

LE COUPLAGE PHOSPHORE-PHOSPHORE DANS L'ADENOSINE DI- ET TRIPHOSPHATE

M. ELLENBERGER, L. BREHAMET, M. VILLEMIN et F. TOMA

Département de Biologie - Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay

B.P. no. 2-91-GIF-sur, France

Received 19 March 1970

Revised version received 25 March 1970

The pH dependence of spin-spin coupling constants J_{P-O-P} of ADP and ATP has been determined from the phosphorus NMR spectra at 0° . The variation curves have been interpreted as titration curves. These give different pK values. Comparison with the triphosphate shows the existence of triphosphate chain structural deformation in the nucleotides.

1. Introduction

Nous avons étudié par résonance magnétique nucléaire (RMN) le couplage phosphore-phosphore dans les molécules d'adénosine di- et triphosphate (ADP et ATP), et sa variation en fonction du pH.

Les spectres de résonance du phosphore de ces molécules ont été étudiés pour la première fois à une fréquence de 24,288 MHz par M. Cohn [1, 2], qui a identifié les pics correspondant aux atomes de phosphore α et β de l'ADP, α , β et γ de l'ATP et mesuré la variation du déplacement chimique (δ) en fonction du pH. La structure fine observée par M. Cohn à pH 10 montre l'existence d'un couplage spin-spin entre les noyaux de phosphore. Pour cette même valeur du pH, analysant avec précision à 40,5 MHz le couplage phosphore-phosphore, M. Crutchfield, C.H. Dungan et J.R. Van Wazer [3] observent une différence de 0,7 Hz entre les constantes $J_{P\beta-O-P\gamma}$ et $J_{P\beta-O-P\alpha}$.

Nous avons mesuré les constantes de couplage J_{P-O-P} de l'ADP et de l'ATP en solution aqueuse sur toute la gamme des pH. Pour maintenir la stabilité des composés en solutions, même en milieu acide, nous avons opéré à 0° . Ainsi le spectre de l'ATP a pu être observé jusqu'à pH 0,20 et celui de l'ADP jusqu'à pH 3,01 (figs. 1 et 2). Les valeurs de J ne varient pas de façon mesurable entre 0° et la température ambiante; nos résultats peuvent donc être comparés avec ceux obtenus précédemment à cette température.

La résolution du spectromètre utilisé, de fréquence 30 MHz, ne permettant pas de distinguer les faibles différences constatées sur l'ATP, entre $J_{P\beta-O-P\gamma}$ et $J_{P\beta-O-P\alpha}$ [3] nous avons mesuré un couplage moyen J_{P-O-P} relatif à toute la molécule. Les variations de cette grandeur sont nettement supérieures à l'erreur expérimentale, ce qui nous conduit à admettre que $J_{P\beta-O-P\gamma}$ et $J_{P\beta-O-P\alpha}$ varient séparément comme J_{P-O-P} observée. (fig. 3).

2. Matériel et méthodes

Les solutions, de concentration 0,5 M en phosphore, sont préparées à partir de sels monosodiques d'ADP et disodique d'ATP (Calbiochem, qualité A). On obtient les solutions alcalines et acides par adjonction de KOH et de HCl concentrés, suivie de réajustement de la concentration d'ADP et d'ATP. Ces opérations ont été faites en chambre froide à 5° .

Le pH est mesuré à 0,01 unité près au moyen d'un pH-mètre (Tacussel TS-6) entre microélectrodes de verre et à calomel, avec affichage de la température à 0° .

Les mesures de RMN sont faites sur des solutions fraîchement préparées. Le temps de séjour à la température ambiante est réduit au strict minimum.

Nous utilisons un spectromètre (Spectrospin KIS 2), équipé d'une alimentation stabilisée (Drusch),

