

Стэкинг-агрегация и фотодимеризация тиминовых хромофоров в водных растворах poly-T

© В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт

Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: vlmalkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.02.2022 г.
В окончательной редакции 12.02.2022 г.
Принята к публикации 25.02.2022 г.

Методами люминесцентной и абсорбционной спектроскопии установлена гетерогенность водных растворов политимидиловой кислоты (poly-T) при комнатной температуре. Выявлены две фракции тиминовых хромофоров: 1) фотоактивная фракция, состоящая из двух типов стэкинг-агрегатов с оптимальной для фотодимеризации структурой, первому типу соответствуют полосы поглощения — 250 и 280 nm (экситонное расщепление 4300 cm^{-1}), второму — 260 и 290 nm (экситонное расщепление 4000 cm^{-1}); 2) фотохимически интактная с максимумом спектра поглощения у 270 nm и без признаков экситонного расщепления, состоящая, вероятно, из относительно изолированных хромофоров.

Ключевые слова: политимидиловая кислота, спектры поглощения, люминесценция, фотодимеризация, фотоаддукт, фототример, фототетрамер.

DOI: 10.21883/OS.2022.05.52431.18-22

Введение

Интерес к фотофизическим и фотохимическим процессам в водных растворах политимидиловой кислоты (poly-T) вызван двумя причинами. Во-первых, такие процессы в компонентах нуклеиновых кислот *in vivo* являются причиной фотомутагенеза и фотоканцерогенеза [1]. Во-вторых, мы полагали, что есть потенциальная возможность использования тиминовых компонентов нуклеиновых кислот для обратимой фотохимической записи информации [2,3].

При циклобутановой фотодимеризации тимина (и его производных) пропадает первая полоса поглощения тимина (с максимумом около 265 nm) и появляется полоса фотодимера, сдвинутая относительно полосы тимина в коротковолновую сторону (рис. 1, кривые 1 и 2) [4,5]. Реакция идет при облучении системы УФ светом в полосе поглощения тиминных хромофоров, тянущейся в длинноволновую сторону примерно до 300 nm, квантовый выход реакции при комнатной температуре обычно не превышает 1% [4,6]. При поглощении кванта света циклобутановый димер распадается, а мономер тимина восстанавливается, квантовый выход фотолиза 1.0 [4,6], причем циклобутановый фотодимер не поглощает свет с длиной волны больше 280 nm. Таким образом, циклобутановая фотодимеризация вызывает принципиально обратимые изменения спектров поглощения систем, содержащих тиминные хромофоры, при облучении УФ светом разных длин волн. Такие изменения спектра поглощения теоретически возможно использовать для записи информации. Идея такой записи была независимо выдвинута в работах [2,3].

В.Л. Рапопорт [2] предложил использовать для фотохимической записи информации реакцию циклобутановой фотодимеризации плотноупакованных стопочных димеров тимина, подобных образующимся в стеклующейся смеси EG:H₂O (77 K) при фотолизе фиксированных в этой смеси циклобутановых фотодимеров диметилтимина (DMT) плотноупакованным стопочным димерам DMT [7]. Для таких димеров характерна плотная упаковка с межплоскостным расстоянием 2.9 Å (в отличие от обычного для ДНК 3.4 Å), проявляющаяся в сильном экситонном расщеплении спектров поглощения (около 3400 cm^{-1}) (рис. 1, кривая 3) [7,8]. Плотная упаковка в описываемых димерах возможна благодаря взаимному параллельному смещению и повороту составляющих их оснований [9]. В плотноупакованных стопочных димерах DMT в EG:H₂O, 77 K, квантовый выход циклобутановой димеризации оказался равен 100%. Отметим, что плотноупакованные димеры DMT диссоциируют в неполярном EG:H₂O при нагреве до T_{room} [7] (рис. 1, кривая 4). Мы стремились получить сходную систему с плотно упакованными стопочными димерами тимина, стабильную при комнатной температуре.

В работе [3] была сделана попытка осуществить обратимую запись информации, используя в качестве носителя информации полученные из додецилтимина пленки Ленгмюра–Блоджетт на воде при T_{room} . Авторы [3] полагали, что присоединенные к тиминным хромофорам алифатические хвосты позволят увеличить квантовый выход циклобутановой фотодимеризации и сократить побочные по отношению к ней фотохимические реакции за счет правильной взаимной ориентации тиминных хромофоров друг относительно друга.

