

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. 1. Ядерная ДНК как составная часть ДНК-топоизомеразного комплекса.—// Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 5.—С. 44.
2. Соловьян В. Т., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. Обнаружение и свойства дискретных фрагментов ДНК // Молекуляр. биология.—1991.—25, № 4.—С. 1071—1079.
3. Соловьян В. Т., Андреев И. О., Кунах В. А. Фракционирование ДНК эукариот в пульсирующем электрическом поле. 2. Дискретные фрагменты ДНК и уровни структурной организации хроматина // Там же.— № 6.—С. 43—51.
4. Sander M., Hsieh T.-S. Double-strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster* // J. Biol. Chem.—1983.—258.—P. 8421—8428.
5. Liu L. F., Rowe T. C., Yang L. et al. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II // Ibid.—P. 15365—15370.
6. Osheroff N., Zechiedrich E. L. Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form // Biochemistry.—1987.—26.—P. 4303—4309.
7. Osheroff N. Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide // Ibid.—1989.—28.—P. 6157—6160.
8. Farnshaw W. C., Heck M. M. S. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes // J. Cell. Biol.—1985.—109.—P. 1716—1725.
9. Gasser S. M., Laemmli U. K. The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site // EMBO J.—1986.—5.—P. 511—518.
10. Berrios M., Osheroff N., Fisher P. A. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of *Drosophila* nuclear matrix fraction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 4142—4146.
11. Cockerill P. N., Garrard W. T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites // Cell.—1986.—44.—P. 273—283.
12. Earnshaw W. C., Halligan B., Cooke L. A. et al. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds // J. Cell. Biol.—1985.—100.—P. 1706.
13. Uemura T., Ohkura H., Adachi Y. et al. DNA topoisomerase II is required for condensation and segregation of mitotic chromosomes in *S. pombe* // Cell.—1987.—50.—P. 917—925.
14. Newport J. Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA // Ibid.—48.—P. 205—217.
15. Sperry A. O., Blasquez V. C., Garrard W. T. Disfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association region and topoisomerase II // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 5497—5501.
16. Adachi Y., Kas E., Laemmli U. K. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associate regions // EMBO J.—1989.—8, N 13.—P. 3997—4006.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 11.12.92

УДК 535.34:615.015

А. Е. Болдескул, А. Н. Величко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУР СТРУКТУРНО-ФАЗОВЫХ ПЕРЕСТРОЕК В МОДЕЛЬНЫХ И БИОМЕМБРАНАХ ПО СПЕКТРАЛЬНЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ МЕРОЦИАНИНА 540

Изучены спектры поглощения и флуоресценции цианинового красителя мероцианина 540 (M540) в органических растворителях, липосомах из различных классов липидов, в микросомах печени крыс и эритроцитах. Показано, что наряду с известным способом определения температур фазовых переходов T_n по спектрам поглощения M540 возможно определение этого показателя по изменению квантового выхода мономеров, причем предлагаемый метод является более простым. Проведено сопоставление обоих методов.

Введение. Среди структурных перестроек биомембран различной природы, вызываемых множеством физико-химических факторов, термоиндуцированные структурно-фазовые переходы являются наиболее неблагоприятными, а иногда и губительными для организма [1]. Изучение механизмов переходов и динамической структуры бислоя воз-

© А. Е. Болдескул, А. Н. Величко, 1993

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1993. Т. 9. № 6

59

можно различными методами [2], среди которых метод флюоресцентных зондов стал традиционным [3]. Анионный цианиновый краситель мероцианин 540 (M540) в последние годы широко используется в фотобиологии и фотомедицине [4] для исследования структуры и функций биологических мембран. Учитывая широкие прикладные возможности M540, возникает необходимость дальнейшего углубления знаний о его фотофизике, зависимости спектральных параметров от природы окружения и температуры.

Настоящая работа посвящена изучению спектральных характеристик M540 в липидных дисперсиях и их применению для определения температур структурно-фазовых перестроек в модельных и биомембранах.

