

УДК 577.159

## ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ И КОНСТАНТУ РАВНОВЕСИЯ РЕАКЦИИ

Е. П. ЧЕТВЕРИКОВА, Л. Л. АЛИЕВСКАЯ и А. В. КРИНСКАЯ

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

Изучали действие кальция и магния на активность креатинкиназы миофибрилл, выделенных из скелетной и сердечной мышц крыс. Кальций слабее активирует креатинкиназу миофибрилл, чем магний, что связано с непосредственным угнетающим действием  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии магния. Угнетающее действие кальция в присутствии высоких концентраций магния наблюдается и на креатинкиназе, выделенной из скелетных мышц. Оно усиливается после старения фермента или преникубации его с  $\text{KCl}$  или  $\text{NaCl}$ . Уменьшение кажущейся константы равновесия реакции под влиянием низких концентраций кальция не проявляется в присутствии магния.

Креатинкиназа играет важную роль в энергетике мышечного сокращения, обеспечивая ресинтез АТФ. Она активируется двухвалентными металлами — магнием, кальцием и марганцем. Считают, что роль металлов-активаторов состоит в образовании субстратов-комплексов с АТФ или АДФ [1—3]. Из перечисленных трех катионов меньше всего изучен и является наихудшим активатором кальций [4], причем причина слабой активации неясна. В связи с этим было предпринято исследование влияния кальция (и магния) на активность креатинкиназы и константу равновесия реакции.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили на гомогенном препарате креатинкиназы, выделенной из скелетных мышц кролика по методу [5], и на миофибриллах из сердечных и скелетных мышц крыс. Для выделения миофибрилл мышцы гомогенизировали в 0,025 М трис- $\text{HCl}$ -буфере с 2 мМ ЭДТА, миофибриллы осаждали при 1000 g, суспендировали в этом же буфере и снова осаждали при 6000 g. Промывание повторяли 5 раз до почти полного исчезновения креатинкиназной активности в промывных водах. Креатинкиназную активность в отмытых миофибриллах или экстрактах из них определяли по образованию креатина [6]. Содержание белка определяли биуретовым методом [7].

Активность очищенной креатинкиназы определяли по прямой реакции ( $\text{АТФ} + \text{креатин} \rightarrow \text{АДФ} + \text{креатинфосфат}$ ), образовавшийся креатинфосфат (Фкр) — по реакции со щелочным пикратом [6]. В этом случае реактивы, в том числе раствор АТФ, креатина и фермента обрабатывали катионитом Дауэкс-50 в натриевой форме.

Для расчета константы равновесия несколько раз (через 10, 15 и 20 мин) определяли образование Фкр в инкубационной смеси, содержащей 1 мкмоль АТФ, 24 мкмоль креатина, то или иное количество двухвалентного иона и 1 мкг фермента при 30°. Убедившись в том, что система находится в состоянии равновесия, из содержания Фкр в смеси рассчитывали концентрацию АДФ, АТФ и креатина.

Концентрации свободных  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  при их совместном присутствии в пробе с нуклеотидом рассчитывали, решая графическим методом систему уравнений:

$$K_{\text{Mg}} = \frac{(\text{Mg}_{\text{об}} - x)(\text{A}_{\text{об}} - x - y)}{x} \quad \text{и} \quad K_{\text{Ca}} = \frac{(\text{Ca}_{\text{об}} - y)(\text{A}_{\text{об}} - x - y)}{y},$$

где  $\text{MgA}$  обозначено через  $x$ ;  $\text{CaA}$  — через  $y$  и концентрация АТФ или АДФ — через  $A$ .

По такому же принципу рассчитывали концентрации комплексов металла с нуклеотидом при одновременном присутствии АТФ и АДФ. Использовали следующие константы стабильности комплексов, полученные в условиях, близких к нашим [8, 9]:  $\text{MgA}$  АТФ —  $11\,000 \text{ M}^{-1}$ ,  $\text{MgA}$  АДФ —  $1000 \text{ M}^{-1}$ ,  $\text{CaA}$  АТФ —  $5000 \text{ M}^{-1}$ ,  $\text{CaA}$  АДФ —  $600 \text{ M}^{-1}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние кальция на активность креатинкиназы.** Из табл. 1 можно видеть, что в промытых сердечных миофибриллах активность креатинкиназы значительно выше, чем в скелетных. Это связано с тем, что креатинкиназа слабо связана с миофибриллами скелетной мышцы. Креатинкиназа миофибрилл и экстрактов из них значительно сильнее активируется  $Mg^{2+}$ , чем  $Ca^{2+}$  (табл. 1). Это справедливо для хорошо отмытых миофибрилл и из скелетной, и из сердечной мышцы.

