

# ИЗМЕНЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИЧЕСКОЙ ЗАКРУТКИ СОСЕДНИХ МОЛЕКУЛ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, ИНДУЦИРОВАННОЕ КАТИОНАМИ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

*Ю. М. Евдокимов\*, В. И. Салянов, О. В. Кондрашина*

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарда Российской академии наук  
119991, Москва, Россия*

*А. А. Гасанов*

*Научно-исследовательский и проектный институт «Гиредмет»  
119017, Москва, Россия*

*Э. В. Штыкова, К. А. Дембо*

*Институт кристаллографии им. М. В. Шубникова Российской академии наук  
119333, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 30 августа 2006 г.

Определены некоторые физико-химические характеристики частиц холестерических жидкокристаллических дисперсий комплексов двухцепочечных нуклеиновых кислот с редкоземельными элементами. Впервые показано, что связывание катионов редкоземельных элементов с линейными молекулами нуклеиновых кислот, упорядоченными в структуре частиц холестерических жидкокристаллических дисперсий, сопровождается не только амплификацией аномальной полосы в спектре кругового дихроизма, но и исчезновением характерного максимума на кривых рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами. Переход холестерик 1–холестерик 2, индуцированный катионами редкоземельных элементов, представляет собой пример работы микроскопической машины, состоящей из упорядоченных в пространстве молекул нуклеиновых кислот. Частицы холестерических жидкокристаллических дисперсий комплексов нуклеиновых кислот с редкоземельными элементами сохраняют аномальные оптические свойства в течение длительного времени.

PACS: 61.30.-v, 61.30.St, 61.30.Pq

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В работах [1–6] показано, что при взаимодействии катионов редкоземельных элементов (РЗЭ) с линейными двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот (ДНК или синтетического полирибонуклеотида поли(И)×поли(Ц)) спектры кругового дихроизма (КД) этих молекул меняют свою форму. В частности, при низкой ионной силе раствора спектр КД, характерный для линейной, правоспиральной *B*-формы ДНК, при величине  $r_{total}$  ( $r_{total}$  — отношение молярной концентрации РЗЭ в растворе к молярной концентрации оснований ДНК) рав-

ной примерно 0.5 становится подобным спектру КД левоспиральной *Z*-формы ДНК [2, 5]. При высокой ионной силе (примерно 0.3) этот переход, хотя и наблюдается, однако проявляется в спектре КД не столь заметно. Изменение формы спектра КД свидетельствует о том, что регулярный характер вторичной структуры линейных ДНК нарушается, что, согласно работам [1–3], может быть следствием образования комплексов редкоземельных элементов с парами оснований. Кроме того, было обращено внимание на то, что свойства частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов нуклеиновых кислот с редкоземельными элементами отличаются от свойств частиц дисперсий, сформированных из исходных линейных молекул двухцепочечных ну-

\*E-mail: yevdokim@eimb.ru

клеиновых кислот [6].

В настоящей работе начато детальное исследование физико-химических свойств частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов двухцепочечных нуклеиновых кислот с редкоземельными элементами. Основное внимание при этом уделено свойствам холестерических жидкокристаллических дисперсий комплексов (ДНК-гадолиний).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовался дополнительно очищенный от примесей и деполимеризованный препарат двухцепочечной ДНК тимуса теленка («Sigma») и препарат двухцепочечного полирибонуклеотида поли(И)×поли(Ц) («Sigma»). Деполимеризация ДНК проводилась при помощи ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (Россия). Молекулярная масса ДНК после ультразвуковой деполимеризации составляла  $(0.6-0.8) \cdot 10^6$  Да.

Использовали препараты хлоридов солей редкоземельных элементов (гадолиния, лантана, неодима, празеодима, самария, тербия и иттербия, чистота — 99.99%), предоставленные Государственным институтом редких металлов (Москва, Россия).

Использовались препараты полиэтиленгликоля (ПЭГ; «Fluka», Швейцария; молекулярная масса ПЭГ 4000 Да).

Формирование холестерической жидкокристаллической дисперсии на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот в результате их фазового исключения из ПЭГ-содержащих водно-солевых (NaCl) растворов описано ранее [7].

В физико-химическом смысле исследуемая система представляет собой частицы жидкокристаллической дисперсии двухцепочечных ДНК, изотропно распределенные в водно-солевом растворе ПЭГ. Наличие в спектре КД аномальной полосы с максимумом при  $\lambda \approx 260$  нм свидетельствует об образовании частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии во всех изученных системах.

Комплекс холестерической жидкокристаллической дисперсии с РЗЭ (нуклеиновая кислота–РЗЭ) формировался путем обработки холестерической жидкокристаллической дисперсии исходной двухцепочечной ДНК водными растворами солей РЗЭ.

Спектры поглощения нуклеиновых кислот, холестерических жидкокристаллических дисперсий нуклеиновых кислот и холестерических жидкокристаллических дисперсий комплексов (нуклеиновая кислота–РЗЭ) регистрировали при помощи спектро-

фотометра «Specord M-40»; а спектры кругового дихроизма — при помощи портативного дихрометра СКД-2 производства Института спектроскопии РАН, г. Троицк.

Рентгенографический анализ образцов холестерических жидкокристаллических фаз комплексов (ДНК– $Gd^{3+}$ ) проводился согласно описанной ранее методике [8].

Морфология частиц холестерических жидкокристаллических комплексов (ДНК– $Gd^{3+}$ ) исследовалась при помощи атомного силового микроскопа P47-SPM-MDT [8].

