

На правах рукописи

СИМАКОВ

Михаил Борисович



**РОЛЬ ВАКУУМНОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
И ДРУГИХ ВИДОВ ЭНЕРГИИ ОТКРЫТОГО КОСМОСА
В АБИОГЕННОМ СИНТЕЗЕ
НУКЛЕОТИДОВ И ДИПЕПТИДОВ**

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена в Институте цитологии РАН
Санкт-Петербург

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Доктор биологических наук,
КУЗИЧЕВА Евгения Алексеевна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

ШАГИСУЛТАНОВА Гадила Ахатовна

Доктор химических наук,

ЮРРЕ Татьяна Андреевна

Доктор химических наук,

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

Защита состоится “20” *декабря* 2005 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.230.02 при государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (технический университет), по адресу: 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26.

Отзывы на автореферат в одном экземпляре, заверенные печатью, просим направлять по адресу: 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Ученый совет.

С диссертацией можно ознакомиться в
фундаментальной библиотеке Технологического института.

Автореферат разослан “11” *ноября* 2005 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кхн, доцент



/Соколова Н.Б./

Общая характеристика работы

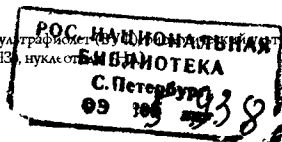
Актуальность проблемы

Происхождение жизни — один из основных вопросов естествознания. В настоящее время является общепринятым, что возникновению первых живых организмов предшествовал период химической эволюции, в процессе которой простейшие неорганические молекулы под действием различных факторов окружающей среды превратились в сложные комплексы органических молекул, которые способны к взаимодействию друг с другом и имеют пространственную и временную организацию.

Впервые гипотеза о химической эволюции материи была предложена академиком Опариным в 1924 году и получила широкое признание в научном мире. Начало экспериментальной проверки данной теории было положено классическими работами Стенли Миллера по синтезу аминокислот из смеси простейших газов, послужившими отправной точкой для огромного числа исследований по абиогенному синтезу биологически значимых соединений в опытах, моделирующих условия первобытной Земли, её атмосферу, гидросферу и литосферу.

Геологические данные неопровержимо свидетельствуют, что уже 3.5 млрд лет назад на планете существовали достаточно сложные фотоавтотрофные микроорганизмы, сходные с современными цианобактериями. Более того, изотопный анализ углерода из осадочных пород, имеющих возраст около 3.8 млрд лет говорит о том, что и в это время протекали фотоавтотрофные биохимические процессы. С другой стороны, именно на этот период приходится конец интенсивной бомбардировки земной поверхности кометами и метеоритами, которая полностью исключала наличие какой-либо живой и даже просто сложной органической материи. Учитывая эти данные можно предположить, что жизнь на Земле возникла сразу, как только геологические условия стали приемлемыми для ее существования, а сам процесс проходил, по геологической шкале, практически мгновенно, ибо на химическую эволюцию органических соединений, которая должна была предшествовать биологической эволюции, оставалось очень мало времени.

Ряд авторов предложили вполне убедительную модель доставки на первобытную Землю сложных органических молекул астероидами, кометами, метеоритами, микрометеоритами и частицами межпланетной космической пыли на последней стадии бомбардировки планеты. В связи с этим, весьма актуальным является изучение абиогенных синтезов биологически значимых соединений (БЗС), в частности, нуклеотидов и олигопептидов в ранее не исследованных условиях, приближенных к тем, что могли возникнуть на поверхности малых тел солнечной системы в процессе ранних стадий ее эволюции. Крайне важно установить влияние



отдельных факторов открытого космического пространства на ход химической эволюции на поверхности этих объектов, исследовать различные ее этапы — как образование исходных мономеров БЗС (первый шаг в эволюции органических соединений), так и их олигомеризацию, которую считают следующей стадией химической эволюции. Один из основных вопросов состоял в том, чтобы установить, насколько сложными могли быть те органические вещества, которые попали на первобытную Землю из космического пространства и приняли участие сначала в химической, а затем и биологической эволюции на поверхности нашей планеты. Известный биохимик Кристиан де Дюве сформулировал неизменность основных положений химической эволюции и важность процессов, протекающих в открытом космосе: “жизнь возникла естественным химическим путём, методом прогрессивного усложнения, начиная, по-видимому, с малых молекул, таких, которые возникают в космосе в абиогенных реакциях”. Актуальность этих исследований определяется и тем, что экспериментальное изучение первых стадий химической эволюции, протекающих в достаточно жестких условиях открытого космоса, имеет первостепенное значение для проблемы происхождения жизни на Земле и преодоления парадокса сверхбыстрого появления живых организмов после завершения стадии метеоритной бомбардировки нашей планеты на ранних стадиях формирования солнечной системы.

Крайне важно выявить и влияние разных факторов открытого космического пространства на ход химической эволюции на поверхности этих объектов, исследовать различные ее этапы — как образование исходных мономеров БЗС, так и их олигомеризацию. Вот почему постановка вопроса о роли разных видов энергии открытого космоса в абиогенном синтезе нуклеотидов и олигопептидов представляется актуальной.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение возможности абиогенного синтеза биологически важных соединений, таких как нуклеотиды и олигопептиды, в твердых пленках под действием различных видов энергии открытого космического пространства, в частности, вакуумного ультрафиолетового излучения (ВУФ, $\lambda_{\text{max}} < 200$ нм), ультрафиолетового излучения (УФ, $\lambda_{\text{max}} 254$ нм), γ -радиации и потоков заряженных частиц. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) осуществить абиогенный синтез нуклеотидов из смеси нуклеозид + неорганический фосфат в условиях твердой фазы под действием вакуумного ультрафиолетового излучения;
- 2) сравнить полученные результаты с действием УФ излучения, гамма-радиации и тепла;
- 3) осуществить абиогенный синтез олигопептидов из отдельных аминокислот в условиях твердой фазы и установить роль вакуумного ультрафиолетового излучения и потоков заряженных частиц в данном процессе;

4) провести эксперимент по абиогенному синтезу пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов из смеси нуклеозид + неорганический фосфат в условиях открытого космоса.

Из всех видов энергии, присутствующих в открытом космическом пространстве наиболее распространенным является вакуумное ультрафиолетовое излучение Солнца с длинами волн менее 200 нм. Именно поэтому ему было уделено основное внимание в наших лабораторных экспериментах.

