

УДК 541.64:539.2:532.73

СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ СИНТЕТИЧЕСКИХ НЕИОНОГЕННЫХ ПОЛИМЕРОВ И ДНК В ВОДНО-СОЛЕВЫХ РАСТВОРАХ

© 2007 г. Е. В. Ануфриева, М. Г. Krakovjak, Т. Н. Некрасова,
Р. Ю. Смыслов, О. В. Назарова, Е. Ф. Панарин

Институт высокомолекулярных соединений

Российской академии наук

199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 15.06.2006 г.

Принята в печать 06.10.2006 г.

Люминесцентным методом наносекундной динамики обнаружено влияние солевых добавок на структурные превращения не содержащих ионогенных групп макромолекул синтетических полимеров и молекул ДНК. При добавлении солей поливалентных металлов в макромолекулах поли-*N*-н-пропилметакриламида наблюдается переход клубок–глобула, в молекулах ДНК – изменения структуры, при которых интеркалированный в ДНК в водном растворе низкомолекулярный органический катион переходит в раствор. Эти изменения проявляются при добавлении ионов поливалентных металлов в количестве один ион Mg^{2+} на десять фосфатных групп ДНК. Так же действуют и соли поликатионов, добавленные в раствор интерполиэлектролитного комплекса ДНК–поликатион.

Изменение межмолекулярных взаимодействий в водно-солевых растворах неионогенных полимеров наиболее детально изучено на примере поли-*N*-винилкапролактама (ПВК) [1]. Влияние солевых добавок на структурообразование в водных растворах биополимеров широко представлено в работах [2]. Обсуждается влияние солевых добавок на структурные переходы в макромолекулах белков, на конформационные особенности ряда других природных полимеров, в том числе ДНК, и на температуру осаждения синтетических полимеров [3].

Задача настоящей работы – установить влияние солевых добавок в водных растворах на внутримолекулярные взаимодействия в неионогенных полимерах в условиях, исключающих осаждение полимеров, а также на внутримолекулярные взаимодействия в свободных молекулах ДНК, и в молекулах ДНК, включенных в интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК). Изменение внутримолекулярных взаимодействий в макромолекулах синтетических полимеров влияет на структурную организацию макромолекул и может быть изучено методами наносекундной динамики, которые отражают изменения наносекундных внутримолекулярных контактов, ответственных за структурные переходы в макромолекулах [4].

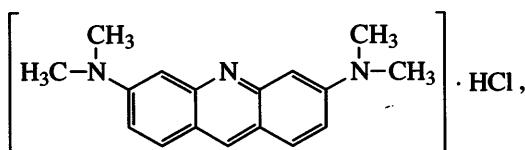
В макромолекулах ДНК изменение внутримолекулярных взаимодействий может влиять в первую очередь на внутримолекулярные контакты между основаниями ДНК, что скажется на контактах с молекулами ДНК низкомолекулярных органических катионов, интеркалированных в ДНК. Явление интеркаляции низкомолекулярных органических катионов в ДНК широко используется при анализе взаимодействия ДНК с поликатионами [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

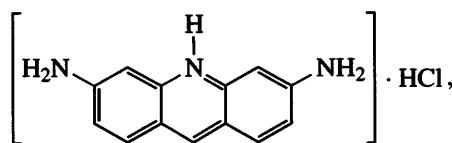
В качестве синтетического полимера использовали поли-*N*-н-пропилметакриламид (ППМА). Индикатором внутримолекулярного структурообразования в макромолекулах полимера служило формирование внутримакромолекулярных глобул, которое определяется методом поляризованной люминесценции по изменению времен релаксации для люминесцентно меченого полимера [4], полученного по методике [7]. Концентрация ППМА в растворе 0.05 мг/мл, концентрация ДНК

E-mail: polar@mail.macro.ru (Ануфриева Елизавета Викторовна).