Таблица 1

**Влияние двухвалентных катионов на удельную активность креатинкиназы миофибрилл**  
(мкмоль креатина на мг белка в мин)

Препарат	Без катиона	$Mg^{2+}$ , mM		$Ca^{2+}$ , mM
		5	10	5
Сердечная мышца				
Миофибриллы	0,03	0,43	0,58	0,14
Экстракт 0,92 M KCl	0,18	1,85	1,67	0,65
Экстракт фосфатный (0,02 M)	0,28	3,13	3,07	0,82
Скелетная мышца				
Миофибриллы	—	0,05	0,05	0,03
Экстракт 0,92 M KCl	—	0,16	0,12	0,06
Экстракт фосфатный (0,02 M)	—	0,80	0,65	0,30

Таблица 2

**Влияние кальция на удельную активность креатинкиназы миофибрилл в присутствии 5 mM магния**  
(мкмоль креатина на мг белка в мин)

Препарат	$Ca^{2+}$ , mM			
	0	0,25	1	5
Сердечная мышца				
Миофибриллы	0,31	0,22	0,22	—
Экстракт 0,92 M KCl	2,10	1,70	1,25	1,45
Экстракт фосфатный (0,02 M)	3,25	2,15	1,55	1,35
Скелетная мышца				
Экстракт 0,92 M KCl	0,16	0,12	0,10	0,07
Экстракт фосфатный (0,02 M)	0,80	0,50	0,45	0,25

Концентрации  $MgADP$  и  $CaADP$  в присутствии 5 mM катиона были почти одинаковы в опытах, представленных в табл. 1 (0,81 mM и 0,72 mM соответственно). Следовательно, разная скорость реакции зависела не от разной концентрации субстрата, а от других причин, возможно, от непосредственного угнетающего действия кальция на фермент.

Для выяснения этого вопроса были поставлены опыты, в которых действие кальция исследовалось на фоне оптимальной концентрации магния как активатора. Как видно из табл. 2, добавление кальция в присутствии 5 mM магния к миофибриллам или экстрактам из них приводит к уменьшению креатинкиназной активности.

При добавлении в пробу 0,25 mM  $Ca^{2+}$  этот катион является только ингибитором, так как не принимает участия в образовании субстрата реакции (концентрация  $CaADP$  0,02 mM по сравнению с 0,80 mM  $MgADP$ ). Кальций в концентрации 1 mM тоже приблизительно можно считать только ингибитором. Большая концентрация (5 mM) имеет смешанный механизм действия, так как кальций конкурирует с  $Mg^{2+}$  за ADP и одновременно в виде свободного катиона угнетает фермент.

Влияние кальция было исследовано и на креатинкиназе, выделенной из скелетной мышцы. Оказалось, что 1—2 мМ  $\text{CaCl}_2$  на 10—30% угнетает реакцию образования АТФ и креатина на фоне 10 мМ магния (рис. 1, кривые 1). Чувствительность креатинкиназы к меньшим концентрациям кальция зависит от конформации белка, которая изменяется по мере хранения препарата. Свежие препараты фермента не угнетаются концентрациями ионов кальция, меньшими чем  $10^{-3}$  М; постаревшие препараты более чувствительны. На рис. 1, А (кривая 1) показаны ре-

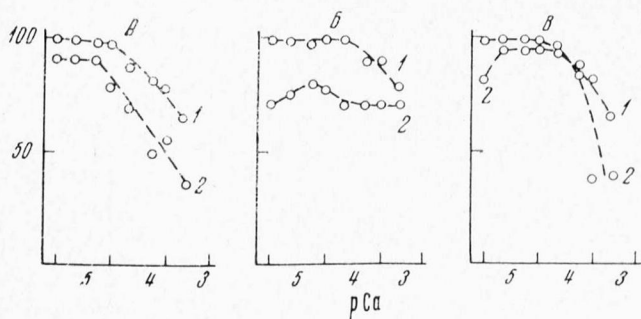


Рис. 1. Влияние кальция на скорость образования креатина

Пробы содержали 3 мкмоль креатинфосфата 1 мкмоль АДФ, 10 мкмоль ацетата магния и 1 мкг фермента в 1 мл трис-ацетатного буфера, pH 7,9. По ординате — величина ферментативной активности, % к пробам без кальция. 1 — преинкубация в буфере; 2 — преинкубация в буфере с раствором соли; А — постаревший фермент, преинкубация с 0,1 М KCl; Б — сильно постаревший фермент, преинкубация с 0,1 М NaCl