Научная новизна и практическая ценность

В данной работе впервые подробно изучен абиогенный синтез нуклеотидов из смеси различных нуклеозидов и неорганического фосфата в твердом состоянии под действием ВУФ. Проведено сравнительное исследование действия энергий широкого диапазона, начиная с наиболее мягкого теплового воздействия и заканчивая γ -радиацией, на реакцию абиогенного фосфорилирования нуклеозидов в тонких твердых пленках.

Впервые наблюдался абиогенный синтез дипептидов из смеси отдельных аминокислот под действием потока заряженных частиц.

Впервые подробно изучена реакция олигомеризации аминокислот под действием ВУФ и проведено сравнение эффективности воздействия на исходные смеси аминокислот вакуумного ультрафиолетового излучения, γ -радиации и потока заряженных частиц.

Впервые показана возможность протекания второй стадии химической эволюции, а именно, полимеризации, в условиях открытого космического пространства.

Результаты лабораторных исследований были полностью подтверждены в эксперименте по абиогенному синтезу природных нуклеотидов, выполненном на борту космического спутника "Бион-11".

Представленная работа относится к фундаментальным исследованиям в области химической эволюции и происхождения жизни на Земле и других планетах во Вселенной, а полученные данные имеют важное значение для понимания путей абиогенеза БЗС в период молекулярной эволюции.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на XXX Пленарной сессии Комитета МСНС по космическим исследованиям (COSPAR) (Гамбург, Германия, 1994), на Первой международной конференции "Проблемы ноосферы и устойчивого развития" (Санкт-Петербург, 1996), на XXXI Пленарной сессии Комитета МСНС по космическим исследованиям (COSPAR) (Бирмингем, Великобритания, 1996), на 181 Коллоквиуме Международного Астрономического Союза (Кентербери,

Великобритания, 2000), на 6-й Международной конференции по химической эволюции (Триест, Италия, 2000).

Публикации По материалам диссертации опубликовано 11 работ.

Краткое содержание работы

Диссертация изложена на 128 страницах и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, объекты и методы исследования, экспериментальная часть, обсуждение результатов), выводов и списка цитированной литературы (296 наименований).

Во введении обоснована актуальность выбранной проблемы.

Первая глава представляет собой обзор литературы по теме диссертации. Кратко рассмотрены основные современные подходы к решению проблемы происхождения жизни на Земле и возможности ее существования во Вселенной, приведена их классификация. Основное внимание уделено работам, посвященным поиску сложных органических молекул в открытом космическом пространстве и на поверхности малых тел Солнечной системы, таких как кометы, астероиды, метеориты и частицы межпланетной пыли. Данные, представленные в литературе, показывают, что вещества, использованные нами в качестве исходных в экспериментах по абиогенному синтезу (основания нуклеиновых кислот, аминокислоты), широко представлены среди молекул, обнаруженных на поверхности различных космических объектов.

Вторая глава посвящена объектам исследования, обоснованию их выбора и основным экспериментальным методам исследования.

Обоснование выбора объектов исследования

Нуклеотиды и аминокислоты являются основными структурными составляющими всех живых объектов. К настоящему времени убедительно доказано наличие аминокислот, оснований нуклеиновых кислот и углеводов в составе различных космических объектов, и наше исследование было посвящено изучению дальнейших путей их эволюции.

Реакции абиогенного синтеза БЗС

Абиогенный синтез нуклеотидов

В опытах по абиогенному синтезу нуклеотидов предварительно готовили плёнки путем высушивания на воздухе водных растворов, содержащих эквимолярную смесь нуклеозида и неорганического фосфата (NaH_2PO_4). Плёнки содержали по 10 мкмоль каждого компонента, а их площадь составляла около 1 см². Использование пленок обуславливалось ограниченной проникающей способностью УФ излучения. Толщина пленок подбиралась из расчета его полного поглощения и контролировалась спектрально по оптической плотности в первой полосе поглощения.

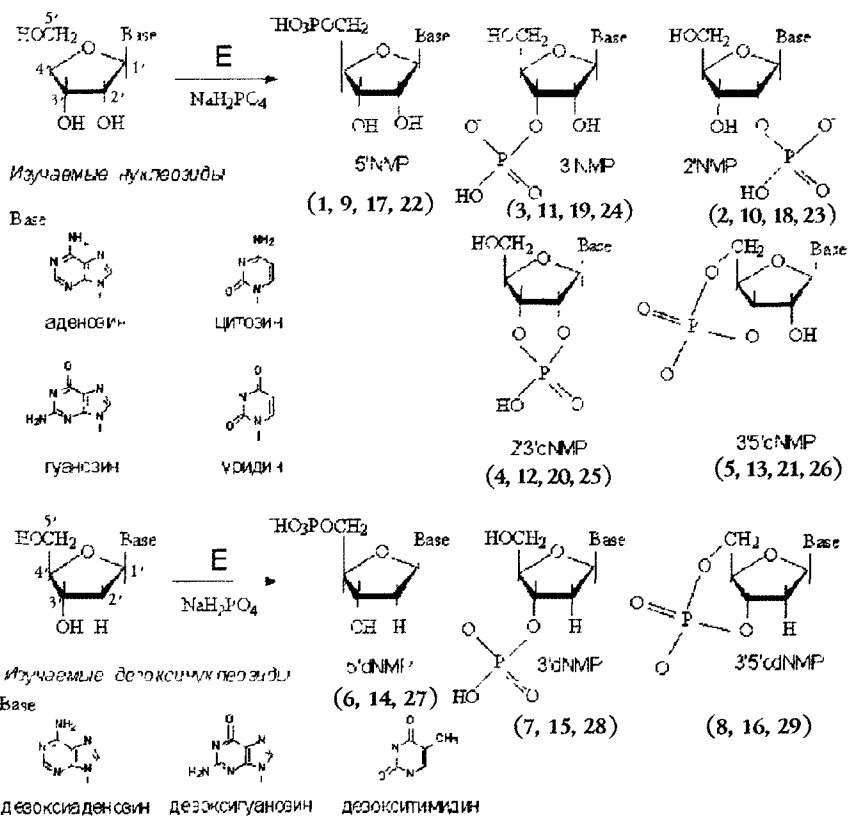


Схема 1

Абиогенный синтез нуклеотидов

Таблица 1. Продукты абиогенного синтеза нуклеотидов

основание	углевод	5'	2'	3'	2'3'c	3'5'c
аденин	рибоза	1	2	3	4	5
аденин	дезоксирибоза	6		7		8
гуанин	рибоза	9	10	11	12	13
гуанин	дезоксирибоза	14		15		16
урацил	рибоза	17	18	19	20	21
цитозин	рибоза	22	23	24	25	26
тимин	дезоксирибоза	27		28		29

