

УДК 577.352

**СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК С КАТИОННЫМИ
АМФИФИЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ: СТРУКТУРНЫЕ
ОСОБЕННОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФЕКЦИИ¹**

Зуев Ю.Ф., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А.

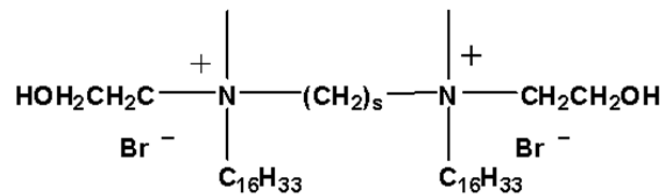
КИББ КазНЦ РАН

420111, г. Казань, Р.В. 30, e-mail: yufzuev@mail.ru

Особенности искусственных средств доставки генетического материала в растительные и животные клетки, используемые в молекулярной биологии и медицине, требуют пространственной компактизации нуклеиновых кислот, имеющих исходно большие размеры [1]. Целью настоящей работы было исследование внутренней структуры комплексов ДНК с гидроксилсодержащими алкиламмонийными геминальными поверхностно-активными веществами (ГПАВ).

Экспериментальная часть

В работе использовали ГПАВ следующего химического строения:



где s=4 (**G4**), 6 (**G6**), 8 (**G8**), (**G10**), 12 (**G12**), полученные в лабораторных условиях в Институте органической и физической химии КазНЦ РАН. В качестве модельной ДНК использовали палиндромный олигонуклеотид (ONu) **gcg-tta-acg-c** производства фирмы “Синтол” (Россия). Экспериментальные исследования проведены в 4 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 8. Концентрацию нуклеотида и молярные отношения R=[ГПАВ]/[ONu] выражали в расчете на одноце-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-29-01239 офи_м.

почечный нуклеотид. В отдельных экспериментах использовали кольцевую плазмиду pEGFP-N1 [Clontech], которая ранее была использована для трансфекции клеток НЕК [2].

Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали с помощью спектрометра Jasco-1500 (США) в спектральном диапазоне 200-350 нм, скорость сканирования 100 нм/мин, ширина щели 1 нм, шаг выборки 1 нм, 3 накопления. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Лямбда 25 (Perkin Elmer). Атомно-силовую микроскопию выполняли на приборе Multimode V (Veeco, USA) методом прерывистого контакта или таппинга. Использовали кантилеверы 250-350 Гц (Veeco, США) с силиконовым наконечником радиусом 10-13 нм. Для получения двумерных изображений поверхности применяли сканер 8279JV с разрешением 512x512 точек, скорость сканирования 1 Гц. Вибрации подавлялись антивибрационной системой SG0508. Образцы в виде водных растворов помещали на поверхность слюды с шероховатостью не более 1-2 нм и высушивали.

Для исследования взаимодействия ГПАВ с ONu использовалась программа AutoDock4.2 [3], которая позволяет проводить поиск локального минимума энергии взаимодействия между двумя молекулами. Поиск конфигураций комплексов олигонуклеотид – ГПАВ с минимальной свободной энергией осуществлялся с помощью Lamarckian genetic algorithm. Расчеты проводились на жесткой структуре олигонуклеотида, а в молекуле ГПАВ разрешалось вращение вокруг одинарных связей. Расчет свободной энергии связывания осуществлялся с учетом электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, эффекта сольватации и торсионной свободной энергии:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{sol}},$$

где ΔG_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий, ΔG_{hbond} – энергия водородных связей, ΔG_{elec} – энергия электростатических взаимодействий, ΔG_{tor} – торсионная свободная энергия, ΔG_{sol} – энергия сольватации. Для

проведения статистического анализа полученных результатов было построено 50 комплексов для каждого типа.

В работе использовали данные по трансфекции клеток (доставка чужеродной ДНК) линии 293Т эмбрионального почечного эпителия человека плазмидой рEGFP-N1 (“Clontech”, США) размером 5100 п.н., экспрессирующей зелёный флуоресцентный белок. Протокол опытов по трансфекции описан в работе [2].