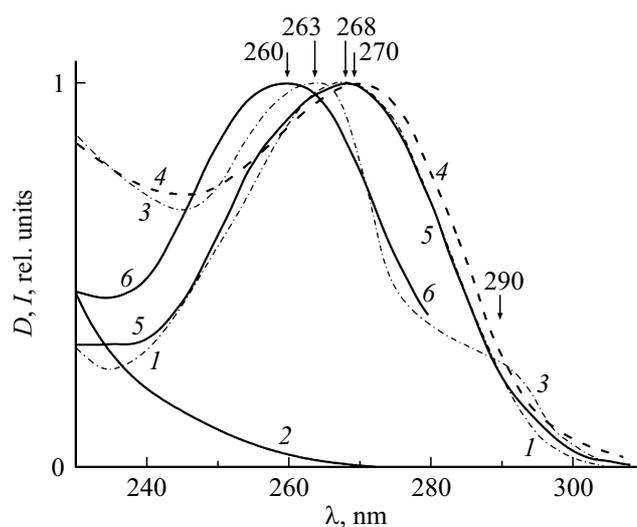


Рис. 1. Нормированные по максимуму спектры поглощения: (1) водных растворов TMP при T_{room} [5], (2) циклобутанового димера тимина при T_{room} [4], (3) *cis-syn* стэкинг-агрегатов DMT в EG:H₂O при 77 K [7], (4) DMT в EG:H₂O при T_{room} [7], (5) водных растворов poly-T при T_{room} (pH 7.0) [13]. Спектр действия циклобутановой фотодимеризации в водных растворах poly-T (pH 7.0) при T_{room} [13] (6).

Действительно, наблюдался более высокий, чем обычно, квантовый выход циклобутановой фотодимеризации при комнатной температуре — 4% [3], вместо 1% для водных растворов тимина [4,6]. Авторы сделали вывод о принципиальной возможности применения исследуемой системы для записи информации, но полной обратимости реакции они не наблюдали. Обратимость реакции циклобутановой фотодимеризации тимина практически во всех исследованных системах ограничена побочными фотохимическими реакциями образования фотоаддуктов и их производных [6,10–12].

Для практического осуществления основанной на циклобутановой фотодимеризации записи информации необходимо исключить побочные фотохимические реакции (образование фотоаддуктов и их производных) и достичь максимального квантового выхода циклобутановой фотодимеризации. В работе [13] отмечалось отсутствие побочных фотохимических реакций и обратимость циклобутановой фотодимеризации в водных растворах poly-T при T_{room} — именно это привлекло наше внимание. Приведенные в [13] спектры действия циклобутановой димеризации в водных растворах политимидиловой кислоты при комнатной температуре (рис. 1, кривая 6) и спектры поглощения тех же растворов (рис. 1, кривая 5) отличаются по положению максимумов, что говорит о гетерогенности исследуемой системы. Спектр поглощения poly-T (рис. 1, кривая 5) [13] близок по максимуму (268 nm) со спектром тимидинмонофосфата (TMP) (рис. 1, кривая 1) [5], однако спектр поглощения poly-T слегка отличается от спектра поглощения TMP — наблюдается небольшое плечо у 255 nm, а также

небольшое уширение у 290–305 nm. Спектр действия циклобутановой фотодимеризации в poly-T (максимум у 260 nm, рис. 1, кривая 6) [13] смещен по максимуму в коротковолновую сторону относительно спектра поглощения poly-T (максимум у 270 nm, рис. 1, кривая 5) [13]. Если сравнить смещение спектра действия со спектром поглощения *cis-syn* стэкинг-агрегатов (DMT) (максимум на 263 nm, рис. 1, кривая 3) в смеси этиленгликоля с водой EG:H₂O [7], можно отметить, что наблюдаемое для спектра действия коротковолновое смещение максимума сильнее, что в соответствии с [8] наводит на мысль о возможном участии в циклобутановой фотодимеризации больших, чем димеры, агрегатов. К сожалению, спектр действия был приведен в [13] лишь от 230 до 280 nm, и неизвестно, было ли в нем характерное для агрегатов DMT длинноволновое плечо у 290 nm.

Сравнение спектра действия со спектрами поглощения poly-T и стэкинг-агрегатов DMT позволяет предположить, что в водных растворах poly-T, вероятно, есть относительно фотохимически активная фракция тиминовых хромофоров, объединенных в стэкинг-агрегаты с оптимальной для циклобутановой фотодимеризации структурой, подобной структуре *cis-syn* стэкинг-агрегатов DMT в EG:H₂O, 77 K.

Близость спектра поглощения водных растворов poly-T спектру поглощения TMP в воде позволяла предположить, что большая часть тиминовых хромофоров в водных растворах poly-T относительно изолированы друг от друга, подобно тиминовым хромофорам в водных растворах TMP. Данных о люминесценции водных растворов poly-T при комнатной температуре крайне мало. Нам удалось обнаружить лишь упоминание о присутствии в их спектрах люминесценции полос с максимумами у 340 и 410 nm [14]. Мы полагаем, что первому из этих максимумов можно сопоставить смещенный в длинноволновую сторону (относительно спектра мономеров) спектр тиминовых хромофоров poly-T, второй может быть отнесен к люминесценции фотоаддуктов, стремительно накапливающихся в образце под действием облучения в процессе измерения [10]. Самых спектров люминесценции и ее возбуждения водных растворов политимидиловой кислоты, кроме нас [15], никто не приводил.

