

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.3

КІНЕТИЧНЕ ТЛУМАЧЕННЯ рН-ЗАЛЕЖНОСТІ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ “БАЗАЛЬНОЇ” Mg^{2+} -АТР-ази САРКОЛЕМИ ГЛАДЕНЬКОГО М’ЯЗА

С. О. КОСТЕРІН¹, Т. О. ВЕКЛІЧ¹, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ², П. О. БОРИСКО²

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

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

В експериментах, виконаних на фракції плазматических мембран кліток гладкої м’язи матки, показано, що рН-зависимість ферментативної активності “базальної” (Ca^{2+} -независимой) Mg^{2+} -АТР-ази, отримана в режимі визначення початкової швидкості реакції гідролізу АТР, не являється колоколообразною, а характеризується лінійністю в діапазоні значень рН 6,0 – 8,0. Предложена и проанализирована кинетическая модель Mg^{2+} -зависимого ферментативного гидролиза АТР, объясняющая линейность указанной рН-зависимости. Результаты кинетического анализа свидетельствуют, что причина линейности рН-зависимости ферментативной активности “базальной” Mg^{2+} -АТР-ази заключается в том, что протон (H^+) является конкурентным ингибитором данного фермента: увеличение концентрации протонов приводит к уменьшению сродства субстрата $MgATP^2-$ к ферменту, однако не влияет на число оборотов последнего. Таким образом, в работе дается кинетическое обоснование возможной регуляторной роли H^+ как фактора своеобразной отрицательной обратной связи, контролирующей ферментативную активность “базальной” Mg^{2+} -АТР-ази, “нарабатывающей” протоны в клетках миомерия: при увеличении концентрации протонов в примембранных областях миоплазмы активность АТР-ази уменьшается, а при уменьшении – увеличивается. Не исключается, что благодаря своей своеобразной линейной рН-зависимости изучаемая АТР-гидролазная система служит важным элементом контроля протонного гомеостаза в гладкомышечных клетках.

Ключевые слова: Mg^{2+} -АТР-аза, протоны, плазматическая мембрана, гладкие м’язи, миомерий, рН-функции Михаэлиса, кинетический анализ.

У плазматичній мембрані клітин збудливих тканин ідентифіковано декілька АТР-гідролаз, а саме [1–5]:

- високоафінна щодо іонів кальцію Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-аза (“екстра-АТР-аза”, кальцієва АТР-аза), яка забезпечує активний трансмембранний викид іонів Са з цитоплазми у позаклітинне середовище. Її активний центр міститься з цитоплазматичного боку плазматичної мембрани;

- низькоафінна до іонів кальцію Mg^{2+} -незалежна Ca^{2+} -АТР-аза. Функціональну роль та локалізацію її остаточно не з’ясовано;

- убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТР-аза, що забезпечує активне антипортне транспортування іонів Na та K із клітини і в клітину відповідно та підтримує трансмембранний електрохімічний градієнт цих іонів. Як і в молекулі Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТР-ази, активний центр Na^+, K^+ -АТР-ази розташовується на цитоплазматичному боці плазматичної мембрани;

- “базальна” Mg^{2+} -АТР-аза (Ca^{2+} -незалежна

Mg^{2+} -АТР-аза). Її функціональну роль, як і локалізацію, остаточно не встановлено, хоча не виключають, що ця АТР-аза може бути причетною до регуляції концентрації протонів у поза- чи внутрішньоклітинному просторах. Що стосується останньої АТР-ази, то в літературі відомі дані щодо її вельми високої ферментативної активності (у гладеньких м’язах вона становить 30–100 мкмоль P_i /год на 1 мг білка залежно від виду тварини, умов проведення реакції, складу середовища інкубації), кінетичних та каталітичних властивостей, чутливості її активності до дії різних фізико-хімічних факторів та ефекторів [1, 6, 7]. В експериментах, проведених на міометрії (питома ферментативна активність – 20–40 мкмоль P_i /год на 1 мг білка) доведено резистентність “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази до дії інгібіторів транспортних АТР-аз плазматичної мембрани та інших субклітинних структур, а саме – убаїну, тапсигаргіну та азиду натрія (блокують Na^+, K^+ -АТР-азу плазматичної мембрани,

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азу ендо(сарко)плазматичного ретикулула та АТФ-азу мітохондрій відповідно [6].

З огляду на те, що одним із продуктів реакції Ca^{2+} -незалежного Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ є протон, припускається участь високоактивної „базальної” Mg^{2+} -АТФ-ази в регуляції внутрішньоклітинного рН (що виявлено у клітинах печінки та епітелію [8, 9]), а також у контролі $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну в мітохондріях та, можливо, у плазматичній мембрані міоцитів [9]. Важливим етапом на шляху до розуміння функціональної ролі цієї АТФ-ази в контролі гомеостазу протонів у тканині є дослідження рН-чутливості її ферментативної активності з наступною кількісною модельною інтерпретацією одержаних результатів.

У цій роботі з метою розширення сучасних уявлень щодо каталітичних властивостей „базальної” Mg^{2+} -АТФ-ази ми поставили перед собою задачу дослідити рН-залежність активності ферменту у фракції сарколеми міометрія та надати кінетичне тлумачення одержаним даним.