Результаты и их обсуждение

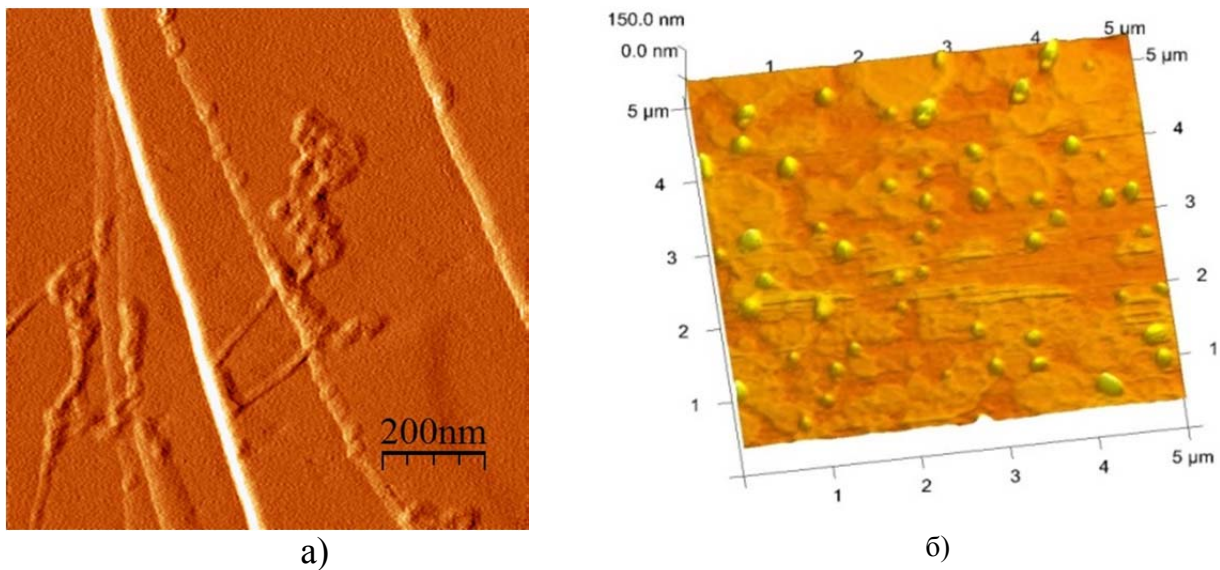


Рис. 1. Атомно-силовые изображения плазмиды рEGFP (а) и комплекса **G12**-рEGFP (б).

Комплексообразование ГПАВ и нуклеотида продемонстрировано на рис. 1, где представлены изображения с атомно-силового микроскопа плазмиды рEGFP, сорбированной на поверхности слюды и ее комплекса с ГПАВ G12 при $R = 7$. Из представленных изображений следует, что при связывании ГПАВ с плазмидой происходит компактизация ДНК с образованием агрегатов сферической формы диаметром 100-300 нм.

Ранее мы исследовали комплексообразование олигонуклеотида с ГПАВ **G4**, **G6** и **G12** [4]. На рис. 2 приведены спектры КД нуклеотида, полученные при титровании раствором ГПАВ **G12**. Спектр чистого ONu имеет характерную форму с положительным максимумом при 283 нм и примерно равным ему по величине отрицательным максимумом при 256 нм. Отношение эллиптичности в этих экстремальных точках $\theta_{283}/\theta_{256}$ равно 0.9, что соответствует В-форме исследуемого нуклеотида [5], а изменения спектра с увеличением количества

ГПАВ характерны для перехода вторичной структуры нуклеотида из формы В в форму С [5, 6].

