

ТЕМПЕРАТУРНО-ИНДУЦИРОВАННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ УПАКОВКИ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ ЛИНЕЙНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК В ЧАСТИЦАХ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ДИСПЕРСИЙ

© 2016 г. Ю.М. Евдокимов, С.Г. Скуридин, В.И. Саянов, Е.И. Кац*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

**Институт теоретической физики им. Л.Д. Ландау РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 2*

E-mail: yevdokim@imb.ru

Поступила в редакцию 18.02.16 г.

Изучены спектры кругового дихроизма жидкокристаллических дисперсий, полученных в результате фазового исключения линейных, двухцепочечных молекул ДНК из водно-солевых растворов полиэтиленгликоля ($120 \leq C_{\text{ПЭГ}} \leq 300$ мг/мл). Формирование жидкокристаллических дисперсий при концентрациях полиэтиленгликоля 120–200 мг/мл сопровождается появлением аномальной отрицательной полосы в спектре кругового дихроизма, свидетельствующей о холестерической упаковке двухцепочечных молекул ДНК в частицах дисперсии. При концентрациях полиэтиленгликоля > 220 мг/мл и комнатной температуре формируются жидкокристаллические дисперсии, не имеющие аномальной полосы в спектре кругового дихроизма, что свидетельствует в пользу гексагональной упаковки двухцепочечных молекул ДНК в частицах дисперсии. Нагревание оптически неактивных жидкокристаллических дисперсий приводит к их переходу в состояние, характеризующее отрицательной аномальной полосой в спектре кругового дихроизма. Этот переход рассматривается в рамках представления о трансформации гексагональной упаковки молекул ДНК в холестерическую. Мы предлагаем качественный механизм такого перехода в терминах «квазинематических» слоев, образованных двухцепочечными молекулами ДНК, которые меняют свою пространственную ориентацию за счет конкуренции эффектов осмотического давления растворителя, ориентационной упругости холестерической упаковки и тепловых флуктуаций.

Ключевые слова: частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК, круговой дихроизм, аномальная оптическая активность, гексагональная и холестерическая упаковка молекул ДНК, «квазинематические» слои, переход «гексагональная \rightarrow холестерическая» упаковка.

Известно, что при комнатной температуре смешение водно-солевого раствора двухцепочечных, линейных, жестких (или полугибких) молекул ДНК (молекулярная масса ДНК $< 1 \cdot 10^6$ Да), отрицательные заряды фосфатных групп которых нейтрализованы противоионами, с водно-солевыми растворами некоторых полимеров, в частности полиэтиленгликоля (ПЭГ), сопровождается фазовым исключением (конденсацией) молекул ДНК и формированием жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) [1].

Эффективность фазового исключения двухцепочечной ДНК зависит от ионного состава, ионной силы и рН раствора, а также молекулярной массы и концентрации ПЭГ и т.д. [2].

Конденсация ДНК наблюдается в тех случаях, когда концентрация ПЭГ в растворе, используемом для фазового исключения, превы-

шает «критическое» значение ($C_{\text{ПЭГ}}^{\text{кр}}$). Нарушение «граничных» условий формирования дисперсий, в частности понижение концентрации ПЭГ ниже «критического» значения, приводит к распаду частиц дисперсий и к переходу молекул ДНК в изотропное состояние [2].

Частицы дисперсии, образующиеся при фазовом исключении двухцепочечной ДНК, обладают несколькими особенностями.

Во-первых, полимер (ПЭГ) не входит в состав образующихся частиц дисперсии ДНК.

Во-вторых, оценка размера частиц дисперсии показывает, что при молекулярной массе ДНК $< 1 \cdot 10^6$ Да средний диаметр частиц дисперсии близок к 500 нм и в составе одной частицы содержится около 10^4 молекул ДНК [2,3].

В-третьих, указанный выше размер частиц дисперсии ДНК является результатом тонкого баланса между суммарной свободной энергией

Сокращения: ПЭГ – полиэтиленгликоль; ЖКД – жидкокристаллическая дисперсия, КД – круговой дихроизм.

частиц и их поверхностной свободной энергией [4]. Конкуренция между суммарной свободной энергией частицы дисперсии (которая стремится увеличить размер частицы) и ее поверхностной свободной энергией (которая зависит от поверхностного натяжения и стремится уменьшить поверхность между ДНК-богатой частицей и окружающим изотропным раствором [4]) означает, что существует «критический» размер частицы дисперсии, ниже которого они являются нестабильными.

В-четвертых, при использованной схеме формирования дисперсий ДНК, включающей стадию смешивания растворов ДНК и ПЭГ, упаковка молекул ДНК в частицах дисперсии определяется за счет латерального взаимодействия между соседними молекулами «в момент» их сближения, зависящего от осмотического давления раствора ПЭГ [2]. Сочетание таких условий, как минимизация свободного объема линейных, жестких двухцепочечных молекул ДНК и необходимость в максимально плотной упаковке наибольшего числа молекул ДНК в малом объеме частицы дисперсии, определяет стремление этих молекул к параллельному (одномерному) расположению в частице дисперсии, т.е. к гексагональной упаковке. Это означает, что по мере увеличения концентрации ПЭГ, т.е. осмотического давления раствора, должно происходить «сжатие» (сближение) соседних двухцепочечных молекул ДНК в частицах дисперсий.

В-пятых, тот факт, что двухцепочечные молекулы ДНК имеют анизотропные свойства, означает, что упорядочение будет конкурировать со стремлением молекул ДНК к упаковке в виде пространственно-закрученной структуры [5–7]. Поэтому при определенных условиях, даже при наличии латерального взаимодействия между соседними молекулами, может реализоваться спиральная пространственная закрутка молекул ДНК, упакованных в частицах дисперсии [8–10].

Таким образом, после формирования частиц дисперсий ДНК свойства этих частиц определяются, главным образом, осмотическим давлением раствора ПЭГ. Это означает, что пространственная структура частиц дисперсии в ПЭГ-содержащих растворах является «замороженной», хотя некоторые диффузионные степени свободы молекул ДНК сохраняются, определяя «жидкостной» характер их упаковки. Постоянство осмотического давления раствора определяет постоянство пространственной структуры частиц дисперсии, а следовательно, фиксированное расстояние между соседними ли-

нейными молекулами ДНК в частицах дисперсии.

Следует отметить, что вопросу об упаковке двухцепочечных молекул ДНК в жидкокристаллических фазах посвящено большое число работ и обзоров (см., например, [2,5–7]). В частности, характер упаковки молекул в жидкокристаллических фазах и структурные превращения между ними могут быть установлены в результате определения рентгенографических параметров образованных фаз, анализа текстур тонких слоев или электронномикроскопических фотографий этих фаз [2,5,11].

