

УДК 541(49+64):547.9

ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДНК: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИПОСОМАМИ

© 1993 г. С. А. Сухишвили*, О. Л. Обольский**, И. В. Астафьева**,
А. В. Кабанов**, А. А. Ярославов*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119899 Москва, Ленинские горы
**Московский институт биотехнологии, 113149 Москва, Симферопольский бульвар, 8

Изучены образование и взаимодействие с отрицательно заряженными липосомами интерполиэлектролитных комплексов ДНК с цетилпиридиний бромидом и поликатионами (поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом и сополимером N-этил-4-винилпиридиний и N-цетил-4-винилпиридиний бромидов (ПВПЭЦ)). Обнаружено, что константы образования интерполиэлектролитных комплексов ДНК со всеми катионами столь велики, что все молекулы компонентов смеси входят в состав таких комплексов. Эти комплексы представляют собой крупные агрегаты, когда отношение f между числом молекул цетилпиридиний бромида или мономерных звеньев поликатиона и мономерных звеньев ДНК близко к единице. Размер комплексов резко падает как с увеличением, так и с уменьшением содержания катионов. В присутствии липосом комплекс цетилпиридиний бромида с ДНК ($f = 0.1$) полностью разрушается; при этом цетилпиридиний бромид встраивается в липидный бислой, а высвободившаяся ДНК остается в растворе. Комплексы поли-N-этил-4-винилпиридиний бромида с ДНК ($f = 0.1$) вообще не реагируют с липосомами. Иная картина наблюдается в случае интерполиэлектролитных комплексов, образованных ПВПЭЦ и ДНК. Благодаря наличию боковых цетильных заместителей в молекуле ПВПЭЦ такие комплексы, не диссоциируя, связываются с поверхностью липосом, образуя при этом трехкомпонентный комплекс ПВПЭЦ-ДНК-липосомы.

ВВЕДЕНИЕ

Доставка нукleinовых кислот в клетку является одной из актуальных задач генной инженерии [1]. ДНК вводят в клетку либо путем препарации с фосфатом кальция [2] или диэтиламиноэтидекстраном [3], электропорацией [4], микропинъекциями [5], либо включая ее в оболочку вирусов [6] или липосом [7]. В поисках путей более эффективного введения нукleinовых кислот в клетку был предложен новый подход, основанный на связывании нукleinовых кислот в интерполиэлектролитный комплекс (ИПЭК) с поликатионами [8 - 12]. В частности, на примере бацилл и клеток млекопитающих было показано, что включение ДНК в состав ИПЭК с кватернизованными поли-4-винилпиридинами (ПВП) существенно усиливает связывание ДНК на клеточной мембране и ее последующее проникновение в клетки *Bacillus subtilis* [10 - 12].

Тем не менее механизм и движущие силы взаимодействия таких ИПЭК с клеточной мембраной изучены мало. Исследованию этих вопросов на модельной системе и посвящена настоящая работа. Объектом, имитирующим клетку, служили отрицательно заряженные липосомы. Выбор катионов для модификации ДНК был обусловлен следующими соображениями. Очевидно, что связыванием ДНК-содержащих комплексов могут управлять различные факторы. Во-первых, это могут быть гидрофобные взаимодействия между расположенным в основной цепи гидрофобными участками комплекса ДНК-поликатион и гидрофобной частью мембранны. Чтобы смоделировать эту ситуацию в данной работе был выбран

поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПВПЭ). Во-вторых, гидрофобные взаимодействия могут обеспечиваться боковыми гидрофобными радикалами комплекса. Для моделирования этой ситуации был взят цетилпиридиний бромид (ЦПБ). Наконец, в работе были исследованы комплексы сополимера N-этил-4-винилпиридиний и N-цетил-4-винилпиридиний бромидов (ПВПЭЦ) с ДНК, взаимодействие которых с липосомами определяют оба названных фактора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез и фракционирование ПВП проводили согласно процедуре, описанной в работе [13]. Средневесовые молекулярные массы фракций ПВП определяли методом светорассеяния. Фракцию полимера с $P_w = 1070$ использовали для дальнейшей модификации. Алкилирование фракций ПВП бромистым этилом, а также смесью последнего с бромистым цетилом проводили, как описано в работах [13] и [14] соответственно. Степень алкилирования полимеров определяли методом ИК-спектроскопии [15]. Были получены следующие полимеры: ПВПЭ, содержащий 90% алкилированных звеньев, и ПВПЭЦ, содержащий 4% цетильных и 60% этильных заместителей. Катионом служил также ЦПБ фирмы "Chemapol" (Чехо-Словакия).

