



УДК 577.155

## КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНАЛОГОВ ГУАНИДИНОВЫХ СУБСТРАТОВ С МЫШЕЧНОЙ КРЕАТИНКИНАЗОЙ

*Куприянов В. В., Панасенко Н. А., Сакс В. А.**Лаборатория метаболизма миокарда Всесоюзного кардиологического научного центра Академии медицинских наук СССР, Москва*

Изучена кинетика действия аналогов гуанидиновых субстратов креатинкиназы — циклокреатина (сCr), фосфоциклокреатина (PcCr) и *L*, $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионовой кислоты (AGPA) как субстратов и ингибиторов креатинкиназной реакции. Показано, что сCr фосфорилируется АТФ в прямой реакции с *V*, составляющей 45% от *V* с креатином (Cr), и имеет два значения  $K_m$ : 110 мМ для двойного комплекса E·сCr и 27 мМ для тройного комплекса MgАТФ·E·сCr. PcCr принимал участие в обратной креатинкиназной реакции с *V*, составляющей 0,5% от *V* с фосфокреатином (PCr) и с  $K_m$  4 мМ. AGPA не фосфорилировалась в креатинкиназной реакции. сCr, PcCr и AGPA были ингибиторами креатинкиназы, конкурентными по отношению к креатину и фосфокреатину с  $K_i$ , соответственно равными 80, 4,5 (в обратной реакции) и 30 мМ (в прямой реакции). Ингибирование PcCr прямой реакции носило сложный характер, объясняющийся синергизмом между PcCr, с одной стороны, и одним АТФ или АТФ вместе с креатином — с другой, благодаря взаимозависимости связывания этих веществ с разными субъединицами димера креатинкиназы. Из представленных данных следует, что перечисленные субстратные аналоги связываются с тем же участком молекулы фермента, что и природные субстраты — креатин и фосфокреатин, но при этом предполагается, что PcCr и АТФ (или АТФ вместе с креатином) взаимодействуют кооперативно с разными субъединицами димера креатинкиназы.

Решение проблемы транспорта энергии в мышечных клетках и, в частности, в клетках миокарда имеет большое значение для понимания особенностей их энергетики, а также для управления сократимостью мышц. Сравнительно недавно опубликован ряд работ [1–6], согласно которым в миокардиальных клетках транспорт энергии от митохондрий [1, 2] и, возможно, от гликолитической системы [3] к местам ее потребления, включающим миофибриллы, Са-АТФ-азу саркоплазматического ретикулула, Na, К-АТФ-азу сарколеммы, осуществляется благодаря креатинкиназной системе, а основным переносчиком энергии является фосфокреатин (PCr) [1, 4–6]. Для изучения фосфокреатинового пути транспорта энергии и его регуляции *in vivo* удобны аналоги гуанидиновых субстратов креатинкиназы — креатина и фосфокреатина (PCr). Основное достоинство гуанидиновых аналогов заключается в том, что они, по-видимому, должны, в отличие от аналогов нуклеотидных субстратов (АТФ и АДФ), обладать высокой специфичностью по отношению к креатинкиназе, что особенно важно в условиях *in vivo*, поскольку креатин и фосфокреатин избирательно взаимодействуют с креатинкиназой.

Сокращения: Cr — креатин, PCr — фосфокреатин, сCr — циклокреатин (1-карбоксиметил-2-иминоимидазолидин), PcCr — фосфоциклокреатин (1-карбоксиметил-2-имино-3-фосфоимидазолидин), AGPA — *L*,  $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионая кислота.

К настоящему времени испытано около 20 различных аналогов гуанидиновых субстратов в качестве ингибиторов и субстратов креатинкиназной реакции [7–15]. Среди этих соединений нефосфорилированные по гуанидиновой группе *N*-алкильные производные *N*-амидиноглицина (креатин — *N*-метил-*N*-амидиноглицин), *N*-амидиносалицина, *N*-амидино- $\beta$ -аланина, производные, в которых карбоксильная группа креатина заменена на

группу  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P}-\text{O}^- \\ \diagup \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{R} \end{array}$  [7–10], циклокреатин [9, 10], креатинин и некото-

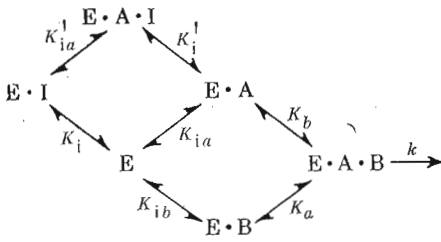
рые другие вещества [12]. Группа фосфорилированных по гуанидиновой группе производных включает в себя всего несколько соединений, среди которых фосфоциклокреатин [14, 15], фосфокреатинин [13] и фосфогуанидин- $\beta$ -пропионовая кислота [12]. Для большинства из перечисленных аналогов известны величины  $K_m$  и относительной максимальной скорости, определенные при высокой фиксированной концентрации второго субстрата [9–11, 14]; для некоторых из них имеются только данные об их метаболизме в условиях *in vivo* [12].

Целью настоящей работы было детальное изучение взаимодействия с креатинкиназой циклокреатина (сСг), фосфоциклокреатина (РсСг) и *L*- $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионовой кислоты (АГРР) как субстратов и ингибиторов креатинкиназной реакции. В работе определены все кинетические параметры изученных аналогов. Показано, что взаимодействие фосфоциклокреатина с креатинкиназой происходит более сложным образом, чем это предполагает схема, допускающая независимое связывание фосфоциклокреатина и природных гуанидиновых субстратов с разными субъединицами димера креатинкиназы.

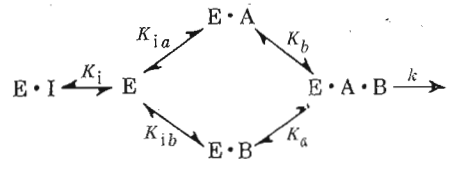
### Теоретическая часть

При рассмотрении ингибирующего действия аналогов гуанидиновых субстратов на креатинкиназную реакцию могут быть проанализированы две разные схемы. Первая из них предполагает конкуренцию ингибитора только с гуанидиновым субстратом, вторая — как с гуанидиновым, так и с нуклеотидным субстратом. Необходимость анализа последней схемы вытекает из хорошо известного факта, что фосфокреатин (и, по-видимому, его аналоги) не только связывается с тем же участком молекулы фермента, что и креатин, но, кроме того, способен конкурировать с АТР благодаря перекрыванию концевых фосфатных групп фосфокреатина и АТР [16]. Иными словами, непродуктивный комплекс РСг·Е·MgАТР не образуется [2]. Возможные сочетания субстратов и ингибитора, соответствующие этим двум случаям, иллюстрируются схемой 1. Приведенные случаи ингибирования справедливы для мономерного, а также для димерного (или вообще *n*-мерного) фермента, если субъединицы последнего не взаимодействуют друг с другом, т. е. связывание ингибитора (субстрата) с одной субъединицей не влияет на связывание субстрата (ингибитора) с другой. Если же связывание ингибитора и субстрата взаимозависимо, то обе кинетические схемы существенно усложняются.

Учитывая, что креатинкиназа представляет собой димерный фермент, усложним представленные выше схемы (схема 1), введя допущение, что связывание ингибитора с одной из субъединиц изменяет сродство гуанидинового субстрата к другой субъединице и, наоборот, связывание субстрата влияет на сродство ингибитора ко второй субъединице. Допустим также: 1) связывание нуклеотидного (А) и гуанидинового (В) субстратов происходит взаимозависимо в пределах одной субъединицы и независимо в разных субъединицах димера; 2) связывание нуклеотидного субстрата с разными субъединицами, а также связывание гуанидинового субстрата с разными субъединицами осуществляется независимо. На основа-



Случай 1



Случай 2

Два случая конкурентного ингибирования креатинкиназы анализами гуанидиновых субстратов. Обозначения: А — нуклеотидный субстрат (MgADP или MgATP); В — гуанидиновый субстрат (креатин, фосфокреатин, циклокреатин и фосфоциклократин); I — гуанидиновый ингибитор. Случай 1. Конкуренция ингибитора только с гуанидиновым субстратом: а) А — MgADP, В — фосфокреатин (или его аналог); I — фосфорилированный или нефосфорилированный гуанидиновый аналог (или креатин); б) А — MgATP, В — креатин (или его аналог), I — нефосфорилированный аналог креатина. Случай 2. Конкуренция ингибитора с гуанидиновым и нуклеотидным субстратом: А — MgATP, В — креатин или его аналог, I — фосфорилированный аналог гуанидинового субстрата или фосфокреатин

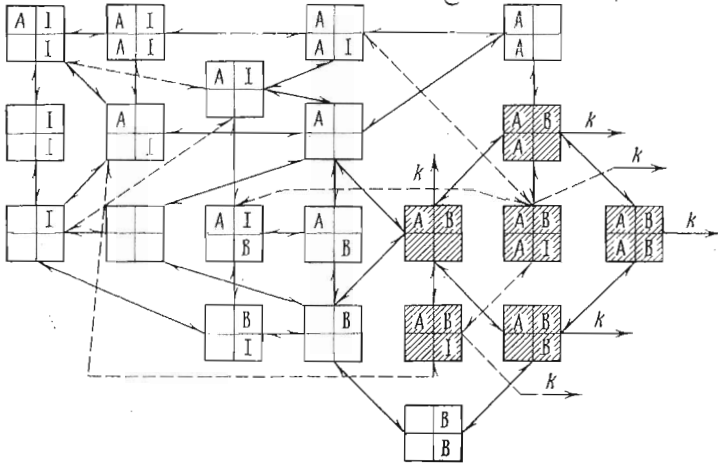
нии этих предпосылок ингибирование креатинкиназы производными ее природных гуанидиновых субстратов может быть изображено схемами 2 и 3, представляющими собой усложненные варианты случаев 1 и 2 (схема 1). Предполагается, что все активные фермент-субстратные комплексы (защитированные квадраты) распадаются с одинаковой каталитической константой. Введем обозначения:  $K_{ia}$  и  $K_a$  — константы Михаэлиса для связывания нуклеотидного субстрата со свободной субъединицей и ее комплексом с гуанидиновым субстратом соответственно,  $K_{ib}$ ,  $K_b$  и  $K'_b$  — константы Михаэлиса гуанидинового субстрата для свободной субъединицы ( $K_b$ ), ее комплекса с нуклеотидным субстратом, когда гуанидиновый ингибитор не связан ( $K_b$ ) и соответственно связан ( $K'_b$ ) со второй субъединицей;  $K_i$ ,  $K'_i$  — константы ингибирования аналогом гуанидинового субстрата, когда гуанидиновый субстрат не связан и соответственно связан со второй субъединицей, причем  $K_i K'_b = K'_i K_b$ ,  $K_a K_{ib} = K_{ia} K_b$ . Кинетический анализ схем 2 и 3, базирующийся на предположении о квазиравновесии между всеми фермент-субстратными комплексами (перенос фосфатной группы является стадией, определяющей скорость [16, 17]), дает следующие выражения для обратной скорости реакции. Для случая 1 конкуренции ингибитора только с гуанидиновым субстратом (схема 2), обозначив  $(1+A/K_a)/(1+A/K_{ia})=Q$ , имеем

$$1/v = \frac{1}{2V} [(1 + K_a/A) + (1 + K_{ia}/A) K_b/B] + [(1 + K_{ia}/A) K_b/2VB] \frac{I}{K_i} \times \left\{ 1 + \frac{(K'_i/K_i - 1) [2 + I (K'_i/K_i + 1)/K'_i]}{1 + BQ/K_{ib} + I/K'_i} \right\}. \quad (1)$$