Однако вопрос о том, как упакованы двухцепочечные молекулы ДНК в частицах ЖКД, требует проведения дополнительных исследований. Это связано с тем, что «размерный» эффект может приводить к заметным отличиям в способах упаковки молекул в частицах ЖКД от способов их упаковки в жидкокристаллических фазах. Поэтому в работе [12] была начата проверка возможных способов упаковки двухцепочечных молекул ДНК в частицах ЖКД.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы получить дополнительные экспериментальные данные об упаковке двухцепочечных молекул ДНК в частицах ЖКД, сформированных в ПЭГ-содержащих растворах с высокой концентрацией ПЭГ. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу возможности использования для описания таких частиц понятия о «квазинематических» слоях из ориентационно упорядоченных молекул ДНК. Изменение ориентации этих слоев в частицах дисперсии на небольшой угол обеспечивает формирование пространственно-закрученной (холестерической) структуры с характерными для нее физико-химическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат двухцепочечной ДНК из тимуса телят (Sigma, США) с молекулярной массой $(0,6–0,8) \cdot 10^6$ Да. Концентрацию ДНК в водно-солевых растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения ($\lambda = 258,4$ нм, $\epsilon_{\max} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Препарат ПЭГ (Serva, Германия; молекулярная масса 4000 Да) использовали без дополнительной очистки.

Исходный водно-солевой раствор ПЭГ (0,3 М NaCl, $C_{\text{ПЭГ}} = 600$ мг/мл) готовили растворяя навески NaCl и ПЭГ в 0,002 М Na-фосфатном буфере (pH ~ 7,0).

ЖКД ДНК в водно-солевых растворах с разным содержанием ПЭГ ($120 \text{ мг/мл} \leq C_{\text{ПЭГ}} \leq 300 \text{ мг/мл}$) формировали в соответствии с методикой, описанной ранее [2]. Согласно этой методике равные объемы водно-солевых растворов, один из которых содержал ДНК, а другой – ПЭГ (концентрация ДНК и ПЭГ в растворах в два раза превышала требуемые конечные значения), смешивали и полученную смесь интенсивно встряхивали на миксере в течение 1 мин. После этого полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 1 ч для завершения формирования ЖКД ДНК, а затем использовали в работе.

Концентрация ДНК в исследованных ПЭГ-содержащих растворах составляла 30 мкг/мл, а максимальная концентрация ПЭГ – 300 мг/мл.

Спектры поглощения растворов регистрировали при помощи спектрофотометра Cary 100 Scan (Varian, США), а спектры кругового дихроизма (КД) – при помощи портативного дихрометра СКД-2 (разработка Института спектроскопии РАН, Троицк Московской области). Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивности поглощения лево- и правополяризованного света (ΔA ; $\Delta A = (A_L - A_R)$) от длины волны (λ) [13,14].

Во всех случаях использовали прямоугольные кварцевые кюветы (100 QS, Helma, Германия) с длиной оптического пути 1 см.

Температуру в терморегулируемом отсеке дихрометра в интервале от 20 до 80°C устанавливали при помощи программы «Управление температурой», входящей в состав прикладного программного обеспечения дихрометра СКД-2. После установки необходимого значения температуры, кювету, содержащую 2 мл ЖКД ДНК, выдерживали в течение 10 мин в терморегулируемом отсеке и приступали к регистрации спектра КД в интервале длин волн 250–350 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В интервале концентраций ПЭГ до 110 мг/мл молекулы ДНК сохраняют свою принадлежность к В-форме, что подтверждается данными рентгеноструктурного анализа и спектроскопии кругового дихроизма [15–17]. Спектр КД, характерный для линейной В-формы двухцепочечной ДНК, приведен на рис. 1а.

Формирование ЖКД ДНК в растворах ПЭГ с концентрацией в интервале от 120 до 220 мг/мл, т.е. при $C_{\text{ПЭГ}}^{\text{кр}} < C_{\text{ПЭГ}} < C_{\text{ПЭГ}}^{\text{пред}}$ (рис. 1б, область I), сопровождается появлением интенсивной отрицательной полосы в спектре КД,

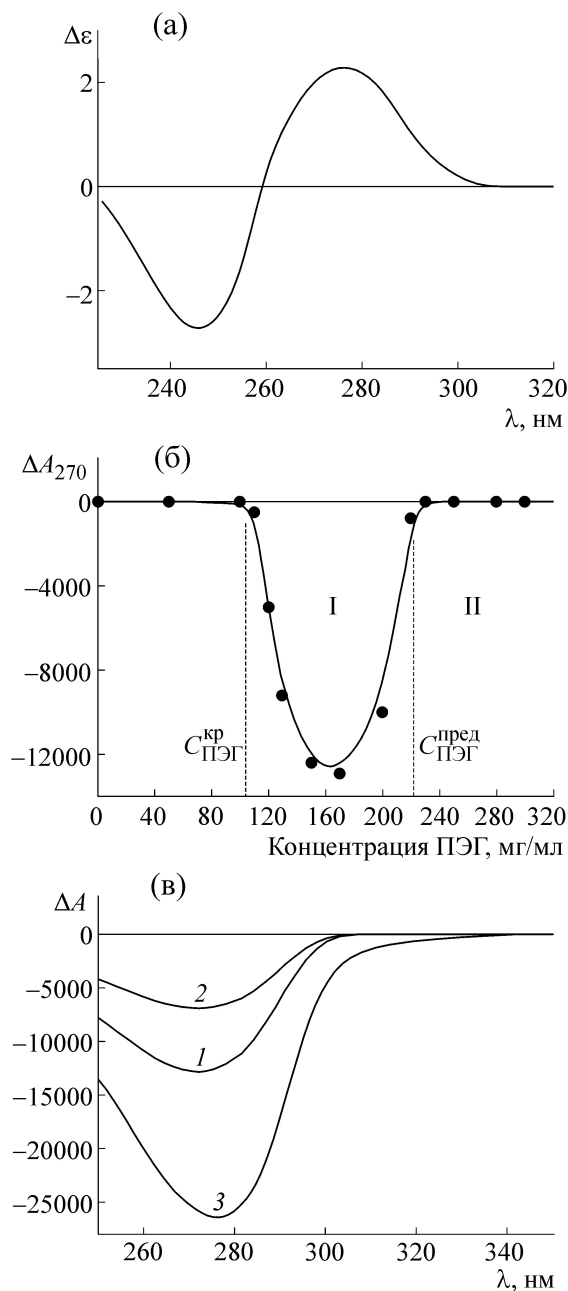


Рис. 1. (а) – Спектр КД водно-солевого раствора линейной двухцепочечной В-формы ДНК: 0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер. (б) – Зависимость амплитуды полосы в спектре КД ДНК ($\lambda = 270 \text{ нм}$) от концентрации ПЭГ: $C_{\text{ДНК}} = 30 \text{ мкг/мл}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер; $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ опт. ед., $L = 1 \text{ см}$, $T = 22^\circ\text{C}$; $C_{\text{ПЭГ}}^{\text{кр}}$ и $C_{\text{ПЭГ}}^{\text{пред}}$ – «критическая» и «предельная» концентрации ПЭГ, определяющие «граничные» условия существования ЖКД с холестерической упаковкой молекул ДНК. (в) – Спектры КД ЖКД ДНК, сформированных в водно-солевом растворе ПЭГ ($C_{\text{ПЭГ}} = 170 \text{ мг/мл}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер), зарегистрированные при разной температуре ($^\circ\text{C}$): 1 – 22, 2 – 80, 3 – 80 → 22; $C_{\text{ДНК}} = 30 \text{ мкг/мл}$, $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ опт. ед.; $L = 1 \text{ см}$.

