

УДК 576.343:546.26

О РАСПРЕДЕЛЕНИИ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В МЕТАБОЛИТАХ ЦИКЛА КАЛЬВИНА И ФОСФОГЛЮКОНАТНОГО ЦИКЛА

А. А. ИВЛЕВ, Д. А. КНЯЗЕВ, А. Г. КАЛОШИН, Ю. Н. РАДЮКИН

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

Знание распределения изотопов углерода в метаболитах циклов Кальвина и фосфоглюконатного необходимо при изучении углеродного метаболизма клетки.

В настоящей работе показано, что изотопное распределение метаболитов зависит от сопряжения циклов с другими метаболическими процессами и что по внутримолекулярным изотопным различиям можно судить об интенсивности этих процессов. В частности, отмечено, что при достаточно большом числе оборотов цикла Кальвина распределение изотопов углерода в метаболитах стремится к равномерному. Напротив, при малом числе оборотов оно неоднородно. В фотосинтетической глюкозе атомы 3 и 4 обогащены изотопом ^{13}C . Иное распределение изотопов в глюкозе, образующейся при функционировании фосфоглюконатного цикла (гексозомонофосфатного шунта). Сопоставление фактического распределения изотопов углерода в глюкозе с теоретически возможным позволяет судить о путях синтеза глюкозы, о том, как образуются фонды этого метаболита.

Выясним, каким будет и от чего зависит изотопное распределение в метаболитах циклов. Оно определяется двумя причинами — либо фракционированием изотопов в цикле или (и) изотопным составом исходных субстратов. Возникновение заметных изотопных эффектов в циклических процессах маловероятно, поскольку такие эффекты, возникающие на предыдущем витке, гасятся на последующем [1]. Более вероятно появление изотопной неоднородности метаболитов за счет изотопных различий исходных субстратов. В этом случае распределение изотопов в метаболитах цикла зависит от специфичности биохимических взаимодействий в цикле и от перемешивания атомов. Первый фактор обуславливает закономерное и неоднородное распределение изотопов в молекулах, второй, наоборот, рандомизирует углеродные атомы и, следовательно, выравнивает изотопный состав. Оба фактора действуют одновременно. Поэтому учет количественного анализа необходим учет путей движения каждого углеродного атома поступающих в цикл субстратов.

Рассмотрим восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина). В опытах с меченой CO_2 установлена последовательность превращений (рис. 1, [5]). Пронумеруем атомы, как показано на рис. 1, чтобы проследить за их перемещениями в реакциях и определить положения, которые они займут в метаболитах. Отчетливо видно, что превращения каждого атома углерода ис-

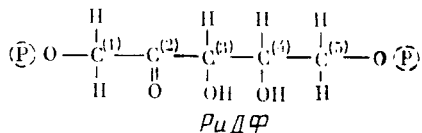
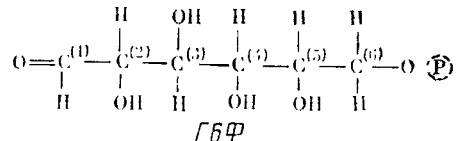
ходных молекул специфичны. Перемешивание атомов возникает в реакции синтеза фосфоглицериновой кислоты (ФГК) (реакция I) и в транскетотазных и трансальдозазных реакциях цикла (VII и IX). Оно обусловлено наличием общих пулов, пополняемых метаболитами, которые синтезируются разными путями.

Изотопные различия исходных субстратов — CO_2 и рибулозодифосфата (РиДФ) — возможны благодаря кинетическому изотопному эффекту в реакции декарбоксилирования пирувата, проявляющемуся в сопряженных процессах гликолиза и глюконеогенеза [2]. При этом РиДФ обогащается ^{12}C относительно экзогенной CO_2 . Возможное фракционирование изотопов на стадии фотосинтетической ассимиляции CO_2 лишь смещает все эффекты в область отрицательных значений $\delta^{13}\text{C}$, но не устраняет их.

С учетом этого рассмотрим, каким станет распределение изотопов углерода в метаболитах цикла Кальвина после одного оборота и как оно будет меняться с ростом числа оборотов.

