

УДК 541.64:539.199

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ УКЛАДКИ МОЛЕКУЛ ДНК,
ОБРАЗУЮЩИХ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ МИКРОФАЗЫ,
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ**

Салянов В. И., Евдокимов Ю. М.

Изучены спектры кругового дихроизма ЖК-микрофаз, сформированных как из свободных, так и из связанных в комплекс с антраціклиновыми антибиотиками молекул ДНК в растворах разной кислотности при разных температурах. Появление интенсивных полос кругового дихроизма в области поглощения азотистых оснований (хромофоров) ДНК ($\lambda \sim 270$ нм) и хромофоров антибиотика ($\lambda \sim 500$ нм) и синхронное изменение амплитуд обеих полос при изменении внешних условий (pH, T), указывает на наличие спиральной закрутки ЖК-микрофаз ДНК, направление которой определяется в момент формирования микрофаз. Смена направления спиральной закрутки микрофазы происходит при изменении энергии взаимодействия между молекулами ДНК в результате связывания антибиотика или увеличения температуры раствора.

В результате конденсации молекул ДНК низкой ММ образуются ЖК-микрофазы, рассеивающие УФ-излучение [1]. Формирование таких микрофаз сопровождается появлением малоуглового рефлекса на рентгенограммах, что свидетельствует о ближнем порядке в расположении молекул ДНК и высокой оптической активности, проявляемой, в частности, в виде интенсивности полосы в спектре кругового дихроизма (КД) при $\lambda \sim 270$ нм. Тот факт, что полоса в спектре КД расположена в области поглощения азотистых оснований (хромофоров) ДНК ($\lambda \sim 260$ нм), делает неоднозначным высказанное в работе [2] предположение, согласно которому интенсивная полоса в спектре КД является полосой «селективного отражения», связанной с шагом спиральной структуры микрофазы ДНК.

Один из подходов к изучению особенностей структурной организации лиотропных жидких кристаллов ДНК основан на изучении спектров КД жидкокристаллических микрофаз комплексов ДНК с красителями, имеющими полосы поглощения, удаленные от полосы поглощения ДНК [3]. Согласно теоретическим расчетам [4], появление интенсивных полос в области поглощения молекул красителя, определенным образом ориентированных на молекуле ДНК, дает информацию о спиральной закрутке ЖК-микрофазы ДНК.

В настоящей работе сопоставлены спектры кругового дихроизма ЖК-микрофаз свободной ДНК со спектрами ЖК-микрофаз комплексов ДНК с окрашенными антибиотиками в таких условиях, при которых взаимодействие между молекулами, участвующими в образовании ЖК-микрофазы, может меняться.

Использовали препарат ДНК спермы лосося с $M = (5-7) \cdot 10^5$. Антибиотики — дауномицин, карминомицин, а также препарат ПЭГ («Loba Chemie», Австрия) с $M = 4000$ использовали без дополнительной очистки. Концентрацию ДНК и антибиотиков определяли по оптической плотности их растворов, пользуясь известными значениями коэффициентов экстинкции. Параметры связывания антибиотиков с ДНК в водно-солевых ПЭГ-содержащих растворах были определены ранее [5]. ЖК-микрофазы ДНК формировали по стандартной методике [1]. ЖК-микрофазы комплексов (ДНК — антибиотик) формировали по схеме [5]

ДНК (0,3 NaCl) + антибиотик \rightarrow комплекс (ДНК — антибиотик)
(в 0,3 м. NaCl),

комплекс (ДНК — антибиотик) + ПЭГ (0,3 м NaCl) $\xrightarrow{\text{смешение}}$ ЖК-микрофаза
комплекса (ДНК — антибиотик)

(в ПЭГ-содержащем растворе).

