

КООПЕРАТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КАК ОДНО ИЗ СВОЙСТВ АССОЦИАЦИЙ МОЛЕКУЛ

М. А. НОВОСЕЛЕР, О. М. АИВАЗЯН, В. В. БАГДАСАРЯН, А. А. ШАГНИЦЯН

Показана общность некоторых свойств таких модельных систем как ДНК в водно-солевых растворах, агрегаты амфифилей в водно-солевой среде, комплексы ДНК-лиганд, мицеллы—низкомолекулярные гидрофобные субстраты.

Рассматривается влияние ионной силы растворов на степень кооперативности взаимодействий молекул в ассоциациях. Наличие кооперативных взаимодействий в изученных модельных системах вызывает самосборку компонентов в надмолекулярные структуры.

Большинство простых надмолекулярных структур клетки является результатом процесса спонтанной самосборки большого числа макромолекул. В образовании любых молекулярных ассоциаций принимают участие ионные, водородные, ван-дер-ваальсовы и «гидрофобные» связи. Изменение свободной энергии при образовании этих связей значительно меньше изменения свободной энергии образования ковалентных связей и по порядку величины совпадает (или несколько превышает) со средними значениями кинетической энергии теплового движения [8]. Поэтому ассоциаты молекул, основанные на слабых связях, будут достаточно стабильны только при наличии большого количества взаимодействующих молекул.

Это свойство кооперативности взаимодействий ярко проявляется в модельных системах, изучаемых нами: ДНК в водно-солевых растворах, агрегатах амфифилей в водно-солевой среде (мицеллы, липосомы, бимолекулярные фосфолипидные слои и т. д.), комплексах одномерная решетка (ДНК)—большой лиганд (основные полипептиды и белки), мицеллы—низкомолекулярные субстраты.

В настоящей работе нами показана общность всех перечисленных систем и рассмотрено влияние ионной силы растворов на степень кооперативности взаимодействий молекул в ассоциатах.

Об образовании агрегатов амфифилей и их свойствах судили как по данным измерения поверхностного натяжения, вязкости, плотности и активности ионов, так и по расщеплению основных полос поглощения хромофорных групп молекул амфифилей и данным протонного магнитного резонанса (ПМР).

ДНК и комплексы ДНК—большой лиганд исследовались спектрофотометрически и методом кругового дихроизма (КД).

Известно, что молекулы ДНК претерпевают переход спираль-клубок при нагревании раствора нативной ДНК или обработке его щелочью или кислотой. Этот конформационный переход происходит в узком интервале температур или концентраций денатурирующих агентов, что говорит о его кооперативности. Причина кооперативности перехода спираль—клубок заключается в том, что лишь разрыв большого числа комплементарных водородных связей и стэкинг-взаимодействий между основаниями внутри двойной спирали ДНК обеспечивает выигрыш в энтропии, достаточный для перекрывания проигрыша в энтальпии при образовании петлеобразных структур и обеспечивает переход в клубкообразное состояние [3, 16]. Для растворов ДНК тимуса телят в дистилляте интервал плавления (ΔT) равен 14° . При повышении ионной силы раствора степень кооперативности внутримолекулярного плавления ДНК увеличивается: ΔT уменьшается до 7° при ионной силе— $0,64 \text{ M NaCl}$ [2]. Интервал плавления ДНК может уменьшаться от 14 до 7°C при образовании комплексов ДНК с поли- l -лизинном (ПЛ), количество которого в комплексе характеризуется отношением $\text{NH}_2/\text{P} = 0,42$ [5].

Сравнение температур плавления (T_m) скомплексированных с ПЛ участков ДНК тимуса телят (92 — 96°) с T_m электрически нейтральной молекулы ДНК (99°) [6] показывает, что фосфаты ДНК достаточно хорошо нейтрализуются лизиновыми остатками. Поэтому возрастание кооперативности перехода спираль—клубок при комплексировании с ПЛ и при увеличении ионной силы раствора объясняется аналогично [2]. Поскольку молекула ДНК в растворе представляет собой полиэлектролит, то при оценке изменений свободной энергии перехода спираль—клубок необходимо учитывать взаимодействия дальнего порядка, которые носят в основном, характер кулоновского отталкивания [9]. В нативном состоянии флюктуационное изгибание цепи затруднено, поэтому для нативной структуры ДНК взаимодействием дальнего порядка можно пренебречь. Термодинамическая выгодность процесса плавления ДНК определяется величиной изменения свободной энергии при плавлении двойной спирали:

