

УДК 576.343:546.26

О РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В МЕТАБОЛИТАХ ГЛИОКСИЛАТНОГО ЦИКЛА И ЦИКЛА КРЕБСА

А. А. ИВЛЕВ, Д. А. КНЯЗЕВ, А. Г. КАЛОШИН, Ю. Н. РАДЮКИН
(Кафедра неорганической химии)

Циклические процессы лежат в основе динамического (стационарного) состояния клетки. В соответствии с качественной моделью изотопного фракционирования [2] распределение изотопов углерода в метаболитах зависит от динамического состояния клетки и отражает особенности сопряжения катаболических и анаболических процессов. В связи с этим изучение внутримолекулярного распределения изотопов в метаболитах основных циклов имеет важное значение для понимания углеродного метаболизма и его регуляции.

В настоящей работе на основании сопоставления теоретически ожидаемого распределения изотопов углерода в метаболитах глиоксилатного цикла и цикла Кребса (в

соответствии с моделью [2]) и наблюдаемого распределения изотопов углерода в аминокислотах показано, что в фазу гликолиза синтез жирных кислот и метаболитов глиоксилатного цикла происходит во времени раньше, чем синтез метаболитов цикла Кребса и связанных с ним аминокислот, т. е. во время функционирования глиоксилатного цикла и синтеза жирных кислот функционирование цикла Кребса подавлено. В работе также рассматривается связь между стационарным распределением изотопов углерода в метаболитах и интенсивностью циклов.

Поскольку в конечном счете изотопная неоднородность метаболитов определяется изотопными различиями поступающих в

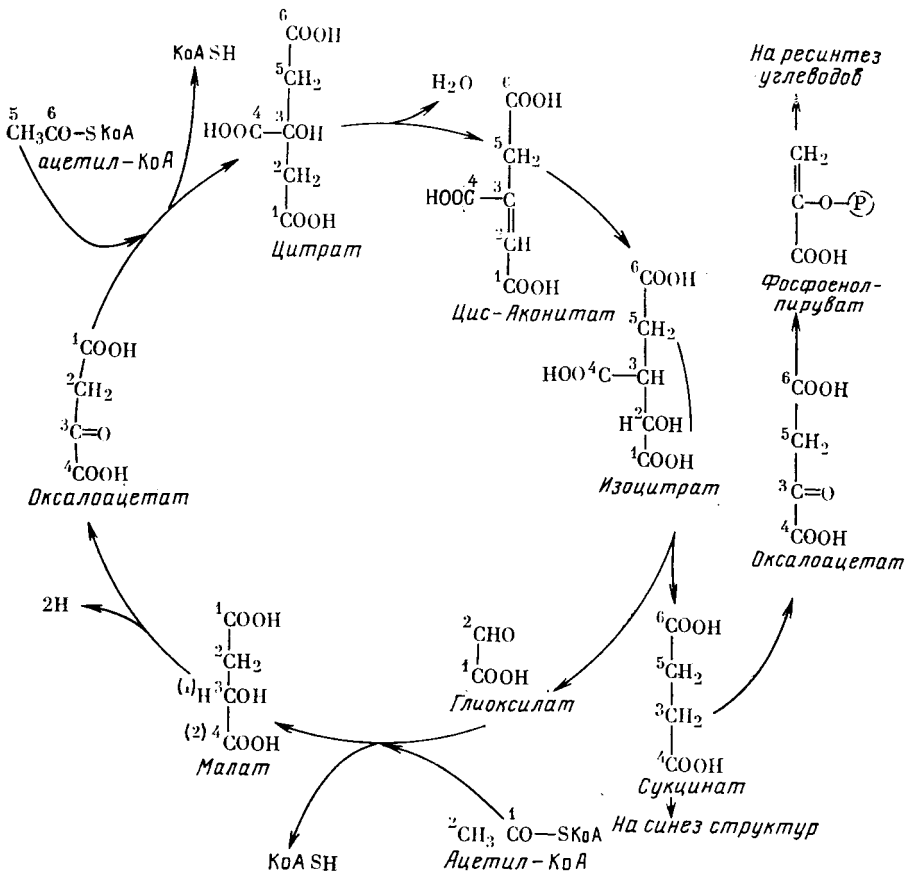


Рис. 1. Схема перемещения углеродных атомов в глиоксилатном цикле. Для наглядности атомы одинакового изотопного состава в ацетил-КоА имеют разную нумерацию.

