

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ КРЕАТИНКИНАЗЫ ПЛАЦЕНТЫ И МОЗГА

Л. С. НЕРСЕОВА, С. А. КОСЯН, Ж. И. АКОНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что характер кинетики обратной реакции при изучении зависимости ее скорости от концентрации ADP зависит от pH для КК как плаценты, так и мозга. При pH 6,5—6,8 K_m для ADP равны 0,83 и 0,67 мМ и для креатинфосфата 1,00 и 0,91 мМ для КК плаценты и мозга соответственно. При хранении КК плаценты более стабильна, чем фермент мозга. Термостабильность КК плаценты—низкая; ADP защищает фермент от термoinактивации. Сделан вывод, что КК плаценты—трансформированная, более стабильная форма ВВ-изофермента.

Ցույց է արվել, որ նեոսպարմ սեպկցիայի կրեատինկազի ընդդիր, ADP-ի խոտ-
թյունից կրկ առաջացած կախումը սուստանսիբիլիա, կախված է ինչպես ընկեր-
քի, արժանի է ուղեղի ԿԿ-ի pH-ից, pH 6,5—6,8-ի դեպքում K_m -ները ADP-ի
համար կազմում են 0,83 և 0,67 միկրոմոլ, կրեատինֆոսֆատի համար՝ 1,00 և
0,91 միկրոմոլ, համապատասխանորեն: Չնկերքի ԿԿ-ի սկստիֆոսֆատը առանձին
ընթացքով ապար կայուն է ձեռով, բան ունեղին: Շնորհի ԿԿ-ի ջերմադիմադ-
րունկությունը թույլ է ADP-ի ֆերմենտը պաշտպանում է ջերմային ինակտիվա-
ցումից: Իզոակտիվություն է արվել, որ ընկերքի ֆերմենտը ВВ իզոֆերմենտի
արանֆորմացիան է:

It has been shown that the character of kinetics of reverse reaction dur-
ing the study of dependence of its rate on concentration of ADP de-
pends on pH for CK not only of placenta, but also of brain. At pH 6.5—
6.8 K_m values for ADP are 0.83 mM and 0.67 mM and for creatine phos-
phate—1.00 mM and 0.91 mM—for placental and brain creatine kinases
accordingly. At storage placental CK is more stable than the enzyme
from brain. Placental CK is distinguished with low thermostability. ADP
protects the enzyme from thermoinactivation. Comparative analysis of
the indicated properties of both enzymes proposes that placental CK is
the transformed form of ВВ isoenzyme.

Креатинкиназа—плацента—мозг.

Широкое распространение КК в тканях человека и животных и важная роль фермента в энергетическом метаболизме клетки показаны многими исследователями [2, 7]. Но наиболее изученным остается фермент из скелетных мышц—ММ-изофермент. В то же время КК внутренних органов (за исключением сердца) почти не изучена. Поэтому мы получили гомогенный препарат КК плаценты рожеиц, изучили некоторые физико-химические свойства его. Оказалось, что КК плаценты по своим свойствам близка к мозговой КК (ВВ-изоферменту), но имеются и некоторые отличия. Было высказано предположение, что фермент плаценты—трансформированная форма ВВ-изофермента [5]. Целью настоящей работы являлось изучение каталитических

Сокращения: КК—креатинкиназа; ADP—аденозидифосфорная кислота; ДТТ—дитиотрейтол; ЭЦТА—этилендиаминотетраацетат; K_m —кон. Михаэлиса

свойств и стабильности КК плаценты в сравнении с КК мозга кролика, как наиболее изученным ВВ изоферментом.

Материал и методика. КК из плаценты и мозга кролика выделяли согласно методу [5]. Удельная активность препаратов плаценты и мозга была равна $2,6 \pm 0,5$ и 139 ± 28 мкм/мг.мин соответственно. Гомогениность полученных препаратов контролировали электрофорезом в ПААГ. Препараты фермента хранили в 0,05 М три-ацетатном буфере, содержащем 5 мМ ДТТ и 0,05 мМ ЭДТА при -20° . Об активности КК судили по накоплению креатина в обратной реакции с использованием α -нафтола и диацетила. Содержание белка определяли по Лоури. Для изучения термостабильности фермент преинкубировали при соответствующих температурах в течение 15 мин в 0,05 М три-ацетатном буфере (рН 7,0), содержащем 2 мМ ДТТ, затем определяли остаточную активность.