Целью нашей работы был поиск спектральных проявлений присутствия в водных растворах poly-T тиминовых хромофоров, объединенных в стэкинг-агрегаты с оптимальной для циклобутановой фотодимеризации структурой, подобной описанной в [7] *cis-syn* стэкинг-агрегатам DMT в EG:H₂O, 77 K, с характерным экситонным расщеплением спектров поглощения. Поиск спектральных проявлений этих стэкинг-агрегатов велся как в разностных спектрах поглощения, полученных в процессе облучения растворов, так и в спектрах люминесценции и ее возбуждения.

Материалы и методы

Нами использовался коммерческий препарат poly-T („Interactiva“, Германия). Химическая гомогенность poly-T гарантировалась производителем: препарат очищался методом жидкостной хроматографии под давлением (HPLC).

В качестве растворителя использовалась вода (бидистиллят), причем интенсивность рамановского рассеяния в ней превосходила люминесценцию примесей более чем в 20 раз. При такой чистоте воды вклад фона (люминесценции растворителя с фосфатным буфером — $\text{Na}_2\text{HPO}_4:\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0, $C_{\text{буфера}} = 5 \cdot 10^{-4} 010^{-3}$ М, производство „Sigma“) при $\lambda_{\text{в}} = 260$ nm был не более 1/15 от интенсивности пика рамановского рассеяния, и составлял менее 1/5 от интенсивности люминесценции образца при концентрации тимина (Thy) $5 \cdot 10^{-5} - 10^{-4}$ М. При обработке спектров люминесценции и ее возбуждения фон вычитался из общей интенсивности люминесценции образца.

Все спектры зарегистрированы на спектрофлуориметре „Hitachi-850“ (Япония). Источником ультрафиолета в нем служит ксеноновая лампа. Прибор имеет двойной монохроматор возбуждения и светосильный одинарный монохроматор регистрации. При спектральной ширине щелей монохроматора 5 nm доля рассеянного света не превышает 10^{-5} от интенсивности света выделенной полосы. Спектры корректировались по методу квантового счетчика с родамином-Б [16].

Запись спектров люминесценции и ее возбуждения велась с накоплением из-за низких квантовых выходов люминесценции полинуклеотидов при комнатной температуре (порядка 10^{-5}) [14]. Относительная погрешность полученных спектров люминесценции и ее возбуждения составляла не более 0.015.

Специальная приставка позволяла измерять спектры поглощения образца по однолучевой схеме на той же установке, спектры поглощения получены с относительной погрешностью 1%. Для облучения образцов применяли источник, собранный из ртутной лампы среднего давления (ПРК-2), кварцевой линзы, водяного фильтра и комбинации стеклянных фильтров. Для стабилизации дуги подаваемое на лампу напряжение было понижено относительно номинального. Водяной фильтр отсекал коротковолновую (короче 200 nm) составляющую спектра источника и предотвращал нагрев кюветы с образцом. Испарение предупреждалось герметизацией кюветы закрепленной на ней (поверх крышки) тефлоновой пленкой.

Накопление циклобутановых димеров в растворе происходило под действием света источника, прошедшего через комбинацию фильтров „А“: УФС, прозрачный для света от 230 до 390 nm, и „обрезной“, прозрачный для света с длиной волн более 290 nm, от „Hitachi-850“. При этом основное действие облучения на тиминовые

хромофоры вызывалось линиями спектра лампы с максимумами 297, 302/303 nm, попадающими в длинноволновой „хвост“ спектра поглощения poly-T. Основной действующей линией была 297 nm с интенсивностью $\sim 5 \cdot 10^{-9}$ эйнштейн на квадратный сантиметр в секунду ($\text{E}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$). Эта комбинация фильтров также пропускала линии источника с длинами волн 312/313, 334 и 365/366 nm, не поглощавшиеся тиминовыми хромофорами и циклобутановым фотодимером тимина, но попадающими в полосу поглощения фотоаддуктов тимина [6,17].

Распад циклобутановых димеров происходил под действием света источника, пропущенного через комбинацию фильтров „Б“: водяной фильтр, заполненный водным раствором триптофана, и фильтр УФС. Распад циклобутановых фотодимеров вызывался проходящими через эти фильтры линиями с $\lambda = 253.7$ и 257.6 nm. Влиянием пропускаемых комбинацией „Б“ линий 302.2/302.7 nm можно пренебречь — они не попадают в полосу поглощения фотодимеров.