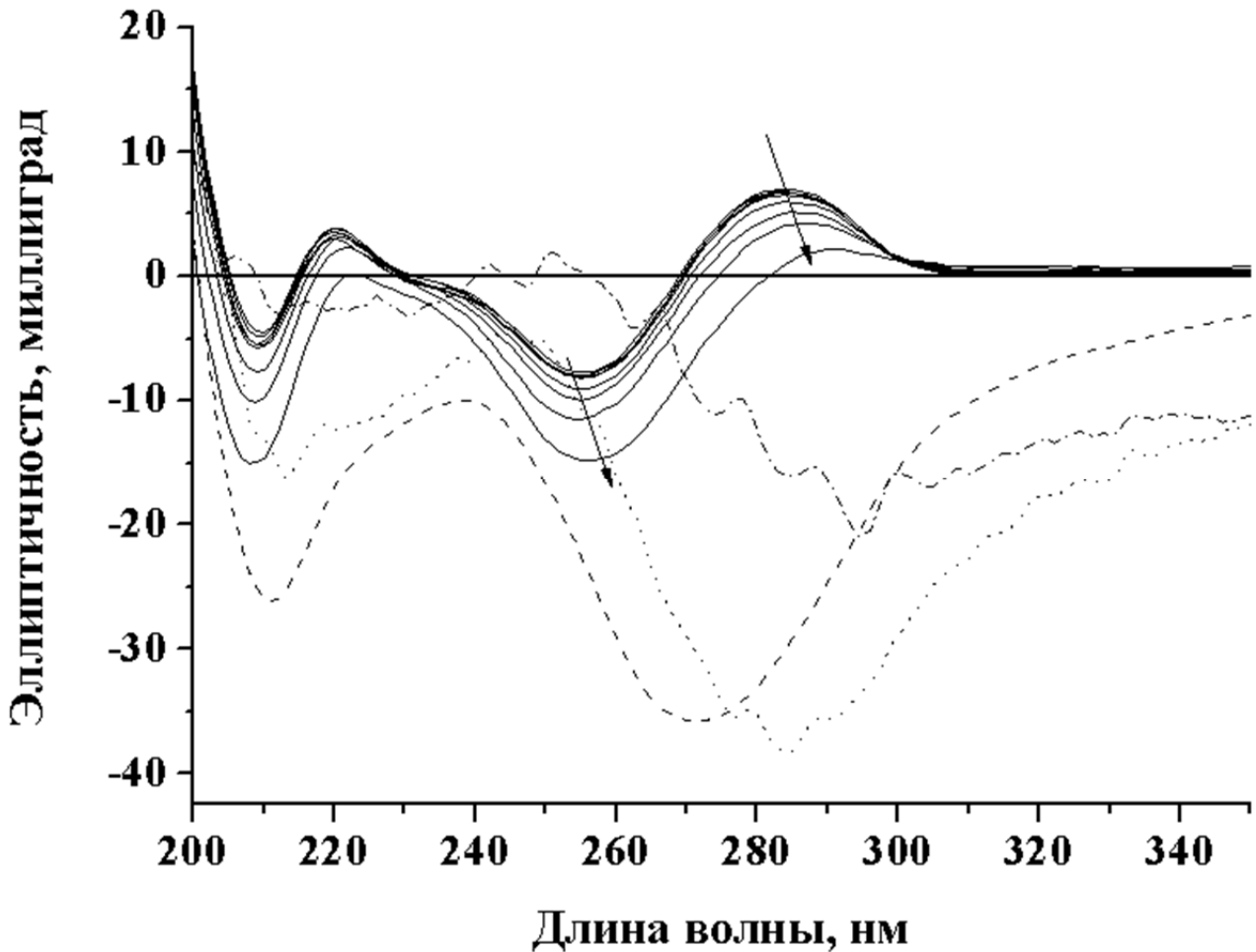


Рис. 2. Спектры КД олигонуклеотида при титровании раствора ГПАВ G12 при молярных отношениях R 0.08 – 3.4. Направление увеличения R показано стрелками. Штриховой, пунктирной и штрихпунктирной линиями обозначены спектры, снятые соответственно через 5, 15 и 25 мин после внесения ГПАВ при R = 3.4.

Для формы С, в целом сохраняющей конформацию двойной спирали ДНК, характерно изменение ориентации фосфатных групп, нуклеозидных оснований и геометрии спирали. Характер перехода сохраняется до молярного отношения $R = 1-1.5$, выше которого наблюдаются более резкое падение интенсивности положительной компоненты спектра вплоть и рост интенсивности отрицательной полосы со значительным сдвигом в длинноволновом направлении (рис. 3). Длинноволновый сдвиг отрицательной компоненты спектра свидетельствует об образовании новой структуры и может служить индикатором начала этого процесса. Комплексы с новой структурой склонны к агрегации, что регистрируется по росту светорассеяния в спектрах поглощения. Агрегация резко усиливается с увеличением молярного отношения ГПАВ/ОНu. Эволюция

спектров соответствует изменениям, связанным с образованием супрамолекулярных хиральных структур ДНК, аналогичных холестерическим жидким кристаллам (пси-фаза (polymer-salt-induced)) [7, 8], дихроизм которых зависит от размера образующихся супрамолекулярных комплексов. Спектры КД (рис. 1) при достаточно высокой концентрации ГПАВ обладают всеми признаками пси-фазы ДНК, а отрицательная эллиптичность полосы свидетельствует о левовращающем характере новообразованной хиральной структуры.

