

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.3

КІНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ДІЇ ОБОРОТНИХ ЕФЕКТОРІВ (ІНГІБІТОРІВ ТА АКТИВАТОРІВ) НА ФЕРМЕНТАТИВНУ (ТРАНСПОРТНУ) АКТИВНІСТЬ БІЛКІВ

С. О. КОСТЕРІН¹, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ², П. О. БОРИСКО², М. С. МІРОШНИЧЕНКО²

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

На основі аналізу кінетических закономірностей діяння обратимих ефекторів (інгібіторів і активаторів) на каталитическую (транспортную) активність белков предложено метод расчета важнейших параметров двухстадийного ферментативного или транспортного процесса — коэффициентов модификации α и β (характеризуют механизм действия эффектора), а также констант ингибирования K_i или активации K_a (характеризуют сродство эффектора к белку). В основе метода лежит титрование ферментативного (транспортного) белка субстратом при отсутствии и в присутствии эффектора, взятого в одной из концентраций, а также определение (при фиксированной концентрации субстрата) коэффициента ингибирования $i_{0,5}$ (в случае действия ингибитора) или коэффициента активации $a_{0,5}$ (в случае действия активатора). Практическое использование метода продемонстрировано на примере обратимого ингибирования эозином $Y(2',4',5',7'$ -тетрабромифлуоресцеином) реакции ферментативного гидролиза АТФ, катализируемой высокоочищенной транспортной Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азой, выделенной из сарколеммы гладкой мышцы. В этом случае ингибиторный эффект характеризуется такими параметрами: $\alpha = 6-8 > 1$; $\beta = 0,50-0,53 < 1$; константа ингибирования $K_i = 10^{-9}-10^{-8}$ М. Следовательно, судя по значениям α и β , в основе действия эозина Y на анализируемую Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимую АТФ-гидролазную ферментативную реакцию лежит механизм смешанного ингибирования (имеет место торможение обеих стадий ферментативного превращения — связывания субстрата с ферментом и распада «комплекса Михаэлиса» в направлении образования продуктов реакции), а сам ингибитор, в соответствии со значением K_i , характеризуется весьма высоким сродством к Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азе. Предполагается, что предложенный подход может быть полезен при идентификации типа действия обратимого эффектора на ферментативную (транспортную) активність белков, оценке реального сродства ингибиторов и активаторов к ним.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ферменты, обратимые эффекторы, коэффициенты модификации, константа ингибирования (активации), коэффициент ингибирования (активации).

О оборотні ефектори — інгібітори та активатори дуже широко використовуються в біохімічних та біофізичних дослідженнях, спрямованих на вивчення метаболічних перетворень, механізмів ферментативного каталізу, мембранного транспортування речовин і т. ін. Тому велике значення має дослідження кінетичних закономірностей дії оборотних ефекторів на функціональну (каталітичну, транспортну) активність білків. Цьому питанню присвячена значна кількість статей, монографій та підручників із біохімічної кінетики, наприклад [1–6]). Зазначимо, що задача, яка виникає при вивченні впливу оборотного ефектора E (інгібітора I або акти-

ватора A) на ферментативну чи транспортну активність білків, складається, як мінімум, із двох частин. По-перше, йдеться про з'ясування механізму дії цього ефектора, що безпосередньо пов'язано із кількісним визначенням так званих коефіцієнтів модифікації α та β (див. [4,5], а також нижче). Дійсно, знаючи величини цих коефіцієнтів можна дати тлумачення механізму дії оборотного ефектора (ідентифікація різних часткових випадків інгібування та активації). По-друге, важливим є обчислення ефекторної константи K_e (у випадку дії оборотного інгібітора I — константи інгібування K_i , а у випадку дії оборотного активатора A — константи активації K_a). Адже

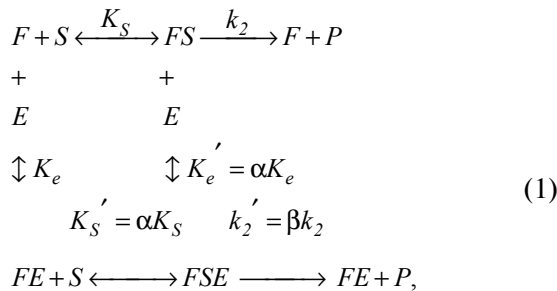
саме ця константа є кількісною мірою дуже важливої характеристики – спорідненості ефектора до ферментативного чи транспортного білка.

Загальновідомою є методологія визначення кінетичних параметрів α , β та K_e (K_i , K_a), що була запропонована у 1971 р. І. В. Березіним та К. Мартинеком і яка ґрунтується, у разі ферментативного каталізу, на вивченні залежності уявних максимальної швидкості $\langle V_{0,max} \rangle$ та константи Міхаеліса $\langle K_M \rangle$ ферментативної реакції від концентрації оборотного ефектора (інгібітора, активатора) у певному діапазоні її значень [4, 5].

У цій роботі ми пропонуємо інший метод визначення найважливіших параметрів, що характеризують кінетичні закономірності дії оборотного ефектора E – коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e (K_i , K_a). Особливість цього методу полягає в тому, що, по-перше, він не потребує відстеження залежності максимальної швидкості та константи Міхаеліса ферментативної реакції (чи транспортного процесу) від концентрації оборотного ефектора E в певному діапазоні його концентрацій. По-друге, цей метод пов'язаний з використанням такого простого емпіричного параметра, як коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ (у разі дії оборотного інгібітора) або коефіцієнт активації $a_{0,5}$ (у разі дії оборотного активатора).

І. Кінетичні та термодинамічні аспекти дії оборотних ефекторів E на ферментативну (транспортну) активність білка F

Одну з найбільш узагальнених універсальних схем, яка описує механізм дії оборотних ефекторів на двостадійний ферментативний (транспортний) процес, було запропоновано І. В. Березіним та К. Мартинеком [5] (див. також [4]). Відповідно матеріал у цьому розділі викладається згідно з ідеями, які було втілено в цих роботах. Схема, яка віддзеркалює сукупність відповідних реакцій, має такий вигляд:



де F – ферментативний чи транспортний білок (в останньому випадку локалізований у мембрані будь-якої субклітинної структури), S та P –

відповідно субстрат та продукт ферментативної реакції чи транспортного процесу, E – оборотний ефектор (інгібітор I чи активатор A), FS – подвійний “комплекс Міхаеліса” “фермент – субстрат ферментативної реакції” чи “транспортний білок – субстрат транспортного процесу”, FE – подвійний комплекс “білок–ефектор”, FSE – потрібний “комплекс Міхаеліса” “білок–субстрат–ефектор”, $K_S = [F][S]/[FS]$ – субстратна константа для стадії утворення подвійного комплексу FS (ця константа є кількісною мірою спорідненості субстрату S до ферментативного, або транспортного, білка F), $K'_S = [FE][S]/[FSE] = \alpha K_S$ – субстратна константа для стадії утворення потрібного комплексу FSE (див. далі), $K_e = [F][E]/[FE]$ – ефекторна константа для стадії утворення подвійного комплексу FE , яка характеризує спорідненість ефектора E до ферментативного або транспортного, білка F (у разі дії оборотного інгібітора I – це константа інгібування K_i , а у разі дії оборотного активатора A – константа активації K_a), $K'_e = [FS][E]/[FSE] = \alpha K_e$ – ефекторна константа для стадії утворення потрібного комплексу FSE (див. далі), k_2 – константа розпаду (“число обертів”) подвійного комплексу FS у напрямку необоротного вивільнення продукту P ферментативної реакції чи транспортного процесу, $k'_2 = \beta k_2$ – константа розпаду (“число обертів”) потрібного комплексу FSE у напрямку необоротного вивільнення продукту P ферментативної реакції чи транспортного процесу (див. далі), α та β – так звані перший та другий коефіцієнти модифікації (фізико-хімічне тлумачення цих коефіцієнтів наведено нижче).