В работе использовали ДНК куриного эмбриона ("Reanal", Венгрия). ДНК фрагментировали обработкой ультразвуком, а затем фракционировали в градиенте плотности сахарозы (5 - 20%). Для дальнейшей работы была выбрана фракция фрагментированной ДНК, содержащей по данным

электрофореза в агарозном геле от 50 до 100 пар оснований. Введение флуоресцентной метки в молекулы фрагментированной ДНК проводили по следующей методике. 50 мг ДНК куриного эмбриона растворяли в 4 мл бидистиллированной воды, прибавляли 200 мкл 0.5 М раствора ЭДТА и 1 мл 1 N раствора NaOH. Раствор инкубировали в течение 15 мин при 60°C, а затем высаждали из него ДНК добавлением 1.5 мл 2 М раствора LiClO₄ и 20 мл ацетона и отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 8000 g. Осажденную ДНК затем растворяли в 4 мл 0.1 M NaClO₃. К полученному раствору прибавляли 200 мкл 0.5 M раствора ЭДТА и 1 мл 0.1 M раствора N-бромсукцинида. Раствор инкубировали 10 мин при 0°C и затем добавляли к нему 1.3 мл водного раствора очищенного 1-аминогексаметиленфлуоресцина в двукратном молярном избытке по отношению к брому, модифицирующему ДНК. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 50°C, затем полученную флуоресцентно меченую ДНК (ДНК*) высаждали по описанной выше методике, промывали ацетоном и сушили в вакууме.

Использованный для получения ДНК* 1-аминогексаметиленфлуоресцин синтезировали по следующей методике. Смешивали равные объемы растворов 0.2 M 1,6-гексаметилендиамина и 0.01 M флуоресцин изотиоцианата в 0.2 M NaHCO₃ буфере (pH 9). Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 20°C. Полученный 1-аминогексаметиленфлуоресцин очищали методом TCX на силикагеле.

Для приготовления липосом использовали L, α -фосфатидилхолин (ФХ) (10%-ный раствор в смеси хлороформа с этанолом, 9 : 1), кардиолипин (КЛ) (0.5%-ный раствор в метаноле), а также меченный липид L, α -фосфатидилэтаноламин, N-флуоресцин изотиоцианат (Ф*) (0.1%-ный раствор в смеси хлороформа с этанолом, 9:1) фирмы "Sigma". Для получения липосом смешивали соответствующие количества растворов липидов, растворитель удаляли на вращающемся вакуумном испарителе RE 21 фирмы BUCHI (Швейцария). Образующуюся на стенках колбы пленку липидов растворяли при встряхивании на смесителе VORTEX в рассчитанном количестве буфера (необходимо для получения 1%-ной взвеси липидов). Взвесь обрабатывали на ультразвуковом диспергаторе 4710 фирмы "Cole Parmer" (США) в течение 160 с (частота 22 кГц, сила тока 0.2 A), охлаждая льдом. Суспензию готовых липосом отделяли от титановой пыли центрифугированием в течение 5 мин при 18500 g. Липосомы использовали в день приготовления. По данным метода квазиупругого рассеяния лазерного света средний диаметр полученных липосом составлял около 50 нм.

В работе использовали в основном липосомы, содержащие 20% отрицательно заряженного КЛ и 80% нейтрального ФХ (ФХ-КЛ-липосомы). Флуоресцентно меченные липосомы (ФХ-КЛ-Ф*-липосомы) содержали 20% КЛ, 0.5% Ф* и 79.5%

ФХ. Кроме того, были получены нейтральные липосомы, состоящие только из ФХ (ФХ-липосомы).

