

УДК 541.143+547.757+547.854.4

БИОХИМИЯ

Д. Б. АСКЕРОВ, В. А. ИВАНЧЕНКО, А. И. ТИЩЕНКО, Н. С. ВУЛЬФСОН

**ФОТОХИМИЯ ЗАМОРОЖЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СМЕСЕЙ ТРИПТОФАНА С КОМПОНЕНТАМИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

(Представлено академиком А. А. Баевым 18 V 1973)

В ряде случаев фотостабильность нуклеиновых кислот повышается в присутствии белков<sup>(1)</sup>.

Целью работы являлось изучение этого эффекта на модельных системах — замороженных водных растворах смесей триптофана с компонентами нуклеиновых кислот. Выбор модельной системы основывался на том факте, что триптофан образует комплексы как с ДНК, так и с компонентами нуклеиновых кислот благодаря прямому взаимодействию гетероциклических колец оснований с индольным кольцом триптофана<sup>(2-4)</sup>.

Облучение у.-ф. светом замороженных водных растворов смесей триптофана с уридином, урацилом или тимином, а также индивидуальных растворов триптофана, уридуна, урацила или тимина в концентрации по  $2 \cdot 10^{-3}$  M каждого проводилось в специальной камере лампой БУВ-15 при температуре —  $30 \pm 1^\circ$  в токе азота при толщине облучаемого слоя 0,5 мм. Интенсивность излучения на поверхность облучаемого образца измерена по уридиновому актинометру<sup>(5)</sup> и составила  $4 \cdot 10^5$  эрг/(мм<sup>2</sup>·час).

Облучения, проведенные с фильтром уксусная кислота — вода (1:1 по объему) для вырезания линии 180 м $\mu$  в спектре лампы БУВ-15, показали, что присутствие этой линии в у.-ф. свете не влияет на фотолиз исследуемых веществ. Поэтому можно считать, что фотолиз образцов происходил под действием монохроматического света с длиной волны 254 м $\mu$ .

Все исследуемые вещества были хромотографически чистыми. Димер урацила был получен по методике<sup>(6)</sup>. Концентрация нингидрина положительных веществ в облученных растворах оценивалась по калибровочной кривой реакции триптофана с нингидрином. Хотя при разделении продуктов фотолиза триптофана (при всех дозах облучения) на тонких слоях силикагеля не было обнаружено других, кроме триптофана, нингидрин положительных веществ, не исключена возможность их образования в количествах, лежащих за пределами детектирования нингидрина положительных пятен на тонкослойной хроматограмме. В облученных растворах компонентов нуклеиновых кислот не были обнаружены фотопродукты, реагирующие с нингидрином.

Концентрации уридуна, урацила и тимина после облучения определялись по оптической плотности их растворов при 260 м $\mu$  с поправкой для смесей на максимальное изменение оптической плотности триптофана, которое при этой длине волны не превышало 10%. На рис. 1 представлены кривые зависимости концентрации уридуна, урацила, тимина и нингидрина положительных веществ от дозы облучения как в индивидуальных, так и в смесевых образцах. Видно, что для компонентов нуклеиновых кислот при некоторой дозе облучения устанавливается стационарная концентрация, которая в присутствии триптофана значительно выше, т. е. наблюдается фотозащита уридуна, урацила и тимина триптофаном.

Возникающая взаимная экранировка для смесевых образцов была грубо учтена путем расчета поправочных коэффициентов экранировки в

начальный момент времени по методу <sup>(7)</sup>. Были вычислены следующие значения поправочных коэффициентов: для экранировки уридина, урацила или тимина триптофаном 0,80, 0,77, 0,75; для экранировки триптофана уридином или урацилом — 0,44 и 0,51 соответственно.

Учет экранировки необходим лишь при начальных дозах облучения, она не существенна при установленном фотохимическом равновесии и не влияет на величину равновесной концентрации.