$$\Delta F = F_{\text{кл}} - F_{\text{сп.}}$$

В случае, когда заряд молекулы ДНК уменьшается (при увеличении ионной силы раствора или комплексировании с ПЛ), свободная энергия клубкообразного состояния $F_{\text{кл}}$ повышается, а $F_{\text{сп.}}$, как отмечалось, не зависит от степени нейтрализации фосфатов. Следовательно, по мере уменьшения степени ионизации макромолекул ДНК уменьшается изменение свободной энергии ΔF , т. е. возрастает степень кооперативности внутримолекулярного плавления.

Итак, кооперативность взаимодействий в полужестком клубке ДНК в растворе обеспечивается электростатическими взаимодействиями заряженных фосфатных групп, а в двойной спирали ДНК создается за счет стэкинг-взаимодействий и комплементарных водородных связей.

Известно, что в водных растворах нуклеотиды и нуклеозиды образуют ассоциаты, представляющие собой стопки, в которых плоские гетероциклические основания расположены друг над другом [15]. Энергетическая выгодность образования стопкообразных ассоциатов нуклеотидов обеспечивается рядом факторов. Одним из первичных и определяющих факторов считается изменение свободной энергии ΔF , обусловленное уменьшением поверхности оснований, взаимодействующей с молекулами воды. При этом изменяется степень упорядоченности молекул воды вокруг оснований. А между основаниями возникают индукционные электростатические взаимодействия, лондоновские дисперсионные силы и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, объединяемые под названием стэкинг-взаимодействий, приводящие к еще большему уменьшению свободной энергии системы, и, следовательно, к стабилизации стопки нуклеотидов.

Природа кооперативных взаимодействий в ассоциатах амфифильных веществ (АФ) ничем не отличается от природы кооперативных взаимодействий в стопкообразных ассоциатах нуклеотидов. Амфифильными называются вещества, состоящие из неполярных олеофильных и полярных гидрофильных групп, расположенных асимметрично относительно друг друга в молекуле. Характерными примерами АФ являются фосфолипиды, поверхностно-активные вещества и т. д. В первом приближении и нуклеотиды можно считать АФ.

Растворение в воде молекул АФ сопровождается сложными изменениями объемной структуры воды—образованием «айсберговых» структур вокруг углеводородных радикалов молекул АФ. Поскольку «айсберги» имеют аналогичную со льдом структуру, то увеличение концентрации АФ в системе приводит к увеличению структурированности воды и, следовательно, к уменьшению энтропии системы. По этой причине, начиная с определенной концентрации АФ, называемой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), наблюдается самосборка молекул АФ в мицеллы, в которых углеводородные радикалы спрятаны внутрь, а гидратированные полярные группы молекул АФ расположены на поверхности мицелл. При этом айсберговые структуры распадаются, что приводит к увеличению энтропии системы, а между углеводородными радикалами молекул АФ возникают взаимодействия, приводящие к еще большему уменьшению свободной энергии системы и, следовательно, к стабилизации мицеллярных структур [13]. Эта картина аналогична картине, наблюдаемой при образовании стопкообразных ассоциатов нуклеотидов.

В зависимости от типа АФ мицеллы могут быть положительно, отрицательно заряженными или электрически нейтральными. Часть заряда диссоциированных полярных групп молекул ионногенных АФ на поверхности мицелл компенсируется противоионами.

Наличие поверхностного заряда и гидрофобного ядра делают ККМ, структуру и свойства мицелл зависящими от ионной силы и рН среды, температуры и т. д. В частности, добавление электролитов в водном-

целлярный раствор ионногенных АФ приводит к уменьшению ККМ, изменяет форму и число агрегаций (число молекул АФ в одной мицелле) мицелл. Так, например, увеличение концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в системе вода—пентадецил-сульфонат натрия (ПДСН) приводит к возрастанию числа агрегаций мицеллы от 96 до 540. При этом имеет место превращение сферических мицелл в вытянутый эллипсоид вращения [10]. Увеличение степени кооперативности взаимодействий в мицелле при повышении ионной силы сопровождается уменьшением гидратации и увеличением плотности мицелл. Это означает, что в присутствии электролита увеличивается экранировка их поверхностного заряда, что благоприятствует сближению молекул АФ и стабилизации мицелл.