зультаты, полученные на нескольких препаратах креатинкиназы, хранившихся в холодильнике при 20° в течение 15—30 дней. Можно видеть, что 0,2—0,5 мМ Са оказывают угнетающее влияние на активность фермента на фоне магния как активатора. В этом случае кальций оказывает непосредственное воздействие на белок и образует лишь незначительные количества СаАДФ.

В связи с тем, что чувствительность к ионам кальция у свежего фермента, выделенного из скелетных мышц, несколько меньше, чем у миофибрилл, было исследовано влияние преинкубации с KCl на действие кальция (экстрагировали миофибриллы растворами, содержащими калий). Фермент (0,2 мг) инкубировали 10 мин с 0,1 М KCl, и затем определяли его активность в присутствии той или иной концентрации кальция. Оказалось, что преинкубация с KCl увеличивает чувствительность креатинкиназы к ионам кальция и угнетающее действие последних проявляется уже в концентрациях  $10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-5}$  М на разных препаратах в разной степени (рис. 1, А и Б, кривые 2). Влияние высоких концентраций кальция ( $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М) также усиливается. Преинкубация в 0,1 М NaCl действует аналогичным образом, но слабее (рис. 1, В).

Во многих опытах наблюдались два максимума угнетающего действия ионов кальция после преинкубации в солевых растворах — в области низких ( $10^{-5}$  М) и высоких ( $10^{-3}$  М) концентраций (рис. 1, Б и В, кривые 2).

Преинкубация креатинкиназы с KCl не изменяет активности нативного фермента и уменьшает ее у постаревшего белка (табл. 3). У сильно постаревших препаратов фермента, потерявших большую часть ферментативной активности, преинкубация с KCl вызывает восстановление активности, иногда полное (табл. 3).

Влияние калия на чувствительность креатинкиназы к ионам кальция не зависит от характера влияния калия на величину ферментативной активности белка.

**Влияние преинкубации в солевых растворах на активность креатинкиназы  
из скелетных мышц**

Активность выражена в мкмоль креатина на 10 мкг белка за 2 мин инкубации

Препарат фермента	Преинкубация		Препарат фермента	Преинкубация	
	в трис-бу- фере	в буфере и 0,1 М KCl		в трис-бу- фере	в буфере и 0,1 М KCl
Нативный (не более 10 дней хранения при $-20^{\circ}$ )	1,42	1,10	Постаревший (15— 30 дней хранения при $-20^{\circ}$ )	0,78	0,63
	1,10	1,20		0,62	0,46
	1,20	1,20			
	1,20	1,20			
Постаревший (15— 30 дней хранения при $-20^{\circ}$ )	1,04	0,55	Сильно постаревший	0,30	0,86
	0,71	—		0,25	1,90
				0,19	0,40

В ряде опытов исследовали действие кальция на реакцию образования креатинфосфата. Было показано, что в этом случае также наблюдается незначительное торможение реакции 0,1—0,24 мМ  $\text{CaCl}_2$  на фоне значительного избытка ионов магния как активатора (рис. 2).

**Влияние кальция и магния на константу равновесия реакции.** Нода и соавторы [10, 11] показали, что кажущаяся константа равновесия креатинкиназной реакции  $K'$  сильно зависит от концентрации водородных ионов и слабее — от концентрации магния, увеличение которой уменьшает  $K'$ . Уменьшение  $K'$  при возрастании концентрации Mg, Ca и Mn наблюдали и другие авторы [12], причем в присутствии высоких концентраций катионов низкая величина  $K'$  становилась независимой от концентрации ионов металлов [12, 13].