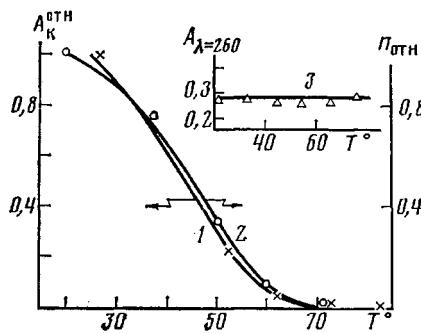


Рис. 1

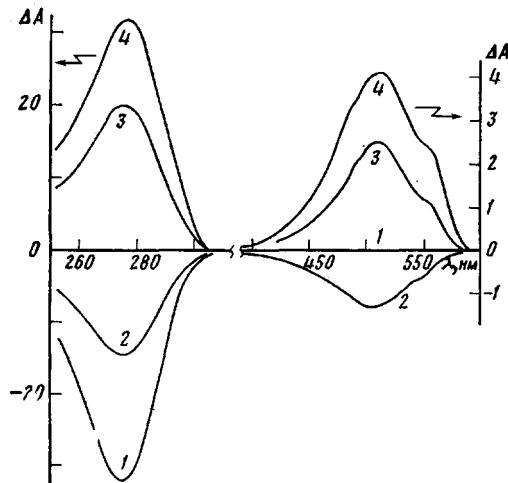


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость кажущейся оптической плотности ЖК-микрофаз ДНК ($A_k^{\text{отн}} = \frac{A_{k,20^\circ} - A_{k,t}}{A_{k,20^\circ} - A_{k,80^\circ}}$, $\lambda = 340 \text{ нм}$) (1), а также показателя преломления водно-солевого раствора ПЭГ ($n_{\text{отн}} = \frac{n_{20^\circ} - n_t}{n_{20^\circ} - n_{80^\circ}}$) (2) от температуры ([ПЭГ] = 170 мг/мл), температурная зависимость оптической плотности ЖК-микрофаз ДНК за вычетом вклада $A_k([\text{ПЭГ}] = 170 \text{ мг/мл})$ (3)

Рис. 2. Спектры КД жидкокристаллических микрофаз комплексов ДНК – дауномицина при $r = 0$ (1), 0,082 (2), 0,141 (3) и 0,198 (4). [ПЭГ] = 170 мг/мл; 20°

Титрование ЖК-микрофаз ДНК, а также комплексов ДНК – антибиотик проводили, добавляя кислоту (0,5 м. НCl) или щелочь (0,5 м. NaOH) в измерительную кювету. Разбавление раствора в кювете не учитывали, поскольку общее изменение объема не превышало 1%. Величину pH определяли при помощи рН-метра «рН-М-64». Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра «Specord M-40» (ГДР); спектры КД – при помощи дихромографа «Jobin – Yvon, Mark III» (Франция). Для получения спектров поглощения или КД при разных температурах кювету с раствором нагревали в кюветном отделении спектрофотометра или дихромографа; термопару хромель-капель помещали в исследуемый раствор.

Влияние температуры на спектры КД ЖК-микрофаз комплексов (ДНК – антибиотик). Образование ЖК-микрофаз ДНК сопровождается уменьшением амплитуды полосы поглощения ($\lambda \sim 260 \text{ нм}$), смещением ее максимума в длинноволновую область спектра и появлением «поглощения» при длинах волн, превышающих 320 нм («кажущаяся» оптическая плотность A_k [1]). Увеличение температуры раствора, содержащего ПЭГ, в котором сформированы ЖК-микрофазы ДНК, приводит к уменьшению величины A_k (рис. 1); при $\sim 80^\circ$ кажущаяся оптическая плотность практически отсутствует. Оптическая плотность ($\lambda \approx 260 \text{ нм}$) раствора, в котором сформированы микрофазы ДНК, будучи ниже оптической плотности исходного водно-солевого раствора ДНК, не меняется при увеличении температуры (рис. 1, кривая 3). Изменение показателя преломления водно-солевого раствора ПЭГ при увеличении температуры (рис. 1) коррелирует с изменением величины A_k .

Образование ЖК-микрофаз комплексов (ДНК – дауномицин) (рис. 2) сопровождается появлением интенсивных полос в спектре КД – одна из них расположена в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda_1 \sim \sim 270 \text{ нм}$), другая – в области поглощения дауномицина ($\lambda_2 \sim 505 \text{ нм}$). Увеличение степени заполнения ДНК дауномицином (увеличение r) и последующее формирование микрофаз из таких комплексов приводит к