Подобным образом ведет себя ДНК при увеличении концентрации электролита: она в водных растворах при концентрациях электролита > 1 М переходит из канонической В-формы в более закрученную (компактную) С-форму [4].

При повышении ионной силы среды самосборка молекул ПДСН в мицеллы сопровождается усилением давидовского расщепления УФ-спектра поглощения молекул ПДСН и уширением резонансной линии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) групп $(\text{CH}_2)_n$ [11], (рис. 1, 2).

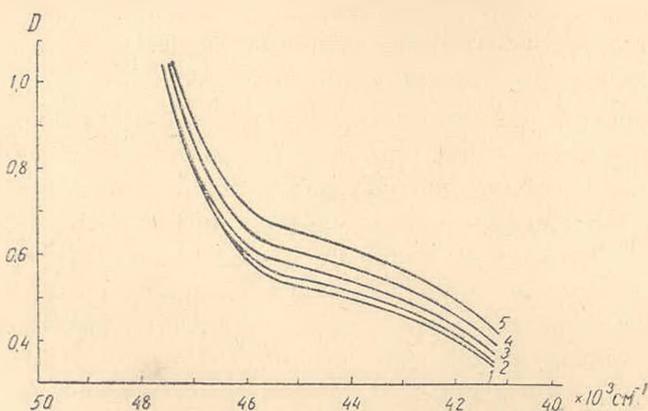


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения системы ПДСН + H_2O + NaCl при $C_{\text{ПДСН}} = 4\%$ по весу, $C_{\text{NaCl}} = 0$ (1); 0,2 (2); 0,4 (3); 0,6 (4) и 0,8 (5) моль/л.

Следовательно, при самосборке молекул ПДСН в мицеллы имеет место взаимная ориентация как хромофорных, так и углеводородных участков молекул ПДСН, т. е. определенное упорядочение системы. Поэтому мицеллу можно рассматривать как некую трехмерную «решетку». Тогда введение низкомолекулярных субстратов в нее, приводящее к стабилизации мицеллы и возрастанию кооперативности системы, аналогично влиянию лиганда на одномерную решетку (ДНК). Под стабилизацией мицеллы мы понимаем увеличение числа включенных в нее молекул АФ и возрастание ее солюбилизующей способности (способности растворять низкомолекулярные субстраты-лиганды). Солюбилизация представляет собой не простое накопление субстрата в мицеллах. Известно, что солюбилизующий субстрат активно влияет на

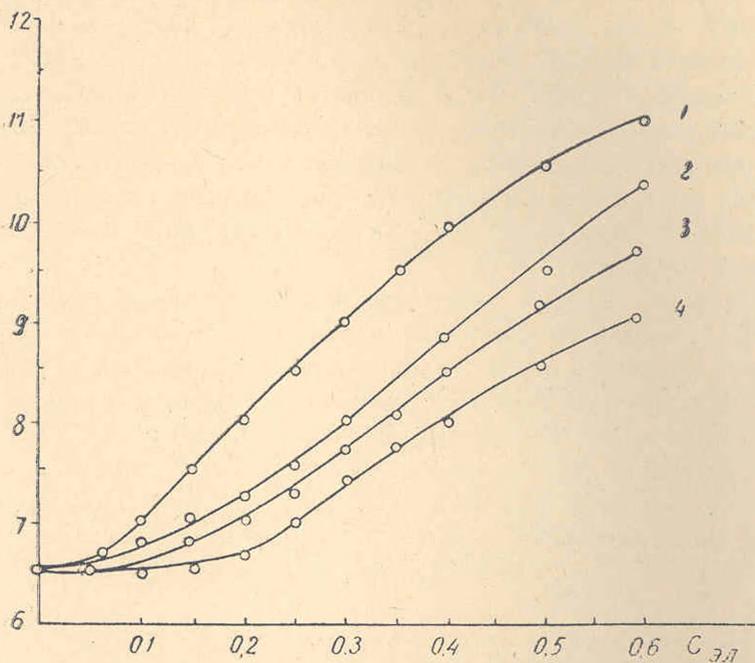
$\Delta v_{1/2}^{20}$ 

Рис. 2. Зависимость величины полуширины сигнала $(CH_2)_n$ групп молекул ПДСН от концентрации электролита: KCl (1); CsCl (2); NaCl (3) LiCl (4).