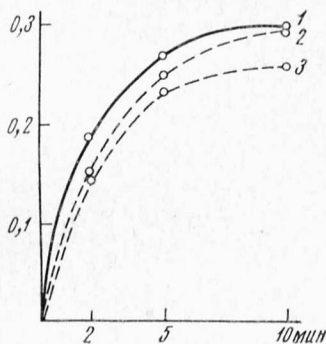


Рис. 2. Влияние кальция на реакцию образования креатинфосфата

Пробы содержали 1 мкмоль АТФ, 2 мкмоль ацетата магния, 20 мкмоль креатина в 1 мл трис-НСl-буфера, pH 7,2. 1 — без кальция; 2 — 0,1 мМ кальция; 3 — 0,25 мМ кальция

В наших опытах увеличение концентрации двухвалентных катионов в пределах  $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М уменьшает  $K'$  (табл. 4 и 5). Понижение  $K'$  происходит в результате увеличения концентрации субстрата обратной реакции (MeАДФ) в пробе. В присутствии больших концентраций  $\text{Me}^{2+}$ , превышающих концентрацию нуклеотида, конкуренция между АДФ и АТФ за катион уменьшается и ослабевает зависимость  $K'$  от концентрации металла. Полученные нами величины  $K'$  совпали с данными других авторов [11].

Константа равновесия, рассчитанная на основании представления о комплексе металла и нуклеотида как субстрате креатинкиназной реакции, при pH 8 не зависела от концентрации катиона [12]. Нами получены такие же результаты (табл. 4 и 5), за исключением самой низкой концентрации Са. Как можно видеть из табл. 4, в присутствии магния действие кальция на  $K'$  проявляется значительно слабее. Так, увеличение концентрации кальция в 10 раз (с 0,1 до 1 мМ) уменьшает  $K'$  в 4 раза. Такое же увеличение концентрации кальция на фоне 2 мМ магния уменьшает  $K'$  только на 40%, так как само присутствие магния сдвигает равновесие в сторону обратной реакции.

Проведенные опыты показали, что кальций в концентрациях  $1 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-3}$  М оказывает тормозящее влияние на креатинкиназу, когда субстратами служат MgАДФ или MgАТФ и в инкубационной смеси нахо-

Таблица 4

**Влияние кальция на константу равновесия креатинкиназной  
реакции при pH 7,0**

Ca <sup>2+</sup> , мМ	$K' = \frac{[\text{Фкр}][\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}][\text{креатин}]}$		Равновесные концентрации, мМ		$K = \frac{[\text{Фкр}]}{[\text{СаАТФ}]} \cdot \frac{[\text{СаАДФ}]}{[\text{креатин}]}$
	без Mg	в присутствии 1 мМ Mg <sup>2+</sup>	СаАТФ	СаАДФ	
0,1	0,012	0,005	0,07	0,002	0,0004
0,25	0,009	—	0,17	0,014	0,0012
0,5	0,005	0,004	0,28	0,030	0,0012
1,0	0,003	0,003	0,47	0,040	0,0008
2,0	0,002	0,0025	0,60	0,070	0,0010

Таблица 5

**Влияние магния на константу равновесия  
креатинкиназной реакции при pH 7,0**

Mg, мМ	K'	Равновесные концентрации, мМ		K
		MgАТФ	MgАДФ	
0,1	0,025	0,07	0,01	0,0025
0,3	0,015	0,2	0,02	0,0021
1,0	0,010	0,43	0,12	0,0030
3,0	0,004	0,62	0,17	0,0029
10,0	0,003	0,67	0,21	0,0030

дится большое количество ионов магния. Угнетающее влияние кальция можно наблюдать на ферменте, выделенном из скелетной мышцы, и на креатинкиназе, находящейся в сердечных или скелетных миофибриллах в комплексе с сократительными белками. Ранее было установлено угнетающее действие высоких концентраций ионов кальция, порядка  $10^{-3}$ — $10^{-2}$  М [4]. Было отмечено, что угнетение зависит от соотношения концентраций кальция и фермента [14].

Полученные нами результаты позволяют предполагать, что креатинкиназа имеет разные контактные участки для связывания ионов кальция и магния, так как последний не препятствует тормозящему действию кальция даже в 100-кратном избытке. Этот вывод согласуется с результатами исследований Флойда и Фридберга [15], которые изучали связывание катионов креатинкиназой и показали, что магний и кальций присоединяются к разным участкам белка. Эти авторы нашли, что при pH 7,0 креатинкиназа связывает по два катиона кальция и магния на молекулу, причем кальций связывается несколько сильнее.