Матеріали та методи

Фракцію плазматичних мембран гладенько-м'язових клітин виділяли з міометрія свині як описано раніше [10]. Для цього 15 г тканини подрібнювали ножицями і тричі гомогенізували (співвідношення тканина – розчин 1 : 4) за допомогою ножового гомогенізатора (1 хв, 8000 об/хв) до гомогенного стану. Для гомогенізації використовували розчин такого складу (в мМ): сахароза – 250; трис-НСІ-буфер (рН 7,4) – 20; ЕДТА – 2, КСІ – 600. Одержаний гомогенат центрифугували при 3000 г протягом 20 хв. Використовували надосадову рідину, яку нашаровували на градієнт сахарози в такій послідовності і співвідношенні: 30%-на сахароза – 15%-на сахароза – надосадова рідина (6 : 5 : 20). Систему градієнта центрифугували 90 хв у бакет-роторі (105 000 г, +8 °С). До одержаної фракції плазматичних мембран, зібраної шприцом, додавали холодний бідистилят і доводили концентрацію сахарози до 2,5%. Мембрани осаджували центрифугуванням упродовж однієї години при 105 000 г, після цього їх зберігали в середовищі, яке містило (в мМ): Tris-НСІ-буфер (рН 7,4) – 20; КСІ – 150. Вміст білка в мембранах визначали методом М. М. Bredford [11], використовуючи реакцію з реактивом Кумасі-G250.

Загальну АТФ-азну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм 0,4 мл), яке містило (в мМ): АТФ – 1, MgCl_2 – 3, NaCl – 125, КСІ – 25, ЕДТА – 1, Hepes-Tris-буфер (рН 7,4) – 20, NaN_3 (інгібітор АТФ-ази

мітохондрій [12]) – 1; а також 0,1 мкМ тапси-гаргін (селективний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази ендо(сарко)плазматичного ретикулула [12]) і 0,1% дигітоніну (фактор перфорації плазматичної мембрани [13]). Кількість білка у мембранній фракції проби – 20–30 мкг, тривалість інкубації при 37 °С – 3 хв. Ферментативну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації 20 мкл суспензії плазматичних мембран (8 °С), а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл „стоп-розчину”, який містив 1,5 М натрію оцтовокислою; 3,7% формальдегіду; 14,0% етанолу та 5,0% трихлороцтової кислоти (рН 4,3, температура 8 °С). Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕДТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування ендogenous іонів Са. Контролем на неферментативний гідроліз АТФ слугувало середовище інкубації, що мало аналогічний склад, але до нього не додавали фракцію плазматичних мембран. Контролем на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в мембранному препараті було середовище, що містило тільки фракцію мембранного препарату у водному розчині. Загальну АТФ-азну активність обчислювали за різницею між кількістю P_i в середовищі інкубації у присутності та за відсутності фрагментів плазматичної мембрани, враховуючи поправку на неферментативний гідроліз АТФ та вміст ендogenous P_i у мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали методом W. Rathbun et V. Betlach [14].

„Базальну” Mg^{2+} -АТФ-азну активність визначали в тому самому середовищі, що і загальну АТФ-азну активність, але у присутності 1 мМ оубаїну (інгібітор Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани [15, 16]). Цю активність обчислювали за різницею між величинами загальної Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності (уабайнчутлива Na^+ , K^+ -АТФ-аза + уабайнчутлива Mg^{2+} -АТФ-аза) і уабайнчутливою Na^+ , K^+ -АТФ-азною активністю.

Під час дослідження кінетики накопичення продукту уабайнчутливої Na^+ , K^+ -АТФ-азної та уабайнчутливої Mg^{2+} -АТФ-азної реакції (P_i) тривалість інкубації змінювали в межах до 10 хв. В експериментах, в яких вивчали вплив різних концентрацій АТФ (0,01–5,00 мМ) на активність Mg^{2+} -АТФ-ази концентрація MgCl_2 у стандартному середовищі інкубації була сталою (3 мМ). Уявну константу Міхаеліса за АТФ (K_m) обчислювали методом Ейзенталя–Корніш–Боуден [17]. Для вивчення впливу рН на активність обох АТФ-аз використовували 20 мМ Hepes-Tris-буфер (рН 6,0–8,0).

Результати досліджень обробляли статистично стандартними методами з використанням

t-критерія Стюдента. Кінетичні та статистичні показники визначали в режимі програмного забезпечення на персональному комп'ютері IBM PC. Усі розрахунки в межах кінетичної протонної моделі (“Результати та обговорення”) здійснювали як аналітично, так і з використанням пакету програми “Математика”.

У досліджах застосовували АТР, Нерес, убаїн, тапсигаргін («Sigma», США), трис-гідроксиметиламінометан («Reanal», Угорщина), дигітонін («Merck», Німеччина), ЕГТА («Fluka», Швейцарія) та інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації ч. д. а. та х. ч.

Результати та обговорення

Деякі властивості ферментативної реакції “базального” Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР та тлумачення її своєрідної рН-залежності. У середовищі інкубації, в якому не було екзогенних катіонів Са, але містилися катіони 125 мМ Na, 25 мМ К і 3 мМ Mg, а також 1 мМ АТР та Ca^{2+} -хелатора 1 мМ ЕГТА, “базальна” Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} -АТР-аза плазматичних мембран клітин міометрія тестується як частина загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-гідролазної ферментативної активності, яка резистентна до дії убаїну (1 мМ),

тапсигаргину (100 нМ) та азиду натрію (1 мМ). Значення ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази становить $19,5 \pm 1,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n = 5$), тобто $60,9 \pm 4,1\%$ від величини загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-азної активності (рис. 1).