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Спектры кругового дихроизма частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, обработанных ионами редкоземельных элементов

На рис. 1 в качестве примера сопоставлены спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК в отсутствие (кривая 1) и в присутствии  $GdCl_3$  (кривые 2–6). Исходная холестерическая жидкокристаллическая дисперсия ДНК ха-

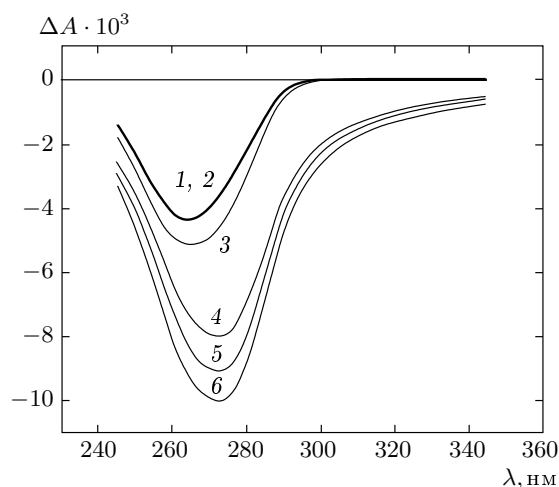


Рис. 1. Спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, сформированной в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе в отсутствие (кривая 1) и присутствии (кривые 2–6)  $GdCl_3$ :  $C_{DNA} = 10$  мкг/мл;  $C_{NaCl} = 0.3$  М;  $C_{PEG} = 170$  мг/мл; 1 —  $C_{GdCl_3} = 0$ , 2 —  $C_{GdCl_3} = 2.49 \cdot 10^{-4}$ , 3 —  $C_{GdCl_3} = 4.97 \cdot 10^{-4}$ , 4 —  $C_{GdCl_3} = 9.9 \cdot 10^{-4}$ , 5 —  $C_{GdCl_3} = 1.48 \cdot 10^{-3}$ , 6 —  $C_{GdCl_3} = 2.92 \cdot 10^{-3}$ ,  $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$  отн. ед.

рактируется аномальной полосой в спектре КД с максимумом при  $\lambda \approx 260$  нм. Отрицательный знак аномальной полосы свидетельствует о том, что для частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, образованных правоспиральными двухцепочечными молекулами ДНК (B-форма), характерна левая закрутка их холестерической пространственной структуры [9]. Амплитуда этой аномальной полосы зависит как от угла закрутки холестерика, образованного молекулами ДНК, так и от угла, под которым хромофоры (азотистые основания) ориентированы по отношению к оси спиральной молекулы ДНК [9]. Кроме того, свойства этих хромофоров определяют положение максимума аномальной полосы в спектре КД. Следует отметить, что частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК существуют при определенном осмотическом давлении водно-солевого раствора, задаваемом высокой концентрацией ПЭГ в растворе [10].

Рисунок 1 показывает, что в области низкой концентрации  $GdCl_3$  амплитуда аномальной полосы в спектре КД частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии остается неизменной, несмотря на увеличение концентрации  $GdCl_3$  в растворе (кривые 1, 2). При определенной концентрации  $GdCl_3$  происходит увеличение амплитуды аномальной полосы в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК- $Gd^{3+}$ ) приблизительно в 2 раза, а максимум полосы смещается на 10 нм в сторону длинных волн (кривая 6).

Аналогичные изменения формы спектров КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК отмечены в тех случаях, когда эти холестерические жидкокристаллические дисперсии обрабатывались высокими концентрациями солей других РЗЭ (лантана, неодима, самария, тербия). Кроме того, в случае холестерической жидкокристаллической дисперсии, сформированной из двухцепочечных молекул поли(И)×поли(Ц) и имеющей аномальную положительную полосу в спектре КД, также наблюдается амплификация этой полосы и смещение ее максимума в красную область спектра (данные не показаны).

Наблюдаемые изменения формы спектра КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, в принципе, аналогичны изменениям спектров КД этих же холестерических жидкокристаллических дисперсий при «сшивании» соседних молекул ДНК за счет образования между ними наномостиков [11]. Такое «сшивание» приводит к исчезновению «жидкостного» характера упаковки молекул ДНК в частицах холестерической жидкокристалли-

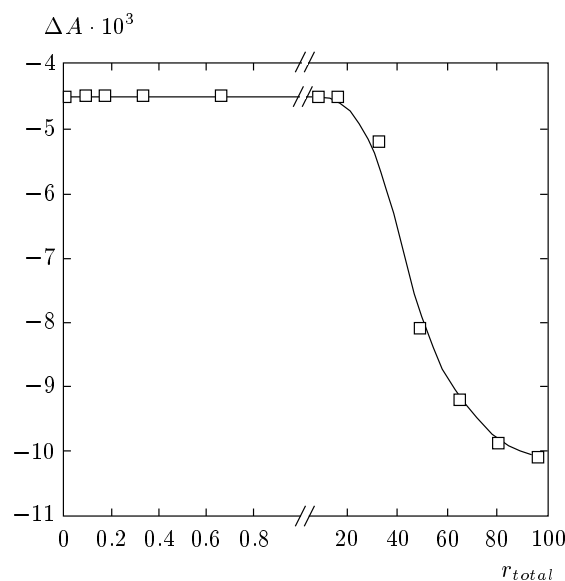


Рис. 2. Зависимость амплитуды полосы ( $\lambda = 270$  нм) в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК- $Gd^{3+}$ ) от величины  $r_{total}$ ;  $C_{DNA} = 10$  мкг/мл,  $C_{NaCl} = 0.3$ М,  $C_{PEG} = 170$  мг/мл,  $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$  отн. ед.