Чувствительность креатинкиназы к ионам кальция увеличивается после старения фермента и преенкубации его с одноосновными солями — 0,1 М KCl или NaCl (рис. 1). По-видимому, изменение конформации белка в результате старения или воздействия солей открывает новые контактные участки для ионов кальция. Интересно, что креатинкиназа избирательно связывает большое количество ионов калия [15].

В регуляции креатинкиназной реакции *in vitro* кальций участвует тремя путями. Как и магний, он может быть активатором (табл. 1), образуя субстраты реакции в комплексе с нуклеотидами. Кальций является ингибитором, обладая непосредственным действием на белок. Поскольку способность кальция быть ингибитором проявляется в концентрациях меньших, чем его «субстратные» количества, некоторое угнетение всегда сопутствует активации и создается впечатление, что кальций — плохой активатор. И, наконец, увеличение концентрации кальция, как и магния,



сдвигает равновесие креатинкиназной реакции в сторону образования АТФ. Как и следовало ожидать, ионы кальция не обладают специфическим действием в этом отношении и на фоне больших количеств магния действие его низких концентраций на  $K'$  теряется (табл. 4).

В мышечной клетке реализуются не все из перечисленных путей действия кальция. Этот катион не может образовывать субстраты реакции и влиять на константу равновесия реакции, так как его концентрация в саркоплазме и миофибриллах мала по сравнению с магнием [16, 17]. Непосредственное угнетающее действие ионов кальция на креатинкиназу может реализоваться в клетке. Во время сокращения возможна концентрация  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-5}$  М [17, 18], и в клетке присутствуют необходимые для действия таких концентраций кальция ионы калия и натрия.

Авторы выражают благодарность В. И. Кринскому за консультацию по графическому методу расчета концентраций хелатных комплексов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kuby S. A., Noda L., Lardy H. A., J. Biol. Chem., **210**, 65, 1954
2. Noda L., Nihel T., Morales M. F., J. Biol. Chem., **235**, 2830, 1960
3. Morrison J. F., James E., Biochem. J., **97**, 37, 1965
4. Morrison J. F., Uhr M. L., Biochim. et biophys. acta, **122**, 57, 1966
5. Четверикова Е. П., Кринская А. В., Розанова Н. А., Рыбина В. В., Алиевская Л. Л., Биохимия, **35**, 953, 1970
6. Четверикова Е. П., Биофизика, **13**, 864, 1968
7. Gornall A. G., Bardavill C. J., David M., J. Biol. Chem., **177**, 751, 1949
8. Nanninga L. B., Biochim et biophys. acta, **54**, 330, 1964
9. Hommes G. G., Hurst J. K., Biochemistry, **8**, 1083, 1969
10. Noda L., Kuby S. A., Lardy H. A., J. Biol. Chem., **210**, 83, 1954
11. Nihei T., Noda L., Morales M. F., J. Biol. Chem., **236**, 3203, 1961
12. Morrison J. F., White A., Europ. J. Biochem., **3**, 145, 1967
13. Askonas B. A., цит. по М. Диксон, Э. Уэбб. Ферменты, стр. 388, «Мир», М., 1966
14. Ennor A. H., Rosenberg H., Biochem. J., **57**, 203, 1954
15. Floyd B. F., Friedberg F., J. Biol. Chem., **241**, 5533, 1966
16. Hasselbach N., Federat. Proc., **23**, 909, 1964
17. Nanninga L. B., Biochim. et biophys. acta, **54**, 338, 1961
18. Weber A., Herz R., Reiss L., Federat. Proc., **23**, 896, 1964

Поступила в редакцию  
3.VI.1970

---

#### ACTION OF CALCIUM ON ACTIVITY OF CREATINE KINASE AND EQUILIBRIUM CONSTANT OF THE REACTION

*E. P. CHETVERIKOVA, L. L. ALIEVSKAYA and A. V. KRINSKAYA*

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino*

Action of calcium and magnesium on activity of creatine kinase of myofibrill isolated from skeletal and cardiac muscles of rat was studied. Calcium activates myofibrill creatine kinase not so strongly as magnesium which might be due to direct repressive action of  $\text{Ca}^{2+}$  on protein in presence of magnesium. Inhibiting action of calcium in presence of high concentrations of magnesium was also noted for creatine kinase isolated from skeletal muscles. It was enhanced with aging of the enzyme or after its pre-incubation with KCl or NaCl. Decrease of apparent reaction equilibrium constant under the action of low concentrations of calcium is not manifested in the presence of magnesium.