

УДК 547.963.3

**КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ,
ИНДУЦИРУЕМАЯ ПОЛИЛИЗИНОМ И СПЕРМИДИНОМ**

© 2007 Н.А. Касьяненко*, Б.А. Дрибинский

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 20 февраля 2007 г.*

Методами кругового дихроизма, ультрафиолетовой спектрофотометрии, динамического светорассеяния (ДСР), вискозиметрии и динамического двулучепреломления изучены конформационные свойства молекулы ДНК при комплексообразовании с полилизин (PLL) и спермидином (Spd). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при соотношении концентраций мономерных остатков полилизина и ДНК, выраженных в молях (N/P), меньше единицы вязкость меняется мало, а при $N/P > 1$ происходит ее резкое падение до значений, практически совпадающих с вязкостью растворителя. Это сопровождается изменением оптической анизотропии и спектров кругового дихроизма ДНК. Данные, полученные методом ДСР, свидетельствуют, что при $N/P > 1$ образуются компактные дискретные частицы.

Ключевые слова: ДНК, компактизация, полилизин, спермидин.

Изучение компактизации ДНК в растворах, вызванной ее взаимодействием с различными соединениями, представляет интерес не только для понимания конформационных свойств биологических макромолекул, но и для подбора оптимальных условий при конструировании наноструктур на основе нуклеиновых кислот. К последним относятся, например, невирусные генные векторы, используемые для направленной доставки модифицированного генетического материала в клетки-мишени. При создании таких структур используют поликатионы [1–4], в том числе полилизин [5, 6].

Увеличить эффективность трансфекции ДНК-полимерных комплексов можно за счет оптимизации структуры поликатионов и включения лигандов, имеющих большую степень сродства с клеточными мембранами. Однако для этого необходимы систематические исследования комплексообразования ДНК с конденсирующими агентами различной природы. Известно, что некоторые заряженные лиганды и поликатионы способны вызывать конденсацию ДНК с образованием компактных дискретных частиц определенной морфологии. К таким агентам относятся спермидин и полилизин [7, 8]. Изучение конденсации ДНК продолжается на протяжении многих лет [9, 10], но молекулярные основы этого процесса до конца не поняты.

Цель данной работы — сравнение взаимодействия молекулы ДНК с полилизин различной молекулярной массы и спермидином для выявления особенностей компактизации ДНК, индуцируемой поликатионами и малыми заряженными лигандами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали препараты фирмы "Sigma" (рис. 1): спермидин тригидрохлорид (Spd) и поли-L-лизин гидробромид со средней степенью полимеризации $n = 270$ (PLL270) и $n = 17$ (PLL17), тимусную ДНК ($2 \cdot 10^4$ пар оснований), молекулярная масса которой была оп-

* E-mail: kasyan@paloma.spbu.ru

Рис. 1. Структурные формулы полилизина и спермидина

ределена по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl. Измерения проводили при концентрации поддерживающего электролита (NaCl) 0,005 М и 1 М при температуре 21 °С.

Концентрация ДНК при приготовлении комплексов составляла 0,004 %.

Относительную вязкость растворов ДНК $\eta_r = \eta/\eta_0$,

где η и η_0 — вязкость раствора и растворителя соответственно, измеряли с помощью низкограддиентного ротационного вискозиметра типа Зимма—Крозерса [11]. Диапазон используемых градиентов скорости составлял $g \cong (0,5-2) \text{ с}^{-1}$.

Зависимость величины двойного лучепреломления Δn растворов ДНК от градиента скорости потока g определяли на установке с полутеневым эллиптическим компенсатором. Для растворов ДНК вследствие пренебрежимо малого вклада эффекта формы в измеряемое двойное лучепреломление справедливо следующее уравнение [12]:

$$\frac{(\Delta n/g)_{g \rightarrow 0}}{(\eta_r - 1)\eta_0} = \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} S(\beta_1 - \beta_2).$$

Здесь $[n]/[\eta]$ — отношение динамооптической постоянной к характеристической вязкости ДНК, пропорциональное оптической анизотропии макромолекулы $(\gamma_1 - \gamma_2)$, где γ_1 и γ_2 — поляризуемости молекулярного клубка вдоль главных осей (для модели эллипсоида вращения); k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; S — число звеньев в статистическом сегменте; $(\beta_1 - \beta_2)$ — разность поляризуемости пары нуклеотидов вдоль и поперек оси спирали.