Для случая 2 конкуренции ингибитора с гуанидиновым и нуклеотидным субстратами одновременно получим:

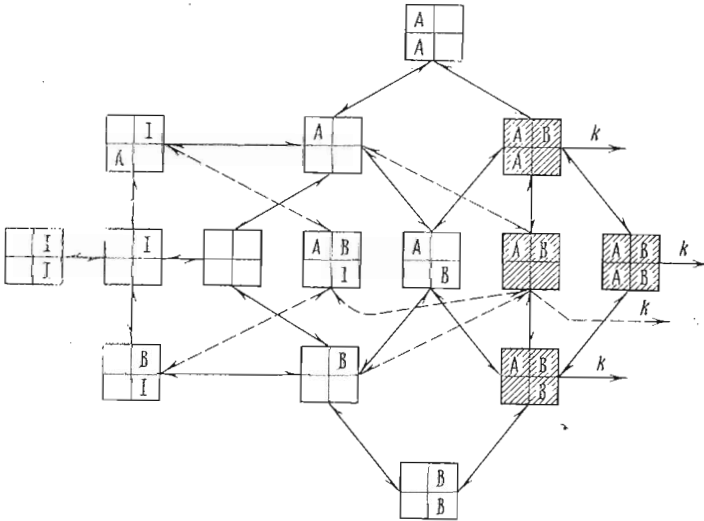
$$1/v = \frac{1}{2V} [(1 + K_a/A) + (1 + K_{ia}/A) K_b/B] + \frac{K_{ia} K_b}{2VAB} \cdot \frac{I}{K_i} \times \left\{ 1 + \frac{(K'_i/K_i - 1) [2 + I (K'_i/K_i + 1)/K'_i (1 + A/K_{ia})]}{1 + BQ/K_{ib} + I/K'_i (1 + A/K_{ia})} \right\}. \quad (2)$$

Схема 2



Ингибирование креатинкиназы аналогами гуанидиновых субстратов для случая кооперативной конкуренции ингибитора только с гуанидиновым субстратом. Димер креатинкиназы изображен в виде квадрата, разделенного на четыре части. Верхняя и нижняя половины квадратов соответствуют двум субъединицам димерной молекулы фермента, а левая и правая половины соответствуют центрам связывания соответственно нуклеотидного (А) и гуанидинового (В) субстратов с мономерами фермента. Заштрихованными квадратами изображены каталитически активные фермент-субстратные комплексы, распадающиеся с образованием продуктов реакции. Остальные обозначения те же, что и в схеме 1

Схема 3



Ингибирование креатинкиназы аналогами гуанидиновых субстратов для случая конкуренции ингибитора с гуанидиновым и нуклеотидным субстратом, когда имеет место кооперативность между ингибитором и гуанидиновым субстратом. Все обозначения те же, что в схемах 1 и 2

Легко видеть, что оба этих уравнения представляют собой нелинейные функции концентрации ингибитора, которые переходят в линейные функции, когда  $K_1 = K_1'$ , т. е. при независимом связывании ингибитора и субстрата с ферментом.

Проанализируем уравнения 1 и 2 подробнее. Увеличение концентрации ингибитора будет сопровождаться изменением величины множителя в фигурных скобках. При этом кривая в координатах  $1/v$  против  $[I]$  будет

иметь отклонение от линейности: кривая может загнуться вверх или вниз. При очень высоких концентрациях ингибитора, когда

$$[I] \gg K_i'(1 + BQ/K_{ib}); [I] \gg \frac{(2K_i'/K_i - 1) + BQ/K_{ib}}{(K_i'/K_i)^2} \text{ для случая 1,}$$

$$[I] \gg K_i'(1 + BQ/K_{ib})(1 + A/K_{ia});$$

$$[I] \gg \frac{(2K_i'/K_i - 1 + BQ/K_{ib})(1 + A/K_{ia})}{(K_i'/K_i)^2} \text{ для случая 2,}$$

выражение в фигурных скобках будет стремиться к постоянной величине, равной  $(K_i'/K_i)^2$ . Это означает, что кривая зависимости  $1/v$  от  $[I]$  при высоких  $[I]$  будет иметь приблизительно линейный участок с тангенсом угла наклона, равным

$$\text{для уравнения 1 } s = \frac{K_b}{2VB} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \frac{K_i'}{K_i^2}, \quad (3)$$

$$\text{для уравнения 2 } s = \frac{K_{ia}K_b}{2VAB} \cdot \frac{K_i'}{K_i^2}. \quad (4)$$

При очень низких концентрациях ингибитора, когда одновременно

$$[I] \ll K_i' \left(1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right);$$

$$[I] \ll K_i' \left(2K_i'/K_i - 1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right) / (K_i'/K_i)^2 \text{ (случай 1, уравнение 1)}$$

$$\text{или } [I] \ll K_i' \left(1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right) (1 + A/K_{ia});$$

$$[I] \ll K_i' \left(2K_i'/K_i - 1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right) (1 + A/K_{ia}) / (K_i'/K_i)^2 \text{ (случай 2, уравнение 2),}$$

начальные участки кривых в координатах  $1/v$  против  $[I]$  могут быть аппроксимированы прямыми с тангенсами углов наклона, приблизительно равными:

$$\text{для уравнения 1 } s = \frac{K_b}{2VB} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \frac{(2K_i'/K_i - 1) + \frac{B}{K_{ib}} Q}{\left(1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right) K_i'}, \quad (5)$$

$$\text{для уравнения 2 } s = \frac{K_{ia}K_b}{2VAB} \frac{(2K_i'/K_i - 1) + BQ/K_{ib}}{\left(1 + \frac{B}{K_{ib}} Q\right) K_i'}. \quad (6)$$

При  $K_i'/K_i \geq 1/2$  с ростом величины  $B$  от 0 до  $\infty$  наклоны начальных участков ( $s$ ), представленные уравнениями 5 и 6, будут монотонно убывать от  $\infty$  до 0. Напротив, при  $K_i'/K_i < 1/2$  с увеличением  $B$  от 0 до  $\infty$  величины наклонов возрастают от  $-\infty$  до 0, становятся положительными, проходя через максимум при  $K_{ib}/QB = \sqrt{2(K_i'/K_i - 1) / (2K_i'/K_i - 1) - 1}$ , а затем стремятся к 0.

При промежуточных концентрациях ингибитора кривая зависимости  $1/v$  от  $[I]$  представляет собой часть параболы, обращенной выпуклостью вниз или вверх. При этом, если  $K_i'/K_i \geq 1/2$ , с увеличением  $B$  переходная параболическая область кривой между двумя прямолинейными участками будет смещаться в область все более высоких концентраций ингибитора. Отношения тангенсов углов наклона прямолинейных участков при высоких

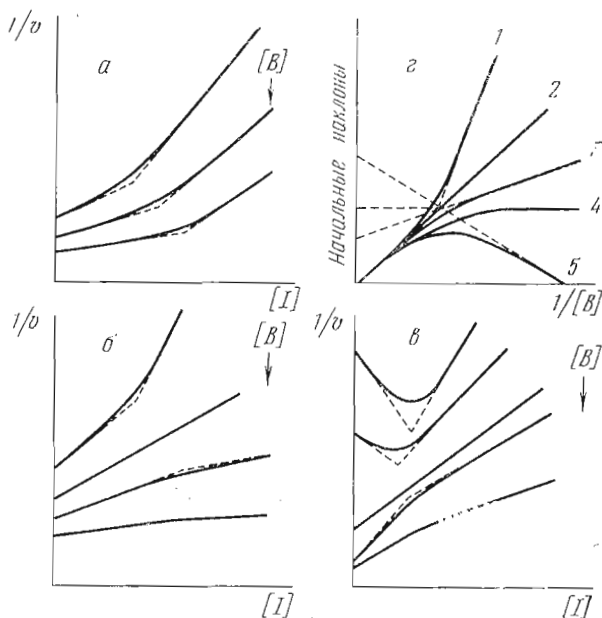


Рис. 1. Схематическое изображение различных случаев ингибирования креатинкиназы аналогами гуанидиновых субстратов, когда взаимодействие ингибитора ( $I$ ) и субстрата ( $B$ ) с ферментом носит кооперативный характер.  $a$  — случай антагонизма между ингибитором и субстратом,  $K_1'/K_1 > 1$ ;  $б$  — «слабый» синергизм во взаимодействии ингибитора и субстрата,  $1 > K_1'/K_1 \geq 1/2$ ;  $в$  — «сильный» синергизм между ингибитором и субстратом,  $K_1'/K_1 < 1/2$ ;  $г$  — зависимость начальных наклонов кривых, изображенных на рис.  $a - в$ , от  $1/B$ : 1 — антагонизм,  $K_1'/K_1 > 1$ ; 2 — отсутствие кооперативности,  $K_1'/K_1 = 1$ ; 3 — «слабый» синергизм,  $1 > K_1'/K_1 \geq 1/2$ ; 4 — «слабый» синергизм,  $K_1'/K_1 = 1/2$ ; 5 — «сильный» синергизм,  $K_1'/K_1 < 1/2$ .

концентрациях ингибитора к начальным наклонам при низких концентрациях ингибитора и фиксированной величине  $B$  в обоих случаях равны:

$$R = \left( \frac{K_1'}{K_1} \right)^2 \frac{1 + BQ/K_{ib}}{(2K_1'/K_1 - 1) + BQ/K_{ib}}. \quad (7)$$

Очевидно, что при  $R > 1$  кривая зависимости  $1/v$  от  $[I]$  изгибается вверх, при  $R < 1$  изгибается вниз и при  $R = 1$  представляет собой прямую.

