

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.32

МЕХАНИЗМ ТЕРМИЧЕСКОГО РАЗРУШЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**А.В. Филипский***Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, г. Харьков, 61085, ул. Акад. Проскуры, 12,*

Поступила в редакцию 24 апреля 2009 г.

Принята 20 мая 2009 г.

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии проведено исследование термической устойчивости гомополинуклеотидов (polyA, polyG, polyC, polyU) и природной ДНК, а также их составных компонентов: нуклеозида (уридин), нуклеотидов (УМФ, УДФ, УТФ) и сахара (D-рибоза). Получены зависимости теплового потока от температуры в интервале температур от 20 до 400⁰С, на которых проявились индивидуальные особенности исследуемых веществ. При температуре выше 200⁰С для всех образцов обнаружены экзотермические пики, которые связаны с необратимыми процессами термической деструкции. Определены температуры термического разрушения и значения эффективной теплоты наблюдаемых экзотермических процессов. Экспериментальные результаты свидетельствуют о существенном различии термической устойчивости первичной структуры различных гомополинуклеотидов и ДНК, среди которых наиболее устойчивой структурой является polyG, а наименее устойчивой - ДНК. Калориметрический анализ структурных компонентов полинуклеотидов показал, что экзотермический характер деструкции нуклеиновых кислот определяется процессом разрушения D-рибозы. На основе полученных нами результатов термического анализа нуклеиновых кислот и литературных данных предложен механизм термического разрушения полинуклеотидов в твердом состоянии. Первичным процессом при деструкции образцов является разрыв гликозидной связи с возможным переносом атома водорода с рибозного кольца к азотистому основанию. Это, в свою очередь, приводит к тому, что связь С-О между фосфорным остатком и рибозой становится нестабильной и происходит ее разрыв, что и приводит к разрушению цепи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *ДНК, полинуклеотиды, термодеструкция, калориметрия.*

Известно, что нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) играют исключительно важную роль в живых организмах, связанную с хранением и передачей информации, которая определяется их первичной структурой. Очевидно, что целостность и устойчивость этих структур является необходимыми условиями для их естественного функционирования. В то же время генетический материал клеток часто подвергается различным внешним воздействиям способным приводить к нарушениям исходной первичной структуры.

Одним из факторов, которые могут вызывать изменения генетического материала, является температура. Так, в результате нагрева могут возникать мутации, причем организмы с отличающимся нуклеотидным составом молекул ДНК и РНК подвержены влиянию температуры в различной степени [1, 2]. Влияние нагрева как мутагенного фактора представляет интерес и для понимания эволюции, в ходе которой действие температуры, скорее всего, оказывало большее влияние, чем обычные ошибки при репликации ДНК [3]. В связи с этим большое значение представляют определение малоизученных к настоящему времени устойчивости первичной структуры полинуклеотидов к действию температуры и механизма процесса их термического разрушения.

С этой целью нами были проведены калориметрические исследования природной ДНК, гомополинуклеотидов различного типа, а также их структурных компонентов. На основании полученных нами результатов и литературных данных предложен возможный механизм термического разрушения нуклеиновых кислот.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Калориметрические исследования проводили с помощью дифференциального сканирующего микрокалориметра DSC-101 фирмы "Сетарам" (Франция) в двух одинаковых кюветках, одна из которых служила кюветкой сравнения. Масса исследуемых образцов составляла 3-8 мг. Измерения проводили при скорости сканирования 1, 5 и 10⁰С/мин. Калибровку прибора осуществляли с помощью стандартных образцов индия, олова и дифенила, имеющих различные температуры плавления и энергии переходов.

В работе исследовались препараты фирмы "Serva": натриевая соль тимусной ДНК, гомополинуклеотиды (polyA, polyG, polyC, polyU), нуклеозид моно-, ди- и трифосфаты (содержащие основание уридин) и D-рибоза. Опыты проводили с образцами в твердом состоянии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведены калориметрические исследования тимусной ДНК и четырех типов гомополинуклеотидов в интервале температур от 20 до 300⁰С. Для всех исследуемых образцов (рис.1) обнаружены необратимые экзотермические переходы в интервале температур от 210 до 290⁰С [4]. Термогравиметрические исследования ДНК [5] показали, что при нагреве до 250⁰С происходит потеря массы образца более чем на 20%, что согласно классическому определению термической устойчивости полимеров свидетельствует о разрушении полимера [6].