Результаты и обсуждение

Люминесцентные проявления гетерогенности водных растворов poly-T

Нами были получены спектры поглощения (рис. 2, кривая 1), люминесценции (рис. 2, кривые 2–4) и ее возбуждения (рис. 2, кривые 6, 7) водных растворов poly-T при комнатной температуре. Форма и положение максимума спектров люминесценции зависят от длины волны

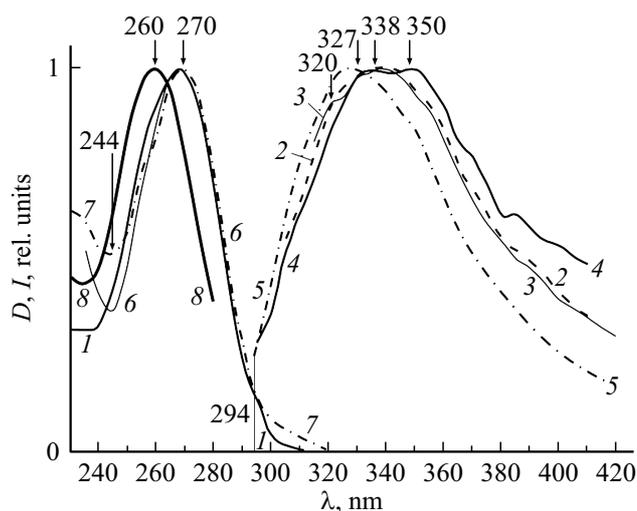


Рис. 2. Нормированные по максимуму спектры poly-T в водных растворах: поглощения (1); люминесценции при $\lambda_{\text{в}} = 260$ (2), 270 (3), 250 nm (4); возбуждения люминесценции при $\lambda_{\text{р}} = 330$ (6), 355 nm (7). Нормированные по максимуму спектры люминесценции водного раствора тимина (pH 7.0), $\lambda_{\text{в}} = 260$ nm (5) [18] и действия циклобутановой фотодимеризации в водных растворах poly-T (pH 7.0) (нормированный по максимуму спектр) [13] (8).

возбуждающего света (рис. 2, кривые 2–4). Спектры возбуждения (рис. 2, кривые 6, 7) отличаются от спектра поглощения (рис. 2, кривая 1) и зависят от длины волны регистрации. Все это явно указывает на гетерогенность исследованных нами растворов. Рассмотрим подробнее полученные нами спектры.

Спектры люминесценции poly-T (рис. 2, кривые 2–4) слегка уширены и смещены в длинноволновую сторону по максимуму относительно спектра люминесценции тимина (рис. 2, кривая 5) (максимум на 327 nm [18]). Форма спектров люминесценции и положение их максимума заметно зависит от длин волн возбуждения, что для водных растворов тимина не характерно [18]. Максимум спектра люминесценции poly-T при возбуждении на 260 nm находится у 338 nm (рис. 2, кривая 2), при возбуждении на 270 nm положение максимума остается прежним (338 nm), но появляется плечо 320 nm (рис. 2, кривая 3), смещение возбуждения к 250 nm вызывает появление спектра с двумя максимумами — у 330 и 350 nm (рис. 2, кривая 4).

Нормированные спектры возбуждения люминесценции poly-T в воде слегка сдвинуты по максимуму (270 nm) в длинноволновую сторону относительно спектра поглощения тех же растворов (максимум у 268 nm) и идут несколько выше нормированного спектра поглощения в районе 275–295 nm, а в области от 295 до 320 nm существенно превышают его.

Исследованные спектры возбуждения зависят от длины волны регистрации (рис. 2, кривые 6 и 7). Сравнивая спектры возбуждения, полученные при длинах волн регистрации 355 (рис. 2, кривая 7) и 330 nm (рис. 2, кривая 6), можно отметить вклад в спектр возбуждения с регистрацией на 355 nm полосы с максимумом у 255 nm, не проявляющейся в спектре с более коротковолновой (330 nm) регистрацией, а также — уширение этого спектра в области 280–300 nm.

Длинноволновое смещение спектров люминесценции водных растворов poly-T относительно спектров люминесценции тимина, их зависимость от длины волны возбуждения, а также присутствие в спектрах возбуждения плеч и уширений, наиболее явно проявляющихся при более длинноволновой регистрации, указывает на то, что в исследуемой системе есть как относительно слабо взаимодействующие тиминовые хромофору с максимумами люминесценции 338 nm и возбуждения 270 nm, так и люминесцирующие агрегаты с максимумом люминесценции 350 nm и возбуждения 255 и 280–300 nm. Вероятно, эти агрегаты могут быть отнесены к выявленной по полученным в процессе облучения разностным спектрам поглощения фотохимически активной фракции тиминовых хромофоров, чьи спектры поглощения имеют подобное расщепление (см. ниже). Видимо, именно присутствие стэкинг-агрегатов тимина в водных растворах poly-T вызывает как отличия спектров поглощения poly-T и ТМР в водных растворах (рис. 1, кривые 1 и 3), так и обнаруженные нами люминесцентные проявления гетерогенности этих растворов (рис. 2).

Изменение спектров поглощения водных растворов poly-T под действием УФ облучения

Исследованы изменения спектров поглощения водных растворов poly-T под действием облучения через комбинацию фильтров „А“. Циклобутановая фотодимеризация вызывалась пропущенными через фильтры линиями рутного спектра 297 и 302/303 nm. Прошедший через выбранную комбинацию фильтров („А“) свет не поглощается циклобутановыми фотодимерами и поэтому не вызывает их фотолиза. Таким образом, облучение через комбинацию фильтров „А“ вело к накоплению в системе циклобутановых фотодимеров. Однако нельзя исключать возможности побочных по отношению к фотодимеризации реакций, например, реакции образования фотоаддуктов и их производных.