Рассмотрим, как величина  $R$  и форма кривых зависят от соотношения констант  $K_1'/K_1$  и концентрации гуанидинового субстрата  $B$ .

1. Антагонизм между гуанидиновым субстратом и ингибитором,  $K_1'/K_1 > 1$ . В этом случае  $R > 1$  при любых значениях  $B$  ( $B > 0$ ) все кривые в координатах  $1/v$  против  $[I]$  изгибаются вверх (см. рис. 1а).

2. Синергизм между гуанидиновым субстратом и ингибитором. Возможны два случая: «слабый» синергизм,  $1 > K_1'/K_1 \geq 1/2$  и «сильный»,  $K_1'/K_1 < 1/2$ . а)  $1 > K_1'/K_1 \geq 1/2$ . При малых  $B$   $R > 1$ , кривые обращены выпуклостью вниз; напротив, при достаточно больших значениях  $B$   $R < 1$  и, следовательно, кривые обращены выпуклостью вверх. б)  $K_1'/K_1 < 1/2$ . При  $B \rightarrow 0$  величина  $R < 0$ , а тангенсы углов наклона начальных участков кривых ( $1/v$  против  $[I]$ ) становятся отрицательными и поэтому при увеличении концентрации ингибитора от нуля  $1/v$  уменьшается. Это означает, что в указанных условиях в малых концентрациях ингибитор действует как активатор. При дальнейшем увеличении концентрации ингибитора кривая пройдет через минимум и начнет подниматься вверх. Увеличение концентрации  $B$  при  $K_1'/K_1 < 1/2$  приводит к тому, что величина  $R$  уменьшается до  $-\infty$ , затем меняет знак на противоположный и от  $+\infty$  в пределе стремится к  $(K_1'/K_1)^2$ .

Таким образом, из приведенного анализа следует, что возможны три типа семейств кривых ингибирования в координатах  $1/v$  против  $[I]$  в зависимости от величины отношения  $K_i'/K_i$ . Названные случаи иллюстрируются рис. 1а-в.

Наклоны начальных участков приведенных на рис. 1а, б кривых, выражающиеся уравнениями 5 и 6, являются нелинейными функциями  $1/B$ :

$$s = \frac{1}{2VK_i'}(1 + K_{ia}/A) \frac{K_b}{B} \left[ 1 + \frac{(2K_i'/K_i - 1)K_{ib}}{QB} \right] \left/ \left( 1 + \frac{K_{ib}}{QB} \right) \right., \quad (8)$$

$$s = \frac{K_{ia}}{2VK_i'} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{K_b}{B} \left[ 1 + \frac{(2K_i'/K_i - 1)K_{ib}}{QB} \right] \left/ \left( 1 + \frac{K_{ib}}{QB} \right) \right.. \quad (9)$$

При малых значениях  $1/B$ , когда  $K_{ib}/QB \ll 1$ , вторичные зависимости  $s$  от  $1/B$  имеют начальные наклоны, равные соответственно:

$$\frac{K_b}{2K_i'V}(1 + K_{ia}/A) \text{ и } \frac{K_b K_{i\gamma}}{2K_i'V} \cdot \frac{1}{A}.$$

При больших значениях  $1/B$ , когда  $K_{ib}/QB \gg 1$ , кривые в координатах  $s$  от  $1/B$  имеют приблизительно линейные участки, выражающиеся уравнениями (10) и (11):

$$s = \frac{(1 + K_{ia}/A)}{2K_i'V} \left[ \frac{2(1 - K_i'/K_i)QK_b}{K_{ib}} + \frac{(2K_i'/K_i - 1)K_b}{B} \right], \quad (10)$$

$$s = \frac{K_{i\gamma}}{2K_i'V} \cdot \frac{1}{A} \left[ \frac{2(1 - K_i'/K_i)QK_b}{K_{ib}} + \frac{(2K_i'/K_i - 1)K_b}{B} \right]. \quad (11)$$

Очевидно, что наклоны этих прямолинейных участков и ординаты их пересечений с осью ординат, полученные экстраполяцией к  $1/B \rightarrow 0$ , соответственно равны:

$$ss = \frac{1 + K_{ia}/A}{2V} \cdot \frac{K_b}{K_i'} (2K_i'/K_i - 1); \quad is = \frac{(1 + K_{ia}/A)Q}{VK_i'K_{ib}} (1 - K_i'/K_i) K_b \quad \text{для (10),}$$

$$ss = \frac{K_{i\gamma}K_b}{2VK_i'} \cdot \frac{(2K_i'/K_i - 1)}{A}; \quad is = \frac{K_{i\gamma}(1 - K_i'/K_i)Q}{VK_i'K_{ib}} \cdot \frac{K_b}{A} \quad \text{для (11).}$$

Из сравнения выражений для наклонов линейных участков зависимостей  $s$  от  $1/B$  следует, что при  $K_i'/K_i > 1$  (антагонизм) названные кривые изгибаются вверх; при  $K_i'/K_i = 1$  (отсутствие кооперативности) кривые трансформируются в прямые, при  $1 > K_i'/K_i \geq 1/2$  кривые изгибаются вниз, но наклон их всегда положителен, и при  $K_i'/K_i < 1/2$  кривые имеют максимум и приблизительно линейный участок с отрицательным наклоном. Все указанные случаи схематично показаны на рис. 1г.

В то же время наклоны ( $s$ ) прямолинейных участков кривых в координатах  $1/v$  против  $[I]$  при больших значениях  $[I]$  ( $[I] \gg K_i'(1 + BQ/K_{ib})$ ;  $[I] \gg K_i'(2K_i'/K_i - 1 + BQ/K_{ib})/(K_i'/K_i)^2$  или  $[I] \gg K_i'(1 + BQ/K_{ib})(1 + A/K_{ia})$ ;  $[I] \gg K_i'(2K_i'/K_i - 1 + BQ/K_{ib})(1 + K_{ia}/A)/(K_i'/K_i)^2$ ) во всех случаях являются линейными функциями  $1/B$  (см. уравнения 3 и 4). Однако определенная из наклонов вторичных зависимостей  $s$  от  $1/B$  наблюдаемая величина константы ингибирования равна  $K_i K_i'/K_i'$  и, очевидно, может быть либо больше  $K_i$ , при  $K_i/K_i' > 1$  (синергизм), либо меньше  $K_i$ , при  $K_i/K_i' < 1$  (антагонизм).

Рассмотрим более сложный случай, когда ингибитор, конкурирующий одновременно с гуанидиновым и нуклеотидным субстратами, проявляет кооперативность по отношению не только к гуанидиновому, но и к нуклео-

тидному субстрату. В этой ситуации для описания взаимодействия ингибитора с ферментом необходимы величины 4 констант диссоциации ингибитора из комплекса с ферментом:  $K_1$  — для комплекса со свободным ферментом;  $K_{11}$  — для комплекса, содержащего связанный с другой субъединицей гуанидиновый субстрат;  $K_{12}$  — для комплекса фермента с нуклеотидным субстратом, связанным с другой субъединицей;  $K_{13}$  — для комплекса, содержащего связанные со второй субъединицей гуанидиновый и нуклеотидный субстраты одновременно. Выражение для обратной скорости запишется следующим образом (предполагая для простоты, что  $K_{ia} = K_a$ ,  $K_{ib} = K_b$ ):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{2V} \left(1 + \frac{K_a}{A}\right) \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) + \frac{I}{K_{13}} \frac{K_a K_b}{2VAB} \cdot \left\{ \begin{array}{l} 2 \left[ (K_{13}/K_i - 1) + \frac{A}{K_a} (K_{13}/K_{i2} - 1) + \frac{B}{K_b} (K_{13}/K_{i1} - 1) \right] + \\ + \frac{I}{K_{13}} (K_{13}^2/K_i^2 - 1) \end{array} \right\} \cdot \quad (12)$$

Анализ этого уравнения в общем виде достаточно сложен, поэтому рассмотрим более простой случай, представляющий практический интерес, когда  $K_1 = K_{11} = K_{12}$ . Заметим, что рассмотренный выше вариант (случай 2) с кооперативностью по отношению к гуанидиновому субстрату является частным случаем более общего уравнения 12 при  $K_1 = K_{11}$  и  $K_{12} = K_{13}$ .

Итак, допустим, что  $K_1 = K_{11} = K_{12}$ . Тогда уравнение 12 упрощается следующим образом:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{2V} \left(1 + \frac{K_a}{A}\right) \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) + \frac{1}{K_{13}} \cdot \frac{K_a K_b}{2VAB} \cdot \frac{(2K_{13}/K_i - 1) \left(1 + \frac{A}{K_a} + \frac{B}{K_b}\right) + \frac{AB}{K_a K_b} + \frac{I}{K_{13}} \left(\frac{K_{13}}{K_i}\right)^2}{(1 + A/K_a)(1 + B/K_b) + I/K_{13}} \quad (13)$$

При малых концентрациях ингибитора, когда одновременно

$$I/K_{13} \ll \left[ (2K_{13}/K_i - 1) \left(1 + \frac{A}{K_a} + \frac{B}{K_b}\right) + \frac{AB}{K_a K_b} \right] / (K_{13}/K_i)^2$$

и

$$I/K_{13} \ll (1 + B/K_b)(1 + A/K_a),$$

кривые ингибирования в координатах  $1/v$  против  $I$  будут иметь прямолинейные участки с наклонами, равными

$$s = \frac{K_a K_b (2K_{13}/K_i - 1)}{2VAB \cdot K_{13}} - \frac{K_{13}/K_i - 1}{VK_{13}(1 + A/K_a)(1 + B/K_b)} \quad (14)$$

При фиксированной концентрации второго субстрата зависимости  $s$  от  $1/B$  (или  $1/A$ ) будут представлять собой кривые, выходящие из начала координат, с двумя прямолинейными участками. Для высоких значений  $1/B$  ( $1/A$ ) прямолинейные участки будут иметь наклоны и экстраполироваться на ось ординат в точки с ординатами, равными

$$\text{для } s \text{ против } 1/B: ss = \frac{K_a K_b (2K_{13}/K_i - 1)}{2VK_{13}} \cdot \frac{1}{A}; \quad is = \frac{1 - K_{13}/K_i}{VK_{13}(1 + A/K_a)};$$

$$\text{для } s \text{ против } 1/A: ss = \frac{K_a K_b (2K_{13}/K_i - 1)}{2VK_{13}} \cdot \frac{1}{B}; \quad is = \frac{1 - K_{13}/K_i}{VK_{13}(1 + B/K_b)}.$$