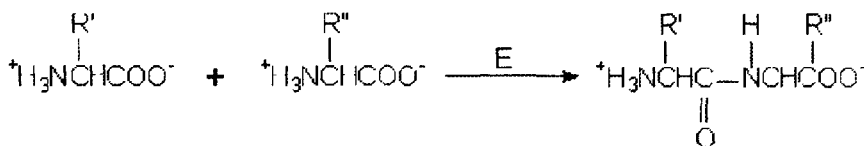


Схема 2 Абиогенный синтез дипептидов из свободных аминокислот

Исследовались реакции фосфорилирования пиримидиновых (уридин, цитозин, дезокситимидин) и пуриновых (аденозин, гуанозин, дезоксиаденин и дезоксигуанозин) нуклеозидов (схема 1, таблица 1).

Источники энергии подбирались с учетом спектральных свойств исходных молекул. В качестве источников излучения использовались: (1) лампы с окошками из MgF_2 с барьерным разрядом в Кг и Хе с максимумами при 145 и 175 нм (вакуумное ультрафиолетовое излучение - ВУФ) с мощностью излучения 10 мВт. Дозы ВУФ излучения составляли от 0 до 3×10^6 Дж/м²; (2) ртутные лампы ДБ-30 с мощностью дозы 6 мВт/см² или 8×10^{14} квант/см²с (биологически-значимое ультрафиолетовое излучение (УФ, λ 254 нм). В первом случае плёнки непосредственно наносились на окошко лампы для того, чтобы избежать прослойки воздуха между лампой и пробой, тогда как в опытах по синтезу нуклеотидов под действием УФ излучения образцы размещались на стёклах и облучались в атмосфере азота в металлической камере с окном из оптического кварца и отводной трубкой для пропускания азота в течение всего времени облучения. Азот использовался для устранения возможного влияния кислорода на ход реакции. Дозы биологически активного ультрафиолета составляли от 0 до 4.4×10^8 Дж/м².

Радиационно-химический синтез нуклеотидов осуществляли при комнатной температуре путем облучения лиофилизированной эквимольной (10 мкмоль) смеси порошков нуклеозида и дигидрофосфата натрия. Источником γ -излучения служила установка [ЛМВ- γ -1] (^{137}Cs) с мощностью дозы 2,64 крад/мин в атмосфере аргона. Суммарные дозы составляли от 0 до 3×10^3 Дж/г.

Абиогенный синтез дипептидов

В опытах по абиогенному синтезу дипептидов исследовались реакции полимеризации следующих аминокислот (тирозин, триптофан, аланин, глицин), протекающих по схеме 2 (таблица 2). Уксуснокислые растворы отдельных аминокислот и их смесей наносились на стеклянные подложки и высушивались на воздухе. Плёнки содержали по 10 мкмоль каждой аминокислоты, а их площадь составляла около 1 см². Облучение образцов ультрафиолетовым светом как в ВУФ, так и УФ области проводили по методике, полностью идентичной описанной выше для синтеза нуклеотидов.

При использовании потоков заряженных частиц облучение пленок проводилось рассеянным пучком протонов, полученным на ускорителе типа У-120

Таблица 2. Продукты абиогенного синтеза дипептидов

дипептид	NN	
глицил-триптофан	Gly-Trp	30
триптофил-глицин	Trp-Gly	31
триптофил-триптофан	Trp-Trp	32
глицил-тирозин	Gly-Tyr	33
тирозил-глицин	Tyr-Gly	34
тирозил-тирозин	Tyr-Tyr	35
аланил-триптофан	Ala-Trp	36
триптофил-аланин	Trp-Ala	37

накладываются непосредственно на облучаемые образцы. Роль вторичных факторов при торможении протонов в алюминиевой фольге не учитывалась. Энергии потоков составляли 1,8, 4 и 6 МэВ.

Эксперименты в космосе

Космические эксперименты проводили в наружном контейнере биоспутника “Бион-11”. По семь образцов каждой исследуемой смеси были помещены на внешней обшивке спутника и подвергались во время полета действию всего спектра космических источников энергии. В качестве контроля использовалось по одному образцу каждой смеси, которые находились на протяжении всего полета во внутреннем контейнере спутника и были защищены от перепадов температуры, ультрафиолетового излучения и ионизирующей радиации. Температура внутри спутника во время полета от +21 °С до +26 °С (измерялась), температура снаружи поднималась временами до +80-100 °С и опускалась до -30 °С.

Исследовалось четыре варианта смеси, состоящей из эквимольных количеств (10 мкмоль) соответствующего нуклеозида (тимидин, цитидин, аденозин или дезоксиаденозин) и дигидроксифосфата натрия. Водный раствор смеси исходных компонентов наносился на стекло и высушивался на воздухе. Стекла при помощи специального клея размещались на поверхности экспериментальной платы.

Контрольными для всех экспериментов по синтезу нуклеотидов и дипептидов служили исходные смеси соединений, не подвергавшиеся облучению в лабораторных опытах или не подвергавшиеся экспонированию в открытом космосе. Их анализ проводили параллельно с анализом экспериментальных образцов. После облучения пробу растворяли в бидистиллированной воде и анализировали при помощи ВЭЖХ.

Аналитические методы

Качественный и количественный анализ продуктов абиогенного синтеза нуклеотидов, олигопептидов и продуктов распада проводился при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе на приборе LC-5000 фирмы “Varian” (США). Использовалась колонка MZRP-18 (4×

в НИИ Физики Санкт-Петербургского государственного университета. Первоначальная энергия протонов пучка составляла 6,6 МэВ, а интенсивность не превышала величины 3×10^7 протонов/см²с во избежание тепловых эффектов воздействия на облучаемые образцы. Дозы облучения достигали величины 5×10^{11} прот./см². Изменение энергии протонов производилось с помощью алюминиевых фильтров соответствующей толщины,

250 мм, диаметр сорбента 5 мкм). Предварительно пробы растворяли в бидистиллированной и деионизированной воде типа "Super Q", фильтровали через микрофильтр GV-0.22 (Миллипор, США) и 10 мкл раствора вводили в колонку. Скорость потока элюента была 1 мл/мин.

