

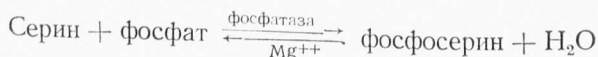
## О ВЕЛИЧИНЕ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ФОСФОСЕРИНА

Г. Е. ВЛАДИМИРОВА, А. И. КОМКОВА и Н. А. ФЕДОРОВА

Лаборатория химии белка, кафедра биохимии Государственного университета им. А. А. Жданова, Ленинград

Высокая скорость включения радиоактивного фосфора в состав фосфопротеинов различных тканей [1—4] указывает, по-видимому, на их особую роль в обмене фосфатных групп. При изучении скорости обновления фосфопротеинов мозговой ткани было найдено, что почти весь включенный в них фосфат присоединен к серину и может быть выделен в виде фосфосерина [5; 6]. В связи с этим определение величины свободной энергии реакции гидролиза фосфосерина представляет основу для выяснения направления реакции при обмене фосфора между фосфопротеинами и другими веществами. Данных относительно величины свободной энергии гидролиза фосфосерина в литературе не имеется за исключением лишь указания Рабиновича и Липмана [7] на то, что для фосфопротеинов энергия реакции гидролитического отщепления фосфатной группы на 2,9 ккал меньше величины свободной энергии реакции гидролиза АТФ.

В настоящей работе мы предприняли попытку определить величину свободной энергии гидролиза фосфосерина по константе равновесия в присутствии почечной фосфатазы:



### МЕТОДИКА

Почечную фосфатазу выделяли из свиных почек [8] и почек крыс [9]. Активность фосфатазы проверяли перед каждым опытом по ее действию на фосфосерин. Фосфосерин, используемый в качестве носителя, был синтезирован химическим путем по Плиммеру [10] из серина и кристаллической фосфорной кислоты в присутствии  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Полученный фосфосерин хроматографически был идентичен фосфосерину, выделенному из казеина после кислотного гидролиза последнего [11]. Для проведения опытов использовали реакцию смесь, состоящую из раствора серина на 0,9 М медиал-вероналовом буфере с требуемым рН,  $\text{NaH}_2\text{P}_3\text{O}_4$  и почечной фосфатазы. В качестве активатора фосфатазы в пробу прибавляли  $\text{MgCl}_2$  (0,05 мг/мл). Пробу инкубировали при 35° в течение 1—4 час. Реакцию останавливали добавлением ТХУ (50 мг/мл).

Каждый раз параллельно с опытной пробой ставили контрольную, состав которой отличался от опытной лишь тем, что она содержала фосфатазу, инактивированную кипячением. Исследование этой пробы позволяло установить, насколько последующая очистка проб достаточна для полного удаления загрязнений радиоактивным  $\text{P}_{\text{неорг}}$ .

В ходе реакции из серина и фосфата синтезировалось незначительное количество фосфосерина, количество которого можно было определить только по радиоактивной метке. Для выделения синтезированного фосфосерина в пробу вносили в качестве носителя определенное количество немеченого фосфосерина, полученного химическим путем. Для определения количества синтезированного фосфосерина препарат необходимо было очистить от меченого  $\text{P}_{\text{неорг}}$ . Основную массу  $\text{P}_{\text{неорг}}$  осаждали по методу Делори [12]. Дальнейшую очистку фосфосерина от радиоактивного  $\text{P}_{\text{неорг}}$  осуществляли путем многократного (3—11 раз) переосаждения его этанолом. Затем осадок фосфосерина растворяли в небольшом количестве воды и для более полной очистки его от загрязнений  $\text{P}^{32}$  производили хроматографирование на бумаге. Из опытной и контрольной проб ставили по 2—3 параллельные хроматограммы. На каждую хроматограмму

наносили два пятна (контроль или опыт и фосфосерин — свидетель, полученный химическим путем).

В качестве растворителя использовали смесь следующего состава: *n*-бутанол — этанол — 0,005 н. HCl (3 : 2 : 2). Растворитель пропускали в нисходящем направлении в течение 48 час. За это время фосфорсин продвигался на 12—15 см, а  $R_{\text{неорг}}$  — на 40—50 см. Основная часть  $R^{32}$  отделялась на хроматограмме от фосфорсина. Местоположение фосфорсина из опытной и контрольной пробы определяли по свидетелю, который проявляли нингидрином или молибденовым реактивом Хейнса и Ишервуда. Поскольку оба проявителя разрушают фосфорсин, непосредственного проявления пятен из опытной или контрольной проб не проводили.

