

¹ доктор физико-математических наук, доцент кафедры физики, ГВУЗ «ДГПУ»

e-mail: a.kostikov@hotmail.com, ORCID 0000-0002-9041-3209

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И ПАРАМАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА ТРИПТОФАНА

Понимание процессов, приводящих к повреждению важных биологических молекул – белков остается актуальной задачей для исследований. При этом полезным инструментом является исследование простых модельных систем. В данной работе в качестве объекта исследований использовался триптофан в щелочной среде. Такой выбор обусловлен тем, что молекула триптофана является амфипатической, т.е. содержит сильно гидрофобную и полярную группы и в условиях щелочной среды может образовывать мицеллы, в состав которых входят несколько молекул триптофана. В нашем случае такие мицеллы содержали шесть молекул триптофана.

Используя методы оптической спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса показано, что при облучении щелочного раствора триптофана образуется набор нескольких видов продуктов. Это катион-радикалы, анион-радикалы, свободные электроны, ловушки этих продуктов. Измерены параметры всех этих продуктов, их свойства.

Ключевые слова: фотофизика, парамагнитные свойства, триптофан.

Введение.

Ароматические аминокислоты, входящие в состав многих белков, удобно использовать для наблюдения за локальным микроокружением белка, его конформацией, а также для выяснения механизмов соответствующих биологических процессов. Полезную информацию при этом можно получить при исследовании фотоионизации и фотодиссоциации ароматических кислот, а также при наблюдении за спектрами Электронного Парамагнитного Резонанса (ЭПР).

Известно, что при действии УФ-излучения на раствор триптофана при 77К в результате образуются катион-радикалы и захваченные матрицей свободные электроны [1]. Спектр ЭПР катион-радикалов представляет собой синглетную линию с шириной $\Delta H = 22$ Гс. В щелочном растворе взаимодействие высвобожденного электрона с молекулой триптофана затруднено потому что свободные электроны могут захватываться ловушками щелочного льда. Спектр ЭПР захваченных электронов представляет относительно узкую синглетную линию с шириной $\Delta H = 14$ Гс. Оптический спектр поглощения захваченных электронов представляет широкую полосу в диапазоне 350 - 800 нм с максимумом около 600 нм. Последующее действие света в ука-

занной полосе поглощения приводит к освобождению электронов из ловушек и рекомбинации их с катион-радикалами. Представленные здесь некоторые особенности процессов воздействия светового излучения на молекулу триптофана в широком диапазоне длин волн как выяснилось за последние годы не ограничивается только указанными свойствами. В более поздних исследованиях были получены дополнительные детали фотофизики этого белка [2]. Наконец, в последние годы [3-6] были обнаружены и изучены эффекты световой дезактивации фосфоресценции триптофана и его аналогов. Экспериментальные данные, полученные нами, позволили получить достоверную информацию о механизме взаимодействия карбонильной группы с индольным кольцом триптофана. Детали полученных результатов содержатся, в частности, в работе [6]. В настоящей работе приведены результаты изучения действия УФ-излучения на триптофан в щелочной среде замороженной до 77К, а также изучено действие видимого света на парамагнитные центры. Проведен анализ изменения интенсивности люминесценции триптофана при перемораживании образца.

Материалы и методы.

Для исследований использовался раствор L-триптофана ($1, 1 \cdot 10^{-4} M$) в щелочи (10н. NaOH). Раствор триптофана помещали в кварцевую трубку с внутренним диаметром 2 мм и откачивали до давления 1,3 Н/м. Облучение УФ светом проводили ртутной лампой ДРШ-1000 через водный фильтр и фильтр УФС-2 (270-380 нм). В качестве источника видимого света использовали тот же источник света, но с фильтром БС-10 ($>400m$). Спектры ЭПР измерялись на стандартном спектрометре 3-см диапазона. Оптические характеристики измерялись с использованием спектрофотометра Spesord "UV-VIS".

Результаты и обсуждение.

При облучении УФ светом (270-380нм) триптофана в щелочной среде наблюдался спектр ЭПР захваченных электронов с полушириной синглетной линии $\Delta H = 12$ Гс.

При последующем действии видимого света форма спектра изменялась, вместо узкой линии ЭПР захваченных электронов появляется более широкая линия ($\Delta H = 22$ Гс) с интегральной интенсивностью уменьшенной на 75%.