Кінетика процесу Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР протягом 10 хв задовольняє закономірностям реакції нульового порядку: спостерігається лінійність між кількістю продукту реакції P_i та тривалістю інкубації t (рис. 2), що відповідає режиму визначення початкової швидкості V_0 , яка становить 260 ± 24 нмоль P_i /хв на 1 мг білка ($M \pm m, n = 5$).

Залежність початкової швидкості ферментативної реакції V_0 від концентрації субстрату S_0 (АТР) є гіперболічною у разі зміни концентрації останнього від 0,5 до 1 мМ і підпорядковується рівнянню Міхаеліса–Ментен. При цьому величини максимальної швидкості ферментативної реакції $V_{0,max} = k_2 f_0$ та субстратної константи K_s становлять 28 ± 2 мкмоль P_i /год на 1 мг білка та $34,1 \pm 2,8$ мкМ відповідно ($n = 7$); k_2 – число обертів АТР-гідролазної ферментативної реакції, f_0 – загальна концентрація ферментного білка, а значення субстратної константи K_s практично

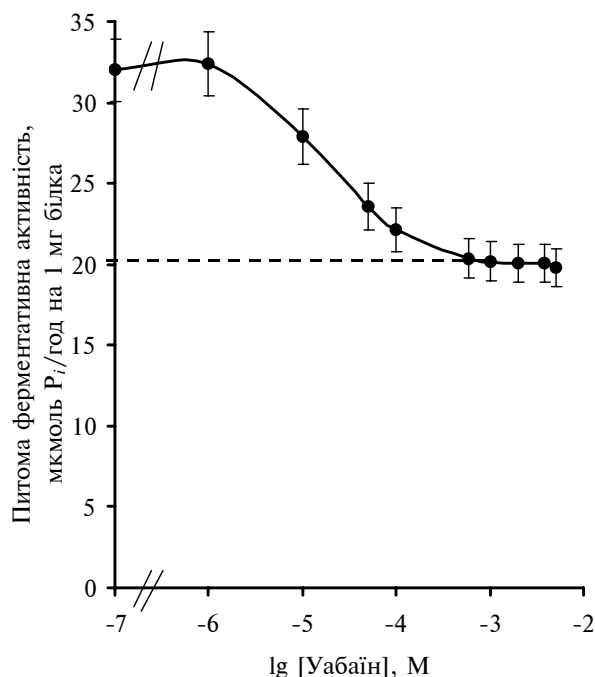


Рис. 1. Ідентифікація “базальної” Mg^{2+} -АТР-азної активності у фракції плазматичних мембран клітин міометрія як убаїннечутливої складової загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТР-гідролазної ферментативної активності ($M \pm m, n = 5$). Пунктиром позначено рівень “базальної” Mg^{2+} -АТР-азної активності. Тут і на рис. 4 наведено склад середовища інкубації для визначення загальної АТР-азної активності (в мМ): АТР – 1, $MgCl_2$ – 3, $NaCl$ – 125, KCl – 25, ЕГТА – 1, Нерес-Трис-буфер (рН 7,4; 37 °С) – 20, NaN_3 – 1, а також 0,1 мкМ тапсигаргину та 0,1% дигітоніну. Кількість білка у пробі мембранної фракції – 20–30 мкг; тривалість інкубації при 37 °С – 3 хв.

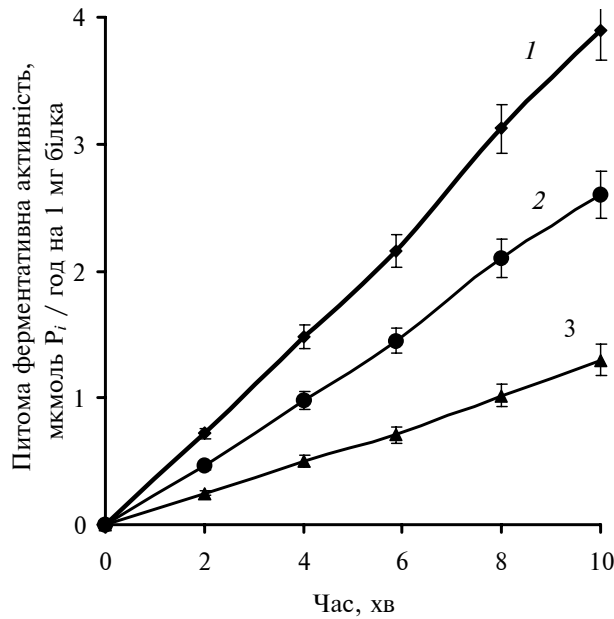


Рис. 2. Кінетика Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР у фракції плазматичних мембран клітин міометрія ($M \pm m, n = 5$). На графіку, який віддзеркалює ферментативний гідроліз АТР, є такі позначення: 1 – загальний Mg^{2+}, Na^+, K^+ -залежний; 2 – Mg^{2+} -залежний убаїннечутливий (“базальна” Mg^{2+} -АТР-аза); 3 – Mg^{2+}, Na^+, K^+ -залежний убаїнчутливий (за участю убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТР-ази, концентрація убаїну – 1 мМ). Середовище інкубації для визначення загальної АТР-азної активності містило (в мМ): АТР – 1, $MgCl_2$ – 3, $NaCl$ – 125, KCl – 25, ЕГТА – 1, Нерес-Tris-буфер (рН 7,4; при температурі при 37 °С) – 20, NaN_3 – 1, а також 0,1% тапсигаргін та 0,1% дигітоніну. Кількість білка у мембранній фракції проби – 20–30 мкг.