Обнаружено, что под действием УФ облучения помимо падения оптической плотности происходит изменение формы спектра поглощения водных растворов poly-T (рис. 3). Мы предположили, что изменение формы спектра поглощения может быть связано с тем, что не все тиминовые хромофору в poly-T с одинаковой вероятностью вступают в реакцию циклобутановой фотодимеризации. Часть этих хромофоров должна принадлежать к относительно более фотоактивной фракции, а часть — к менее фотоактивной, фотоинтактной, фракции, причем спектры поглощения фотоактивной и фотоинтактной фракций должны различаться.

Скорость циклобутановой фотодимеризации в растворе poly-T сильно падает в процессе эксперимента (рис. 3), что указывает на уменьшение доли фотоактивной фракции тиминовых хромофоров при УФ облучении. Такое уменьшение может быть связано с переходом хромофоров, составляющих фотоактивную фракцию, в фотодимеры. Возможно и неблагоприятное для циклобутановой фотодимеризации изменение пространственной

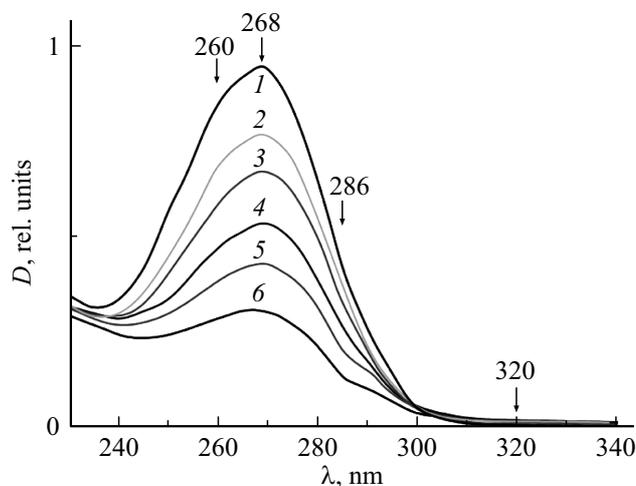


Рис. 3. Изменение спектра поглощения poly-T (рН 7.0) под действием УФ облучения (297 nm, $\sim 5 \cdot 10^{-9}$ E/(cm² · s)). Спектры до (1) и после облучения в течение 8 (2), 15 (3), 30 (4), 48 (5), 176 min (6).

структуры poly-T в результате образования под действием УФ облучения циклобутановых фотодимеров и других фотопродуктов.

Для определения форм спектров поглощения фотоактивной и фотоинтактной фракций были исследованы разностные спектры поглощения — разности между спектрами поглощения водного раствора poly-T до УФ облучения и спектрами, полученными через некоторое время после начала облучения. Полученные нами разностные спектры (рис. 4) заметно отличались по форме от спектров поглощения (рис. 3), что подтвердило присутствие как минимум двух фракций тиминовых хромофоров, фотоактивной и фотоинтактной, с разными спектрами поглощения. Полученные нами разностные спектры имели максимум у 268 nm и плечи на 250, 260, 280 и 290 nm.

Также были получены поэтапные разностные спектры поглощения (рис. 5) — разности между спектрами поглощения в начале и в конце отдельных выделенных периодов облучения. Эти спектры позволили еще более четко, чем разностные спектры поглощения, оценить, какие фракции тиминовых хромофоров и на каких этапах наиболее активно вступают в реакцию циклобутановой димеризации. На начальных этапах облучения велик вклад в циклобутановую фотодимеризацию фракций с полосами поглощения 250, 260, 280 и 290–295 nm. По истощении фотоактивной фракции в поэтапных разностных спектрах начинает явно преобладать фракция с полосой поглощения у 270 nm, что близко к полосе поглощения ТМР (268 nm). При этом скорость перехода тиминовых хромофоров в димер уменьшается на завершающем этапе примерно в 20 раз по сравнению с начальным.

Мы предположили, что фотоактивная фракция с полосами поглощения 250, 260, 280 и 290 nm соответствует

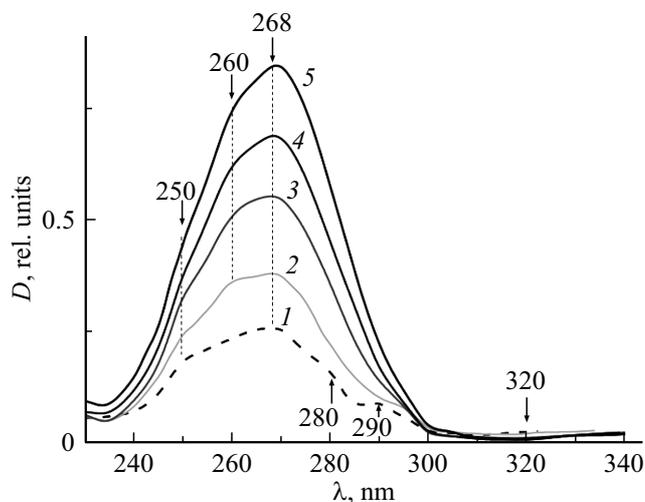


Рис. 4. Разности между спектрами поглощения водного раствора poly-T (pH 7.0), полученными до и после УФ облучения (297 nm, $\sim 5 \cdot 10^{-9}$ E/(cm² · s), в течении 8 (1), 15 (2), 30 (3), 48 (4), 176 min (5).