ческой дисперсии и формированию жесткой пространственной структуры. Поэтому изменение формы спектра КД (рис. 2) можно рассматривать как указание на то, что при взаимодействии ионов РЗЭ с молекулами ДНК, фиксированными в пространственной структуре частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, растворимость этих частиц уменьшается.

Зависимость амплитуды аномальной полосы в спектре КД частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК ( $\Delta A_{270}$ ) от концентрации гадолиния приведена на рис. 2. Поскольку амплитуда аномальной полосы в спектре КД отражает закрутку холестерической пространственной структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, зависимость на рис. 2 показывает, что при большом избытке катионов гадолиния в растворе ( $r_{total} > 20$ ) имеет место достаточно резкое изменение закрутки холестерической спирали.

Следует добавить, что обработка частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии солями других металлов (железа, алюминия и т.д.) сопровождается не амплификацией аномальной полосы в спектре КД, а резким уменьшением амплитуды этой полосы.

Следовательно, в случае катионов РЗЭ существу-

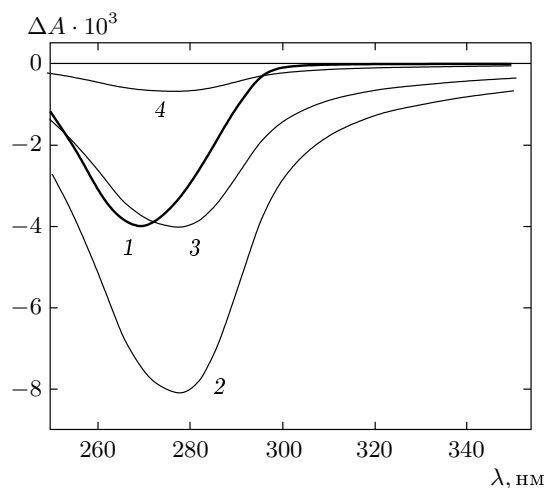


Рис. 3. Спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК в отсутствие (кривая 1) и присутствии (кривые 2–4)  $GdCl_3$  при разных температурах;  $C_{DNA} = 10$  мкг/мл,  $C_{NaCl} = 0.3M$ ,  $C_{PEG} = 170$  мг/мл, 1 –  $T = 20^\circ C$ ; 2 –  $T = 20^\circ C$ ; 3 –  $T = 50^\circ C$ ; 4 –  $T = 70^\circ C$ ;  $r_{total} = 93$ ,  $\Delta A = (A_L - A_R) \cdot 10^{-6}$  отн. ед.

ет специфический механизм, обуславливающий как понижение растворимости частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечных нуклеиновых кислот, так и амплификацию аномальных полос в спектрах КД, соответствующих холестерической жидкокристаллической дисперсии.

Для выяснения особенностей этого механизма необходимо было оценить температурную стабильность частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечных нуклеиновых кислот в присутствии катионов РЗЭ.

### 3.2. Температурные изменения спектров кругового дихроизма холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК– $Gd^{3+}$ )

На рис. 3 в качестве примера приведены спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечных ДНК (кривая 1) и спектры КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК– $Gd^{3+}$ ) при разных температурах (кривые 2–4).

Следует отметить, что нагревание холестерической жидкокристаллической дисперсии исходной ДНК сопровождается уменьшением амплитуды отрицательной полосы (КД-плавление) и характеризуется величиной  $\tau_{melt}$  [12], составляющей в дан-

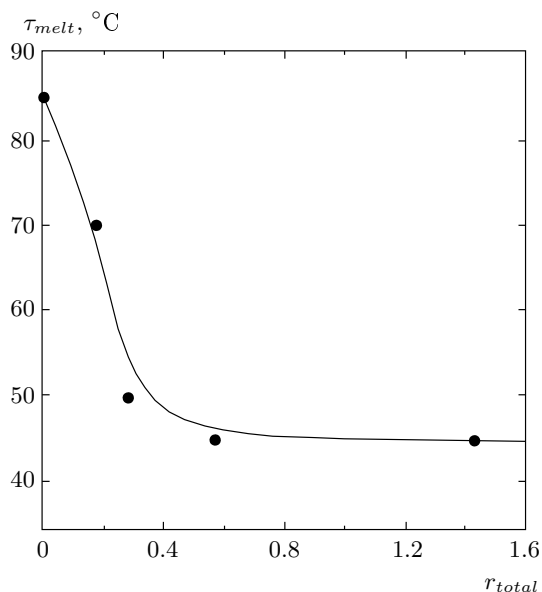


Рис. 4. Зависимость величины  $\tau_{melt}$  холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК– $Gd^{3+}$ ) от величины  $r_{total}$ ;  $C_{DNA} = 10$  мкг/мл,  $C_{NaCl} = 0.3M$ ,  $C_{PEG} = 170$  мг/мл,

ном случае  $86^\circ C$ . КД-плавление не связано с разделением цепей двухцепочечной ДНК; этот процесс отражает раскручивание спирали холестерической структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии (переход холестерик–нематик) и носит полностью обратимый характер.

Рисунок 3 показывает, что амплитуда аномальной полосы в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК– $Gd^{3+}$ ) также уменьшается при увеличении температуры (кривые 2–4), причем это уменьшение не сопровождается смещением положения ее максимума ( $\lambda \approx 280$  нм), что указывает на существование в системе хромофоров, поглощающих при этой длине волны.