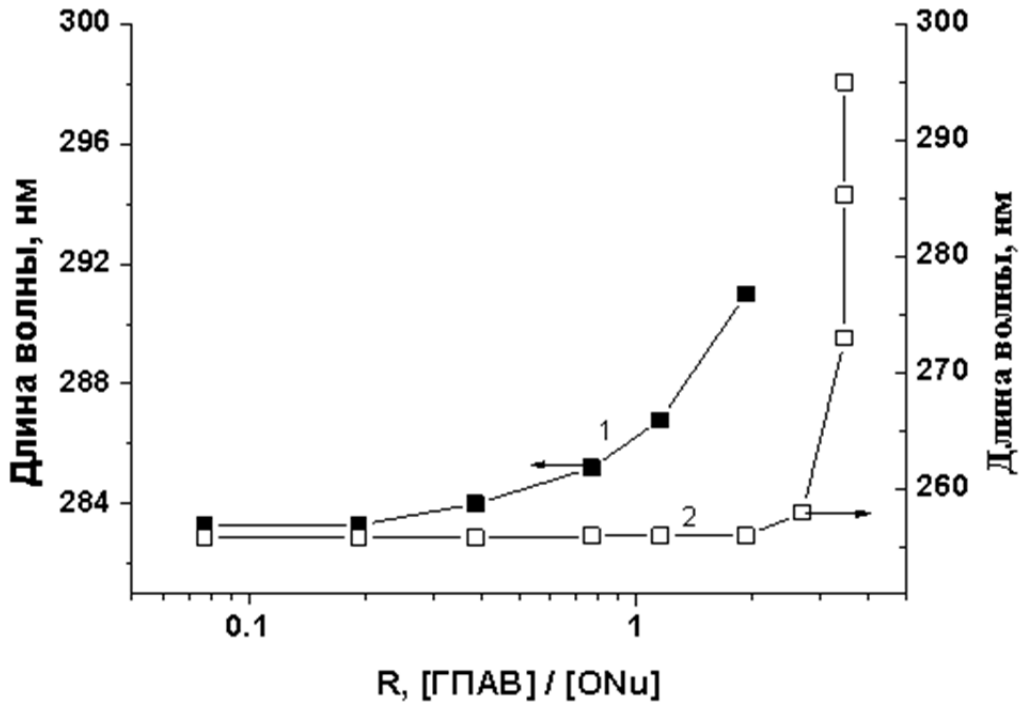


Рис. 3. Смещение максимума положительной (1) и отрицательной (2) компонент спектра КД нуклеотида в зависимости от молярного отношения G12/ONu.

При титровании раствора олигонуклеотида ГПАВ G4 и G6 спектральные изменения качественно схожи с G12, различаясь по величине пороговой концентрации образования пси-фазы.

