



УДК 547.963.32'953.2:543.422.25

ДНК-ФОСФОЛИПИДНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ.  
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

Викторов А. В., Гречаевский А. А., Бергельсон Л. Д.\*

Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва;\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР изучены комплексы ДНК фага Т7 с различными фосфолипидами при молярном отношении фосфолипид – нуклеотид (1:2). Используя тионовый аналог фосфатидилхолина, удалось оценить вклад фосфолипидов и ДНК в спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР комплекса. Найдено, что взаимодействие фосфолипидов с ДНК приводит к частичной иммобилизации молекулы ДНК и к полной иммобилизации фосфатных групп молекул фосфолипидов. Иммобилизующая способность фосфолипидов зависит от их структуры, увеличиваясь в ряду: фосфатидилхолин – фосфатидилэтанолламин < < сфингомиелин ≤ тройная смесь фосфатидилхолин – фосфатидилэтанолламин – сфингомиелин. Полученные данные свидетельствуют о неэквивалентности связывания ДНК с различными классами фосфолипидов.

В последние годы появились данные, свидетельствующие о способности фосфолипидов вступать во взаимодействие с ДНК с образованием смешанных агрегатов или комплексов [1–3]. Показано, что для такого взаимодействия необходимо присутствие двухвалентных катионов [3]. Однако природа ДНК-фосфолипидного взаимодействия и его зависимость от структуры фосфолипидов остаются неясными. В настоящей работе для изучения этих вопросов впервые применен метод  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. При этом основная трудность интерпретации спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР состоит во взаимном перекрывании сигналов от ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов и ДНК. Поэтому для разделения этих сигналов мы использовали наряду с природными фосфолипидами – ФХ, ФЭ и СМ – тионовый аналог ФХ, для которого сигнал фосфорного резонанса смещен на 59 м.д. в сторону слабого поля относительно  $^{31}\text{P}$ -резонанса природных фосфолипидов [4].

Разбавленные водные растворы ДНК фага Т7 характеризуются узким сигналом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 400$ –450 Гц, рис. 1а), что указывает либо на существование внутримолекулярных движений фосфатных групп с большой амплитудой в наносекундном интервале [5–7], либо на быструю реориентацию всей молекулы ДНК с временем вращательной корреляции порядка  $10^{-6}$  с [8]. Напротив, фосфолипиды в воде при температуре выше фазового перехода самопроизвольно образуют крупные агрегаты, спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР которых в условиях, когда можно пренебречь диполь-дипольным взаимодействием ядер фосфора с соседними протонами (см. «Экспериментальную часть»), характеризуются относительно широкими сигналами с анизотропией химического сдвига ~40 м.д. со слабопольным плечом в случае ФХ и СМ и с сильнопольным плечом (~20 м.д.) в случае ФЭ [9, 10].

Из рис. 1б–д видно, что в спектрах смесей ДНК – фосфолипид (2:1) \* характер  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-сигнала существенно меняется по сравнению со спектрами индивидуальных компонентов: появляется очень широкая составляющая (ширина вблизи базовой линии  $\approx 120$  м.д.) и наложенный на нее узкий сигнал ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 450$ –500 Гц). Подобные широкие сигналы характерны для сильно иммобилизованных фосфатных групп и напоминают сигнала

Принятые сокращения: ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, СМ – сфингомиелин, ТФХ – тионовый аналог фосфатидилхолина, ФЛ – фосфолипид.

\* Здесь и далее отношение ДНК – ФЛ указано в молях нуклеотида на моль фосфолипида.