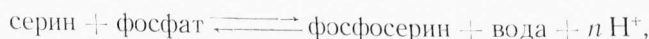
Пятно фосфорсера на вырезали напротив пятна свидетеля, разрезали и экстрагировали 1 н. HCl. Оставшиеся следы  $P^{32}$  в пробах извлекали в виде фосфорно-молибденового комплекса изобутанолом по Беренблему и Чейну [13]. Извлечение повторяли два-три раза. Последняя проба изобутанола не содержала  $P^{32}$ . Затем пробы сжигали, а в них определяли  $P_{\text{неорг}}$  по Фиске и Суббароу и радиоактивность на установке Б-2 со счетчиком АС-2. Расчет константы равновесия проводили по формуле:

$$K = \frac{(\text{серин}) (\text{фосфат})}{(\text{фосфосерин})}$$

7 в 10  $\mu\text{кг}$  Р выделенного фосфосерина-носителя было определено  $5 \cdot 10^{-9}$  г меченого Р фосфосерина). При определении  $\Delta F$  такие значительные размахи в цифрах приводят всего к различиям в 0,3 ккал/моль.

На положение равновесия гидролиза и синтеза эфиров фосфорной кислоты влияет рН среды. Это связано с изменением диссоциации кислотных групп. Первая ОН-группа фосфорной кислоты как свободной, так и в ее соединениях полностью нонизирована, третья ОН-группа ( $K = 4,5 \cdot 10^{-12}$ ) фосфата при рН 9,7 и ниже практически не диссоциирует и не влияет на реакцию среды. Кислотные свойства свободной фосфорной кислоты и ее эфиров в зоне, недалеко от нейтральной реакции, определяются исключительно различиями в диссоциации второй ОН-группы. Присоединение фосфата к креатину и к глицерину сильно отражается на диссоциации второй ОН-группы, причем константа диссоциации этой группы увеличивается (например, для свободной фосфорной кислоты она равна  $1,5 \cdot 10^{-7}$ , а для глицерофосфата —  $4,7 \cdot 10^{-7}$ ).

Гидролиз эфиров фосфорной кислоты сопровождается связыванием водородных ионов, а синтез — освобождением:



где  $n$  — правильная дробь.

В соответствии с принципом Ле Шателье сдвиг рН в кислую сторону смещает положение равновесия в сторону уменьшения концентрации фосфосерина. Изменение константы равновесия реакции гидролиза эфиров фосфорной кислоты при сдвиге концентрации водородных ионов в области, близкой к физиологической концентрации, может быть вычислено по формуле, выведенной Гинодманом [14]:

$$\frac{K_{\text{ф}} + \text{H}_1^+}{K_{\text{сф}} + \text{H}_1^+} \cdot \frac{K_{\text{сф}} + \text{H}_2^+}{K_{\text{ф}} + \text{H}_2^+} = \frac{K_1}{K_2},$$

где  $\text{H}_1^+$  и  $\text{H}_2^+$  — концентрация водородных ионов для щелочной и кислой среды,  $K_1$ ,  $K_2$  — константы равновесия для щелочной и кислой среды,  $K_{\text{ф}}$  и  $K_{\text{сф}}$  — константы диссоциации второй группы фосфорной кислоты свободной и в фосфосерине соответственно. Но Остебергу [15]  $K_{\text{сф}} = 10^{-5,67}$ . Расчет по этой формуле при переходе от рН 9,7 к рН 7,0 дает изменение константы равновесия в 1,6 раза:

$$\frac{10^{-6,82} + 10^{-9,7}}{10^{-5,67} + 10^{-9,7}} \cdot \frac{10^{-5,67} + 10^{-7}}{10^{-6,82} + 10^{-7}} = \frac{1}{1,6}.$$

Таким образом, если для рН 9,7 принять константу равной 287, то при рН 7,0 следует ожидать 459. Результаты опытов (табл. 2) показали, что действительно константы равновесия в нейтральной среде больше, чем в щелочной и полученная разница величин констант равновесия при рН 7,0 и 9,7, хотя и не соответствует полностью теоретически рассчитанной, тем не менее близка к ней.

Определив константу равновесия реакции, можно было рассчитать величину  $\Delta F$  гидролиза фосфосерина. Для стандартных условий при концентрации реагирующих веществ, равных 1 М для рН 9,7 она оказалась равной —3,41 ккал, а для рН 7,0—7,1 —3,95 ккал.