Результаты и обсуждение. Зависимость скорости реакции от концентрации одного из субстратов исследовали на фоне постоянной избыточной концентрации другого субстрата при рН 6,5–6,8, оптимальной для данной реакции, и рН 7,5–8,0, близкой к физиологической. При варьировании концентрации нуклеотидного субстрата соотношение Mg,ADP–3:1 сохранялось постоянным. Анализ данных зависимостей скорости реакции образования креатина от концентрации ADP показал, что характер ее кинетики зависит от рН. На рис. 1 представлены

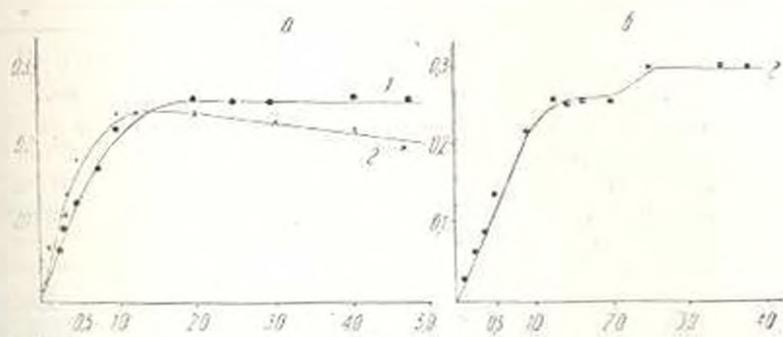


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации ADP для креатинкиназы плаценты (1) и мозга (2) при рН 6,8 (а) и 8,0 (б). По оси абсцисс—концентрация ADP в мМ, по оси ординат—скорость реакции в ед. опт. пл., E_{520}

типичные кривые этих зависимостей. При рН 6,5–6,8 зависимость скорости от концентрации нуклеотидного субстрата выражается гиперболой как для фермента плаценты, так и для фермента мозга. При концентрациях нуклеотидного субстрата больше 1,5 мМ для фермента мозга наблюдается ингибирование реакции. В двойных обратных координатах были получены следующие величины K_m для ADP: 0,83 мМ и 0,67 мМ для КК плаценты и мозга соответственно. При рН 8,0 зависимость скоростей обратной реакции от концентрации ADP характеризуется кривой с промежуточным плато в области концентраций 1–2 мМ субстрата для фермента из мозга кролика и сложной кривой для фермента плаценты. Такой характер кинетики реакции может быть связан с присутствием в растворе при рН 8,0 двух (и более для плаценты)

форм фермента, например, димера и мономера, как это было показано в случае с мышечной креатинкиназой [4, 6]. Зависимость скоростей обратной реакции от концентрации креатинфосфата для КК плаценты и мозга при pH 6,5—6,8 подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, и величины K_m для креатинфосфата равны 1,0 и 0,91 мМ для ферментов из плаценты и мозга соответственно.

Исследование зависимости скорости обратной реакции от концентрации металла-активатора (Mg) показало, что как с ферментом плаценты, так и с ферментом мозга реакция протекает и без добавления ионов Mg в реакционную среду, и скорость ее значительная—более 50% от максимальной скорости (рис. 2). Аналогичные данные были

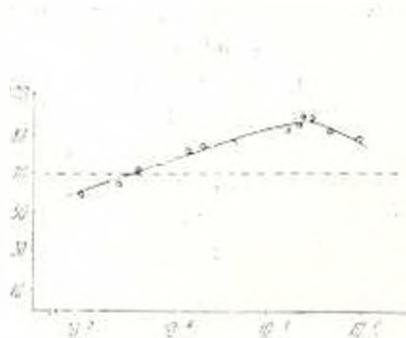


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость скорости реакции (%) от концентрации ионов Mg (мМ) для креатинкиназы плаценты.