Зависимость величины  $\tau_{melt}$  холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК– $Gd^{3+}$ ), оцененная на основании изменения амплитуды аномальной полосы в спектрах КД для разной концентрации гадолиния, добавленного в раствор, приведена на рис. 4.

Показанную зависимость можно условно разделить на две части: 1) зависимость при значениях  $r_{total} < 0.5$  и 2) зависимость при  $r_{total} > 0.5$ . Видно, что в области низких значений  $r_{total}$  величина  $\tau_{melt}$  не только зависит от  $r_{total}$ , но и быстро уменьшается с ростом  $r_{total}$ ; в области высоких значений

$r_{total}$  величина  $\tau_{melt}$  остается постоянной (примерно  $45^\circ\text{C}$ ).

Интерес представляет сопоставление рис. 2 и рис. 3. Такое сопоставление показывает, что при неизменной (постоянной) амплитуде аномальной полосы в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, обрабатываемой гадолинием, при  $r_{total} < 0.5$  (рис. 2) величина  $\tau_{melt}$  резко уменьшается (рис. 3). Если учесть, что амплитуда аномальной полосы в спектре КД зависит от двух параметров, а именно, от угла спиральной закрутки холестерической структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии и от характера ориентации хромофоров (азотистых оснований) по отношению к оси спирали молекулы ДНК, то наблюдаемая зависимость величины  $\tau_{melt}$  от концентрации гадолиния, регистрируемая при постоянной величине аномальной отрицательной полосы в спектре КД (рис. 2), указывает на то, что параметры вторичной структуры молекул ДНК в составе холестерической жидкокристаллической дисперсии начинают отличаться от параметров *B*-формы ( $\tau_{melt} \approx 86^\circ\text{C}$ ) по мере взаимодействия ДНК с гадолинием. Такая «модифицированная» вторичная структура молекул ДНК окончательно формируется при величине  $r_{total} \approx 0.5$  и остается далее неизменной, что приводит к постоянству величины  $\tau_{melt}$  (рис. 4). При этом рис. 2 показывает, что при высоких значениях  $r_{total}$  имеет место переход между двумя холестерическими структурами частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии: холестерическая структура, характерная для *B*-формы ДНК, превращается в холестерическую структуру, характерную для модифицированной гадолинием ДНК, которая имеет постоянную величину  $\tau_{melt}$ . Таким образом, сопоставление рис. 2 и рис. 3 позволяет предположить, что имеются два разных процесса, происходящих при обработке холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК ионами гадолиния. Во-первых, это модификация вторичной структуры ДНК, происходящая при низких концентрациях гадолиния. Вероятнее всего, такая модифицированная структура состоит из чередующихся нерегулярным образом фрагментов, имеющих конформации, соответствующие правспиральной *B*- и левспиральной *Z*-формам. Во-вторых, это изменение спиральной закрутки холестерической структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии *B*-формы ДНК на спиральную закрутку, соответствующую модифицированной ДНК, происходящее при высокой концентрации гадолиния.

Если в этих условиях ионы гадолиния замещают

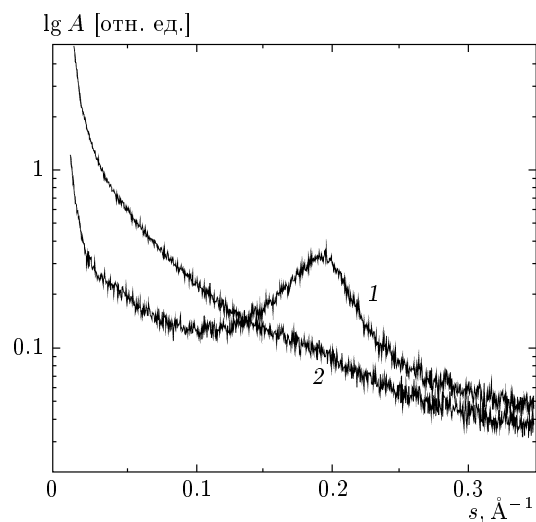


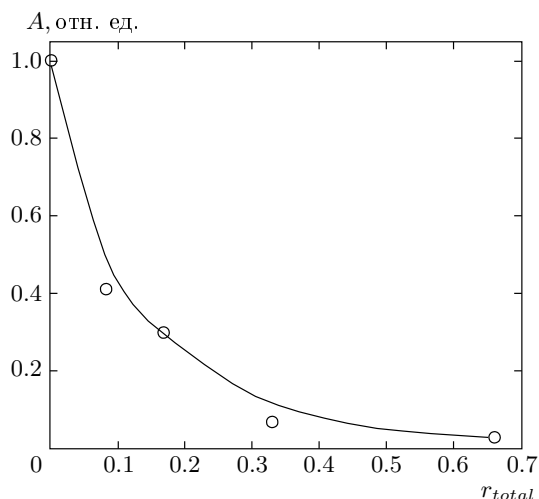
Рис. 5. Кривые малоуглового рассеяния рентгеновских лучей холестерической жидкокристаллической фазой ДНК в отсутствие (кривая 1) и в присутствии  $\text{GdCl}_3$  (кривая 2);  $C_{\text{NaCl}} = 0.3 \text{ M}$ ,  $C_{\text{PEG}} = 170 \text{ мг/мл}$ ;  $r_{total} = 0$ , 2 —  $r_{total} = 0.66$

ионы натрия, нейтрализующие отрицательные заряды фосфатных групп ДНК, то молекулы ДНК, а следовательно, и частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии должны терять свою растворимость в ПЭГ-содержащем водно-солевом растворе. Можно ожидать, что такие частицы будут существовать в условиях отсутствия высокого осмотического давления растворителя, определяемого высокой концентрацией ПЭГ. В этом случае открывается возможность для легкого манипулирования этими частицами, в частности, из частиц можно готовить осадки, свойства которых могут быть изучены при помощи разных физико-химических методов.

