

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Г. П. БРИН, В. В. НИКАНДРОВ

ВОЗБУЖДЕНИЕ СВЕТОМ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПИРИДИННУКЛЕОТИДОВ: ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА НА ФЕРРЕДОКСИН И МЕТИЛВИОЛОГЕН

Ранее было определено, что возбужденные ультрафиолетовым светом НАД-Н и его аналоги способны к фотовосстановлению ряда соединений, в том числе метилвиологена (1). Высказывались предположения о возможной роли таких реакций при химической эволюции фотосинтеза (2).

В настоящей работе изучено фотохимическое восстановление ферредоксина (Фд) и метилвиологена (в форме дикатиона MV^{2+}) возбужденными НАД-Н и НАДФ-Н и фотосенсибилизация этих реакций к видимой области спектра гематопорфирином.

Мы использовали лиофилизированный ферредоксин, выделенный из сине-зеленой водоросли *Spirulina maxima* с известной величиной E (3), НАД-Н и НАДФ-Н 80% чистоты («Reanal»), метилвиологен дихлорид кристаллический. Реакции проводились в водном растворе в вакуумных трубках Тунберга, освещение линиями ртути 365 нм, выделенными из спектра ртутно-кварцевой лампы СВД-120А комбинацией светофильтров УФС-1, СЗС-23, СЗС-24 ($4 \cdot 10^4$ эрг/см²·сек). За восстановлением метилвиологена следили по увеличению оптической плотности раствора при 605 нм в максимуме поглощения катион-радикала ($MV^{\cdot+}$), за восстановлением Фд — по изменению поглощения в максимумах 420 и 465 нм. Спектрофотометр СФ-14 был приспособлен для измерения образцов малой оптической плотности введением дополнительного диапазона измерения от 0 до 0,1 D.

Прямое фотовосстановление метилвиологена. Освещение водных растворов НАД-Н и НАДФ-Н ($4,8 \cdot 10^{-4}$ M) в присутствии MV^{2+} ($4 \cdot 10^{-6}$ M) приводит к появлению характерного спектра поглощения катион-радикала $MV^{\cdot+}$. При продолжительности освещения 10 мин. после максимального накопления синей формы мы наблюдали падение D при 605 нм (рис. 1). Неокрашенный продукт не окисляется кислородом. На 1 моль образованного $MV^{\cdot+}$ расходуется $1/2$ моля НАД-Н, а восстановление до бесцветной формы требует 1 моль НАД-Н, т. е. соответствует стехиометрии образования дигидроформы (MV). Известно, что восстановление $MV^{\cdot+}$ (⁴⁻⁶) приводит к образованию дигидропиридила, который обладает поглощением при 400 нм, обратимо окисляется кислородом. Возможно, что дигидропиридил является промежуточным продуктом на пути образования тетрагидропиридила (4). На это указывает частичная обратимость (около 10%) реакции (на нисходящей ветви кривой) в темноте после освещения.

E_0' первой ступени электрохимического восстановления MV^{2+} до $MV^{\cdot+}$ составляет 0,45 в, а второй ступени 0,8 в (5). Вероятно, возбуждение светом НАД-Н или НАДФ-Н увеличивает их восстановительный потенциал по крайней мере до этой величины. Это согласуется с нашим измерением фотопотенциала системы (2).

С помощью железооксалатного актинометра (7) был измерен квантовый выход (γ) реакции. При образовании $MV^{\cdot+}$ $\gamma=0,2$ для НАД-Н и $\gamma=0,1$

для НАДФ-Н. Для второй ступени восстановления величина γ на порядок меньше.

Фотовосстановление ферредоксина. При освещении водных растворов НАД-Н в присутствии Фд наблюдалось падение поглощения в области 420 и 465 нм (рис. 2а), что соответствует образованию восстановленного ферредоксина (Фд⁻). За 20 мин. освещения восстанавливается до 80% исходного белка. При пуске воздуха происходит полное обратимое окисление Фд⁻ до Фд. Последующее удаление кислорода и освещение приводит к повторению реакции. Такая процедура повторялась

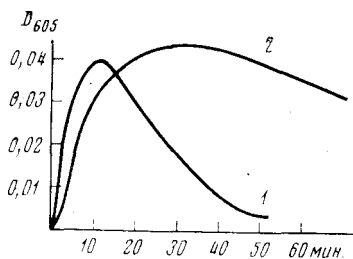


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика фотовосстановления метилвиологена ($4 \cdot 10^{-6} M$) восстановленными пиридиннуклеотидами. 1 — НАД-Н ($4,8 \cdot 10^{-4} M$), 2 — НАДФ-Н ($4,8 \cdot 10^{-4} M$). Освещение 365 нм; $4 \cdot 10^4$ эрг/см².сек, без воздуха