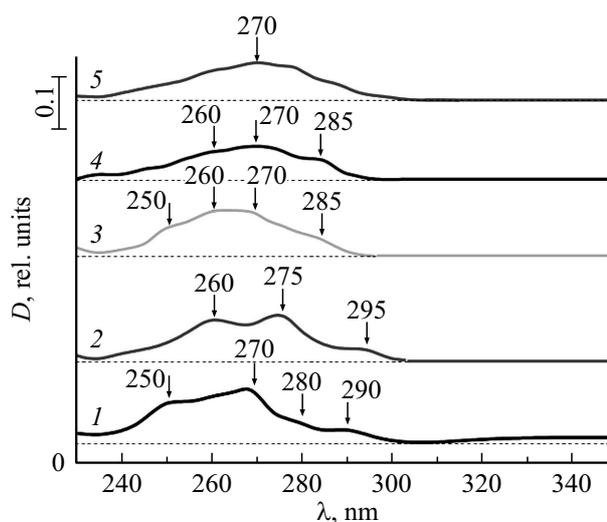


Рис. 5. Поэтапные разности между спектрами поглощения ($D(\lambda) - D'(\lambda)$) между спектрами поглощения водного раствора poly-T, измеренными в моменты t и t' соответственно (начало отсчета времени — момент начала облучения). Кривым (1–5) соответствуют следующие значения t и t' : (1) $t_1 = 0$, $t'_1 = 6$ min, $\Delta t_1 = (t_1 - t'_1) = 6$ min; (2) $t_2 = 6$, $t'_2 = 15$ min, $\Delta t_2 = (t_2 - t'_2) = 9$ min; (3) $t_3 = 15$, $t'_3 = 30$ min, $\Delta t_3 = (t_3 - t'_3) = 15$ min; (4) $t_4 = 30$, $t'_4 = 48$ min, $\Delta t_4 = (t_4 - t'_4) = 18$ min; (5) $t_5 = 48$, $t'_5 = 176$ min, $\Delta t_5 = (t_5 - t'_5) = 128$ min. Каждая из кривых приведена со сдвигом относительно предыдущей 0.15 (2, 4, 5), на 0.20 (3). Погрешность определения оптической плотности не более 0.01.

стопочным агрегатам тиминовых хромофоров с оптимальной для циклобутановой фотодимеризации структурой. Фотоинтактной фракции с полосой поглощения 270 nm, видимо, соответствуют тиминовые хромофору, для которых образование циклобутанового фотодимера затруднено по пространственным соображениям.

Полагаем, что фотоактивная фракция тиминовых хромофоров включает в себя два типа стэкинг-агрегатов с экситонным расщеплением спектров поглощения, которым соответствуют пары полос поглощения — 250 и 280 nm с экситонным расщеплением ~ 4300 cm⁻¹ и 260 и 290 nm с экситонным расщеплением ~ 4000 cm⁻¹ [11,15]. Большая величина экситонного расщепления явно указывает на плотную упаковку наиболее фотохимически активных тиминовых хромофоров и на то, что в эти фотохимически активные стопочные агрегаты должны входить более чем два хромофора. Судя по нашим данным по поэтапным разностным спектрам поглощения, можно полагать, что доля входящих в такие стэкинг-агрегаты тиминовых хромофоров в водных растворах poly-T велика — не менее 20%.

Интересно, что ранее близкие по смыслу результаты были получены нами при исследовании изменения спектров поглощения твердых слоев тимина на кварце под действием ультрафиолетового облучения. Для этой системы тоже было выявлено присутствие более фото-

химически активной фракции с полосами 250 и 280 nm, что соответствует экситонному расщеплению спектров около 4000 cm^{-1} [12]. Мы связали это экситонное расщепление с малым межплоскостным расстоянием между тиминовыми хромофорами в кристаллогидрате тимина [19].

В работах [11,15] нами был сделан вывод о том, что в циклобутановой фотодимеризации тиминовых хромофоров poly-T участвуют в первую очередь тиминовые хромофоры, входящие в состав стэкинг-агрегатов с плотной упаковкой и оптимальной для циклобутановой димеризации взаимной ориентацией. Наши выводы противоречили принятым на тот момент представлениям о пространственной структуре poly-T в водном растворе, основанным на косвенных данных (рентгеноструктурного анализа кристаллов dTdT [20]), согласно которым она похожа на ершик для мытья бутылок с торчащими в во все стороны тиминовыми хромофорами, изолированными друг от друга.