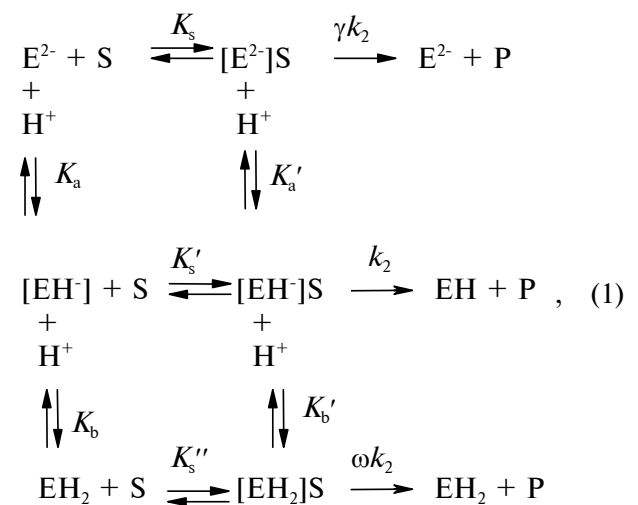
відповідає величині константи Міхаеліса K_m . У разі подальшого збільшення концентрації АТР до 5 мМ спостерігається субстратне інгібування: за цих умов V_0 повільно знижується (рис. 3).

При вивченні рН-залежності ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази було виявлено, що в режимі визначення початкової швидкості V_0 реакції гідролізу АТР (тривалість інкубації 3 хв) за рН 6,0–8,0 графік має не типовий куполоподібний вигляд, а лінійний. Для порівняння наведено куполоподібну рН-залежність активності убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТР-ази (рис. 4).

Таким чином, реакція „базального” Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у фракції плазматичних мембран клітин міометрія відповідає режиму визначення початкової швидкості V_0 , яка змінюється залежно від концентрації субстрату S_0 за рівнянням Міхаеліса–Ментен. Варто зазначити, що лінійна рН-залежність початкової швидкості цієї реакції у діапазоні рН 6,0–8,0 є своєрідною.

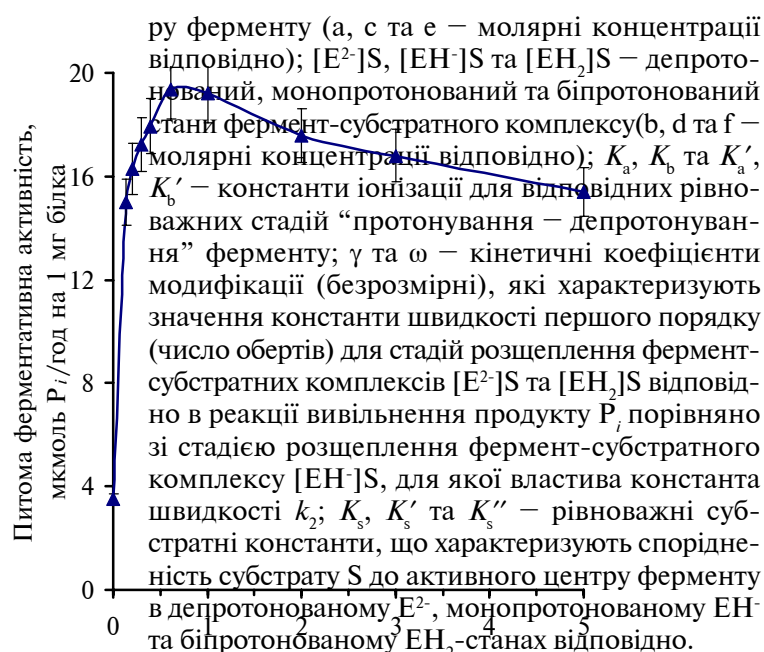
Узагальнена кінетична модель та термодинамічна й кінетична інтерпретація рН-залежності ферментативної реакції. Узагальнений кінетичний аналіз рН-залежності ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази доцільно проводити в термінах так званих “рН-функцій Міхае-

ліса”, які описують вплив концентрації H^+ на V_0 відповідно до найпростішого “мінімального” механізму (1), що ґрунтується на уявленні існування шістьох іонізаційних станів активного центру ферменту Е (3 – у відсутності субстрату S та 3 – за його наявності) [17]:



де E^- , E та EH_2 – депротонований, монопротонований та біпротонований стани активного цент-

Рис. 3. Каталітичне титрування “базальної” Mg^{2+} -АТФ-ази у фракції плазматичних мембран клітин міометрія АТФ ($M \pm m, n = 7$). Середовище інкубації для визначення “базальної” АТФ-азної активності містило (в мМ): $MgCl_2 - 3, NaCl - 125, KCl - 25, EGTA - 1, HEPES-Tris$ -буфер (рН 7,4 при 37 °С) – 20, $NaN_3 - 1$, а також 0,1 мкМ тапсигаргіну та 0,1% дигітоніну. Кількість білка у мембранній фракції проби – 20–30 мкг.