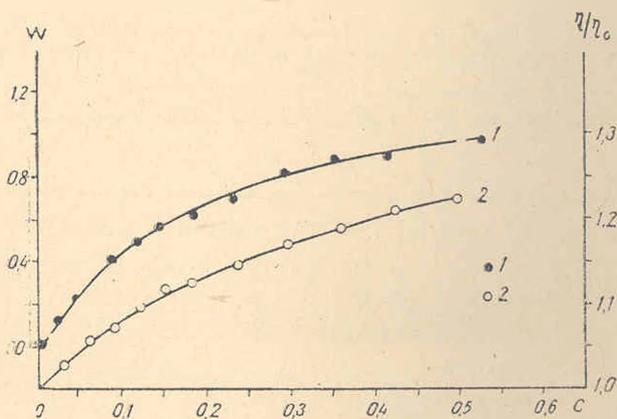


Рис. 3. Зависимость величины полуширины сигнала $(CH_2)_n$ групп в единицах w (1) и относительной вязкости (2) от концентрации солюбилизованного спирта. ($W = (\Delta v_{1/2} - \Delta v_{1/2}^0) / \Delta v_{1/2}^0$, где $\Delta v_{1/2}^0$, $\Delta v_{1/2}$ полуширина сигнала в присутствии и отсутствии спирта соответственно).

структуру, размеры и гидродинамические свойства мицелл. Это связано с тем, что появление субстрата в мицелле изменяет соотношение гидрофильных и гидрофобных сил в ней и тем самым меняет ее структурные параметры. И действительно, мы наблюдаем изменения под-

вижности углеводородных хвостов молекул ПДСН и общей вязкости системы в зависимости от концентрации добавленного субстрата (о-ксилола) [1]. Из рис. 3 видно, что при увеличении концентрации о-ксилола в мицеллах ПДСН величина полуширины сигнала ЯМР группы $(\text{CH}_2)_n$ молекул ПДСН ($\Delta\nu^{1/2}$) возрастает сначала резко до 25%-ного насыщения мицелл о-ксилолом, а затем темп роста падает. Так же меняется относительная вязкость (η/η_0) системы. Возрастание $\Delta\nu^{1/2}$ указывает на уменьшение подвижности углеводородных радикалов молекул ПДСН, а увеличение η/η_0 —на асимметризацию мицелл под воздействием о-ксилола.

Добавление лиганда к одномерной решетке также вызывает изменение ее структуры: большую или меньшую компактизацию ДНК в зависимости от состава и чередования мономерных единиц в решетке [6].

Исследование влияния электролита на солюбилизирующую способность мицелл показало, что при увеличении концентрации NaCl от 0 до 0,5 М солюбилизация о-ксилола в мицеллах ПДСН линейно возрастает от 0,8 моль кислот/моль ПДСН до 1,65 моль кислот/моль ПДСН. Причем по мере увеличения концентрации электролита число лигандов в гидрофильной зоне мицелл уменьшается, а в гидрофобной—увеличивается [12].

Итак, нами показано вполне определенное распределение лигандов внутри мицеллярной «решетки».

Исследование распределения больших лигандов на одномерной решетке спектрофотометрическим методом (табл.) свидетельствует о том,

Таблица
Распределение больших лигандов на макромолекуле ДНК тимуса теленка

Комплексы ДНК—поли- <i>l</i> -лизин				Комплексы ДНК—протамин			
NH_2/P	l_1	l_2	n	NH_2/P	l_1	l_2	n
0,084	1050	118	1	0,084	700	175	14
0,17	650	134	1	0,17	600	166	14
0,25	380	118	1	0,25	525	142	12
0,33	308	151	1	0,33	430	148	12
0,42	190	121	1	0,4	380	194	16
0,5	143	142	1	0,47	320	200	16

l_1 —средняя длина свободных участков ДНК

l_2 —средняя длина закрытых белком участков ДНК

n —среднее число молекул лиганда в кластерах

что молекулы ПЛ (молекулярный вес 52000), нейтрализующие 130 пар оснований каждая, располагаются вдоль решетки на расстоянии от 100 до 150 пар оснований друг от друга, если степень насыщения решетки лигандом изменяется от $\text{NH}_2/\text{P}=0,084$ до $\text{NH}_2/\text{P}=0,5$. Молекулы же протамина, экранирующие каждая 12 пар оснований, взаимодействуют с решеткой кооперативно, распределяясь на макромолекуле ДНК класте-

рами, содержащими 13 молекул белка, т. е. при малых концентрациях протамина наблюдается самосборка нуклеосомоподобных структур [7].