расположенной в области поглощения хромофоров (азотистых оснований) ДНК (рис. 1в, кривая 1).

При анализе причин появления интенсивной отрицательной полосы в спектре КД необходимо учитывать ряд обстоятельств.

Во-первых, в составе молекул ДНК присутствуют хромофоры (азотистые основания, поглощающие ультрафиолетовое излучение), достаточно жестко фиксированные по отношению к длинной оси молекул ДНК (угол наклона оснований составляет около 90°).

Во-вторых, если исходить из идеологии метода «внешнего» хромофора [13,14], то можно ожидать, что при возникновении пространственно закрученной упаковки соседних молекул ДНК в структуре частиц ЖКД азотистые основания оказываются встроенными («введенными») в такую структуру, поэтому возникающая структура является «окрашенной». Теория [13,14], учитывающая возникновение «дальнего» (ориентационного) порядка в расположении хромофоров в результате формирования слоев из молекул, содержащих хромофоры, и пространственную спиральную закрутку этих слоев, предсказывает появление интенсивной полосы в спектре КД. В частности, в случае формирования холестерической структуры из двухцепочечных молекул ДНК такая полоса должна располагаться в ультрафиолетовой области.

В-третьих, чтобы подчеркнуть принципиальное различие между «молекулярным» круговым дихроизмом (выражаемым в виде величины $\Delta\epsilon$) и «структурным» круговым дихроизмом, отражающим пространственные особенности возникающей структуры, для обозначения интенсивных полос в спектрах кругового дихроизма холестерических ЖКД нуклеиновых кислот, независимо от их знака, был введен термин «аномальная» полоса [13]. Следует иметь в виду, что «молекулярный» круговой дихроизм – это практически постоянная величина, отражающая свойства изолированных азотистых оснований или азотистых оснований в составе линейных молекул ДНК или даже неупорядоченных агрегатов из этих молекул. В частности, величина «молекулярного» кругового дихроизма ($\Delta\epsilon$) лежит в пределах от $2,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (для В-формы ДНК) до $6\text{--}12 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (для А-формы ДНК). В то же время при постоянстве вторичной структуры ДНК и свойств азотистых оснований «структурный» круговой дихроизм зависит от таких параметров частиц ЖКД, как шаг спиральной структуры, размер частиц дисперсии и т.д. [14]. С учетом отмеченных факторов, влияющих на

«структурный» круговой дихроизм, а следовательно, на величину аномальной полосы в спектре КД, амплитуду этой полосы выражают не в виде величины $\Delta\epsilon$, а в виде легкоизмеряемой величины ΔA : $\Delta A = (A_L - A_R)$.

Отрицательная аномальная полоса в спектре КД отражает холестерическую упаковку соседних двухцепочечных молекул ДНК в образующихся частицах ЖКД (с расстоянием между молекулами ДНК от 50 до 30 Å) [18–20]. Этот результат подтвержден наличием классической текстуры «отпечатков пальцев» у тонких слоев фаз, полученных в результате концентрирования частиц холестерической ЖКД двухцепочечной ДНК [2,18–20].

Образование ЖКД ДНК в растворах ПЭГ ($C_{\text{ПЭГ}}$ от 220 до 300 мг/мл, рис. 1б, область II) приводит к формированию дисперсий ДНК, в спектрах КД которых аномальная полоса практически отсутствует (рис. 2, кривая 1).

Регистрация спектров КД дисперсий с высоким разрешением позволяет обратить внимание на тот факт, что в области концентраций ПЭГ от 220 до 300 мг/мл в спектре КД присутствует малоинтенсивная положительная полоса (величина молекулярного кругового дихроизма ($\Delta\epsilon$) которой лежит в пределах $8\text{--}9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (рис. 2а, кривые 2 и 3)). Хотя отнесение малоинтенсивных полос в спектрах КД агрегатов ДНК (в том числе и их дисперсий) к определенной форме нуклеиновых кислот не является однозначным [21], не исключено, что эта полоса указывает на появление в составе частиц ЖКД ДНК фрагментов, соответствующих А-форме [22,23]. Следует отметить, что малоинтенсивная ($\Delta\epsilon \sim 4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) положительная полоса в спектре КД дисперсии ДНК, сформированной при $C_{\text{ПЭГ}} = 300 \text{ мг/мл}$, была впервые зарегистрирована в работе [16]. Однако этот факт практически не учитывался в дальнейших работах, поскольку регистрацию спектров КД проводили, как правило, в оптических шкалах, соответствующих величинам аномальной оптической активности ЖКД, в которых вклад от малоинтенсивной положительной полосы был малозаметным.

Отсутствие аномальной полосы в спектрах КД дисперсий ДНК, сформированных в растворах ПЭГ с $C_{\text{ПЭГ}}$ от 220 до 300 мг/мл, и данные малоуглового рассеяния рентгеновых лучей, свидетельствующие о том, что расстояние между молекулами ДНК в этой области концентраций ПЭГ меняется от 29 до 23 Å, позволяют предположить, что для сформированных частиц ЖКД характерна гексагональная