Впоследствии [21] наши выводы были независимо подтверждены результатами компьютерного моделирования, показавшими, что тиминовые хромофоры в цепи poly-T не только образуют стэкинг-агрегаты с оптимальной для циклобутановой фотодимеризации структурой, но и сама эта цепь, даже при длине всего в 18 нуклеотидов, вполне может сворачиваться в „игольные ушки“ и участки с двойной спиралью [21] за счет хугстеновского спаривания тиминовых хромофоров [20].

Исследование обратимости фотодимеризации в poly-T

Мы исследовали возможность многократного последовательного повторения циклов образования и расщепления циклобутановых фотодимеров в водных растворах poly-T под действием УФ облучения. Накопление циклобутановых димеров в растворе происходило под действием света источника, прошедшего через комбинацию фильтров „А“. Накопление циклобутановых фотодимеров в полимере вызывалось линиями спектра лампы с максимумами 297, 302/303 nm, попадающими в „хвост“ спектра поглощения poly-T. Важно, что эта комбинация фильтров также пропускала сильные линии спектра на 312/313 nm и 334 nm, поглощаемые (6–4) фотоаддуктом — нециклобутановым димером тимина с одинарной связью между 6 и 4 атомами углерода пиримидиновых колец, см. [6]. (6–4) фотоаддукт не распадается под действием света (в отличие от циклобутанового димера), может вступать в реакции с образованием фототримеров и фототетрамеров [17].

Фотолит циклобутановых димеров проводился при освещении тем же источником с комбинацией фильтров „Б“, за счет пропускаемых ими полос спектра 253.7 и 257.6 nm. Действие линий 302.2/302.7 nm, попадающих в „хвост“ спектра поглощения poly-T, может вести к образованию новых циклобутановых димеров, но этим процессом можно пренебречь, так как в исследованной

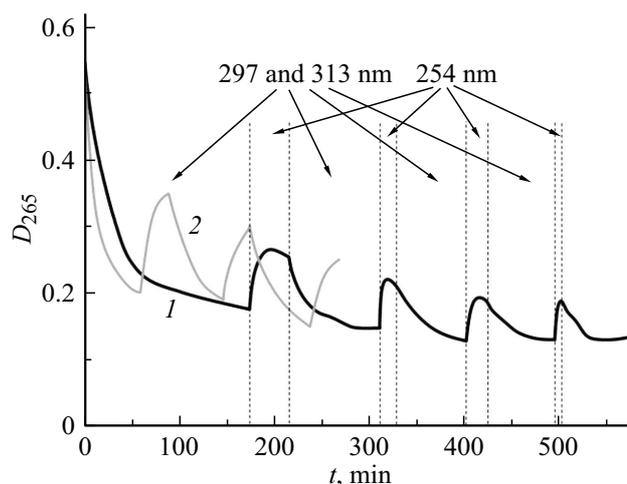


Рис. 6. (1) Динамика изменения поглощения водного раствора poly-T (pH 7.0) на 270 nm под действием облучения: падение поглощения происходило в основном под действием света с $\lambda = 297$ и 302 nm, а восстановление — при облучении светом с $\lambda = 248$ и 254 nm. (2) Для сравнения приведены аналогичные данные по циклическим изменениям оптической плотности пленок Ленгмюра–Блоджетт под действием УФ облучения из [3].

системе квантовый выход распада димеров — 1.0, а образования — лишь 0.04 [10,13,18].

Динамика изменения оптической плотности (измеренной на 270 nm) исследованных нами растворов под действием УФ облучения показана на рис. 6 (кривая 1). Для сравнения приведены аналогичные по смыслу кривые из [3] — результаты сопоставимы (рис. 6, кривая 2). Рост поглощения исследованных растворов за счет фотолитиза циклобутановых димеров не монотонный — достигнув локального максимума, при дальнейшем облучении (в том же диапазоне длин волн) оптическая плотность начинала уменьшаться, хотя и медленнее, чем при прямой реакции (рис. 6, кривая 1). Мы связали это с накоплением (6–4) фотоаддуктов, не расщепляющихся под действием УФ облучения, и их производных. Хотя при облучении с комбинацией фильтров „А“ люминесценции (6–4) фотоаддукта не наблюдалось, у облученных с комбинацией фильтров „Б“ образцов появлялись соответствующие фотоаддукту тимина полосы в спектрах поглощения с максимумом 310 nm [6], полоса люминесценции с максимумом 390 nm [6] и полоса возбуждения люминесценции с максимумом 310–325 nm [6]. Отсутствие спектров поглощения и люминесценции (6–4) фотоаддукта у образцов, облученных с комбинацией фильтров „А“, можно объяснить тем, что при возбуждении фотоаддукта светом в области 300–350 nm идет его реакция с тиминовыми хромофорами, ведущая к образованию нелюминесцирующих фототримеров и фототетрамеров [17]. Фототримеры и фототетрамеры имеют в своей структуре циклобутановые кольца, связывающие тиминовые хромофоры, и при возбуждении они не лю-

минесцируют, а распадаются [17]. Поэтому облучая образцы светом, прошедшим через комбинацию фильтров „Б“, мы наблюдали появление полос люминесценции.