Таким образом, можно сказать, что наличие кооперативных взаимодействий во всех исследуемых нами модельных системах диктует неспецифическую самосборку компонентов в надмолекулярные структуры.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 10.I 1979 г.

ՓՈՆԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿՈՈՊԵՐԱՏԻՎՆԻԹՅՈՒՆԸ ՈՐՂԵՍ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԱՍՈԱՅՄԱՆ ՀԱՏԿԱՆԵՇ

Մ. Ա. ՆՈՎՈՍԵԼԵՐ, Զ. Մ. ԱՅՎԱԶՅԱՆ, Վ. Վ. ԲԱԳԴԱՍՅԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՇԱԶԻՆՅԱՆ

Հետազոտվել են ԴՆԹ-ի, ամֆիֆիլների անսամբլների, ԴՆԹ-լիզանգ և միցել-ցածրամոլեկուլային հիդրոֆոբ սուբստրատ մոդելային համակարգերը՝ աղաչրային միջավայրում: Յուրջ է արվում, որ քննվող համակարգերում գոյություն ունի մի շարք հատկությունների ընդհանրություն. ինչպիսիք են՝ իոնական ուժի ազդեցությունը միջմոլեկուլային փոխազդեցության, առաջացած կոմպլեքսների ձևի և չափերի փոփոխության վրա և այլն, լիզանդի և սուբստրատի համանման ազդեցությունը ԴՆԹ-ի և միցելների վրա՝ համապատասխանաբար:

Ենթադրվում է, որ նման մոդելային համակարգերում կոմպոնենտների ինքնակուտակմամբ վերմոլեկուլային կառուցվածքների առաջացումը պայմանավորված է կոմպոնենտների կոպերատիվ փոխազդեցությամբ:

COOPERATIVE INTERACTION OF MOLECULE ASSOCIATIONS

M. A. NOVOSELER, H. M. AJVASIAN, W. W. BAGDASSARIAN,
A. A. SHAGINIAN

The community of the following model systems has been shown: 1) DNA in water-salt solutions, 2) ensemble of amfifil molecules, 3) DNA-ligand and 4) micella-lowmolecular hidrofobic substrat. The influence of ionic strength on the degree of intermolecular cooperative interaction has been studied. A supposition that cooperative interactions stimulate selfcollapsibility of components in submolecular structures has been made.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Աճառյան Օ. Մ., Այրումյան Լ. Գ., Շաгинյան Ա. Ա. Коллоид журн., 1979 (в печати).
2. Աճառյան Վ. Մ., Գոբրիելյան Ա. Գ., Նովոսելեր Մ. Ա., Դոմասյան Զ. Գ. ДАН Арм. ССР. 17, 4, 198, 1966.
3. Волькенштейн М. В. Молекулы и жизнь, М., 1965.
4. Иванов В. И. Сб.: Молекулярная биология, М., 1973.
5. Նովոսելեր Մ. Ա. Канд. дисс., Ереван, 1976.
6. Նովոսելեր Մ. Ա. ДАН АрмССР, 66, 1, 44. 1978.
7. Նովոսելեր Մ. Ա. ДАН АрмССР, 1979 (в печати).

8. Певзнер Л. Основы биоэнергетики. М., 1977.
9. Птицин О. Б. Биофизика, 7, 257, 1962.
10. Шагинян А. А., Айвазян О. М., Налбандян Ю. Е., Мелконян Л. Г., Маркрян Ш. А. Коллоид. журн., 3, 605, 1977.
11. Шагинян А. А., Багдисян В. В., Айвазян О. М., Асланян В. М. Коллоид. журн., 1979 (в печати).
12. Шагинян А. А., Айвазян О. М., Налбандян Ю. Е., Ханданян А. Ж. Коллоид. журн., 3, 610, 1977.
13. Frank H. S. Paper presented on the 144-th National Meeting of the American Chemical Society, N. Y., 1963.
14. Li H. J., Brand B., Rotter A., Chang C., Weiscopef M. Biopolymers, 13, 1681, 1974.
15. Solie T. N., Schellman I. A. J. Mol. Biol., 33, 61, 1968.
16. Zimm B. J. Chem. Phys., 33, 1349, 1960.