Згідно з [5] наявність першого коефіцієнта модифікації α безпосередньо впливає із застосування найважливішого закону термодинаміки – закону збереження енергії. Для балансу вільної енергії Гіббса ΔG на рівні циклічного фрагмента реакції (1), який віддзеркалює два паралельні шляхи переходу від стану вільного білка F до стану потрібного комплексу “фермент–субстрат–ефектор” FSE , маємо:

$$\Delta G_{F \leftrightarrow FS} + \Delta G_{FS \leftrightarrow FSE} = \Delta G_{F \leftrightarrow FE} + \Delta G_{FE \leftrightarrow FSE}, \tag{2}$$

де $\Delta G_{F \leftrightarrow FS}$, $\Delta G_{FS \leftrightarrow FSE}$, $\Delta G_{F \leftrightarrow FE}$ та $\Delta G_{FE \leftrightarrow FSE}$ – зміни вільної енергії ΔG на окремих етапах:



Беручи до уваги вираз для енергетичного балансу (2), а також окремі стадії (3) – (6) реакції (1), і враховуючи відоме рівняння Вант-Гоффа $\Delta G = -RT \ln K$ (T – температура, K ; R – газова стала), можна записати:

$$-RT \ln K_s - RT \ln K_e' = -RT \ln K_e - RT \ln K_s'. \quad (7)$$

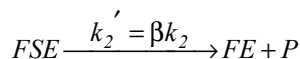
Звідси:

$$K_e'/K_e = K_s'/K_s = \alpha > 0, \quad (8)$$

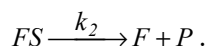
де $\alpha > 0$ – деяка стала, яка має термодинамічне тлумачення, і, відповідно – схема (1):

$$K_e' = \alpha K_e; K_s' = \alpha K_s. \quad (9)$$

Наявність другого коефіцієнта модифікації $\beta \geq 0$ впливає з міркування, що константа швидкості k_2' на рівні стадії:



може, взагалі кажучи, відрізнитись від константи швидкості k_2 перебігу реакції на рівні стадії:



Отже, другий коефіцієнт модифікації β має кінетичне тлумачення.

Застосуємо до схеми (1) стандартні принципи хімічної кінетики.

Врахування принципу збереження загальної концентрації речовини в реакції дає можливість записати:

- для ферментативного (транспортного) білка F :

$$[F]_0 = [F] + [FS] + [FE] + [FSE], \quad (10)$$

- для субстрату S ферментативної реакції чи транспортного процесу:

$$[S]_0 = [S] + [FS] + [FSE] + [P], \quad (11)$$

- для ефектора E

$$[E]_0 = [E] + [FE] + [FSE], \quad (12)$$

де $[F]_0$, $[S]_0$ та $[E]_0$ – сумарні (початкові) (в початковий момент часу $t=0$) концентрації ферментативного (транспортного) білка F , субстрату S та ефектора E відповідно.

Зазвичай, за реальних умов в біохімічних дослідах *in vitro* загальна концентрація $[F]_0$ ферментативного (транспортного) білка F (10^{-7} – 10^{-6} М) значно менша, ніж загальні (початкові) концентрації субстрату $[S]_0$ та ефектора $[E]_0$, тобто $[F]_0/[S]_0 \approx [F]_0/[E]_0 \ll 1$. Тому, беручи до уваги цю обставину, а також існування традиційного для експериментальних досліджень у галузі ензимології режиму визначення початкової швидкості ферментативної (транспортної) реакції (1) $v_0 = (dP/dt)_{t=0}$ і, відповідно, з урахуванням того,

що за умов цього режиму маємо $[P] \ll [S]$, співвідношення (11) та (12) можна переписати так:

$$[S]_0 = [S], \quad (13)$$

$$[E]_0 = [E]. \quad (14)$$

Залучення до схеми (1) закону діючих мас разом із принципом незалежного перебігу реакцій дає можливість записати загальний вираз для початкової швидкості v_0 реакції у такому вигляді:

$$v_0 = k_2 [FS] + \beta k_2 [FSE]. \quad (15)$$

Тоді, використовуючи рівняння (10), (13) та (14), а також вирази для рівноважних констант (наведено вище): $K_s = [F][S]/[FS]$, $K_s' = [FE][S]/[FSE] = \alpha K_s$, $K_e = [F][E]/[FE]$, $K_e' = [FS][E]/[FSE] = \alpha K_e$, можемо одержати остаточне рівняння для початкової швидкості $v_{0,E}$ реакції за присутності ефектора E (1):

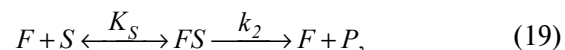
$$v_{0,E} = \frac{\langle V_{0,max} \rangle [S]_0}{\langle K_M \rangle + [S]_0}, \quad (16)$$

де $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_M \rangle$ – уявні кінетичні константи, які тестуються за наявності ефектора E у середовищі інкубації (максимальна початкова швидкість та константа Міхаеліса відповідно) [4,5]:

$$\langle V_{0,max} \rangle = \frac{\alpha K_e + \beta [E]_0}{\alpha K_e + [E]_0} k_2 [F]_0 \quad (17)$$

$$\langle K_M \rangle = \frac{K_e + [E]_0}{\alpha K_e + [E]_0} \alpha K_s. \quad (18)$$

За відсутності у середовищі інкубації ефектора E ($[E]_0 = 0$) із співвідношень (16) – (18) одержуємо класичний вираз для рівняння Міхаеліса–Ментен, яке описує кінетику елементарного ферментативного (транспортного) акту:



а саме [1,3,4]:

$$v_0 = \frac{V_{0,max} [S]_0}{K_s + [S]_0}, \quad (20)$$

де $V_{0,max} = k_2 [F]_0$ та K_s – канонічні константи елементарного ферментативного (транспортного) акту, які тестуються за відсутності ефектора E у середовищі інкубації – максимальна початкова швидкість та субстратна константа відповідно.

Зрозуміло, що у разі, якщо ефектор E є інгібітором I , маємо: $v_0 > v_{0,E} = v_{0,I}$. Якщо ж ефектор E є активатором A , то має місце нерівність: $v_0 < v_{0,E} = v_{0,A}$.

Відповідно до відомої класифікації впливу оборотних ефекторів на ферментативну (транспортну) активність білків [5], зокрема, є мож-

ливими наступні випадки дії інгібітора I :

I. Вплив інгібітора I на створення “комплексу Міхаеліса”: $\alpha \neq 1$; $\beta = 1$:

1. Стимуляція процесу створення “комплексу Міхаеліса”: $\alpha < 1$;

2. Часткове (неповне) конкурентне інгібування: $\alpha > 1$;

3. Повне конкурентне інгібування: $\alpha \rightarrow \infty$.

II. Вплив інгібітора I на швидкість перетворення “комплексу Міхаеліса”: $\alpha = 1$; $\beta \neq 1$:

4. Повне неконкурентне інгібування: $\beta = 0$;

5. Часткове (неповне) неконкурентне інгібування: $0 < \beta < 1$;

6. Стимуляція стадії перетворення “комплексу Міхаеліса”: $\beta > 1$.

III. Змішаний тип впливу інгібітора I : $\alpha \neq 1$; $\beta \neq 1$:

7*. Стимуляція стадії створення “комплексу Міхаеліса” та інгібування (повне, $\beta = 0$, або часткове) наступної стадії його перетворення: $\alpha < 1$; $\beta < 1$;

8*. Неповне інгібування стадії створення “комплексу Міхаеліса” та промотування наступної стадії його перетворення: $\alpha > 1$; $\beta > 1$;

9. Стимуляція обох стадій ферментативної реакції: $\alpha < 1$; $\beta > 1$;

10. Інгібування обох стадій ферментативної реакції: $\alpha > 1$; $\beta < 1$.