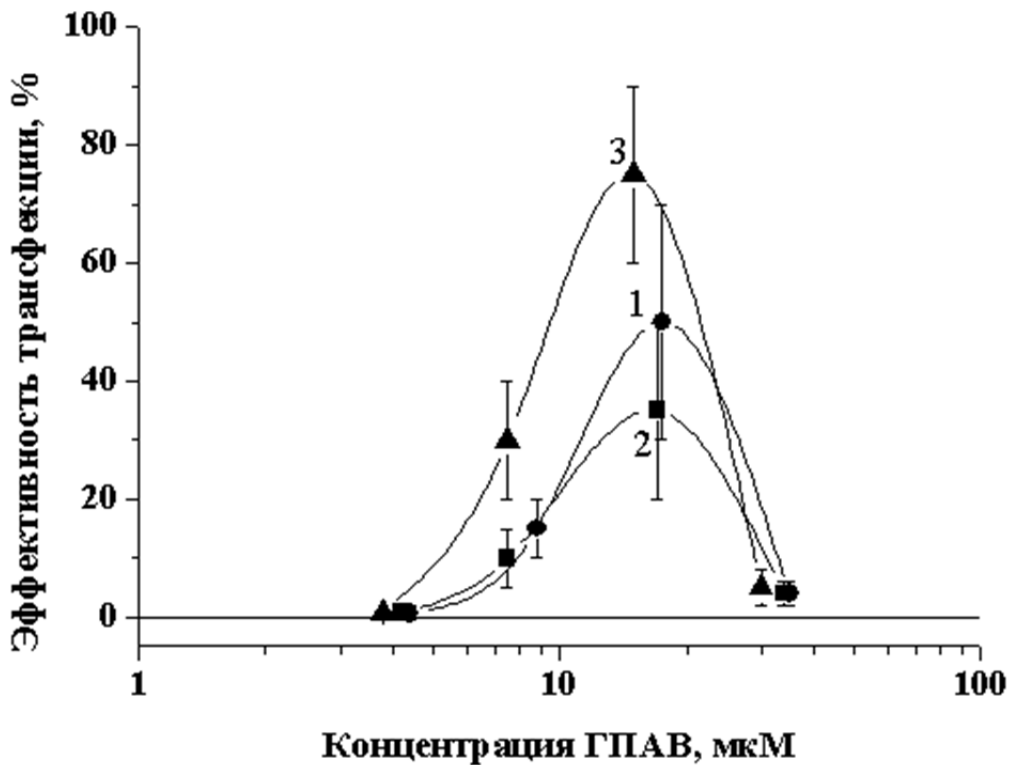


Рис. 4. Эффективность трансфекции в зависимости от концентрации ГПАВ. Цифрами на графике обозначены зависимости для $s = 4$ (1), 6 (2), 12 (3).

Мы сопоставили концентрационные зависимости комплексообразования ГПАВ с олигонуклеотидом с концентрационными зависимостями эффективности трансфекционной активности этих соединений в отношении плазмиды рEGFP-N1 размером 5100 п.н. и клеток НЕК293Т (рис. 4). Оказалось, что трансфекция не происходит при концентрациях ГПАВ ниже границы образования пси-фазы. Эффективность трансфекции отлична от нуля лишь в области существования хиральных супрамолекулярных комплексов и достигает максимума при концентрациях, близких к пороговой концентрации агрегации комплексов.

Спектр КД плазмиды рEGFP-N1 размером 5100 п.н. в отсутствие ГПАВ соответствует В-форме ДНК. Начиная с определенной концентрации ГПАВ (3 мкМ), появляется так называемая пси-фаза ДНК, представляющая собой левовращающую супрамолекулярную структуру. Эволюция спектров КД плазмиды качественно совпадает с поведением десятичленного нуклеотида при титровании растворами ГПАВ. Однако, в отличие от короткого олигонуклеотида изменения в спектрах плазмиды выражены слабее, и в растворе не образуются крупных нерастворимых частиц. Сопоставление данных рис. 5 с данными по транс-

фекции на рис. 4 показывает хорошее соответствие концентрационных интервалов образования супрамолекулярных структур ГПАВ/ДНК и трансфекционной активности комплексов.

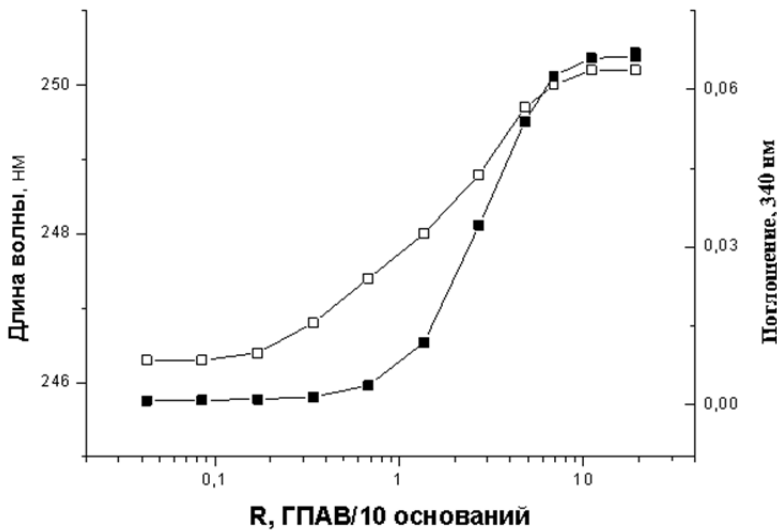


Рис. 5. Зависимость положения максимума отрицательной полосы на 246 нм в спектрах КД (светлые символы, левая шкала) и интенсивности светорассеяния в спектрах УФ (темные символы, правая шкала) плазмиды от R. Для удобства сопоставления с олигонуклеотидом величина R рассчитывалась как отношение числа молей ГПАВ к числу молей одноцепочечных декамеров в структуре плазмиды.