При малых значениях  $1/B$  наклоны начальных участков кривых в координатах  $s$  от  $1/B$  равны

$$ss = \frac{K_a K_b}{AVK_{i3}} \left[ 1 + \frac{2(K_{i3}/K_i - 1)}{1 + A/K_a} \right]. \quad (15)$$

При  $A/K_a \ll 1$

$$ss = \frac{K_a K_b (2K_{i3}/K_i - 1)}{VK_{i3}} \cdot \frac{1}{A} + \frac{K_b}{VK_{i3}}, \quad (16)$$

а при  $A/K_a \gg 1$

$$ss = \frac{K_a K_b}{VK_{i3}} \cdot \frac{1}{A}. \quad (17)$$

Анализ различных случаев кооперативного взаимодействия ингибитора — аналога гуанидинового субстрата с креатинкиназой (табл. 1, для  $Q \approx 1$ ) показывает, что при синергическом взаимодействии ингибитора и субстратов и при малой концентрации одного из субстратов (больших значениях  $1/B$ ) конкурентное ингибирование может выглядеть по формальным признакам как неконкурентное. Так, например, прямолинейные участки зависимостей наклонов ( $s$ ) от  $1/B$  или  $1/A$  при больших значениях  $1/B$  или  $1/A$  соответственно не идут в начало координат, т. е.  $is \neq 0$ . При конкуренции ингибитора одновременно с гуанидиновым и нуклеотидным субстратом случай кооперативности между ингибитором и гуанидиновым субстратом (2а) симметричен по отношению к случаю кооперативности ингибитора и нуклеотидного субстрата (2б). Это означает, что для получения соответствующих выражений для наклонов и ординат пересечений в случае 2б достаточно заменить  $A$  на  $B$  и  $B$  на  $A$  в соотношениях для случая 2а (см. табл. 1).

## Результаты исследования и их обсуждение

1. Циклокреатин, фосфоциклокреатин и  $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионовая кислота как субстраты креатинкиназы. Зависимости обратной скорости прямой креатинкиназной реакции от обратной концентрации циклокреатина ( $cCr$ ) при разных концентрациях  $MgATP$  (рис. 2а) имеют вид пучка прямых, пересекающихся в левом верхнем квадранте, что может свидетельствовать о взаимозависимом связывании  $cCr$  и  $MgATP$  с ферментом. Абсцисса общей точки пересечения позволяет приблизительно оценить величину  $K_m$  для связывания  $cCr$  со свободным ферментом, которая составляет около 150 мМ. Представление ординат пересечений указанных прямых ( $1/v$  против  $1/[cCr]$ ) и их наклонов в виде зависимостей от  $1/[MgATP]$  (рис. 2б) позволяет более точно определить величины  $K_m$  для связывания  $cCr$  со свободным ферментом и его комплексом с  $MgATP$  (110 и 27 мМ соответственно).

Зависимости скорости обратной креатинкиназной реакции (фосфорилирование ADP) от концентрации фосфоциклокреатина при разных концентрациях  $MgADP$  в двойных обратных координатах представляют собой семейство прямых, пересекающихся в одной точке на оси абсцисс (рис. 3а), что предполагает независимое связывание обоих субстратов и позволяет определить величину  $K_m$  для  $PCr$  непосредственно из абсциссы общей точки пересечения, которая равна 4,5 мМ. Вторичные зависимости наклонов ( $s$ ) и ординат пересечений ( $i$ ) этих прямых от  $1/[MgADP]$  (рис. 3б) представляют собой две прямые, пересекающиеся в одной точке на оси абсцисс, обратная величина абсциссы которой дает значение  $K_m$  для  $MgADP$ . Максимальная скорость находится из этих же прямых по величине ординаты пересечения прямой зависимости  $i$  от  $1/[MgADP]$ , которая

Теоретические значения параметров уравнений для наклонов начальных линейных участков кривых в координатах  $1/v$  против  $[I]$  для разных случаев ингибирования креатинкиназы аналогами гуанидиновых субстратов

Случай	Вторичная зависимость наклонов ( $s$ ) прямых в координатах $1/v$ против $[I]$	Зависимость наклонов и пересечений с осью ординат прямоугольных участков кривых во вторичных координатах	Наклон	Ордината пересечения
1. Конкуренция ингибитора с гуанидиновым субстратом, когда связывание ингибитора зависит только от гуанидинового субстрата	$s$ против $1/B$ , при высоких значениях $1/B$ $s$ против $1/A$ , при высоких значениях $1/A$	$ss$ против $1/A$ $is$ против $1/A$ $ss$ против $1/B$ $is$ против $1/B$	$K_a K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$ $K_a K_b (1 - K_1/K_1) / VK_1'$ $K_a K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$ $K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$	$K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$ $K_b (1 - K_1/K_1) / VK_1'$ $K_a K_b (1 - K_1/K_1) / VK_1'$ $K_b (1 - K_1/K_1) / VK_1'$
2. Конкуренция ингибитора и с гуанидиновым, и с нуклеотидным субстратом, когда связывание ингибитора зависит только от гуанидинового (случай 2а) субстрата или только от нуклеотидного субстрата (случай 2б)	$s$ против $1/B$ ( $1/A$ ), при высоких значениях $1/B$ ( $1/A$ ) $s$ против $1/A$ ( $1/B$ ), при высоких значениях $1/A$ ( $1/B$ )	$ss$ против $1/A$ ( $1/B$ ) $is$ против $1/A$ ( $1/B$ ) $ss$ против $1/B$ ( $1/A$ ) $is$ против $1/B$ ( $1/A$ )	$K_a K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$ $K_a (1 - K_1/K_1) / VK_1'$ $K_a K_b (2K_1/K_1 - 1) / 2VK_1'$	0 $(1 - K_a/K_{ia}) / 2K_1'V$ , $A/K_a \ll 1$ 0, при $A/K_a \gg 1$ , или $K_a = K_{ia}$ $K_a (1 - K_1/K_1) / VK_1'$
3. Конкуренция ингибитора и с гуанидиновым, и с нуклеотидным субстратом, когда связывание ингибитора зависит только от обоих субстратов одновременно	$s$ против $1/B$ , при высоких значениях $1/B$ $s$ против $1/A$ , при высоких значениях $1/A$	$ss$ против $1/A$ $1/is$ против $A$ $ss$ против $1/B$ $1/is$ против $B$	0 $K_a K_b (2K_{13}/K_1 - 1) / 2VK_{13}$ $K_{13}V / K_a (1 - K_{13}/K_1)$ $K_a K_b (2K_{13}/K_1 - 1) / 2VK_{13}$ $K_{13}V / K_b (1 - K_{13}/K_1)$	0 $(1 - K_a/K_{ia}) / 2K_1'V$ , $A/K_a \ll 1$ и 0, при $A/K_a \gg 1$ , или $K_a = K_{ia}$ 0 $K_{13}V (1 - K_{13}/K_1)$ 0 $K_{13}V (1 - K_{13}/K_1)$

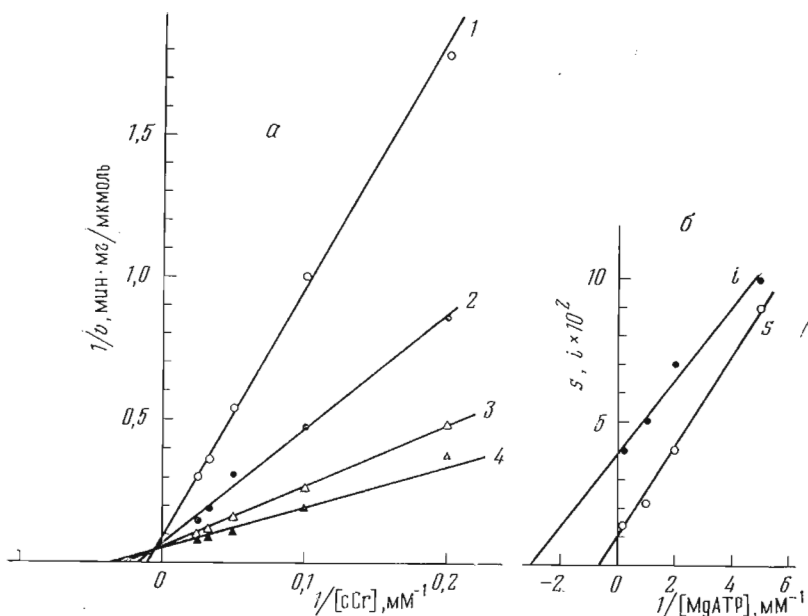


Рис. 2. Циклокреатин как субстрат прямой креатинкиназной реакции. *a* – зависимости обратной скорости реакции от обратной концентрации циклокреатина при следующих концентрациях MgATP (мМ): 1 – 0,2; 2 – 0,5; 3 – 1; 4 – 5. *b* – зависимости наклонов (*s*) прямых на рис. 2*a* и их пересечений с осью ординат (*i*) от  $1/[\text{MgATP}]$

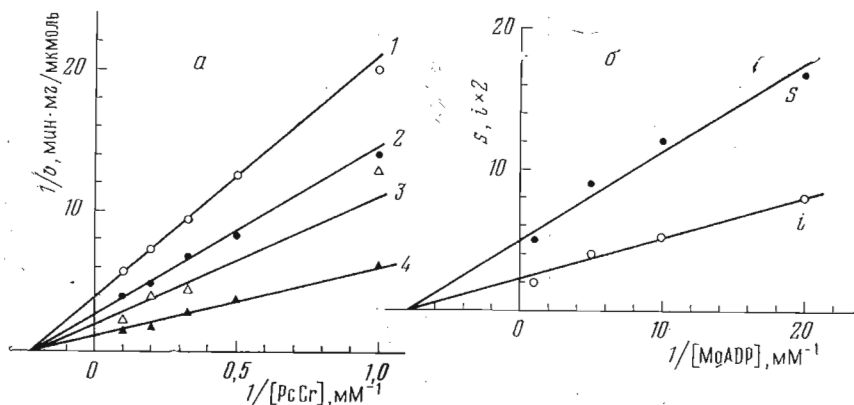


Рис. 3. Фосфоциклокреатин как субстрат обратной креатинкиназной реакции. *a* – зависимости  $1/v$  от  $1/[\text{PcCr}]$  при следующих концентрациях MgADP (мМ): 1 – 0,05; 2 – 0,1; 3 – 0,2; 4 – 1,0. *b* – наклоны (*s*) и пересечения (*i*) с осью ординат прямых на рис. 3*a* как функции  $1/[\text{MgADP}]$

составляет величину около 1 мкмоль/мин·мг, что примерно в 200 раз меньше максимальной скорости с фосфокреатином в условиях этих экспериментов.