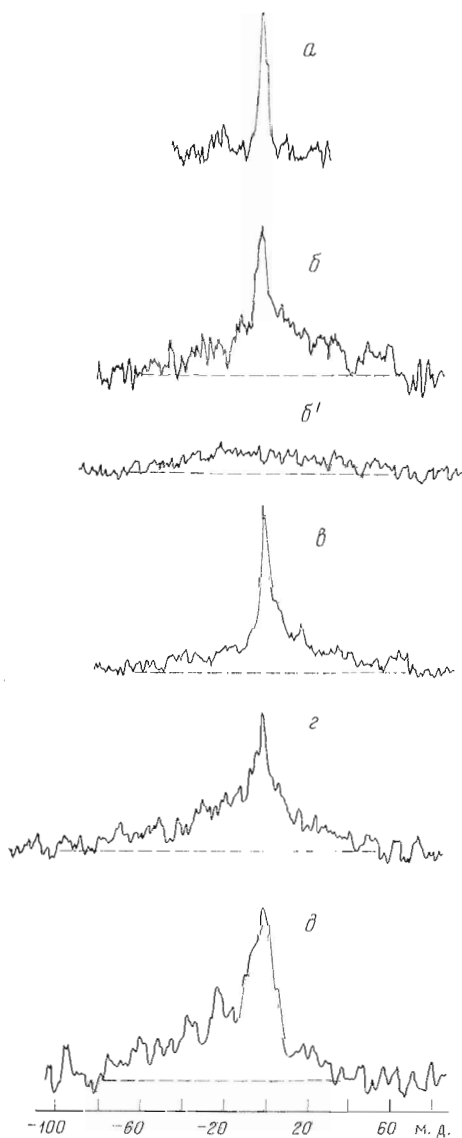


Рис. 1

Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР [101,3 МГц] комплексов ДНК - ФХ: а - ДНК, водный раствор (0,35 мг/мл); б - ДНК - ФХ, 2:1; б' - ДНК - ФХ после добавления  $\text{Mn}^{2+}$  (2 мМ); в - ДНК - ФЭ, 2:1; г - ДНК - СМ, 2:1; д - ДНК - ФЛ, 2:1 (ФЛ: ФХ - ФЭ - СМ, 4:4:1)

Рис. 2. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (401,3 МГц) комплексов ДНК - ТФХ: а - ДНК - ТФХ, 2:1; б - ДНК - ТФХ, 1:1; б' - ДНК - ТФХ, 1:1, после добавления  $\text{Mn}^{2+}$  (2 мМ); в - ДНК - ТФХ, 1:2

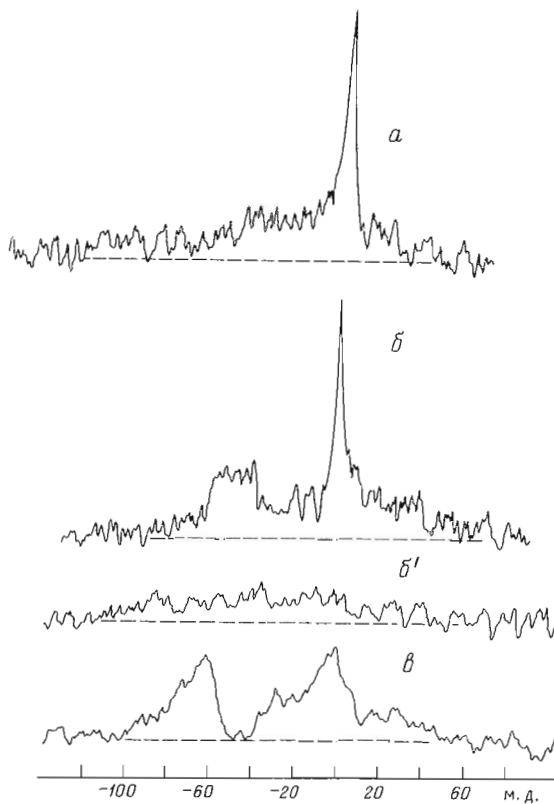


Рис. 2

лы от ядер твердых тел в так называемых порошкообразных спектрах. Приведенные в литературе значения главных компонентов тензора анизотропии химического сдвига ДНК и ФЛ близки между собой\*, поэтому эти спектры не позволяют определить вклад ДНК и ФЛ в широкую составляющую сигнала. Полуширина же узкого сигнала близка к полуширине, наблюдаемой в разбавленном растворе ДНК без липидов. На этом основании можно предположить, что узкий сигнал, вероятно, принадлежит  $^{31}\text{P}$ -ядрам ДНК.

Для проверки этого предположения мы заменили природный ФХ на ТФХ. Если часть ядер ФЛ дает в спектре комплекса ДНК - ФЛ узкий сигнал, то в случае ТФХ он должен появляться в области  $\sim 59$  м.д. в слабом поле относительно сигнала ортофосфата. Однако это не так, т.е. для соотношения ДНК - ТФХ 2:1 все молекулы ТФХ сильно иммобилизованы, а узкий сигнал  $\sim 0$  м.д. принадлежит фосфатам ДНК (рис. 2а). Интересно, что увеличение количества ТФХ в комплексе ДНК - ТФХ (рис. 2б, в) приводит к появлению в спектре в области 60 м.д. широкого

\* Так, для ФХ:  $\delta_{11} -87$ ,  $\delta_{22} -25$ ,  $\delta_{33} 119$  м. д. [11]; для ФЭ:  $\delta_{11} -81$ ,  $\delta_{22} -20$ ,  $\delta_{33} 105$  м. д. [11]; для ТФХ:  $\delta_{11} -123$ ,  $\delta_{22} -96$ ,  $\delta_{33} 54$  м. д. [4]; для ДНК:  $\delta_{11} -85$ ,  $\delta_{22} -25$ ,  $\delta_{33} 109$  м. д. [8].