С этой точки зрения представляют интерес рентгенографические параметры осадков (фаз), полученных в результате низкоскоростного осаждения частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК с гадолинием.

### 3.3. Рентгенографические параметры фаз холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК– $\text{Gd}^{3+}$ )

На рис. 5 кривая малоуглового рассеяния рентгеновских лучей холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК– $\text{Gd}^{3+}$ ) (кривая 2) сопоставлена с кривой для исходного образца холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК (кривая 1).



**Рис. 6.** Зависимость амплитуды максимума на кривых малоуглового рассеяния рентгеновских лучей жидкокристаллической фазы комплекса (ДНК-Gd<sup>3+</sup>) от величины  $r_{total}$ :  $C_{NaCl} = 0.3$  М,  $C_{PEG} = 170$  мг/мл

Нетрудно видеть, что увеличение концентрации гадолиния в образце приводит к эффекту, ранее не известному для холестерической жидкокристаллической дисперсии нуклеиновых кислот, а именно, к исчезновению максимума на кривой рассеяния рентгеновских лучей.

Аналогичное исчезновение максимума на кривых рассеяния отмечено для холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК с другими РЗЭ (лантаном, неодимом, гольмием и иттербием), а также комплексов поли(И)×поли(Ц) с гадолинием.

В таблице приведены рентгенографические параметры фаз, сформированных из комплексов (ДНК-Gd<sup>3+</sup>) при разных значениях  $r_{total}$ .

На рис. 6 приведена зависимость величины брэгговского максимума ( $A$ ) на кривых рассеяния рентгеновских лучей фазами комплексов (ДНК-гадолиний) от величины  $r_{total}$ .

Рисунок 6 показывает, что при концентрации Gd<sup>3+</sup>, составляющей примерно 0.5–0.6 атомов Gd на 1 основание молекулы ДНК, рентгенографическая упорядоченность соседних молекул ДНК, характеризуемая амплитудой брэгговского пика (или площадью под кривой рассеяния), исчезает, в отличие от частиц исходной холестерической жидкокристаллической дисперсии, сформированной из интактных молекул двухцепочечных ДНК, характеризуемых брэгговским рефлексом 3.1–3.2 нм [14–17], соответ-

ствующим среднему расстоянию между двухцепочечными молекулами ДНК (*B*-форма), упорядоченными в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии.

Приведенные в таблице и на рис. 6 результаты показывают, что при критической концентрации гадолиния, связанного с молекулами ДНК в составе частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК ( $r_{total} \approx 0.5$ ), трансляционный порядок соседних молекул ДНК нарушается, вплоть до его полного исчезновения. Тем не менее аномальная полоса в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК-Gd<sup>3+</sup>), свидетельствующая о холестерической упорядоченности хромофоров (азотистых оснований) ДНК, связанных в комплекс с гадолинием, сохраняется. Более того, как показывает рис. 2, при высокой концентрации гадолиния в растворе ( $r_{total} > 5$ ), т. е. в условиях отсутствия трансляционного порядка молекул ДНК в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии, амплитуда аномальной отрицательной полосы в спектре КД холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (ДНК-Gd<sup>3+</sup>) резко увеличивается.

С учетом полученных данных представляет интерес вопрос о форме частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК с гадолинием.

### 3.4. Визуализация частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК-Gd<sup>3+</sup>)

Как было отмечено выше, частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии исходной двухцепочечной ДНК не существуют в условиях отсутствия высокого осмотического давления растворителя (обусловленного высокой концентрацией ПЭГ), т. е. их фиксация на мембранном ядерном фильтре, а следовательно, и визуализация, невозможна.

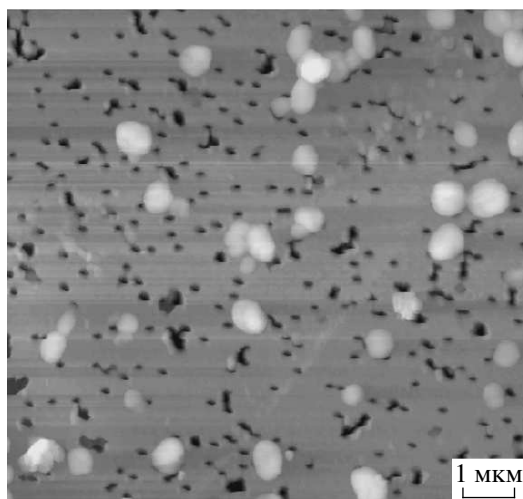
Однако, если в результате взаимодействия с ионами РЗЭ происходит формирование малорастворимых частиц дисперсии, состоящих из молекул комплекса (нуклеиновая кислота — РЗЭ), в частности (ДНК-Gd<sup>3+</sup>), то становится возможной иммобилизация частиц на поверхности ядерного мембранного фильтра и исследование размера и формы этих частиц.