Полученный таким образом спектр ЭПР хорошо соответствует спектру катион-радикалов. Интерпретация процессов, происходящих при последовательном облучении образца сначала УФ светом, а затем светом видимого

диапазона хорошо соответствует появлению в начальном процессе захваченных электронов с узким спектром ЭПР и высвобождению части захваченных электронов под действием видимого света.

Таким образом часть захваченных электронов возвращалась из ловушек и происходила полная рекомбинация этих электронов, т.е. наблюдался полностью обратимый процесс.

Представляет особый интерес механизм процессов, ответственных за остаток примерно 25% парамагнитных центров, нечувствительных к действию видимого света. Параметры спектра ЭПР этих центров позволяет предположить, что они являются свободными радикалами триптофана. Детали механизма соответствующих процессов, требуют дополнительных исследований.

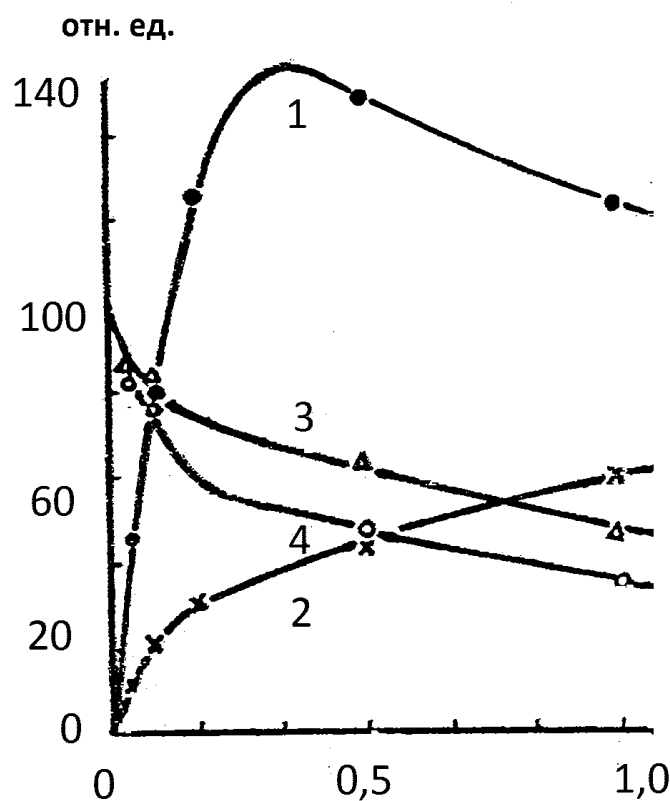


Рис. 1: Изменение интегральной интенсивности спектра ЭПР парамагнитных состояний при 77К в щелочном растворе при разных режимах облучения. Кривая 1 получена при действии УФ-(270-280 нм). Максимум на кривой 1 соответствует выходу на равновесную концентрацию захваченных электронов. Кривая 2 коррелирует с накоплением радикалов, не чувствительных к видимому свету. Кривые 3 и 4 показывают поведение интенсивности люминесценции в режиме, совпадающем с режимом получения кривых 1 и 2.

На рисунке представлены кривые изменения интенсивности спектра ЭПР парамагнитных состояний, возникающих при разных режимах облучения.

Кривая 1 демонстрирует изменение интенсивности спектра ЭПР при действии УФ-излучение в области 270–280 нм. Для получения каждой точки на кривой 2 использовался новый раствор; сначала образец облучали УФ-светом в течение заданного времени, а затем видимым светом в течение 10сек. В первом случае в образце в результате ионизации триптофана образуются катион-радикалы, захваченные электроны и анион-радикалы. Число катион-радикалов равно сумме числа захваченных электронов и числа анион-радикалов.

В результате имеем равные количества катион- и анион-радикалов. По наклону начальных участков кривых видно, что начальная скорость образования захваченных электронов примерно в три раза выше скорости образования анион-радикалов, т.е 75% испускаемых электронов захватывается ловушками а 25% реагирует с молекулами триптофана с образованием стабильных при 77К анион-радикалов. Свет в области 270 – 380 нм перекрывает коротковолновую часть спектра поглощения захваченных электронов. При действии этого света наряду с ионизацией молекул триптофана протекает фотоосвобождение электронов из ловушек и рекомбинация их с катион-радикалами.