Доля иммобилизованных фосфатных групп ДНК и ФЛ в комплексах ДНК — ФЛ, рассчитанная по данным спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР  
Относительная погрешность приведенных значений 20–25%

Образец	Доля широкого сигнала (доля иммобилизованных фосфатов), % от суммарного сигнала (широкий + узкий)	
	ДНК + липид	ДНК
ДНК	0	0
ДНК — ФХ, 2 : 1	55	30
ДНК — ФЭ, 2 : 1	55	30
ДНК — СМ, 2 : 1	75	60
ДНК — ФЛ, 2 : 1	80	70
(ФЛ : ФХ — ФЭ — СМ, 4 : 4 : 1)		
	Липид	ДНК
ДНК — ТФХ, 2 : 1	100	35
ДНК — ТФХ, 1 : 1	80	60
ДНК — ТФХ, 1 : 2	60	80

анизотропного сигнала, свойственного молекулам ТФХ, образующим протяженные бислон [4].

Доля широкого сигнала в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР рассчитывалась следующим образом: сравнение интегральной интенсивности всего наблюдаемого в спектре сигнала с сигналом от внешнего стандарта показало, что в спектре регистрируется ~90% всех фосфатных групп ФЛ и ДНК. Далее предположили, что при соотношении ДНК — ФЛ 2 : 1 ядра  $^{31}\text{P}$  молекул ФЛ не вносят вклад в интенсивность узкого сигнала (это предположение основано на отсутствии узкого сигнала в спектре смеси ДНК — ТФХ 2 : 1). Что же касается широкого сигнала, то в него, по-видимому, вносят вклад ядра  $^{31}\text{P}$  не только ФЛ, но и ДНК. Действительно, если бы были иммобилизованы только фосфаты ФЛ, то, принимая во внимание взятое отношение фосфатов ДНК и ФЛ (2 : 1), интенсивность широкого компонента должна была бы составлять не более  $\frac{1}{3}$  интенсивности суммарного сигнала. Поскольку наблюдаемая доля широкого компонента существенно больше, то, очевидно, часть фосфатов ДНК тоже иммобилизована (таблица). Доля иммобилизованных фосфатов ДНК довольно сильно возрастает при введении в систему СМ (рис. 1г).

Для оценки доступности фосфатных групп в комплексе ДНК — ФЛ со стороны водной фазы были измерены спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР смесей ДНК — ФЛ и ДНК — ТФХ в присутствии парамагнитных ионов  $\text{Mn}^{2+}$ , которые в концентрации 1–2 мМ уширяют сигнал  $^{31}\text{P}$ -ЯМР от фосфатов ФЛ до слияния с базовой линией [12].

Добавление в «наружный» раствор ионов  $\text{Mn}^{2+}$  вызывает полное уширение узкого сигнала и, кроме того, части широкого; в результате интенсивность остаточного сигнала составляет ~ $\frac{1}{3}$  исходного суммарного (рис. 1б'). Однако в данном случае невозможно установить, уширяются ли ионами  $\text{Mn}^{2+}$  сигналы фосфатов ФЛ или ДНК. С этой целью аналогичный анализ широкого и узкого сигналов был проведен и для смесей ДНК — ТФХ (таблица). На первом этапе от очень широкого сигнала сильно иммобилизованных фосфатов были отделены узкий изотропный сигнал в области 0 м.д., обусловленный резонансом неиммобилизованных фосфатов ДНК, и более широкий в области 60 м.д., происходящий от ядер  $^{31}\text{P}$  молекул ТФХ, имеющих ламелярную упаковку. Далее было проведено разделение очень широкого сигнала на ФЛ- и ДНК-составляющие, основанное на форме сигнала и значениях главных компонентов тензора магнитной анизотропии химического сдвига, полученных ранее для «порошкообразных спектров» ТФХ и ДНК [4, 7]. Отношение интенсивностей сигналов ТФХ и ДНК после окончательного разделения соответствовало исходному молярному отношению ДНК — ТФХ. Добавление ионов  $\text{Mn}^{2+}$  к смеси ДНК — ТФХ (1 : 1) индуцирует полное уширение узкого сигнала

ДНК и широкого анизотропного сигнала от молекул ТФХ, образующих ламелярную фазу. При этом значительно уширяется сигнал от иммобилизованных молекул ДНК и в гораздо меньшей степени сигнал от иммобилизованных молекул ТФХ (рис. 2б').