На рис. 7 приведен вид частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса

Рентгенографические параметры фаз, сформированных из комплексов (ДНК-Gd<sup>3+</sup>)

Образцы фаз комплексов (ДНК-Gd)	$s_{max}$ , нм <sup>-1</sup>	$d$ , нм	$L$ , нм	$\Delta/d$	$A$ , отн. ед.	$S$ , отн. ед.	$r_{total}$
1	0.95	3.2	21	0.12	0.73	0.0094	0
2	1.93	3.3	28	0.11	0.30	0.0057	0.082
3	1.88	3.3	30	0.10	0.22	0.0026	0.167
4	1.87	3.3	26	0.10	0.05	0.0005	0.33
5	1.87	3.3	24	0.10	0.02	0.000	0.66

*Примечание.*  $A$  — амплитуда брэгговского максимума,  $S$  — площадь под кривой рассеяния рентгеновских лучей. Остальные значения параметров, приведенных в таблице, охарактеризованы ранее [13].



**Рис. 7.** Вид частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечной ДНК после их обработки  $GdCl_3$  и фиксации на ядерном мембранном фильтре, темные точки — отверстия в фильтре

(ДНК-Gd<sup>3+</sup>), иммобилизованных на поверхности ядерного мембранного (лавсан) фильтра.

Видно, во-первых, что частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК с гадолинием существуют как независимые, индивидуальные объекты; и эти частицы легко визуализировать. Существование независимых частиц свидетельствует в пользу предположения о появлении некомпенсированного положительного поверхностного заряда на частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии, препятствующего их

агрегации.

Во-вторых, средний размер частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК-Gd<sup>3+</sup>), составляющий  $(4-5) \cdot 10^2$  нм, практически совпадает с размером частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии исходной ДНК [14]. Этот результат имеет важное значение, поскольку он позволяет предполагать, что средняя плотность упаковки молекул ДНК в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК-Gd<sup>3+</sup> достаточно близка к плотности упаковки молекул ДНК в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии, сформированных из исходных молекул. В этом случае средняя плотность хромофоров (азотистых оснований) ДНК в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК-Gd<sup>3+</sup> также должна оставаться не только высокой [18], но и достаточной для сохранения аномальной оптической активности частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК-Gd<sup>3+</sup>.

В-третьих, визуализация единичных частиц говорит о том, что при обработке частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечной ДНК раствором  $GdCl_3$  «жидкостной характер» упаковки молекул ДНК в этих частицах исчезает и частицы приобретают жесткую пространственную структуру. Такая структура отражает не только понижение растворимости молекул ДНК, но и наличие сильного взаимодействия между фрагментами соседних молекул ДНК, поскольку ионы гадолиния могут быть распределены по длине этих молекул неравномерно.

### 3.5. Возможные причины амплификации полосы в спектрах кругового дихроизма холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов нуклеиновых кислот с редкоземельными элементами

Приведенные выше результаты показывают, что для частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса ДНК– $Gd^{3+}$ , также как и комплексов ДНК с другими РЗЭ (лантаном, неодимом, гольмием и иттербием), характерны два эффекта, отличающие их от частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, формируемых из комплексов ДНК с катионами других металлов. Во-первых, это исчезновение максимума на кривых рассеяния рентгеновских лучей у образцов холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов НК с РЗЭ. Во-вторых, это амплификация аномальной полосы в спектре КД, происходящая при насыщающих концентрациях катионов РЗЭ, связанных с ДНК.

При объяснении причин, лежащих в основе этих эффектов, необходимо иметь в виду следующее. Как было показано ранее [6], при связывании катионов РЗЭ с линейными двухцепочечными молекулами ДНК при достижении величины  $r_{bond} \approx 0.5$  происходит резкое изменение формы спектра КД этих молекул. Это изменение отражает нарушение регулярного, однородного характера вторичной структуры ДНК. Такое нарушение может быть связано с конформационным переходом типа  $B-Z$ . В пользу того, что при увеличении концентрации гадолиния в растворе конформация молекул ДНК начинает меняться, и после достижения  $r_{total} \sim 0.5$  это изменение достигает максимальной величины, несмотря на упаковку молекул ДНК в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии, свидетельствует характер зависимости величины  $\tau_{melt}$  (рис. 4) от концентрации гадолиния. В пользу возможного конформационного  $B-Z$ -перехода свидетельствует также тот факт, что в случае линейных двухцепочечных молекул поли(И)×поли(Ц) ( $A$ -форма) добавление ионов гадолиния сопровождается лишь небольшим изменением амплитуды положительной полосы в спектре КД, хотя и в этом случае обработка частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии растворами РЗЭ приводит к амплификации положительной полосы. Таким образом, можно предположить, что в области низких концентраций связывание ионов гадолиния с двухцепочечными молекулами ДНК (или РНК), даже упакованными в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии,

приводит к тому, что однородность вторичной структуры ( $B$ -форма в случае ДНК и  $A$ -форма в случае поли(И)×поли(Ц)) нарушается. «Модифицированные» молекулы нуклеиновых кислот разбиваются на чередующиеся фрагменты, различающиеся по своей конформации (например,  $B-Z-B-B-Z-Z\dots$  в случае ДНК). О том, что в составе модифицированной ДНК сохраняются фрагменты, имеющие  $B$ -форму, свидетельствует факт, согласно которому планарные антибиотики (дауномицин, митоксантрон) встраиваются между парами оснований модифицированной ДНК в составе частиц ХЖКД комплексов ДНК с гадолинием. Если фрагменты соседних молекул комплексов ДНК с гадолинием, или даже все молекулы, упакованные в частицах ХЖКД, приобретают «неоднородную» вторичную структуру, то очевидно, что трансляционная упорядоченность этих фрагментов (молекул) нарушается и малоугловой рефлекс на рентгенограммах должен исчезнуть, что и наблюдается экспериментально (рис. 5). Этот экспериментальный результат подтверждает предположение, согласно которому обработка частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии катионами РЗЭ приводит к появлению «модифицированной» вторичной структуры у молекул ДНК.