цикл субстратов [7], необходимо выяснить распределение изотопов в продуктах реакции декарбоксилирования пирувата, которые питают оба цикла.

Как отмечалось ранее [5], распределение изотопов углерода в продуктах реакции декарбоксилирования пирувата обусловлено кинетическими изотопными эффектами, сопровождающими эту реакцию. В результате карбоксильный атом углерода ацетил-КоА и образующаяся CO₂ обогащаются изотопом ¹²C, а атомы непрореагировавшего пирувата, соответствующие местам разрыва связи, — ¹³C. Изотопный состав атомов углерода в продуктах декарбоксилирования определяется соотношениями, показанными в [5].

Анализ изотопного распределения в метаболитах рассматриваемых циклов удобно провести в численном виде. Рассмотрим какой-нибудь конкретный пример. Так, заданы следующие параметры: кинетический изотопный эффект α, степень превращения пируватного пула F₁, изотопный состав углеродных атомов исходного пирувата. Пусть α=1,030, что соответствует области возможных значений кинетических изотопных эффектов для реакций декарбоксилиро-

вания [11]; F₁=0,6 (диапазон возможных колебаний F₁ от 0 до 1), изотопный состав исходной CO₂ для удобства примем равным 0‰, а атомов исходного пирувата — 20‰. Последнее означает, что изотопные эффекты при ассимиляции CO₂ равны 20‰ и фракционирования изотопов на метаболическом пути превращения крахмала в пируват не происходит [9]. Тогда, используя соответствующие соотношения [5], легко вычислить изотопный состав атомов в продуктах декарбоксилирования пирувата:

$$C_{(1)}H_3-C_{(2)}O-SK_0A: \delta^{13}C_{(1)C_2} = -19,6 \text{ ‰}; \delta^{13}C_{(2)C_2} = -37,8 \text{ ‰}$$

$$CO_2: \delta^{13}C_{CO_2} = -37,8 \text{ ‰}$$

$$C_{(1)}H_3-C_{(2)}O-C_{(3)}OOH: \delta^{13}C_{(1)C_3} = -20,6 \text{ ‰}; \delta^{13}C_{(2)C_3} = \delta^{13}C_{(3)C_3} + 6,7 \text{ ‰}$$

Перейдем теперь к анализу изотопного распределения углерода в метаболитах глиоксилатного цикла. Исходными субстратами для цикла в фазу гликолиза являются C₂-фрагменты, образующиеся при декарбоксилировании пирувата, характер рас-

пределаения изотопов которых аналогичен рассмотренному в примере. Ниже показано, что декарбоксилирование пирувата (назовем его первичным), происходящее одновременно с функционированием глиоксилатного цикла и синтезом жирных кислот и обеспечивающее их C_2 -фрагментами, удобно рассматривать отдельно от декарбоксилирования, происходящего позднее и снабжающего субстратами цикл Кребса.

Чтобы учесть влияние специфичности ферментативных превращений и перемешивание атомов в реакциях глиоксилатного цикла, пронумеруем атомы C_2 -фрагментов, входящих в цикл, как показано на рис. 1, и проследим за их перемещениями. По распределению атомов в молекулах нетрудно видеть, что уже на первом обороте в метаболитах цикла в каждом топологически определенном атоме устанавливается соотношение изотопов, аналогичное соотношению изотопов в соответствующем углеродном атоме C_2 -фрагментов. Причем такое распределение изотопов не зависит от последующих оборотов цикла. Оно характеризуется тем, что все карбоксильные атомы метаболитов наследуют карбоксильный углерод C_2 -фрагментов и обогащены легким изотопом, а углеродные атомы радикалов наследуют метильный углерод C_2 -фрагментов, изотопный состав которого при декарбоксилировании почти не меняется. Глиоксилатный цикл служит поставщиком различных промежуточных продуктов для синтеза углеродных скелетов многих важных компонентов растительной клетки, и, следовательно, изотопный состав этих компонентов будет более легкий, чем у фотосинтетической глюкозы.