Спектры кругового дихроизма регистрировали с помощью дихрографа Mark 4, Jobin Yvon (Франция). Измерение оптической плотности растворов D проводили на спектрофотометре СФ-26.

При исследовании систем методом динамического светорассеяния определяли гомодинную корреляционную функцию интенсивности $G^{(2)}(t)$ на установке PhotoCor-SP (Россия) с He-Ne-лазером с длиной волны излучения 632,8 нм. В приближении отсутствия межмолекулярных взаимодействий с точностью до членов порядка $1/N$ (N — число рассеивателей) справедливо соотношение Зигерта:

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta |g^{(1)}(t)|^2,$$

где $g^{(2)}(t) = G^{(2)}(t) / G^{(2)}(\infty)$ — нормированная корреляционная функция интенсивности рассеянного света; $G^{(2)}(\infty)$ — экспериментально определяемая базовая линия; β — фактор когерентности; $g^{(1)}(t) = G^{(1)}(t) / G^{(1)}(0)$ — нормированная автокорреляционная функция поля.

В разбавленных растворах монодисперсных частиц при условии $q\langle R^2 \rangle^{1/2} \ll 1$ (где q — величина вектора рассеяния, $q = (4\pi/\lambda)\sin(\vartheta/2)$, ϑ — угол рассеяния, $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ — среднеквадратичный радиус инерции макромолекулы) автокорреляционная функция поля является взвешенной суммой индивидуальных вкладов различных релаксационных процессов:

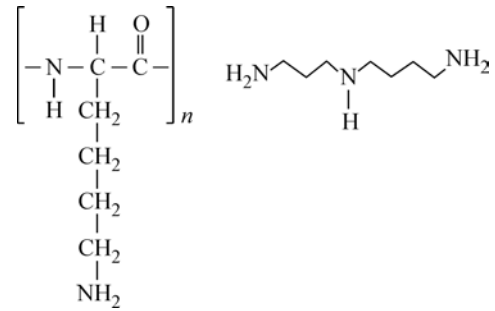
$$g^{(1)}(t) = \sum A(\tau) \exp(-t/\tau_i).$$

Здесь τ_i — время релаксации рассматриваемого релаксационного процесса. Коэффициент поступательной диффузии частицы D может быть определен

$$D = \lim_{q \rightarrow 0} (\Gamma/q^2).$$

Γ — скорость релаксации, $\Gamma = 1/\tau$. Измерения для каждой системы проводили в диапазоне углов 40—90°. Коэффициент диффузии частиц определяли по наклону зависимости $1/\tau$ от q^2 . Предполагая сферическую форму частиц, проводили оценку их размеров (гидродинамического радиуса R_h) с помощью формулы Стокса—Эйнштейна

$$R_h = kT/6\pi\eta_0 D.$$



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При отношении молярных концентраций мономерных остатков полилизина и ДНК $C_{PLL}/C_{ДНК}$ (далее N/P) менее единицы специфическая вязкость растворов $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = (\eta - \eta_0)/\eta_0$ изменяется мало, а при $N/P > 1$ происходит резкое падение вязкости до значений, совпадающих с вязкостью растворителя (рис. 2). Обнаружено, что для Spd определяющим оказывается не соотношение N/P ($C_{Spd}/C_{ДНК}$), а концентрация соединения: компактизация ДНК наблюдается при $C_{Spd} > 2 \cdot 10^{-4}$ М.

Различие во влиянии PLL и Spd на ДНК проявляется и в растворах большой ионной силы (см. рис. 2). Специфическая вязкость растворов не изменяется с увеличением C_{Spd} , а при добавлении PLL ее падение наблюдается при больших N/P по сравнению с наблюдаемым в 0,005 М NaCl. Таким образом, экранировка заряженных групп ДНК в 1 М NaCl препятствует связыванию ДНК со Spd, но не мешает взаимодействию с PLL. Комплексообразование PLL и Spd с ДНК в значительной степени обусловлено притяжением между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и азотосодержащими группами PLL и Spd. При большой ионной силе раствора (1 М NaCl), когда противоионы (Na^+) эффективно экранируют заряд ДНК, спермидин не может приблизиться к макромолекуле и вступить с ней во взаимодействие. Вместе с тем, хотя заряд поликатионов в 1 М NaCl также экранируется из-за высокой концентрации противоионов, а полиэлектролитное набухание макромолекул подавлено, вероятность их контактов с ДНК отлична от нуля из-за относительно большого размера молекулярных клубков. По-видимому, этим обусловлено наблюдаемое в эксперименте взаимодействие ДНК с PLL, фиксируемое по уменьшению специфической вязкости растворов.