В работе использовали дважды дистиллированную воду, дополнительно очищенную с помощью системы Milli-Q ("Millipore", США).

Измерение размеров и электрофоретической подвижности проводили с помощью метода квазиупругого рассеяния лазерного света на приборах "Autosizer 2C" и "Zetasizer 2C" (фирма "Malvern", Великобритания) соответственно.

Интенсивность флуоресценции измеряли на флуоресцентном спектрофотометре F-4000 ("Hitachi", Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование комплексов ДНК с ЦПБ, ПВПЭ и ПВПЭЦ

Взаимодействие ДНК с этими катионами было изучено методом квазиупругого рассеяния лазерного света. Добавление катионов к ДНК приводит к образованию комплексов, которые можно зарегистрировать этим методом. На рис. 1 представлены средний гидродинамический диаметр и электрофоретическая подвижность частиц комплексов для разных составов комплексов f через 10 мин после смешения компонентов (f – соотношение между количеством положительных зарядов катиона и количеством отрицательных зарядов ДНК). При $f < 1$ размер частиц увеличивается с ростом f . Тот факт, что при этом электрофоретическая подвижность частиц остается отрицательной, означает, что в этой области комплексы обогащены ДНК. Комpleксы именно такого состава были успешно использованы для трансформации ДНК в клетки *Bacillus subtilis* [10]. Видно, что для всех катионов частицы комплекса не регистрируются методом квазиупругого рассеяния лазерного света, когда $f < 0.3$. Тем не менее, как следует из экспериментов по тушению флуоресценции (данные не приведены), в этом интервале также происходит образование комплексов катион-ДНК. Частицы наибольшего размера образуются при стехиометрическом соотношении компонентов (рис. 1), когда электрофоретическая подвижность комплексов равна нулю. Это означает, что константа образования комплексов всех катионов (ЦПБ, ПВПЭ, ПВПЭЦ) с ДНК столь велика, что в условиях эксперимента все молекулы компонентов включаются в состав таких комплексов.

При $f > 1$ комплексы заряжены положительно (рис. 1б). В таких условиях увеличение содержания катионов (рост f) приводит к уменьшению размера частиц поликомплекса. Это, по всей вероятности, обусловлено стабилизацией частиц комплекса в растворе за счет появления избыточного положительного заряда. В дальнейших экспериментах мы использовали в основном комплексы с соотношением компонентов $f = 0.1$. В таких комплексах ДНК находится в избытке, т.е. нукleinовая кислота модифицирована в малой степени.

Взаимодействие комплексов катион-ДНК с липосомами

Экспериментальное подтверждение того факта, что свободные молекулы ДНК не связываются с отрицательно заряженными и нейтральными липосомами, было получено методом лазерного микроэлектрофореза. Если липосомы состоят только из нейтрального липида, их электрофоретическая подвижность равна нулю. Добавление ДНК не должно изменять электрофоретическую подвижность липосом, если ДНК не взаимодействует с ними, и должно приводить к понижению электрофоретической подвижности, если цепи ДНК связываются с липидным бислоем. Даже в случае незаряженных ФХ-липосом добавление ДНК (концентрация 3×10^{-4} осново-моль/л, фосфатный буфер 0.01 М, pH 7) не приводило к изменению электрофоретической подвижности липосом (ее величина равна -0.04 мкм/см с В). Следовательно, незаряженные липосомы не взаимодействуют с молекулами ДНК. Тем более подобного взаимодействия не должно происходить и в случае отрицательно заряженных липосом ФХ-КЛ.

