



УДК 547.854.4 : 535.212

© 1991 г.

Д. Ю. Яковлев, А. Р. Хомутов, Р. М. Хомутов*
**НОВЫЙ МЕТОД СЕЛЕКТИВНОГО ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ
 УРАЦИЛА И ТИМИНА**

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;
 Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

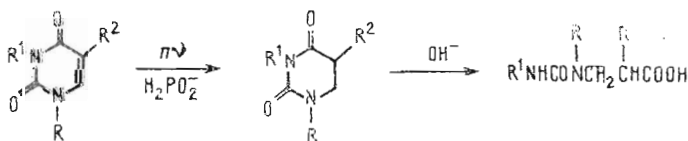
Действие ультрафиолетового излучения на основания нуклеиновых кислот приводит к их переходу в возбужденные синглетные и триплетные состояния, реакции которых отличны от превращений в основных состояниях. Наиболее характерными УФ-индуцированными (λ 240—290 нм) превращениями пиримидинов в водных растворах являются их гидратация и димеризация, а также фотоприсоединение нуклеофилов по С5—С6-двойной связи [1]. Применение фотохимических методов исследования нуклеиновых кислот и нуклеопротеидных комплексов позволяет получить дополнительную информацию об их структуре и функциях [2], а также расширить области применения известных реакций модификации нуклеиновых кислот [3].

Нами обнаружено, что в мягких условиях урацил и тимин подвергаются фотохимическому восстановлению солями фосфорноватистой кислоты, причем в отличие от известных реакций фотохимического восстановления (NaBH_4 [4] и HCOOH [5]) цитозин и пурины практически не затрагиваются.

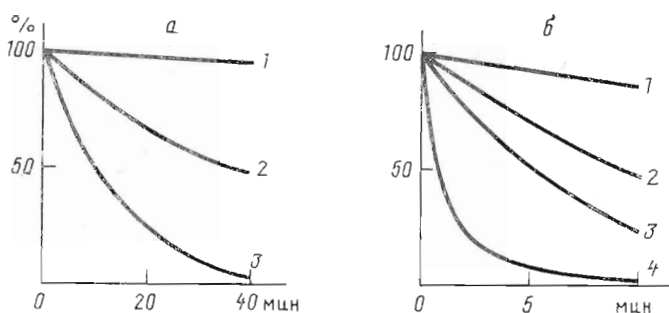
УФ-облучение (λ 254 нм) водных растворов (10^{-3} М) урацила и тимина в присутствии гипофосфита аммония вызывает быстрое падение оптического поглощения, характерное для насыщения ароматической системы (рисунок). Подобная картина наблюдалась нами ранее для темновой реакции восстановления 2,4-диоксипиримидинов, время полупревращения которых, однако, составляло десятки часов [6]. При УФ-облучении урацила в отсутствие гипофосфита образуется его фотогидрат — 6-гидрокси-5,6-дигидроурацил, димеризация тимина в этих условиях слабо выражена. Как для урацила, так и для тимина падение оптического поглощения в растворах гипофосфита происходит значительно быстрее, чем в воде (рисунок).

Для 6-гидрокси-5,6-дигидроурацила в щелочной среде характерно элиминирование воды с восстановлением ароматической системы. Подщелачивание УФ-облученной реакционной смеси урацила и гипофосфита аммония приводит к появлению и быстрому исчезновению максимума поглощения при 230 нм без регенерации ароматической системы, что характерно для дигидропиримидинов и указывает на расщепление N3—C4-связи [7]. Таким образом, появляется возможность разделения вклада двух фотореакций в наблюдаемое превращение урацила и его производных и расчета квантового выхода основной реакции по методу [8].

Анализ продуктов с помощью ПМР и сравнение их свойств с заведомыми образцами, проведенный аналогично [6], показывает, что в фотохимической реакции образуются 5,6-дигидропиримидины, подвергающиеся затем расщеплению цикла с образованием уреидопропионовой кислоты и ее производных:



где R = H, CH₃, β-D-рибофуранозил; R¹ = H, CH₃; R² = H, CH₃.



Зависимость фотопревращения 2,4-диоксопиримидинов (рН 7,0) от времени облучения. УФ-лампа БУВ-15, λ 254 нм, I_0 $1,9 \cdot 10^{17}$ квант \cdot мин $^{-1}$ \cdot см $^{-2}$, концентрация нуклеозидов и оснований 10^{-3} М, длина оптического пути 1 мм. а — тимин в воде (1), в 0,1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (2), в 1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (3); б — урацил в воде (1) и в 0,1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (3); уридин в воде (2) и в 0,1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (4)

Скорость реакции зависит от концентрации гипофосфита. Квантовый выход фотопревращения тимина при рН 7 составляет $1,9 \cdot 10^{-2}$ в 1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$, $8,5 \cdot 10^{-3}$ в 0,1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ и $5,8 \cdot 10^{-1}$ в 0,01 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$. Аналогичная зависимость наблюдается в случае урацила и уридина, квантовые выходы которых в 0,1 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ при рН 7 составляют $6,6 \cdot 10^{-2}$ и $1,5 \cdot 10^{-1}$ соответственно. Квантовый выход фотовосстановления зависит от рН и в 0,15 М растворе фосфорноватистой кислоты ($pK_a = 1,1$) для Уга равен $1,4 \cdot 10^{-3}$. Оптимум реакции находится в области рН 5—7.