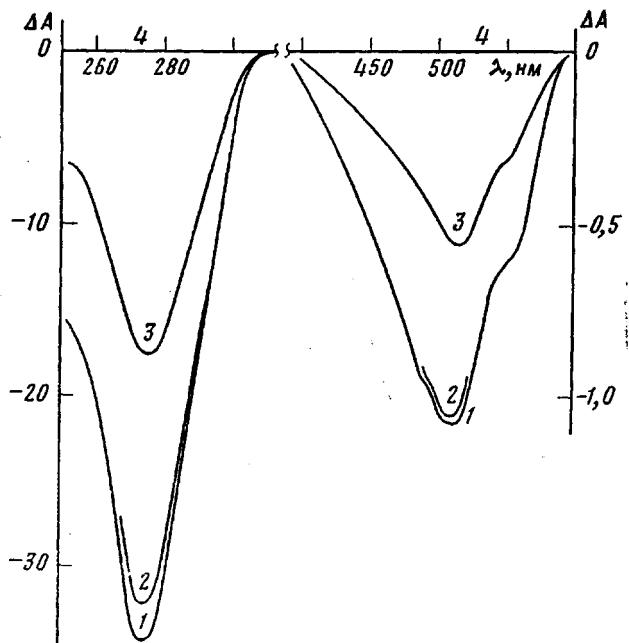


Рис. 3. Спектры КД жидкокристаллических микрофаз комплекса ДНК – дауномицин ($r=0,035$) при 20 (1), 78 (2), 83 (3) и 87° (4)

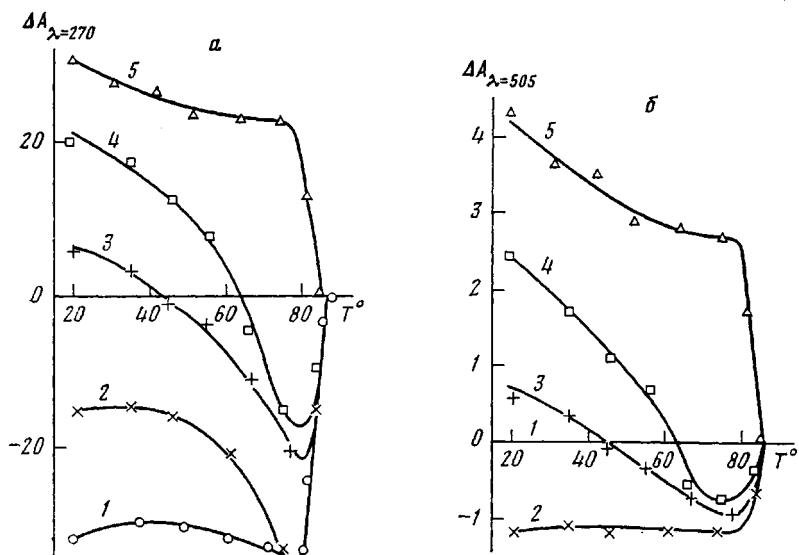


Рис. 4. Зависимость амплитуды полосы в спектре КД при $\lambda=270$ (а) и 505 нм (б) для ЖК-микрофаз комплексов ДНК – дауномицин от температуры при $r=0$ (1); 0,082 (2); 0,126 (3); 0,141 (4) и 0,198 (5). $[\text{ПЭГ}]=170 \text{ мг/мл}$

смене знаков полос в спектре КД: вместо отрицательных они становятся положительными, причем максимумы полос не смещаются.

Нагревание ЖК-микрофаз комплексов (ДНК – дауномицин), сформированных при малых r , приводит к уменьшению амплитуды отрицательных полос (рис. 3) в спектре КД. При охлаждении раствора исходные полосы в спектре КД восстанавливаются [6]. Кривые изменения амплитуд полос (рис. 4) при увеличении температуры ЖК-микрофаз, сформированных из разных комплексов (ДНК – дауномицин), показывают, что при малых r амплитуда полос ($\lambda_1 \sim 270$ нм) меняется незначительно в области 20–75°; при 75–87° наблюдается заметное уменьшение амплитуды. При 90° спектр КД раствора, содержащего ПЭГ, в котором сформированы

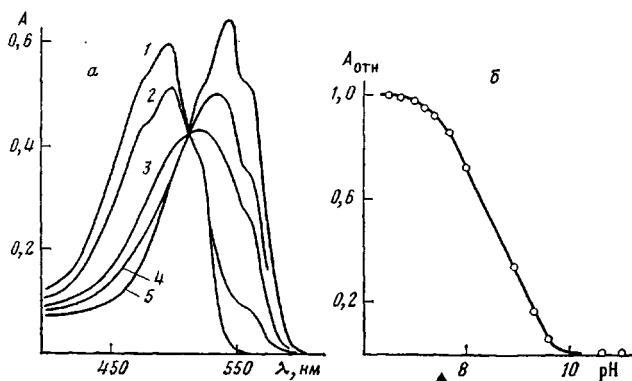
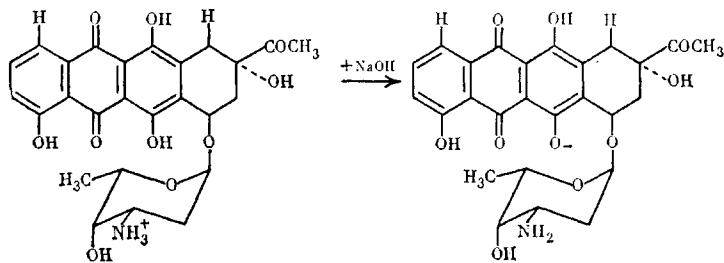