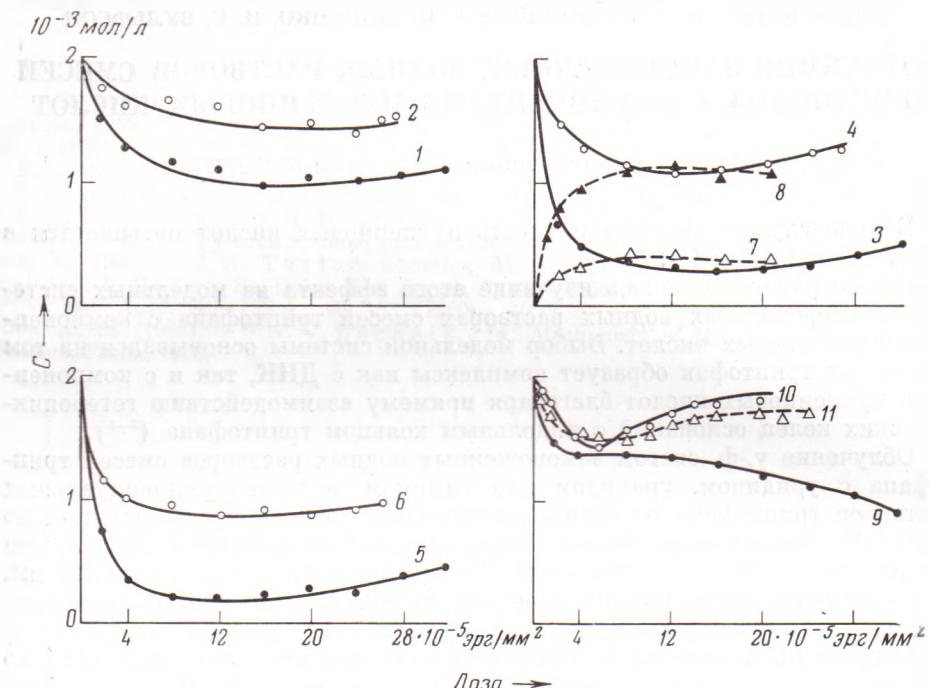


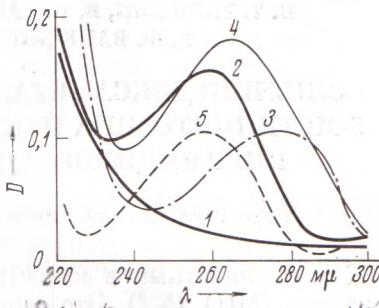
Рис. 1. Кривые зависимости концентрации от дозы облучения: уридина (1 и 2), урацила (3 и 4), тимина (5 и 6) и димера урацила (7 и 8) в отсутствие и в присутствии триптофана соответственно; нингидрин положительных веществ при облучении триптофана (9), триптофана в смеси с уридином (10) или урацилом (11).

При высоких дозах облучения смесей триптофана с уридином или урацилом (рис. 1) наблюдается увеличение концентрации нингидрин положительных веществ, что может быть связано либо с фотовосстановлением триптофана из полимерных продуктов, образующихся при его фотолизе <sup>(8)</sup>, либо с накоплением фотопродуктов, реагирующих с нингидрином. Образование последних при разрыве индолинового кольца триптофана возможно лишь в количествах меньших предела детектирования нингидрином при тонкослойной хроматографии. Можно видеть, что фотохимическое поведение триптофана в присутствии компонентов нуклеиновых кислот существенно меняется, однако для однозначной интерпретации кривых фотолиза триптофана необходимо установление строения его фотопродуктов и применение количественной хроматографии.