Отже, цілком зрозуміло, що коректна ідентифікація механізму та оцінка ефективності дії оборотного ефектора (інгібітора, активатора) на каталітичну чи транспортну активність білків потребує незалежного визначення коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e (константи інгібування K_i у випадку дії оборотного інгібітора I чи константи активації K_a у випадку дії оборотного активатора A) для кожного конкретного ферментативного чи транспортного процесу.

У класичній роботі [4] було описано метод розрахунку коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e . Цей розрахунок ґрунтується на побудові, відповідно до рівнянь (17) та (18), лінеаризованих графіків у координатах $\{[(\langle V_{0,max} \rangle / V_{0,max}) - 1]^{-1}; 1/[E]_0\}$ та $\{[(\langle K_M \rangle / K_S) - 1]^{-1}; 1/[E]_0\}$. Зрозуміло, що робота з такими системами координат може ґрунтуватись лише на попередньому значному за об'ємом експериментальному дослідженні залежності початкової швидкості $v_{0,E}$ ферментативного (транспортного) процесу від концентрації субстрату (фермента-

тивного перетворення чи трансмембранного перенесення) $[S]_0$ за різних концентрацій ефектора $[E]_0$ із наступною побудовою “вторинних” графіків залежності $\langle K_M \rangle$ та $\langle V_{0,max} \rangle$ від концентрації ефектора $[E]_0$ та подальшою їхньою лінеаризацією за вищезазначеним алгоритмом.

Дійсно, будемо вважати, наприклад, що для одержання однієї графічної залежності у координатах “початкова швидкість ферментативної реакції v_0 ; концентрація субстрату $[S]_0$ ” (така крива потрібна для розрахунку параметрів $V_{0,max}$ та K_S та $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_M \rangle$ за відсутності та присутності ефектора E відповідно) досліднику треба мати, як мінімум, 6 експериментальних точок. Нехай для одержання графіка залежності параметрів $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_M \rangle$ від концентрації ефектора $[E]_0$ треба також мати 6 точок (у разі 6 різних концентрацій ефектора). Таким чином, обсяг експериментальної роботи, який спрямований на визначення, відповідно до робіт [4,5], параметрів α , β та K_e із застосуванням лінійних графіків, що побудовані у координатах $\{[(\langle V_{0,max} \rangle / V_{0,max}) - 1]^{-1}; 1/[E]_0\}$ та $\{[(\langle K_M \rangle / K_S) - 1]^{-1}; 1/[E]_0\}$, потребує одержання $(1 + 6) \cdot 6 = 42$ експериментальних точок. Якщо ж на кожну експериментальну точку маємо 3 “паралельні” та 3 “контрольні” проби (які не містять білка чи містять реакційноздатне середовище інкубації з інгібітором ферментативного перетворення чи транспортного процесу), то, таким чином, всього будемо мати $42 \cdot 6 = 252$ експериментальних визначень величини початкової швидкості.

У даній роботі ми пропонуємо, ґрунтуючись на уявленнях І. В. Березіна та К. Мартинєка, інший підхід до розрахунку коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e , який для свого практичного застосування потребує значно менше витрат часу на лабораторну працю та реактиви, ніж метод, наведений у роботах [4,5]. Такий експериментальний підхід ґрунтується на каталітичному титруванні ферментативного (транспортного) білка субстратом за відсутності та у присутності в середовищі інкубації ефектора (у фіксованій концентрації) та титруванні цього білка ефектором у присутності в середовищі інкубації субстрату (у фіксованій концентрації).

II. Новий метод кінетичної характеристики дії оборотних ефекторів на ферментативну (транспортну) активність білків. Застосування коефіцієнтів інгібування або активації

Наш метод ґрунтується на визначенні таких параметрів ферментативного (транспортного) процесу, як:

* Можливі часткові випадки: $\alpha < \beta$; $\alpha > \beta$ та $\alpha = \beta$ — особливий випадок спряженого (безконкурентного) інгібування. Частковий випадок: $\alpha = \beta < 1$ — так зване антиконкурентне інгібування.

- класичні константи $V_{0,max}$ та K_s ;
 - уявні константи $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_s \rangle$ (за однієї фіксованої концентрації ефектора $[E]_0$);

- коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ (у випадку дії оборотного інгібітора) або коефіцієнт активації $a_{0,5}$ (у випадку дії оборотного активатора) (за однієї фіксованої концентрації субстрату S_0).

Згідно з вищенаведеним, проаналізуємо два часткові важливі випадки:

1. Дія оборотного інгібітора (I)

З урахуванням того, що концентрація ефектора – оборотного інгібітора становить $[E]_0 = i_0$, з рівнянь (17) та (18) будемо мати:

$$\tilde{V}_{0,max} = 1 - \frac{(1-\beta)i_0}{\alpha K_i + i_0}, \quad (21)$$

$$\tilde{K}_s = 1 + \frac{(\alpha-1)i_0}{\alpha K_i + i_0}, \quad (22)$$

де $\tilde{V}_{0,max} = \frac{\langle V_{0,max} \rangle}{V_{0,max}}$ та $\tilde{K}_s = \frac{\langle K_s \rangle}{K_s}$ – уявні нормо-

вані максимальна початкова швидкість та субстратна константа відповідно.

У фізико-хімічній біології дуже поширеним у роботі з оборотними інгібіторами є використання так званого коефіцієнта інгібування $i_{0,5}$ [4, 7]. За визначенням $i_{0,5}$ – це така концентрація оборотного інгібітора (за будь-якої початкової фіксованої концентрації субстрату $[S]_0$), за якої початкова швидкість ферментативного (транспортного) процесу $v_{0,I}$ становить 50% від контрольного значення v_0 . Інакше, $v_{0,I} = 0,5v_0$. Відповідно до цієї умови та згідно з рівняннями (16) – (18) та (20) у випадку $i_0 = i_{0,5}$ будемо мати

$$\frac{V_{0,max} S_0}{2(K_s + S_0)} = \frac{\left[1 - \frac{i_{0,5}}{\alpha K_i + i_{0,5}}\right] V_{0,max} S_0}{\left[1 + \frac{(\alpha-1)i_{0,5}}{\alpha K_i + i_{0,5}}\right] 2(K_s + S_0)}, \quad (23)$$

де $S_0 = [S]_0$. З рівняння (23) впливає вираз для константи інгібування K_i :

$$K_i = \frac{i_{0,5}}{\alpha} \left[1 - 2 + (-1) \frac{x_s}{1+x_s} \right], \quad (24)$$

де введено позначення: $x_s = \frac{K_s}{S_0}$.

З рівнянь (21) і (22) легко одержати зв'язок між коефіцієнтами модифікації α і β :

$$\beta = 1 - \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} (\alpha - 1) \quad (25)$$

Розв'язуючи замкнену систему рівнянь (21), (24) і (25), знаходимо перший коефіцієнт модифікації α :

$$\alpha = 1 + \frac{1 - y_i}{2(1 - \tilde{V}_{0,max}) - y_i + \frac{x_s}{1+x_s}}, \quad (26)$$

де введено позначення $y_i = \frac{i_0}{i_{0,5}}$.

Таким чином, визначаючи експериментально такі величини як $\tilde{V}_{0,max}$, \tilde{K}_s , y_i (за значення коефіцієнта інгібування $i_{0,5}$) та x_s (за значення субстратної константи K_s), можна однозначно за формулами (26), (25) та (24) розрахувати величини найважливіших невідомих кінетичних параметрів – коефіцієнтів модифікації α та β , а також константи інгібування K_i .