Материалы и методы. Фотометрические измерения проводили на спектрофотометре Шимадзу MPS-5000 (Япония), флюориметрические — на спектрофлюориметре Хитачи MPF-4 (Япония) в кюветах толщиной 1 см. Поправочные коэффициенты для учета эффекта экранирования света вводили согласно [3]. Погрешность измерений не превышала 5%. В работе использовали димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ) фирмы «Serva» (ФРГ). Липосомы готовили стандартным способом [5]. Суспензии липидов обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе УЗДН-2Т в трубчатом излучателе в течение 10 мин.

Результаты и обсуждение. В спектрах поглощения M540 в органических растворителях (табл. 1) при увеличении диэлектрической проницаемости ϵ наблюдается батохромное смещение полос мономера и димера [8]. Длинноволновая полоса мономера чувствительна к микроокружению и может быть индикатором эффективной диэлектрической проницаемости. Отсутствие линейной корреляции между ϵ растворителя и $\lambda_{\max}^{\text{мон}}$ связано с различной сольватацией аниона [9].

В спектрах поглощения M540, локализованного в суспензии липосом из различных липидов, имеет место равновесие между мономерными молекулами и димерами в бислое, что проявляется в изменении коэффициента молярного погашения по отношению к водному раствору. Соотношение оптических плотностей мономера и димера составляет 1:3 [7]. В табл. 2 приведены спектральные параметры M540 в липидных дисперсиях. Из сопоставления данных табл. 1 и 2 можно оценить, аналогично [10], локальную диэлектрическую константу окружения M540 в липидном бислое, находящуюся в пределах $\epsilon^* = 2-6$ для различных классов липидов при соотношении [липид]/[M540] > 100.

В работе [7] предложен метод фиксации термоиндуцированных фазовых перестроек в водных растворах дипальмитоилфосфатидилхолина и его аналогов, основанный на соотношении оптических плотностей мономеров M540 в бислое и димеров в воде $r = D_{564 \text{ нм}}/D_{600 \text{ нм}}$.

Таблица 1
Полосы поглощения M540 в различных растворителях

Растворитель	ϵ^* , диэлектрическая проницаемость (25 °C) [6]	d , дипольный момент [6]	$C_{\text{M540}} \cdot 10^{-6}$, М	$\lambda_{\text{дим}}^{\text{нм}}$, нм	$\epsilon_{\text{дим}}^{\text{нм}}$, $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$	$\lambda_{\text{мон}}^{\text{нм}}$, нм	$\epsilon_{\text{мон}}^{\text{нм}}$, $10^6 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$
Вода	84,2 (0 °C)	1,84	10	505	0,68	540	0,61
Диметилсульфоксид	49	3,90	10	538	0,94	568	2,03
Тетрахлорэтан	39 (20 °C)	1,75	10	545	0,25	577	0,61
Этиленгликоль [7]	37	2,30	0,5	—	—	557	1,03
Ацетонитрил	26,5	3,45	10	530	0,81	562	2,08
Октанол [7]	10	1,60	0,5	—	—	565	1,68
Изопропиловый спирт	8,77	1,69	10	535	1,03	565	2,69
Хлороформ [7]	4,0	1,27	0,5	—	—	570	1,6
Бензол [7]	2,0	0	0,5	—	—	574	2,05

На рис. 1 приведена зависимость оптической плотности D от температуры для М540 в воде и липосомах из ДМФХ и сфингомиелина при соотношении липид/краситель $\sim 300:1$. Ход кривых отражает смещение равновесия в сторону образования мономеров как для полос $\lambda_{\max}^{\text{мон}}=574$ нм, 577 нм (4, 3), так и $\lambda_{\max}^{\text{дим}}=537$ нм, 540 нм (2, 1).