Рис. 5. Спектры поглощения водно-солевого (0,3 м. NaCl) раствора карминомицина. а: pH 6,55 (1); 7,97 (2); 8,98 (3); 9,72 (4) и 11,1 (5); б: зависимость относительной оптической плотности водно-солевого раствора карминомицина от pH, $A_{\text{отн}} = \frac{A_{\text{pH } 6,6} - A_{\text{pH }}}{A_{\text{pH } 6,6} - A_{\text{pH } 11,5}}$, $\lambda = 495 \text{ нм}$

ЖК-микрофазы, становится аналогичным спектру КД исходной формы ДНК (В-форма). При больших r ($>0,1$) амплитуда положительной полосы постепенно уменьшается в области $20-80^\circ$, затем наблюдается смена знака полосы с положительного на отрицательный (рис. 4, кривые 3, 4). Характерно при этом, что при изменении температуры положение максимума полосы в спектре КД ($\lambda \sim 270 \text{ нм}$) сохраняется. При максимальной степени заполнения ДНК антибиотиком (рис. 4, кривая 5) амплитуда положительной полосы уменьшается в интервале $75-87^\circ$. Амплитуда полосы в спектре КД, регистрируемая в области поглощения хромофоров дауномицина ($\lambda \sim 505 \text{ нм}$), меняется аналогично амплитуде полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК (рис. 4 а, б).

Влияние ионизации на спектры КД жидкокристаллических микрофаз. На рис. 5, а показано изменение спектров поглощения карминомицина при изменении pH; в области щелочных значений pH происходит депротонирование антибиотика по схеме



Зависимость амплитуды полосы в спектре поглощения ($\lambda=495 \text{ нм}$) от pH приведена на рис. 5, б (pK $\sim 8,5$). В области pH от 6,5 до 3 форма спектра поглощения этого антибиотика не меняется.

На рис. 6 приведены спектры КД жидкокристаллических микрофаз комплекса (ДНК – карминомицин), показывающие, что при изменении pH от 6,5 до 2,5, т. е. в той области, в которой азотистые основания ДНК протонируются и происходит денатурация ДНК, наблюдается синхронное уменьшение амплитуды положительных полос ($\lambda_1 \sim 270$ и $\lambda_2 \sim 505 \text{ нм}$) в спектре КД. При этом максимумы полос в спектре КД не смещаются.

Зависимость амплитуды полос в спектре КД жидкокристаллических микрофаз комплекса (ДНК – карминомицин) в широком интервале pH приведена на рис. 7. В области щелочных значений pH также наблюдается уменьшение амплитуды полос в спектре КД. Характер изменения

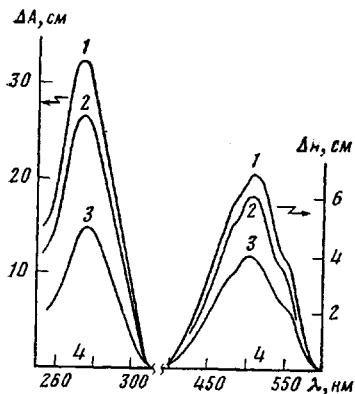


Рис. 6

Рис. 6. Спектры КД жидкокристаллических микрофаз комплекса (ДНК – карминомицин) при pH 6,65 (1); 3,62 (2); 2,60 (3); 2,42 (4). [ПЭГ]=170 мг/мл; $r=0,21$; 1 см= $1 \cdot 10^{-4}$ оптич. ед.