Відповідно до принципу збереження загальної концентрації ферменту в реакції (1), для загальної концентрації ферменту e_0 будемо мати такий вираз:

$$e_0 = a + b + c + d + e + f. \quad (2)$$

Згідно із законом збереження енергії та базуючись на відомому в хімічній термодинаміці рівнянні $\Delta G = -RT \ln K$ (ΔG – вільна енергія

Гіббса; K – константа рівноваги; R – газова стала; T – температура, $^{\circ}K$) для схеми (1) у разі двох альтернативних шляхів переходу від стану ферменту E^{2-} до $[EH_2]S$ ($E^{2-} \rightleftharpoons [E^{2-}]S \rightleftharpoons [EH^-]S \rightleftharpoons [EH_2]S$ і $E^{2-} \rightleftharpoons EH^- \rightleftharpoons EH_2 \rightleftharpoons [EH_2]S$), можна написати рівняння енергетичного балансу (3):

$$-RT \ln K_s - RT \ln K_a' - RT \ln K_b' = -RT \ln K_a - RT \ln K_b - RT \ln K_s''. \quad (3)$$

Зазначений енергетичний баланс буде слушним також для двох “внутрішніх” циклів схеми (1) із шляхами переходу $E^{2-} \rightleftharpoons [E^{2-}]S \rightleftharpoons [EH^-]S$ та $E^{2-} \rightleftharpoons EH^- \rightleftharpoons [EH^-]S$; $EH^- \rightleftharpoons [EH^-]S \rightleftharpoons [EH_2]S$ та $EH^- \rightleftharpoons EH_2 \rightleftharpoons [EH_2]S$. Тому наступні співвідношення між константами рівноваги будуть такими:

$$\begin{aligned} K_s' &= \alpha K_s \\ K_a' &= \alpha K_a \\ K_b' &= \beta K_b \\ K_s'' &= \beta K_s' = \alpha \beta K_s, \end{aligned} \quad (4)$$

де α та β – так звані термодинамічні коефіцієнти модифікації (безрозмірні), які, згідно з виразами (5), пов'язані із субстратною константою K_s , константами іонізації (на рівні вільного ферменту K_a та K_b) і концентрацією субстрату ферментативної реакції S_0 , парціальними концентраціями ферментного білка a, b, c, d, e та f, а також із концентрацією протонів $h = 10^{-pH}$:

$$\begin{aligned} K_s &= \frac{aS_0}{b}; & \alpha K_s &= \frac{cS_0}{d}; \\ K_a &= \frac{ah}{c}; & \alpha\beta K_s &= \frac{eS_0}{f}; \\ K_b &= \frac{ch}{e}; & \alpha K_a &= \frac{bh}{d}; \\ & & \beta K_b &= \frac{dh}{f}. \end{aligned} \quad (5)$$

Тоді, згідно з рівнянням (6), неважко записати вирази для парціальних концентрацій ферментного білка а, с, d, е та f у вигляді залежностей від однієї з парціальних концентрацій білка, а саме b:

$$\begin{aligned} a &= \frac{bK_s}{S_0}, \\ c &= \frac{ah}{K_a} = \frac{bK_s}{S_0} \cdot \frac{h}{K_a} = \frac{bK_s h}{S_0 K_a}, \\ d &= \frac{bh}{\alpha K_a}, \\ e &= \frac{ch}{K_b} = \frac{bK_s h}{K_a S_0} \cdot \frac{h}{K_b} = \frac{bK_s}{K_a K_b S_0} h^2, \\ f &= \frac{dh}{\beta K_b} = \frac{bh}{\alpha K_a} \cdot \frac{h}{\beta K_b} = b \frac{h^2 b K_s}{\alpha \beta K_a K_b}. \end{aligned} \quad (6)$$

Грунтуючись на балансовому виразі для загальної концентрації ферментного білка (2) і вищенаведених співвідношеннях (6), для концентрації b ферментного білка одержимо з високим ступенем вірогідності залежність (7) від субстратної константи K_s , констант іонізації (на рівні вільного ферменту K_a та K_b), коефіцієнтів модифікації а та b, концентрації субстрату S_0 , загальної концентрації ферменту f_0 і концентрації протонів h:

$$b = \frac{\frac{f_0}{1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b}} S_0}{\frac{1 + \frac{h}{K_a} + \frac{h^2}{K_a K_b}}{1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b}} K_s + S_0}. \quad (7)$$

Відповідно до закону діючих мас і згідно зі схемою (1) вираз для початкової швидкості ферментативної реакції матиме вигляд $V_0 = \gamma k_2 b + k_2 d + \omega k_2 f = k_2(\gamma b + d + \omega f)$, а враховуючи

рівняння (6) та (7), одержимо кінцеве рівняння (8) для залежності V_0 від початкової концентрації субстрату S_0 , яке має вигляд класичного (стосовно субстрату S) рівняння Міхаеліса – Ментен:

$$V_0 = \frac{\langle V_{0,\max} \rangle S_0}{\langle K_m \rangle + S_0}. \quad (8)$$