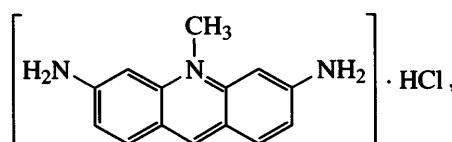
в растворе 0.07 мг/мл. Для формирования интерполиэлектролитного комплекса ДНК–поликатион использовали следующие поликатионы: поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМ), сополимеры N,N-диметиламиноэтилметакрилата с N-винилпирролидоном (ВП) или N-метакрилоиламиноглюкозой (МАГ), сополимеры N-диэтиламиноэтилметакрилата (ДЭАЭМ) с МАГ, поливиниламин (таблица). Для сополимеров с небольшим содержанием катионных звеньев (до 20 мол. %) значения ММ рассчитывали из значений характеристической вязкости $[\eta]$ по формулам для поли-N-метакрилоиламиноглюкозы, а при большом содержании звеньев ДМАЭМ или ДЭАЭМ приведены значения только $[\eta]$. Люминесцентно меченный ПДМАЭМ получали по методике [7]. Индикатор внутримолекулярного структурообразования в макромолекулах ДНК – интеркалированный в ДНК низкомолекулярный органический катион, интенсивно люминесцирующий (или не люминесцирующий) и высоко подвижный в воде в отсутствие ДНК и теряющий (или приобретающий) люминесценцию и теряющий подвижность при интеркаляции в ДНК. Об уменьшении подвижности свидетельствует увеличение времен вращательной релаксации катиона от 1 до 96 нс. В качестве таких катионов использовали: акридиновый оранжевый



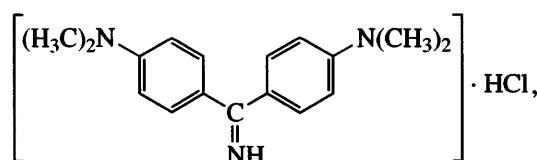
профлавин



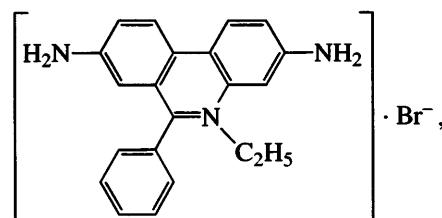
трипафлавин



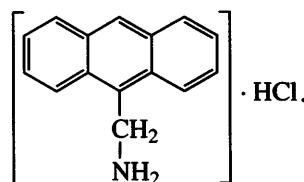
аурамин



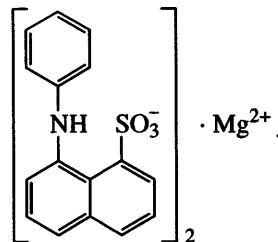
этидий бромид



солянокислый 9-антрилметиламин



Для взаимодействия с поликатионом ПДМАЭМ в воде брали люминесцирующий в связанном с макромолекулами состоянии анион 8-анилинонафталин-1-сульфонат (АНС)



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При добавлении AlCl_3 к водному раствору нейоногенного полимера ППМА изменяется время релаксации полимерных цепей τ , что свидетельствует о формировании глобуллярной структуры в макромолекулах ППМА. Доказательством формирования глобуллярных структур является характер изменения τ (рис. 1), отражающий сначала рост внутримолекулярной заторможенности, а затем появление нового релаксационного процесса с меньшим значением τ . Уменьшение значения τ после роста внутримолекулярной заторможенности обычно указывает на компактизацию макромолекулярного клубка и появление нового ре-

Характеристика исследованных (ко)полимеров

(Co)полимер	Структурная формула	[η], дл/г	Растворитель	T, °C	$\eta \times 10^3 \times M_n$
Поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат		0.065 0.2	1 М нитрат	20 °C	25 120
N,N-Диметиламиноэтилметакрилат- <i>N</i> -винилпирролидон <i>m</i> : <i>n</i> = 49 : 51		0.18	0.1 М CH3COONa	25°C	
N,N-Диметиламиноэтилметакрилат- <i>N</i> -метакрилоиламиноглюкоза <i>m</i> : <i>n</i> = 93 : 7		0.14	0.1 М Na2SO4	25°C	35
<i>m</i> : <i>n</i> = 82 : 18		0.11			20
<i>m</i> : <i>n</i> = 55 : 45		0.10			
N,N-Диэтиламиноэтилметакрилат- <i>N</i> -метакрилоиламиноглюкоза <i>m</i> : <i>n</i> = 57.5 : 42.5		0.18	ДМФА	25°C	
Поливиниламин гидрохлорид		1.03	0.1 М NaCl	25°C	75