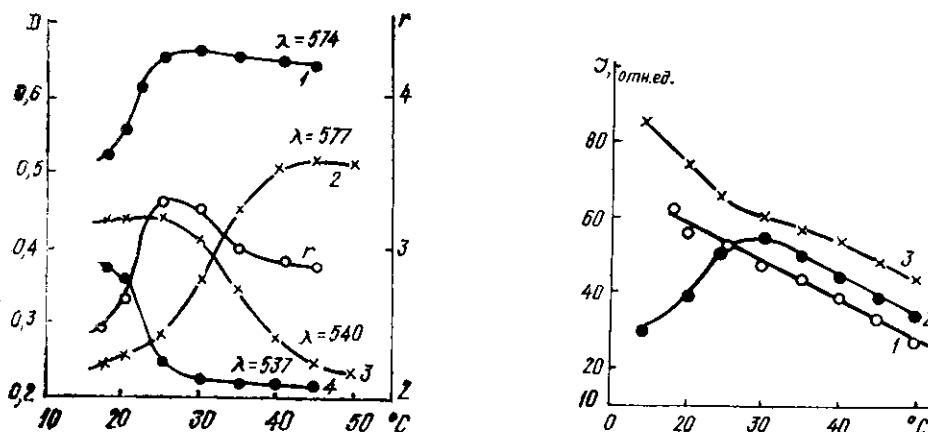


Рис. 1. Спектры поглощения и фактор $r(T)$ мероцианина 540 ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М) в липидных дисперсиях: 1, 4 — липосомы из ДМФХ (0,3 мг/мл); 2, 3 — липосомы из сфингомиелина (0,3 мг/мл)

Рис. 2. Зависимость спектра флуоресценции мероцианина 540 ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М) от температуры: 1 — раствор М540 в H_2O ; 2 — М540 в липосомах из ДМФХ (0,3 мг/мл; трис-НСI, рН 7,4); 3 — М540 в растворе теней эритроцитов (трис-НСI, рН 7,4; $C_{\text{белка}}=0,3$ мг/мл)

Согласно [11], при соотношении концентраций $[\text{ФХ}]/[\text{М540}] < 2$ спектр поглощения представляет собой суперпозицию спектра в воде и мембраносвязанного димера, при $[\text{ФХ}]/[\text{М540}] > 10$ преобладают мембраносвязанные мономеры и димеры, в промежуточной области $2 < [\text{ФХ}]/[\text{М540}] < 10$ имеем суперпозицию спектров раствора и мембраносвязанных мономеров и димеров. В исследуемых нами мембранных структурах и липосомах соотношение $[\text{липид}]/[\text{М540}] > 10$.

Температура структурно-фазового перехода для ДМФХ, вычисленная дифференцированием зависимости $r(T)$ (см. рис. 1), составила $26,0 \pm 0,5$ °С, что согласуется с величиной 24,5 °С [12].

Учитывая высокие константы связывания М540 с липидами ($K_c = 8 \cdot 10^4$ М $^{-1}$ для ФХ липосом), белками ($K_c = 2 \cdot 10^5$ М $^{-1}$ для САЧ) и отсутствие люминесценции димеров М540 в бислое [13], можно предположить, что основной вклад в люминесценцию мономеров дают мембраносвязанные молекулы красителя. В этом случае флуоресцен-

Таблица 2

Спектральные характеристики М540, связанного с липидами

Липид	$C_{\text{липид}}$, мг/мл	$C_{\text{М540}} \cdot 10^{-6}$, М	$\lambda_{\text{дим}}^{\text{пик}}$, нм	$\epsilon_{\text{дим}} \cdot 10^4$, М $^{-1}$ см $^{-1}$	$\lambda_{\text{мон}}^{\text{пик}}$, нм	$\epsilon_{\text{мон}} \cdot 10^{-5}$, М $^{-1}$ см $^{-1}$
Фосфатидилхолин	0,3	1,25	535	1,12	570	1,04
Фосфатидилхолин	0,3	1,25	540	0,74	572	1,22
Кардиолипин	0,3	5,0	540	0,7	572	1,11
Димиристонилфосфатидилхолин	0,3	5,0	537	0,84	574	1,37
Фосфатидилхолин [7]	0,3	—	—	—	567	1,8
Фосфатидилсерин [7]	0,3	—	—	—	561	0,81
Сфингомиелин	0,5	4,0	540	1,09	577	0,88
Микросомы ЭР печени	0,5	4,0	540	0,58	575	1,14