Сравнивая полученную величину  $\Delta F_0$  с имеющимися в литературе данными для некоторых эфиров фосфорной кислоты (табл. 3), можно заключить, что фосфосерин является соединением, обладающим большей энергией связи, чем прочие эфиры фосфорной кислоты и спиртов.

Так как вхождение фосфосерина в состав белка, по-видимому, не скрывается существенным образом на величине  $\Delta F_0$  гидролиза фосфоэфирной связи, то и фосфопротены следует считать веществами, обладаю-

Таблица 2

**Константа равновесия и величина свободной энергии реакции гидролиза  
фосфосерина при pH среды 7,0—7,1**

Номера опытов	Концентрации веществ, участвующих в реакции		Радиоактивность фосфата, <i>имп/мин</i>	Продолжительность опыта, <i>мин.</i>	Количество фосфосерина-носителя, <i>мг/пробу</i>	Номер хроматограммы	Количество синтезированного фосфосерина, $10^{-6}$ <i>М</i>	K	$\Delta F_0$ , <i>ккал</i>
	серин, <i>М</i>	фосфат, <i>М</i>							
6	0,0092	0,0308	$7,10 \cdot 10^8$	210	0,753	1	0,26	1083	—4,28
						2	0,55	522	—3,85
						3	0,27	928	—4,18
7	0,0080	0,0260	$5,80 \cdot 10^8$	240	0,381	1	0,70	273	—3,44
						2	0,37	560	—3,92
Среднее:								673	—3,95

Таблица 3

**Величина свободной энергии гидролиза некоторых эфиров фосфорной кислоты**

№ № п/п	Соединение	pH	ккал	Автор
1	$\alpha$ -Глицерофосфат	8,5	2,20	Мейергоф и Грин [16]
2	3-Фосфоглицериновая кислота	8,5	3,00	Мейергоф и Оспер [17]
3	Глюкозо-6-фосфат	8,5	3,00	Мейергоф и Грин [16]
4	»		2,45	Гинодман [14]
5	Фруктозо-6-фосфат	8,5	3,00	Мейергоф и Оспер [17]
6	АТФ	7,0	7,6	Робинс и Бойер [18]
7	»	7,25	5,6—6,2*	Владимиров и др. [19]
8	»	7,0	6,8	Аткинсон и др. [20]
9	Фосфосерин	9,7	3,41	Данные настоящей работы
10	»	7,0	3,95	»

\* Если принять  $\Delta F_0$  гидролиза глюкозо-6-фосфата равной — 2,45 (4), то для гидролиза АТФ  $\Delta F_0$  была высчитана равной 5,6 ккал; если же принять величину Мейергофа и Грина 3,00 (3), то она получится равной 6,2 ккал.

щими несколько большей  $\Delta F_0$  гидролиза, чем целый ряд фосфорных соединений — промежуточных продуктов гликолиза. Интересно, что Наджаром  $\Delta F_0$  фосфоглюкомутазы оценивается в 3,9 ккал [21].

Подобная величина  $\Delta F_0$  фосфопротеинов обеспечивает термодинамическую обратимость обмена фосфатными группами между фосфопротеинами и фосфорными эфирами. Все вышеуказанное хорошо согласуется с представлениями о том, что фосфопротеины являются каталитически активными белками, участвующими в обмене веществ [22]. Теперь уже доказано, что фосфопротеинами являются некоторые ферменты, переносящие фосфатную группу, в частности, гексокиназа [23], фосфоглюкомутазы [24—26], фосфорилаза [27; 28], причем фосфорная кислота входит в состав этих ферментов в виде фосфосерина.

Полученные данные позволяют далее вновь вернуться к величине  $\Delta F_0$  гидролиза АТФ. В исследованиях последнего времени эта величина колеблется в пределах 5,6—7,6 ккал (табл. 3, 6—8). Если для фосфопротеинов энергия гидролиза та же, что и для фосфосерина, и если принять в соответствии с данными Рабиновича и Линмана [7], что при переносе фосфатной группы с АТФ на фосфопротеины изменение свободной энергии составляет 2,9 ккал, то свободная энергия гидролиза АТФ будет на 2,9 ккал выше, чем энергия гидролиза фосфосерина. А это составит от 6,3 (pH 9,7) до 6,85 ккал (pH 7,0). Рассчитанная таким образом  $\Delta F_0$  для АТФ оказывается очень близкой к величинам, определенным экспериментально, в особенности к данным Аткинсона и сотрудников.

