

УДК 577.158.1

БИОХИМИЯ

А. И. ЛЕБЕДЕВА, Б. А. КИСЕЛЕВ, А. Д. МАКАРОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АДФ В НЕЙТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ рН ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 III 1971)

Возможный механизм образования аденозинтрифосфата из аденозиндифосфата рассматривается в работе Л. А. Блюменфельда и М. И. Темкина (¹). Первичным процессом этой реакции является восстановление аденинового кольца, в результате чего основность аминогруппы резко повышается. Эта гипотеза не встречает возражений с химической точки зрения, однако до настоящего времени она не получила экспериментального подтверждения.

В ряде работ (²⁻⁴) приводятся данные по электрохимическому восстановлению аденина и его производных. Было показано, что аденин дает волну восстановления на ртутном капельном электроде лишь в крайней кислой области с $E_{1/2} \approx -1$ в. Восстановление сопровождается выделением аммиака и разрушением аденинового кольца; конечным продуктом реакции является производное имидазола. Такой процесс не может, очевидно, служить моделью предполагаемого восстановления АДФ *in vivo* по двум причинам: отсутствие в клетке крайне кислой среды, в которой проводилось восстановление; образующийся продукт имеет разрушенное адениновое кольцо, что, по-видимому, исключает возможность последующего образования АТФ.

Целью данной работы является исследование процесса восстановления АДФ в условиях, близких к существующим в клетке, в частности при нейтральных значениях рН, методом классической полярографии и электролиза при контролируемом потенциале.

При рН 4—5 АДФ образует диффузионную волну восстановления, потенциал полу волны которой линейно зависит от рН. Эти данные согласуются с результатами работ (^{2, 3}). Однако, в отличие от упомянутых выше работ, нам удалось распространить полярографические измерения на более щелочные области.

При значениях рН более 5 волна восстановления становится отличной от диффузионной, предельный ток резко возрастает (рис. 1б) и перестает зависеть от высоты ртутного столба. Зависимость $E_{1/2}$ от рН возрастает до 200 мв на 1 ед. рН (в диапазоне рН 4,8—6,2) вместо 60 мв на 1 ед. рН. Все это позволяет считать, что при переходе рН от 5 к нейтральным и щелочным значениям механизм электродного процесса изменяется: имеет место каталитическое восстановление ионов водорода. «Рваный» характер полярограммы в этой области рН обусловлен выделением пузырьков водорода на поверхности ртутной капли. При дальнейшем увеличении рН среды высота волны восстановления уменьшается и приобретает кинетический характер; волна становится квазидиффузионной.

В ряде работ (^{2, 3}) указывалось на способность аденина и его производных катализировать электрохимическое восстановление ионов водорода. Изложенные выше данные являются прямым доказательством этого и для молекулы АДФ.

В этом случае электрон переносится на протонированную молекулу «деполяризатора» (АДФ). Образующийся при этом незаряженный свобод-

ный радикал в результате диспропорционирования дает молекулу исходного «деполяризатора» и молекулу водорода.

Каждая частица катализатора (АДФ) может таким образом «переработать» значительное количество протонов, что и обуславливает аномально большую величину предельного тока при относительно малой концентрации катализатора (АДФ).

При переходе к более щелочным значениям pH ($\text{pH} > 7$) концентрация протонов становится заметно меньше, чем может «переработать» АДФ, предельный ток снова уменьшается и имеет диффузионное ограничение, по теперь уже по концентрации протонов.

Изложенный механизм детально изучен в монографии С. Г. Майраповского (5).

Молекула аденина обладает основными свойствами и способна протонироваться даже в слабокислой среде по N_1 (6).

Наличие каталитической волны выделения водорода, ее уменьшение, вплоть до полного исчезновения с ростом pH, зависимость $E_{1/2}$ от pH (рис.