Для достижения связывания ДНК с липидной мембраной ДНК была включена в комплекс с низкомолекулярным поверхностно активным веществом – ЦПБ. Чтобы ответить на вопрос, будет ли комплекс ЦПБ–ДНК связываться с поверхностью липосом, мы провели следующие эксперименты. К липосомам добавляли различные количества данного комплекса ($f = 0.1$); за происходящими при этом явлениями следили, измеряя размеры и электрофоретическую подвижность липосом (рис. 2). В интервале $0 < k < 0.9$ (k равно отношению количества положительных зарядов катиона к количеству отрицательных зарядов на липосомах) добавление комплекса ЦПБ–ДНК (как и добавление не связанного в комплекс ЦПБ) не изменяет начального размера липосом (рис. 2, кривые 1, 2). Важно, что в указанном интервале совпадают также электрофоретические подвижности липосом, полученные после добавления к ним ЦПБ и комплекса ЦПБ–ДНК (рис. 2, кривые 1' и 2'). Эти факты означают, что при добавлении липосом комплекс ЦПБ–ДНК полностью диссоциирует: молекулы ЦПБ встраиваются в мембрану, а свободные молекулы ДНК остаются в растворе. Добавление больших количеств комплекса ($k \geq 0.9$) приводит к росту среднего размера липосом (рис. 2, кривая 2). Причина этого состоит в том, что при $k \geq 0.9$ комплексы ЦПБ–липосома приобретают положительный заряд (рис. 2, кривая 1') и, следовательно, не могут существовать с высвобождающимися отрицательно заряженными молекулами ДНК, образуя крупные агрегаты липосомы ДНК–ЦПБ. Именно присутствием ДНК в агрегатах и обусловлен сдвиг их электрофоретической подвижности в более отрицательную область по сравнению с комплексом ЦПБ–липосомы (рис. 2, кривые 2' и 1').

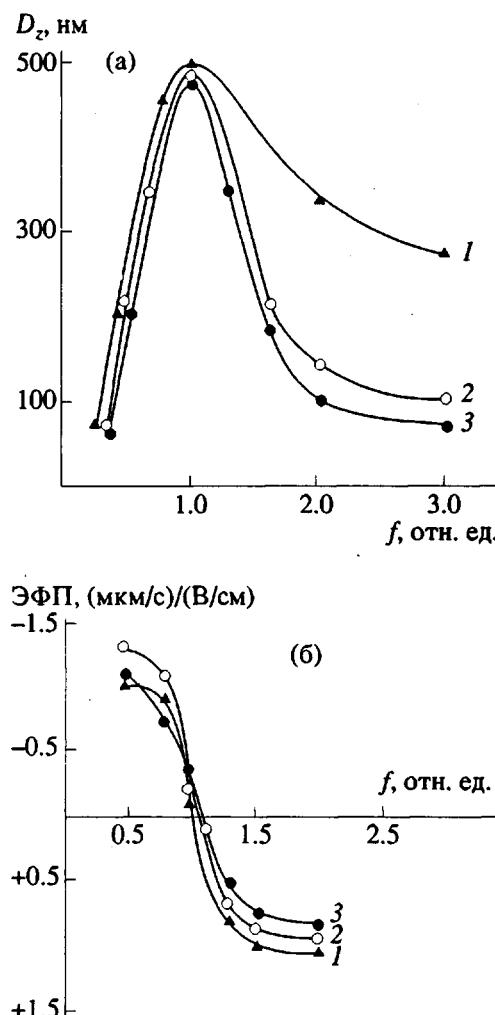


Рис. 1. Зависимость среднего гидродинамического диаметра D_z (а) и электрофоретической подвижности ЭФП (б) комплексов катион-ДНК через 10 мин после смешения компонентов, от величины f (f – отношение количества положительных зарядов добавленных катионов к количеству отрицательных зарядов ДНК) для комплексов ЦПБ–ДНК (1), ПВПЭ–ДНК (2) и ПВПЭЦ–ДНК (3). Концентрация ДНК 10^{-4} осново-моль/л, фосфатный буфер 0.01 М, pH 7.

Очевидно, что при $k < 0.9$ высвобождающиеся молекулы ДНК не должны взаимодействовать с образующимся комплексом ЦПБ–липосомы. Этот вывод был подтвержден методом тушения флуоресценции: интенсивность флуоресценции ДНК* не изменялась при добавлении комплекса ЦПБ–липосомы.

