



УДК 577.113:577.115:577.336

ДНК-ФОСФОЛИПИДНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ. ИССЛЕДОВАНИЕ
С ПОМОЩЬЮ ЛИПИДСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
И ФОТОРЕАКТИВНЫХ ЗОНДОВ

Гречаевский А. А., Маневич Е. М.*, Бергельсон Л. Д.**

Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва;

* Московский медицинский стоматологический институт им. Н. А. Семашко;

** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук
СССР, Москва

С помощью аналогов фосфатидилхолина и сфингомиелина, несущих на конце ацильной цепи флуоресцентную или фотореактивную группу, изучено взаимодействие фосфолипидов с ДНК фага Т7. По данным поляризационных измерений, присутствие ДНК снижает подвижность флуорофора по мере его удаления от полярной части липидной молекулы. В присутствии ионов Ca^{2+} иммобилизация липидных цепей возрастает, причем для производных сфингомиелина больше, чем для фосфатидилхолина. Вместе с тем аналоги фосфолипидов, содержащие фотореактивно меченные жирнокислотные остатки, не сшиваются в ДНК-фосфолипидном комплексе с ДНК, что указывает на отсутствие контактов жирнокислотных остатков с ДНК.

В последние годы в литературе стали накапливаться данные о взаимодействии липидов с ДНК с образованием агрегатов или комплексов [1—3]. Установлено, что ФЛ влияют на термостабильность ДНК [4], могут ее расплетать [4], а ДНК в свою очередь изменяет кинетику фазовых переходов ФЛ [5]. Однако природе этого взаимодействия и его зависимости от структуры ФЛ еще недостаточно выяснены. Пока единственным достоверным указанием на характер ДНК-ФЛ-взаимодействия является тот факт, что комплексы ДНК-ФЛ образуются только в присутствии двухвалентных катионов [5]; это свидетельствует о наличии «мостиков» между фосфатными группами ФЛ и ДНК.

В настоящей работе предпринята попытка изучить степень иммобилизации фосфатных групп ДНК и ФЛ при образовании ими комплексов на примере модельных систем, содержащих ДНК и различные типы ФЛ в соотношении, близком к таковому в ядерном матриксе. При этом использованы методы флуоресценции и фотореактивного мечения.

В поисках модели взаимодействия ФЛ с ДНК, приближающейся к ситуации *in vivo*, мы определили отношение ФЛ: ДНК в материале, извлекаемом из ядерного матрикса фибробластов L-929 раствором 2 М NaCl с 2 М мочевиной. Оказалось, что на пару оснований ДНК приходится в среднем одна молекула фосфолипида. Состав ФЛ, извлекаемых в указанных условиях, представлен в табл. 1. В дальнейших экспериментах мы исследовали взаимодействие ДНК со смесью Spm — PtdCho (1:9) при найденном соотношении ФЛ:ДНК.

Для изучения взаимодействия гидрофобных участков ФЛ с ДНК мы определили изменение поляризации флуоресценции аналогов фосфатидилхолина, несущих хромофор в конце ацильной цепи на различном расстоянии от остатка глицерина (ADPC и APPC), и флуоресцентного аналога сфингомиелина (ADSM) в их комплексе с ДНК (табл. 2). Взаимодей-

Принятые сокращения: ФЛ — фосфолипиды, Spm — сфингомиелин, PtdCho — фосфатидилхолин, PtdEtn — фосфатидилэтанолламин, PtdIns — фосфатидилинозит, PtdSer — фосфатидилсерин, ADPC — 1-ацил-2-[12-(9-антрил)-11-транс-додецеаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин, APPC — 1-ацил-2-[5-(9-антрил)-4-пентеноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин, ADSM — N-[12-(9-антрил)-11-транс-додецеаноил]-сфингозин-1-фосфохолин, Nap — 2-нитро-4-азидофенил.