Це рівняння включає так звані ефективні константи: уявну максимальну швидкість ферментативної реакції $\langle V_{0,\max} \rangle$ (рівняння 9) та уявну константу Міхаеліса $\langle K_m \rangle$ (рівняння 10):

$$\langle V_{0,\max} \rangle = \frac{\left[\gamma + \left(1 + \frac{\omega h}{\beta K_b} \right) \frac{h}{\alpha K_a} \right] k_2 f_0}{1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b}}, \quad (9)$$

$$\langle K_m \rangle = \frac{1 + \frac{h}{K_a} + \frac{h^2}{K_a K_b}}{1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b}} K_s. \quad (10)$$

Таким чином, уявні кінетичні константи ферментативної реакції (1) $\langle V_{0,\max} \rangle$ та $\langle K_m \rangle$ – рівняння (9) та (10) відповідно – істотно залежать від “рН-функцій Міхаеліса”, які є сумою лінійних чи нелінійних складових стосовно концентрації протонів h і широко використовуються в хімічній кінетиці, коли описують вплив концентрації протонів на швидкість хімічних перетворень, що контролюються процесами оборотної іонізації (реакції “протонування – депротонування”) [17]. На підставі вищенаведеного кінетичного аналізу реакцій схеми (1) наводимо наші міркування стосовно своєрідної рН-залежності ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком’язових клітин (рис. 4).

Модельне тлумачення своєрідної рН-чутливості ферментативної реакції Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР. З огляду на вирази (9) і (10), кінцеве рівняння (8), яке віддзеркалює залежність початкової швидкості V_0 ферментативної реакції Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР від концентрації протонів h, можна переписати у вигляді виразу (11):

$$V_0(h) = \frac{\left(\frac{h}{\alpha K_a} + \gamma + \frac{\omega h^2}{\alpha \beta K_a K_b} \right) k_2 f_0}{\left(1 + \frac{h}{K_a} + \frac{h^2}{K_a K_b} \right) \frac{K_s}{S_0} + 1 + \frac{h}{\alpha K_a} + \frac{h^2}{\alpha \beta K_a K_b}}, \quad (11)$$

де, як і раніше, $h = 10^{-pH}$.

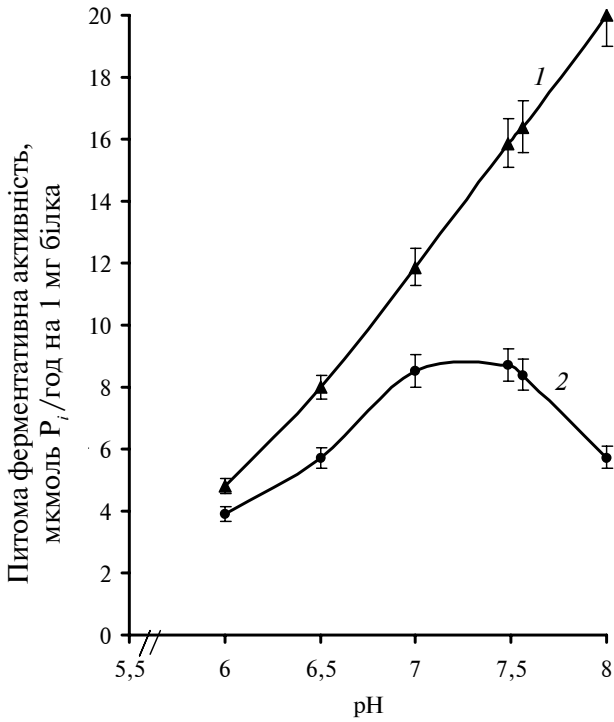


Рис. 4. Вплив рН на ферментативну активність "базальної" Mg^{2+} -АТФ-ази (крива 1) та Na^+, K^+ -АТФ-ази у плазматичних мембранах клітин міо-метрія за концентрації убаїну 1 мМ (крива 2) ($M \pm m, n = 6$).

За виконання умов

$$\beta K_b(\alpha \gamma K_a + h) \gg \omega h^2 \quad (12)$$

та

$$\beta K_b[(\alpha K_a(1+x) + (1 + \alpha x)h) \gg (1 + \alpha \beta x)h^2,$$

де $x = K_s/S_0$ – нормована (на початкове значення концентрації субстрату) величина субстратної константи, та аналізуючи вираз (11) отримуємо гіперболічну залежність $V_0(h)$ (13), яка ідентична лінійній залежності в координатах ($[V_0; pH]$, рис. 4):

$$V_0(h) = \frac{(\alpha \gamma K_a + h)k_2 f_0}{\alpha K_a(1+x) + (1 + \alpha x)h} \quad (13)$$

Виходячи з одержаних нами експериментальних даних щодо значень $V_0(h)$ у трьох експериментальних точках за різної величини рН ($h = 10^{-6}, 10^{-7}$ і 10^{-8} М; рис. 4), а також експериментально встановлених значень величини $k_2 f_0 = V_{0,max} = 28$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка та $x = K_s/S_0 = 0,034$ мМ/1 мМ = $0,034 \ll 1$ (наведені вище, а також рис. 3), з виразу (13) знаходимо три невідомі параметри:

$$\alpha \approx 200,$$

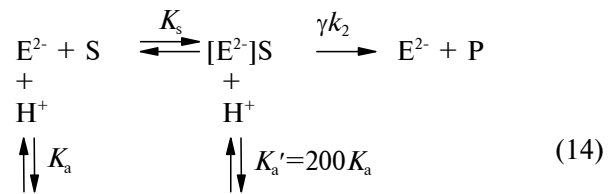
$$K_a = \frac{0,0185\alpha - 3,0556}{\alpha} \cdot 10^{-6} = 3,2 \cdot 10^{-6} \approx 10^{-8,5} \text{ М},$$

$$\gamma = \frac{1,3452\alpha - 218,4558}{1,85\alpha - 305,56} = 0,8.$$

Якщо проаналізувати відомі значення рК деяких груп білків [18], то можна дійти висновку, що одержана величина K_a відповідає або α -аміногрупі, або сульфгідрильній групі цистину.

