производили согласно ранее описанным методам [12—14] с той лишь разницей, [что отсутствовала стадия фракционирования на фосфоцеллюлозе. Предварительно измельченную сердечную ткань (10—15 г) помещали в 3-кратный объем холодного (0°) 10 мМ КСl и гомогенизировали 30 с в гомогенизаторе Virtis при 10 000 об/мин, а затем 1 мин при 22 000 об/мин. Полученный гомогенат центрифугировали при 100 000 *g* в течение 30 мин. Прозрачный надосадочный раствор, содержащий аденилаткиназу с уд. акт. (А) 1,4 мкмоль АТФ/мин·мг общего белка, фильтровали через марлю и затем подвергали кислотной обработке по методу Хейла [13]. После центрифугирования денатурированного кислотной обработкой белка (15 000 *g*, 30 мин) к надосадочному раствору добавляли сульфат аммония до 80% насыщения (47,5 г на 100 мл жидкости при рН 6); осадок, образовавшийся после стояния в течение ночи при 4°, отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме (~1 мл) 50 мМ фосфата натрия (рН 7) и 0,1 М NaCl; полученный раствор помещали на колонку (1 × 60 см) с сефадексом G-75 и элюировали тем же буфером при 2°. Фракции, содержавшие аденилаткиназную активность, объединяли (А ≈ 25 мкмоль АТФ/мин·мг белка), белок осаждали (NH₄)₂SO₄ (80% насыщения), центрифугировали, суспендировали в минимальном объеме раствора (NH₄)₂SO₄ (80% насыщения) и хранили при 0°. Перед кинетическими измерениями белок осаждали центрифугированием, осадок растворяли в небольшом объеме 20 мМ Трис-НСl-буфера (рН 8), содержавшего 0,3 мМ дитиотреит, до конечной концентрации 7—8 мг белка/мл.

Измерение скорости прямой аденилаткиназной реакции. Скорость прямой реакции регистрировали спектрофотометрически при 340 нм с помощью АТФ-улавливающей системы на основе гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Опытная проба содержала 20 мМ Трис-НСl-буфер (рН 8), 20 мМ глюкозу, 0,3 мМ дитиотреит, 0,6 мМ АДФ, 6—8 МЕ гексокиназы, 4—8 МЕ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, различные концентрации АДФ (0,1—12 мМ) и ацетата Mg (0—15 мМ). Концентрация аденилаткиназы подбиралась таким образом, чтобы максимальная активность улавливающей системы была в 20—100 раз больше определяемой активности, которая составляла не более 0,02—0,03 мкмоль/мин. В отдельных случаях, когда условия эксперимента были экстремальными, т. е. при высоких концентрациях АДФ или низких концентрациях Mg²⁺, специально проверялось наличие линейности между скоростью аденилаткиназной реакции и концентрацией аденилаткиназы, а также отсутствие зависимости скорости реакции от концентрации ферментов улавливающей системы. Все измерения выполняли при 30° и рН 8, для того чтобы АДФ и MgADP находились в полностью депротонированной форме, так как величины *pK* для них составляют 6,85 и 5,5 соответственно при 30° и ионной силе 0,04 М [11].

Скорость реакции выражали в мин⁻¹, умножая значения скорости в мкмоль/мин·мг на величину отношения максимальной скорости в мин⁻¹

известной из литературы (28 000 мин⁻¹ [1]), к максимальной скорости для данного препарата фермента в мкмоль/мин·мг, определенной обычным методом.

Очистка ADP от AMP. Коммерческие препараты ADP содержали значительные количества AMP: от 10% (моль/моль) и более. По этой причине для некоторых экспериментов проводилась очистка ADP от AMP с помощью тонкослойной хроматографии на целлюлозе в 40 мМ ацетате натрия (рН 5,2) и 0,15 М NaCl по методу, описанному в работе [15]. Содержание AMP при этом снижалось до 2%.

Концентрацию Mg²⁺ в исходных растворах определяли титрованием EDTA в присутствии эриохрома черного [16]. Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури [17].

В работе применялись ADP (Sigma, Calbiochem, США; Serva, Merck, ФРГ; Реанал, Венгрия); AMP и NADP (Calbiochem); дитиотреит (Sigma), гексокиназа (Ferak, Западный Берлин); глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Calbiochem, Serva).

Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометрах Perkin-Elmer-402 и Aminco DW-2-UV/VIS (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Noda L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **232**, 237—250.
2. Callaghan O. H., Weber H. (1959) *Biochem. J.*, **73**, 473—485.
3. Kudy S. A., Mahowald T. A., Noltmann E. A. (1962) *Biochemistry*, **1**, 748—762.
4. Pradhan T. K., Criss W. E., Morris H. (1974) *Cancer Res.*, **34**, 3058—3061.
5. Noda L. (1973) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), 3rd edn., v. 8, pp. 279—305, Acad. Press, N. Y.
6. Roads D. G., Lowenstein J. M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3963—3972.
7. Четверикова Е. П. (1975) *Успехи биол. химии*, **16**, 43—67.
8. Atkinson D. E. (1970) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), 3rd edn., v. 4, pp. 91—146, Acad. Press, New York and London.
9. King E. L., Altman C. (1956) *J. Phys. Chem.*, **60**, 1375—1378.
10. King E. L. (1956) *J. Phys. Chem.*, **60**, 1378—1381.
11. Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **57**, 273—290.
12. Kubo S., Noda L. H. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 325—334.
13. Heil A., Muller J., Noda L. H., Pinder T., Schirmer H., Schirmer I., von Zabern J. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **43**, 131—134.
14. Thuma E., Schirmer R. H., Schirmer J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 81—91.
15. Kirnos M. D., Vasiliev V. K., Vanyushin B. F. (1975) *J. Chromat.*, **104**, 113—122.
16. Крешков А. П. (1971) *Основы аналитической химии*, ч. 2, с. 372, «Химия», М.
17. Hartree E. F. (1972) *Anal. Biochem.*, **48**, 422—427.

Поступила в редакцию
31. III. 1977

ADENYLATE KINASE FROM HEART. I. KINETICS OF THE FORWARD REACTION

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

*Laboratory of Myocardial Metabolims, National Cardiology
Research Center, Moscow; Laboratory of Muscular Activity,
Tartu State University, Tartu*

Heart adenylate kinase (EC 2.7.4.3) catalyzed utilization of ADP was shown to be inhibited by high concentrations of the latter, whereby linear dependences could be obtained in the coordinates $1/v$ versus $[ADP]^2$. These data suggest that i) formation of the active ternary complex ADP·E·MgADP occurs more rapidly through the E·MgADP than E·ADP complex and ii) the dead-end ternary complex ADP·E·ADP should also be formed. Experimental data can be described satisfactorily by the equation for quasi-steady state system of random substrate binding to the enzyme, but not by the equation of Michaelis-Menten type. A study of the AMP inhibitory action on adenylate kinase reaction is suggestive of possible formation of the dead-end E·AMP, AMP·E·ADP and AMP·E·MgADP complexes.