На каждом обороте цикла (рис. 1) в результате взаимодействия шести молекул РиДФ с шестью молекулами CO_2 образуется одна молекула глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) и регенерируются шесть молекул акцептора CO_2 — РиДФ, но уже с отличающимся от исходного распределением изотопов углерода. Отличия обусловлены тем, что в четырех из шести регенерируемых молекулах РиДФ атомы экзогенной CO_2 оказываются в положении 3, а в двух других — в положениях 1, 2, 3. В сумме атомы углерода регенерируемых РиДФ и определяют изотопный состав акцептора на каждом обороте цикла. Рассмотрим распределения изотопов в Г6Ф и РиДФ.

Примем необходимым для расчетов изотопных распределений нумерацию атомов в Г6Ф и РиДФ



и введем буквенные обозначения изотоп-

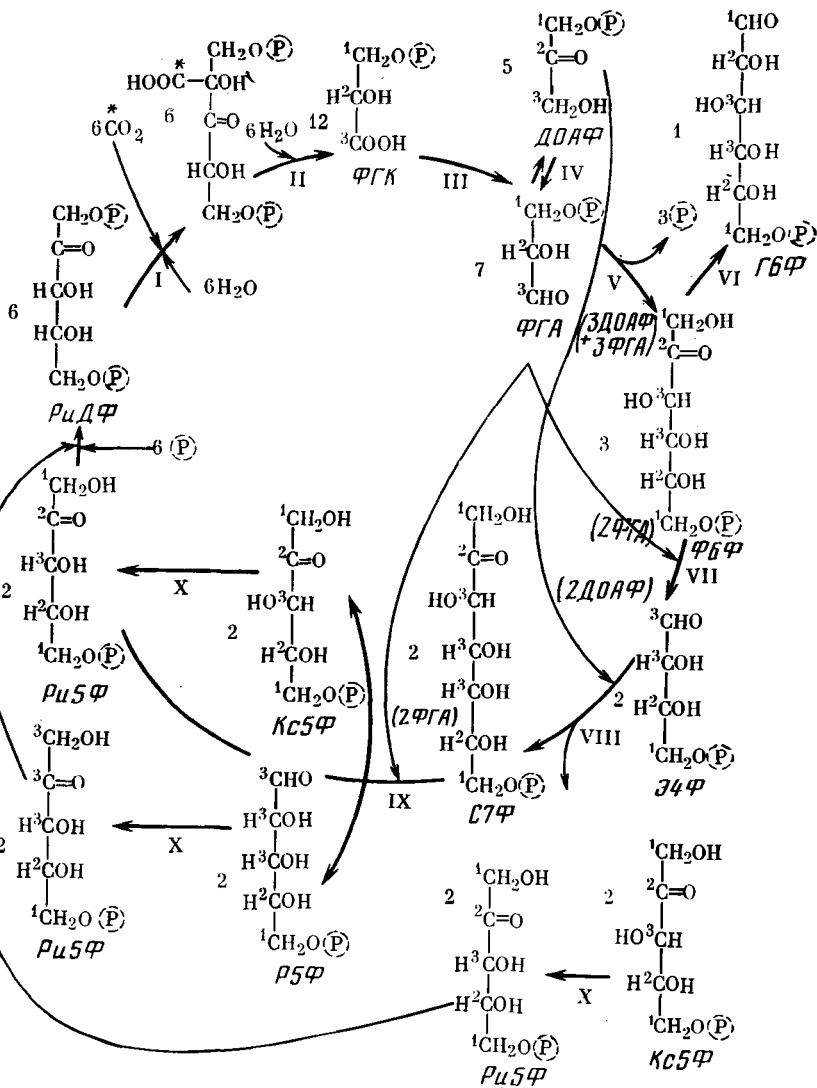


Рис. 1. Перемещения углеродных атомов в цикле Кальвина.