*L*,  $\alpha$ -Амино- $\beta$ -гуанидинпропионовая кислота в отличие от циклокреатина совсем не фосфорилировалась в условиях наших экспериментов (рН 7,4; 30° С) даже при высоких концентрациях креатинкиназы (3 МЕ/мл) и АТР (5 мМ).

Для выяснения механизма взаимодействия субстратных аналогов с креатинкиназой целесообразно иметь информацию о конкуренции или ее отсутствии между аналогами и природными субстратами за место связывания с ферментом. В описанных ниже экспериментах исследовано ингибирующее действие фосфокреатина на прямую креатинкиназную реак-

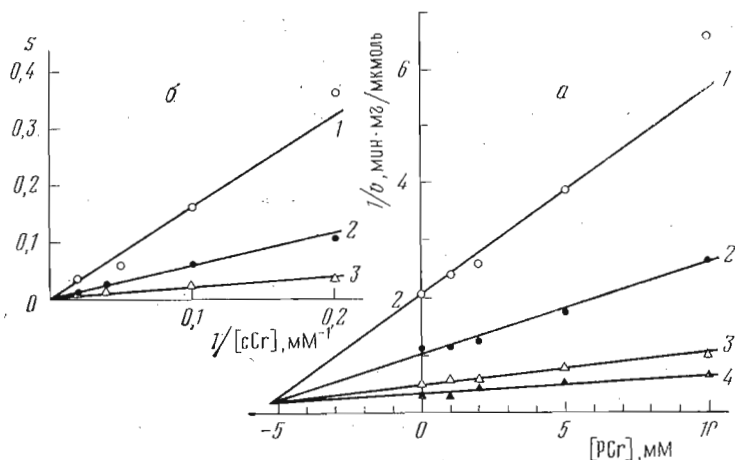


Рис. 4. Ингибирование фосфокреатином прямой креатинкиназной реакции с циклокреатином в качестве субстрата. *a* — зависимости обратной скорости от концентрации фосфокреатина при 0,3 мМ MgATP и следующих концентрациях циклокреатина (мМ): 1 — 5; 2 — 10; 3 — 20; 4 — 50. *б* — зависимости наклонов прямых на рис. 4*a* (*s*) от  $1/[cCr]$  при следующих концентрациях MgATP (мМ): 1 — 0,3; 2 — 1; 3 — 5

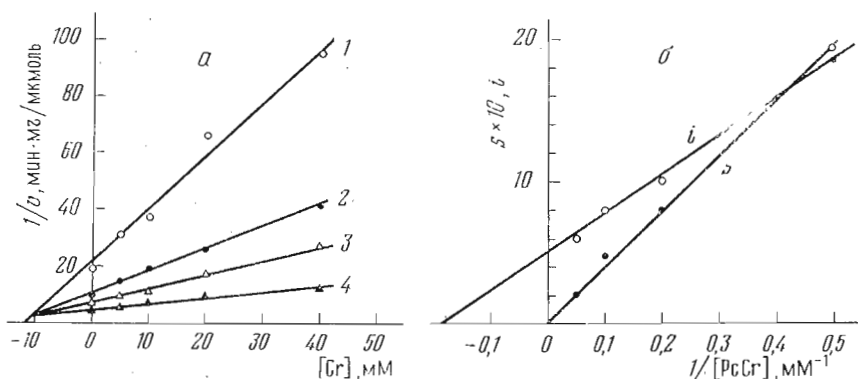


Рис. 5. Ингибирование креатином обратной креатинкиназной реакции с фосфоциклокреатином в качестве субстрата. *a* — зависимости обратной скорости от концентрации креатина при фиксированной концентрации MgADP (1 мМ) и разных концентрациях фосфоциклокреатина (мМ): 1 — 2; 2 — 5; 3 — 10; 4 — 20. *б* — вторичные зависимости наклонов и ординат пересечений прямых, изображенных на рис. 5*a*, от  $1/[PcCr]$

дию с циклокреатином в качестве субстрата и креатина на обратную реакцию, субстратом которой был фосфоциклокреатин.

Зависимости обратной скорости прямой креатинкиназной реакции (субстрат — циклокреатин) от концентрации ингибитора — фосфокреатина при разных концентрациях циклокреатина и фиксированной концентрации MgATP (0,3 мМ) (рис. 4*a*) имеют вид пучка прямых, пересекающихся примерно в одной общей точке в левом верхнем квадранте. Вторичные зависимости наклонов названных прямых от  $1/[cCr]$  при трех разных концентрациях MgATP представляют собой прямые, выходящие из начала координат, что свидетельствует о конкуренции между фосфокреатином и циклокреатином. Средняя величина константы ингибирования, вычисленная из этих данных, равна 4 мМ, что достаточно хорошо согласуется с величиной  $K_m$  для фосфокреатина в условиях наших экспериментов (2,5 мМ).

Аналогичная ситуация имеет место в случае ингибирования креатином обратной креатинкиназной реакции с фосфоциклокреатином в качестве

субстрата. И в этом случае пучок прямых в координатах  $1/v$  от  $[Cr]$  (рис. 5а) пересекается в одной точке над осью абсцисс, левее оси ординат. Абсцисса точки пересечения дает приблизительное значение  $K_1$  для креатина 7—8 мМ, достаточно близкое к величине  $K_m$  для креатина в этих условиях. Вторичная зависимость наклонов прямых в координатах  $1/v$  против  $[Cr]$  от  $1/[PcCr]$  (рис. 5б) имеет вид прямой, выходящей из начала координат. Это означает, что креатин и фосфоциклокреатин имеют общее место связывания с ферментом, причем присоединение любой из этих молекул к одной субъединице димера креатинкиназы не влияет на связывание другой молекулы со второй субъединицей.

2. *Ингибирование креатинкиназной реакции циклокреатином, фосфоциклокреатином и  $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионовой кислотой.* Было изучено ингибирующее действие циклокреатина на обратную креатинкиназную реакцию с фосфокреатином в качестве субстрата при разных концентрациях фосфокреатина и фиксированной концентрации MgADP (1 мМ). Ингибирование было конкурентным по отношению к фосфокреатину: прямые в координатах  $1/v$  против  $[cCr]$  пересекались в одной точке в левом верхнем квадранте (рисунок не приведен), а вторичная зависимость их наклонов от  $1/[PcCr]$  имела вид прямой, исходящей из начала координат. Величина константы ингибирования составляла 80 мМ, что хорошо согласуется с величиной  $K_m$  для взаимодействия циклокреатина со свободным ферментом, равной 110 мМ.

Ингибирующее действие фосфоциклокреатина исследовалось как на прямой реакции с креатином, так и на обратной реакции с фосфоциклокреатином, поскольку  $V$  для  $PcCr$  по крайней мере в 200 раз меньше, чем  $V$  для  $PcCr$ , а величины  $K_m$  близки. Иными словами, вкладом  $PcCr$  в общую скорость обратной реакции, определяемую по появлению АТР, можно пренебречь при не слишком высоких концентрациях  $PcCr$ . Действительно, специальный эксперимент, в котором скорость расщепления фосфокреатина и фосфоциклокреатина при их одновременном присутствии в среде определялась по появлению креатина и циклокреатина соответственно, показал, что даже при соотношении  $[PcCr]/[PcCr]$ , равном 20, скорость дефосфорилирования  $PcCr$  не превышала 10% от скорости превращения  $PcCr$ . Зависимость обратной величины скорости обратной креатинкиназной реакции от концентрации ингибитора — фосфоциклокреатина при разных концентрациях фосфокреатина (рис. 6а) показывает, что экспериментальные точки хорошо ложатся на прямые, имеющие общую точку пересечения над осью абсцисс и левее оси ординат. Вторичная зависимость наклонов этих прямых от  $1/[PcCr]$  представляет собой прямую, пересекающую начало координат, что указывает на конкурентный характер ингибирования  $PcCr$  по отношению к  $PcCr$  и на отсутствие взаимозависимости в связывании этих соединений с разными субъединицами димера фермента. Величина константы ингибирования для  $PcCr$ , найденная из приведенных данных, равна 4,5 мМ и практически совпадает со значением  $K_m$  для этого соединения, определенным в предыдущих экспериментах ( $\sim 4$  мМ).

Зависимости обратной величины скорости прямой креатинкиназной реакции (субстрат — креатин) от концентрации фосфоциклокреатина в среде при разных концентрациях MgATP и фиксированной концентрации креатина (9,6 мМ) представляют собой пучок прямых, пересекающихся с осью абсцисс далеко слева от начала координат (рис. 7а), давая очень высокие значения кажущихся величин  $K_1$  для  $PcCr$ , лежащие в диапазоне от 45 до 60 мМ, что превышает на порядок найденные ранее величины  $K_m$  и  $K_1$  для этого соединения (4,0—4,5 мМ). Вторичные зависимости наклонов этих прямых от  $1/[MgATP]$  при двух концентрациях креатина (4,8 и 9,6 мМ) имеют вид прямых, пересекающихся с осью ординат выше нуля (рис. 7б), что по формальным признакам свидетельствует о неконкурентном ингибировании фосфоциклокреатином по отношению к MgATP. Аналогичная ситуация имеет место для зависимости  $1/v$  от  $[PcCr]$  при разных

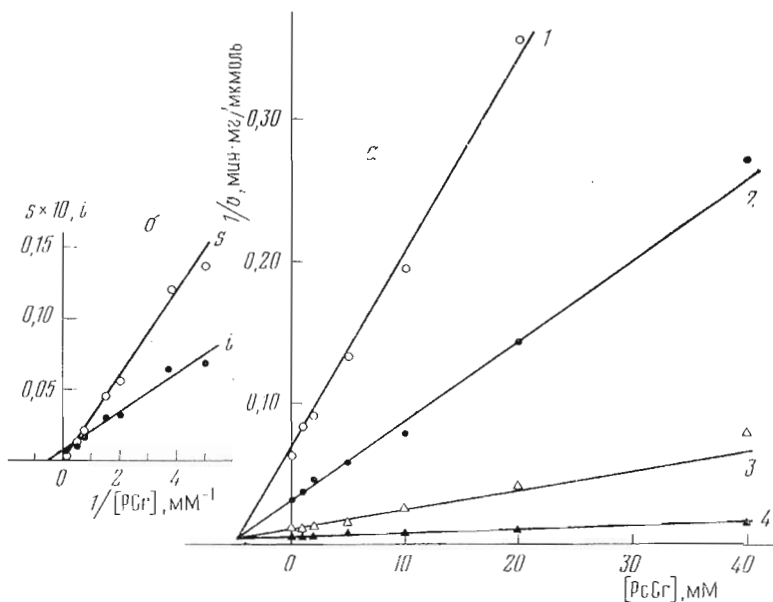


Рис. 6. Ингибирование обратной креатинкиназной реакции (субстрат – фосфокреатин) фосфодиклокреатином. *a* – семейство прямых в координатах  $1/v$  против  $[PCr]$  при следующих концентрациях фосфокреатина (мМ): 1 – 0,2; 2 – 0,5; 3 – 2; 4 – 10. *б* – вторичные зависимости наклонов и ординат пересечений прямых, изображенных на рис. 6а, от обратной концентрации фосфокреатина. Концентрация  $MgADP$  1 мМ