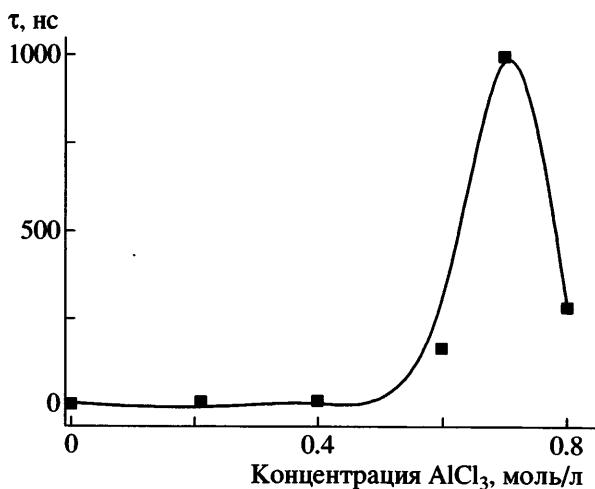


Рис. 1. Зависимость времени релаксации τ , характеризующего наносекундную подвижность макромолекул ППМА с $M = 1.7 \times 10^5$, от содержания AlCl_3 в водно-солевом растворе. $c_{\text{пол}} = 0.05$ мг/мл.

лаксационного процесса – подвижности макромолекулы как целого [4, 8, 9]. Действительно, экспериментальное значение τ при содержании AlCl_3 , равном 0.8 моль/л, совпадает с временем релаксации, характеризующим подвижность глобулы как целого, рассчитанным по формуле

$$\tau_{\text{теор}} = k[\eta]M\eta/RT \quad (1)$$

В этом соотношении M – молекулярная масса полимера, T и η – температура и вязкость растворителя. В расчете используются значения характеристической вязкости раствора полимера $[\eta] = 3–4 \text{ см}^3/\text{г}$ и $k = 1.2$ как для белковой глобулы, поскольку $[\eta] \sim 1/\tau$ [4], а значения 3–4 $\text{см}^3/\text{г}$ являются предельными.

При добавлении к раствору ДНК с интеркалированными низкомолекулярными органическими катионами уже такого малого количества соли AlCl_3 или TbCl_3 , при котором содержание ионов Al^{3+} или Tb^{3+} на порядок ниже, чем содержание фосфатных групп ДНК, структура ДНК претерпевает изменения, и низкомолекулярные катионы переходят из ДНК в раствор. Об этом свидетельствует кооперативный рост как интенсивности люминесценции, так и подвижности. Например, в случае солянокислого антрилметиламина и трипафлавина (рис. 2) при изменении содержания в растворе Al^{3+} или Tb^{3+} от 0.05 до 0.2 [Mt^{3+}] : [ДНК] интенсивность люминесценции ка-

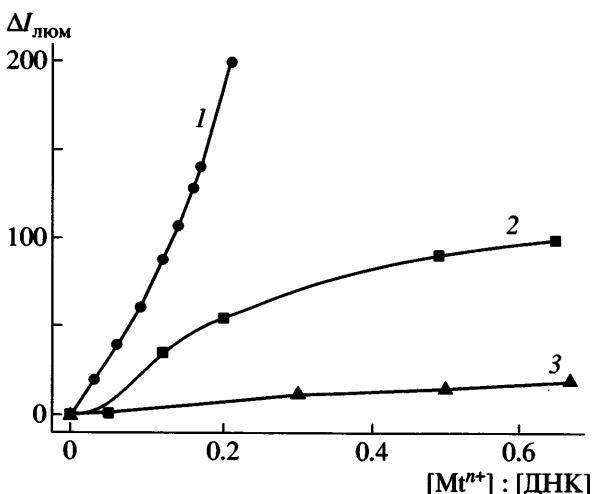


Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции $\Delta I_{\text{люм}}$ низкомолекулярного органического катиона антрилметиламина, интеркалированного в ДНК, от содержания иона поливалентного металла Mt^{3+} , отнесеного к содержанию фосфатных групп ДНК, в водном растворе ДНК. 1 – Tb^{3+} , 2 – Ca^{2+} , 3 – Rb^+ . $c_{\text{ДНК}} = 0.07$ мг/мл. $\Delta I_{\text{люм}} = I_{\text{набл}} - I_{\text{ДНК}}$.