Содержание фосфолипидов (%) в ядерном матриксе фибробластов L-929 (I) и в материале, извлекаемом из него 2 М NaCl, содержащим 2 М мочевины (II)
Приведены результаты одного из четырех аналогичных опытов

Фосфолипид	I	II
Spm	3,0±0,1	13,2±0,1
PtdIns	5,4±0,2	6,3±0,1
PtdSer	5,3±0,2	5,6±0,1
PtdCho	43,2±0,1	39,2±0,1
PtdEtn	43,1±0,2	35,7±0,2

ствие ФЛ с ДНК приводит к увеличению поляризации зондов ADPC и ADSM, содержащих флуорофор в конце длинной жирнокислотной цепи, но не сказывается на поляризации флуоресценции короткоцепочечного зонда APCC. Это свидетельствует об иммобилизации хромофора, находящегося в конце аполярной цепи на уровне атомов C11—C16, и об отсутствии изменения подвижности хромофора, расположенного на уровне участка C4—C9. В присутствии ионов Ca²⁺ иммобилизация жирнокислотных цепей еще больше возрастает, причем уменьшается подвижность также и участка C4—C9. Таким образом, в отсутствие ионов Ca²⁺ имеет место гидрофобное взаимодействие молекул ДНК с концевыми участками жирнокислотных цепей зондов. Как уже отмечалось [5], добавление двухвалентных катионов приводит к связыванию ДНК с ФЛ, вероятно, путем образования Ca²⁺-мостиков между фосфатными группами ДНК и ФЛ. Это ионное взаимодействие, видимо, и ограничивает подвижность участка C4—C9 аполярных цепей. Следует, однако, отметить, что дополнительная иммобилизация жирнокислотных цепей на ДНК в присутствии ионов Ca²⁺ явно зависит от природы полярной головки ФЛ. Максимальная иммобилизация аполярных цепей наблюдается в случае сфингомиелинового зонда ADSM, тогда как цепи аналогов фосфатидхолина иммобилизованы в меньшей степени (табл. 2). По-видимому, наличие в молекуле аналога сфингомиелина амино- и гидроксильной групп, способных к образованию водородных связей, усиливает полярное взаимодействие ФЛ с ДНК. Это приводит к дополнительному снижению подвижности аполярных цепей зонда.

Интересно сравнить эти данные с результатами исследования комплексов ФЛ с ДНК, которое мы проводили методом ³¹P-ЯМР при том же соотношении ФЛ с ДНК [6]. В этих экспериментах при использовании различных ФЛ (Spm, PtdCho, PtdEtn) было показано, что наибольшей способностью иммобилизовать фосфатные группы ДНК обладает сфингомиелин. Более того, ЯМР-спектры самих ФЛ приближаются по форме и значениям главных компонент тензора магнитной анизотропии химического сдвига к «порошкообразным спектрам» [7]. Иными словами, оказалось, что фосфатные группы ФЛ сильно иммобилизуются при взаимодействии

Таблица 2

Влияние ДНК и ионов Ca²⁺ на поляризацию флуоресценции ADPC, APCC и ADSM в составе смеси Spm — PtdCho в мольном соотношении 1 : 9. ДНК добавлена из расчета 2 пары оснований на 1 моль ФЛ
Приведены данные одного из четырех аналогичных опытов

Компоненты	Поляризация зондов		
	ADPC	APCC	ADSM
Spm — PtdCho	0,035±0,003	0,040±0,003	0,043±0,003
Spm — PtdCho	0,050±0,003	0,040±0,003	0,055±0,003
Spm — PtdCho ДНК, CaCl ₂	0,054±0,003	0,050±0,003	0,074±0,003

ФЛ с ДНК. Обнаруженное же в данной работе увеличение поляризации флуоресценции ФЛ-зондов, содержащих хромофор в конце жирнокислотной цепи, говорит о том, что происходит иммобилизация также и гидрофобной части фосфатидилхолина и сфингомиелина.