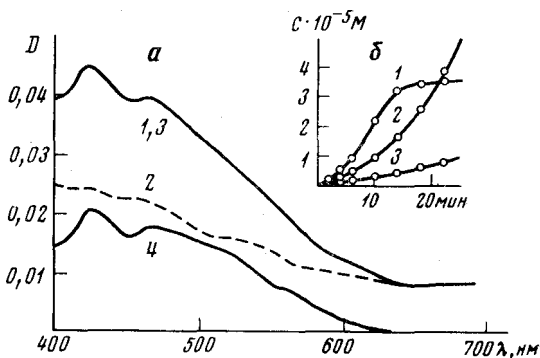


Рис. 2

Рис. 2. а — фотовосстановление ферредоксина ($4,4 \cdot 10^{-6} M$) с помощью НАД-Н ($2,4 \cdot 10^{-4} M$). Спектры поглощения: 1 — до освещения, 2 — после освещения, 3 — после обратной реакции с кислородом воздуха, 4 — дифференциальный спектр (темнота — свет). Освещение 20 мин. светом 365 нм, $4 \cdot 10^4$ эрг/см².сек, без воздуха. б — кинетика фотовосстановления ферредоксина НАД-Н и НАДФ-Н при разных концентрациях компонентов: 1 — НАД-Н $2,4 \cdot 10^{-4} M$, Фд $4,4 \cdot 10^{-6} M$; 2 — НАД-Н $2,4 \cdot 10^{-4} M$, Фд $3,7 \cdot 10^{-5} M$; 3 — НАДФ-Н $2,4 \cdot 10^{-4} M$, Фд $4,4 \cdot 10^{-6} M$

4 раза без снижения поглощения исходного Фд. Освещение реакционной смеси светом длиннее 400 нм, т. е. в области, которая не поглощает НАД-Н, не приводило к восстановлению Фд. Измерения в максимуме поглощения НАД-Н показали его окисление в ходе реакции, также как и в случае образования МВ⁺.

Квантовый выход реакции при концентрации Фд $4,4 \cdot 10^{-6} M$ $\gamma=0,2$, а при $3,7 \cdot 10^{-5} M$ Фд величина γ достигала 0,3 (рис. 2б), т. е. реакция является весьма эффективной. Изменение рН от 7,3 до 9,3 не отразилось на скорости и глубине описанных реакций.

При использовании НАДФ-Н скорость реакции ниже (рис. 2б). $\gamma=0,02$ при $4,4 \cdot 10^{-6} M$ Фд. Причины этого неясны. Возможны стерические трудности при взаимодействии Фд с НАДФ-Н по сравнению с НАД-Н. В контрольном опыте освещение Фд при рН 7,3 в вакууме (без НАД-Н) линиями ртути 365 нм не вызывало изменений в спектре поглощения. Существенно, что освещение линиями ртути 313 нм (светофильтр УФС-1) приводило к фотовосстановлению Фд с γ до 0,1. При последующем пуске воздуха до 90% образованного Фд⁻ окислялось. По-видимому, этот эффект связан с самовосстановлением Фд за счет алектонодонорных группировок молекулы белка, что подобно эффекту фотохимического самовосстановления цитохрома с, обнаруженному в нашей лаборатории^(8, 9).

Освещение «полным» нефильтрованным спектром ртутной лампы приводило к необратимому падению максимума окисленного Фд, что, очевидно, связано с далеко идущей деструкцией белка.

Фотосенсибилизация. Мы наблюдали ранее восстановление MV^{2+} в присутствии различных доноров электрона (¹, ¹⁰) фотосенсибилизированное хлорофиллом; НАД-Н также может быть донором электрона в этих реакциях (¹¹). Фотосенсибилизированное копропорфирином восстановление Фд происходит при использовании в качестве донора электрона аскорбиновой кислоты и дитиозеритрита (¹²). Наблюдалось фотовосстановление Фд при использовании гематопорфирина как сенсибилизатора и глутатиона как донора электрона (¹³).

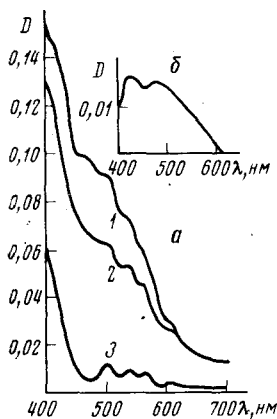


Рис. 3

Рис. 3. Фотосенсибилизированное гематопорфирином ($5 \cdot 10^{-7} M$) восстановление ферредоксина ($1,05 \cdot 10^{-5} M$) с помощью НАД-Н ($2,4 \cdot 10^{-4} M$). *a* — спектры поглощения: 1 — до освещения, 2 — после освещения, 3 — спектр поглощения гематопорфирина ($5 \cdot 10^{-7} M$). *б* — дифференциальный спектр (темнота — свет). Освещение светом 500–650 нм, $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек, без воздуха

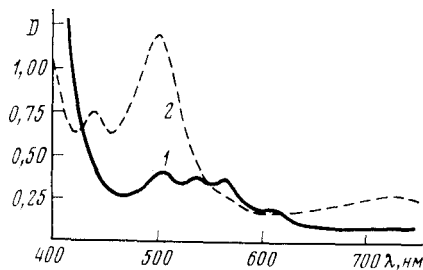


Рис. 4

Рис. 4. Фотовосстановление гематопорфирина ($8 \cdot 10^{-6} M$) в присутствии НАД-Н ($2,4 \cdot 10^{-4} M$). Спектры поглощения: 1 — до освещения, 2 — после 20 мин. освещения. Свет 500–650 нм, $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек, без воздуха

Мы применили водорастворимый гематопорфирин как фотосенсибилизатор окисления НАД-Н ферредоксином или метилвиологеном. В этом случае реакция возбуждалась видимым светом в области поглощения гематопорфирина при 500–650 нм (лампа накаливания 100 вт с конденсором, комбинацией светофильтров ЖС-17, СЗС-23, СЗС-24), $3 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек.