тионов возрастает от 30 до 160 отн. ед., а время вращательной релаксации τ уменьшается от 96 до 1 нс. В работе [10] показано, что именно в этих условиях, т.е. при добавлении ионов поливалентного металла, ДНК компактируется, на что указывает двукратное уменьшение приведенной вязкости раствора ДНК.

В макромолекулах ДНК структурные изменения, влияющие на ее взаимодействие с интеркалированным низкомолекулярным органическим катионом, происходят при добавлении не только ионов поливалентных металлов, но и поликатиона. Конечно, при введении поликатиона сначала формируется ИПЭК (поликатион–ДНК), но включение ДНК в ИПЭК незначительно влияет на подвижность или люминесценцию интеркалированного в ДНК низкомолекулярного органического катиона (рис. 3). Только при избытке поликатиона после образования ИПЭК наблюдается кооперативный выход из ДНК интеркалированного низкомолекулярного катиона. При этом часть молекул поликатиона, добавленного в раствор после формирования ИПЭК, оказывается свободной, не взаимодействующей с фосфатными группами ДНК.

Формирование ИПЭК и появление в растворе свободного поликатиона определяется по изменению наносекундной подвижности люминесцентно меченого поликатиона, (данные рис. 3 получены для поликатиона ПДМАЭМ). Время релаксации поликатиона τ возрастает от 20 до 70 нс при включении поликатиона в ИПЭК и постепенно уменьшается до значения, отвечающего свободному поликатиону, который обнаруживается в растворе после завершения формирования ИПЭК.

Появление поликатиона, не связанного с ДНК, следует также из того, что поликатион, добавленный к ИПЭК, и поликатион в воде в отсутствие ДНК одинаково взаимодействуют с анионом АНС. Как видно из рис. 3, АНС в обоих случаях имеет одинаковую интенсивность люминесценции, т.е. избыточное количество поликатиона, введенное в раствор ДНК после включения ее в ИПЭК, действительно не связывается с ДНК, а остается свободным и взаимодействует с анионом АНС.

Все наблюдаемые явления – формирование глобулярной структуры в макромолекулах ППМА или структурные изменения ДНК при введении в раствор низкомолекулярных или полимерных ионов могут быть вызваны, вероятно, как и при добавлении солей к раствору ПВК, изменением в структуре воды [1], которые, по-видимому, могут происходить или в объеме всего раствора (в случае неионогенного полимера), или в слое, примыкающем либо к фосфатным группам свободной ДНК (при введении Mg^{2+}), либо к ИПЭК (при появлении свободного поликатиона).

Таким образом, формирование ИПЭК с поликатионом не приводит к вытеснению из ДНК в раствор интеркалированного в ДНК низкомолекулярного органического катиона. Это значит, что выход последнего происходит вследствие появления свободных (избыточных) поликатионов, а не в результате конкуренции поликатиона с низкомолекулярным катионом за взаимодействие с ДНК. Отсюда следует также, что изменение интенсивности люминесценции низкомолекулярного катиона, интеркалированного в ДНК, не может быть индикатором образования ИПЭК. Именно свободный поликатион может влиять на структуру воды и тем самым вызывать те изменения структуры ДНК, которые способствуют выходу в раствор низкомолекулярного органического