Попутно заметим, что жирные кислоты, которые так же, как и метаболиты глиоксилатного цикла, синтезируются через C_2 -фрагменты, образующиеся при первичном декарбоксилировании пирувата, по изотопному составу близки к последним. Однако распределение изотопов в них иное, оно характеризуется чередованием «легких» (карбоксильный углерод C_2 -фрагментов) и «тяжелых» (метильный углерод C_2 -фрагментов) атомов, поскольку синтез жирных кислот идет путем конденсации C_2 -фрагментов по принципу «голова к хвосту» [1].

В фазу глюконеогенеза через глиоксилатный цикл осуществляется липидно-углеводный обмен. Исходными субстратами, как и в фазу гликолиза, являются C_2 -фрагменты, образующиеся при β -окислении жирных кислот. Поскольку, как при синтезе жирных кислот, так и при их распаде перемешивания углеродных атомов не происходит, можно полагать, что распределение изотопов в C_2 -фрагментах, образующихся при β -окислении, такое же, как и при первичном декарбоксилировании пирувата. Следовательно, и распределение изотопов в C_4 -продуктах глиоксилатного цикла при глюконеогенезе такое же, как и при гликолизе. Знание этого позволяет определить изотопные распределения в фосфоенолпирувате и глюкозе ресинтеза, необходимые для построения динамической модели изотопного фракционирования [2].

Рассмотрим распределение изотопов углерода в метаболитах цикла Кребса в фазу гликолиза.

Как уже говорилось, мы приняли априорно следующую хронологию метаболических событий. Пока функционирует глиоксилатный цикл и происходит синтез липидов, цикл Кребса репрессирован. Образующиеся при первичном декарбоксилировании пирувата C_2 -фрагменты полностью расходуются на синтез липидов, а остаточный пируват запасается (вероятно, в виде аланина) в промежуточном фонде. Между синтезом липидов и циклом Кребса, по-видимому, существует регуляторная связь, которая по завершении синтеза липидов запускает цикл Кребса. При этом аланин промежуточного фонда вновь превращается в пируват, который подвергается декарбоксилированию, которое мы называем вторичным. Продукты вторичного декарбоксилирования — CO_2 , C_2 и C_3 -фрагменты — являются исходными субстратами для цикла Кребса.

Покажем теперь, что только такая последовательность метаболических процессов обеспечивает соответствие теоретического распределения изотопов углерода в аминокислотах, связанных с метаболитами цикла Кребса, и экспериментально изученного распределения изотопов в тех же аминокислотах, выделенных из белковой фракции ряда фотосинтезирующих микроорганизмов [9]. Для этого вначале необходимо оценить изотопное распределение в поступающих в цикл субстратах, а затем, проследив за перемещением атомов, учитывая специфичность ферментативных взаимодействий и перемешивание атомов в реакциях цикла, определить изотопное распределение в метаболитах цикла.

Оценка изотопного распределения в исходных субстратах цикла Кребса, как и в случае первичного декарбоксилирования пирувата, проводилась с использованием соотношений, полученных в [5]. Однако учитывая, что неравномерное изотопное распределение в исходном пирувате — результат изотопного эффекта, сопровождающего первичное декарбоксилирование.

Степень превращения пирувата при вторичном декарбоксилировании определяется как соотношение

$$F = \frac{n_{C_2}}{n_{C_2} + n_{C_3}},$$

где n_{C_2} и n_{C_3} — количества C_2 - и C_3 -фрагментов, поступающих в цикл Кребса после вторичного декарбоксилирования. Если принять n_{C_3} за 1, то n_{C_2} соответствует числу C_2 -фрагментов, приходящихся на каждый C_3 -фрагмент, поступающий в цикл. Это отношение не только задает размеры внутримолекулярных изотопных различий в исходных субстратах, но и интенсивность работы цикла Кребса. В самом деле, так как за один полный оборот цикла в направлении α -кетоглутаровой кислоты (рис. 2) в него поступает один C_2 -фрагмент (соответственно выделяются две молекулы CO_2), то отношение числа C_2 -