ция мономеров должна быть чувствительной к локальному изменению их окружения в биомембране. На рис. 2 представлены зависимости от температуры $I_{\text{фл}}$ ($\lambda=586$ нм) М540 в H_2O (1), ДМФХ (2) и тенях эритроцитов человека (3). В воде наблюдается монотонное уменьшение квантового выхода красителя (кривая 1). Температура фазового перехода ДМФХ, полученная сплайн-интерполяцией зависимости $I_{\text{фл}}^{\text{мон}}$ (C_{M540}) с последующим дифференцированием, составила $25,5 \pm 0,5$ °С. В мембранах теней эритроцитов человека зарегистрированы термотропные переходы при 25 и 40 °С. Согласно [14], переход в области 20—25 °С зависит от взаимодействия белков цитоскелета с мембранными белками, а при 40 °С — вызван изменением состояния агрегации молекул спектрина.

Таким образом, с помощью цианинового красителя М540 наряду с определением электростатического потенциала, микроскопической диэлектрической проницаемости появляется возможность исследования по флуоресценции мономеров М540 структурно-фазовых перестроек в биомембранах.

Резюме. Вивчено спектри поглинання і флуоресценції ціанінового барвника мероціаніна 540 (М540) в органічних розчинниках, ліпосомах із різних класів ліпідів, в мікросомах печінки щурів та еритроцитах. Показано, що поруч із відомим способом визначення температур фазових переходів T_n за спектрами поглинання М540 стає можливим визначення цього показника за зміною квантового виходу мономерів, причому запропонований метод є простішим. Проведено зіставлення обох методів.

Summary. Absorption and fluorescence spectra of cyanine dye merocyanine 540 (M540) in organic solvents, liposomes from different classes of lipids, in rat liver microsomes and erythrocytes were studied. It was shown that together with the known way of determination of temperatures of phase transitions T_n from absorption spectra of M540, determination of T_n from quantum yield of monomers was possible; at the same time the method proposed was more simple. Comparison of both methods was carried out.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран — М.: Наука, 1982.—224 с.
2. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. — М.: Наука, 1981.—293 с.
3. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и виропротеинов.— М.: Наука, 1989.—277 с.
4. Waggoner A. S. Dye indicators of membrane potential // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1979.—8.— P. 47—68.
5. Губский Ю. И., Болдескул А. Е., Примак Р. Г., Задорина О. В. Влияние α-токоферола и инола на физическую структуру мембран микросом печени крысы в условиях антиоксидантной недостаточности // *Укр. биохим. журн.*—1989.—61 № 1.— С. 94—99.
6. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.— М.: Мир, 1976.—544 с.
7. Lelkes P. I., Miller I. R. Perturbation of membrane structure by optical probes. I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes // *J. Membr. Biol.*—1980.—52.— P. 1—15.
8. Shikurova L., Haban I., Chorvat D. I. Dimers of merocyanine 540 in aqueous solutions // *Stud. Biophys.*—1988.—125.— P. 107—111.
9. Ищенко А. А., Мушкало И. Л., Деревянко Н. А. и др. Ассоциация бисцианиновых красителей с жесткосвязанными хромофорами в растворителях различной полярности // *J. Inf. Rec. Mater.*—1989.—17.— P. 39—51.
10. Glushko V., Thaler M. S., Karp C. D. Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions behavior in model solvents // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1981.—210.— P. 33—42.
11. Verkman A. S., Frosch M. P. Temperature-jump studies of merocyanine 540 relaxation kinetics in lipid bilayer membranes // *Biochemistry.*—1985.—24.— P. 7117—7122.
12. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж. Финдлея.— М.: Мир, 1990.—424 с.
13. Aramendia F. P., Krieg M., Nitsch C. The photophysics of merocyanine 540. A comparative study in ethanol and in liposomes // *Photochem. and Photobiol.*—1988.—48.— P. 187—194.
14. Итоги науки и техники. Биофизика мембран / Под ред. Р. И. Жданова, А. М. Комарова.— М.: ВИНТИ, 1989.— Т. 6.—210 с.

Ин-т фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев

Получено 16.06.93