Максимум на кривой 1 соответствует выходу на равновесную концентрацию захваченных электронов, когда скорость захвата высвобожденных электронов в ловушки равна скорости из фотоосвобождения с последующей рекомбинацией с катион-радикалом. Дальнейшее облучение образца приводило к постепенному снижению равновесной концентрации захваченных электронов, которое коррелирует с накоплением не чувствительных к видимому свету радикалов (кривая 2).

Кривые (3 и 4) демонстрируют поведение люминесценции триптофанового белка при УФ-облучении. Режим облучения при получении кривых 3 и 4 такой же, как в случае получения кривых 1 и 2, соответственно. Из экспериментальных кривых 1 и 2, опираясь на наши представления об образовании парамагнитных центров, можно получить кривые изменения концентрации для каждого из них.

Проанализируем процессы тушения люминесценции в связи с присутствием в образце тех или иных парамагнитных центров в первые секунды фотолиза, когда степень превращения триптофана мала, а количество парамагнитных центров в первом приближении пропорционально длительности УФ-экспозиции. Облучение образца УФ-светом в течение 5 секунд приводило к образованию в образце $4,2 \cdot 10^{14}$ парамагнитных центров (кривая 1). При действии видимого света в результате рекомбинации равных количеств катион-радикалов и электронов исчезало $3 \cdot 10^{14}$ центров, что соответствует

примерно 9% молекул триптофана от их исходного количества $2 \cdot 10^{15}$ центров в образце. В то же время интенсивность флуоресценции восстанавливалась на те же 9% процентов от интенсивности флуоресценции необлученного образца. Это означает, что катион-радикалы триптофана в щелочном растворе не тушат флуоресценцию соседних молекул. Это означает также, что захваченные электроны тоже не тушат флуоресценцию триптофана в условиях настоящего эксперимента.

Через 5 секунд УФ облучения в образце накапливается $1,2 \cdot 10^{14}$ свободных радикалов не чувствительных к видимому свету (кривая 2). Можно предположить, что это сумма равных количеств катион- и анион-радикалов. Это соответствует тому, что в эти два типа радикалов превращено по 3,3% молекул в образце. Интенсивность флуоресценции в таком образце уменьшена по сравнению с исходной на 19% (кривая 4). В нашем случае катион-радикалы не тушат флуоресценцию других молекул триптофана. При этом интенсивность люминесценции за счет превращения молекул триптофана в катион-радикалы должна снизиться на те же 3,3%.

Уменьшение интенсивности флуоресценции еще на $19 - 3,3 = 15,7\%$ связано с образованием анион-радикалов. На 3,3% интенсивность флуоресценции уменьшается из-за того, что сами ион-радикалы не люминесцируют. Дополнительное тушение на 12,4% связано, по-видимому, с тем, что каждый анион-радикал эффективно тушит люминесценцию примерно четырех соседних молекул триптофана ($12,4\% / 3,3\% \approx 3,8\%$).

Близкие значения получаются при рассмотрении соотношения набора свободных радикалов и тушения флуоресценции в образце после УФ-облучения в течение 6 минут (кривая 2). В этом случае тушение флуоресценции составило 93%. Количество катион-радикалов каждого типа в образце $2,8 \cdot 10^{14}$. Т.е. примерно по 15% от исходного числа молекул триптофана превращаются в радикалы того и другого типа с потерей способности к люминесценции. Тушение 64% флуоресценции, как и в предыдущем случае можно связать с эффективным тушением каждым анион-радикалом люминесценции четырех соседних молекул триптофана ($63\% / 15\% \approx 4,2\%$).

Можно было ожидать, что все реакции будут протекать как в застеклованном растворе. Действительно, известно, что растворы NaOH с высокой концентрацией стеклуются при охлаждении. Однако наши эксперименты показали, что раствор триптофана в щелочи при 77К не является истинным. Действительно, предельное количество свободных радикалов в 3,6 раз меньше числа молекул триптофана (кривая 2). Этот результат можно объяснить если учесть тушение люминесценции анион-радикалами (см. выше). Тушение

люминесценции триптофана свободными радикалами, УФ индуцированными в белках и в различных модельных системах при 77К, эффективно на расстоянии меньше 3,4 нм. Однако в $1.1 \cdot 10^{-4}$ М растворе триптофана среднее расстояние между молекулами составляет 26 нм. На таком расстоянии в застеклованном истинном растворе тушение люминесценции триптофана за счет переноса энергии электронного возбуждения по индукционно-резонансному механизму на свободный радикал происходить не может.