Проведемо якісний аналіз одержаних результатів. За визначенням $\alpha \geq 0$, $\beta \geq 0$ і $\tilde{K}_s \geq 0$. З умови $0 \leq \tilde{V}_{0,max} \leq 1$, з урахуванням виразу (21), випливає, що $\beta \leq 1$. З умови $K_i \geq 0$, враховуючи вираз (24), маємо:

$$1 - 2 + (-1) \frac{x_s}{1+x_s} \geq 0. \quad (27)$$

Підставляючи у (27) вираз для параметра $(\alpha-1)$ з формули (25), отримуємо більш строгі обмеження для другого коефіцієнта модифікації β :

$$0 \leq \beta \leq 1 - \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} \cdot \frac{1}{2 \cdot \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} + \frac{x_s}{1+x_s}}. \quad (28)$$

Навпаки, підставляючи у (27) вираз для параметра β з формули (25), отримуємо більш строгі обмеження для першого коефіцієнта модифікації α :

$$\alpha \geq 1 + \frac{1}{2 \cdot \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} + \frac{x_s}{1+x_s}}. \quad (29)$$

Отже, оцінки (28) і (29) показують, що завжди $\{0 \leq \beta \leq 1 \text{ і } \alpha \geq 1\} \Rightarrow \{\alpha > \beta\}$. Як наслідок цього, з формули (22) випливає: $\tilde{K}_s \geq 1$.

Зокрема, розглянемо такі граничні загальновідомі класичні випадки, як: а) повне конкурентне та б) повне неконкурентне інгібування.

а) Повне конкурентне інгібування. У цьому

випадку покладемо $\frac{\alpha K_i}{i_0} \gg 1$, тобто

$$\alpha \gg 1 + \frac{1 + y_i}{2 \cdot \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} + \frac{x_s}{1 + x_s}} \quad i$$

$$\beta \ll 1 - \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} \cdot \frac{1 + y_i}{2 \cdot \frac{1 - \tilde{V}_{0,max}}{\tilde{K}_s - 1} + \frac{x_s}{1 + x_s}}$$

Як результат з формул (21), (22) і (24) от-

римуємо: $\tilde{V}_{0,max} = 1$, $\tilde{K}_s = 1 + \frac{i_0}{K_i} = 1 + \frac{x_s}{1 + x_s} \cdot y_i$ і

$$K_i = \frac{x_s}{1 + x_s} \cdot i_{0,5}$$

. Отже, одержаний частковий результат цілком відповідає загальновідомому [1, 3–5]: повний конкурентний інгібітор не впливає на число обертів ферменту (транспортного білка), але зменшує спорідненість субстрату до нього, при цьому коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ не дорівнює безпосередньо значенню константи інгібування K_i , і, відповідно, цей коефіцієнт як такий не може бути мірою спорідненості інгібітора I до ферменту (транспортного білка) F .

б) Повне неконкурентне інгібування. Покладемо $\alpha = 1$ і $\beta = 0$. Внаслідок цього з формул

$$(21), (22) \text{ і } (24) \text{ отримуємо: } \tilde{V}_{0,max} = \frac{1}{1 + \frac{i_0}{K_i}} = \frac{1}{1 + y_i},$$

$$\tilde{K}_s = 1 \text{ і } K_i = i_{0,5}$$

Таким чином, одержаний частковий результат цілком відповідає загальновідомому [1, 3–5]: повний неконкурентний інгібітор знижує число обертів ферменту (транспортного білка), але зовсім не впливає на спорідненість субстрату до нього, при цьому коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ є суто константою інгібування K_i , і, відповідно, цей коефіцієнт є мірою спорідненості інгібітора I до ферменту (транспортного білка) F .

Перейдемо до графічного аналізу одержаних даних.

На рис. 1, 2 і 3 наведені залежності відносної швидкості ферментативного (транспортного)

процесу $v_{0,i}/V_{0,max}$ від величини $y_i = \frac{i_0}{i_{0,5}}$ (нормованої концентрації інгібітора) за різних значень

величини $x_s = \frac{K_s}{S_0}$ (нормованої субстратної кон-

станти) та параметрів α і β . Ці залежності були розраховані за такою формулою:

$$v_{0,i}/V_{0,max} = \frac{1 - 2\beta + (\alpha - 1) \frac{x_s}{1 + x_s} + \beta y_i}{\left(1 - 2\beta + (\alpha - 1) \frac{x_s}{1 + x_s}\right) (1 + x_s) + (1 + \alpha x_s) y_i} \quad (30)$$

При цьому важливо зауважити, що всі можливі значення параметрів α і β за фіксованих величин x_s та y_i обов'язково мають задовольняти такій умові (знаменник у виразі (30) не дорівнює нулю):

$$(1 - 2\beta)(1 + x_s) + (\alpha - 1)x_s + (1 + \alpha x_s)y_i \neq 0. \quad (31)$$

Як бачимо з рис. 1, 2 і 3, із зростанням величин $x_s = K_s/S_0$ від 0,1 до 10 (тобто у разі зменшення насичення ферментативного (транспортного) білка субстратом або у випадку зменшення спорідненості субстрату до цього білка) та із зростанням α від 1 до 100 за можливих значень β різко знижується максимальне значення величини $v_{0,i}/V_{0,max}$: від 0,8 до 0,08. Чим більшим є значення β за фіксованих величин x_s та α , тим вище лежать криві $v_{0,i}/V_{0,max}$ як функції $y_i = i_0/i_{0,5}$. За великих значень параметра α (>10) одержані криві за різних фіксованих значень величини x_s та параметрів β практично збігаються (рис. 1в, 2б та 3б). Нарешті, внаслідок існування обмежень на параметри α і β за фіксованих величин x_s та y_i (формула (31)), нами були одержані критичні значення параметра $\beta_{кр}$, за якого гіперболічна залежність $v_{0,i}/V_{0,max}$ як функції y_i переходить у пряму лінію (рис. 1а, 1б, 2а і 3а), тобто швидкість перебігу ферментативної реакції вже не залежить від концентрації інгібітора. Наприклад, при $\alpha = 1$ $\beta_{кр} = 0,5$ і не залежить від величини x_s (рис. 1а, 2а і 3а); при $\alpha = 10$ і $x_s = 0,1$ маємо: $\beta_{кр} = 0,9$ (рис. 1б). Із зростанням величин α (>10) та x_s поява параметра $\beta_{кр}$ не спостерігається взагалі (рис. 1в, 2б і 3б).

Таким чином, у разі збільшення насичення ферментативного (транспортного) білка субстратом (чи за зменшення спорідненості цього білка до субстрату) (величина $x_s = K_s/S_0$ зменшується, рис. 3, 2 та 1), збільшення ступеня дисоціації потрійного “комплексу Міхаеліса” [FSE] (збільшення першого коефіцієнта модифікації α) призводить до зменшення “чутливості” залежності $v_{0,i}/V_{0,max}$ від $y_i = i_0/i_{0,5}$ до зміни величини другого коефіцієнта модифікації β . Треба відзначити, що за інших умов (від $\alpha = 1$ до $\alpha = 100$; $\beta = 0-1$; діапазон $y_i = i_0/i_{0,5}$ 0–10) діапазон зміни абсолютного значення відносної швидкості $v_{0,i}/V_{0,max}$ тим менше, чим більша величина $x_s = K_s/S_0$ (тоб-