Таким образом, связывание ДНК в комплекс с низкомолекулярным ЦПБ не приводит к доставке молекулы ДНК к поверхности липосом из-за диссоциации комплекса ЦПБ–ДНК при добавлении липосом.

Известно, что поликатионы являются более сильными конкурентами за связывание с полиа-

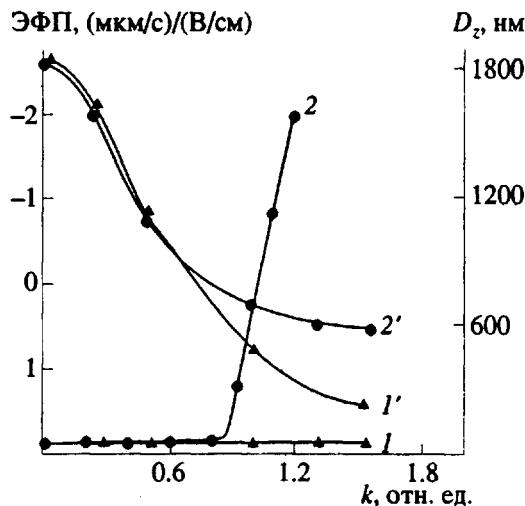


Рис. 2. Зависимость от концентрации ЦПБ D_z (1, 2) и ЭФП (1', 2') липосом ФХ-КЛ через 10 мин после смешения компонентов (k - отношение количества положительных зарядов ЦПБ к количеству отрицательных зарядов ДНК) при добавлении к липосомам свободного ЦПБ (1 и 1') и комплекса ЦПБ-ДНК состава $f = 0.1$ (2 и 2'). Концентрация липосом 0.1%, фосфатный буфер 0.01 М, рН 7.

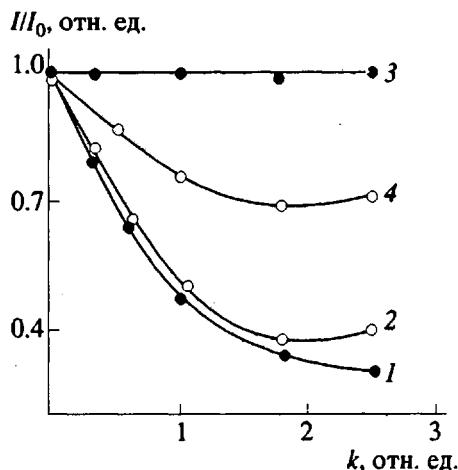


Рис. 3. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции липосом ФХ-КЛ-Ф* от величины k при добавлении к ним ПВПЭ (1), ПВПЭЦ (2), а также комплексов ПВПЭ-ДНК (3) и ПВПЭЦ-ДНК (4). Концентрация липосом 0.1%, боратный буфер 1.01 М, рН 9.5.

нионами по сравнению с низкомолекулярными ПАВ, если концентрация последних ниже их ККМ [16]. Поскольку концентрация ЦПБ в условиях эксперимента не превышала его ККМ, можно ожидать, что комплексы поликатион-ДНК не будут разрушаться в присутствии липосом. Чтобы ответить на вопрос, диссоциируют ли комплексы поликатион-ДНК в присутствии липосом, мы использовали ДНК*, содержащую флуоресцентную метку. Когда ДНК* входит в состав комплекса

с поликатионом-тушителем, флуоресценция метки затушена. Диссоциация комплекса должна была бы сопровождаться возгоранием флуоресценции. В нашем эксперименте флуоресценция ДНК*, связанная в комплексы с ПВПЭ и ПВПЭЦ, не возгоралась под воздействием липосом. Следовательно, ни комплекс ПВПЭ-ДНК, ни комплекс ПВПЭЦ-ДНК не разрушаются при добавлении липосом.