На рис. 5 наведено експериментальні значення $V_0(h)$ (позначені кружками) та крива, що була теоретично розрахована за формулою (13). Як бачимо, значення теоретично розрахованих точок збігаються з експериментальними точками.

Згідно з вищенаведеним аналізом та відповідно до співвідношень $K'_s = 200K_s$ і $K'_a = 200K_a$ (рівняння (4)), узагальнювальна схема (1) набуває такого вигляду:



Отже, на підставі проведеного кінетичного аналізу експериментально встановленої рН-залежності ферментативної активності "базальної" Mg^{2+} -АТФ-ази сарколеми гладенького м'язу (рис. 4) та відповідно до схеми (14) можна запропонувати такий можливий механізм своєрідної дії концентрації H^+ на цю активність. За відсутності субстрату S та при збільшенні концентрації протонів від 0,01 до 1 мкМ (рН зменшується від 8 до 6) переважно спостерігається перехід активного центру Mg^{2+} -АТФ-ази від депротонованого стану E^{2-} до монопротонованого $[EH^-]$ (константа іонізації $K_a = 10^{-8,5}$ М). Дійсно, за цих умов, але у присутності субстрату S, переходи від монопротонованого стану ферменту $[EH^-]$ до монопротонованого фермент-субстратного комплексу $[EH^-]S$ (субстратна константа $K'_s = 200K_s$) та від стану депротонованого фермент-субстратного комплексу $[E^{2-}]S$ до монопротонованого $[EH^-]S$ (субстратна константа $K'_a = 200K_a$) будуть істотно зміщені в бік дисоціації монопротонованого фермент-субстратного комплексу $[EH^-]S$. Останній хоча і є каталітично активним (число обертів – k_2), але не може накопичуватись порівняно з подвійним депротонованим фермент-субстратним

ки значення термодинамічного коефіцієнта модифікації $\alpha = 200$ дуже високе, на основі рівняння (13) остаточно можемо одержати такий вираз залежності початкової швидкості V_0 ферментативної реакції Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР від концентрації субстрату S_0 :

$$(16)$$

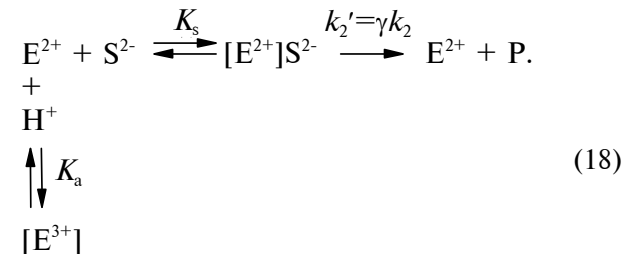
де

$$\begin{aligned} \langle V_{0,\max} \rangle &\approx k_2' f_0 = \gamma k_2 f_0, \\ \langle K_m \rangle &\approx K_s \left(1 + \frac{h}{K_a} \right). \end{aligned} \quad (17)$$

Таким чином, $\langle V_{0,\max} \rangle$ є уявною максимальною швидкістю ферментативної реакції, яка не залежить від концентрації протонів, а $\langle K_m \rangle$ – уявною константою Міхаеліса, що ілюструє зміну спорідненості субстрату ферментативної реакції до “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази, якщо концентрація протонів h у середовищі інкубації змінюється.

Отже, відповідно до рівнянь (16) та (17), зменшення концентрації протонів h зумовлює збільшення спорідненості субстрату до “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази сарколеми гладенького м’яза, але зовсім не впливає на максимальну швидкість (число обертів) АТР-гідролазної реакції $\langle V_{0,\max} \rangle = \gamma k_2 f_0$.

Важливим є питання електростатичних взаємодій між реальними зарядами Mg^{2+} -АТР-ази та її субстратом. Очевидно, що еквівалентна зі схемою (15) схема Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР, яка враховує наявність подвійного негативного заряду субстрату (у хелатному комплексі $MgATP^{2-}$), може бути в найпростішому випадку такою:



Таким чином, схема (18), задовольняє вищенаведеному узагальненому кінетичному аналізу і віддзеркалює можливість адсорбції двовалентного аніона $MgATP^{2-}$ на активному центрі АТР-ази та додаткове приєднання до ферменту H^+ як конкурентного інгібітора. Це унеможливує взаємодію аніонного субстрату $MgATP^{2-}$ з АТР-азою.

1,0
h · 10⁻⁶, М

Рис. 5. Графік $V_0(h)$ (суцільна крива) реакції Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТР у фракції плазматичних мембран клітин міометрія. Теоретичну суцільну криву було розраховано за формулою (13). Експериментальні значення $V_0(h)$ (рис. 1) на цьому графіку позначено кружечками.