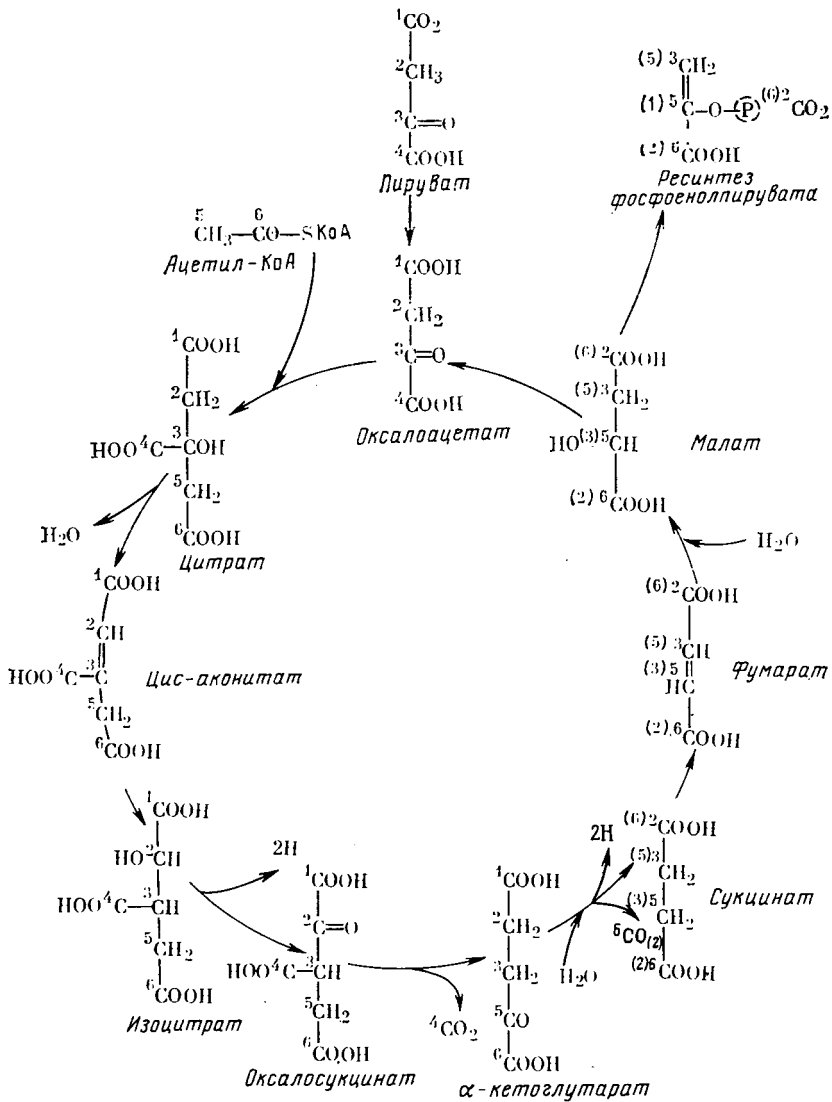


Рис. 2. Схема перемещения углеродных атомов в цикле Кребса.

фрагментов к числу C₃-фрагментов определяет количество оборотов, которое совершает цикл, прежде чем поступившие в него субстраты израсходуются на окисление и биосинтез. Например, степень превращения $F=0,9$ отвечает соотношению C₂- и C₃-фрагментов, поступающих в цикл, 9:1, т. е. за время прохождения потока углерода через цикл совершается 9 оборотов.

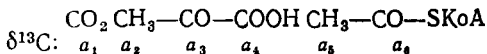
Пронумеруем атомы углерода в поступающих в цикл субстратах, как показано на рис. 2 (нумерация атомов дана для одного оборота). Тогда легко видеть, что в ходе превращений вначале отщепляется атом 4, соответствующий карбоксильному углероду пирувата, а затем — атом 1, относящийся к молекуле CO₂. На последующих оборотах, если нет подпитки пируватом, отщепляются соответственно карбоксильные

атомы оксалоацетата. В реакциях, связанных с превращениями дикарбоновых кислот сукцината и фумарата, благодаря наличию пулов симметричных кислот, неспособности сукцинатадегидрогеназы различать карбоксильные группы сукцината, а также благодаря обратимости реакций происходит попарное перемешивание атомов 2 и 6, 3 и 5, что отражено на схеме двойной нумерацией.

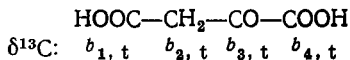
Для аналитического описания распределения изотопов углерода в метаболитах цикла Кребса и зависимости изотопного распределения от числа оборотов цикла воспользуемся очевидными соотношениями изотопного баланса.