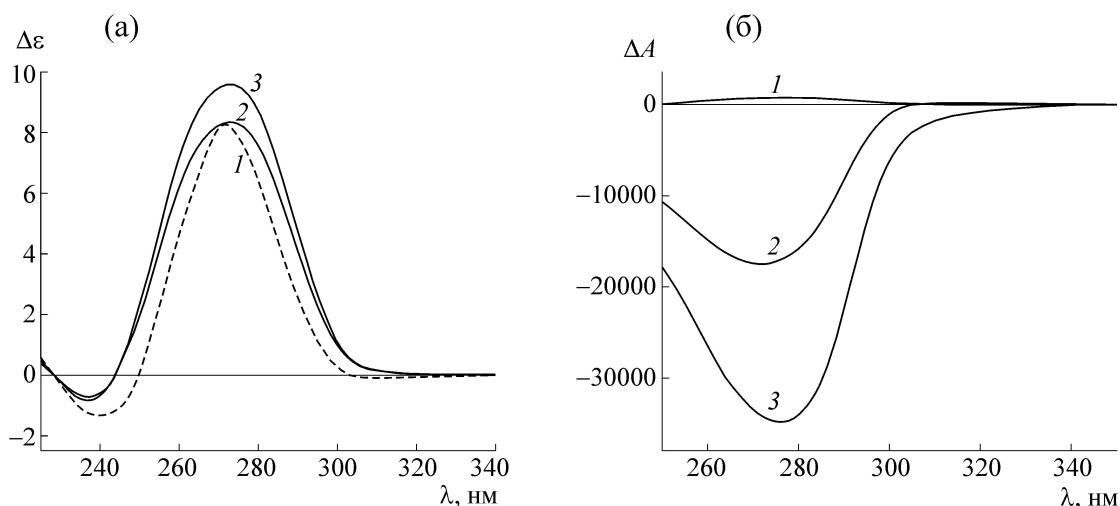


Рис. 2. (а) – Спектры КД водно-солевого раствора (0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер) А-формы ДНК, образующейся в водно-спиртовом растворе (кривая 1) и ЖКД ДНК, сформированных в водно-солевых растворах (0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер) с разной концентрацией ПЭГ (кривая 2 – $C_{\text{ПЭГ}} = 240$ мг/мл; кривая 3 – $C_{\text{ПЭГ}} = 300$ мг/мл). (б) – Спектры КД ЖКД ДНК, сформированных в водно-солевом растворе ПЭГ ($C_{\text{ПЭГ}} = 260$ мг/мл, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-фосфатный буфер), зарегистрированные при разной температуре (°С): 1 – 22, 2 – 80, 3 – 80 → 22; $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл; $\Delta A = (A_L - A_R) \times 10^{-6}$ опт. ед.; $L = 1$ см.

упаковка молекул двухцепочечной ДНК [12,24,25].

Таким образом, в области I концентраций ПЭГ (рис. 1б) фазовое исключение двухцепочечных молекул ДНК приводит к их холестерической упаковке в частицах ЖКД, тогда как в области II образуются частицы ЖКД, имеющие гексагональную упаковку двухцепочечных молекул ДНК.

Нагревание ЖКД двухцепочечной ДНК, сформированной в области I концентраций ПЭГ, приводит к уменьшению (рис. 1в, кривая 2) амплитуды отрицательной аномальной полосы в спектре КД (вплоть до нулевого значения). Этот хорошо изученный процесс [2,13,26,27] носит название «КД-плавления» и соответствует раскрутке пространственной структуры частиц ЖКД и образованию частиц с неупорядоченным расположением соседних молекул ДНК.

Вопрос о влиянии температуры на пространственную организацию двухцепочечных молекул ДНК в частицах ЖКД в области II концентраций ПЭГ оставался до настоящего времени открытым, попытки получить ответ на этот вопрос были начаты в работе [12].

На рис. 2б, в качестве примера, показано изменение спектров КД ЖКД двухцепочечной ДНК ($C_{\text{ПЭГ}} = 260$ мг/мл) при нагревании. Увеличение температуры сопровождается необычным эффектом: у частиц дисперсии ДНК, не имевшей при комнатной температуре аномаль-

ной полосы в спектре КД (рис. 2б, кривая 1), такая полоса появляется (рис. 2б, кривая 2).

Аналогичным образом меняется при нагревании вид спектров КД у частиц ЖКД, сформированных в области $C_{\text{ПЭГ}}$ от 220 до 300 мг/мл, т.е. у всех частиц дисперсий, упаковка двухцепочечных молекул ДНК в которых соответствует гексагональной [5].

На рис. 3 представлены температурные зависимости изменения амплитуды аномальных полос в спектрах КД ЖКД, сформированных в области II концентраций ПЭГ, позволяющие определить некую среднюю температуру перехода ($\tau_{\text{пер}}$) из состояния, в котором аномальная полоса в спектре КД отсутствует, в состояние, характеризуемое аномальной полосой в спектре КД. На рис. 4 показано, что чем выше концентрация ПЭГ, тем выше величина $\tau_{\text{пер}}$.

Таким образом, частицы ЖКД ДНК, сформированные в области II концентраций ПЭГ, могут при увеличении температуры приобретать структурную форму, характеризуемую аномальной оптической активностью. При этом величина амплитуды возникающей аномальной полосы в спектре КД заметно превышает амплитуду, характерную для частиц холестерической дисперсии ДНК (рис. 1в, кривая 1).

Поскольку аномальная полоса в спектре КД является доказательством в пользу холестерической упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии, можно предполагать, что ее появление у частиц ЖКД, сформированных в области

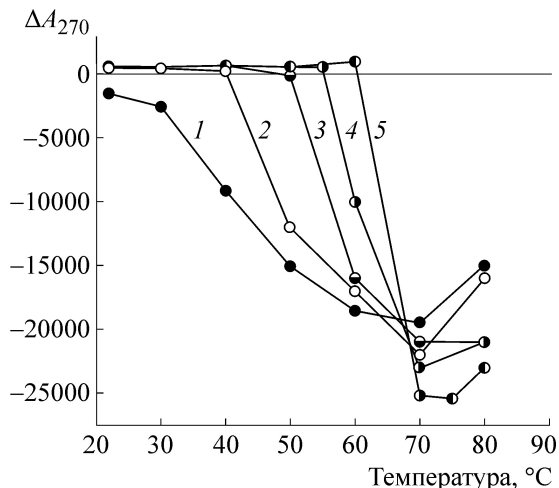


Рис. 3. Температурные зависимости амплитуды аномальной полосы в спектрах КД ЖКД ДНК ($\lambda = 270$ нм), сформированных в водно-солевых растворах с разной концентрацией ПЭГ: 1 – 220 мг/мл, 2 – 240 мг/мл, 3 – 260 мг/мл, 4 – 280 мг/мл, 5 – 300 мг/мл; $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-фосфатный буфер; $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ опт. ед., $L = 1$ см. Стрелкой показан способ определения среднего значения температуры фазового перехода ($\tau_{\text{пер}}$).

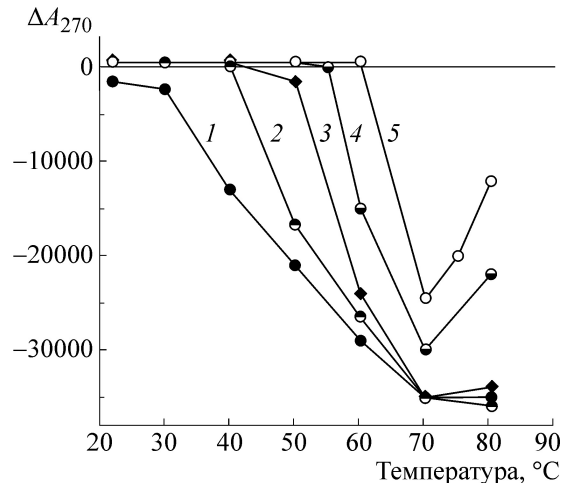


Рис. 5. Температурные зависимости амплитуды аномальной полосы в спектрах КД ЖКД ДНК ($\lambda = 270$ нм), сформированных при комнатной температуре, нагретых интервале от 30 до 80°C и охлажденных до комнатной температуры: 1 – $C_{\text{ПЭГ}} = 220$ мг/мл, 2 – $C_{\text{ПЭГ}} = 240$ мг/мл, 3 – $C_{\text{ПЭГ}} = 260$ мг/мл, 4 – $C_{\text{ПЭГ}} = 280$ мг/мл, 5 – $C_{\text{ПЭГ}} = 300$ мг/мл; $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер; $\Delta A_{270} \times 10^{-6}$ опт. ед., $L = 1$ см.