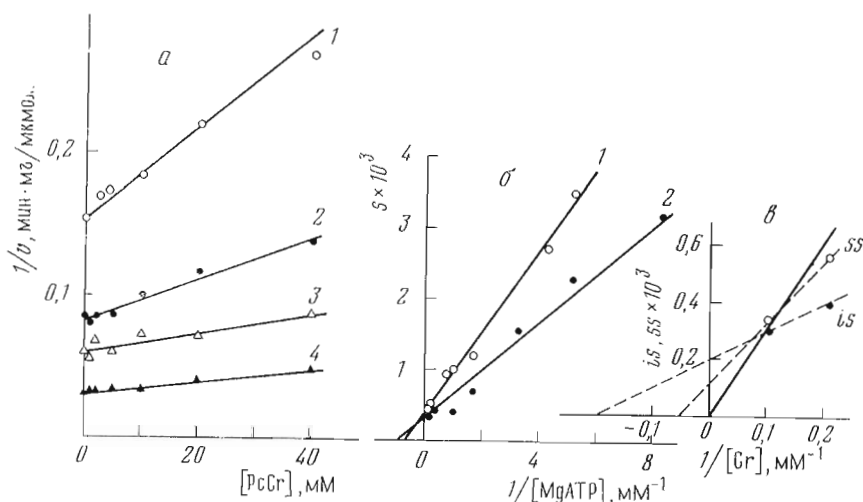


Рис. 7. Ингибирование прямой креатинкиназной реакции (субстрат – креатин) фосфодиклокреатином. *a* – семейство прямых в координатах  $1/v$  против  $[PCr]$  при фиксированной концентрации креатина (9,6 мМ) и концентрациях  $MgATP$  (мМ): 1 – 0,12; 2 – 0,3; 3 – 0,6; 4 – 3,0. *б* – вторичные зависимости наклонов ( $s$ ) прямых, изображенных на рис. 7а, от  $1/[MgATP]$  при следующих концентрациях креатина (мМ): 1 – 4,8; 2 – 9,6. *в* – зависимость наклонов и пересечений прямых в координатах  $s$  против  $1/[Cr]$  (рис. 7б) от  $1/[Cr]$

концентрациях креатина и фиксированной концентрации  $MgATP$  (рис. 8а). И в этом случае экспериментальные прямые в координатах  $1/v$  против  $[PCr]$  пересекаются с осью абсцисс далеко слева от начала координат, давая сильно завышенные значения  $K_1$ , равные 60–70 мМ (см. рис. 8а); вторичные зависимости наклонов этих прямых от  $1/[Cr]$  при разных концентрациях  $MgATP$  (рис. 8б) не экстраполируются в начало

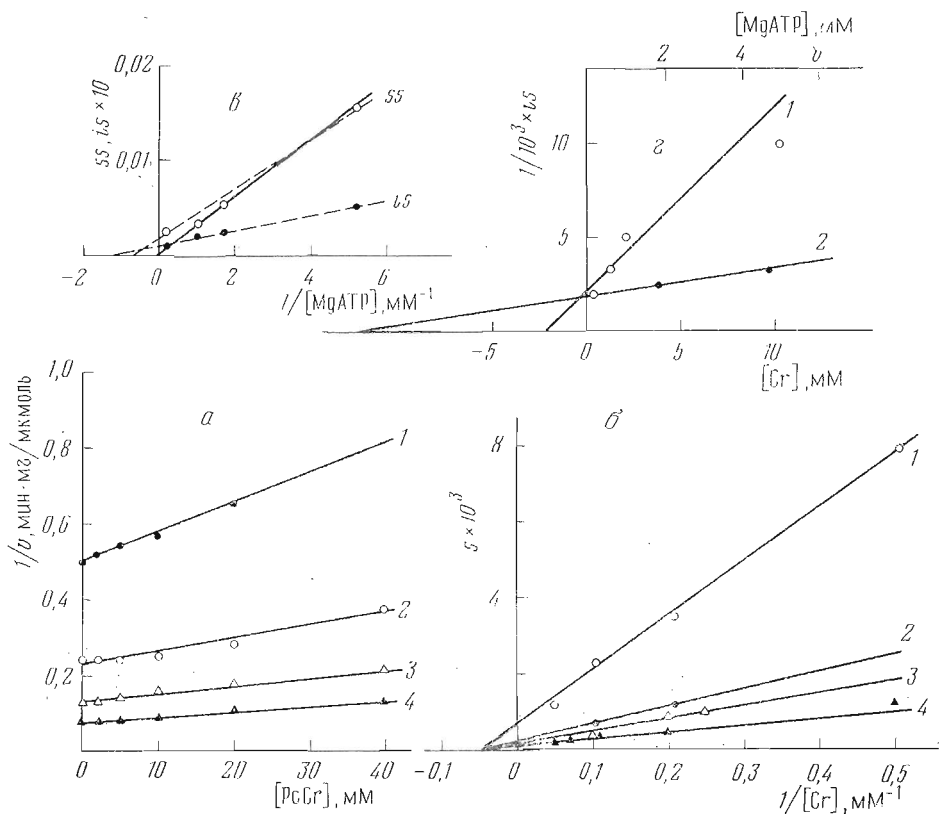


Рис. 8. Ингибирование прямой креатинкиназной реакции (субстрат — креатин) фосфоциклокреатином. *а* — семейство прямых в координатах  $1/v$  против  $[PcCr]$  при фиксированной концентрации  $MgATP$  (0,19 мМ) и разных концентрациях креатина (мМ): 1 — 2; 2 — 4,8; 3 — 9,6; 4 — 19. *б* — вторичные зависимости наклонов ( $s$ ) прямых в координатах  $1/v$  против  $[PcCr]$  (рис. 8а) от  $1/[Cr]$  при концентрациях  $MgATP$  (мМ): 1 — 0,19; 2 — 0,6; 3 — 1,0; 4 — 5,0. *в* — зависимость вторичных наклонов ( $ss$ ) и пересечений ( $is$ ) прямых в координатах  $s$  против  $1/[Cr]$  (рис. 8б) от  $1/[MgATP]$ . *г* — зависимость обратных величин вторичных пересечений ( $is$ ) с осью ординат прямых на рис. 8б и 7б соответственно от концентраций  $MgATP$  (1) и креатина (2)

координат, что формально означает отсутствие конкуренции между креатином и фосфоциклокреатином.

Таким образом, анализ ингибирующего действия  $PcCr$  на прямую креатинкиназную реакцию в рамках простой классической схемы (см. схему 1), предполагающей независимое связывание субстратов и ингибитора с разными субъединицами фермента, приводит к противоречиям. Во-первых, при любых значениях концентрации креатина и АТР, использованных в наших экспериментах, получаются сильно завышенные величины  $K_i$  для  $PcCr$  (45—70 мМ) по сравнению с теми, которые были найдены из данных по ингибированию обратной реакции ( $K_i=4,5$  мМ), а также с величиной  $K_m$  для  $PcCr$  (~4 мМ), когда он использовался как субстрат для обратной реакции. Во-вторых, в предыдущих экспериментах (см. рис. 5) было показано, что креатин является конкурентным ингибитором обратной креатинкиназной реакции по отношению к фосфоциклокреатину, в то время как  $PcCr$  не конкурирует с креатином при ингибировании прямой реакции  $PcCr$ . И наконец, в-третьих,  $PcCr$  должен конкурировать также и с АТР благодаря перекрыванию их концевых фосфатных групп, как это происходит в случае фосфокреатина и АТР [2, 16].

В связи со сказанным целесообразно рассмотреть данные по ингибированию прямой реакции фосфоциклокреатином в рамках более сложной

модели, предполагающей взаимозависимое связывание ингибитора и субстратов с разными субъединицами креатинкиназы (см. «Теоретическую часть» и схемы 2 и 3). В рамках этой модели возможны три разных случая, суммированных в табл. 1: 1) конкуренция ингибитора только с гуанидиновым субстратом; 2) конкуренция ингибитора и с гуанидиновым субстратом, и с MgATP, когда связывание ингибитора зависит или только от гуанидинового субстрата (*a*), или только от MgATP (*b*); 3) конкуренция ингибитора одновременно и с гуанидиновым субстратом (креатин), и с MgATP, причем ингибитор имеет другое сродство только к субъединице креатинкиназы, когда вторая субъединица образует тройной комплекс с креатином и MgATP. Как следует из теоретического анализа, в первом случае зависимость наклонов вторичных прямых (*s* против  $1/[Cr]$  и *s* против  $1/[ATP]$ ) от  $1/[ATP]$  и  $1/[Cr]$  соответственно должна представлять собой прямую, пересекающую ось ординат над началом координат; в последних двух случаях прямая этой зависимости от  $1/[ATP]$  должна выходить из начала координат (см. табл. 1). На рис. 7б и 8б представлены экспериментальные зависимости наклонов вторичных прямых и их пересечений с осью ординат от  $1/[MgATP]$  и  $1/[Cr]$ . Из этих рисунков следует, что через имеющиеся экспериментальные точки для наклонов могут быть проведены как прямые, идущие из начала координат, так и прямые, пересекающиеся с осью ординат выше нуля. По этой причине, для того чтобы сделать выбор между этими тремя вариантами, необходимо сопоставить численные значения получаемых наклонов и пересечений с осью ординат прямых в координатах *ss* и *is* против  $1/[Cr]$  и  $1/[MgATP]$ . В табл. 2 представлены величины наклонов и пересечений названных прямых для всех трех случаев при  $Q \approx 1$ . Из этой таблицы следует, что между экспериментальными значениями коэффициентов, найденных при двух разных последовательностях представления и обработки экспериментальных данных, наблюдается хорошее соответствие. Согласно теории (см. табл. 1), если имеет место случай 1, кинетические константы связаны между собой соотношениями

$$s_{ss} = \frac{K_a K_b (2K'_i/K_i - 1)}{2VK'_i} = 2,5 \cdot 10^{-3}, \quad i_{ss} = \frac{K_b (2K'_i/K_i - 1)}{2VK'_i} = 1,2 \cdot 10^{-3},$$

$$s_{is} = \frac{K_a K_b (1 - K'_i/K_i)}{VK'_i} = 1 \cdot 10^{-4}, \quad i_{is} = \frac{K_b (1 - K'_i/K_i)}{VK'_i} = 1,5 \cdot 10^{-4}.$$

Учитывая, что  $K_a = 1$  мМ,  $K_b \approx 10$  мМ,  $V = 100$  мкмоль/мин·мг и  $K_i = 4,5$  мМ, можно показать, что первая пара уравнений несовместна со второй парой. Для того чтобы эти уравнения стали совместными, значения численных коэффициентов для первой пары должны быть в 5—10 раз больше ( $\sim 12 \cdot 10^{-3}$ ) или же значения коэффициентов для второй пары уравнений на два порядка больше имеющихся ( $\sim 10^{-2}$ ). Иными словами, наблюдающиеся расхождения между численными значениями коэффициентов не могут быть объяснены экспериментальными ошибками.