Введем буквенные обозначения изотопного состава углеродных атомов: для продуктов декарбоксилирования пи-

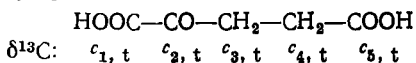
рувата



для изотопного состава углеродных атомов оксалоацетата — предшественника семейства аминокислот — на *t*-обороте обозначим



для изотопного состава углеродных атомов другого метаболита, также предшественника семейства аминокислот — α -кетоглутарата



Тогда можно записать связь между изотопным составом углеродных атомов оксалоацетата и углеродных атомов исходных субстратов следующим образом:

$$\begin{aligned} \text{для } t=1 & \qquad \qquad \text{для } t>1 \\ b_{1,1} &= 0,5(a_2 + a_6) & b_{1,t} &= 0,5(b_{1,t-1} + a_6) \\ b_{2,1} &= 0,5(a_3 + a_5) & b_{2,t} &= 0,5(b_{2,t-1} + a_5) \\ b_{3,1} &= b_{2,1} & b_{3,t} &= b_{2,t} \\ b_{4,1} &= b_{1,1} & b_{4,t} &= b_{1,t} \end{aligned}$$

Аналогичная связь для α -кетоглутарата:

$$c_{1,t} = b_{1,t-1}; \quad c_{2,t} = b_{2,t-1}; \quad c_{3,t} = b_{3,t-1};$$

$$c_{4,t} = a_5; \quad c_{5,t} = a_6.$$

Иллюстрируя связь изотопного распределения углерода в метаболитах цикла Кребса с количеством оборотов цикла, рассмотрим численный пример.

Пусть пируват после первичного декарбоксилирования характеризуется следующим распределением изотопов (см. выше):

$$\begin{aligned} \delta^{13}\text{C}(1)\text{C}_3 &= -20,6\%_0; & \delta^{13}\text{C}(2)\text{C}_3 &= \\ &= \delta^{13}\text{C}(3)\text{C}_3 &= +6,7\%_0 \end{aligned}$$

Примем, что α при вторичном декарбоксилировании пирувата такой же, как и при первичном, т. е. $\alpha=1,030$, а отношение $n_{\text{C}_2}:n_{\text{C}_3}=9:1$ ($F_2=0,9$). Получим, что у исходных субстратов цикла Кребса, образующихся при вторичном декарбоксилировании, распределение следующее:

$$\begin{aligned} \text{CO}_2: \delta^{13}\text{CCO}_2 &= -0,9\%_0 \\ \text{CH}_3\text{—COSKoA}: \delta^{13}\text{C}(1)\text{C}_2 &= -20,4\%_0, \\ & \delta^{13}\text{C}(2)\text{C}_2 &= -0,9\%_0 \\ \text{CH}_3\text{—CO—COOH}: \delta^{13}\text{C}(1)\text{C}_2 &= -22,2\%_0, \\ & \delta^{13}\text{C}(2)\text{C}_2 &= \delta^{13}\text{C}(3)\text{C}_2 &= +75,3\%_0. \end{aligned}$$

Воспользовавшись приведенными выше соотношениями, получим зависимость изотопного распределения в основных метаболитах цикла — оксалоацетате (ОА) и α -кетоглутарате (α -КГ), с которыми связан синтез аминокислот, от числа оборотов цикла. Результаты представлены в табл. 1. Анализируя их, можно отметить неравномерность изотопного распределения в метаболитах, которая является следствием изотопной неоднородности исходных субстра-

тов и специфичности превращений в цикле. Хотя в реакции цикла и происходит частичное перемешивание атомов, полной их рандомизации, как в цикле Кальвина, не происходит даже при большом числе оборотов. При числе оборотов больше 10 распределение изотопов в метаболитах становится стационарным и определяется только изотопной неоднородностью исходных C_2 -фрагментов.

Поскольку углеродные атомы C_2 -фрагментов как бы «размазываются» по четырехуглеродному скелету молекул дикарбоновых кислот, причем таким образом, что карбоксильный углерод распределяется между карбоксильными группами, а метильный — между атомами углерода радикала, изотопный состав соответствующих углеродных атомов C_4 -кислот характеризуется значениями $\delta^{13}\text{C}$, вдвое меньшими, чем у углеродных атомов C_2 -фрагмента. Очевидно, изотопное распределение в аминокислотах, синтезируемых через метаболиты цикла Кребса, наследует изотопный состав атомов метаболитов.