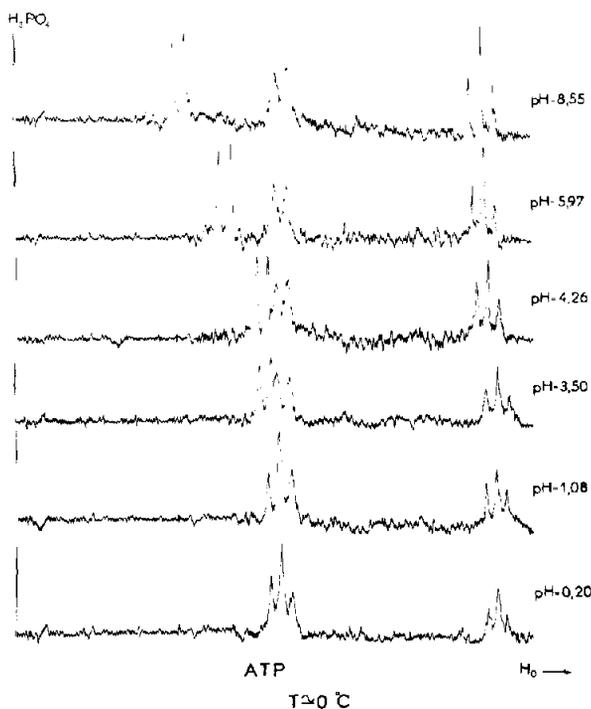


Fig. 1. Spectres de résonance du phosphore de l'ATP à 0° et à différents pH. Dans le sens du champ magnétique croissant à pH 8,55: raie du repère externe H_3PO_4 ; doublet du phosphore γ ; doublet du phosphore α élargi par couplage avec le groupe CH_2 en 5' du ribose; triplet du phosphore β . Les bandes latérales ont été supprimées des spectres.

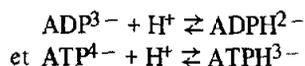
fonctionnant pour la résonance du phosphore à 30 MHz ($H_0 = 17\,406\text{ G}$). Une unité de variation de température (Bruker B-ST 100/700) stabilise la température de l'échantillon à $0 \pm 1^\circ$. Les spectres ont été enregistrés en balayage de champ. La résolution est de 0,6 Hz.

Les tubes à échantillon de précision, de 5 mm de diamètre, tournants, contiennent une petite sphère remplie de H_3PO_4 à 85% servant de repère. Les bandes latérales de ce repère ont été utilisées pour la mesure de l'effet J . Les mesures ont été faites 5 à 6 fois à quelques jours d'intervalle. L'erreur expérimentale est inférieure à 0,3 Hz.

Les multiplets complexes résultant en milieu acide de la superposition partielle de deux doublets voisins ont été décomposés analogiquement sur un analyseur de courbes (Dupont de Nemours 310) à partir de courbes lorentziennes dissymétriques.

3. Résultats et discussion

1) La variation de J est caractéristique: décroissance monotone par paliers quand le pH diminue et parallélisme des courbes de l'ATP et de l'ADP. Nous l'interprétons comme une courbe de titrage. Les paliers correspondent aux régions de pH où une espèce ionique est prédominante et les points d'inflexion aux pK de ces molécules. Nous trouvons une valeur de $6,5 \pm 0,1$ pour le pK de l'ADP et de l'ATP. Elle est compatible avec les données de la littérature pour les équilibres:



celles-ci variant selon la nature de l'électrolyte, sa concentration et la méthode de titrage [4]. Pour les trois

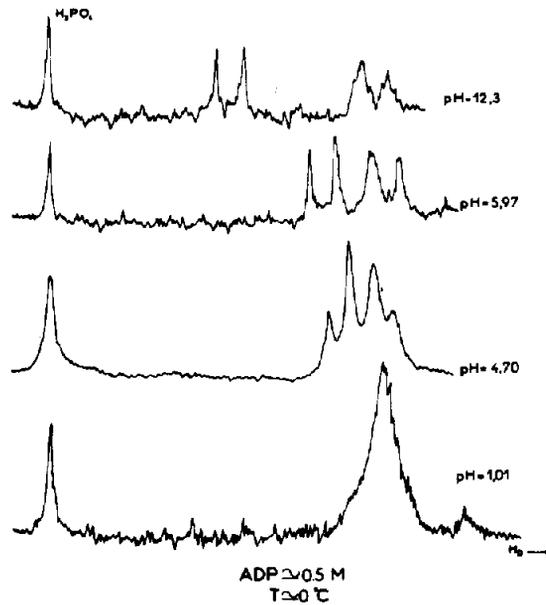


Fig. 2. Spectres de résonance du phosphore de l'ADP à 0° et à différents pH. Dans le sens du champ magnétique croissant à pH 12,3: repère externe, doublet du phosphore β , doublet du phosphore α . Les bandes latérales ont été supprimées des spectres.

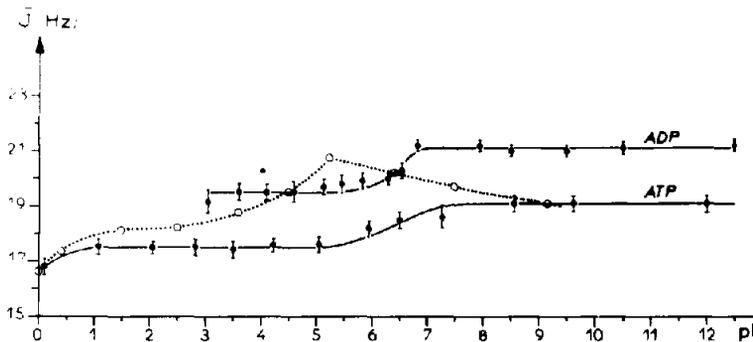


Fig. 3. Variation de \bar{J}_{P-O-P} de l'ADP et l'ATP en fonction du pH. En pointillé: même variation pour le triphosphate, d'après [6].

premières ionisations de l'ATP, les pK ont été évalués à 1,0 et 2,0 [5]. Nous trouvons une valeur inférieure à 1.

