

УДК 541(49+64):535.37

ПРЕИМУЩЕСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДНК, ОСНОВАННОГО НА КОНКУРЕНТНОМ ВЫТЕСНЕНИИ ИНТЕРКАЛИРОВАННОГО КРАСИТЕЛЯ¹

© 2007 г. М. В. Жирякова, В. А. Изумрудов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.
Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы

Взаимодействие катионных (био)полимеров с ДНК может вызывать перенос интеркалированного катионного красителя бромистого этидия из двойной спирали в раствор, что сопровождается тушением флуоресценции зонда. Эффективное вытеснение этидия из нуклеиновой кислоты, обнаруженное при изучении кооперативного электростатического связывания ДНК с солями полимерных оснований, положено в основу разработки флуоресцентного метода изучения полиэлектролитных комплексов ДНК. На примере широкого круга модельных поликатионов продемонстрирована плодотворность этого подхода для оценки кооперативности взаимодействия, получения pH-зависимых профилей реакций образования комплексов и конкурентного связывания, создания систем с заданной и контролируемой стабильностью в водно-солевых средах, что может быть особенно важным для конструирования эффективных полиэлектролитных средств доставки генетического материала в клетку.

ВВЕДЕНИЕ

Катионный краситель бромистый этидий (БЭ) широко используется в качестве флуоресцентного зонда для идентификации нативной ДНК и для прокрашивания нуклеиновых кислот при проведении гель-электрофореза. Это обусловлено способностью БЭ самопроизвольно встраиваться (интеркалировать) в двойную спираль, что сопровождается резким увеличением интенсивности флуоресценции I этидия [1]. Возгорание флуоресценции обусловлено тем, что при фотовозбуждении свободного (не связанного с ДНК) зонда в растворе происходит тушение его флуоресценции по безызлучательному пути, включающему в себя взаимодействие протона аминогруппы с растворителем, а будучи интеркалированным между парами оснований двойной спирали ДНК, катион этидия экранируется от контакта с растворителем, что практически полностью предотвращает тушение флуоресценции по механизму переноса

протона [2] или растворенным кислородом. Это приводит к увеличению времени жизни в возбужденном состоянии от 1.8 нс (в воде) до 23 нс [3] и уменьшению константы тушения в 30 раз [4]. Комpleксы ДНК · БЭ характеризуются весьма высокой устойчивостью ($K_c \sim 10^6$ моль/л [1]), обусловленной специфическими взаимодействиями плоских этидиевых катионов с основаниями ДНК, и не разрушаются даже в концентрированных растворах низкомолекулярных солей [1, 5]. БЭ встраивается в двойную спираль без нарушения уотсон-криковской схемы спаривания оснований. Однако, чтобы интеркаляция произошла, пары оснований должны раздвинуться, что отражается в последовательном увеличении шага спирали и уменьшении гибкости цепи по мере добавления красителя [6]. Встраивание молекул БЭ подчиняется принципу исключения ближайших соседей: каждое второе место (ближайший сосед вдоль оси двойной спирали ДНК) остается свободным из-за нарушения геометрии нуклеотидов, примыкающих к интеркаляторам [7]. Другими словами, стопкообразное расположение пар оснований с характерным расстоянием 3.4 Å сохраняется, но место каждой третьей пары становится занятым молекулой интеркалятора. Таким обра-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 07-03-00228а).

E-mail: izumrud@genebee.msu.su (Изумрудов Владимир Алексеевич).

зом, стехиометрия насыщения составляет одну молекулу БЭ на четыре молекулы нуклеотида (на две пары оснований) и практически не зависит от содержания пар гуанин–цитозин, последовательности нуклеотидов в ДНК, молекулярной массы ДНК или ионной силы раствора [1]. Значение интенсивности флуоресценции также достигает максимума при этом соотношении. При дальнейшем добавлении красителя величина I перестает расти и даже несколько снижается, что объясняют либо конформационными изменениями спирали при взаимодействии с молекулами БЭ, находящимися в избытке, либо энергетическими переходами между молекулами красителя [5]. Интенсивность флуоресценции комплекса ДНК · БЭ практически не меняется в широком интервале изменения кислотности среды ($4.0 < \text{рН} < 11.0$), а достижение граничных значений рН, соответствующих началу кислотной и щелочной денатурации ДНК (т.е. расплетанию двойной спирали), приводит к тушению [1]. Именно на этом свойстве красителя основано использование БЭ как индикатора на наличие двусpirальнойности в структуре нуклеиновых кислот и для оценки доли двухъядерных участков в них.