Сопоставим изотопное распределение в аминокислотах, рассчитанное согласно изложенным модельным представлениям, с экспериментально изученным изотопным распределением в аминокислотах, выделенных из белковой фракции ряда фотосинтезирующих микроорганизмов, биосинтез которых связан с оксалоацетатом и α -кетоглутаратом (табл. 2). Общей особенностью первого и второго является большая обогащенность карбоксильных групп аминокислот тяжелым изотопом ^{13}C , чем углерода радикала.

Из изложенного следует, что такой изотопный состав определен изотопным распределением в C_2 -фрагментах, которое возникает лишь при условии осуществления описанной выше последовательности метаболических событий, а именно наличия последовательно протекающих первичного декарбоксилирования, снабжающего C_2 -фрагментами синтез липидов, и вторичного декарбоксилирования, снабжающего C_2 -фрагментами и другими субстратами цикла Кребса.

Нетрудно понять, что в противном случае карбоксильный углерод C_2 -фрагмента всегда был бы богаче ^{12}C (а не ^{13}C), чем углерод радикала. Но утверждать, что карбоксильный углерод аминокислот всегда должен быть изотопнотяжелее углерода радикала, нельзя. В клетке существуют различные пути синтеза аминокислот (например, через оксалоацетат, образующийся в гликоксилатном цикле), определяющие и противоположный характер распределения изотопов [3]. Однако наличие изотопной утяжеленности карбоксильных групп аминокислот можно рассматривать как свидетельство в пользу описанной последовательности метаболических процессов. Подобный характер изотопного распределения накладывает определенные граничные условия на степень превращения пирувата при вторичном декарбоксилировании. Значение F должно быть по крайней мере больше 0,5, а это значит, что в цикл Креб-

Зависимость изотопного состава ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) углеродных атомов α -кетоглутарата (в числителе) и оксалоацетата (в знаменателе) от числа оборотов цикла Кребса (Изотопный состав исходных субстратов дан в тексте)

t	№ атома					CO ₂ дыхания
	1	2	3	4	5	
1	—	—	—	—	—	+37,18
	-11,53	+27,41	+27,41	-11,53	—	
2	-11,53	+27,41	+27,41	-20,44	-0,89	-11,53
	+13,26	+3,49	+3,49	+13,26		
3	+13,26	+3,49	+3,49	-20,44	-0,89	+13,26
	+1,30	-8,48	-8,48	+1,30		
4	+1,30	-8,48	-8,48	-20,44	-0,89	+1,30
	-4,69	-14,46	-14,46	-4,69		
5	-4,69	-14,46	-14,46	-20,44	-0,89	-4,69
	-7,68	-17,44	-17,44	-7,68		
6	-7,68	-17,44	-17,44	-20,44	-0,89	-7,68
	-9,17	-18,44	-18,44	-9,17		
7	-9,17	-18,44	-18,44	-20,44	-0,89	-9,17
	-9,91	-19,69	-19,69	-9,91		
8	-9,91	-19,69	-19,69	-20,44	-0,89	-10,91
	-10,29	-20,07	-20,07	-10,29		
9	-10,29	-20,07	-20,07	-20,44	-0,89	-10,29
	-10,48	-20,25	-20,25	-10,48		
10	-10,48	-20,25	-20,25	-20,44	-0,89	-10,48
	-10,57	-20,37	-20,37	-10,57		

Таблица 2

Внутримолекулярные изотопные эффекты углерода в аминокислотах семейств оксалоацетата и α -кетоглутарата, выделенных из белковой фракции фотосинтезирующих микроорганизмов ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, питательной среды равна 0 ‰) [9]

Аминокислоты	Chlorella	Anacystis nuddlensis	Scendesmus	Chromatium	Euglena	Gracilaria
Аспарагиновая	+2,2	+2,8	-0,8	-15,9	+1,0	-5,3
	-15,6	-22,1	-24,3	-27,6	-20,3	-18,4
Треонин	-0,5	—	—	—	+2,1	-8,5
	-19,2	—	—	—	-12,2	-16,4
Лизин	+2,5	—	—	—	-24,8	—
	-20,9	—	—	—	-22,4	—
Глутаминовая	-8,8	+11,7	-5,6	+2,2	-0,2	-8,4
	-21,1	-16,7	-26,6	-20,1	-21,5	-19,8
Аргинин	-2,6	—	—	—	-3,6	-3,6
	-22,6	—	—	—	-19,8	-15,9

Примечание. В числителе — карбоксил, в знаменателе — радикал.