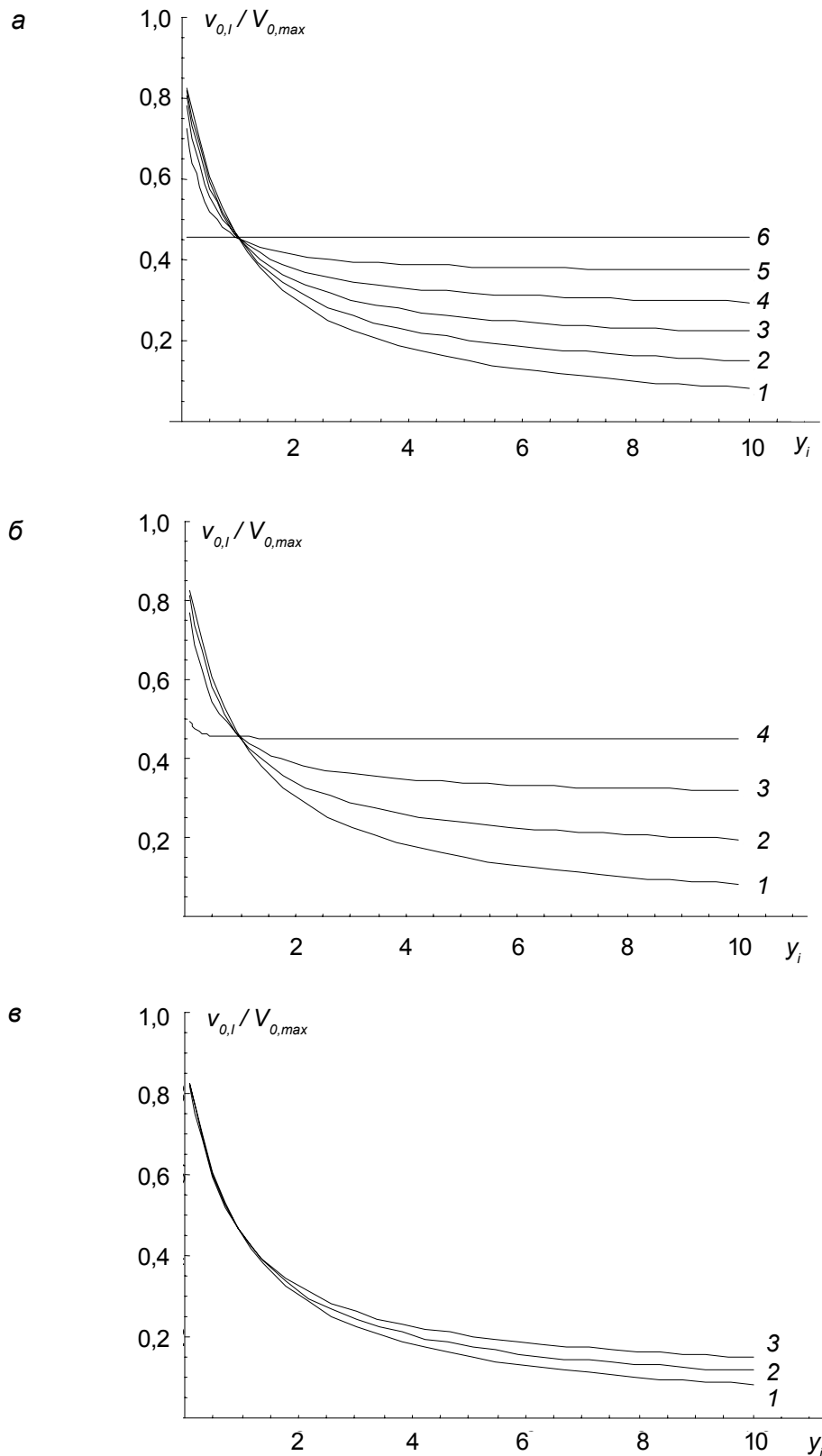


Рис. 1. Розраховані за рівнянням (30) залежності відносної швидкості ферментативного (транспортно-го) процесу $v_{0,1}/V_{0,max}$ від величини y_i (нормованої концентрації інгібітора $i_0/i_{0,s}$) при $x_s = K_s/S_0 = 0,1$ та: а) $\alpha = 1$ та $\beta = 0$ (1); 0,1 (2); 0,2 (3); 0,3 (4); 0,4 (5) і $\beta_{kp} = 0,5$ (6); б) $\alpha = 10$ та $\beta = 0$ (1); 0,3 (2); 0,6 (3) і $\beta_{kp} = 0,9$ (4); в) $\alpha = 100$ і $\beta = 0$ (1); 0,5 (2); 1 (3).

то чим менша спорідненість субстрату до ферментативного, чи транспортного білка, або чим меншим є ступінь насиченості останнього субстратом) (рис. 1–3).

2. Дія оборотного активатора (А)

У цьому разі формули (21) і (22) перепишемо так:

$$\tilde{V}_{0,max} = 1 + \frac{(\beta - 1)a_0}{\alpha K_a + a_0}, \quad (21^*)$$

$$\tilde{K}_s = 1 - \frac{(1 - \alpha)a_0}{\alpha K_a + a_0}. \quad (22^*)$$

За умови:

$$2 \cdot \frac{V_{0,max} S_0}{K_s + S_0} = \frac{\left[1 + \frac{(-1)a_{0,5}}{\alpha K_a + a_{0,5}} \right] V_{0,max} S_0}{\left[1 - \frac{(1 - \alpha)a_{0,5}}{\alpha K_a + a_{0,5}} \right] K_s + S_0} \quad (23^*)$$

знаходимо зв'язок між константою активації K_a та коефіцієнтом активації $a_{0,5}$:

$$K_a = \frac{a_{0,5}}{\alpha} \left[\beta - 2 \cdot \frac{1 + \alpha x_s}{1 + x_s} \right]. \quad (24^*)$$

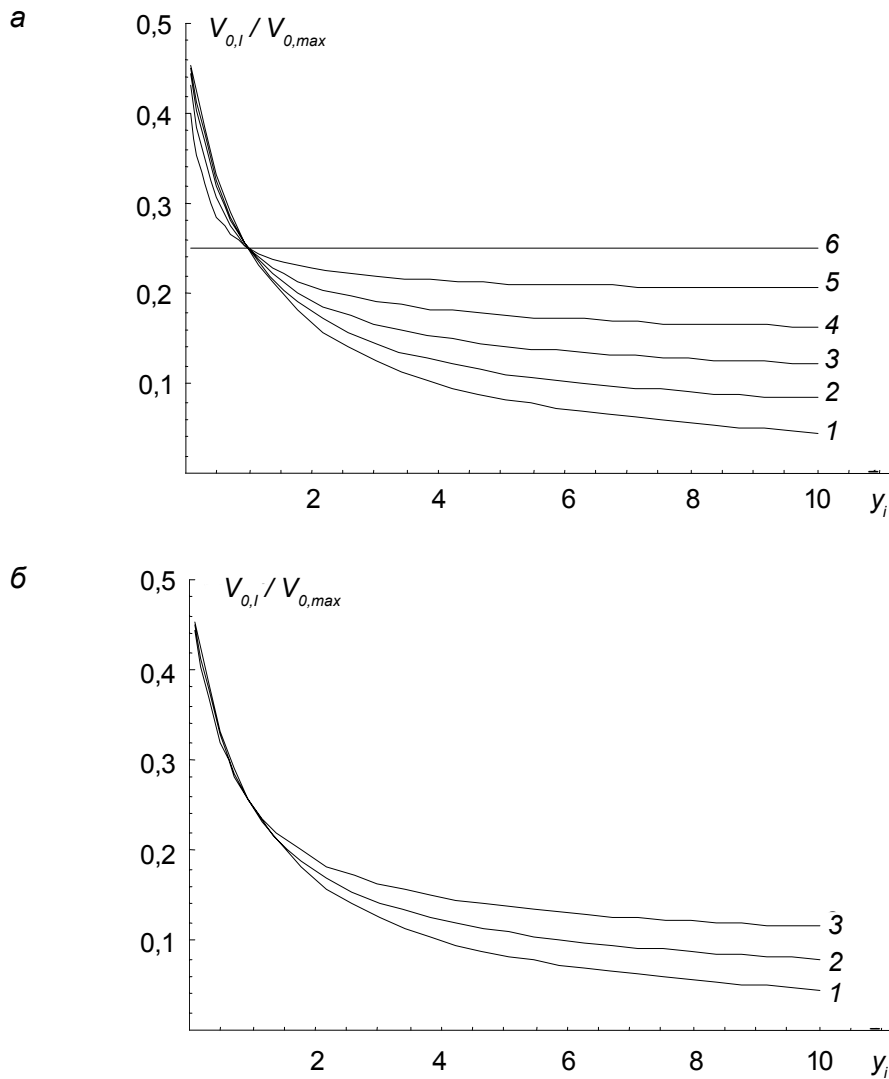


Рис. 2. Розраховані за рівнянням (30) залежності відносної швидкості ферментативного (транспортного) процесу $v_{0,1}/V_{0,max}$ від величини y_i (нормованої концентрації інгібітора $i_0/i_{0,5}$) при $x_s = K_s/S_0 = 1$ та: а) $\alpha = 1$ і $\beta = 0$ (1); 0,1 (2); 0,2 (3); 0,3 (4); 0,4 (5) і $\beta_{кр} = 0,5$ (6); б) $\alpha = 10$ і $\beta = 0$ (1); 0,5 (2); 1 (3).