Во втором случае (2а) кинетические константы выражаются через экспериментально найденные коэффициенты следующим образом:

$$s_{ss} = \frac{K_a K_b (2K'_i/K_i - 1)}{2VK'_i} = 2,6 \cdot 10^{-3}, \quad s_{is} = \frac{K_a (1 - K'_i/K_i)}{VK'_i} = 1 \cdot 10^{-3},$$

$$i_{is} = (1 - K_a/K_{ia})/2K'_i V = 1,5 \cdot 10^{-4}.$$

Из первых двух уравнений следует, что  $K'_i = 0,53 \cdot K_i = 2,4$  мМ. В то же время из последнего уравнения вытекает, что  $K_a/K_{ia} = 0,94$ , что не противоречит ранее определенному отношению этих констант, приблизительно равному 1, вследствие независимого связывания MgATP и креатина с молекулой мономера креатинкиназы в условиях наших экспериментов.



Численные значения параметров кривых ингибирования ( $1/v$  против  $[I]$ ), полученные при графической обработке экспериментальных данных

Функция	Случай	Переменная			
		$1/[MgATP]$		$1/[Cr]$	
		наклон	ордината пересечения	наклон	ордината пересечения
Вторичные наклоны ( $s_s$ ), полученные из зависимостей первичных наклонов, от $1/[Cr]$ или $1/[MgATP]$ соответственно	1	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
	2а	$3 \cdot 10^{-3}$	0	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
	2б	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	0
	3	$3 \cdot 10^{-3}$	0	$3 \cdot 10^{-3}$	0
Пересечения с осью ординат ( $i_s$ ) прямых первичных наклонов, полученных из зависимостей $1/v$ против $[I]$ , от $1/[Cr]$ или $1/[MgATP]$ соответственно	1	$0,88 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
	2а	$0,88 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
	2б	0	$2 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Для случая 2б численные коэффициенты выражаются через кинетические константы следующим образом:

$$s_{ss} = \frac{K_a K_b (2K'_i/K_i - 1)}{2K'_i V} = 2,9 \cdot 10^{-3}; \quad i_{ss} = \frac{K_a (1 - K'_i/K_i)}{2K'_i V} = 1,2 \cdot 10^{-3};$$

$$(1 - K_a/K_{ia})/2K'_i V = 2 \cdot 10^{-4}.$$

Эти соотношения практически не отличаются от тех, которые были получены в предыдущем случае (2а), и дают близкие значения констант:  $K'_i = 3,0$  мМ и  $K_a/K_{ia} = 0,88$ .

В третьем случае величина  $s_{ss}$  и выражение для нее практически не изменяется ( $s_{ss} = 3 \cdot 10^{-3}$ ), однако  $i_s$  не является линейной функцией  $1/[MgATP]$ . Зависимости  $1/i_s$  от  $1/[MgATP]$  и  $1/[Cr]$  должны быть прямыми линиями, пересекающимися в одной точке на оси ординат. Как следует из рис. 8а, экспериментальные зависимости  $1/i_s$  от  $1/[MgATP]$  и от  $1/[Cr]$  действительно аппроксимируются прямыми, имеющими общую точку пересечения на оси ординат. Из пересечений этих прямых с осью абсцисс и ординаты общей точки пересечения определяются следующие величины:

$$K_a = 0,5 \text{ мМ}, \quad K_b = 10 \text{ мМ} \quad \text{и} \quad i = \frac{K'_i V}{1 - K'_i/K_i} = 1600. \text{ Значения величин } K_a \text{ и}$$

$K_b$  близки к тем, которые находились ранее из других экспериментов. Величина  $K'_i$ , найденная из последнего выражения ( $i$ ), равна 3,4 мМ, что не очень хорошо согласуется со значением  $K'_i$ , определенным из величин  $s_{ss}$  и  $i_{ss}$  (случай 2а и 2б), так как подстановка  $K'_i = 2,5-3,0$  мМ в выражение для  $i$  дает величину  $i = 500-900$ , которая существенно меньше, чем экспериментально определяемое значение ( $i \approx 1600$ ).

Таким образом, из приведенного анализа следует, что с экспериментом хорошо согласуются модели, предполагающие конкуренцию фосфоциклокreatина и с креатином, и с MgATP, причем ингибитор связывается синергически по отношению либо к MgATP, либо к креатину, либо к тройному комплексу MgATP — фермент — креатин, а константа ингибирования  $K_i$  равна 2,5—3,0 мМ. Все перечисленные случаи синергизма не удастся различить на основании только данных по ингибированию прямой реакции фосфоциклокreatином.

$L, \alpha$ -Амино- $\beta$ -гуанидинпропионовая кислота (AGPA) ингибировала прямую креатинкиназную реакцию конкурентно по отношению к креатину, поскольку экспериментальные прямые зависимостей  $1/v$  против

[AGPA] пересекались в одной точке в левом верхнем квадранте (рисунок не приведен), а вторичная зависимость наклонов этих прямых от  $1/[Cr]$  представляла собой прямую, выходящую из начала координат. Величина константы ингибирования, найденная из этих данных, была равна 30 мМ.

Сравнивая кинетические характеристики циклокреатина, фосфоциклокреатина и *L*, $\alpha$ -амино- $\beta$ -гуанидинпропионовой кислоты, полученные в настоящей работе (табл. 3), можно видеть, что наилучшим субстратом является циклокреатин, фосфорилирование которого в прямой креатинкиназной реакции характеризуется всего лишь вдвое меньшей максимальной скоростью (45%) и величинами  $K_m$  110 и 27 мМ для свободного фермента и комплекса фермента с MgATP соответственно. Последняя величина находится в хорошем согласии со значением  $K_m$ , определенным при высокой фиксированной концентрации АТР, — 25 мМ [10]. Фосфоциклокреатин в отличие от циклокреатина имеет приблизительно в 200 раз меньшую максимальную скорость в обратной креатинкиназной реакции, чем фосфокреатин, однако величины  $K_m$  для этих двух фосфорилированных соединений близки в условиях наших экспериментов (см. табл. 3). Согласно литературным данным,  $V$  для фосфоциклокреатина составляет 0,6% от  $V$  для фосфокреатина, а  $K_m$  равно 3,7 мМ [14], что хорошо согласуется с нашими данными.  $sCr$  и  $PcCr$  связываются, по-видимому, с тем же участком фермента, что и природные субстраты — креатин и фосфокреатин. Об этом, во-первых, свидетельствует конкурентное ингибирование креатинкиназной реакции  $sCr$  и  $PcCr$ , когда в качестве субстратов использовались  $PcCr$  и  $sCr$ . Во-вторых, сами аналоги были конкурентными ингибиторами креатинкиназной реакции:  $sCr$  и  $PcCr$  по отношению к фосфокреатину в обратной реакции, причем константы ингибирования для этих соединений были близки к величинам  $K_m$  для них (см. табл. 3).

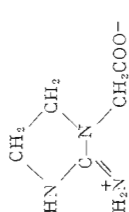
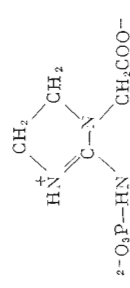
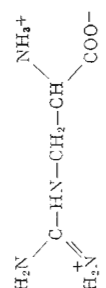
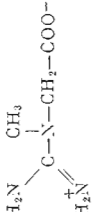
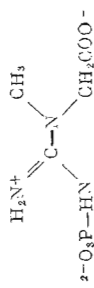
В особом рассмотрении нуждаются данные по ингибированию  $PcCr$  прямой креатинкиназной реакции с креатином в качестве субстрата. В последнем случае анализ результатов в рамках простой кинетической модели, допускающей независимое связывание ингибитора и субстратов с разными субъединицами димера креатинкиназы, приводил к противоречиям. Во-первых, найденные из этих данных кажущиеся константы ингибирования для  $PcCr$  были на порядок выше, чем определенные ранее величины  $K_m$  и  $K_i$  (около 4 мМ) для этого соединения. Во-вторых, по формальным признакам ингибирование было неконкурентным по отношению к креатину, а креатин, как это следует из предшествующего изложения, был конкурентным ингибитором по отношению к  $PcCr$  в обратной реакции.

Анализ этих результатов в рамках более сложной модели, предполагающей взаимозависимое связывание ингибитора, с одной стороны, и субстратов — с другой, с разными субъединицами димера креатинкиназы (см. «Теоретическую часть») приводил к следующим выводам: 1) ингибирование прямой реакции  $PcCr$  конкурентно по отношению к креатину и MgATP; 2) при этом ингибитор ( $PcCr$ ) синергически взаимодействует либо с креатином, либо с MgATP, либо одновременно с креатином и MgATP таким образом, что связывание  $PcCr$  со свободной субъединицей димера улучшалось в 1,5—2,0 раза.

Однако при ингибировании  $sCr$  обратной креатинкиназной реакции с  $PcCr$  в качестве субстрата не наблюдалось синергизма, так как константа ингибирования была близка к величине  $K_m$  для  $sCr$ , а зависимость начальных наклонов прямых в координатах  $1/v$  против  $[Cr]$  от  $1/[PcCr]$  представляла собой прямую, выходящую из начала координат. По этой причине, скорее всего,  $PcCr$  проявляет синергизм либо к MgATP, либо к тройному комплексу  $sCr$  — фермент — MgATP, образованному с одной из субъединиц креатинкиназы. В этой связи необходимо заметить, что упомянутый тройной комплекс или переходное состояние, возникающее из него, проявляют пониженную чувствительность к действующим SH-реактивам, блокирующих существенные для катализа SH-группы креатинкиназы [18].