## ВЫВОДЫ

Свободная энергия гидролиза фосфосерина, определенная по константе равновесия фосфатазной реакции, составляет в среднем 3,95 ккал для стандартных условий.

Свободная энергия гидролиза АТФ немного ниже 7 ккал/моль фосфорной кислоты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Davidson J., Gardner M., Hutchinson W. *et al.*, *Biochem. J.* **44**, 3, 1949.
2. Johnson R., Albert S., *J. Biol. Chem.* **200**, 335, 1953.
3. Владимиров Г.Е., *Физиол. ж.* **39**, 1, 1953.
4. Энгельгардт В.А. и Лисовская Н.П., в сб.: *Биохимия нервной системы*, стр. 77, Изд-во АН УССР, К., 1954.
5. Владимиров Г.Е., Иванова Т.Н. и Правдина Н.И., *Биохимия* **21**, 155, 1956.
6. Heald P.J., *Biochem. J.* **73**, 132, 1959.
7. Rabinowitz M., Lipmann F., *Proc. 4-th Int. Congr. Biochem. Vienna, Sect. 4-69*, Pergamon Press, L., 1958.
8. Albers H., Albers E., *Z. physiol. Chem.* **232**, 165, 1935.
9. Morton R.K., *Biochem. J.* **70**, 139, 1958.
10. Plimmer R.H.A., *Biochem. J.* **35**, 461, 1941.
11. Lipmann F., *Biochem. Z.* **262**, 9, 1933.
12. Delory G.E., *Biochem. J.* **32**, 1161, 1938.
13. Berenblum J., Chain E., *Biochem. J.* **32**, 295, 1938.
14. Гинодман Л.М., Энергетическая характеристика промежуточных реакций гликолиза, Дис., Л., 1954.
15. Österberg R., *Arkiv Kemi* **13**, 393, 1959.
16. Meyerhof O., Green H., *J. Biol. Chem.* **178**, 655, 1949.
17. Meyerhof O., Oesper P., *J. Biol. Chem.* **179**, 1371, 1949.
18. Robbins E.A., Boyer K.D., *J. Biol. Chem.* **224**, 121, 1957.
19. Владимиров Г.Е., Власова В.Г., Колотилова А.И., Лызлова С.Н. и Пантелева Н.С., *Биохимия* **22**, 963, 1957.
20. Atkinson M.R., Johnson E., *Nature* **185**, 1925, 1959.
21. Sidbury J.B., Najjar V.A., *J. Biol. Chem.* **227**, 517, 1957.
22. Энгельгардт В.А. и Лисовская Н.П., Доклад на XIX международном физиол. конгрессе, стр. 209, Изд-во АН СССР, М., 1953.
23. Agren G., Engstrom L., *Acta chem. scand.* **10**, 489, 1956.
24. Jaganathan V., Luck J.M., *J. Biol. Chem.* **179**, 569, 1949.
25. Anderson L., Jollès G.R., *Arch. Biochem. and Biophys.* **70**, 121, 1957.
26. Koshland D.E., Erwin M.J., *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 2657, 1957.
27. Wosilait W.D., *J. Biol. Chem.* **233**, 597, 1958.
28. Fischer E.H., Graves D.J., Crittenden E.R., Krebs E.G., *J. Biol. Chem.* **234**, 1698, 1959.

Поступила в редакцию  
5.VIII.1960

## ON FREE ENERGY OF PHOSPHOSERINE HYDROLYSIS

[G. E. VLADIMIROV], A. I. KOMKOVA and N. A. FEDOROVA

*Laboratory of Protein Chemistry, Chair of Biochemistry, State University, Leningrad*

The free energy of phosphoserine hydrolysis was determined from the equilibrium constant of the phosphatase reaction. Serine and labelled phosphate ( $P^{32}$ ) were used. The amount of synthesized phosphoserine was assayed from the activity of phosphoserine isolated by means of a non-labelled carrier. Free energy ( $\Delta F_0$ ) of phosphoserine hydrolysis at pH 9.7 and 7.0 and at 35°C was found to be equal  $-3.41$  and  $-3.95$  *ksal/mol* respectively.

Such a free energy value of hydrolysis of phosphoserine incorporated into phosphoproteins secures the thermodynamic possibility of a reversible transfer of phosphate groups between some low molecular phosphorus esters, on one hand, and phosphoproteins, on the other.

The above data offer a new means for demonstrating that the free energy of ATP hydrolysis does not exceed 7 *kcal/mol*.