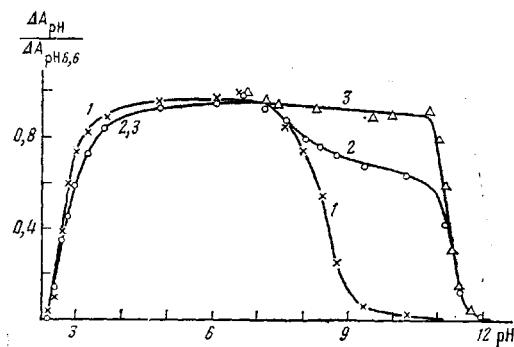


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость относительной амплитуды полосы в спектре КД жидкокристаллических микрофаз комплекса (ДНК – карминомицин) от pH [ПЭГ]=170 мг/мл, $r=0,21$. Кривая 3 соответствует титрованию ЖК-микрофаз свободной ДНК. $\lambda=505$ (1) и 270 нм (2, 3)

полосы в спектре ЖК-микрофаз комплекса (ДНК – карминомицин) при $\lambda \sim 270$ нм (кривая 2) достаточно близок характеру изменения полосы в спектре ЖК-микрофаз, сформированных из свободных молекул ДНК (кривая 3), азотистые основания которых в этой области значений pH депротонируются, что приводит к разделению цепей ДНК. Обращает на себя внимание тот факт, что амплитуда полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров антибиотика ($\lambda_2 \sim 505$ нм) резко уменьшается в том интервале значений pH ($pH > 7$), в котором происходит депротонизация хромофоров антибиотика, причем амплитуда полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda_1 \sim 270$ нм) еще сохраняется (ср. кривые 1 и 2).

Изменение пространственной укладки молекул ДНК. Образование ЖК-микрофаз из свободных молекул ДНК приводит к появлению интенсивной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda \sim 270$ нм). Формирование ЖК-микрофаз из комплексов ДНК – антибиотик сопровождается появлением двух полос – одна из них расположена в области поглощения азотистых оснований, другая – в области поглощения хромофоров антрациклических антибиотиков ($\lambda_2 \sim 500$ нм) (рис. 2). Появление интенсивных полос в спектре КД жидкокристаллических фаз в области поглощения хромофоров, поглощающих в разных областях спектра, является результатом только спиральной закрутки структуры ЖК-фазы [7].

Как было показано выше (рис. 5), антрациклические антибиотики, в частности карминомицин, депротонируются в области значения pH ~ 8 . Изучение комплексообразования ДНК с антибиотиком показало, что комплекс между ДНК и депротонированной формой антибиотика не образуется. Сопоставление кривых 1 и 2 на рис. 7 свидетельствует о том, что в области депротонирования антибиотика амплитуда положительной полосы ($\lambda_2 \sim 500$ нм) в спектре ЖК-микрофазы резко уменьшается, хотя полоса в области поглощения азотистых оснований ДНК ($\lambda_1 \sim 270$ нм) сохраняется. Такое уменьшение амплитуды полосы указывает на то, что антибиотик уходит из состава комплекса, т. е. из его ухода из ЖК-микрофазы в раствор. Это означает также, что интенсивная полоса в спектре КД в области поглощения антибиотика ($\lambda_2 \approx 500$ нм) отражает упорядочение тех молекул антибиотика, которые связаны в комплекс с молекулами ДНК, т. е. определенным образом зафиксированы на молекуле ДНК.

Данные рис. 3 и 6 показывают, что характер изменения амплитуд полос хромофоров, поглощающих в разных областях спектра ($\lambda_1 \sim 270$ и $\lambda_2 \sim$

~500 нм), практически одинаков при нагревании растворов, содержащих ЖК-микрофазы, или при изменении их кислотности. Если бы одна из этих полос являлась полосой селективного отражения, то увеличение температуры, в частности, приводило бы к смещению максимума этой полосы [7]. Постоянство максимумов полос $\lambda_1 \sim 270$ и $\lambda_2 \sim 500$ нм при изменении внешних условий подтверждает предположение [3], согласно которому ни одна из этих полос не является полосой селективного отражения, хотя обе полосы несут информацию о спиральной закрутке ЖК-микрофазы ДНК.

Уменьшение амплитуды интенсивных полос в спектре КД при увеличении температуры отражает изменение пространственной организации ЖК-микрофазы ДНК: вместо спирально закрученной (в частности, холестерической) структуры возникает незакрученная (аморфная или изотропная) структура. О применимости этого вывода к случаю ЖК-микрофаз ДНК свидетельствуют данные, приведенные в этой работе. Как было показано выше (рис. 1), повышение температуры раствора сопровождается уменьшением рассеяния; однако прямая корреляция между температурным ходом изменения показателя преломления водно-солевого раствора ПЭГ, не содержащего ЖК-микрофаз, и изменением величины A_K , характерной для ЖК-микрофаз ДНК (рис. 1), в сочетании с постоянством поглощения ЖК-микрофаз ДНК при всех исследованных нами температурах, свидетельствует о сохранении самих ЖК-микрофаз в ПЭГ-содержащем растворе в интервале температур 20–87°. В этом случае уменьшение амплитуды интенсивной полосы в спектре КД при высоких температурах может быть связано только с переходом от спиральной закрутки ЖК-микрофазы ДНК к неспиральной.