Наблюдаемое при определенных N/P падение специфической вязкости растворов ДНК с PLL и Spd сопровождается столь же резким изменением оптической анизотропии макромолекулы (рис. 3). Из рисунка видно, что поведение оптической анизотропии при изменении концентрации PLL и Spd сходно и коррелирует с данными вискозиметрических исследований. Причиной падения оптической анизотропии при конденсации ДНК до очень малых значений может быть образование компактных сферических частиц. При этом компактизация ДНК сопровождается изменением оптической плотности растворов.

Согласно спектрам УФ поглощения (рис. 4) происходит увеличение оптической плотности растворов ДНК при добавлении Spd и PLL (при $N/P > 1$) во всем используемом диапазоне длин волн (220—310 нм), где Spd и PLL не имеют полосы поглощения. При длине волны 310 нм — вне полосы поглощения ДНК — оптическая плотность растворов увеличивается на такую же

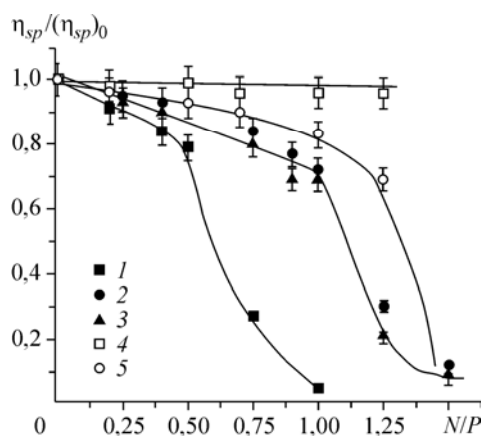


Рис. 2. Зависимость относительного изменения специфической вязкости от N/P для водных растворов ДНК с Spd (1, 4), PLL270 (2, 5), PLL17 (3); 1—3 — ионная сила 0,005 М NaCl; 4—5 — 1 М NaCl. η_{sp0} — вязкость раствора ДНК без поликатионов

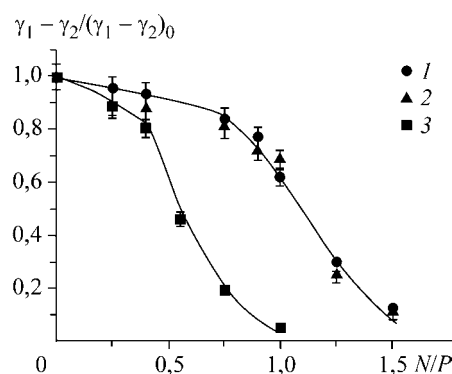
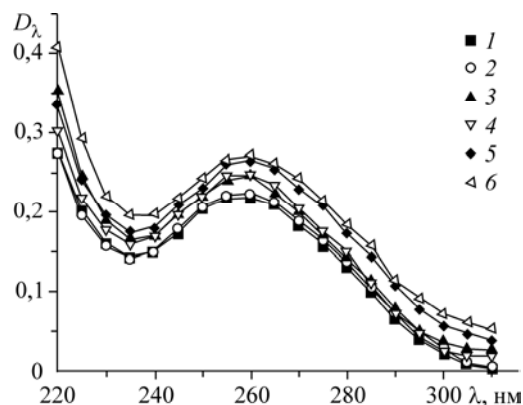


Рис. 3. Зависимость относительного изменения оптической анизотропии ДНК от N/P в водных растворах (0,005 М NaCl) при добавлении PLL270 (1), PLL17 (2), Spd (3)

Рис. 4. Спектры УФ поглощения водных растворов ДНК (0,005 М NaCl, $C_{\text{ДНК}} = 0,001\%$) без конденсирующих агентов (1); при добавлении PLL270 ($N/P = 0,7$ (2), $N/P = 1$ (3)); Spd ($C = 10^{-4}$ М (4), $C = 2 \cdot 10^{-4}$ М (5)); PLL17 ($N/P = 1$ (6))



величину, что и при 260 нм — в максимуме спектра УФ поглощения ДНК. Данный результат указывает на отсутствие нарушений во вторичной структуре ДНК. По-видимому, увеличение оптической плотности растворов связано с увеличением рассеяния из-за конденсации ДНК. Известно, что конденсация ДНК представляет собой фазовый переход, т.е. превращение молекулярного раствора ДНК в дисперсную систему с частицами наноразмеров.