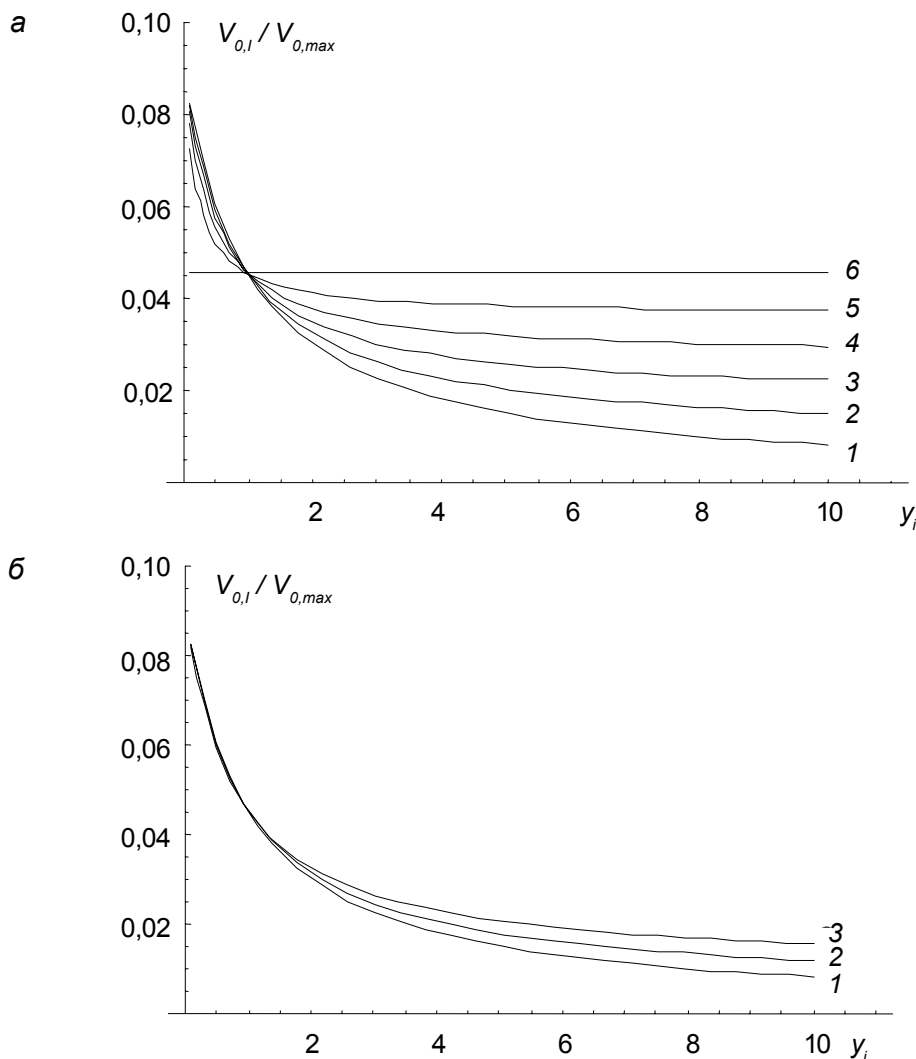


Рис. 3. Розраховані за рівнянням (30) залежності відносної швидкості ферментативного (транспортного) процесу $v_{0,i}/V_{0,max}$ від величини y_i (нормованої концентрації інгібітора $i_0/i_{0,5}$) при $x_s = K_s/S_0 = 10$ та: а) $\alpha = 1$ і $\beta = 0$ (1); 0,1 (2); 0,2 (3); 0,3 (4); 0,4 (5) і $\beta_{кр} = 0,5$ (6); б) $\alpha = 1$ і $\beta = 0$ (1); 0,5 (2); 1 (3).

Формулу (25) перепишемо так:

$$\beta = 1 + \frac{\tilde{V}_{0,max} - 1}{1 - \tilde{K}_s} (1 - \alpha) \quad (25^*)$$

Тоді шуканий параметр α дорівнює:

$$\alpha = 1 - \frac{1 - y_a}{\frac{\tilde{V}_{0,max} - 1 - y_a}{1 - \tilde{K}_s} + 2 \cdot \frac{x_s}{1 + x_s}}, \quad (26^*)$$

де введено позначення $y_a = \frac{a_0}{a_{0,5}}$.

Отже, визначаючи експериментально такі величини, як $\tilde{V}_{0,max}$, \tilde{K}_s , y_a та x_s , можна однозначно за формулами (26*), (25*) і (24*) розрахувати значення невідомих кінетичних параметрів α , β і K_a .

Проведемо якісний аналіз одержаних результатів. За визначенням $\alpha \geq 0$, $\beta \geq 0$ і $\tilde{K}_s \geq 0$. З умови $\tilde{V}_{0,max} \geq 1$, з урахуванням виразу (21*), випливає, що $\beta \geq 1$. З умови $K_a \geq 0$, з урахуванням виразу (24*), випливає:

$$\beta - 2 \cdot \frac{1 + \alpha x_s}{1 + x_s} \geq 0. \quad (27^*)$$

Підставляючи в (27*) вираз для параметра α з формули (25*), отримуємо більш строгі обмеження на параметр β :

$$\beta \geq 1 + \frac{\tilde{V}_{0,max} - 1}{1 - \tilde{K}_s} \cdot \frac{1}{\frac{\tilde{V}_{0,max} - 1}{1 - \tilde{K}_s} + 2 \cdot \frac{x_s}{1 + x_s}}. \quad (28^*)$$

Навпаки, підставляючи в (27*) вираз для параметра β з формули (25*), отримуємо більш строгі обмеження на параметр α :

$$0 \leq \alpha \leq 1 - \frac{1}{\frac{\tilde{V}_{0,max} - 1}{1 - \tilde{K}_s} + 2 \cdot \frac{x_s}{1 + x_s}}. \quad (29^*)$$

Отже, оцінки (28*) і (29*) свідчать, що завжди $\{0 \leq \alpha \leq 1 \text{ і } \beta \geq 1\} \Rightarrow \{\beta > \alpha\}$. Як наслідок цього, з формули (22*) випливає умова: $\tilde{K}_s \leq 1$. Цілком логічно, що ми одержали протилежний результат у разі дії інгібітора.