Таблица 3

## Кинетические характеристики аналогов гуанидиновых субстратов

Название соединения	Формула	$K_1$ по прямой реакции, мМ	$K_1$ по обратной реакции, мМ	$K_m$ , мМ	$V$ , мкмоль/мин·мг	$V$ , % по отношению к $V$ с однородным субстратом
1. Циклокреатин (1-карбоксиметил-2-иминодиазолдин)		---	80	110 (E·сCr) 27 АТР·Е·сCr	27	45
2. Фосфоциклокреатин (1-карбоксиметил-2-имино-3-фосфоиминодиазолдин)		$K_1 = 4,5$ $K_1' = 2,5-3,0$	4,5	4,0	1,0	0,56
3. L, α-Амино-β-гуанидинпропионовая кислота		30	Не опред.	Не является субстр.	---	---
4. Креатин (N-метил-N-амилиноглицин)		---	8	11	60	100
5. Фосфокреатин		4,0	---	2,1	180	100

Иными словами, фермент в указанных условиях, по-видимому, претерпевает существенные конформационные изменения, которые могут сопровождаться не только изменением реакционной способности тиоловых групп фермента, но, вероятно, и изменениями в связывании фосфоциклокреатина. Следовательно, наблюдаемый синергизм в ингибирующем действии фосфоциклокреатина на прямую креатинкиназную реакцию может быть объяснен также взаимодействием ингибитора с переходным состоянием фермента. К сожалению, не удастся оценить долю фермента, находящегося в переходном состоянии, на основании имеющихся кинетических данных и оценить возможное влияние этого состояния на взаимодействие с  $PcCr$ .

Синергическое взаимодействие фосфоциклокреатина с креатинкиназой предполагает наличие взаимодействия между субъединицами димера фермента. Такого рода взаимодействие наблюдали ранее при модификаций SH-групп креатинкиназы флуоресцентными SH-реагентами [19]. В этом случае модификация одной тиоловой группы субъединицы димера фермента сопровождалась уменьшением реакционной способности SH-группы второй субъединицы по отношению к этому реагенту [19].

Константа равновесия (рН 7,4; 30° С) для реакции фосфорилирования циклокреатина, вычисленная с помощью соотношения Холдейна на основании наших кинетических данных, равна 4,1. Та же величина для природного субстрата — креатина, найденная тем же способом, составляет 112, а отношение констант равновесия равно 27,5. Последняя величина хорошо согласуется с величиной (26), полученной Аннесли и Уолкер [14] прямым измерением равновесных концентраций реагирующих веществ в системе, содержавшей креатин, фосфокреатин, циклокреатин, фосфоциклокреатин и каталитические количества АТР.

### Экспериментальная часть

*Измерение скоростей прямой и обратной креатинкиназной реакции.* Измерения выполняли в двух типах буферных систем: а) 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мМ КСI и 6 мМ ацетат Mg; б) 50 мМ HEPES — КОН (рН 7,4), 10 мМ ацетат Mg. В случае прямой креатинкиназной реакции среда измерения содержала также 1 мМ фосфоенолират, 1,6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,16 мМ NADH, 2 МЕ/мл пируваткиназы, 2 МЕ/мл лактатдегидрогеназы, 0,01—0,1 МЕ/мл креатинкиназы, 0,33 мМ дитиотреит, АТР, креатин, циклокреатин и другие добавки в концентрациях, указанных в подписях к рисункам. При измерении скорости обратной реакции среда содержала 1,6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,5 мМ NADP, 20 мМ глюкозу, 0,33 мМ дитиотреит, 2 МЕ/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2 МЕ/мл гексокиназы, 0,01—0,1 МЕ/мл креатинкиназы, ADP, фосфокреатин, фосфоциклокреатин и другие добавки в концентрациях, указанных в подписях к рисункам. За реакцией следили по убыли или возрастанию оптической плотности при 340 нм и температуре 30° С.

*Синтез циклокреатина и фосфоциклокреатина.* Циклокреатин синтезировали по методу, описанному в работе [11], с некоторыми модификациями. Выход составлял около 20% от теоретического. Полученный продукт перекристаллизовывали из воды. Перекристаллизованный препарат давал цветную реакцию с реагентом на циклокреатин (смесь  $Na_2[Fe(CN)_5NO]$  и  $K_3[Fe(CN)_6]$ ) [11], причем коэффициент экстинкции продукта реакции был равен  $5,0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Согласно литературным данным, эта величина составляет  $4,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [11]. Очищенный циклокреатин фосфорилировался АТР в прямой креатинкиназной реакции с  $K_m$  и  $V$  (см. «Результаты исследования и их обсуждение»), близкими к литературным данным [10, 11].

Фосфоциклокреатин синтезировали так же, как и в работе [14], в виде дилитиевой соли, а затем перекристаллизовывали из воды. После пе-

рекристаллизации выход составлял 23% от теоретического. Только что полученный препарат практически не содержал примесей циклокреатина, после хранения в течение нескольких месяцев при  $-15^{\circ}\text{C}$  содержание циклокреатина увеличилось до 5 мол.%. После гидролиза 0,2 н. HCl при  $70^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин гидролизат содержал от 75 до 84% циклокреатина и эквимольные количества ортофосфата, т. е. минимальное содержание фосфоциклокреатина в синтезированном препарате составляло 75–84%. Полученный фосфоциклокреатин дефосфорилировался в обратной креатинкиназной реакции с  $V$  и  $K_m$  (см. «Результаты исследования и их обсуждение»), близкими к полученным в работе [14]. В экспериментах с креатинкиназой применяли фосфоциклокреатин в виде динатриевой соли. Для этой цели к 300 мМ раствору дилитиевой соли добавляли рассчитанное количество твердого  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  при  $0^{\circ}\text{C}$ . Осадок  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  удаляли фильтрованием, а полученный раствор после доведения pH до 7,0–8,0 использовали непосредственно в опытах.

**Определение концентраций.** Концентрацию креатина определяли по методу Эгглтона [20], циклокреатина — как в работе [11], неорганический фосфат — по модифицированному методу Лоури — Лопеца [21]. Концентрацию фосфоциклокреатина измеряли, регистрируя количество циклокреатина, освобождающееся при гидролизе образца в 0,2 н. HCl при  $70^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Растворы АТР, АДР и фосфокреатина калибровали энзиматическим методом [22], как описано ранее [3].

В работе использовались АТР, АДР, АМР, NADP, NADH, фосфоенолпируват, фосфокреатин, креатин, дитиотреит, бычий сывороточный альбумин, трис, НЕРЕС, креатинкиназа, пируваткиназа, гексокиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Sigma или Calbiochem, США), лактатдегидрогеназа (Reanal, Венгрия). Соли, кислоты и щелочи, применявшиеся в экспериментах, имели квалификацию не ниже х.ч. Спектрофотометрические измерения выполняли на спектрофотометрах Aminco DW-2 UV/VIS (США) и Perkin-Elmer, модель 402 (США).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Saks V. A., Rosenshtaukh L. V., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1978) *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, **56**, 691–706.
2. Saks V. A., Chernousova G. B., Gukovsky D. E., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **57**, 273–290.
3. Куприянов В. В., Сеппет Э. К., Сакс В. А. (1978) *Бюохимия*, **43**, 1468–1477.
4. Saks V. A., Chernousova G. B., Vetter R., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1976) *FEBS Lett.*, **62**, 293–296.
5. Левицкий Д. О., Левченко Т. С., Сакс В. А., Шаров В. Г., Смирнов В. Н. (1977) *Бюохимия*, **42**, 1766–1773.
6. Saks V. A., Lipina N. V., Sharov V. G., Smirnov V. N., Chazov E. I., Grosse R. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **465**, 550–558.
7. Ennor A. H., Rosenberg H., Armstrong M. D. (1955) *Nature*, **175**, 120.
8. Tanzer M. L., Gilvarg C. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 3201–3204.
9. Rowley G. L., Greenleaf A. L., Kenyon G. L. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 5542–5551.
10. McLaughlin A. C., Cohn M., Kenyon G. L. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4382–4388.
11. Griffiths G. R., Walker J. B. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2049–2054.
12. Fitch C. D., Jellinek M., Mueller E. J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1060–1063.
13. Gercken G., Döring V. (1974) *FEBS Lett.*, **46**, 87–91.
14. Annesley T. M., Walker J. B. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **74**, 185–190.
15. Annesley T. M., Walker J. B. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8120–8125.
16. Morrison J. F., Cleland W. W. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 673–683.
17. Morrison J. F., James E. (1965) *Biochem. J.*, **97**, 37–52.
18. Milner-White E. J., Kelly I. D. (1976) *Biochem. J.*, **157**, 23–32.
19. Price N. C., Hunter M. G. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **445**, 364–376.
20. Eggleton P., Elsdon S. R., Caugh N. (1943) *Biochem. J.*, **37**, 526–529.
21. Скулачев В. Н. (1962) Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, Изд-во АН СССР, М.
22. Bergmeyer H. U. (1963) in: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H. U., ed.), p. 266–270, Acad. Press, N. Y.

Поступила в редакцию  
4.V.1979

## THE KINETICS OF THE INTERACTION OF ANALOGS OF GUANIDINE SUBSTRATES WITH MUSCLE CREATINE KINASE

KUPRIYANOV V. V., PANASENKO N. A., SAKS V. A.

*Laboratory of Cardiac Metabolism, All-Union Research Center  
for Cardiology, Moscow*

The guanidine analogs of the creatine kinase (E. C. 2. 7. 3. 2) substrates, i. e. cyclocreatine (cCr), phosphocyclocreatine (PcCr) and *L*,  $\alpha$ -amino- $\beta$ -guanidine propionic acid (AGPA), have been tested for substrate or inhibitory activity in the creatine kinase reaction (30° C, pH 7.4). The kinetic studies showed that cCr was phosphorylated by ATP in the forward reaction, whereby the maximal rate (*V*) value constituted 45% of that for creatine (Cr), and *K<sub>m</sub>* was equal to 110 mM for the binary complex E·cCr and 27 mM for the MgATP·C·cCr ternary complex. PcCr was a substrate in the reverse creatine kinase reaction, *K<sub>m</sub>* being 4 mM and *V* 0.5% of the value for phosphocreatine (PCr). No detectable phosphorylation was observed for AGPA. cCr, PcCr and AGPA proved the creatine kinase inhibitors competitive towards Cr and PCr, the *K<sub>i</sub>* being 80; 4.5 mM (reverse reaction) and 30 mM (forward reaction), respectively. In the forward reaction PcCr manifested the inhibition of a complicated character, apparently due to a synergism between PcCr on the one hand and ATP, alone or with Cr, on the other hand due to interrelated binding of these substances to the different subunits of the creatine kinase dimer.

---