

Г. В. КИСЕЛЕВ, Л. И. ПАВЛИНОВА, Д. А. ЧЕТВЕРИКОВ

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИФОСФОИНОЗИТИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(Представлено академиком Е. М. Крепом 14 X 1975)

Ди- и трифосфоинозитиды (ДФИ и ТФИ), или полифосфоинозитиды (ПФИ), по сравнению с другими фосфолипидами обладают рядом уникальных особенностей. В молекуле ПФИ имеются моноэстерные фосфатные группы, связанные с кольцом инозита в положении 4 (ДФИ) и 4 и 5 (ТФИ). Их биосинтез осуществляется путем ступенчатого фосфорилирования монофосфоинозитидов (МФИ) при помощи АТФ. ПФИ химически неустойчивы и легко разрушаются под влиянием разнообразных факторов окружающей среды. Биохимически они чрезвычайно лабильны и характеризуются высокой скоростью обмена фосфатных групп ⁽¹⁾, быстрым посмертным распадом ⁽²⁾, изменениями содержания при различных физиологических состояниях организма ⁽³⁻⁵⁾, причем содержание фракций ПФИ меняется весьма сходно с изменениями содержания компонентов адениловой системы ⁽⁶⁾. Отсюда видно, что свойства ПФИ имеют ряд черт сходства с макроэргическими фосфорными соединениями.

Высказывались предположения, что необычные свойства фракций ПФИ объясняются высокой свободной энергией гидролиза фосфатных групп этих соединений ⁽³⁻⁶⁾, однако, исходя из существующей теории, рассматривающей энергетическую ценность биологически важных фосфатов в связи с их химическим строением, ПФИ затруднительно отнести к макроэргическим соединениям. Это противоречие может быть решено только опытами по определению стандартной свободной энергии гидролиза ПФИ.

Задача настоящей работы заключалась в определении тепловых эффектов реакций гидролиза моноэстерных фосфатных групп ТФИ и ДФИ. Для сравнения, в тех же самых условиях проводили гидролиз АМФ, глюкозо-1-фосфата (Гл-1-Ф) и креатинфосфата (КФ), стандартные свободные энергии гидролиза (ΔG^0) которых определены и составляют -3 ккал/моль, -5 ккал/моль и -10 ккал/моль, соответственно.

Тепловые эффекты реакций определяли на дифференциальном перемешиваемом микрокалориметре конструкции А. А. Вичутинского ⁽⁷⁾. В качестве субстратов использовали выделенные нами из мозга быка фракции ПФИ ⁽⁸⁾, МФИ ⁽⁹⁾ и продажные препараты АМФ, Гл-1-Ф и КФ. Субстраты гидролизовали ферментом кислая фосфатаза из пшеничных отрубей (фирмы «Реапал») в инкубационной среде состава: буфер — имидазол-ацетат (рН 6,6) 50 мМ, $MgSO_4$ 2 мМ, ЭДТА 4 мМ. Отношение количества фермента в мкг белка к количеству субстрата в мкг фосфора моноэстерного фосфата составляло 15. Растворы фермента и субстратов готовили на инкубационной среде. В исследуемую ячейку помещали по 1,5 мл раствора субстрата и инкубационной среды. Реакцию проводили 1,5 часа при 25°. Для получения поправок на тепловые эффекты разбавления фермента, исходных веществ и продуктов реакции ставили специальные опыты. В этих опытах получали необходимые разбавления для каждого из испытываемых веществ в общем объеме раствора в калориметри-

ческой ячейке 3 мл, для чего брали разные объемы исходного раствора одной концентрации.

Калибровочная константа калориметра, которая представляет собой отношение количества тепла, выделившегося при реакции с известным тепловым эффектом (разбавление раствора сахарозы) к количеству тепла, выделившегося в процессе калибровки электрическим током, составляла 0,91. Эту величину использовали во всех термометрических расчетах. Тепловой эффект реакции равен произведению величины теплового эф-

Таблица 1

Термодинамические характеристики реакций гидролиза моноэстерных фосфатов органических соединений