ФГК — фосфоглицериновая кислота; ФГА — фосфоглицериновый альдегид; РидФ — рибулозо-1,5-дифосфат; ДОАФ — диоксиацетонфосфат; Г6Ф — глюкозо-6-фосфат; Кс5Ф — ксилулозо-5-фосфат; Э4Ф — эритрозо-4-фосфат; Р5Ф — рибозо-5-фосфат; Ри5Ф — рибулозо-5-фосфат; С7Ф — седогептулозо-7-фосфат; P в кружке из пунктирной линии — неорганический фосфат (во избежание двойной нумерации из-за перемешивания атомов углерода при образовании ФГК атомы в метаболитах цикла нумеруются начиная с ФГК).

ного состава атомов в Г6Ф, РиДФ, и CO_2 .
 a_6^0 — изотопный состав исходной CO_2 ;
 $a_1^0, a_2^0, a_3^0, a_4^0, a_5^0$ — изотопный состав атомов углерода РиДФ, поступающего в цикл;
 $c_1^n, c_2^n, c_3^n, c_4^n, c_5^n$ — изотопный состав атомов в изотопной разновидности РиДФ I, регенерированного на n -м обороте (четыре молекулы);
 $d_1^n, d_2^n, d_3^n, d_4^n, d_5^n$ — изотопный состав атомов в изотопной разновидности РиДФ II, регенерированного на n -м обороте (две молекулы);
 $e_1^n, e_2^n, e_3^n, e_4^n, e_5^n$ — изотопный состав ато-

мов углерода общего РиДФ, регенерированного на n -м обороте;
 $b_1^n, b_2^n, b_3^n, b_4^n, b_5^n, b_6^n$ — изотопный состав атомов углерода Г6Ф, синтезируемого на n -м обороте;
 $b_1^{\Sigma n}, b_2^{\Sigma n}, b_3^{\Sigma n}, b_4^{\Sigma n}, b_5^{\Sigma n}, b_6^{\Sigma n}$ — изотопный состав атомов углерода Г6Ф общего фонда, синтезированного за n оборотов.

Тогда совокупность очевидных балансовых соотношений можно выразить следующим образом:

$$b_1^n = (a_1^{n-1} + a_5^{n-1}) \cdot 0,5; b_2^n = (a_2^{n-1} +$$

$$\begin{aligned}
 &+ a_4^{n-1}) \cdot 0,5; b_3^n = (a_3^{n-1} + a_6^0) \cdot 0,5; b_4^n = \\
 &= (a_3^{n-1} + a_6^0) \cdot 0,5; b_5^n = b_2^n; \\
 &b_6^n = b_1^n; c_1^n = b_1^n; c_2^n = b_2^n; c_3^n = b_3^n; c_4^n = \\
 &= b_5^n; c_5^n = b_6^n; d_1^n = b_3^n; d_2^n = b_3^n; d_3^n = b_3^n; \\
 &d_4^n = b_5^n; d_5^n = b_6^n; \\
 &e_i^n = \frac{2c_i^n + d_j^n}{3} \quad (i = 1 \div 5);
 \end{aligned}$$

$$b_i^{\Sigma n} = \frac{\sum_i^n b_i^n}{n} \quad (i = 1 \div 6).$$

Изотопный состав общего углерода Г6Ф, синтезированного за n оборотов цикла, равен

$$\delta^{13}C_{Г6Ф} = \frac{\sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^n b_i^n}{6n}.$$

Проиллюстрируем сказанное численным примером. Предположим, что изотопные эффекты ассимиляции CO_2 отсутствуют. Пусть изотопный состав углеродных атомов РидФ одинаков и равен 20‰ (что соответствует значениям, характерным для углеводных компонентов растения C_3 -типа). Изотопный состав ассимилируемой CO_2 прием равным 0‰. Тогда, используя приведенные соотношения, получим результаты, представленные в табл. 1. Они отчетливо отражают основную особенность распределения изотопов углерода в метаболитах цикла. При малом числе оборотов цикла в образу-

ющихся метаболитах благодаря изотопным различиям исходных субстратов распределение изотопов углерода неравномерно. В Г6Ф атомы 3 и 4 обогащены ^{13}C относительно других атомов углерода. Изотопное распределение в РидФ более сложное. На фоне небольших изотопных различий между атомами в положении 1, 2 и 4, 5 отмечается заметное изотопное утяжеление атома в положении 3. С ростом числа оборотов цикла распределение изотопов стремится к равномерному, а изотопный состав атомов приближается к изотопному составу ассимилируемой CO_2 . Стирание внутримолекулярных изотопных различий происходит быстро. При больших изотопных различиях исходных субстратов (20‰) полное нивелирование происходит приблизительно через 20 оборотов. Понятно, что при меньших различиях, например, в случае значительных эффектов ассимиляции оно произойдет еще быстрее.