Продукты абиогенного синтеза (нуклеозиды и дипептиды) были идентифицированы по временам удерживания (R_t) контрольных образцов. Калибровку проводили непосредственно перед анализом проб. Детектирование продуктов реакции осуществляли на длине волны 254 нм для производных нуклеиновых кислот (основная полоса поглощения оснований НК), для олигопептидов — 275 нм (основная полоса поглощения ароматических боковых цепей аминокислот).

Метод масс-спектрометрии. Подтверждение качественного состава продуктов абиогенного синтеза олигопептидов и дипептидов проводилось при помощи масс-спектрометра Bruker Esquire LC фирмы "Brucker Daltonik GmbH", Германия. Спектрометр был оснащен электро-спрей инжектором (ESI) и магнитно-секторным масс-анализатором с двойной фокусировкой. Анализировали как суммарные облученные образцы, так и их индивидуальные ВЭЖХ-фракции. Высушенные образцы растворяли в смеси 0.2% уксусная кислота/ацетонитрил (1:1 v/v). Пробу в объеме 20 мкл с концентрацией 1-5 пмоль/мкл, оцененной по площади хроматографических пиков, вводили в масс-спектрометр со скоростью подачи 1 мкл/мин. Регистрировали моноизотопные значения m/z . Точность в определении молекулярных масс составляла 0.1%.

Определение квантового выхода реакций проводили на начальных линейных участках кривых абиогенного синтеза нуклеотидов и дипептидов и разложения исходных компонентов. В качестве актинометра в случае ВУФ использовался салицилловокислый натрий, квантовый выход люминисценции которого при возбуждении в области 120-300 нм не зависит от длины волны и близок к единице. В случае УФ излучения его интенсивность измерялась с помощью радиометра "UVX Digital Radiometer" (USA).

В третьей главе изложены экспериментальные результаты абиогенного синтеза нуклеотидов и дипептидов под действием различных источников энергии в лабораторных условиях и в условиях открытого космоса.

Абиогенный синтез нуклеотидов под действием ВУФ

В результате облучения вакуумным ультрафиолетовым светом с длиной волны 145 нм (ВУФ) пленок, приготовленных из смеси нуклеозида и неорганического фосфата, нами были обнаружены природные нуклеотиды, такие как 5' (1, 6, 9, 14, 17, 22, 27), 2' (2, 10, 18, 23), 3' (3, 7, 11, 15, 19, 24, 28) монофосфаты, наряду с циклическими монофосфатами (4, 5, 8, 12, 13, 16, 20, 21, 25, 26, 28). Исследовались как пуриновые, так и пиримидиновые нуклеозиды.

Таблица 3. Результаты синтеза нуклеотидов под действием ВУФ
(время облучения 9 часов, доза — 3×10^6 Дж/м²)

I Нуклеозид	Выход нуклеотидов (%)					Сумма
	5'	2'	3'	2'3'с	3'5'с	
Ado	0.36	0.21	0.20	0.20	следы	0.97
Guo	0.30	0.21	0.22	0.27	0.05	1.05
dAdo	0.13	—	0.15	—	0.02	0.30
dGuo	0.23	—	0.13	—	следы	0.36
Urd	2.80	1.21	1.07	2.13	0.56	7.77
Cyd	3.75	1.32	1.67	2.46	0.86	9.46
dThd	2.59	—	2.00	—	0.84	5.43

Было показано, что абиогенный синтез природных нуклеотидов идет с общим выходом порядка одного процента в случае пуриновых нуклеозидов (аденозин, дезоксиаденозин, гуанозин, дезоксигуанозин) и около 9% в случае пиримидиновых нуклеотидов (уридин, дезокситимидин, цитидин). Обобщенные результаты представлены в таблице 3.

В реакции абиогенного синтеза нуклеотидов, независимо от природы гетероциклического основания, получается весь набор нуклеотидов, встречающихся в живых организмах, но фосфорилирование идет преимущественно с образованием 5'-производных. Очевидно, что гидроксильная группа в пятом положении рибозного и дезоксирибозного остатков нуклеозидов наиболее реакционноспособна в данных условиях. Это хорошо согласуется с литературными данными.

Для каждого из интересующих нас продуктов реакции был определен количественный выход и построены кривые зависимости выхода нуклеотидов от времени облучения. Пример подобной кривой приведен на рисунке 1. Облучение реакционной смеси ведет к образованию природных монофосфатов нуклеозидов и их циклических аналогов, причём с увеличением времени облучения повышается и выход продуктов реакции с постепенным выходом кривой на плато. Можно предположить, что процессы синтеза начинают конкурировать с процессами распада как исходных компонентов, так и вновь синтезируемых молекул.

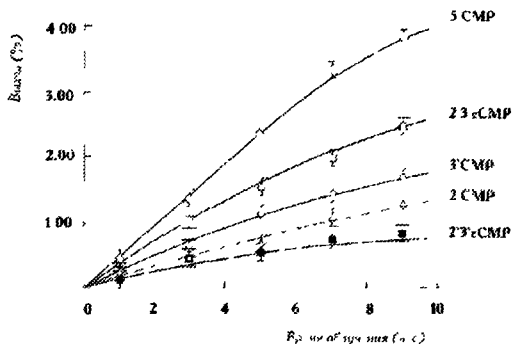


Рисунок 1 Зависимость выхода продуктов абиогенного синтеза цитидиновых нуклеотидов от времени ВУФ облучения

Из ВУФ спектров поглощения компонентов нуклеиновых кислот (снований и нуклеозидов) следует, что излучение с длинами волн менее 200 нм соответствует поглощению с возбуждением S_n состояний пиримидинового и пуринового колец. Наряду с этим происходит поглощение остатками рибозы и дезоксирибозы, входящими в состав нуклеозидов. Кроме того, излучение с этими длинами волн активирует и неорганический фосфат, присутствующий в реакционной смеси. Первый процесс может привести к фотодеструкции исходного нуклеозида с разрывом N-гликозидной связи, а два последних — к абиогенному фотосинтезу нуклеотидов.