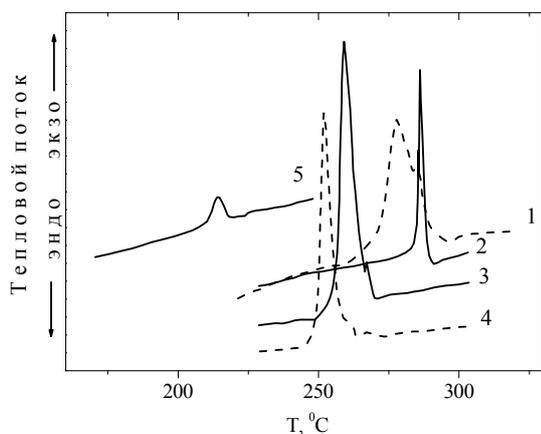


Рис. 1 Термограммы полинуклеотидов. Скорость нагрева 1⁰С/мин. 1-polyU, 2-polyG, 3-polyC, 4-polyA, 5-Na-ДНК.

различным нуклеотидным составом. В табл.1 приведены температуры максимумов экзопиков, а также значения эффективных тепловых эффектов, $\Delta H_{эфф}$.

Из табл.1 видно, что температуры максимумов экзопиков и их тепловой эффект по разному зависят от нуклеотидного состава. Поскольку, как было сказано выше, в величину $\Delta H_{эфф}$ вносят вклад различные процессы, более корректно проводить оценку термической устойчивости полинуклеотидов по температуре наблюдаемого экзопика. Таким образом, наиболее термоустойчивой структурой согласно нашим результатам является polyG, а наименее - ДНК.

Для того, чтобы определить возможный механизм термического разрушения полинуклеотидов были исследованы структурные компоненты нуклеиновых кислот: нуклеотиды, нуклеозиды и рибоза.

Известно, что разрушение связей должно сопровождаться затратой энергии, однако в нашем случае процессы носят ярко выраженный экзотермический характер. Поскольку исследуемые полимеры имеют сложную структуру, можно предположить, что их разрушение включает различные процессы, которые могут быть как эндотермическими, так и экзотермическими. Следовательно, результирующий тепловой эффект будет зависеть от вклада каждого из них.

Одним из наиболее важных полученных результатов является существенное отличие температур обнаруженных экзотермических процессов разрушения для полимеров с

Табл.1 Эффективные значения энергетических параметров процесса термического разрушения полинуклеотидов.

Образец / Параметр	polyA	polyG	polyC	polyU	ДНК
$T_{\text{макс разр.}}$, °C	246	285	255	276	215
$\Delta H_{\text{эфф}}$, кДж/моль	160	56	229	231	23

Наиболее важным результатом этой части исследований является присутствие на термограммах экзопика с близкими значениями температур как для полиуридина и уридина с различным содержанием фосфатных термограмм групп (рис.2), так и для рибозы (рис.3).

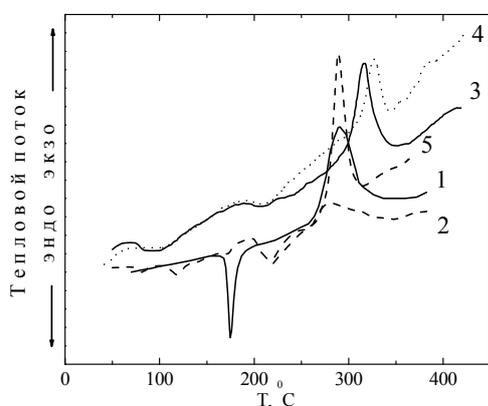
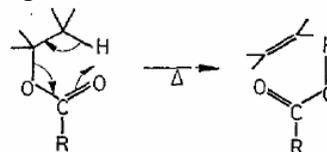


Рис. 2 Термограммы polyU и уридина с различным содержанием фосфатных групп. 1-уридин; 2-УМФ; 3-УДФ; 4-УТФ; 5-полиуридин. Скорость нагрева 5 °C/мин.

Поскольку рибоза является структурным элементом всех исследованных уридинов, то этот результат указывает на то, что основной вклад в экзотермический эффект их разрушения вносят изменения, происходящие с рибозой при нагревании. При термическом разрушении большинства полисахаров и их мономеров образуется фуран и его производные [7, 8]. Механизм образования этих соединений, содержащих двойные связи, скорее всего, связан с протеканием реакций по типу Чугаева, общая схема которой выглядит следующим образом:



Для определения возможной последовательности реакций при разрушении полинуклеотидов нами были использованы литературные данные по термическому анализу нуклеиновых кислот. Наиболее интересные для наших исследований данные были получены методом пиролитической масс-спектрометрии, где условия нагрева образца часто аналогичны методу ДСК. Этот метод широко применяется для определения нуклеотидного состава, а также наличия модифицированных нуклеотидных остатков в полимере [9-11].