В условиях насыщающих концентраций гадолиния, когда, согласно данным разных физических методов, отрицательные заряды фосфатных групп ДНК оказываются нейтрализованными положительно заряженными катионами гадолиния [6, 19], имеет место другой процесс.

Во-первых, ионы гадолиния, нейтрализуя отрицательные заряды фосфатных групп ДНК, делают частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии «нерастворимыми». Действительно, в условиях большого избытка ионов гадолиния (рис. 2) эти ионы, вытесняя ионы натрия, связываются с фосфатными группами ДНК. Необходимо отметить, что при связывании ионов  $Gd^{3+}$  с полифосфатами образуется малорастворимый полифосфат  $Gd$  (произведение растворимости около  $10^{-12}$  М) [4, 16]. Поскольку молекулы двухцепочечной ДНК имеют полифосфатную природу, в условиях насыщающих концентраций гадолиния эти молекулы становятся малорастворимыми в ПЭГ-содержащих водно-солевых растворах. В этих условиях, возможно, формируется стабильная пространственная структура частиц дисперсии и наличия ПЭГ как фактора стабилизации структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии теперь не требуется. Более того, ионы га-



долиния, нейтрализуя отрицательные заряды фосфатных групп ДНК, создают избыточный положительный поверхностный заряд у частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, и агрегация частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии становится невозможной. Об этом свидетельствуют данные атомной силовой микроскопии, согласно которым эти частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, обработанные ионами гадолиния, представляют собой единичные независимые объекты (рис. 7). Частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии теряют свою растворимость и могут седиментировать в растворе. Этот процесс сопровождается уменьшением амплитуды аномальной полосы в спектре КД. Однако интенсивное встряхивание раствора, содержащего полученный осадок, приводит к полному восстановлению первоначальной аномальной оптической активности, т. е. агрегации соседних частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплекса (ДНК-Gd<sup>3+</sup>) действительно не происходит.

При этом десятикратное разбавление водой холестерической жидкокристаллической дисперсии, сформированной в ПЭГ-содержащем растворе ( $C_{PEG} = 170$  мг/мл) из молекул комплекса ДНК-Gd<sup>3+</sup>, не приводит к изменению аномальных оптических свойств дисперсии (с учетом уменьшения концентрации частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии при таком разбавлении).

Таким образом, частицы холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, фосфатные группы которых нейтрализованы ионами гадолиния, становясь малорастворимыми, могут существовать в условиях отсутствия высокого осмотического давления ПЭГ-содержащего раствора. Это означает, что осмотическое давление водно-солевого (или водного) раствора оказывается достаточным для поддержания холестерической упаковки молекул комплексов ДНК-гадолиний в частицах холестерической жидкокристаллической дисперсии.

Во-вторых, неравномерное распределение ионов гадолиния по поверхности молекул ДНК, имеющих «неоднородную» вторичную структуру, сопровождается неравномерным взаимодействием между фрагментами соседних молекул ДНК. В этих условиях взаимодействие между модифицированными молекулами ДНК может индуцировать изменение закрутки холестерической спиральной структуры молекул ДНК. При этом можно обратить внимание на то, что вопрос о связи между конформационной

неоднородностью структуры молекул нуклеиновых кислот и характером их упаковки в жидкокристаллических структурах до сих пор остается предметом интенсивных теоретических исследований [20–24]. Изменение закрутки холестерической структуры может носить характер фазового перехода. Следует отметить, что возможность фазового перехода между двумя формами холестерика рассмотрена совсем недавно в работе [25]. Однако в нашем случае в силу малости элементов системы такой переход может быть достаточно размытым (рис. 2). В пользу изменения такой закрутки свидетельствуют расчеты [6], согласно которым уменьшение угла закрутки холестерической спиральной структуры, образованной исходными молекулами ДНК (B-форма), сопровождается амплификацией аномальной полосы в спектре КД при  $\lambda \approx 260$  нм.

Следовательно, сочетание двух разных эффектов определяет уникальные оптические свойства холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК с гадолинием:

1) формирование неоднородной вторичной структуры молекул ДНК при взаимодействии с гадолинием,

2) усиление взаимодействия между модифицированными молекулами ДНК.

Если первый из эффектов ответствен за «нематизацию» свойств молекул ДНК в структуре холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК с гадолинием, то второй — за большую закрутку холестерической пространственной структуры частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии.

Аналогичные уникальные свойства характерны для частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК, обработанных катионами других РЗЭ (лантана, неодима, гольмия и иттербия), а также частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии поли(И)×поли(Ц), обработанных катионами гадолиния.