В разделе 3.1.1.3 диссертации описаны процессы фотораспада исходных соединений, которые включают в себя как фотодеструкцию гетероциклических оснований с образованием продуктов, которые не поглощают в области 254 нм, в которой проходила регистрация продуктов при анализе ВЭЖХ, так и реакцию расщепления N-гликозидной связи с выделением свободных оснований нуклеиновых кислот. Изучение динамики распада исходных соединений показало, что в ряду нуклеозидов наиболее устойчивым является аденозин, 85% которого остается неизменным в процессе облучения, а самым неустойчивым — уридин, у которого только 25% от исходного количества остается неразрушенным. Полные данные по распаду исходных нуклеозидов, в том числе и с расщеплением N-гликозидной связи с выделением свободного гетероциклического основания, приведены в таблице 4. Пуриновые нуклеозиды более устойчивы к разрушающему действию вакуумного ультрафиолета, чем пиримидиновые, причем это относится как к разрушению гетероциклических оснований, так и расщеплению гликозидной связи. Вероятно, в случае пуриновой системы, устойчивость исходных нуклеозидов является следствием наличия больших возможностей для перераспределения поглощенной энергии по сравнению с пиримидиновым.

Таблица 4. Фотораспад исходных нуклеозидов под действием ВУФ излучения
(время облучения 9 часов, доза — 3×10^6 Дж/м²)

Нуклеозид	% разложения	% распада гликозидной связи
Ado	15	15
Guo	32	18
dAdo	17	17
dGuo	34	21
Urd	75	27
Cyd	44	27
dThd	56	32

Абиогенный синтез нуклеотидов под действием УФ-излучения

Ультрафиолетовое излучение с длиной волны 254 нм, так называемое биологически значимое УФ излучение, также может служить источником энергии для реакций абиогенного синтеза в твердом состоянии. Нами было показано, что при облучении смеси нуклеозид + NaH_2PO_4 ртутной лампой с максимумом излучения при 254 нм идет абиогенный синтез природных фосфатов нуклеозидов, одновременно с которым протекают фотопроцессы с разложением исходного нуклеозидов и выделением свободного гетероциклического основания. Из полученных результатов следует, что, как и в случае ВУФ фотолиза, с наибольшей эффективностью разлагается гетероциклическое основание нуклеозидов, причем процесс может идти как с разрушением самого кольца, так и через образование димеров из расположенных рядом гетероциклических остатков. Менее эффективен процесс распада гликозидной связи с выделением свободного урацила. Одновременно идет абиогенный синтез нуклеозидомонофосфатов. Квантовый выход подобного процесса на два порядка меньше, чем в случае использования ВУФ излучения, тогда как процессы разложения идут практически с одинаковой интенсивностью (таблица 5).

Таблица 5. Квантовые выходы процессов распада и синтеза при облучении смеси уридин + фосфат в ВУФ (145 нм) и УФ (254 нм) области спектра

Процесс	Квантовый выход	
	ВУФ	УФ
Разложение уридина	4×10^{-3}	4×10^{-5}
Выход урацила	3×10^{-3}	2×10^{-5}
Синтез 5'UMP	1×10^{-4}	5×10^{-7}
Синтез 2'3'cUMP	6×10^{-5}	5×10^{-8}

Суммарные данные по выходу продуктов реакции абиогенного фосфорилирования под действием ультрафиолетового излучения с длиной волны 254 нм приведены в таблице 6.

Абиогенный синтез нуклеотидов под действием γ -радиации

Наряду с ультрафиолетом, было изучено воздействие γ -радиации на абиогенный синтез БЗС. Действие γ -лучей на смесь аденинового нуклеозидов с дигидрофосфатом натрия вызывало образование природных нуклеотидов. При максимальной дозе 3×10^3 Дж/г суммарный выход нуклеотидов составил 0.62% для аденозина и 0.59% для дезоксиаденозина. В отличие от экспериментов с использованием УФ излучения (254 нм) среди продуктов реакции аденозина с NaH_2PO_4 были зафиксированы такие природные нуклеотиды, как 2'3'-с-АМР (4, максимальный выход составил 0.12%), 2'-АМР (2, 0.08%) и 3'-АМР (3, 0.06%). Состав продуктов реакции более сходен с тем, что был получен при облучении пленок ВУФ светом.

**Таблица 6. Суммарные данные по выходу
продуктов реакции абиогенного фосфорилирования
нуклеозидов под действием УФ излучения с длиной
волны 254 нм
(доза облучения — 4.4×10^6 Дж/м²)**

Нуклеозид	Продукты	Выход (%)
Urd	5'UMP	0.034
	2'UMP	следы (<0.001)
	3'UMP	следы (<0.001)
	2'3'cUMP	0.003
	Ura	5.8
	Urd	73
Ado	5'AMP	0.094
	Ade	2.78
	Ado	91
dAdo	5'dAMP	0.36
	Ade	0.84
	Ado	84

Абиогенный синтез нуклеотидов в условиях открытого космоса

Особый интерес представляет эксперимент на борту космического спутника "Бион-11". В результате экспонирования сухих твердых пленок, состоящих из смеси нуклеозидов (тимидин, цитидин, аденозин и дезоксиаденозин) и неорганического фосфата (NaH_2PO_4) в условиях открытого космоса были обнаружены природные нуклеотиды, такие как 5' (1, 6, 22, 27), 2' (2, 23), и 3' (3, 7, 24, 28) монофосфаты, наряду с циклическими монофосфатами соответствующих нуклеозидов (4, 5, 8, 25, 26, 29). Основным продуктом реакций абиогенного фосфорилирования были 5'-нуклеотиды. Суммарный выход всех природных монофосфатов за время полета спутника составил для аденозина — 5.94%, для цитидина — 4.78%, для дезоксиаденозина — 2.35%, и для дезокситимидина — 2.06%. Полные данные по абиогенному синтезу нуклеотидов приведены в таблице 7.