На типичных пиролитических масс-спектрах для олигонуклеотидов и природных нуклеиновых кислот основные пики соответствуют ионам фрагментов исходных молекул: фосфорных остатков, азотистых оснований, воды и производных фурана, что указывает на достаточно глубокие изменения начальной структуры полимера. При этом интенсивность пиков, соответствующих ионам азотистых оснований, как правило, наибольшая.

Наиболее важным для нас результатом этих исследований является то, что максимальный выход ионов азотистых оснований при контролируемом нагреве наблюдается в интервале температур 150 – 250 °C, причем для различных типов ионов соответствующие температуры различаются.

При исследовании методом масс-спектрометрии кинетических параметров диссоциации олигонуклеотидов авторами было получено, что при температуре выше 200 °C фрагменты олигонуклеотидов появляются только в результате отрыва

нейтрального азотистого основания с последующим разрывом фосфорноэфирной связи [12, 13, 14].

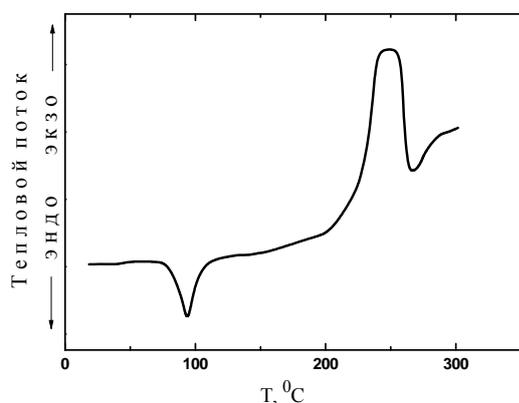


Рис. 3 Термограммы для D-рибозы.
Скорость нагрева 1 °C/мин.

При исследовании нуклеозидов методами ДСК и хроматографии П. Г. Олавоном и соавторами также были обнаружены экзотермические пики в области температур 200 – 300°C, связанные с разрывом гликозидной связи [15, 16]. Авторами показано, что отрыв пуриновых оснований происходит при более низкой температуре, чем пиримидиновых. Полученная нами наибольшая термическая стабильность для polyG может указывать на кооперативный характер разрушения гомополинуклеотидов. Этим, возможно, объясняется и наименьшая температура разрушения ДНК.

На основании этих результатов общая схема разрушения нуклеиновых кислот может выглядеть следующим образом:

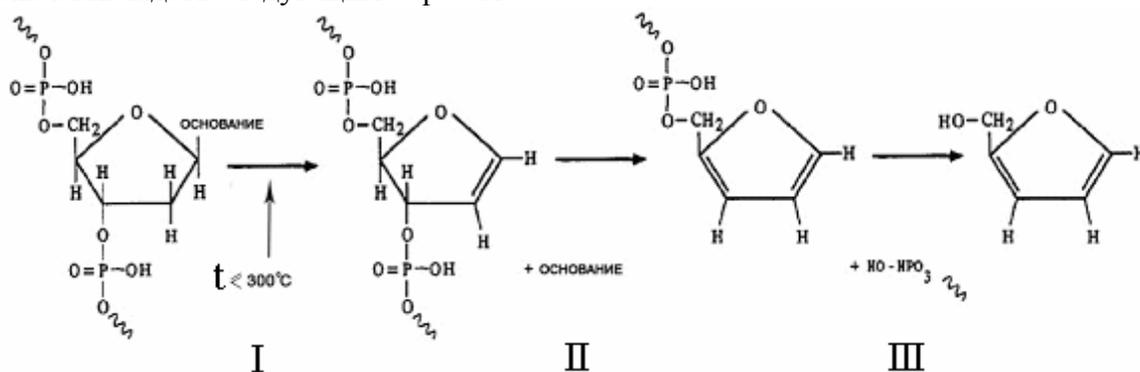


схема 1

Первичным процессом при нагревании образцов является разрыв гликозидной связи (схема 1-I). Согласно полученным значениям эффективной энергии активации механизм реакции гетеролитический, и, возможно, происходит с образованием промежуточного цикла между гидроксильной группой фосфорного остатка и водородом при 2'-С атоме рибозы. Данный процесс, очевидно, является эндотермическим. Поскольку результаты масс-спектрометрии указывают на образование ионов азотистого основания с дополнительным атомом водорода, то процесс разрыва гликозидной связи должен происходить с переносом атома водорода. Данный атом может быть перенесен с ближайшего к месту разрыва атома углерода с образованием двойной связи. Этот процесс, скорее всего, сопровождается экзотермическим эффектом. Отрыв азотистого основания и последующая перегруппировка атомов приводит к тому, что связь 3'-С–О становится нестабильной, и происходит ее разрыв с образованием еще одной двойной связи в рибозном кольце (схема 1-II). Этот процесс также является экзотермическим. Далее происходит отрыв второго фосфорного остатка с образованием производных фурана и его фрагментов (схема 1-III). Согласно предложенной схеме общий тепловой эффект процесса разрушения определяется преобладающим вкладом экзотермических реакций, участвующих в образовании двойных связей в рибозе.

Предложенная схема механизма, скорее всего не является единственно возможной и будет зависеть от условий, при которых происходит процесс. Механизм термического

разрушения рибонуклеиновых кислот также может отличаться, что связано с наличием гидроксильной 2'-ОН группы.

Итак, на основании проведенных нами калориметрических исследований, а также обзора литературы предложен механизм термического разрушения нуклеиновых кислот, который позволяет объяснить различия термической устойчивости полинуклеотидов в зависимости от типа азотистого основания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marguet E., Forterre P. DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles. // Nucl. Acid Res. 1994. V. 22. P. 1681-1686.
2. Lindhal T. Instability and decay of the primary structure of DNA. // Nature. 1993. V. 362. P. 709-715.
3. Sidney W. F., Doxe K. // Molecular Evolution and the Origin of Life, Revised ed. 1977.
4. Гасан А.И., Малеев В.Я., Филиппский А.В. Исследование термической устойчивости первичной структуры нуклеиновых кислот. // Вісник ХДУ, №568, Біофізичний Вісник. 2002. вип. 2. P. 20 – 24.
5. Kyoung J. P., Won J. Characterization of DNA/Poly (ethylene imine) Electrolyte Membranes. // Macromolecular Research. 2007. V. 15. №. 6. P. 581-586.
6. Коршак В. В. // Термостойкие полимеры. 1969. М. Наука. 408 с.
7. Ohnishi A., Kato K., Takagi E. Curie-Point Pyrolysis of Cellulose. // Polymer Journal. 1975. V. 4. P. 431-437.
8. Yaylayan V. A. Precursors, Formation and Determination of Furan in Food. // Journal OF Consumer Protection and Food Safety. 2005. V. 1. P. 5-9.
9. Gross M. L., Lyon P. A., Dasgupta A., Gupta N. K. Mass spectral studies of probe pyrolysis products of intact oligoribonucleotides. // Nucleic Acids Res. 1978. V. 5. № 8. P. 2695-2704.
10. Yang J. Håkansson K. Fragmentation of Oligoribonucleotides from Gas-Phase Ion-Electron Reactions. // J Am Soc Mass Spectrom. 2006. V. 17. P. 1369–1375.
11. Puzo G., Wiebers J.L. Identification of modified nucleosides in intact transfer ribonucleic acid by pyrolysis-electron impact-collisional activation mass spectrometry// Nucleic Acids Research. 1981. V. 9. P. 4655–4667.
12. Wan K. X., Gross M. L. Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences. // J Am Soc Mass Spectrom. 2001. V. 12. P. 580–589.
13. Strittmatter E. F., Schnier P. D., Klassen J. S., Williams E. R. Dissociation energies of deoxyribose nucleotide dimer anions measured using blackbody infrared radiative dissociation. // J Am Soc Mass Spectrom. 1999. V. 10. P. 1095–1104.
14. Klassen J. S., Schnier P. D., Williams E. R. Blackbody Infrared Radiative Dissociation of Oligonucleotide Anions// J Am Soc Mass Spectrom. 1998. V. 9. P. 1117–1124.
15. Olafsson P. G., Bryan A. M., Lau K. A DSC-TLC analysis of thermolysis reactions involving 2'-deoxynucleosides. // J. of Thermal Analysis. 1977. V. 11. P. 377—385.
16. Olafsson P. G., Bryan A. M. Thermal analysis of 5-halo-2'-deoxynucleosides. // Journal of Thermal Analysis. 1977. V. 11. P. 359—376.