Полученные в работе данные показывают, что катионы РЗЭ, взаимодействуя с двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот, фиксированными в структуре частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, индуцируют не только нарушение параметров вторичной структуры нуклеиновых кислот, но и самопроизвольное изменение спиральной закрутки холестерической структуры. Это означает, что холестерик-1, определяемый сочетанием свойств исходных молекул НК (в частности, конформация нуклеиновой кислоты, заряд, фосфатные группы и т. д.), самопроизвольно переходит в бо-

лее закрученный холестерик-2, зависящий от нового набора свойств «модифицированной» нуклеиновой кислоты. Следовательно, имеет место переход между двумя пространственными формами частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии. Наблюдаемый переход является обратимым, поскольку добавление ЭДТА, связывающей ионы гадолиния, переводит холестерик-2 в исходный холестерик-1. Можно поэтому сказать, что «микроскопическая машина», состоящая из  $10^4$  упорядоченных в пространстве молекул нуклеиновых кислот, совершает работу. Это означает, что впервые продемонстрирована возможность преобразования энергии взаимодействия ионов гадолиния с двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот в работу микроскопической машины из молекул нуклеиновых кислот, фиксированных в пространственной структуре частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии, легко обнаруживаемую по изменению аномальной оптической активности.

В заключение можно сказать, что существование независимых частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов (нуклеиновая кислота–РЗЭ) открывает возможность широкого применения этих частиц для решения различных задач в области медицины и биотехнологии.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в работе данные показывают, что катионы редкоземельных элементов, взаимодействуя с двухцепочечными молекулами нуклеиновых кислот, индуцируют два разных структурных эффекта. Во-первых, в случае линейных молекул ДНК и молекул РНК, принадлежащих к разным структурным семействам, это взаимодействие сопровождается изменением параметров вторичной структуры молекул нуклеиновых кислот. Не исключено, что в случае *B*-формы ДНК наблюдаемый структурный переход может соответствовать известному *B*–*Z*-переходу. Во-вторых, в случае молекул нуклеиновых кислот, фиксированных в пространственной структуре частиц холестерических жидкокристаллических дисперсий, взаимодействие ионов редкоземельных элементов с молекулами нуклеиновых кислот сопровождается самопроизвольным изменением спиральной закрутки этих частиц. Этот процесс сопровождается амплификацией аномальной полосы в спектре КД, а также изменением других физических параметров частиц дисперсий. Высказано предположение о тон-

ких деталях взаимодействия ионов редкоземельных элементов с молекулами нуклеиновых кислот в условиях водно-солевых растворов.

Авторы выражают благодарность Е. И. Кацу и В. Л. Голо за полезные дискуссии и критические замечания, способствовавшие более четкому представлению о процессах, происходящих в рассматриваемой системе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. D. W. Gruenwedel and M. K. Cruikshank, *J. Inorg. Biochem.* **43**, 29 (1991).
2. F. E. Rosetto and E. Nieboer, *J. Inorg. Biochem.* **54**, 167 (1994).
3. T. Haertle, J. Augustyniak, W. Guschlbauer et al., *Nucl. Acids Res.* **9**, 6191 (1981).
4. L. Li, J. Yang, X. Wu et al., *J. Luminescence* **101**, 141 (2003).
5. Ю. М. Евдокимов, В. И. Салыанов, О. В. Кондрашина и др., *ДАН* **402**, 693 (2005).
6. Yu. M. Yevdokimov, V. I. Salyanov, O. V. Kondra-shina et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **37**, 165 (2005).
7. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, G. B. Lortkipanidze et al., *Liq. Cryst.* **12**, 1 (1992).
8. В. И. Салыанов, А. И. Евсеев, В. И. Попенко и др., *Биофизика* **52**, № 2 (2007).
9. V. A. Belyakov, V. P. Orlov, S. V. Semenov et al., *Liq. Cryst.* **20**, 777 (1996).
10. Ю. М. Евдокимов, С. Г. Скуридин, С. В. Семенов и др., *Биофизика* **43**, 240 (1998).
11. Yu. M. Yevdokimov, S. S. Skuridin, Yu. D. Nechipurenko et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 103 (2005).
12. Ю. М. Евдокимов, Т. Л. Пятигорская, Н. А. Белозерская и др., *Мол. биол.* **12**, 404 (1978).
13. Yu. M. Yevdokimov, S. G. Skuridin, V. I. Salyanov et al., *Biophys. Chem.* **35**, 143 (1990).
14. Ю. М. Евдокимов, *Жидкие кристаллы и их практическое применение* **3**, 10 (2003).
15. F. Livolant, *Physica A* **176**, 117 (1991).
16. F. Livolant and A. Leforestier, *Progr. Polym. Sci.* **21**, 1115 (1966).

17. R. Rill, T. E. Strezelecka, M. W. Davidson et al., *Physica A* **176**, 87 (1991).
18. Ю. М. Евдокимов, В. И. Салянов, А. Т. Дембо и др., *Сенсорные системы* **13**, 158 (1999).
19. P. A. Lessing, A. W. Erickson, *J. Eur. Ceramic. Soc.* **23**, 3049 (2003).
20. R. Podgornik and V. A. Parsegian, *Phys. Rev. Lett.* **80**, 1560 (1998).
21. A. B. Harris, R. D. Kamien, and T. C. Lubensky, *Rev. Mod. Phys.* **71**, 1745 (1999).
22. A. A. Kornyshev and S. Leikin, *Phys. Rev. E* **62**, 2576 (2000).
23. W. M. Gelbart, R. F. Bruinsma, P. A. Pincus et al., *Phys. Today, Sept.* **38** (2000).
24. A. A. Kornyshev, S. Leikin, and S. V. Malinin, *Eur. Phys. J. E* **7**, 83 (2002).
25. В. Л. Голо, Е. И. Кац, И. П. Кикоть, *Письма в ЖЭТФ* **84**, 334 (2006).