№ п.п.	Показатель	АМФ	Гл-1-Ф	КФ	ДФИ (4)	ТФИ (4,5)	ТФИ (5)
1	ΔQ	$+1,56 \pm 0,15$	$+0,47 \pm 0,02$	$-4,44 \pm 0,70$	$-4,44 \pm 0,43$	$-3,79 \pm 0,77$	
2	ΔH	$-1,32 \pm 0,55$	$-3,10 \pm 0,51$	$-7,32 \pm 1,05$	$-4,27 \pm 0,26$	$-5,60 \pm 0,34$	$-6,93 \pm 0,42$
3	$P_{\text{по АМФ}}$				$<0,01$	$<0,01$	$<0,001$
4	$P_{\text{по Гл-1-Ф}}$				$>0,1$	$<0,01$	$<0,01$
5	$P_{\text{по КФ}}$				$<0,05$	$>0,1$	$>0,1$
6	$\Delta G_{\text{лит}}^0$	-3,0	-5,0	-10,0			
7	$T\Delta S_{\text{расч}}^0$	$-1,5 \pm 0,4$	$-1,5 \pm 0,4$	$-1,5 \pm 0,4$	$-1,5 \pm 0,4$	$-1,5 \pm 0,4$	$-1,5 \pm 0,4$
8	$\Delta G_{\text{расч}}^0$				$-6,4 \pm 0,7$	$-8,0 \pm 0,8$	$-9,5 \pm 0,9$

Примечание. 1) Все величины даны в ккал/моль отщепившегося фосфата. 2) Каждая величина является средней арифметической из трех опытов. 3) P — уровень значимости для ПФИ по соответствующим органическим фосфатам. 4) Цифры в скобках — положение фосфатной группы в кольце инозита.

фекта, полученного в результате калибровки этой реакции, на константу калориметра.

Полноту протекания реакции определяли разделением и количественным анализом исходных и конечных продуктов гидролиза ТФИ, ДФИ, МФИ (¹⁰), АМФ, Гл-1-Ф (¹¹) и КФ (¹²). Исследованные реакции характеризовались различной степенью гидролиза субстратов:

АМФ	→ аденозин + фосфат (Ф)	35%;
Гл-1-Ф	→ глюкоза + Ф	30%;
КФ	→ креатин + Ф	25%;
ДФИ	→ МФИ + Ф	50%;
ТФИ	→ МФИ + 2 Ф	70%.

При гидролизе ТФИ обнаруживали, кроме МФИ, небольшие количества ДФИ. МФИ в присутствии кислой фосфатазы не претерпевали химических превращений; тепловых эффектов при этом также не наблюдалось.

Как видно из табл. 1 (ΔQ , ряд 1), гидролиз макроэргических соединений КФ, АДФ и АТФ (гидролиз двух последних веществ исследован качественно) сопровождался выделением тепла, гидролиз АМФ и Гл-1-Ф — поглощением тепла. Реакции гидролиза ДФИ и ТФИ были экзотермическими.

Учет поправок на разбавление компонентов реакции позволил рассчитать энтальпии гидролиза (ΔH , ряд 2). Далее, если принять, что энтальпия гидролиза ТФИ является средним арифметическим энтальпий гидролиза фосфатных групп, связанных с 4 и 5 атомами углерода кольца инозита,

$$\Delta H_{\text{ТФИ}(4,5)} = \frac{\Delta H_{\text{ТФИ}(5)} + \Delta H_{\text{ТФИ}(4)}}{2} = \frac{\Delta H_{\text{ТФИ}(5)} + \Delta H_{\text{ДФИ}(4)}}{2}$$

то можно рассчитать ΔH реакции гидролиза фосфатной группы в положении 5 кольца инозита (цифры в скобках — положение фосфатной группы инозита)

$$\Delta H \text{ ТФИ}(5) = 2\Delta H \text{ ТФИ}(4, 5) - \Delta H \text{ ДФИ}(4).$$

По величинам ΔH ДФИ статистически значимо отличаются от АМФ и КФ, но не отличаются от Гл-1-Ф, а ТФИ (4, 5) и ТФИ (5) статистически значимо отличается от АМФ и Гл-1-Ф, но не отличаются от КФ.

Для АМФ, Гл-1-Ф и КФ был построен график зависимости известных из литературы значений ΔG° от экспериментально определенных нами величин ΔH (рис. 1). Поскольку условия реакции гидролиза всех фосфорных соединений были одинаковы, а взятые вещества являются однотипными, то можно считать, что энтропийный вклад $T\Delta S^\circ$ в ΔG° , которые связаны общим соотношением $\Delta G = \Delta H - T\Delta S^\circ$, для всех изученных в растворе веществ примерно одинаков, и график можно использовать как калибровочный для определения неизвестных величин ΔG° и $T\Delta S^\circ$ фракций ПФИ.