**Таблица 7. Выходы продуктов реакции абиогенного фосфорилирования
нуклеозидов в условиях космического полета спутника "БИОН-11"**

Нуклеозид	Выход нуклеотидов (%)					Сумма
	5'	2'	3'	2'3'c	3'5'c	
Ado	3.28	0.82	0.71	1.12	0.01	5.94
dAdo	1.87	—	0.48	—	следы	2.35
Cyd	2.68	0.61	0.55	0.94	следы	4.78
dThd	1.70	—	0.36	—	следы	2.06

Выход продуктов фосфорилирования существенно зависит от типа углеводного остатка. Нуклеозиды, содержащие в своем составе рибозу, дают в два раза больше 5'-монофосфата, чем их дезоксирибозные аналоги. Например, выход 5'-аденозинмонофосфата (1) был равен 3.23%, тогда как для 5'-дезоксаденозинмонофосфата (6) он составил лишь 1.87%. Тип нуклеинового основания влиял на выход продуктов, но не так сильно. Пуриновые нуклеозиды давали несколько больший выход природных нуклеотидов, чем пиримидиновые. Так, в случае 3'-аденозинмонофосфата (3) он составил 0.71%, а в случае 3'-цитидинмонофосфата (24) — 0.55%. Наряду с 5'-, 3'-, и 2'-монофосфатами образуются и 2' 3'-циклические монофосфаты (5 и 25). Выход 2' 3'-циклоаденозинмонофосфата (5) примерно в полтора раза выше, чем выходы соответствующих 2' (2) и 3' (3) монофосфатов. Вероятнее всего, наиболее активным источником энергии в условиях космического полета было вакуумное ультрафиолетовое излучение с длинами волн менее 200 нм, которое и ответственно за реакции фотораспада исходных компонентов реакционной смеси и части вновь синтезированных нуклеотидов. Контрольный образец, остававшийся во время всего полета внутри спутника и защищенный от перепадов температуры, УФ и корпускулярного излучения, остался без каких-либо изменений. Результаты полетного эксперимента позволяют заключить, что при суммарном воздействии энергетических источников открытого космического пространства на сухие пленки, состоящие из смеси нуклеотида пуринового или пиримидинового ряда (цитидин, тимидин, аденозин, дезоксиаденозин) и неорганического дигидрофосфата натрия, происходит абиогенный синтез природных мононуклеотидов. Причем, хотя и получается весь набор монофосфатов, встречающихся в живых организмах, фосфорилирование идет преимущественно с образованием 5'-производных, как и в лабораторных экспериментах.

Абиогенный синтез дипептидов

Для изучения влияния источников энергии открытого космоса на абиогенный синтез БЗС нами были исследованы реакции олигомеризации аминокислот в твердом состоянии под действием ВУФ излучения, γ -радиации и потоков заряженных частиц — основных энергетических компонентов космического пространства.

Абиогенный синтез дипептидов под действием ВУФ

Были исследованы фотохимические превращения аминокислот в тонких слоях-пленках под действием ВУФ излучения. В данной области спектра поглощают не только три аминокислоты, которые имеют в своем составе ароматические группы, но и остальные 17 аминокислот, входящие в состав всех живых организмов на Земле. Сама пептидная связь также поглощает в этой области спектра. Нами был проведен абиогенный синтез дипептидов, содержащих алифатическую и ароматическую аминокислоты, из смеси отдельных аминокислот в твердом состоянии. Исследовались смеси глицина или аланина (алифатические аминокислоты) с триптофаном или тирозином (ароматические аминокислоты). В результате были получены различные дипептиды. Данные по выходам продуктов реакции абиогенного синтеза

дидипептидов при максимальном времени облучения (9 часов, 3×10^6 Дж/м²) приведены в таблице 8.

Таблица 8. Выходы реакции абиогенного синтеза дипептидов из смеси отдельных аминокислот под действием ВУФ излучения (время облучения 9 часов, доза — 3×10^6 Дж/м²)

Исследуемая смесь	Продукты	Выходы (%)
Gly + Trp	Gly-Trp	0.39
	Trp-Gly	0.37
	Trp-Trp	0.48
Gly + Tyr	Gly-Tyr	0.36
	Tyr-Gly	0.37
	Tyr-Tyr	0.52
Ala + Trp	Ala-Trp	0.45
	Trp-Ala	0.45
	Trp-Trp	0.51
Trp	Trp-Trp	1.87
Tyr	Tyr-Tyr	1.92

На примере синтеза глицил-триптофана и глицил-тирозина была изучена зависимость выхода продуктов реакции от дозы ВУФ-излучения.

Показано, что с увеличением дозы облучения, количество вновь образующихся молекул возрастает и постепенно кинетическая кривая выходит на плато с выходом продуктов около 0.4% (рисунк 2).

Замена глицина на другую алифатическую аминокислоту (аланин) не оказывает существенного влияния на ход процесса и выходы продуктов. Облучение плёнок, приготовленных из отдельных ароматических аминокислот (триптофана или тирозина) также приводило к синтезу соответствующих дипептидов. Суммарный выход дипептидов приближался к 2%.

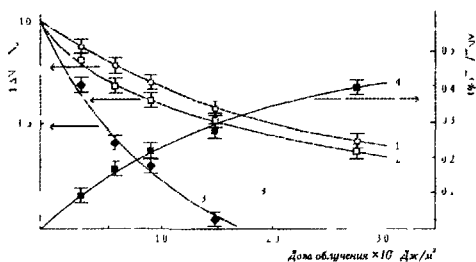


Рисунок 2 Зависимость выходов продуктов реакции абиогенного синтеза и фотолитиза в смеси глицин + триптофан от дозы ВУФ-излучения (1 - распад Gly-Trp ($\lambda_{\text{св}}$, 175 нм), 2 - распад Trp ($\lambda_{\text{св}}$, 145 нм), 3 - распад Gly-Trp ($\lambda_{\text{св}}$, 145 нм), 4 - фотосинтез Gly-Trp ($\lambda_{\text{св}}$, 145 нм))

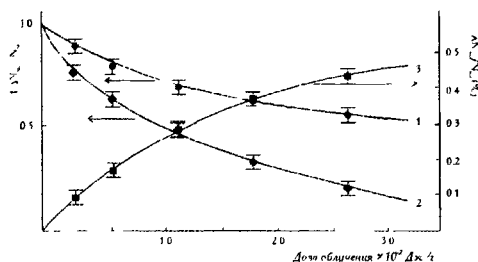


Рисунок 3 Зависимость выходов продуктов реакции абиеогенного синтеза и радиолита в смеси глицин + триптофан от дозы γ -излучения (1 — распад Gly-Trp, 2 — распад Trp, 3 — синтез Gly-Trp)

При использовании смеси аминокислот все обнаруженные дипептиды образуются примерно с одинаковыми выходами, что может свидетельствовать в пользу свободно-радикального механизма реакции и равновероятном образовании радикалов, вступающих в последующие реакции полимеризации. Существование подобных радикалов было установлено ранее при помощи ЭПР.