Можно предположить, что фотохимическое равновесие для компонентов нуклеиновых кислот в присутствии, так же как в отсутствие <sup>(9)</sup> триптофана, устанавливается благодаря процессам димеризации и мономеризации. Для проверки этого было проведено облучение димера урацила в отсутствие и в присутствии триптофана. Концентрация димера была  $1 \cdot 10^{-3} M$ , триптофана  $2 \cdot 10^{-3} M$ . Спектры поглощения, представленные на рис. 2, и тонкослойная хроматография на силикагеле со свидетелем показывают, что при облучении как димера урацила, так и смеси его с триптофаном образуется урацил, при этом скорость мономеризации димеров в присутствии триптофана увеличивается приблизительно в 3 раза.

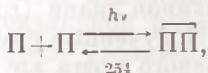
Из кривых образования урацила при облучении димера урацила в отдельности и в смеси с триптофаном (кривая построена без поправки на экранировку), показанных на рис. 1, следует, что через некоторое время в обоих случаях устанавливается фоторавновесная концентрация урацила, которая больше в присутствии триптофана и, кроме того, наблюдается совпадение в стационарном состоянии кинетических кривых для димера урацила с соответствующими кривыми для урацила.

Рис. 2. Спектры поглощения:  
 (1) — димера урацила, (2) — димера урацила после облучения, (3) — смеси димера урацила с триптофаном до облучения и (4) — после облучения, (5) — разностный спектр поглощения (4) — (3) (без учета фотодеградации триптофана)



Полученные результаты свидетельствуют о том, что как при облучении уридуна, урацила или тимина, так и их смесей с триптофаном устанавливается фотохимически равновесное состояние благодаря процессам димеризации и мономеризации, причем в присутствии триптофана равновесие сдвигается в сторону мономеризации.

Для объяснения наблюдаемых закономерностей можно предложить следующую схему протекающих фотопроцессов в стадии равновесия. 1. При облучении у.-ф. светом уридуна, урацила или тимина происходит их фотообратимая димеризация и устанавливается равновесие, характерное для данной длины волны <sup>(9)</sup>:



где P — уридин, урацил или тимин,  $\overline{\text{PP}}$  — соответствующие циклобутановые димеры.

2. В присутствии триптофана равновесие сдвигается в сторону мономеризации. Кроме того известно <sup>(10)</sup>, что между триптофаном и пиримидиновыми димерами наблюдается сильное комплексообразование. Возбуждение триптофана в таком комплексе приводит к фотосенсибилизированной мономеризации димеров. Молекула триптофана при этом возвращается, по-видимому, в основное состояние:



где T — триптофан,  $\text{T}^*$  — триптофан возбужденный.

Перенос энергии от молекул триптофана к пиримидиновым димерам вносит, по-видимому, существенный вклад в наблюдаемый эффект фотозащиты уридуна, урацила и тимина триптофаном, с другой стороны, такой процесс должен привести к уменьшению скорости фотолиза триптофана в присутствии компонентов нуклеиновых кислот.

Научно-исследовательский институт  
органических полупродуктов и красителей  
Москва

Поступило  
1 II 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. D. McLaren, D. Shugar, *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Oxford, 1964, p. 231. <sup>2</sup> S. Friedman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry*, **10**, 3099 (1971).
- <sup>3</sup> J.-L. Dimicoli, C. Hélène, *Biochemistry*, **10**, 300 (1971); *Biochimie*, **53**, 331 (1971). <sup>4</sup> G. Arcaya, M. E. Pantoja et al., *Zs. Naturforsch.*, **26b**, 1026 (1971).
- <sup>5</sup> Д. Шугар, В. Кн. Нуклеиновые кислоты, М., 1962, стр. 34. <sup>6</sup> S. Y. Wang, *Nature*, **190**, 690 (1961). <sup>7</sup> H. J. Mogowitz, *Science*, **111**, 229 (1950). <sup>8</sup> R. S. Asquith, D. E. Rivett, *Biochim. et biophys. acta*, **252**, 111 (1971). <sup>9</sup> R. A. Deering, *Sci. Am.*, **207**, 135 (1962). <sup>10</sup> C. Hélène, M. Charlier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 252 (1971).