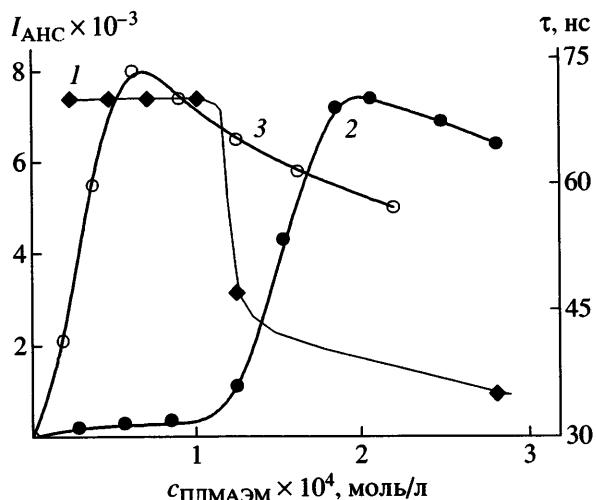


Рис. 3. Зависимость времени релаксации τ макромолекул люминесцентно меченого ПДМАЭМ, от содержания этого полимера в водном растворе в присутствии ДНК (1) и зависимость интенсивности люминесценции АНС $I_{\text{АНС}}$ от содержания ПДМАЭМ в водном растворе в присутствии (2) и в отсутствие ДНК (3); $c_{\text{ДНК}} = 0.07 \text{ мг/мл}$. Значение τ в отсутствие ДНК равно 20 нс.

иона. Приведенные данные показывают, что не только неорганические ионы (солевые добавки) могут оказывать влияние на структуру воды и способствовать структурным превращениям макромолекул.

Из проведенного анализа становится понятным, что означают зависимости на рис. 4, на которых по мере добавления свободного поликатиона к раствору ДНК наблюдается переход от плавного изменения интенсивности люминесценции $I_{\text{люм}}$ низкомолекулярного катиона, интеркалированного в ДНК, при образовании ИПЭК к кооперативному изменению после образования ИПЭК. Кооперативный выход интеркалированного низкомолекулярного катиона после образования ИПЭК указывает на то, что изменение структуры ДНК, влияющее на интеркалированный в ДНК низкомолекулярный катион, происходит не в процессе формирования ИПЭК, а после его завершения. При этом наблюдается кооперативное увеличение наносекундной подвижности или доли свободных органических катионов, характеризуемой величиной $\theta_{\text{своб}}$, и возрастание интенсивности люминесценции (рис. 5). Показано, что эти изменения не зависят от природы низкомолекулярного органического катиона (данные

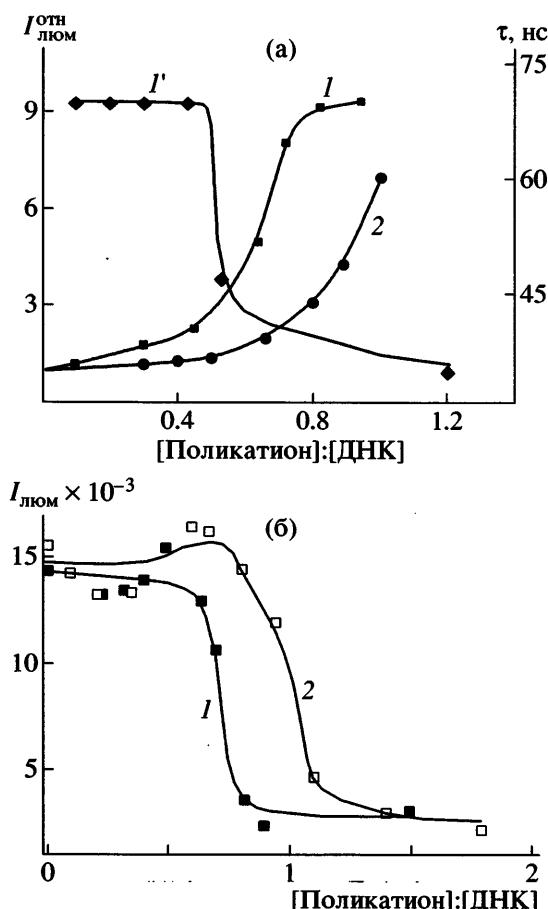


Рис. 4. Интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ низкомолекулярного органического катиона, интеркалированного в ДНК (1, 2) и время релаксации макромолекул поликатиона τ (1') в зависимости от содержания поликатиона. 1, 1' – ПДМАЭМ, 2 – поливиниламин. а – трипафлавин, б – аурамин.