Более сложный характер носит изменение спектров КД жидкокристаллических микрофаз, сформированных из комплексов (ДНК – антибиотик), в частности (ДНК – дауномицин). Связывание молекул антибиотика с ДНК влияет на характер взаимодействия между молекулами ДНК, образующими ЖК-микрофазу и, следовательно, на направление спиральной закрутки ЖК-микрофазы [8]. С учетом использованной нами методики приготовления ЖК-микрофаз комплексов (ДНК – антибиотик) это означает, что смещение водно-солевых растворов ПЭГ и комплекса (ДНК – антибиотик), т. е. момент, когда происходит сближение молекул ДНК, образующих ЖК-микрофазу, определяет направление спиральной закрутки ЖК-микрофазы. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, приведенные на рис. 4, согласно которым связывание ДНК с дауномицином при комнатной температуре сопровождается сменой знака полосы в спектре КД с отрицательного на положительный. Увеличение температуры раствора, содержащего ЖК-микрофазы комплекса (ДНК – антибиотик), приводит к частичной диссоциации антибиотика из состава комплекса, и у молекул ДНК появляется тенденция к образованию ЖК-микрофазы, характеризуемой интенсивной отрицательной полосой в спектре КД. В результате этого при определенных условиях (температура и концентрация связанного антибиотика) возникают «компенсированные структуры», для которых характерно отсутствие оптической активности. Дальнейшее увеличение температуры приводит к формированию ЖК-микрофазы, направление спиральной закрутки у которой отличается от исходного.

Таким образом, внешние условия (температура, эффективность связывания ДНК с антибиотиком) определяют направление спиральной закрутки ЖК-микрофаз, образуемых молекулами ДНК в ПЭГ-содержащих растворах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Акименко Н. М. Высокомолек. соед. 1984, т. 26, № 11, с. 2403.
2. Maestre M. F., Reich C. Biochemistry, 1980, v. 19, № 23, p. 5214.
3. Евдокимов Ю. М., Салянов В. И., Полетаев А. И., Палумбо М. Докл. АН СССР, 1985, 280, № 6, с. 1456.
4. Holzwarth G., Holzwarth N. A. W. J. Opt. Soc. Amer., 1973, v. 63, № 3, p. 324.
5. Yevdokimov Yu. M., Salyanov V. A., Berg H. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 3, p. 743.

6. Евдокимов Ю. М., Пятигорская Т. Л., Белозерская Н. А., Варшавский Я. М., Беккер М., Цирвер Д. Молек. биол., 1977, т. 11, № 3, с. 507.
- 7 Saeva F. D. Liquid Crystals. The Fourth State of Matter. N. Y.- Basel: Marcel Becker Inc., 1979, p. 249.
8. Kim Y. H. J. phys., 1982, v. 43, № 3, p. 559.

Институт молекулярной биологии
АН СССР

Поступила в редакцию
20.VIII.1984

CHANGE OF THE PACKING OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID MOLECULES
FORMING LIQUID CRYSTALLINE MICROPHASES UNDER
THE CHANGE OF EXTERNAL CONDITIONS

Salyanov V. I., Yevdokimov Yu. M.

S u m m a r y

The spectra of circular dichroism of liquid crystalline microphases formed both from free and bound into the complex with anthracycline antibiotics DNA molecules have been studied in solutions of various acidity at various temperatures. Appearance of intense bands of circular dichroism in the region of absorption of nitrogen-containing bases (chromophores) of DNA ($\lambda \sim 270$ nm) and antibiotic chromophores ($\lambda \sim 500$ nm) and the synchronous change of amplitudes of both bands with the change of external conditions (pH, T) points out the existence of helical twisting of liquid crystalline microphases formed at the very moment of formation of microphases. The change of direction of helical twisting of microphase proceeds as a result of the change of the energy of interaction between DNA molecules because of binding of antibiotic or enhancing of temperature.