Сравнение действия PLL разной степени полимеризации показывает, что объем ДНК и ее оптическая анизотропия изменяются одинаково при добавлении PLL270 и PLL17, тогда как спектральные методы фиксируют некоторое различие в их влиянии на ДНК: например, спектры КД при использовании разных образцов полилизина изменяются по-разному (рис. 5), при этом они отличаются от спектров растворов ДНК с Spd. Отметим, однако, некоторое сходство в спектрах кругового дихроизма при взаимодействии ДНК со Spd и PLL17. Таким образом, глобальные изменения структуры ДНК (объем и оптическая анизотропия макромолекулы) оказались сходными при добавлении всех использованных в работе соединений, вместе с тем спектральные исследования указывают на существование различий в конформационных изменениях ДНК на уровне вторичной структуры.

Оценка размеров комплексов, проведенная с помощью метода динамического светорассеяния, свидетельствует об образовании компактных дискретных частиц. Как видно из сравнения данных для свободной макромолекулы и ее комплексов с PLL и Spd (см. таблицу), гидродинамический радиус при компактизации ДНК меняется практически на порядок. При этом наблю-

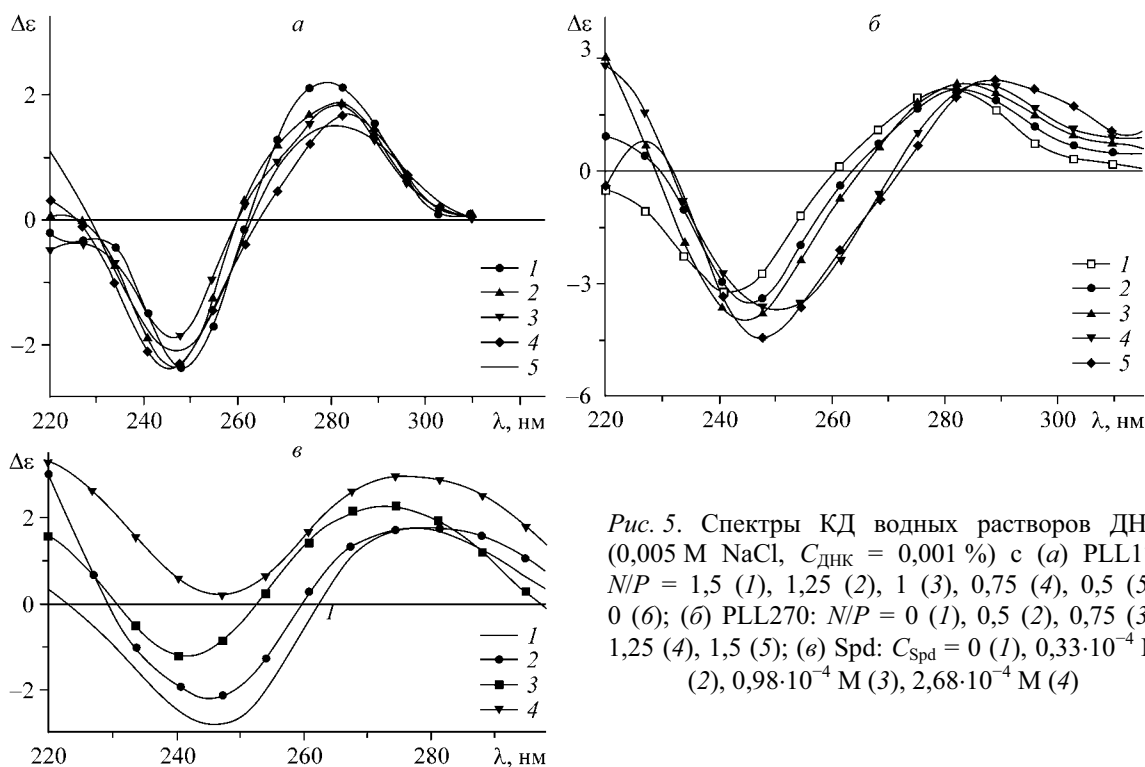


Рис. 5. Спектры КД водных растворов ДНК (0,005 М NaCl, $C_{\text{ДНК}} = 0,001\%$) с (а) PLL17: $N/P = 1,5$ (1), 1,25 (2), 1 (3), 0,75 (4), 0,5 (5), 0 (6); (б) PLL270: $N/P = 0$ (1), 0,5 (2), 0,75 (3), 1,25 (4), 1,5 (5); (в) Spd: $C_{\text{Spd}} = 0$ (1), $0,33 \cdot 10^{-4}$ М (2), $0,98 \cdot 10^{-4}$ М (3), $2,68 \cdot 10^{-4}$ М (4)

Относительный гидродинамический радиус и коэффициент диффузии частиц в растворах ДНК (0,005 М NaCl) с полилизинном и спермидином по данным динамического светорассеяния

Компоненты раствора	N/P	R_H/R_{H0}	$D_T, \text{см}^2/\text{с}$
ДНК	0	1	$(0,30 \pm 0,03) \cdot 10^{-8}$
ДНК + PLL17	1,1	0,15	$(1,99 \pm 0,14) \cdot 10^{-8}$
ДНК + PLL17	1,5	0,15	$(1,87 \pm 0,18) \cdot 10^{-8}$
ДНК + PLL270	1,1	0,11	$(2,71 \pm 0,13) \cdot 10^{-8}$
ДНК + PLL270	1,5	0,12	$(2,59 \pm 0,11) \cdot 10^{-8}$
ДНК + Spd	1,1	0,16	$(1,84 \pm 0,18) \cdot 10^{-8}$
ДНК + Spd	1,5	0,14	$(2,25 \pm 0,07) \cdot 10^{-8}$