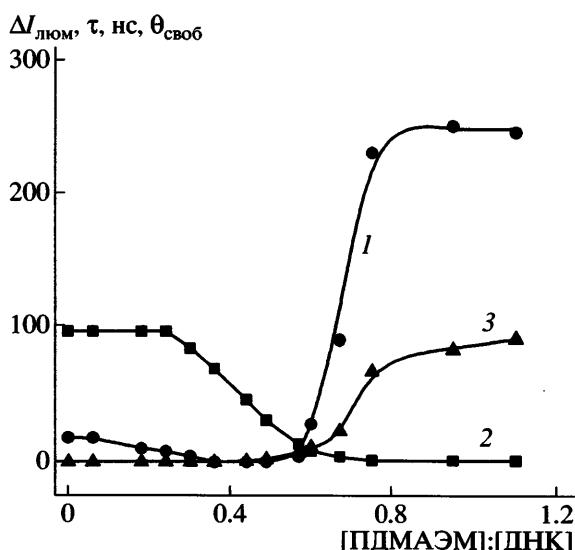


Рис. 5. Интенсивность люминесценции $\Delta I_{\text{люм}}$ (1), время релаксации τ , характеризующее подвижность ионов трипафлавина (2), и доля ионов трипафлавина $\theta_{\text{своб}}$, перешедших из ДНК в раствор (3), в зависимости от соотношения [ПДМАЭМ]: [ДНК] для ДНК с интеркалированным низкомолекулярным органическим катионом трипафлавином. Значения $\theta_{\text{своб}}$ определяли из времен релаксации для свободного $\tau_{\text{своб}}$ и связанных $\tau_{\text{связ}}$ трипафлавина по соотношению $\theta_{\text{своб}}/\tau_{\text{своб}} + (1 - \theta_{\text{своб}})/\tau_{\text{связ}} = 1/\tau_{\text{набл.}}$

Даже небольшое изменение химического строения катионного звена (при переходе от ДМАЭМ к ДЭАЭМ) отражается на значении $N : P$, при котором начинается выход низкомолекулярных органических катионов из ДНК в раствор.

Влияющие на интеркаляцию низкомолекулярных органических катионов в ДНК ионы поливалентных металлов (рис. 2) одновременно вызывают, по данным работы [10], компактизацию ДНК, что позволяет связать структурные изменения ДНК, воздействующие на интеркаляцию низкомолекулярного катиона в системе поликатион–ДНК, с компактизацией ДНК, происходящей лишь после формирования ИПЭК, в результате изменений водного окружения ДНК, обусловленных добавлением свободного поликатиона.

Представленные результаты показывают, что внутримолекулярные взаимодействия в макромолекулах синтетических неионогенных полимеров и в макромолекулах ДНК высоко чувствительны к введению солевых добавок в водные растворы полимеров. Так, для ДНК содержание солей, влияющих на структуру ДНК, оказывается очень

получены для всех низкомолекулярных катионов, представленных выше, и частично приведены на рис. 6) и определяются только строением поликатиона. В зависимости от химического строения поликатиона вытеснение из ДНК низкомолекулярного катиона происходит при разных значениях отношения $N : P$, где N и P – количество звеньев катиона и оснований ДНК в молях, например, для ПДМАЭМ и поливиниламина при значениях $N : P = 0.25$ и 0.75 соответственно (рис. 4). При частичной замене катионных звеньев неионогенными путем включения незаряженных звеньев сомономера в полимерную цепь указанные величины остаются неизменными. Подобная картина наблюдается при изменении ММ поликатиона. Данные получены для ПДМАЭМ с $M = 2.5 \times 10^4$ и 12×10^4 .