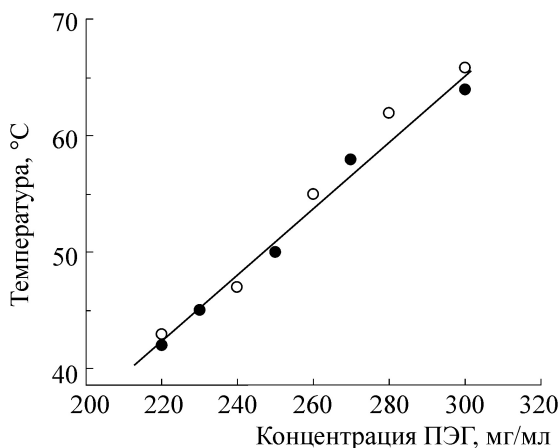


Рис. 4. Зависимость температуры перехода ($\tau_{\text{пер}}$) ЖКД ДНК из состояния, не имеющего аномальной полосы в спектре КД, в состояние, характеризующееся аномальной полосой в спектре КД, от концентрации ПЭГ; $C_{\text{ДНК}} = 30$ мкг/мл, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na-фосфатный буфер. Разные точки относятся к разным сериям опытов.

$C_{\text{ПЭГ}}$ от 220 до 300 мг/мл, отражает температурно-индуцированный переход от гексагональной к холестерической упаковке молекул ДНК.

Охлаждение ЖКД ДНК, сформированных в области I концентраций ПЭГ, сопровождается не только восстановлением аномальной полосы в спектре КД, но и увеличением ее амплитуды (рис. 1в, кривая 3). Такой эффект вполне со-

ответствует представлению об улучшении характера упаковки двухцепочечных молекул ДНК в холестерической структуре частиц дисперсии в результате их «термической тренировки» [28–30].

Однако понижение температуры ЖКД ДНК, сформированных в области II концентраций ПЭГ, не приводит к восстановлению аномальной оптической активности до практически нулевого значения, характерного для исходной гексагональной упаковки (рис. 2б, кривая 1). Вместо этого наблюдается еще один необычный оптический эффект, а именно, величина аномальной оптической активности еще более увеличивается (рис. 2б, кривая 3 и рис. 5).

Необходимо отметить, что «кажущаяся» оптическая плотность (A_k) в спектре поглощения дисперсии ДНК в области длин волн, превышающих 300 нм, увеличивается при уменьшении температуры. Оценки, основанные на использовании уравнения $A_k = K \times \lambda^{-n}$, где величина n – связана с размером частиц [2], показывают (без учета зависимости n от концентрации ДНК и ПЭГ), что величина n меняется незначительно. Это означает, что даже если увеличение величины A_k и обусловлено незначительным ростом размера частиц ЖКД, то такой рост не может вызывать [14] столь сильное увеличение амплитуды аномальной полосы в спектрах КД, как показано на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе полученных результатов, необходимо иметь в виду следующее.

1. При увеличении температуры ПЭГ-содержащего раствора его вязкость уменьшается, а уход молекул воды от полимерной цепи ПЭГ приводит к падению осмотического давления раствора [31–33]. В этих условиях диффузионная подвижность соседних молекул ДНК в частицах ЖКД увеличивается. Увеличение подвижности молекул ДНК может приводить не только к изменению характера взаимодействия соседних молекул, но и, возможно, способа их упаковки.

Следует обратить внимание также на то, что при высокой концентрации ПЭГ может происходить не только конденсация молекул ДНК, но и их дегидратация, сопровождаемая появлением фрагментов ДНК, соответствующих А-форме (что может отражаться в появлении малоинтенсивной положительной полосы в спектре КД, величина молекулярного кругового дихроизма которой лежит в пределах от 6 до $12 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [21,34,35]). Можно вслед за авторами работ [20,23,36–38] допустить, что при дегидратации, определяемой высокой концентрацией ПЭГ, жесткие, линейные двухцепочечные молекулы ДНК (или фрагменты этих молекул) могут переходить из В- в А-форму и конденсироваться именно в такой форме. Однако такое изменение вторичной структуры линейных двухцепочечной ДНК принципиально не влияет на их способность к образованию частиц ЖКД (при их фазовом исключении из раствора ПЭГ) и на гексагональную упаковку соседних молекул в частицах дисперсии [2]. Контрольные опыты с использованием двухцепочечных молекул синтетического полирибонуклеотида полиИ·полиЦ, принадлежащих к А-семейству, показали, что в результате нагревания частиц ЖКД этих молекул, сформированных в растворах ПЭГ с высокой концентрацией (от 220 до 300 мг/мл), можно индуцировать аномальную *положительную* полосу в спектре КД. Амплитуда этой полосы в разных условиях не превышает $10000 \cdot 10^{-6}$ опт. ед. (неопубликованные данные). Особенности этого процесса в данной работе не анализировались в связи с тем, что в случае двухцепочечных молекул полиИ·полиЦ возможен температурный переход между холестерическими структурами, имеющими разное направление пространственной закрутки [39–41].

(Следует отметить также, что результаты, полученные при помощи рентгенографического анализа неориентированных образцов фаз, сформированных в результате концентрирования частиц ЖКД, образованных в растворах с

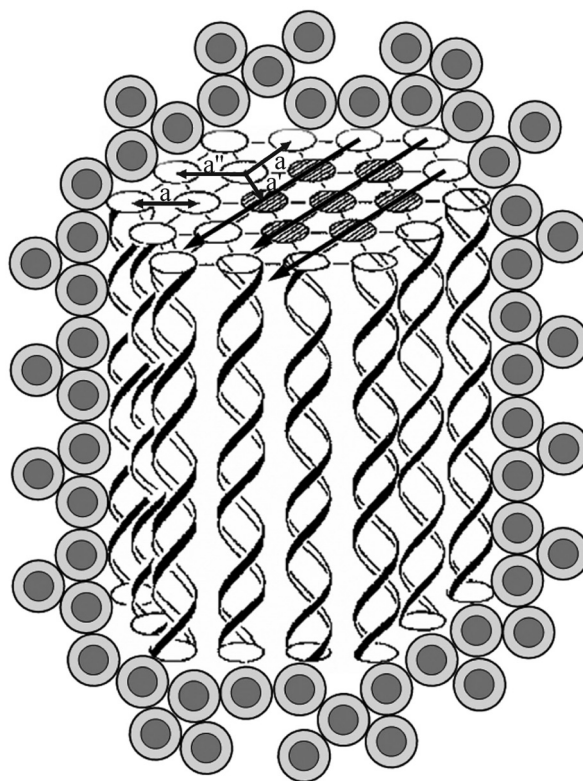


Рис. 6. Гипотетическая схема гексагональной упаковки линейных, двухцепочечных молекул ДНК в частице дисперсии, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ (двойные кружки). Стрелками выделены квазинематические «слои» из молекул ДНК.