Изменение изотопного состава углеродных атомов в глюкозе, накапливающейся в фонде, в целом аналогично таким же изменениям в глюкозе, образующейся на каждом обороте цикла, но будет протекать гораздо медленнее. Даже после 80 оборотов цикла в Г6Ф фонда изотопная неоднородность сохраняется (табл. 2). Однако размеры изотопных различий, как и при малом количестве оборотов, в сильной мере зависят от изотопных различий исходных субстратов.

Таким образом, в глюкозе, выделяемой из фонда крахмала, образующегося при фотосинтезе, можно ожидать два типа изотопного распределения: неравномерное, характеризующееся обогащенностью изотопом ^{13}C атомов в положении 3 и 4, и равномерное. В последнем случае изотопный состав углеро-

Т а б л и ц а 1

Зависимость изотопного состава углерода Г6Ф РидФ от числа оборотов фотосинтетического цикла (изотопный состав ассимилируемой CO_2 равен 0‰, атомов углерода РидФ — 20‰)

№ атома	n=1		n=2		n=3		n=4		n=5	
	Г6Ф b_i^1	РидФ e_i^1	Г6Ф b_i^2	РидФ e_i^2	Г6Ф b_i^3	РидФ e_i^3	Г6Ф b_i^4	РидФ e_i^4	Г6Ф b_i^5	РидФ e_i^5
1	-20,0	-18,3	-18,9	-13,9	-16,1	-11,6	-13,8	-9,6	-11,7	-8,0
2	-20,0	-18,3	-18,9	-13,9	-16,1	-11,6	-13,8	-9,6	-11,7	-8,0
3	-10,0	-10,0	-5,0	-5,0	-2,5	-2,5	-1,3	-1,3	-0,63	-0,6
4	-10,0	-20,0	-5,0	-18,3	-2,5	-16,1	-1,3	-13,8	-0,63	-11,7
5	-20,0	-20,0	-18,3	-18,3	-16,1	-16,1	-13,8	-13,8	-11,7	-11,7
6	-20,0		-18,3		-16,1		-13,8		-11,7	

№ атома	n=6		n=7		n=8		n=9		n=10	
	Г6Ф b_i^6	РидФ e_i^6	Г6Ф b_i^7	РидФ e_i^7	Г6Ф b_i^8	РидФ e_i^8	Г6Ф b_i^9	РидФ e_i^9	Г6Ф b_i^{10}	РидФ e_i^{10}
1	-9,9	-6,7	-8,3	-5,6	-6,9	-4,6	-5,8	-3,9	-4,8	-3,2
2	-9,9	-6,7	-8,3	-5,6	-6,9	-4,6	-5,8	-3,9	-4,8	-3,2
3	-0,3	-0,3	-0,2	-0,2	-0,1	-0,1	-0,04	-0,04	-0,02	-0,02
4	-0,3	-9,9	-0,2	-8,3	-0,1	-6,9	-0,04	-5,8	-0,02	-4,8
5	-9,9	-9,9	-8,3	-8,3	-6,9	-6,9	-5,8	-5,8	-4,8	-4,8
6	-9,9		-8,3		-6,9		-5,8		-4,8	

Изотопный состав углеродных атомов Г6Ф ($\delta^{13}\text{C}$ в ‰) общего фонда ($b_i^{\Sigma n}$) после n оборотов фотосинтетического цикла

№ атома	$n=10$	$n=20$	$n=30$	$n=40$	$n=50$	$n=60$	$n=70$	$n=80$
1	-11,57	-6,80	-4,65	-3,50	-2,80	-2,30	-1,97	-1,74
2	-11,57	-6,80	-4,65	-3,50	-2,80	-2,30	-1,97	-1,74
3	-2,00	-1,00	-0,67	-0,50	-0,40	-0,32	-0,28	-0,25
4	-2,00	-1,00	-0,67	-0,50	-0,40	-0,32	-0,28	-0,25
5	-11,57	-6,80	-4,65	-3,50	-2,80	-2,30	-1,97	-1,74
6	-11,57	-6,80	-4,65	-3,50	-2,80	-2,30	-1,97	-1,74