Методом регрессионного анализа для реакции гидролиза АМФ, Гл-1-Ф и КФ получена эмпирическая формула

$$\Delta G^\circ = 1.17\Delta H - 1.46. \quad (1)$$

По этой формуле определена величина $T\Delta S^\circ$, которая численно равна ΔG° при $\Delta H=0$ (табл. 1, ряд 7). При подстановке в формулу (1) найденных нами величин ΔH для ПФИ получены значения стандартной свободной энергии гидролиза моноэстерных фосфатных групп ПФИ (ряд 8).

Таким образом, ТФИ в положении 5 кольца инозита содержат макроэргические фосфатные связи, а ДФИ и ТФИ в положении 4 — «мезоэргические». В этом разгадка необычных свойств ПФИ, которые до сих пор были необъяснимы, так как согласно существующим представлениям, можно было бы предположить, что ПФИ, в моноэстерной связи содержат низкоэнергетические фосфатные связи с величиной $\Delta G^\circ \cong -3$ ккал/моль. Очевидно, что макроэргические свойства фосфатным связям ТФИ придают другие, не учитываемые до сих пор, факторы. По-видимому, это взаимное отталкивание и определенное расположение отрицательно заряженных фосфатных групп в кольце инозита. Высказанные предположения подтверждаются такими фактами: 1) фосфатные группы кольца инозита ТФИ находятся в *о*- и *п*-положениях друг относительно друга. Известно, что заместители в *о*- и *п*-положениях кольца бензола наиболее реакционноспособны. 2) ΔG° гидролиз фосфатных групп ПФИ убывает с уменьшением их числа в молекуле ПФИ (см. табл. 1). 3) Проведенная нами реакция гидролиза инозитгексафосфата сопровождалась выделением тепла, как это наблюдалось для всех макроэргических соединений (КФ, АДФ, АТФ).

Таким образом, химическая и метаболическая лабильность ПФИ, имеющая определенные черты сходства со свойствами макроэргических фосфатов, нашла объяснение в обнаруженном нами явлении макроэргичности фосфатных связей ТФИ. К многочисленным представителям гидрофильных макроэргических соединений фосфата добавилось единственное пока

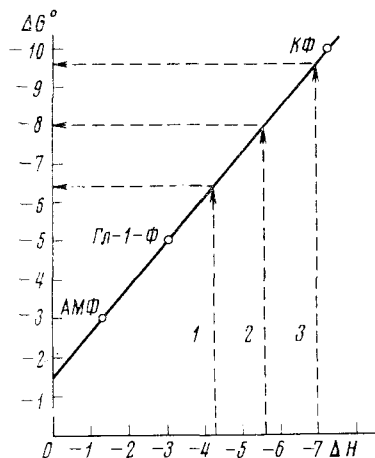


Рис. 1. Калибровочный график зависимости известных значений ΔG° от определенных экспериментально величин ΔH для реакций гидролиза АМФ, Гл-1-Ф и КФ. 1 — ДФИ (4); 2 — ТФИ (4,5); 3 — ТФИ (5)

липидное макроэргическое соединение. По-видимому, система МФИ —ДФИ — ТФИ выполняет энергетические функции в гидрофобных структурах клеток. Не исключено, что реакция переноса фосфатных групп с АТФ на ТФИ является обратимой.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
15 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Brockerhoff, C. E. Ballou, J. Biol. Chem., v. 237, 49 (1962). ² R. M. C. Dawson, J. Eichberg, Biochem. J., v. 96, 634 (1965). ³ В. Я. Дворкин, Г. В. Киселев, Д. А. Четвериков, ДАН, т. 188, 926 (1969). ⁴ В. Я. Дворкин, Г. В. Киселев, Д. А. Четвериков, ДАН, т. 189, 440 (1969). ⁵ Г. В. Киселев, Д. А. Четвериков, III Всесоюзн. биохим. съезд, Рига, Тез. симп. докл., 1974, стр. 182. ⁶ Г. В. Киселев, Т. Е. Райзе, Л. Н. Федоренко, Бюлл. эксп. биол. и мед., № 8, 41 (1971). ⁷ А. А. Вичугинский, Б. Ю. Заславский, ЖФХ, т. 46, 259 (1972). ⁸ H. S. Hendrickson, C. E. Ballou, J. Biol. Chem., v. 239, 1369 (1964). ⁹ C. Long, K. Owens, Biochem. J., v. 99, 617 (1966). ¹⁰ В. Я. Дворкин, Г. В. Киселев, Биохимия, т. 38, 976 (1973). ¹¹ B. B. Marsh, Biochim. et biophys. acta, v. 32, 357 (1959). ¹² R. S. Bandurski, B. Axelrod, J. Biol. Chem., v. 193, 405 (1951).