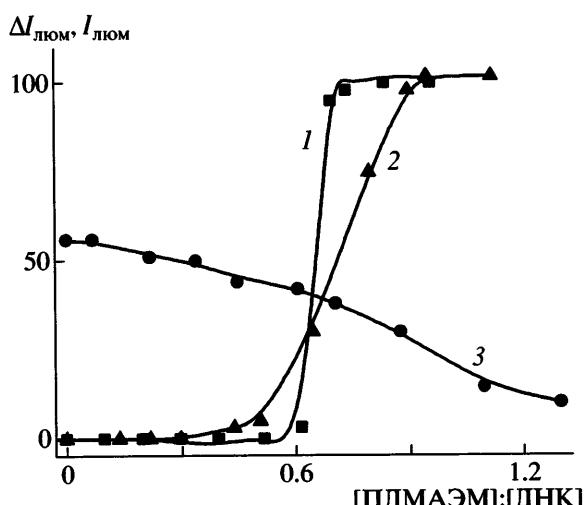


Рис. 6. Зависимости $\Delta I_{\text{люм}}$ для ДНК с интеркалированным трипафлавином (1) и хлоридом антряилметиламина (2), а также $I_{\text{люм}}$ для ДНК с этидий бромидом (3) в водном растворе от соотношения [ПДМАЭМ] : [ДНК]. $\Delta I_{\text{люм}} = I_{\text{набл}} - I_0$, где $I_{\text{набл}}$ и I_0 – интенсивности люминесценции низкомолекулярного органического катиона при добавлении ПДМАЭМ и в отсутствие ДНК в растворе.

низким – один ион Mt^{3+} на десять фосфатных групп ДНК. Низкой оказывается и концентрация свободного поликатиона, действующего на структуру ДНК в ИПЭК. Она составляет, например, для ПДМАЭМ 0.4–0.8 от мольного содержания ДНК, т.е. $(0.8–1.6) \times 10^{-4}$ моль/л при содержании ДНК, равном 2×10^{-4} моль/л (0.07 мг/мл).

Авторы благодарят И.И. Гаврилову за предоставленный образец поливиниламина гидрохлорида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кириш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. М.: Наука, 1998.
- Хиппель П., Шлейх Т. Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973. С. 320.
- Zaslavsky B.Ya., Bagirov T.O., Borovskaya A.A., Gulaeva N.D., Miheeva I.M., Mahmudov A.U., Rodnikova M.N. // Polymer. 1989. V. 30. P. 2103.
- Anufrieva E.V., Gotlib Yu.Ya. // Adv. Polym. Sci. 1981. V. 40. P. 1.
- Arigita C., Zuidam N.J., Crommelin D.J.A., Hennink W.E. // Pharmaceut. Res. 1999. V. 16. № 10. P. 1534.
- Howard K.A., Dash P.R., Read M.L., Ward K., Tomkins L.M., Nazarova O., Ulbrich K., Seymour L.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1475. P. 245.
- Ануфриева Е.В., Кирпач А.Б., Краковяк М.Г., Ананьева Т.Д., Лущик В.Б. // Высокомолек. соед. А. 2001. Т. 43. № 7. С. 1127.
- Ануфриева Е.В., Кирпач А.Б., Краковяк М.Г., Лущик В.Б., Soutar J., Swanson L. // Высокомолек. соед. А. 2000. Т. 42. № 10. С. 1704.
- Ануфриева Е.В., Ананьева Т.Д., Краковяк М.Г., Лущик В.Б., Некрасова Т.Н., Смыслов Р.Ю., Шевелева Т.В. // Высокомолек. соед. А. 2005. Т. 47. № 2. С. 332.
- Касьяненко Н.А. Автореф. ... дис. д-ра физ.-мат. наук. СПб.: СПбГУ, 2003.

Structural Transformations in Macromolecules of Synthetic Nonionogenic Polymers and DNA in Salt-Containing Aqueous Solutions

E. V. Anufrieva, M. G. Krakovskyak, T. N. Nekrasova,
R. Yu. Smyslov, O. V. Nazarova, and E. F. Panarin

Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia

e-mail: polar@mail.macro.ru

Abstract—The influence of salt additives on structural transformations in macromolecules of synthetic polymers free of ionogenic groups and DNA molecules has been determined with the use of the nanosecond dynamics luminescent method. When polyvalent metal salts are added, a coil–globule transition is observed in macromolecules of poly(*N*-*n*-propylmethacrylamide), while structural transformations occur in DNA macromolecules in aqueous solutions, which are accompanied by the passage of low-molecular-mass organic cations intercalated into DNA into solution. These transformations make themselves evident when polyvalent metal ions are added in an amount of one Mt^{3+} ion per ten phosphate groups of DNA. The same effect takes place when salts of polycations are added to solutions of DNA–polycation interpolyelectrolyte complexes.