са на один C₃-фрагмент поступает по крайней мере два C₂-фрагмента, т. е. в фазу гликолиза цикл Кребса как минимум совершает два оборота.

В фазу глюконеогенеза анализ изотопного распределения в продукте цикла

Кребса — фосфоенолпирувате (ФЕП), ресинтезируемом из продуктов распада главным образом аминокислот, не представляет сложности, так как определяется только наследованием углеродных структур. Для такого анализа, как и ранее, необходимо

лишь проследить за специфичностью превращений аминокислот в ФЕП.

В рамках изложенного объясняется экспериментально наблюдаемое обогащение карбоксильного углерода некоторых аминокислот изотопом ^{13}C относительно углерода ассимилируемой CO_2 (положительные значения $\delta^{13}\text{C}$, табл. 2), которое, как мы отмечали ранее [3], возможно, является результатом изотопного фракционирования при синтезе С—С связи в ходе ассимиляции CO_2 . Однако такое обогащение можно объяснить и тем, что изотопное утяжеление карбоксильных групп в дикарбоновых кислотах цикла Кребса, являющееся в конечном счете следствием кинетических изотопных эффектов декарбоксилирования пирувата, превышает обогащение атомов изотопом ^{12}C при фотосинтетической ассимиляции CO_2 . Причем обогащенность ^{13}C карбоксильных групп будет тем больше, чем

меньше интенсивность работы цикла Кребса (табл. 1). Таким образом, разрешается кажущееся противоречие между изотопным облегчением биомассы за счет фотосинтетической ассимиляции CO_2 и наблюдаемым изотопным утяжелением тех фрагментов молекул, в которых вследствие специфичности превращений аккумуляруется экзогенный углерод [6].

В заключение отметим, что выяснение особенностей изотопного распределения и причин их возникновения в метаболитах гликоцилатного цикла и цикла Кребса и в связанных с ними других компонентах клетки позволяет использовать изотопную информацию как средство изучения путей биосинтеза компонентов, в частности аминокислот, образования фондов этих метаболитов, а также для выяснения динамики углеродного метаболизма и его особенностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Г., Костролитина Л. И., Шепелев А. П. Биосинтез насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. — Успехи совр. биол., 1973, вып. 3, с. 352—378. — 2. Ивлев А. А. Фракционирование изотопов углерода в процессах жизнедеятельности организмов в разные фазы геологической истории Земли. — Журн. общ. биол. 1980, т. 41, с. 901—916. — 3. Ивлев А. А., Калошин А. Г., Королева М. Я. Изотопные эффекты углерода в углеводах и аминокислотах фотосинтезирующих организмов. — *Studio biophysica*, 1982, т. 88, № 1, с. 47—54. — 4. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калошин А. Г. Кинетические изотопные эффекты реакции декарбоксилирования пирувата — основной элемент механизма фракционирования изотопов углерода в клетке. — *Биофизика*, 1982, т. 27, вып. 3, с. 485—488. — 5. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калошин А. Г. Соот-

ношения внутримолекулярного распределения изотопов углерода при декарбоксилировании пирувата. *Биофизика*, 1982, т. 27, вып. 4.—6. Ивлев А. А., Королева М. Я. О возможном механизме возникновения изотопных эффектов углерода в автотрофах. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, с. 219—221. — 7. Меландер Л. Изотопные эффекты в скоростях реакций. М.: ИЛ, 1964. — 8. Мэтун Дж. Биосинтез аминокислот. — В сб.: Биогенез природных соединений. / Под ред. Л. М. Гинодмана. М.: Мир, 1965, с. 9—35. — 9. Abelson P. H., Hoering T. C. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1961, vol. 47, p. 623—631. — 10. Bowen M. J. H. — *Environmental Chemistry of Elements*. L.—N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 195. — 11. O'Leary M. H. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1976, vol. 73, p. 614—618.

Статья поступила 27 октября 1981 г.