Увеличение скорости реакции с гипофосфитом при УФ-облучении по сравнению с темновой реакцией [6] может быть связано с повышенной реакционной способностью УФ-индуцированных возбужденных состояний 2,4-диоксопиримидинов. Действительно, квантово-химические расчеты [9] указывают на значительную плотность неспаренных электронов на С5- и С6-атомах пиримидинового цикла в первых возбужденных триплетных состояниях нейтральных форм урацила и тимина, а гораздо меньшие плотности неспаренных электронов для других ионных форм 2,4-диоксопиримидинов и для цитозина согласуются с понижением их реакционной способности. Это позволяет предположить, что фотовосстановление протекает через первое возбужденное триплетное состояние молекулы, реагирующей с гипофосфитом как донором протонов.

На радикальный механизм реакции указывает практически полное подавление фотовосстановления (в условиях, приведенных на рисунке) $5 \cdot 10^{-2}$ М раствором карнозина *. В пользу этого вывода свидетельствуют также радикальные механизмы других известных восстановительных реакций гипофосфита [11—13].

Кроме гипофосфита были исследованы и другие соединения с Р—Н-связью — фосфористая и α -аминоизобутилфосфонистая кислоты, которые даже при длительном УФ-облучении не взаимодействовали с пиримидинами. Этот факт может служить доводом в пользу участия в фотореакции минорной таутомерной формы фосфорноватистой кислоты с трехкоординированным атомом фосфора — $\text{HP}(\text{OH})_2$, образование которой для двух вышеуказанных соединений невозможно.

Сравнение нового метода с известным фотовосстановлением при помощи NaBH_4 [4] однозначно указывает на его преимущества. Реакция фотоиндуцированного восстановления в присутствии гипофосфита специфична к 2,4-диоксопиримидинам и в отличие от реакции с NaBH_4 практически не затрагивает цитозин. Новая реакция оптимальна при нейтральных рН, тогда как реакция с NaBH_4 протекает при рН 9,5—10. Наконец, квантовые выходы фотовосстановления 2,4-диоксопиримидинов в 1 М растворах с оптимальными значениями рН в случае гипофосфита

* Этот факт представляет собой новый пример недавно обнаруженных свойств природного дипептида карнозина — (β Ala-L-His) быть акцептором радикалов [10] и будет предметом наших дальнейших исследований.

более чем на порядок выше, чем для боргидрида натрия. Уреидокислоты, возникающие при раскрытии дигидропиримидинового цикла, в отличие от реакции с NaBH_4 не восстанавливаются гипофосфитом в уреидоспирты.

Таким образом, отличительными особенностями новой реакции фотоиндуцированного восстановления пиримидинов являются специфичность по отношению к урацилу и тимину, высокий квантовый выход и, как следствие, малые времена превращения, а также нейтральное значение рН оптимальных реакций. Эти преимущества фотореакции позволяют использовать ее для селективной модификации урацила и тимина, в том числе и в составе нуклеиновых кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. V. 1, 2 / Ed. S. Y. Wang. N. Y.: Acad. Press. 1976.
2. Budowsky E. I., Kovalsky O. I., Yakovlev D. Yu., Simukova N. A., Rubin L. B. // FEBS Lett. 1982. V. 188. № 1. P. 155—158.
3. Simukova N. A., Yakovlev D. Yu., Budowsky E. I. // Nucl. Acids. Res. 1975. V. 2. № 12. P. 2269—2277.
4. Cerutti P., Kondo Y., Landis W. R., Witkop B. // J. Amer. Chem. Soc. 1968. V. 90. № 3. P. 771—775.
5. Sato E., Koyama K., Kanaoka Y. // Chem. Pharm. Bull. 1971. V. 19. P. 837—839.
6. Хомутов А. Р., Яковлев Д. Ю., Хомутов Р. М. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 427—429.
7. Sander E. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1969. V. 91. № 13. P. 3629—3634.
8. Yakovlev D. Yu., Simukova N. A., Budowsky E. I., Chekhov V. O., Savin F. A., Morozov Yu. V. // J. Photochem. 1982. V. 20. P. 253—268.
9. Бородавкин А. В., Будовский Э. И., Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Симукова Н. А. // Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот / Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 14. М.: ВИНТИ АН СССР. 1977.
10. Cohen R., Yamamoto Y., Cundy K. C., Ames B. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 35. P. 3175—3179.
11. Gilbert W., Larkin J. P., Norman R. O. C., Storey P. M. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1972. V. 2. № 11. P. 1508—1513.
12. Юделевич В. И., Соколов Л. Б., Попов Б. И. // Журн. общ. химии. 1976. Т. 46. № 10. С. 2394.
13. Kornblum N., Cooper G. D., Taylor J. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. № 7. P. 3013—3021.

Поступило в редакцию
24.XII.1990

D. Yu. YAKOVLEV, A. R. KHOMUTOV*, R. M. KHOMUTOV

A NEW METHOD OF SELECTIVE PHOTOREDUCTION OF URACIL AND THYMINE

V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow:

* A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

UV-Irradiation (λ 254 nm) of thymine, uracil and their derivatives in aqueous solutions of phosphinic acid salts leads to formation, with high quantum yields, of the corresponding dihydropyrimidine structures. Mild reaction conditions, high reaction rates and selectivity towards 2,4-dioxypyrimidines makes this new transformation promising for the base-specific modification of nucleic acids.