При фотосенсибилизированной реакции наблюдается восстановление MV^{2+} до MV^{+} , однако в отличие от прямого восстановления фотовозбужденным НАД-Н не происходит дальнейшего восстановления MV^{+} . Такое различие прямой и фотосенсибилизированной реакции, очевидно, связано с тем, что потенциал фотовосстановленного гематопорфирина не достигает 0,8 в.

При использовании Фд в качестве акцептора электрона происходит его полное фотовосстановление, после чего наступает фотовосстановление гематопорфирина, что видно по первоначальному уменьшению поглощения в области 465 и 420 нм (рис. 3) и последующему увеличению поглощения при 440, 500, 730 нм (образование дигидроформы 440, 730 нм и тетрагидроформы 500 нм восстановленного гематопорфирина (¹⁴)). При впуске воздуха идет полное обратимое окисление Фд⁻. После повторной откачки воздуха и освещения реакцию можно повторить. При использовании НАДФ-Н как донора электрона при фотосенсибилизации гематопорфирином скорость восстановления Фд была в два раза меньше, чем с НАД-Н.

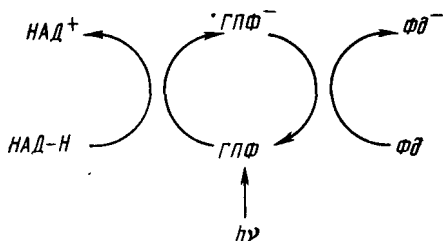
Гематопорфирин способен к фотовосстановлению различными донорами электрона (¹⁵). В наших опытах освещение водного раствора гематопорфирина с НАД-Н также приводило к образованию дигидро- и тетра-

гидроформ восстановленного гематопорфирина (рис. 4). В контрольных опытах, когда растворы гематопорфирина и Фд освещались без донора электрона, наблюдается медленное (скорость реакции в 50 раз меньше) падение максимумов поглощения Фд. При пуске воздуха происходило лишь частичное обращение реакции. Так, при падении поглощения Фд при 465 нм на 25% возвращалась лишь половина Фд, при падении на 60% — около одной трети. Это явление можно объяснить тем, что гематопорфирин фотосенсибилизирует восстановление Фд за счет электронодонорных групп самого белка и при этом происходит частичная деструкция Фд. Подобное явление наблюдается при фотосенсибилизированном восстановлении цитохрома (16).

Итак, результаты опытов могут быть выражены следующей схемой. Прямое фотовосстановление Фд возбужденным НАД-Н



Фотосенсибилизированное гематопорфирином (ГПФ) восстановление Фд



В цепи фотосинтетического переноса электрона образованный Фд⁻ восстанавливает НАД⁺ и НАДФ⁺ с помощью НАДФ-редуктазы; при световой активации НАД-Н и НАДФ-Н (или сенсибилизации) наблюдается обратная реакция, идущая «против» градиента термодинамического потенциала. Наиболее существенно, что в изученных реакциях при световой активации НАД-Н и НАДФ-Н восстановительный потенциал выше, чем у водородного электрода.

В заключение приносим благодарность доктору Д. Холлу, любезно предоставившему нам лиофилизированный ферредоксин из спиролины.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
21 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, т. 163, 761 (1965). ² А. А. Красновский, Г. П. Брин, Сб.: Проблемы эволюционной и технической биохимии, «Наука», 1964.
³ D. O. Hall, K. K. Rao, R. Cammack, Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 47, 798 (1972).
⁴ L. Michaelis, E. S. Hill, J. Gen. Physiol., v. 6, 864 (1933). ⁵ R. M. Eloffson, R. L. Edsberg, Canad. J. Chem., v. 35, 646 (1957). ⁶ J. G. Carey, J. F. Cairns, J. E. Colchester, Chem. Commun., v. 21, 1280 (1969). ⁷ C. A. Parker, Proc. Roy. Soc., v. 220, 104 (1953).
⁸ А. А. Красновский, К. К. Войновская, Биофизика, т. 1, 120 (1956). ⁹ А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, т. 215, 727 (1974). ¹⁰ Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский, ДАН, т. 174, 221 (1967). ¹¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, т. 153, 212 (1963). ¹² R. Kassner, M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 58, 2445 (1967). ¹³ K. K. Eisenstein, L. H. Wang, J. Biol. Chem., v. 244, 1720 (1969). ¹⁴ D. Mauzerall, J. Am. Chem. Soc., v. 84, 2438 (1962). ¹⁵ А. А. Красновский, К. К. Войновская, ДАН, т. 96, 1209 (1954). ¹⁶ А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, ДАН, т. 194, 953 (1970).