Полученные результаты можно объяснить, если предположить, что молекулы триптофана в условиях эксперимента объединялись в мицеллы по шесть штук за счет гидрофобных взаимодействий. Молекулы триптофана являются амфипатическими, т.е. содержат сильно гидрофобную и сильно полярную группы. Известно, что амфипатические соединения стремятся образовать мицеллы, в которых гидрофобные группы обращены внутрь, а полярные - наружу. При ионизации одного из триптофанов образуется катион-радикал, который не тушит люминесценцию других молекул триптофана в мицелле. Если испущенный электрон захватывается другой молекулой триптофана в мицелле, то возникает анион-радикал, который тушит люминесценцию четырех оставшихся молекул триптофана.

Кривые накопления свободных радикалов и уменьшения интенсивности флуоресценции имеют ясно видимый излом. Медленная часть кривых связана с накоплением анион-радикалов и равного количества катион-радикалов. Начальная (до 20 сек.) быстрая часть кривых связана с параллельным протеканием второго процесса - захватом испущенных электронов в ловушки и образованием равного количества катион-радикалов. Этот процесс обратим при действии света в области поглощения стабилизированных электронов. Через 20 сек скорости прямой и обратной реакции выравниваются и он перестает давать вклад в накопление свободных радикалов и в уменьшение интенсивности флуоресценции (кривые 2 и 4).

Выводы

В работе показано, что при облучении щелочного раствора триптофана образуется набор нескольких видов продуктов. Это катион-радикалы, анион-радикалы, свободные электроны, ловушки этих продуктов. При фотоионизации одного из триптофанов образуется катион-радикал, при этом другие молекулы триптофана в мицелле способны испускать люминесцентное излучение. Если испущенный электрон захватывается другой молекулой триптофана в мицелле, то может возникнуть анион-радикал, который тушит люминесценцию остальных молекул триптофана в данной мицелле.

Литература

1. Каюшин Л.П., Грибова З.П., Азизова О.А. Электронный парамагнитный резонанс фотопроцессов биологических соединений. М.: Наука. 1973.
2. Львов К.М. Львова О.Ф. Молекулярные механизмы биологического действия оптического илучения. М. : Наука. 1988. С.41–55.
3. Львов К.М. Обратимое снижение интенсивности фосфоресценции триптофана при действии света в области триплетного поглощения при 77К. /К.М. Львов, С.В. Кузнецов, А.П. Костиков// Биофизика. — 1993. — т. 38, — С. 568–573.
4. Kostikov A.P. Light induced deactivation of tryptophan phosphorescence in proteins. /A.P. Kostikov// Biophysical Journal. — 2003. — v. 84 — p. 500A.
5. Костиков А.П. Светоиндуцированная дезактивация фосфоресценции триптофана, роль карбонильной группы в механизме этого явления. Збірник наукових праць фізико-математичного факультету ДДПУ. 2018. Вип. 8. С. 65–70.
6. Костиков А.П. Структурные особенности триптофана, влияющие на светоиндуцированную дезактивацию фосфоресценции белков. Збірник наукових праць фізико-математичного факультету ДДПУ. 2019. Вип. 9. С. 52–59.

Alexander P. Kostikov

Donbas State Pedagogical University, Sloviansk, Ukraine.

Photophysical and paramagnetic properties of tryptophan

It is shown in the work that a set of several types of products is formed upon irradiation of an alkaline solution of tryptophan. These are radical cations, radical anions, free electrons, traps of these products. When one of the tryptophanes is photoionized, a radical cation is formed, while other tryptophan molecules in the micelle are capable of emitting luminescent radiation. If the emitted electron is captured by another tryptophan molecule in the micelle, then a radical anion can arise, which quenches the luminescence of the remaining tryptophan molecules in this micelle.

Keywords: *tryptophan, photophysics, paramagnetic properties.*