дается унимодалное узкое распределение по временам релаксации, что свидетельствует о монодисперсности системы. Образование компактных (конденсированных) структур сопровождается изменением оптической плотности растворов (см. рис. 4), которое, как было отмечено выше, по всей видимости, обусловлено трансформацией молекулярного раствора в дисперсную систему с малыми частицами. Согласно данным, полученным методом динамического светорассеяния, гидродинамический радиус этих частиц приблизительно одинаков (~100 нм) при использовании разных конденсирующих агентов.

Таким образом, сопоставление гидродинамических и спектральных свойств позволило обнаружить определенные различия во влиянии поликатионных конденсирующих агентов и коротких заряженных цепочек на конформацию ДНК в растворах. Вместе с тем, дискретные частицы, которые образуются в результате конденсации, индуцированной использованными в работе соединениями, имеют близкие размеры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A.J. // *Molecules*. – 2005. – **10**. – P. 34 – 64.
2. Dubruel P., Schacht E. // *Macromol. Biosci.* – 2006. – **6**. – P. 789 – 810.
3. Касьяненко Н.А., Копышев А.М., Обухова О.Н. и др. // *Журн. физ. химии*. – 2002. – **76**. – С. 2021 – 2026.
4. Slita A.V., Kasyanenko N.A., Nazarova O.V. et al. // *J. Biotechnol.* – 2007. – **127**, N 4. – P. 679 – 693.
5. Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. // *AAPS J.* – 2005. – **7**, N 1. – P. E61 – E77.
6. Lollo C.P., Banaszczuk M.G., Mullen P.M. et al. // *Meth. Mol. Med.* – 2002. – **69**. – P. 1 – 13.
7. Gosule L.C., Schellman J.A. // *Nature*. – 1976. – **259**. – P. 333 – 335.
8. Hansma H.G., Pietrasanta L.I., Golan R. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2000. – **2**. – P. 271 – 275.
9. Bloomfield V.A. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – **6**. – P. 334 – 341.
10. Hud N.V., Downing K.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – **98**. – P. 14925 – 14930.
11. Frisman E.V., Shchagina L.V., Vorob'ev V.I. // *Biorheol.* – 1965. – **2**. – P. 189 – 194.
12. Фрисман Э.В., Сибилева М.А., Красноперова А.В. // *Высокомолекулярное соединение*. – 1962. – **1**. – С. 597 – 606.