Т а б л и ц а 3

Изотопный состав углеродных атомов ($\delta^{13}\text{C}$ в ‰)

Число оборотов (n)	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	Общий C
0	+0,4	+0,4	-16,7	-16,7	+0,4	+0,4	-5,5
1	+0,4	-13,3	-10,0	-16,7	+0,4	+0,4	-6,5
2	-10,6	-10,6	-11,3	-16,7	+0,4	+0,4	-8,1
3	-10,6	-11,2	-11,1	-16,7	+0,4	+0,4	-8,1

да глюкозы должен быть таким же, как у фиксируемой CO_2 , с учетом эффекта ассимиляции.

Равномерное распределение изотопов указывает либо на отсутствие внутриклеточного фракционирования (это легко установить по отсутствию внутримолекулярной изотопной неоднородности в других метаболитах, например, в аминокислотах), а следовательно, на тождество изотопного состава фиксируемой CO_2 и РиДФ, либо на значительное число оборотов цикла Кальвина, достаточное для стирания изотопных различий исходных субстратов.

Фосфоглюконовый (пентозофосфатный окислительный) цикл иногда называют обратным циклом Кальвина, поскольку в противоположность последнему в этом случае Г6Ф окисляется до CO_2 . У обоих циклов много общих промежуточных продуктов, но реакции идут в противоположных направлениях. Распределение изотопов в метаболитах фосфоглюконового цикла, как будет показано, существенно отличается от такого распределения в метаболитах цикла Кальвина, и это обстоятельство может быть использовано при изучении их фондов.

Как и в случае цикла Кальвина, неравномерное распределение изотопов в метаболитах фосфоглюконового цикла обусловлено неравномерным внутримолекулярным распределением изотопов в исходном субстрате Г6Ф. Он образуется из фосфоенолпирувата (ФЕП) в фазе глюконеогенеза в результате распада липидов и белков. Можно утверждать, что при распределении изотопов в этом Г6Ф атомы углерода в положениях 3 и 4 будут обогащены изотопом ^{12}C (а не ^{13}C , как в фотосинтетическом Г6Ф).

Для того чтобы оценить изотопное распределение в метаболитах после прохождения углеродного потока через цикл, пронумеруем атомы, как показано на рис. 2, и проследим за их перемещениями в реакциях цикла [4]. В цикл входят шесть молекул Г6Ф, и при полном обороте цикла образуется шесть молекул CO_2 и регенерируется пять молекул Г6Ф. Благодаря ветвлению потока субстратов, трансальдозазным и транскетозазным реакциям в цикле происходит частичное перемешивание атомов, в результате которого в регенерированном Г6Ф распределение изотопов становится отличным от распределения в исходном Г6Ф.

Например, пусть распределение изотопов углерода в поступающем в фосфоглюконовый цикл Г6Ф такое, как приведено в табл. 3. Для описания изменений в распределении изотопов с ростом числа оборотов цикла воспользуемся очевидными соотношениями изотопного баланса в цикле. Обозначим изотопный состав соответствующих атомов в Г6Ф, поступающем в цикл:

$$\delta^{13}\text{C}_{C_1} = c_1^0, \delta^{13}\text{C}_{C_2} = c_2^0, \delta^{13}\text{C}_{C_3} = c_3^0,$$

$$\delta^{13}\text{C}_{C_4} = c_4^0, \delta^{13}\text{C}_{C_5} = c_5^0, \delta^{13}\text{C}_{C_6} = c_6^0$$

а изотопный состав атомов в Г6Ф, образующемся на n обороте,

$$\delta^{13}\text{C}_{C_1} = c_1^n, \delta^{13}\text{C}_{C_2} = c_2^n, \delta^{13}\text{C}_{C_3} = c_3^n,$$

$$\delta^{13}\text{C}_{C_4} = c_4^n, \delta^{13}\text{C}_{C_5} = c_5^n, \delta^{13}\text{C}_{C_6} = c_6^n.$$