2) La constante \bar{J}_{P-O-P} a une plus grande valeur pour l'ADP que pour l'ATP. Ce fait est conforme à d'autres observations analogues où les noyaux apparaissent comme des obstacles (ou des écrans) à la transmission du couplage spin-spin par les électrons de liaison. La grandeur J diminue avec le nombre de

noyaux de phosphore dans la chaîne polyphosphate. Nous remarquons que la diminution de J entre l'ADP et l'ATP est du même ordre de grandeur qu'entre J de l'ATP et $J_{P_2-O-P_3}$ du tétrapolyphosphate [6] à pH 8.

$$\frac{J_{ATP}}{J_{ADP}} = 0,90 \quad \frac{J_{P_2-O-P_3 \text{ tétraP}}}{J_{ATP}} = 0,87 \text{ à pH } 8$$

Ce rapport varie lui-même avec le pH et traduit notamment en milieu acide la probabilité de fixation d'un proton sur un phosphate déterminé [6].

3) Ce qui nous semble particulièrement intéressant pour l'étude des propriétés biologiques de l'ATP et de l'ADP, c'est la comparaison des mononucléotides et du tripolyphosphate relativement au couplage phosphore-phosphore. La variation de J_{P-O-P} du tripolyphosphate telle qu'elle a été mesurée par Crutchfield et collaborateurs [6] a été portée en pointillé sur la fig. 3. Ces auteurs interprètent cette variation comme la superposition de deux effets. En milieu acide, de pH 5,5 à 0, il y aurait décroissance normale de J résultant de la formation de liaisons P-O-H à caractère covalent; à partir du point anguleux et jusqu'aux pH basiques, la variation en sens inverse résulterait de la complexation de l'anion tripolyphosphate avec les ions sodium de la solution. *La diminution de J traduit l'augmentation de charge positive sur la chaîne polyphosphate, effet dû, en milieu acide, à la protonation, en milieu alcalin, à la présence de cations.*

Or, il est remarquable de constater que cette seconde diminution ne s'observe pas sur les courbes des nucléotides. Nous attribuons ce fait, d'une part à l'effet électrostatique moindre des ions K^+ par rapport aux ions Na^+ . Il a été constaté sur les complexes du tripolyphosphate par Crutchfield et Irani [7] qui trouvent $J_{P-O-P} = 18,8$ Hz en présence d'ions Na^+ et 20,4 Hz en présence de K^+ , à pH 9. D'autre part, J ne dépend pas seulement de la densité de charge du milieu, mais aussi des déformations de la chaîne polyphosphate. Ce dernier effet serait propre aux nucléotides. Nos recherches se poursuivent sur le rôle de l'adénosine dans la déformation de la chaîne des phosphates.

Nous pensons que des observations de ce type peuvent apporter des données nouvelles sur la structure des molécules riches en énergie.

Remerciements

Nous remercions E.Roux, qui a eu l'idée de cette expérience, pour ses encouragements et ses conseils. Au cours de discussions passionnantes, G.Mavel nous a fait profiter de son inépuisable expérience sur la résonance du phosphore et M.Lutz de la sienne sur l'ATP. Les tubes à repère externe ont été fabriqués par R.Lebrun. Le Professeur J.P.Mathieu a aimablement mis à notre disposition un analyseur de courbes, Dupont de Nemours.

Bibliographie

- [1] M.Cohn, J.Cellular Comp. Physiol. 54, suppl. 1 (1959) 17.
- [2] M.Cohn and T.R.Hughes jr., J. Biol. Chem. 235 (1960) 3250.
- [3] M.M.Crutchfield, C.H.Dungan and J.R.Van Wazer, P^{31} Nuclear Magnetic Resonance (Wiley, 1967) pp. 12-13.
- [4] R.Phillips, Adenosine and the adenine nucleotides. Ionization, metal complex formation, and conformation in solution. Chem. Res. 66 (1966) 501.
- [5] P.George and R.Rutman, Progr. Biophys. Biophys. Chem. 10 (1960) 33.
- [6] M.M.Crutchfield, C.F.Callis, R.R.Irani and G.C.Roth, Inorg. Chem. 1 (1962) 813.
- [7] M.M.Crutchfield and R.R.Irani, J. Am. Chem. Soc. 87 (1965) 2815.