На основании этих данных можно было предположить, что комплекс ФЛ с ДНК формируется как за счет образования катионных «мостиков» между фосфатными группами ФЛ и ДНК, так и с участием гидрофобной части ФЛ. Для проверки этого предположения мы использовали фотореактивные аналоги сфингомиелина и фосфатидилхолина, содержащие остатки N-Nар-12-амино[12-¹⁴C]додекановой кислоты или N-[¹⁴C]глицина (Nар-[¹⁴C]ФЛ). Эти фотореактивные ФЛ при облучении образуют ковалентные сшивки со своим ближайшим окружением [8]. Однако проведенные нами эксперименты показали, что ни один из четырех использованных фотореактивных ФЛ не сшивался с ДНК. Эти данные позволяют считать, что в комплексе ФЛ — ДНК гидрофобная часть ФЛ не примыкает к ДНК ближе чем на расстояние 5—10 Å [9].

Большой интерес представляет обстоятельство, что сфингомиелин отличается от других ФЛ по взаимодействию с ДНК. Ранее сообщалось, что он входит в состав ядерного матрикса и при низких концентрациях стабилизирует спираль ДНК [10]. Кроме того, обработка сфингомиелиназой приводит к тому, что значительная часть вновь синтезированной ДНК перестает быть связанной с ядерным матриксом [11]. Согласно же нашим данным, в материале, извлеченном из ядерного матрикса (табл. 1), содержится сфингомиелина в 4 раза больше, чем в тотальном матриксе. По-видимому, сфингомиелину принадлежит особая роль во взаимодействии ФЛ с ДНК. Возможно, что он осуществляет связь между белками ядерного матрикса и ДНК путем ионного взаимодействия с ДНК (через двухвалентные катионы) и гидрофобного взаимодействия с белками (за счет ацильных цепей).

Экспериментальная часть

Флуоресцентные и фотореактивные аналоги ФЛ ADPC [12], ADPM [13], APPC [14] и Nар-[¹⁴C]ФЛ [15], любезно предоставлены Ю. Г. Молотковским и Е. Л. Водовозовой (ИБХ АН СССР). Фосфатидилхолин из яичных желтков и сфингомиелин из мозга крупного рогатого скота выделяли как описано в работе [16]. ДНК фага T7 получена методом [17]. Фибробласты L-929, выращенные по [18], любезно предоставлены В. В. Чернохвостовым (ИМБ АН СССР). Ядерный матрикс фибробластов выделяли с помощью метода [19]. Материал, экстрагируемый из ядерного матрикса раствором 2 М NaCl с 2 М мочевиной, приготовленным на 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), извлекали путем центрифугирования (3000 об/мин, 15 мин) сквозь 20% глицерин, содержащий 0,02 М трис-HCl (pH 7,5), 2 М NaCl и 0,1% Triton X-100.

ФЛ экстрагировали двукратным объемом смеси хлороформа с метанолом (2 : 1) [20], экстракты упаривали, растворяли в бензоле и определяли содержание отдельных фракций ФЛ с помощью ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Липидный фосфор определяли по методике [21].