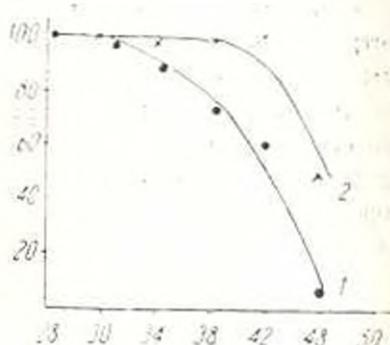


Рис. 3.

Рис. 3. Термостабильность креатинкиназы плаценты в отсутствие (1) и в присутствии ADP (2). По оси абсцисс—температура прединкубации, по оси ординат—остаточная активность в %.

получены для КК сердца [3]. Это явление имеет место независимо от партии исходного препарата фермента и компонентов реакционной смеси. При добавлении ЭДТА в реакционную среду вплоть до концентрации 10^{-4} М сохраняется та же величина остаточной активности (около 50%) как для КК плаценты, так и мозга, независимо от концентрации ЭДТА. При концентрациях ЭДТА выше $1 \cdot 10^{-4}$ М активность фермента резко падает почти до 0. Ранее [1, 9, 10] отмечалось незначительное влияние ионов Mg на связывание нуклеотидных субстратов и их аналогов с мышечной КК, однако этот вопрос требует специального исследования.

В процессе изучения стабильности фермента при хранении выяснилось, что замороженные концентрированные растворы КК плаценты сохраняют исходную активность без значительного изменения в течение 5—6 месяцев, в то время как активность препаратов КК мозга уже в первые месяцы хранения заметно снижается. Для разбавленных препаратов КК мозга наблюдаются колебания активности в зависимости от времени их хранения при 4°. Препараты КК мозга, разбавленные сразу после размораживания, обычно имеют более низкую активность, чем препараты, выдержанные 2—3 суток при 4°. В то же время

исходная активность разбавленных препаратов КК плаценты в тех же условиях сохраняется около недели, а иногда и более, и не подвержена колебаниям. Зависимость удельной активности фермента мозга от его концентрации имела сложный характер, и выявить определенную закономерность не удалось. По-видимому, колебания активности связаны с процессами ассоциации-диссоциации субъединиц фермента и высокой лабильностью мономеров.

Как видно из рис. 3, КК плаценты чувствительна к действию высоких температур. Уже при температуре 42° активность ее падает более чем на 30%, а при 46° остаточная активность составляет лишь 7%, в то время как КК мозга кролика при 46° сохраняет 50% активности [8]. Присутствие АДФ значительно защищает фермент от инактивации.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что близкие по своим свойствам КК плаценты и мозга имеют и определенные различия. КК плаценты более устойчива к регулирующим активность воздействиям (изменения концентрации нуклеотидного субстрата, рН среды, процессы ассоциации-диссоциации), чем фермент мозга. Это свидетельствует в пользу предположения, что КК плаценты — трансформированная, более стабильная форма изофермента ВВ [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бунева В. Н., Гершкова Н. Н., Лаврик О. Н. и др. Молекулярная биология, 11, 6, 1308—1312, 1980.
2. Лызлова С. П. Фосфокиназы. Л., 1974.
3. Меликсетян Г. О., Мкртчян Э. С., Аюбян Ж. И. Вопр. мед. химии, 33, 2, 112—115, 1987.
4. Невинский Г. А., Анкилова В. П., Лаврик О. Н. и др. Биохимия, 18, 2, 339—349, 1983.
5. Нерсесова Л. С., Косян С. А., Аюбян Ж. И. Журн. энол. биох. и физиол., 22, 1, 89—91, 1986.
6. Четаерикова Е. П., Роланов Н. А. Биохимия, 42, 3, 481—489, 1977.
7. Vais R., Edwards J. B. CRC Critical Rev. in Clin. Lab. Sciences, 16, 6, 291—335, 1982.
8. Dawson D. M., Eppenberger H. M., Kaplan N. O. J. Biol. Chem., 242, 1, 210—217, 1967.
9. McLaughlin A. C. J. Biol. Chem., 249, 1445—1452, 1974.
10. Morrison J. F., Sullivan W. J., Ogston A. G. Bioch. Biophys. Acta, 51, 1, 82—96, 1961.

Поступило 21.IV 1988 г.