Чтобы выяснить, связываются ли эти комплексы с поверхностью липосом, необходимо иметь возможность регистрировать контакты между комплексом поликатион-ДНК и липосомой. Для этой цели мы использовали липосомы ФХ-КЛ-Ф*, которые содержат флуоресцентно меченный липид. Связывание комплексов поликатион-ДНК с липосомами должно приводить к падению интенсивности флуоресценции за счет тушения флуоресценции метки кватернизованными поли-4-винилпиридиинами. На рис. 3 представлена зависимость интенсивности флуоресценции липосом ФХ-КЛ-Ф* от концентрации поликатионов (кривые 1, 2), а также комплексов поликатион-ДНК (кривые 3, 4). Образование комплексов ПВПЭ-ДНК и ПВПЭЦ-ДНК сопровождается тушением флуоресценции метки (кривые 1, 2). В то же время при любых концентрациях комплекса ПВПЭ-ДНК интенсивность флуоресценции меченых липосом остается постоянной (кривая 3). Напротив, комплекс ПВПЭЦ-ДНК вызывает уменьшение флуоресценции липосом ФХ-КЛ* (кривая 4). Это означает, что комплекс ПВПЭ-ДНК не реагирует с липосомами, в то время как комплекс ПВПЭЦ-ДНК связывается с поверхностью липосом, образуя трехкомпонентный комплекс ДНК-ПВПЭЦ-липосомы.

Различия в поведении ПВПЭ и ПВПЭЦ в конкурентных реакциях в системе поликатион-ДНК-липосомы могут быть проиллюстрированы следующим экспериментом. В эксперименте исследовали взаимодействие свободных молекул ДНК с комплексами поликатион-липосомы. Добавление ПВПЭ и ПВПЭЦ к липосомам вызывает агрегацию липосом. Размеры этих агрегатов при различных концентрациях добавленных поликатионов, выраженных через соотношение k , представлены на рис. 4 (кривые 1 и 2). При добавлении к этим комплексам десятикратного избытка ДНК (по отношению к положительным зарядам поликатиона) наблюдается следующая картина. Размер комплекса ПВПЭ-липосомы резко падает до начального размера липосом (кривая 1'). Напротив, размеры комплекса ПВПЭЦ-липосомы не восстанавливаются до размера липосом (кривая 2'). Эти результаты полностью согласуются с тем фактом, что ДНК, являясь более сильным, чем липосомы, конкурентом за связывание с ПВПЭ, полностью высвобождает ПВПЭ из комплекса с липосомами. Этого не происходит, если вместо ПВПЭ взят ПВПЭЦ. В данном случае ДНК не может полностью разрушить связи между поликатионом и липосомами, поскольку

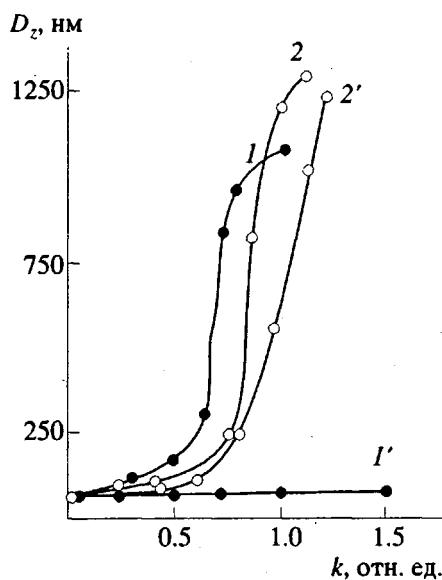


Рис. 4. Зависимость D_z липосом ФХ-КЛ от величины k через 10 мин после добавления к ним ПВПЭ (1), ПВПЭЦ (2), а также через 10 мин после обработки полученных комплексов 10-кратным по отношению к поликатиону избытком ДНК (1', 2'). Концентрация липосом 0.1%, фосфатный буфер 0.01 М, рН 7.

конкуренция между ДНК и липосомами за связывание с ПВПЭЦ приводит к образованию тройного комплекса ДНК-ПВПЭЦ-липосомы.