Тогда, учитывая все типы молекул Г6Ф, образующиеся на каждом обороте (рис. 2), можно записать:

При $n = 1$

$$c_1^1 = 0,2 (4c_2^0 + c_1^0)$$

$$c_2^1 = 0,2 (4c_2^0 + c_2^0)$$

$$c_3^1 = 0,2 (3c_3^0 + 2c_2^0)$$

$$c_4^1 = c_4^0$$

$$c_5^1 = c_5^0$$

$$c_6^1 = c_6^0$$

При $n > 1$

$$c_1^n = 0,2 (4c_2^{n-1} + c_1^{n-1})$$

$$c_2^n = 0,2 (4c_3^{n-1} + c_2^{n-1})$$

$$c_3^n = 0,2 (3c_3^{n-1} + 2c_2^{n-1})$$

$$c_4^n = c_4^0$$

$$c_5^n = c_5^0$$

$$c_6^n = c_6^0$$

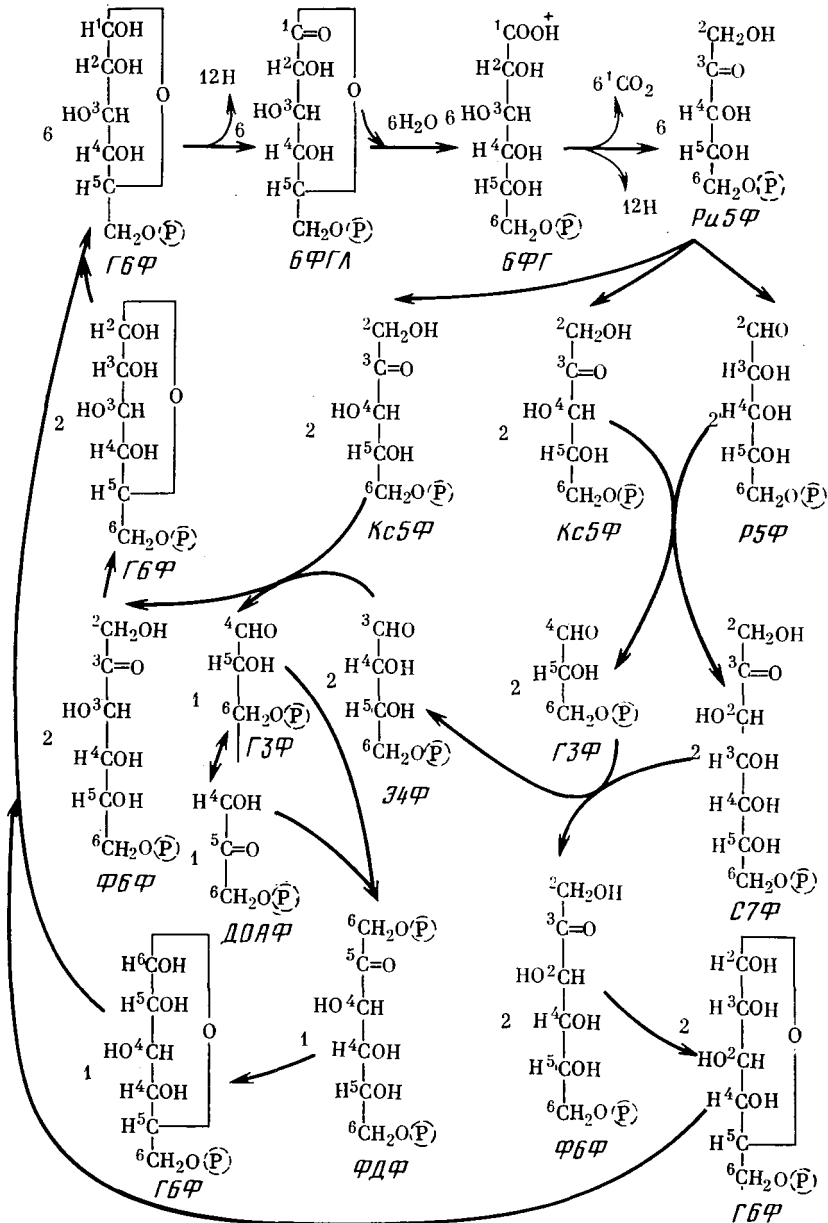


Рис. 2. Перемещения углеродных атомов в фосфоглюконатном цикле. Г6Ф — глюкозо-6-фосфат; 6ФГЛ — 6-фосфоглюкозо-δ-лактон; 6ФГ — 6-фосфоглюконат; Р5Ф — рибулозо-5-фосфат; Кс5Ф — ксилулозо-5-фосфат; Р5Ф — рибозо-5-фосфат; Г3Ф — глицеральдегид-3-фосфат; ДОАФ — диоксиацетонфосфат; С7Ф — седогепулозо-7-фосфат; Э4Ф — эритрозо-4-фосфат; Ф6Ф — фруктозо-6-фосфат; P в кружке из пунктирной линии — неорганический фосфат.

Результаты расчета, приведенные в табл. 3, показывают, что после трех оборотов цикла половина атомов в молекуле Г6Ф оказывается почти равномерно перемешанной и обогащенной легким изотопом относительно углерода другой половины, атомы которой сохраняют исходное распределение изотопов независимо от числа оборотов. При числе оборотов больше трех распределение изотопов в Г6Ф не меняется. Нетрудно оценить изотопное распределение в рибозах, образующихся в фосфоглюконатном цикле. Они являются источником РиДФ, используемого в качестве акцептора CO_2 в цикле Кальвина [4]. Распределение изотопов в рибозо-5-фосфате (Р5Ф) аналогично распределению в Г6Ф, от которого отщеплен глюкозидный атом (C_1 в табл. 3), т. е. три первых атома рибозы ($\text{C}_2, \text{C}_3, \text{C}_4$ в табл. 3) при небольших различиях между собой должны быть обогащены ^{12}C по отношению к атомам в положении 5 и 6.

Таким образом, распределение изотопов в одноименных метаболитах циклов Кальвина и фосфоглюконатного различно: в пер-