Наряду с процессами абиеогенного синтеза дипептидов нами были изучены реакции распада как исходных соединений, так и продуктов. Подобные процессы всегда необходимо учитывать при рассмотрении любых результатов по абиеогенному синтезу. Из полученных данных можно видеть, что распад под действием ВУФ Gly-Trp (30) происходит с большей интенсивностью по сравнению с триптофаном, тогда как для тирозина и его дипептида наблюдается обратная ситуация — фотолиз свободной аминокислоты идет с большей эффективностью по сравнению с дипептидом (Тут-Тут, 35). Одной из причин может являться отсутствие сопряженных ароматических колец в молекуле глицил-триптофана (30), которые могли бы способствовать более эффективной делокализации электронной плотности, как это происходит в случае тирозил-тирозина (35).

Абиеогенный синтез дипептидов под действием γ -радиации

Для сравнения воздействия двух видов излучения нами были проведены исследования по влиянию γ -облучения на смеси аминокислот. Также, как и при ВУФ облучении, в пленках глицин + триптофан был зафиксирован синтез дипептидов. Зависимость абиеогенного синтеза глицил-триптофана (30) в интервале доз от 0 до 3×10^3 Дж/г приведена на рисунке 3. Облучение в этом интервале приводит к увеличению количества образовавшихся молекул до 0,4%. Дальнейшее облучение приводило к деградации синтезированного дипептида из-за конкурирующих процессов распада.

Абиеогенный синтез дипептидов под действием протонов

Наряду с ВУФ и γ -радиацией нами было исследовано влияние потоков заряженных частиц на абиеогенный синтез дипептидов в твердом состоянии. Пленки, состоящие из аминокислот, подвергались воздействию протонов с энергией от 1,8 до 6,6 МэВ. Поглощенная доза составила от 2×10^9 до 5×10^{11} протонов/см². После облучения пленок, содержащих отдельные аминокислоты, тирозин или триптофан, были обнаружены соответствующие дипептиды. Выход дипептидов составил 2,43% для Trp-Trp (32) и 2,38% для Тут-Тут (35) при энергии протонов равной 6,6 МэВ и

максимальной дозе 5×10^{11} протонов/см². В случае смеси, состоящей из алифатической и ароматической аминокислот (тирозин + глицин), количество продуктов реакции абиогенного синтеза ненамного отличалось от экспериментов с отдельными аминокислотами. Выходы дипептидов Gly-Tyr (33), Tyr-Gly (34) и Tyr-Tyr (35) были примерно одинаковы и составили 0.71, 0.67 и 0.67%, соответственно. Полные данные по выходам дипептидов в зависимости от поглощенной дозы протонов приведены в таблице 9.

Таблица 9. Выходы продуктов реакции абиогенного синтеза дипептидов из смеси отдельных аминокислот под действием потока протонов с энергией 6.6 МэВ

Исходные компоненты	Продукты реакции	Выход, %, при дозах протонов/см ² , равных		
		2×10^9	8×10^9	500×10^9
Tyr	Tyr-Tyr	0.47	0.98	2.43
Tyr	Tyr-Tyr	0.54	1.08	2.38
Tyr+Gly	Gly-Tyr	0.09	0.31	0.71
	Tyr-Gly	0.10	0.31	0.67
	Tyr-Tyr	0.16	0.33	0.62

Уменьшение энергии протонов, падающих на образец, ведет к увеличению выхода продуктов реакции абиогенного синтеза дипептидов. Таким образом, с уменьшением энергии протонов больше энергии передается среде и используется для химических превращений. Данные, приведенные в таблице 9, показывают, что процесс абиогенного синтеза под действием протонов мало зависит от вида боковой цепи аминокислот.

Основную роль в подобных реакциях могут играть сверхвозбужденные состояния молекул, которое образуются под действием пучка заряженных частиц. Скорее всего, в реакциях полимеризации участвуют радикалы, образующиеся как от воздействия самих заряженных частиц, так и от воздействия вторичных электронов, образующихся при взаимодействии протонов с подложкой.

В четвертой главе проведено итоговое обсуждение полученных результатов и рассмотрена их связь с химической космической эволюцией.

Для подтверждения гипотезы о том, что процессы химической эволюции могут протекать в условиях открытого космического пространства на поверхности малых тел Солнечной системы, таких как кометы, астероиды, микрометеориты, частицы межзвездной и межпланетной пыли, были осуществлены эксперименты по абиогенному синтезу нуклеотидов в условиях открытого космического пространства и по изучению воздействия отдельных факторов космической среды (ВУФ и УФ излучение, потоки заряженных частиц, γ -радиация) в лабораторных условиях на

синтез нуклеотидов и олигопептидов. В качестве модели поверхности различных космических объектов рассматривалась внешняя поверхность биологического спутника "БИОН-11" с размещенными на ней сухими пленками, полученными из смеси более простых биомолекул. В эксперименте на борту спутника был получен весь спектр нуклеотидов, которые являются исходными соединениями для синтеза молекул РНК и ДНК, основных компонентов живой материи. Среди продуктов реакции были обнаружены 5'-, 2'- и 3'-нуклеотиды, наряду с циклическими фосфатами как пиримидиновых, так и пуриновых нуклеозидов. Суммарный выход нуклеотидов составил от 2 до 6% в зависимости от типа основания и углеводного остатка. Несмотря на небольшой по меркам обычной органической химии выход, принципиальная возможность самого процесса абиогенного синтеза крайне важна с точки зрения как физических условий протекания подобных реакций, так и временных рамок процесса.

В наземных экспериментах были исследованы такие виды излучений, как ВУФ (145 нм), УФ (254 нм), гамма-радиация. Во всех случаях были получены природные нуклеотиды, в основном 5'-монофосфаты. Интересно отметить, что выходы 2' 3'-сNMP почти в два раза превосходят выходы 2'- и 3'-монофосфатов.

Из наших экспериментов можно сделать вывод о том, что абиогенное возникновение нуклеотидов протекает достаточно легко даже в твердом состоянии. Если нуклеозид попадает в среду, содержащую свободный неорганический фосфат, то при наличии какого-либо источника энергии идут реакции фосфорилирования.