Аналогічно, як це було зроблено для інгібітора, розглянемо, наприклад, такий можливий граничний випадок для активатора, поклавши: $\alpha = 1$ і $\beta = 3$ (стимуляція стадії перетворення “комплексу Міхаеліса”). Як результат з формул (21*),

$$(22^*) \text{ і } (24^*) \text{ одержуємо: } \tilde{V}_{0,max} = 1 + 2 \cdot \frac{y_a}{1 + y_a},$$

$$\tilde{K}_s = 1 \text{ і } K_a = a_{0,5}.$$

3. Алгоритм розрахунку кінетичних параметрів

Таким чином, для того, щоб користуватись запропонованим нами методом визначення коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e , досліднику слід:

1. Провести експеримент із каталітичного титрування ферменту (транспортної системи) субстратом ферментативного перетворення (транспортного процесу) за відсутності та у присутності оборотного ефектора (при фіксованій концентрації e_0). Із одержаних графічних залежностей розрахувати стандартні кінетичні параметри (будь-яким диференціальним методом – Лайнуївера–Берка, Ейзенталя–Корніш–Бодена, Едді–Хофсті, логарифмічним та т.ін. [1, 3, 4]): за відсутності ефектора – $V_{0,max}$ та K_S ; за присутності ефектора у даній концентрації e_0 – $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_M \rangle$;

2. Провести дослід із титрування ферменту (транспортної системи) оборотним ефектором, використовуючи субстрат у фіксованій концентрації S_0 . Із одержаної графічної залежності розрахувати значення коефіцієнта інгібування $i_{0,5}$ (за дії інгібітора) чи коефіцієнта активації $a_{0,5}$ (при дії активатора);

3. Розрахувати ефективні відносні параметри: $\tilde{V}_{0,max} = \langle V_{0,max} \rangle / V_{0,max}$ та $\tilde{K}_s = \langle K_m \rangle / K_s$ (при даній концентрації ефектора e_0), а також $x_s = K_s / S_0$ (S_0 – концентрація субстрату, яка використовувалась у дослідах із титрування білка ефектором) та $y_i = i_0 / i_{0,5}$ – за дії інгібітора чи $y_a = a_0 / a_{0,5}$ – за

дії активатора (i_0 чи a_0 – концентрація інгібітора чи активатора, яка використовувалась у дослідах із титрування білка субстратом);

4. Розрахувати значення коефіцієнтів модифікації α і β та константи інгібування K_i (при вивченні дії оборотного інгібітора), використовуючи формули (26), (25) та (24), або розрахувати значення коефіцієнтів модифікації α і β та константи активації K_a (при вивченні дії оборотного активатора), використовуючи формули (26*), (25*) та (24*).

Очевидно, що критерієм коректності визначення значень коефіцієнтів модифікації α і β та ефекторної константи K_e (константи інгібування K_i чи константи активації K_a) є незалежність їхніх величин від концентрацій ефектора E_0 та субстрату S_0 , які використовуються у дослідах.

III. Приклад практичного застосування нового методу кінетичного аналізу дії оборотних ефекторів на ферментативну (транспортну) активність білків. Вплив еозину Y на транспортну Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азу, солюбілізовану із плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин

З метою ілюстрації практичного застосування підходу, що був розроблений у цій роботі, ми використали його для з'ясування кінетичних закономірностей дії еозину Y (2',4',5',7'-тетрабромфлуоресцеїну)-оборотного неспецифічного інгібітора Mg^{2+} -залежних АТР-гідролазних ферментативних систем на Ca^{2+} -транспортну АТР-азу (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азу), яку було солюбілізовано із плазматичної мембрани клітин міомерія (наприклад, [8, 9]).

Дослідження із каталітичного титрування еозином Y солюбілізованої високоочищеної транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази були проведені у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України к.б.н. Н. М. Слінченко.

Було встановлено, що за стандартних умов за відсутності оборотного інгібітора в середовищі інкубації залежність початкової швидкості реакції гідролізу АТР від концентрації нуклеозидтрифосфату АТР характеризується кінетичними параметрами: $V_{0,max} = 70,6$ мкмоль P_i /год·мг білка, $K_s = 73$ мкМ. Величина коефіцієнта інгібування $i_{0,5}$ становила 0,85 мкМ (при цьому концентрація АТР у середовищі інкубації S_0 була 3 мМ). Отже, для величини x_s маємо: $x_s = K_s / S_0 = 0,024$.

За присутності 0,05 мкМ еозину Y у середовищі інкубації значення кінетичних параметрів АТР-гідролазної ферментативної реакції становили: $\langle V_{0,max} \rangle = 59,7$ мкмоль P_i /год·мг білка, $\langle K_m \rangle = 212$ мкМ. Відповідно, маємо:

$\tilde{V}_{0,max} = \langle V_{0,max} \rangle / V_{0,max} = 0,85$; $\tilde{K}_s = \langle K_m \rangle / K_s = 2,9$; $y_i = i_0 / i_{0,5} = 0,06$. Тоді, використовуючи рівняння (26), (25) та (24), одержимо наступні значення для найважливіших кінетичних параметрів: $\alpha = 7,3$; $\beta = 0,50$; $K_I = 17$ нМ.

А за присутності іншої концентрації еозину Y у середовищі інкубації – $0,10$ мкМ значення кінетичних параметрів ферментативної реакції були наступні: $\langle V_{0,max} \rangle = 48,4$ мкмоль P_i /год·мг білка, $\langle K_m \rangle = 318$ мкМ. Відповідно маємо:

$\tilde{V}_{0,max} = \langle V_{0,max} \rangle / V_{0,max} = 0,69$; $\tilde{K}_s = \langle K_m \rangle / K_s = 4,4$; $y_i = i_0 / i_{0,5} = 0,12$. Отже, використовуючи рівняння (26), (25) та (24), одержимо такі значення для шуканих кінетичних параметрів: $\alpha = 6,2$; $\beta = 0,53$; $K_I = 5$ нМ.

Як бачимо, значення параметрів α , β та K_I практично не залежать від величини концентрації оборотного інгібітора еозину Y ($0,05$ чи $0,1$ мкМ). Інакше, критерій коректності розрахунку цих параметрів відповідно до вищенаведеного алгоритму цілком спрацьовує.

Таким чином, у разі реакції Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР та згідно зі схемою (1), можна стверджувати наступне.

1. Для потрійного комплексу FSI (АТР-аза-АТР-еозин Y) його дисоціація більш суттєво зсувається у напрямках звільнення вільних субстрату S та інгібітора I , ніж дисоціація подвійного фермент-субстратного комплексу FS (АТР-аза-АТР) у напрямку звільнення вільного субстрату S та дисоціація подвійного фермент-інгібіторного комплексу FI (АТР-аза-еозин Y) у напрямку звільнення вільного інгібітора I (адже $\alpha = 6-8 > 1$);

2. У разі потрійного комплексу FSI (АТР-аза-АТР-еозин Y) число його каталітичних обертів приблизно удвічі менше, ніж у разі подвійного фермент-субстратного комплексу FS (АТР-аза-АТР) (адже $\beta = 0,50-0,53 < 1$);

3. Отже, в основі гальмування оборотним інгібітором еозином Y АТР-гідролазної ферментативної реакції, що відбувається за механізмом змішаного типу ($\alpha \neq 1$; $\beta \neq 1$), є як зменшення спорідненості подвійних комплексів FI та FS до субстрату АТР та еозину Y відповідно ($\alpha > 1$), так і “атака” інгібітора безпосередньо на подвійний фермент-субстратний комплекс (АТР-аза-АТР) із виникненням потрійного комплексу (АТР-аза-АТР-еозин Y), який характеризується меншим числом обертів, ніж подвійний комплекс (АТР-аза-АТР). Таким чином еозин Y інгібує дві стадії Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежної АТР-гідролазної ферментативної реакції: як стадію зв’язування субстрату з ферментом, так і стадію розкладу

“комплексу Міхаеліса” у напрямку звільнення продукту реакції;

4. Реальна спорідненість оборотного інгібітора еозину Y до Ca^{2+} -транспортної АТР-ази плазматичної мембрани вельми висока: адже значення константи інгібування K_I становить $10^{-9} - 10^{-8}$ М. Отже, ця величина на два-три порядки менша, ніж значення емпіричного коефіцієнта інгібування $i_{0,5} \sim 1 \cdot 10^{-6}$ М. Цей факт наочно вказує на те, що намагання оцінити спорідненість оборотного інгібітора до ферменту виключно за величиною параметра $i_{0,5}$ може призводити до істотних помилок в її оцінці (див., також [7]).