Таким образом, максимальная иммобилизация ДНК обнаруживается в комплексе ДНК с тройной смесью ФХ — ФЭ — СМ (рис. 1д) и в комплексе с СМ (рис. 1г). Кроме того, увеличение количества ТФХ в комплексе ДНК — ТФХ также приводит к возрастанию доли иммобилизованных фосфатных групп ДНК.

На основании полученных данных можно предположить, что во взаимодействии ДНК с ФЛ участвуют фосфатные группы ФЛ, которые при этом становятся менее доступными для ионов  $Mn^{2+}$ . С другой стороны, наблюдаемая при действии ФЛ иммобилизация фосфатных групп ДНК обусловлена, вероятно, иммобилизацией не самих фосфатных групп, а всей молекулы ДНК или отдельных ее участков, поскольку фосфатные группы даже иммобилизованных участков ДНК сохраняют способность взаимодействовать с ионами  $Mn^{2+}$ . Представляется маловероятным, чтобы фосфатные группы ДНК могли непосредственно участвовать во взаимодействии с ФЛ, становясь при этом, с одной стороны, иммобилизованными, а с другой — оставаясь доступными для парамагнитных катионов. Предлагаемая интерпретация полученных данных находится в согласии с предположением, что узкий сигнал в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР разбавленных водных растворов ДНК, в данном случае ДНК фага 17, обусловлен, скорее, быстрыми конформационными переходами всей молекулы ДНК, чем внутримолекулярной подвижностью отдельных фосфатных групп [8].

Следует заметить, что термин «иммобилизованные фосфатные группы» в приложении к ДНК-липидным комплексам не подразумевает полной иммобилизации, так как слабо- и сильнополярная границы широкого сигнала заметно отличаются от главных компонентов  $\delta_{11}$  и  $\delta_{33}$  тензора магнитной анизотропии химического сдвига (рис. 1б-г).

Сравнение различных фосфолипидов по их способности иммобилизовывать ДНК в комплексе ДНК-ФЛ (2:1) (таблица) показывает, что наибольшим иммобилизующим эффектом обладает СМ, затем следуют ФХ и ФЭ. Однако тройная смесь этих липидов иммобилизует молекулы ДНК в большей степени, чем каждый из компонентов отдельно. В этом случае даже «неиммобилизуемые» участки молекулы ДНК имеют ограниченную подвижность по сравнению со свободной ДНК, о чем свидетельствует увеличение полуширины узкого сигнала до 800 Гц в случае тройной смеси ФЛ по сравнению с 400–500 Гц в образцах, содержащих один из индивидуальных ФЛ. Эти различия свидетельствуют о неэквивалентности связывания ДНК с различными классами ФЛ.

### Экспериментальная часть

ДНК фага Т7 выделяли по методу [13], ФХ и ФЭ — согласно методу [14], СМ — как описано в [15], а дигальмитоил — ТФХ был синтезирован по методу [4]. Для приготовления комплексов ДНК — ФЛ в буферную смесь (2 мл: трис-НСI, рН 7,5, 0,02 М + 5 мМ  $CaCl_2$  + 700 мкг ДНК фага Т7;  $H_2O/D_2O$ , 2:1) при интенсивном встряхивании добавляли этанольный раствор липидов (конечная концентрация этанола 7%).

Спектры  $^{31}P$ -ЯМР получены на импульсном фурье-спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) на частоте 101,3 МГц; ширина развертки 50 КГц. Обычно использовали  $\pi/6$ -импульс с задержкой между импульсами 3 с. Сигналы свободной индукции регистрировались ЭВМ (8 К ячеек памяти). Число сканирований варьировало от 25 000 до 60 000. Температуру контролировали стандартным температурным блоком В-УТ 1000 (Bruker, ФРГ) с точностью  $\pm 1^\circ C$ .