Для работы с фотореактивными и флуоресцентными зондами в буферную смесь (200 мкл), состоящую из трис-HCl (0,02 М, pH 7,5), ДНК фага T7 (20 нмоль) и CaCl₂ (5 мМ), впрыскивали при быстром перемешивании этанольный раствор Spm — PtdCho (1:9). Конечная концентрация этанола 5%. Зонд вносили в каждую пробу в количестве 1% от общего содержания ФЛ. Пробы, содержащие Nар-[¹⁴C]ФЛ, облучали 10 мин при 4° С светом ртутной лампы «ВИА-1», экстрагировали смесью хлороформа и метанола (2:1), центрифугировали при 1200g и помещали в сцинтилляционные флаконы отдельно органическую и водную фазы. Радиоактивность образцов измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman-9800. Сцинтиллятор — Unisolv-1 (Koch-Light Laboratories). Пробы, содержащие флуоресцентные зонды, помещали в низкорассеивающие кварцевые кюветы (5 × 5 мм) и проводили измерения флуоресценции на спектрофлуориметре Hitachi 650-60 при непрерывном термостатировании (36,5° С). Корректированные спектры испускания и возбуждения регистрировали при щелях 2 и 10 мм соответственно для монохроматора возбуждения и эмиссии. Поляризацию флуоресценции рассчитывали из спектров возбуждения с помощью процессора спектрофлуориметра.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Manzoli F. A., Muchmore J. M., Bonora B., Sabioni A., Steroni S.* Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 277, № 2, p. 251—255.
2. *Manzoli F. A., Muchmore J. M., Bonora B., Capitani S., Bartoli S.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 340, № 1, p. 115.
3. *Hoffman R. M., Margolis L. B., Bergelson L. D.* FEBS Lett., 1978, v. 93, № 2, p. 11—15.
4. *Budker V. G., Godovicov A. A., Naumova L. P., Slepneva I. A.* Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 11, p. 2499—2515.
5. *Gruzdev A. D., Kramtsov V. V., Weiner L. M., Budker V. G.* FEBS Lett., 1982, v. 137, № 2, p. 227—230.
6. *Викторов А. В., Гречаевский А. А., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 935—939.
7. *Lipari P. G., Szado A.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 21, p. 6250—6356.
8. *Brunner J.* Trends Biol. Sci., 1981, v. 6, № 2, p. 44—46.
9. *Бертлон Д., Койл Д.* Возбужденные состояния в органической химии. М.: Мир, 1978, с. 58.
10. *Manzoli F. A., Capitani S., Maraldi N. M., Cocco L., Varnebei O.* Adv. Enzym. Reg., 1979, v. 17, p. 175—194.
11. *Алесенко А. В., Красильников В. А., Бойков П. Я.* Биохимия, 1983, т. 273, № 1, с. 231—234.
12. *Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Молотковская И. М., Бергельсон Л. Д., Маневич Е. М.* Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 586—600.
13. *Молотковский Ю. Г., Дмитриев П. И., Никулина Л. Ф., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 588—602.
14. *Ильбс А. Б., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 4, с. 527—532.
15. *Водовозова Е. Л., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.* Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 12, с. 1688—1694.
16. *Препаративная биохимия липидов/Ред. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В. М.: Наука, 1981, с. 107—108, 133.*
17. *Richardson C. C. J.* Mol. Biol., 1966, v. 15, № 1, p. 49—61.
18. *Razin S. V., Mantieva V. L., Georgiev G. P.* Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 2, p. 4737—4751.
19. *Razin S. V., Chernohvstov V. V., Roodyn A. J., Zbarsky I. B., Georgiev G. P.* Cell, 1981, v. 27, № 1, p. 65—73.
20. *Folch J., Less M., Sloane-Stanley G. H. J.* Biol. Chem., 1957, v. 226, № 2, p. 497—509.
21. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975, с. 79—80.

Поступила в редакцию
20.III.1985
После доработки
10.X.1985

DNA-PHOSPHOLIPID INTERACTION. A STUDY WITH THE AID OF LIPID-SPECIFIC FLUORESCENT AND PHOTOACTIVABLE PROBES

GREPACHEVSKY A. A., MANEVICH E. M.*, BERGELSON L. D.**

*All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

** N. A. Semashko Medical Stomatological Institute, Moscow;*

*** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The interaction of phospholipids with phage T7 DNA was investigated using anthryl-vinyl-labeled and photoactivable phosphatidylcholine and sphingomyelin. Fluorescence polarization studies demonstrated that, in the presence of DNA, the fluorophore mobility is diminished as its distance from the polar head-group is increased. Immobilization of lipid chains is enhanced by Ca²⁺ ions, the effect being more pronounced for sphingomyelin than for phosphatidylcholine derivatives. On the other hand, phospholipids with a photoactivable group could not be crosslinked to DNA in the DNA-phospholipid complexes, evidencing against the presence of contacts between lipids and DNA.