концентрацией ПЭГ 300 мг/мл, свидетельствуют в пользу преимущественной принадлежности молекул ДНК к В-форме [15,16].)

2. При охлаждении ПЭГ-содержащего раствора до комнатной температуры вязкость раствора увеличивается, а осмотическое давление раствора, «сжимающее» пространственную структуру частиц ЖКД ДНК, нарастает [32,33]. В этих условиях диффузионная подвижность молекул ДНК в частицах ЖКД дисперсии уменьшается.

3. Очевидно, что максимальная плотность упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии достигается при гексагональной упаковке этих молекул (рис. 6). Показанная структура не есть структура настоящего кристалла, поскольку в ней возможны различные типы смещения молекул ДНК друг относительно друга. Такую упаковку можно описать в терминах ориентационно упорядоченных «слоев» [25,42–45] из соседних молекул ДНК (выделены стрелками на рис. 6), которые называют «квазинематическими» [45]. Мы будем использовать этот термин при дальнейшем обсуждении.

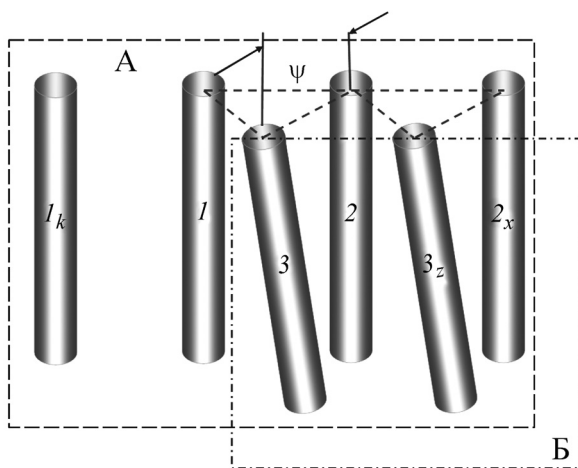


Рис. 7. Схематическое изображение «триад». «Триада» представляет собой комбинацию из двух молекул ДНК (1 и 2), расположенных в одном «слое» (слой (А), показан пунктиром), и третьей молекулы ДНК (3), повернутой на угол ψ в параллельном «слое» (слой (Б), показан штрих-пунктиром).

Схема фиксации молекул ДНК в частице ЖКД (рис. 6) показывает, что спиральная (холестерическая) закрутка молекул ДНК возможна только в том случае, если соседние «квазинематические» слои повернуты в пространстве. Это означает, что появление аномальной оптической активности при нагревании частиц ЖКД с исходной гексагональной упаковкой молекул ДНК (рис. 3) связано с изменением пространственной структуры этих частиц.

Очевидно, что увеличение температуры сопровождается ростом диффузионной подвижности молекул ДНК в частицах ЖКД. В этом случае может быть применено правило Линдемана [46] для кристаллов. Согласно этому правилу, при увеличении температуры амплитуда колебаний атомов в кристаллической структуре увеличивается; когда она достигает некоторой критической величины (приблизительно 0,1 межатомного расстояния в кристаллической решетке), кристаллическая упаковка становится подвижной и может произойти плавление кристаллической структуры. Применение правила Линдемана для случая частиц ЖКД ДНК позволяет предположить, что при некоторой характерной температуре ПЭГ-содержащего раствора амплитуда диффузионных смещений и поворотов соседних молекул ДНК в гексагональной фазе (гексагональной структуре, рис. 6) достигает критической величины. Гексагональная упаковка становится лабильной и (при отсутствии других внешних воздействий) система хотела бы перейти в изотропное состояние (т.е. должно было бы произойти «плавление» гексагональной структуры). Поскольку в нашем

случае переход молекул ДНК в изотропное состояние невозможен по стерическим причинам (в силу «сжимающего» осмотического давления раствора ПЭГ), мы можем ожидать, что вместо полного «плавления» гексагональной структуры может произойти другой фазовый переход. В связи с высоким осмотическим давлением стабильной может оказаться пространственная спирально закрученная (холестерическая) структура, и формирование такой структуры должно привести к появлению аномальной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований. Это произойдет ниже гипотетической (не достигаемой) температуры «плавления». Причина для такого перехода состоит в том, что частичная потеря ориентационной энтропии (за счет перехода в упорядоченную холестерическую структуру) компенсируется за счет вклада в свободную энергию, связанного с ориентационной упругостью хиральных молекул ДНК. Действительно, так как и сами молекулы ДНК (и основные силы взаимодействия между ними) являются нецентросимметричными (хиральными), их параллельное упорядочение невыгодно с точки зрения ориентационной упругой энергии Франка. При параллельной ориентации хиральных молекул ДНК система проигрывает в ориентационной упругой энергии кручения, определяемой константой упругости Франка K_{22} и шагом P оптимальной холестерической упаковки хиральных молекул. Проигрыш в энергии на единицу объема от параллельного упорядочения хиральных молекул ДНК может быть грубо оценен как K_{22}/P^2 , где K_{22} – упругий модуль кручения Франка, а P – шаг оптимальной спиральной структуры.

Поэтому нагревание частиц ЖКД с гексагональной упаковкой соседних «квазинематических» слоев из двухцепочечных молекул ДНК приводит к фазовому переходу «гексагональная → холестерическая» упаковка молекул ДНК в пределах частиц ЖКД.

Правило Линдемана позволяет нам говорить, что имеется еще один фактор (помимо осмотического давления раствора), а именно температура, которая определяет формирование частиц ЖКД с различными способами упаковки молекул ДНК.

Простейшая иллюстрация наблюдаемых оптических эффектов основана на учете теоретических результатов, описывающих образование холестерической фазы из молекул ДНК [6,9]. Авторы предложили использовать «трады» из линейных молекул ДНК (рис. 7) в качестве строительных блоков, определяющих свойства этой фазы. Применение такой модели для слу-

чая частиц ЖКД ДНК позволяет нам рассмотреть следующий сценарий перехода «гексагональная → холестерическая» структура.