Форма линии «порошкообразных спектров» полностью гидратированных ФЛ определяется анизотропией химического сдвига ядер  $^{31}P$  и диполь-дипольным взаимодействием ядер  $^{31}P$  с расположенными поблизости протонами [9]. Ранее было показано, что для спектрометров ЯМР с вы-

сокой напряженностью магнитного поля (частота 129 МГц для ядер  $^{31}\text{P}$ ) анизотропная составляющая доминирует над дипольной и типичные «порошкообразные спектры» для аксиально-симметричного тензора анизотропии химического сдвига могут быть получены даже в отсутствие подавления дипольного взаимодействия с протонами [9, 16–18]. Однако для более точного выявления формы анизотропного сигнала и особенно его краев ( $\sigma_{\parallel}$  и  $\sigma_{\perp}$ ) применяется частичное или полное подавление дипольного взаимодействия с протонами. На нашем спектрометре ЯМР (частота 101,3 МГц для ядер  $^{31}\text{P}$ ) для получения спектра с более резким разрешением краев сигнала оказалось достаточным частичное подавление дипольного взаимодействия ядер  $^1\text{H}$ – $^{31}\text{P}$  при широкополосной развязке от протонов ( $\approx 7$  Вт).

Полученная интерферограмма перед преобразованием Фурье экспоненциально фильтровалась, что приводило к уширению линий в спектре на 100 Гц.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Manzoli F. A., Muchmore J. H., Bonora B., Capitani S., Bartoli S.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 340, № 1, p. 1–15.
2. *Hoefman R. M., Margolis L. B., Bergelson L. D.* FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 11–15.
3. *Gruzdev A. D., Khrantsov V. V., Weiner L. M., Budker V. G.* FEBS Lett., 1982, v. 137, № 2, p. 227–230.
4. *Vasilenko I. A., de Kruijff B., Verkley A. J.* Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 685, № 2, p. 144–152.
5. *Hogan M. E., Jardetzky O.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 21, p. 6341–6347.
6. *Hogan M. E., Jardetzky O.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 11, p. 3460–3465.
7. *Lipari P. G., Szabo A.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6250–6256.
8. *Opella S. J., Wise W. B., Diverdi J. A.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 2, p. 284–290.
9. *Seelig J.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 575, № 2, p. 105–140.
10. *Cullis P. R., de Kruijff B.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 559, № 3, p. 399–420.
11. *Kohler S. J., Klein M. P.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 3, p. 519–526.
12. *Bergelson L. D.* Meth. Membr. Biol., 1977, v. 9, № 3, p. 265–326.
13. *Fridman J. A. J.* Biol. Chem., 1972, v. 247, № 9, p. 35–42.
14. *Dowson R. M. C.* Biochemistry, 1963, v. 88, № 4, p. 414–423.
15. *Hanaman D. J.* Biochem. Preparations, 1961, v. 8, № 1, p. 121–124.
16. *McLaughlin A. C., Cullis P. R., Hemminga M. A., Houtt D. I., Radda G. K., Ritchie G. A., Seeley P. J., Richards R. E.* FEBS Lett., 1975, v. 57, № 2, p. 213–218.
17. *Cullis P. R., de Kruijff B., Richards R. E.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 426, № 3, p. 426–433.
18. *McLaughlin A. C., Cullis P. R., Berden J. A., Richards R. E.* J. Magn. Res., 1975, v. 20, № 2, p. 146–166.

Поступила в редакцию  
15.XII.1983  
После доработки  
26.I.1984

#### DNA-PHOSPHOLIPID INTERACTION. $^{31}\text{P}$ NMR INVESTIGATION

VIKTOROV A. V., GREPACHEVSKY A. A., BERGELSON L. D.\*

*All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow; \* M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The phage T7 DNA complexes with various phospholipids (PL) were studied by  $^{31}\text{P}$  NMR at PL/nucleotide molar ratio of 2:1. Using a phosphatidylcholine thion analogue, the contributions of PL and DNA into the  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of the complex were estimated. It was found that PL – DNA interaction results in partial immobilization of DNA molecule and complete immobilization of PL phosphate groups. Immobilizing ability of PL depends on their structure, increasing in the following row: phosphatidylcholine – phosphatidylethanolamine < sphingomyelin  $\leq$  ternary mixture of these PL. The data obtained are indicative of nonequivalent binding of DNA with various PL species.