Таблица 10. Абиогенный синтез 5'-аденозинмонофосфата под действием различных источников энергии.

Источник энергии	доза	выход (%)
УФ (254 нм)	4.4×10^8 Дж/м ²	0.09
ВУФ (145 нм)	3.8×10^6 Дж/м ²	0.39
γ (¹³⁷ Cs)	3×10^3 Дж/г	0.41
тепло (160 °C, 3 часа)		1.63
космический полет		3.23

Если говорить о количественном сравнении трех исследованных источников энергии, то надо отметить, что оно несколько затруднено из-за различий в исходном состоянии реакционной смеси (сухие плёнки в экспериментах с ВУФ и УФ излучением и лиофилизированная смесь при изучении действия γ -радиации). Тем не менее, можно отметить, что наиболее активным источником энергии в данных условиях является гамма-излучение, затем следует ВУФ и УФ свет. Некоторые суммарные результаты по синтезу 5'-аденозинмонофосфата можно видеть в таблице 10.

Наряду с реакциями абиогенного фосфорилирования нуклеозидов нами было исследовано поведение других БЗС, а именно, олигомеризация аминокислот в виде

сухих пленок под действием различных источников энергии. Была показана возможность абиогенного синтеза дипептидов из смеси отдельных аминокислот в твердом состоянии под действием отдельных компонентов энергетического спектра космического пространства. Органические молекулы, находящиеся в межзвездной среде и на поверхности малых тел испытывают на себе воздействие всего спектра источников энергии, от ультрафиолетовых лучей до потоков заряженных частиц в течение достаточно большого промежутка времени — до нескольких миллионов лет. Процессы полимеризации аминокислот наблюдались независимо как от используемых аминокислот (глицин, аланин, триптофан, тирозин), так и от применявшихся источников энергии (ВУФ, γ -радиация, потоки протонов). Суммарные выходы продуктов димеризации достигали 2%, причем все возможные дипептиды получались примерно в одинаковом количестве.

Таким образом показано, что начальные стадии химической эволюции, вплоть до полимеризации, вполне могли протекать на ранних стадиях эволюции нашей Солнечной системы. Вероятно, подобные процессы происходят в условиях открытого космоса и в настоящее время.

Выводы

1. Впервые показано, что под действием вакуумного ультрафиолетового излучения идет твердофазный абиогенный синтез нуклеотидов в смеси нуклеозида и фосфата.

2. Установлено, что аналогичные процессы твердофазного абиогенного синтеза нуклеотидов протекают и под действием других источников энергии, таких как ультрафиолетовое излучение с длиной волны 254 нм и гамма-радиация.

3. Впервые показано, что вторая стадия химической эволюции — полимеризация аминокислот — может протекать в условиях открытого космического пространства под действием вакуумного ультрафиолетового излучения и гамма-радиации. Воздействие этих источников энергии на твердую смесь аминокислот приводит к образованию дипептидов.

4. Впервые установлено, что твердофазный абиогенный синтез дипептидов идет под действием потоков заряженных частиц (протонов).

5. Впервые показано, что комбинированное воздействие всех источников энергии открытого космического пространства, осуществленное в условиях полёта орбитального спутника “Бιον-11”, приводит к твердофазному абиогенному синтезу пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Кузичева Е.А., Жукова В.Ф., Симаков М.Б. Роль УФ- и гамма-радиации в абиогенном синтезе нуклеотидов в твердом состоянии // *Ж. эвол. биох. и физиол.*, 1993, т.29 №4 с 339-344.
2. Додонова Н.Я., Цыганенко Н.М., Кузичева Е.А., Симаков М.Б. Абиогенный синтез уридиновых нуклеотидов под действием вакуумного ультрафиолетового излучения. // *Биофизика*, 1994, т.39 №1 с.26-31.
3. Кузичева Е.А., Додонова Н.Я., Малько И.А., Петров М.Ю., Симаков М.Б. Спектры поглощения и фотопроцессы в триптофане и его дипептиде с глицином в вакуумной ультрафиолетовой области спектра. // *Оптика и спектроскопия*, 1994, т.77 №4 с.584-589
4. Simakov M.B., Kuzicheva E.A., Malko I.L. and Dodonova N.Ya. Abiogenic synthesis of oligopeptides in solid state under action of vacuum ultraviolet light (100-200 nm) // *Adv Space Res*, 1996, v.18, No12, p.61-64.
5. Kuzicheva E.A., Simakov M.B., Malko I.L., Dodonova N.Ya. and Gontareva N.B. Role of vacuum ultraviolet (VUV) radiation in abiogenic synthesis of adenine nucleotides. // *Adv Space Res*, 1996, v.18, No12, p.65-68
6. Кузичева Е.А., Симаков М.Б., Малько И.А. Вклад вакуумного ультрафиолетового излучения в абиогенный синтез пиримидиновых нуклеотидов. // *Ж. эвол. биох. и физиол.*, 1997, т.33 №2 с.129-134.
7. Simakov M.B., Kuzicheva E.A., and Malko I.L. Abiogenic synthesis of pyrimidine nucleotides in solid state by vacuum ultraviolet radiation // *Adv Space Res*, 1997, v.19, No7, p.1059-1062.
8. Simakov M.B., Kuzicheva E.A., Dodonova N.Ya., and Antropov A.E. Formation of oligopeptides on surface of small bodies in solar system by cosmic radiation // *Adv.Space Res.*, 1997, v.19, No7, p.1063-1066.
9. Kuzicheva E.A. and Simakov M.B. Abiogenic synthesis of nucleotides in conditions of space flight of the biosputnik "BION-11" // *Adv.Space Res.*, 1999, v.23, No2, p.387-391.
10. Simakov M.B. and Kuzicheva E.A. Two possible steps of the chemical evolution on surface of small bodies in the Solar system. In: *First Steps in the Origin of Life in the Universe*. (Chela-Flores et al., eds.), 2001, p.167-170.
11. Simakov M.B. and Kuzicheva E.A. The possibility of abiogenic synthesis of complex biochemical compounds on surface of dust particles. In: *Dust in the Solar System and other Planetary Systems* (Green et al., eds.), 2002 p.396-399

Подписано в печать 10 2005 Формат бумаги 60х84 1/16
Бумага офсетная Печать ризографическая Уст печ л 1,0
Тираж 100 экз. Заказ 3683
Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр 26

№ 23437

РНБ Русский фонд

2006-4

25861