Наприкінці зазначимо, що особливість розробленого нами методу визначення коефіцієнтів модифікації α і β та ефекторної константи K_e (константи інгібування K_i чи константи активації K_a) полягає у наступному.

По-перше, він не потребує, на відміну від методу, описаного раніше [4, 5], відстеження залежності максимальної швидкості та константи Міхаеліса ферментативної реакції (чи транспортного процесу) від концентрації оборотного ефектора E в певному діапазоні його концентрацій.

По-друге, наш метод пов’язаний із використанням такого простого емпіричного параметра, як коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ (у разі дії оборотного інгібітора) або коефіцієнт активації $a_{0,5}$ (у разі дії оборотного активатора).

По-третє, відповідно, метод, який описано в цій роботі, для свого практичного застосування потребує значно менше витрат на лабораторну працю та реактиви, ніж метод, наведений у роботах [4,5].

Проаналізуємо цей аспект ґрунтовніше.

Як і раніше (див. вище) будемо, наприклад, вважати, що для одержання однієї графічної залежності у координатах “початкова швидкість ферментативної реакції v_0 ; концентрація субстрату $[S]_0$ ” (така крива потрібна для розрахунку параметрів $V_{0,max}$ та K_s та $\langle V_{0,max} \rangle$ та $\langle K_m \rangle$ за відсутності та присутності ефектора E відповідно) досліднику треба мати, як мінімум, 6 експериментальних точок, а для одержання однієї точки – 3 “паралельні” та 3 “контрольні” проби (які не містять білка, або містять реакційноздатне середовище інкубації з інгібітором ферментативного перетворення чи транспортного процесу). Тоді у разі застосування методу, запропонованого нами, будемо мати для двох графіків залежності у координатах “початкова швидкість ферментативної реакції v_0 ; концентрація субстрату $[S]_0$ ” (за відсутності ефектора та за його присутності у фіксованій концентрації), як мінімум, $6 \cdot 2 = 12$ експериментальних точок. Нехай для одержання залежності початкової швидкості ферментативної

реакції v_0 (за присутності субстрату у фіксованій концентрації) від концентрації ефектора $[E]_0$ (для визначення значення коефіцієнта інгібування $i_{0,5}$ або коефіцієнта активації $a_{0,5}$) також потрібно мати, як і раніш, як мінімум, 6 експериментальних точок. Отже, в разі застосування нашого методу визначення параметрів α , β та K_e досліднику треба мати, як мінімум, $12 + 6 = 18$ експериментальних точок. Із врахуванням кількості “паралельних” проб (3 на кожен експериментальну точку) та їхніх “контролей” (3 на кожен експериментальну точку) маємо $18 \cdot 6 = 108$ експериментальних визначень величини початкової швидкості. Навіть якщо взяти до уваги, що, відповідно до запропонованого нами методу, досліднику з метою застосування критерія коректності визначення значень коефіцієнтів модифікації α і β та ефекторної константи K_e , слід мати дві криві титрування ферментативного (транспортного) білка субстратом (при двох різних концентраціях ефектора), то і в цьому разі будемо мати кількість проб меншу ($24 \cdot 6 = 144$), ніж у разі застосування методу, описаного в роботах [4,5] (252 проби, див. вище).

Таким чином, очевидно, що використання нашого методу потребує майже вдвічі менше часу на експериментальну дослідницьку роботу та менше витрат на реактиви, ніж у разі застосування методу, запропонованого в роботах [4,5].

Ми вважаємо, що запропонований в цій роботі підхід щодо універсальної кінетичної характеристики дії оборотних ефекторів на ферментативну та транспортну активність білків, який ґрунтується на визначенні значень коефіцієнтів модифікації α та β , а також ефекторної константи K_e (константи інгібування K_i , константи активації K_a), може бути корисним у дослідках з ензимології, а також біохімії та біофізики мембран під час ідентифікації механізму дії ефектора і оцінки його реальної спорідненості до білкової макромолекули.

Сподіваємось також, що викладений матеріал може зацікавити студентів старших курсів університетів, аспірантів, пошукачів, молодих вчених, які працюють у галузі ензимології, біохімії та біофізики іонного транспортування та біотехнології.

Автори висловлюють свою подяку старшому науковому співробітнику відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України канд. біол. наук Н. М. Слінченко за участь в апробації розробленого кінетичного методу в дослідках із транспортною Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азою та обговоренні одержаних результатів.

KINETIC ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF INVERSE EFFECTORS (INHIBITORS AND ACTIVATORS) ON ENZYMATIC (TRANSPORT) ACTIVITY OF PROTEINS

S. O. Kosterin¹, Yu. I. Prilutsky²,
P. O. Borisko², M. S. Miroshnichenko²

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The method is proposed for calculation of the most important parameters of the two-stage enzymatic or transport process — modification factors α and β (which characterize the effector action mechanism) as well as the inhibition constant K_i or activation constant K_a (characterize the effector affinity for protein). The method was derived as based on the analysis of kinetic regularities of the action of reversible effectors (inhibitors and activators) on the catalytic (transport) activity of proteins. The method is based on the titration of enzymatic (transport) protein by the substrate with the absence and with presence of the effector taken in one of concentrations as well as determination (under the fixed substrate concentration) of the inhibition coefficient $i_{0,5}$ (in case of the inhibitor action) or the activation coefficient $a_{0,5}$ (in case of the activator action).

Practical use of the method has been demonstrated on the example of reversible inhibition to eosine Y (2', 4', 5', 7' — tetrabromofluorescein) of the reaction of enzymatic hydrolysis of ATP catalyzed by highly purified transport Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase isolated from the smooth-muscle sarcolemma. In this case the inhibitory effect is characterized by the following parameters: $\alpha = 6-8 > 1$; $\beta = 0.50-0.53 < 1$; inhibition constant $K_i = 10^{-9}-10^{-8}$ M. Consequently, judging from the values of α and β , the eosine Y effect on the analyzed Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolase enzymatic reaction is based on the mechanism of the mixed inhibition (one can observe the inhibition of the both stages of enzymatic transformation — the substrate binding with the enzyme and decomposition of “Michaelis complex” in the direction of formation of the reaction products). The inhibitor itself, in correspondence with K_{ij} values is characterized by rather high affinity for Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. It is supposed that the proposed approach can be useful when identifying the type of the reversible effector action on the enzymatic (transport)

activity of proteins, estimation of real affinity of the inhibitors and activators for the latter.

К e y w o r d s: enzymes, reversible effectors, modification coefficient, inhibition (activation) constant, inhibition (activation) coefficient.

1. *Cornish-Bowden A.* Fundamentals of Enzyme Kinetics. London: Portland Press. 1995. 343 p.
2. *Fell D.* Understanding the Control of Metabolism. London and Miami: Portland Press. 1997. 301 p.
3. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир. 1990. 348 с.
4. *Березин И. В., Клесов А. А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд. МГУ. 1976. 320 с.

5. *Березин И. В., Мартинек К.* // Молекулярная биология. 1971. **5**, № 3. С. 317–350.
6. *Костерин С. А.* // Журн. физ. химии. 1981. **55**, № 8. С. 1965–1969.
7. *Костерин С. О.* // Укр. біохім. журн. 1999. **71**, № 2. С. 100–103.
8. *Kosterin S. O.* // Neurophysiology. 2003. **35**, N 314. P. 215–228.
9. *Slinchenko N. N., Kosterin S. A., Bratkova N. F., Zimina V. P., Chernysh I. G.* // Biochemistry (M). 1998. **63**, N 6. P. 685–690.

Отримано 09.06.2004