Предположим, что в стабильной гексагональной структуре, показанной на рис. 6, молекулы ДНК действительно образуют «квазинематические» слои. Условно обозначим два соседних слоя как слой (А) и слой (Б). Первоначально молекулы ДНК в этих слоях имеют гексагональную упаковку. В принципе при увеличении температуры раствора должно произойти «плавление» гексагональной структуры, и молекулы ДНК должны перейти в изотропное состояние. Однако применение правила Линдемана позволяет рассмотреть совсем другую возможность. При нагревании, в условиях повышенной диффузионной подвижности молекул ДНК и пониженного осмотического давления раствора ПЭГ, появляется возможность для флуктуационного смещения соседних молекул 1 и 2 (слой А) и усиления их латерального взаимодействия, сопровождаемого их фиксацией на определенном расстоянии в плоскости (в одном «квазинематическом» слое). Образуется «ансамбль» из этих молекул. Если молекулы I_k , I_l или 2_x , 2_y и т.д. из этой же плоскости приближаются к «ансамблю», то это приводит лишь к увеличению размера первоначального ансамбля. В этих условиях молекула 3 (соседнего слоя Б) должна «чувствовать» хиральность пространственной формы не каждой молекулы 1 или 2 отдельно (как это было при исходной гексагональной упаковке), а объединенную хиральность «ансамбля» из молекул 1 и 2, которая должна отличаться от хиральности исходных молекул. В результате изменения характера взаимодействия между молекулой 3 и хиральным «ансамблем» из молекул 1 и 2 произойдет поворот молекулы 3 в пространстве [47,48]. Возникает «триадная» структура (рис. 7), которая станет основой для формирования зародыша (ядра) новой фазы. Последующий поворот всего слоя (Б), а следовательно, и соседних «квазинематических» слоев, приводит к росту зародыша до критического размера, необходимого для формирования новой фазы из метастабильной гексагональной фазы. (В принципе рост критического зародыша за счет диффузии соседних слоев может и не требовать дополнительных термоактивационных процессов.) Возникающая новая, спирально закрученная фаза будет представлять собой холестерик ДНК и будет обладать аномальной оптической активностью.

Рассмотренный «триадный» механизм в сочетании с различиями между рис. 3 и 5 свидетельствует о дуализме действия температуры.

С одной стороны, температура вызывает образование зародыша новой фазы и его рост. С другой стороны, температура увеличивает флуктуации соседних «квазинематических» слоев и препятствует их упорядоченному пространственному расположению в структуре частиц дисперсии. Поэтому лишь при понижении температуры, когда возрастает осмотическое давление раствора, «сжимающее» соседние молекулы и слои ДНК, когда уменьшается диффузионная подвижность молекул ДНК, должно наблюдаться не только точное пространственное упорядочение «квазинематических» слоев из молекул ДНК, но и их «замораживание» в пределах вновь сформированной холестерической структуры. Это означает, что при понижении температуры переход в исходную гексагональную структуру становится практически невозможным как по кинетическим соображениям, так и в связи с изменением характера взаимодействия между соседними молекулами ДНК.

Результаты, приведенные на рис. 5, можно рассматривать как подтверждение высказанной гипотезы. Действительно, рис. 5 показывает, что понижение температуры ЖКД приводит к заметному росту аномальной полосы в спектре КД, расположенной в области поглощения азотистых оснований ДНК.

Также можно обратить внимание на следующее. Если при комнатной температуре вязкость (концентрация) раствора ПЭГ такова, что при ней обеспечивается высокая скорость диффузии соседних молекул ДНК, то «сжимающее» осмотическое давление будет приводить не только к латеральному взаимодействию соседних молекул 1 и 2, но и обеспечивать поворотное смещение молекулы 3 (рис. 7). При этих условиях будет возникать пространственно-закрученная (холестерическая) структура частиц дисперсии ДНК (с расстоянием между молекулами ДНК от 50 до 30 Å) [2,5]. Однако при увеличении вязкости раствора ПЭГ (т.е. при увеличении осмотического давления), когда скорость диффузии молекул ДНК падает, осмотическое давление будет обеспечивать только латеральное взаимодействие соседних молекул 1, 2 и 3. В этих условиях при комнатной температуре угол Ψ (рис. 7) между «квазинематическими» слоями будет стремиться к нулевому значению и при обращении величины Ψ в ноль будет реализовываться гексагональная упаковка молекул ДНК. Следовательно, существуют условия, при которых анизотропные свойства молекул ДНК не обеспечивают достаточного вклада в свободную энергию взаимодействия молекул ДНК и реализуется их гексагональная упаковка в частицах ЖКД. Дру-

гими словами, энтропия упаковки жестких, линейных двухцепочечных молекул ДНК будет превышать энергетический вклад, обусловленный хиральными свойствами этих молекул [49].

Однако ситуация меняется при изменении температуры. Наши результаты показывают, что чем выше температура ПЭГ-содержащего раствора, тем выше тенденция «квазинематических» слоев, образованных хиральными молекулами ДНК, к холестерической, а не гексагональной упаковке.