Вероятно, именно благодаря накоплению (6–4) фотоаддукта и его производных обратимость циклобутановой фотодимеризации оказалась неполной, что ясно видно на кривой 1 рис. 6.

Выводы

В водных растворах политимидиловой кислоты при комнатной температуре выявлены две фракции тимино-вых хромофоров.

1) Фотоактивная фракция, состоящая из двух типов стэкинг-агрегатов с оптимальной для фотодимеризации структурой — первому типу соответствуют полосы поглощения 250 и 280 nm (экситонное расщепление 4300 cm^{-1}), второму — 260 и 290 nm (экситонное расщепление 4000 cm^{-1}); им можно сопоставить полосу люминесценции с максимумом у 350 nm, которой соответствует расщепленный спектр возбуждения.

2) Фракция, относительно фотохимически интактная, со спектром поглощения с максимумом 270 nm и без признаков экситонного расщепления; имеет спектр люминесценции с максимумом 338 nm, которому соответствует спектр возбуждения с максимумом 270 nm.

Обратимость циклобутановой фотодимеризации в исследованной системе ограничивается побочными фотохимическими реакциями — накоплением фотоаддуктов и их производных.

Благодарности

Авторы выражают признательность В.В. Горючко за помощь в оформлении графических материалов к статье.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- [1] К. Смит, Ф. Хэнеуолт. Молекулярная фотобиология (Мир, Москва 1971). [Hendric C. Smith, Philip C. Hanawalt. *Molecular photobiology*. Academic Press, New York, London, 1969].
- [2] В.Л. Рапопорт. В: *Тезисы докладов Всесоюзной школы-семинара по биомолекулярному компьютерингу*. 27–31 Мая (Москва, 1991), с. 40.
- [3] Ei Yano, S. Tatsuura. *Thin Solid Films*, **196** (1), 147 (1991).
- [4] G.J. Fisher, H.E. Johns. In: *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. V. I (Academic Press, New York, 1976), p. 225–294.
- [5] А.В. Бородавкин, Э.И. Будовский, Ю.В. Морозов, Ф.А. Савин, Н.А. Симукова. *Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот*. Серия Молекулярная биология: вып. 14 (ВИНИТИ, Москва, 1977), с. 228.
- [6] S.Y. Wang. In: *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. V. I (Academic Press, New York, 1976), p. 296–356.
- [7] J. Eisinger, A.A. Lamola. *Molecular Photochemistry*, **1**, 209 (1969).
- [8] M. Kasha, H.R. Rawls, M. Ashraf El-Bayomi. *Pure and Applied Chemistry*, **1** (3–4), 371 (1965).
- [9] В.Л. Рапопорт, В.М. Малкин, С.В. Зорина, С.М. Комаров, В.В. Горючко. ДАН, **406** (3), 402 (2006). [V.L. Rapoport, V.M. Malkin, S.V. Zorina, S.M. Komarov, V.V. Goryuchko. *Doklady biochemistry and biophysics*, **406** (1), 23 (2006)].
- [10] В.Л. Рапопорт, В.М. Малкин. *Биофизика*, **58** (5), 734 (2008). [V.L. Rapoport, V.M. Malkin. *Biophysics*, **53** (5), 336 (2008)].
- [11] В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт. *Химическая физика*, **22** (4), 3 (2003).
- [12] В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт. *Вестник СПбУ Сер. 4 (физика, химия)*, **3** (18), 108 (1999).
- [13] R.A. Deering, R.B. Setlow. *Biochimica Biophysica Acta*, **68**, 526 (1963).
- [14] P. Vigny, J.P. Ballini. In: *Excited States in Organic Chemistry and Biochemistry* (Dordrecht, 1977), p. 1–13.
- [15] В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт. *Биофизика*, **50** (6), 1013 (2005). [V.M. Malkin, V.L. Rapoport. *Biophysics*, **50**, 6 (2005) p. 874–878].
- [16] С. Паркер. *Фотолуминесценция растворов* (Мир, Москва, 1972) [C.A. Parker. *Photoluminescence of Solutions*. (Elsevier Publishing Co., Amsterdam–London–New York, 1968)].
- [17] Н.К. Кочетков, Э.И. Будовский, Е.Д.Свердлов, Н.А. Симукова, М.Ф. Турчинский, В.Н. Шибанов. *Органическая химия нуклеиновых кислот* (Химия, Москва, 1970).
- [18] В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт. *Биофизика*, **44** (6), 1027 (1999). [V.M. Malkin, V.L. Rapoport. *Biophysics*, **44** (6), 992 (1999)].
- [19] R. Gerdill. *Acta Crystallographica*, **14** (4), 333 (1961).
- [20] В. Зенгер. *Принципы структурной организации нуклеиновых кислот* (Мир, Москва, 1987). [W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure* (Springer, New York, 1984)].
- [21] A. Johnson, O. Wiest. *J. Physical Chemistry: B*, **111** (51), 14398 (2007).