Таким образом, ни низкомолекулярные поверхности активные вещества, ни линейные поликатионы, не содержащие гидрофобных заместителей, не способствуют связыванию ДНК с поверхностью липосом. Лишь объединение в одной молекуле свойств линейного поликатиона и поверхности активного вещества, а именно введение бокового гидрофобного заместителя в цепь линейного поликатиона, приводит к тому, что

ДНК доставляется к липосомам. В этом случае основная цепь поликатиона обеспечивает его сильное взаимодействие с ДНК, а гидрофобные боковые заместители обуславливают связывание комплекса поликатион-ДНК на поверхности липосом. Данное исследование дает физико-химическую основу для работ, направленных на усиление способности ДНК связываться с природной клеточной мембраной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DNA Cloning. A Practical Approach / Ed. by Glover D.N. Oxford: IRL, 1985. V. I - II.
2. Graham F., Van Der Eb A. // Virology. 1973. V. 52. № 2. P. 456.
3. Sompayrac L., Danna K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7575.
4. Potter H., Weir L., Leder P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 7161.
5. Capocci M.R. // Cell. 1980. V. 22. P. 479.
6. Gitman A.G., Graessmann A., Loyter A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7309.
7. Wang C.-Y., Huang L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 3410.
8. Wu G.Y., Wu C.H. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 3. P. 887.
9. Behr J.-P., Demenaix B., Loeffler J.-P., Perez-Mutzel J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6982.
10. Кабанов А.В., Киселев В.И., Чикиндас М.Л., Астафьев И.В., Глухов А.И., Гордеев С.А., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Левашов А.В., Северин Е.С., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 306. № 1. С. 226.
11. Kabanov A.V., Astafieva I.V., Chikindas M.L., Rosenblat G.F., Kiselev V.I., Severin E.S., Kabanov V.A. // Biopolymers. 1991. V. 31. P. 1437.
12. Kabanov A.V., Astafieva I.V., Maksimova I.V., Lukyanidin E.M., Georgiev G.P., Kabanov V.A. // Bioconj. Chemistry (in press).
13. Fuoss R.M., Strauss U.P. // J. Polym. Sci. 1948. V. 2 P. 246.
14. Мустафаев М.И., Гончаров В.В., Евдаков В.П. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 225. № 3. С. 721.
15. Starodubtsev S.G., Kirsh Yu.E., Kabanov V.A. // Eur. Polym. J. 1987. V. 10. P. 739.
16. Листова О.В., Изумрудов В.А., Касаукин В.А., Кабанов Н.М., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. Б. 1989. Т. 31. № 4. С. 244.

DNA-Containing Interpolyelectrolyte Complexes: Interaction with Liposomes

S. A. Sukhishvili*, O. L. Obol'skii**, I. V. Astaf'eva**, A. V. Kabanov**, and A. A. Yaroslavov*

*Moscow State University, Moscow, 119899 Russia, Leninskie gory

**Moscow Institute of Biotechnology, Simferopol'skii bul. 8, Moscow, 113149 Russia

Abstract – Formation of complexes of DNA with cetylpyridinium bromide and polycations [viz., poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide and N-ethyl-4-vinylpyridinium and N-cetyl-4-vinylpyridinium bromides random copolymer (PVPEC)] and interaction of such complexes with negatively charged liposomes were studied. The dissociation constants of all the DNA-cation complexes are extremely low, and all the molecules are incorporated into the complexes. The complexes are large aggregates in which the number of molecules of cetylpyridinium bromide (or polycation monomer units) approximately is equal to that of the monomer units of DNA (ratio $f = 1$). Either an increase or a decrease in the cation content produce a drastic decrease in the size of the particles of the complex. Complexes of DNA with cetylpyridinium bromide ($f = 0.1$) dissociate completely after the addition of liposomes, as surfactant molecules fit into the lipid bilayer and the DNA chains are released into solution. In contrast, complexes of DNA with poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide ($f = 0.1$) exhibit no interaction with liposomes. After the insertion of cetyl substituents into the polycation chain, DNA molecules are conveyed to the liposome surface: PVPEC/DNA complexes bind with liposomes without their dissociation to form ternary DNA-liposomes-PVPEC complex.