вом цикле оно равномерно, в последнем — неравномерно. Значения же внутримолекулярных изотопных различий зависят от значений эффектов внутриклеточного разделения изотопов и прежде всего от эффектов, сопровождающих реакцию декарбоксилирования пирувата.

Если в клетке существуют отдельные фонды крахмала, синтезированного фотосинтетическим путем, и крахмала, синтезированного при глюконеогенезе «метаболическим» путем, то изотопный состав их углерода, а также внутримолекулярное распределение изотопов углерода глюкозы должны различаться. В первом случае углерод должен быть обогащен ^{13}C относительно второго. В глюкозе крахмала, синтезированного фотосинтетическим путем, углеродные атомы в положении 3 и 4 либо утяжелены, либо имеют такой же изотопный состав, что и атомы в других положениях. В глюкозе крахмала, синтезированного «метаболическим» путем, атомы в положении 3 и 4, напротив, обогащены ^{12}C относительно остальных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивлев А. А. Вопросы теории фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующих организмах. — Усп. соврем. биол., 1976, т. 81, с. 84—104. — 2. Ивлев А. А. Фракционирование изотопов углерода в процессах жизнедеятельности организмов в разные фазы геологической истории Земли. — Журн. общей биол., 1980, т. 41, с. 901—916. — 3. Ивлев А. А.,

Князев Д. А. Изотопные эффекты углерода и метаболизм клетки. — Изв. ТСХА, 1982, вып. 3, с. 3—11. — 4. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1979. — 5. Кальвин М. Углеродный цикл при фотосинтезе. — В сб.: Современные проблемы биохимии. /Под ред. Энгельгардта В. А. М.: ИЛ, 1957, с. 446—488.

Статья поступила 27 октября 1981 г.

SUMMARY

Theoretical analysis of carbon isotope distribution in Kalvin cycle's metabolites and glucophosphate cycle showed that isotope distribution of metabolites depended on conjugation of cycles with other metabolic processes influencing isotope composition of substrata acting in a cycle and the intensity of cycles' function as well. Glucose resulted in Kalvin cycle's function and glucophosphate cycle had different isotope distribution.