Взаимодействие ДНК с молекулами ГПАВ было оценено методом молекулярного докинга. Наличие длинных алкильных радикалов позволяет молекулам ГПАВ локализоваться в малой бороздке ДНК (рис. 6), при этом основной вклад в механизм взаимодействия алкильных радикалов с ДНК дают гидрофобные взаимодействия. Чем длиннее алкильный радикал, тем выше благоприятный вклад энергии ван дер Ваальса и тем более неблагоприятен энтропийный вклад в свободную энергию взаимодействия молекулы ПАВ и ДНК. Взаимодействие полярных головных групп ПАВ с ДНК зависит от нескольких параметров: типа и размера этих головных групп, заряда, длины спейсера, которая влияет на распределение потенциала. Кроме того, увеличение ионной силы раствора приводит к ослаблению электростатического взаимодействия молекул. Расчеты показывают, что при малых концентрациях геминальных ПАВ образуются комплексы ДНК-ГПАВ и механизм этого взаимодействия имеет гидрофобный характер. При увеличении концентрации ГПАВ и образовании ими мицелл механизм взаимодействия меняется и возрастает роль электростатического взаимодействия. Таким образом, взаимодействие молекул ГПАВ с ДНК является балансом действия множества различных факторов, не является монотонной функцией одного параметра и зависит, в том числе, от конкуренции сродства молекул ГПАВ к молекулам ДНК и к другим молекулам ПАВ.

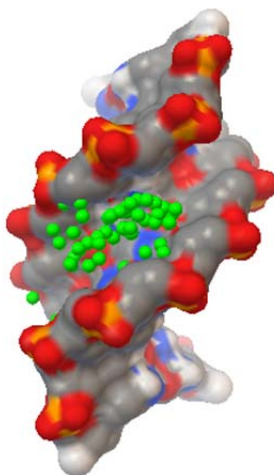


Рис. 6. Локализация центров масс молекулы ГПАВ **G6** в комплексах с олигонуклеотидом ДНК. Зеленые шарики представляют центры масс молекулы ГПАВ.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о связывании катионных ГПАВ с ДНК. При связывании геминальных гидроксиэтилированных ПАВ с ДНК в определенных концентрационных интервалах, не зависящих от длины цепи ДНК, происходит ее компактизация. При этом ДНК образует супрамолекулярные хиральные комплексы с ПАВ. Условия возникновения комплексов совпадает с проявлением их трансфекционной активности.

Благодарности

Авторы выражают свою благодарность проф. Захаровой Л.Я. (ИОФХ им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН) за предоставление катионных геминальных ПАВ и директору междисциплинарного центра аналитической микроскопии Осину Ю.Н. за помощь в исследованиях методом АСМ.

Литература

1. Teif V.B., Vohinc K. [Condensed DNA: condensing the concepts](#) // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2011. – V. 105. – P. 208–222.
2. Григорьев И.В., Коробейников В.А., Чересиз С.В., Покровский А.Г., Захарова Л.Я., Воронин М.А., Лукашенко С.С., Коновалов А.И., Зуев Ю.Ф. Катионные геминальные ПАВ как новые средства доставки плазмидной ДНК в клетки // Докл. Академии наук. – 2012. – Т. 445. № 3, – С. 349–352.

3. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* – 2009. – V. 30. – P. 2785–2791.
4. Файзуллин Д.А., Зуев Ю.Ф., Захарова Л.Я., Покровский А.Г., Коробейников В.А., Мухаметзянов Т.А., Коновалов А.И. // Липоплексы дикатионных геминальных ПАВ с ДНК: структурные особенности компактизации ДНК и эффективность трансфекции // *Докл. Академии наук.* – 2012 – Т. 465. № 6. – С. 745-748.
5. Zuidam N.J., Barenholza Y., Minsky A. Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposome assemblies // *FEBS Letters.* – 1999. – V. 457. – P. 419–422.
6. van Dam L., Levitt M.H. BII nucleotides in the B and C-forms of natural-sequence polymeric DNA: a new model for the C-form of DNA // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 304. – P. 541–561.
7. Shin Y.A., Eichhorn G.L. Formation of psi (+) and psi (-) DNA // *Biopolymers.* – 1984. – V. 23. – P. 325–335.
8. Cherstvy A.G. DNA cholesteric phases: the role of DNA molecular chirality and DNA-DNA electrostatic interactions // *J. Phys. Chem. B* – 2008. – V. 112. – P. 12585–12595.