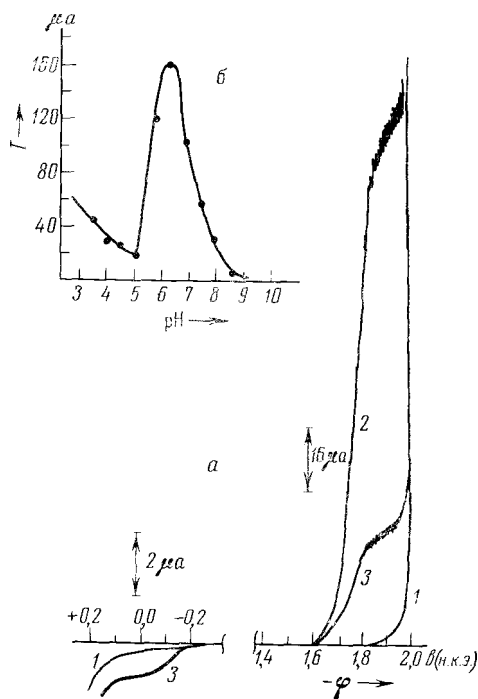


Рис. 1

Рис. 1. а — полярограммы 10^{-3} М АДФ в ацетатном буфере при pH 6,7: 1 — фон, 2 — до электролиза, 3 — после электролиза при $\phi = -1,85$ в в течение 2,5 часа; б — зависимость предельного тока волны восстановления АДФ от pH среды

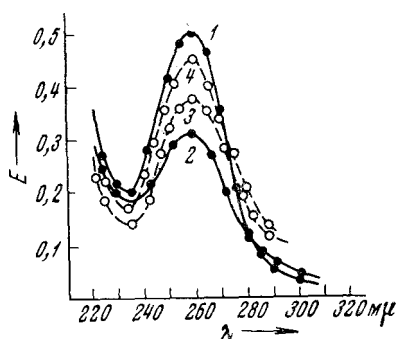


Рис. 2

Рис. 2. Кривые поглощения АДФ в у.-ф. до и после электролитического восстановления в ацетатном буфере pH 6,7. $C_{\text{АДФ}} = 10^{-3}$ мол./л, $\phi_{\text{электролиза}} = 1,8$ в. 1 — до электролиза; 2 — после электролиза в течение 3 час; 3 — после стояния на воздухе 10 час; 4 — после стояния на воздухе 20 час.

процессы смешанного характера, в которых одновременно с образованием молекулярного водорода происходит частичное восстановление катализатора.

Очевидно, что если электрохимическое восстановление АДФ при нейтральных значениях pH вообще возможно, то оно будет иметь место при одновременном каталитическом восстановлении протонов водорода. Действительно, электролиз раствора АДФ при pH 6, 7, проведенный при потенциале предельного тока каталитической волны, показал уменьшение концен-

трации АДФ, измеряемой по величине поглощения при 260 мμ (рис. 2). Как и следовало ожидать, выход по току очень мал, собственно на восстановление АДФ расходуется около 10% количества электричества, прошедшего через ячейку.

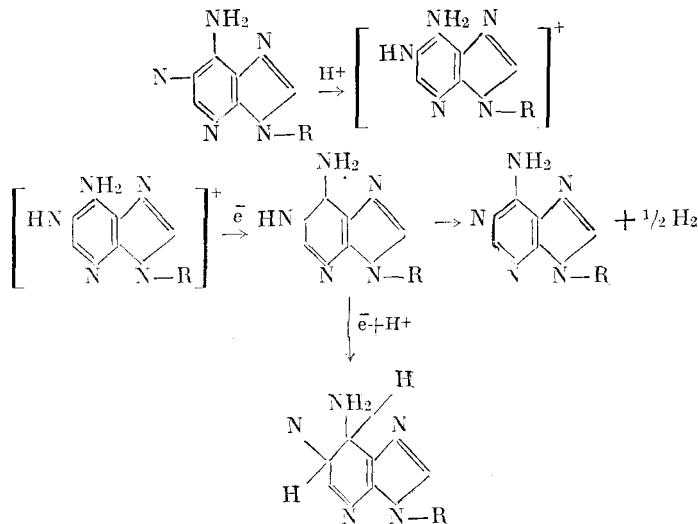
Из рис. 1а следует, что продукт восстановления АДФ, получаемый в этих условиях, образует анодную волну с $E_{1/2} \approx -0,12$ в; продукт «кислого» электролиза полярографически не удалось зарегистрировать. Анодная волна указывает, что продукт способен сравнительно легко окисляться, а значение ее потенциала полуволны указывает, что окислителем может служить кислород воздуха. Рис. 2 подтверждает, что при длительном стоянии на воздухе продукт электролиза регенерируется в АДФ. Из этого факта следует весьма важный вывод, что при восстановлении АДФ в нейтральной среде адениновое кольцо молекулы сохраняется.

В отличие от изложенного результата, продукт электролиза в кислой среде не образует на ртутном капальном электроде анодной волны и не регенерируется при длительном стоянии на воздухе.