комплексом $[E^{2+}]S$ у значних кількостях (адже величина коефіцієнта модифікації α дуже велика і становить 200). Отже, причина того, що зі збільшенням рН відбувається лінійне зростання ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази сарколеми (рис. 4), полягає в наступному: в разі зменшення концентрації протонів у діапазоні рН 6–8 рівновага зміщується в бік дисоціації монопротонованого стану ферменту $[EH^-]$ до його депротонованого стану E^{2-} . Дійсно, повністю депротонований стан ферменту (E^{2-}) можливий лише при високих значеннях рН. Отже, в узагальненій схемі (1) можна знехтувати складовою $[EH^-]S$. Зважаючи на вищенаведені міркування, дійдемо висновку, що схему (14) можна трансформувати:

Із схеми 15 ($k_2'=\gamma k_2$) впливає, що лінійність рН-залежності ферментативної активності “базальної” Mg^{2+} -АТР-ази сарколеми гладенького м’яза (рис. 4) пов’язана з тим, що протон є конкурентним інгібітором цього ферменту. Оскільки

Отже, в цій роботі маємо кінетичне обґрунтування можливої регуляторної ролі протонів як фактора негативного оберненого зв'язку, що контролює ферментативну активність "базальної" Mg^{2+} -АТФ-ази, локалізованої у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин матки – ферментативної системи, яка продукує "напрацьовує" H^+ : при збільшенні концентрації протонів у навколишньому середовищі активність цієї АТФ-ази зменшується, а при зменшенні – підвищується. Не виключено, що з огляду на виявлену нами лінійну рН-залежність зазначена АТФ-гідролазна система є своєрідним рН-чутливим ферментативним сенсором і важливим чинником контролю внутрішньоклітинного протонного гомеостазу у гладеньких м'язках.

KINETIC INTERPRETATION OF THE ORIGINAL PH-DEPENDENCE OF ENZYMATIC ACTIVITY OF "BASAL" Mg^{2+} -ATPASE OF THE SMOOTH MUSCLE SARCOLEMMA

S. O. Kosterin¹, T. O. Veklich¹,
Yu. I. Prilutsky², P. O. Borysko²

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Taras Shevchenko Kyiv National University;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

It was demonstrated in experiments made on a fraction of plasma membranes of the uterine smooth muscle cells that pH-dependence of enzymatic activity of the "basal" (Ca^{2+} -independent) Mg^{2+} -ATPase obtained under the conditions of determining the initial velocity of ATP hydrolysis is not bell-shaped but is characterized by linearity in the range of the values of hydrogen index 6.0–8.0. A kinetic model of Mg^{2+} -dependent enzymatic hydrolysis of ATP has been suggested and analyzed; the model explains the linearity of the above pH-dependence. Results of kinetic analysis prove that the cause of linear pH-dependence of enzymatic activity of the "basal" Mg^{2+} -ATPase is that the proton H^+ is a competitive inhibitor of the given enzyme: the increase of protons concentration leads to a decrease of the affinity of Mg^{2+} -ATP substrate for the enzyme, but it has no effect on the number of circulations of the latter. Thus the work gives a kinetic substantiation of the possible regulatory role of protons H^+ as the factor of original negative inverse relation which controls the enzymatic activity of the basal Mg^{2+} -ATPase "producing" protons in the myometrium cells; the concentration of protons in the near-membrane regions of the myoplasm being increased the ATPase activity

decreases, and the former being decreased the latter increases. It is not excluded that owing to its original linear pH-dependence the studied ATP-hydrolyase system serves as an important element of the control of proton homeostasis in the smooth-muscle cells.

К е у w o r d s: MgI^+ -ATPase, protons, plasma membrane, smooth muscle, myometrium, kinetic analysis.

1. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – 216 с.
2. Boldyrev A. A. // Membr. Cell. Biol. – 2000. – 13, № 6. – P. 715–719.
3. Kosterin S. A., Burdyga Th. V., Fomin V. P., Grover A. K. // Control of Uterine Contractility. – Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. – Ann Arbor–London–Tokyo: CRC Press, Boca Raton, 1994. – P. 129–153.
4. Chen H., Tang Z. Y., Yang J. X. et al. // Chin. Med. Sci. J. – 2004. – 19, N 4. – P. 286–9.
5. Carofoli E., Brini M. // Current Opinion in Chemical Biology. – 2000. – 4. – P. 152–161.
6. Костерин С. А., Браткова Н. Ф. // ДАН (Россия). – 1995. – 342, №5. – С. 696–699.
7. Magocsi M., Penniston J. T. // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – 1070, N 1. – P.163–172.
8. Luu-The V., Goffeau A., Thines-Sempoux D. // Ibid. – 1987. – 904. – P. 251–258.
9. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Зимица В. П. // Биохимия. – 1995. – 60, № 9. – С.1450–1459.
10. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепина А. А. и др. // Укр. биохим. журн. – 1986. – 58, № 4. – С. 50–56.
11. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P.24–282.
12. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biological Chemistry. – 2001. – 276, N 39. – P. 36411–36418.
13. Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, № 1. – С. 42–48.
14. Rathbun W., Betluch V. // Ibid. – 1969. – 28. – P.436–445.
15. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – 17, N 12. – P. 1700–1702.
16. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, N 17. – P. 17250–17259.
17. Cornish-Bowden A. / Fundamentals of enzyme kinetics // Great Britain by the University Press, Cambridge. 2002. – 344 p.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 1. – 392 с.

Отримано 27.07.2005