ВЫВОДЫ

В заключение нужно сказать следующее. Результаты, полученные в настоящей работе, могут быть объяснены с учетом концепции о существовании упорядоченных «квазинематических» слоев с их параллельной ориентацией в гексагональной структуре частиц ЖКД ДНК. При повышении температуры характер упаковки линейных двухцепочечных молекул ДНК в частицах ЖКД меняется, а именно, температура индуцирует поворот соседних слоев в пространстве. В результате этого процесса происходит фазовый переход и вместо гексагональной структуры возникает пространственно-закрученная геликоидальная структура (холестерическая фаза) частиц ЖКД ДНК. Таким образом, способ упаковки соседних «квазинематических» слоев определяет физико-химические свойства частиц ЖКД ДНК, которые зависят не только от осмотического давления раствора, но и от его температуры. Следует отметить также, что обнаруженный эффект значительной амплификации аномальной отрицательной полосы в спектре КД открывает дорогу для создания принципиально новых типов оптических тест систем, в которых могут быть использованы биодатчики на основе частиц ЖКД с гексагональной упаковкой молекул двухцепочечной ДНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00041).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, and G. B. Lortkipanidze, *Liq. Cryst.* **12** (1), 1 (1992).
2. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. V. Semenov, and S. G. Skuridin, *DNA liquid-crystalline dispersions and nanoconstructions* (CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton-London-New York, 2011).
3. Ю. М. Евдокимов, В. И. Салаянов, М. Н. Саватеев и др., *Технол. живых систем* **10** (1), 20 (2013).
4. A. Goldar, H. Thomson, and J. M. Seddon, *J. Phys.: Condens. Matter*, **20**, 035102 (2008).
5. F. Livolant and A. Leforestier, *Prog. Polym. Sci.* **21** (6), 1115 (1996).
6. A. A. Kornyshev, D. J. Lee, S. Leikin, and A. Wynveen, *Rev. Mod. Phys.* **79** (3), 943 (2007).
7. T. Bellini, R. Cerbino, and G. Zanchetta, *Top. Curr. Chem.* **318**, 225 (2012).
8. M. Leonard, H. Hong, N. Easwar, and H. N. Strey, *Polymer* **42** (13), 5823 (2001).
9. A. A. Kornyshev, S. Leikin, and S. V. Malinin, *Eur. Phys. J.* **E7**, 83 (2002).
10. A. G. Cherstvy, *J. Phys. Chem. B* **112** (40), 12585 (2008).
11. С. А. Пикин, *Структурные превращения в жидких кристаллах* (Наука, М., 1981).
12. Ю. М. Евдокимов, С. Г. Скуридин, В. И. Салаянов и др., *Биофизика* **60** (5), 861 (2015).
13. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, S. G. Skuridin, et al., *The CD spectra of double-stranded DNA liquid crystalline dispersions* (Nova Science Publishers, N.Y., 2011).
14. С. В. Семенов и Ю. М. Евдокимов, *Биофизика* **60** (2), 242 (2015).
15. Ю. М. Евдокимов, Т. Л. Пятигорская, О. Ф. Поливцев и др., *Молекуляр. биология* **10** (6), 1221 (1976).
16. S. G. Skuridin, H. Damaschun, G. Damaschun, et al., *Stud. Biophys.* **112** (2–3), 139 (1986).
17. D. Durand, J. Doucet, and F. Livolant, *J. Phys. II* **2** (9), 1769 (1992).
18. F. Livolant, *Eur. J. Cell Biol.* **33** (2), 300 (1984).
19. R. L. Rill, T. E. Strzelecka, M. W. Davidson, and D. H. van Winkle, *Physica A* **176** (1), 87 (1991).
20. A. Leforestier and F. Livolant, *Biophys. J.* **65** (1), 56 (1993).
21. V. Bloomfield, D. M. Crothers, and I. Tinoko, *Physical chemistry of nucleic acids* (Harper & Row Publishers, N.Y., Evanston, San-Francisco, London, 1974).
22. J. Piskur and A. Rupprecht, *FEBS Lett.* **375** (3), 174 (1995).
23. R. Podgornik, H. N. Strey, K. Gawrisch, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (9), 4261 (1996).
24. F. Livolant, A. M. Levelut, J. Doucet, and L. P. Benoit, *Nature* **339** (6227), 724 (1989).
25. F. Livolant, *J. Mol. Biol.* **218** (1), 165 (1991).
26. Ю. М. Евдокимов, Т. Л. Пятигорская, Н. А. Белозерская и др., *Молекуляр. биология* **11** (3), 507 (1977).
27. D. Grasso, S. Fasone, C. La Rosa, and V. Salyanov, *Liq. Cryst.* **9** (2), 299 (1991).
28. А. С. Сонин, *Введение в физику жидких кристаллов* (Наука, М., 1983).
29. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, and V. I. Salyanov, *Liq. Cryst.* **3** (11), 1443 (1988).
30. N. Sundaresan, Th. Thomas, Th. J. Thomas, and C. K. S. Pillai, *Macromol. Biosci.* **6** (1), 27 (2006).
31. E. M. Burlyn M. R. Kaufman, *Plant Physiol.* **51** (5), 914 (1973).

32. E. M. Burlyn, *Plant Physiol.* **72** (1), 66 (1983).
33. C. B. Stanley and H. H. Strey, *Macromolecules* **36** (18), 6888 (2003).
34. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat, et al., *J. Mol. Biol.* **87** (4), 817 (1974).
35. J. C. Girod, W. C. Jonnson, S K. Huntington, and M. F. Maestre, *Biochemistry* **12** (25), 5092 (1973).
36. A. A. Kornyshev and S. Leikin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (23), 13579 (1998).
37. L. Rudd, D. J. Lee, and A. A. Kornyshev, *J. Phys.: Condens. Matter* **19** (41), 416103 (2007).
38. D. Sanyal, *Phys. Rev. E: Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **81** (3, Pt 1), 032901 (2010).
39. Г. Б. Лорткипанидзе, Ю. М. Евдокимов, В. А. Кадьков и Я. М. Варшавский, *Молекуляр. биология* **14** (6), 1378(1980).
40. С. Г. Скуридин, Н. С. Бадаев, А. Т. Дембо и др., *Молекуляр. биология* **5** (21), 1386 (1987).
41. S. G. Skuridin, N. S. Badaev, A. T. Dembo, et al., *Liq. Cryst.* **1** (3), 51 (1988).
42. С. П. Папков и В. Г. Куличихин, *Жидкокристаллическое состояние полимеров* (Химия, Москва, 1977).
43. A. Gautier, L. Michel-Salamin, E. Tosi-Couture, et al., *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **97** (1–3), 10 (1986).
44. T. T. Nguyen, arXiv:1508.02085v1 [q-bio.BM] 9 Aug 2015.
45. Г. С. Чилая и Л. Н. Лисецкий, *Успехи физ. наук* **134** (2), 279 (1981).
46. F. A. Lindemann, *Physik. Z.* **11** (14), 609 (1910).
47. R. Podgornik and V. A. Parsegian, *Phys. Rev. Lett.* **80** (7), 1560 (1998).
48. M. Kanduc, J. Dobnikar, and R. Podgornik, *Soft Matter* **5** (4), 868 (2009).
49. E. Grelet, *Phys. Rev. Lett.* **100** (16), 168301 (2008).

Temperature-Induced Change of Double-Stranded DNA Molecule's Packing in Liquid-Crystalline Dispersion Particles

Yu.M. Yevdokimov*, S.G. Skuridin*, V.I. Salyanov*, and E.I. Kats**

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Landau Institute for Theoretical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 2, Moscow, 119334 Russia*

The circular dichroism spectra of liquid-crystalline dispersions obtained as a result of phase exclusion of linear, double-stranded DNA molecules in water-salt solutions of poly(ethylene glycol) ($120 \text{ mg/ml} \leq C_{\text{PEG}} \leq 300 \text{ mg/ml}$) were studied. The formation of liquid-crystalline dispersions at poly(ethylene glycol) concentrations of 120-200 mg/ml is accompanied by the appearance of an abnormal negative band in the circular dichroism spectrum that provides evidence of cholesteric packaging of double-stranded DNA molecules in the dispersion particles. At poly(ethylene glycol) concentrations of 220 mg/ml and room temperature the liquid-crystalline dispersions without the abnormal band in the circular dichroism spectrum are formed. This result produces the proof of hexagonal packing of double-stranded DNA molecules in the dispersion particles. Heating of optically inactive liquid-crystalline dispersions induces their transition to the state characterized by abnormal negative band in the circular dichroism spectrum. This phenomenon is considered as a "hexagonal \rightarrow cholesteric" phase transition. We suggest the quality mechanism of such transition in terms of "quasinematic" layers formed by double-stranded DNA molecules that change their spatial orientation through competition of solvent osmotic pressure effects, the orientation of the cholesteric elastic packing and thermal fluctuations.

Key words: DNA liquid-crystalline dispersion particles, circular dichroism, abnormal optical activity, hexagonal and cholesteric packing of DNA molecules, "quasinematic" layers, a "hexagonal cholesteric" phase transition