Отсутствие обратимости для второго продукта становится ясным из схемы Смита и Элвинга ⁽²⁾ для восстановления пуриновых соединений в кислой области. В этом случае волна восстановления отвечает последовательному принятию 6 электронов и 6 протонов. Процесс сопровождается отщеплением аммиака и разрушением аденинового кольца; продуктом является производное имидазола.

Каталитическое выделение водорода, происходящее одновременно с процессом восстановления АДФ при переходе к нейтральной области pH, не позволяет определить число электронов и протонов, принимаемых молекулой АДФ.

Однако, опираясь на схему Смита и Элвинга и на факт наличия сравнительно легкой регенерации продукта в исходное вещество, можно, вероятно, предположить, что в процессе участвуют 2 электрона и 2 протона. Такое менее глубокое восстановление происходит без отщепления аммиака и разрушения аденинового кольца.



Из изложенных выше результатов электрохимического восстановления следует несколько выводов, которые могут представлять интерес для понимания роли АДФ в клетке.

Участие восстановленной формы АДФ при образовании АТФ в процессе окислительного фосфорилирования является необходимым моментом гипотезы Блюменфельда и Темкина. На возможное участие дигидропроизводных аденозиндифосфатов в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях и фотофосфорилирования на хлоропластах ука-

зывалось в работах (⁷, ⁸). Получение восстановленной формы электрохимическим путем без разрушения аденинового кольца при нейтральных значениях рН может служить подтверждением вышеизложенных предположений.

Имеются указания на активирующую роль аденозиннуклеотидов в процессе фотовосстановления НАДФ. Процессы фотофосфорилирования и восстановления НАДФ сопряжены в случае нециклического фосфорилирования с одним и тем же участком электрон-транспортной цепи. Обычно ускорение фотовосстановления НАДФ в присутствии аденозиннуклеотидов связывают с участием последних в транспорте электронов (⁹, ¹⁰). Однако В. П. Скулачевым было выдвинуто предположение, что адениннуклеотиды могут выполнять роль переносчика протонов на фосфорилирующем участке дыхательной цепи (⁷). Способность АДФ катализировать восстановление протонов можно считать прямым доказательством, того, что наряду с основной ролью — участвовать в синтезе АТФ — АДФ может служить переносчиком протонов в биологических системах.

Электрохимическое восстановление даже протонированной молекулы АДФ в нейтральной области рН на электроде происходит с большим перенапряжением. Найденное нами значение потенциала восстановления АДФ $E_{1/2} = -1,75$ в (или $\approx -1,5$ в по водородной шкале) для живой клетки является величиной нереальной. Однако следует обратить внимание, что в данном случае $E_{1/2}$ не является нормальным окислительно-восстановительным потенциалом, так как электрохимический процесс необратим (потенциал окисления продукта $E_{1/2}^0 \approx -0,12$ в).

Очевидно, окислительно-восстановительный потенциал для системы АДФ-Н⁺/АДФ-Н₂ имеет более положительное значение, вероятно около $-0,4$ в по водородной шкале (или $-0,65$ в н.к.э.), что соответствует энергии 10 ккал/мол при проведении процесса в стандартных условиях.

Столь большая величина электрохимического перенапряжения (около вольта) указывает, что в клетке восстановления АДФ носит ферментативный характер, при котором двухэлектронный процесс восстановления может быть расчленен на два одноэлектронных, протекающих при менее отрицательных потенциалах.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступила
17 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. А. Блюменфельд, М. И. Темкин, Биофизика, 7, в. 6 (1962).
² D. Smith, P. Elving, J. Am. Chem. Soc., 84, 1412 (1962). ³ В. П. Скулачев, Л. И. Денисович, Биохимия, 31, 132 (1966). ⁴ И. А. Горская, А. В. Котельникова и др., Биохимия, 30, 315 (1965). ⁵ С. Г. Майрановский, Каталитические и кинетические волны в полярографии, «Наука», 1966. ⁶ Органическая химия нуклеиновых кислот, М., 1970. ⁷ V. P. Skulachev, Nature, 198, 444 (1963). ⁸ А. Д. Макаров, А. Н. Мальяп, и др., Биофизика. ⁹ A. Trebst, E. Pistorius, Biochim. et biophys. acta, 131, № 3, 580 (1967). ¹⁰ G. Forti, Biochem. Biophys. Res. Commun., 33, № 1, 38 (1968).