Первые попытки использования флуоресцентных свойств БЭ для изучения взаимодействия ДНК с положительно заряженными партнерами были предприняты почти 30 лет назад в работах по связыванию природных олигомерных аминов, главным образом спермина и спермидина [8, 9]. Их добавление к раствору комплекса ДНК · БЭ приводило к тушению флуоресценции, что позволило авторам оценить константы связывания по концентрации тушителя, при которой значение I падало в 2 раза. Для спермидина с тремя аминогруппами в молекуле эта величина составила 3×10^5 моль/л, тогда как для спермина, имеющего на одну аминогруппу больше, она оказалась на порядок более высокой, 5×10^6 моль/л [8]; это хорошо согласуется с длиной кооперативного участка связывания, который для сильно заряженных полиелектролитов составляет 4–6 звеньев. В работах [8, 9] не рассматривался вопрос о том, чем обусловлено наблюданное тушение – вытеснением молекул БЭ или изменением их локального окружения в процессе связывания. Между тем, такая информация важна и необходима для корректного анализа результатов флуоресцентных измерений.

Новый импульс в развитие данного подхода добавил все возрастающий интерес ученых, работающих на стыке полимерной химии, молекулярной биологии и медицины, к созданию средств доставки генетического материала в ядра клеток. Способность катионных полимеров или положительно заряженных липидов, образующих с ДНК соответственно полиелектролитные комплексы (полиплексы) или липидные комплексы (липплексы), делает актуальной разработку наиболее эффективных и нетоксичных носителей на их основе. Для оптимизации синтеза полимерных носителей необходимо выявить влияние структуры и молекулярных характеристик поликатионов на физико-химические свойства полиплексов и установить их взаимосвязь с эффективностью доставки целевой ДНК в клетку. Успешное решение этой задачи во многом определяется наличием простого, доступного, чувствительного и высокопрограммированного метода, позволяющего проводить сравнительную экспресс-оценку связывания различных катионных (био)полимеров с ДНК в буферных растворах, при физиологических условиях, а также при изменении рН, ионной силы и температуры. В работе, опубликованной 12 лет назад [10], экспериментально доказана способность солей различных полимерных оснований эффективно вытеснять интеркалированные молекулы БЭ в результате кооперативного электростатического связывания с ДНК. Там же изложены основы метода наблюдения за образованием полиплексов и их устойчивостью в водно-солевых средах вплоть до полной диссоциации. Вслед за этой публикацией появилось множество статей по использованию флуоресценции БЭ для изучения связывания ДНК с различными катионными полимерами и олигомерами, например основными полипептидами [11–13], линейными и разветвленными полиаминами [14–17], катионными дендримерами [17, 18]. Некоторые из перечисленных публикаций, а также другие работы по этой теме нашли свое отражение в обзоре [19]. В настоящее время тушение флуоресценции БЭ стало рутинным приемом, который широко используется в качестве доказательства связывания положительно заряженных партнеров с ДНК, причем круг объектов таких исследований непрерывно расширяется, включая в себя, например, полибетаины [20] или катионные амфи菲尔ные соединения [21–23], заслуживающие отдельного рассмотрения.

В настоящей работе мы ставили перед собой задачу продемонстрировать преимущества и потенциальные возможности метода, которые выходят далеко за рамки его обычного применения как способа качественной оценки средства различных партнеров к ДНК. С этой целью мы систематизировали основные результаты, полученные и опубликованные нами на протяжении последних лет, и дополнили их новыми данными. Плодотворность и перспективность подхода уже находит свое подтверждение в модельных исследованиях, призванных оптимизировать синтез эффективных средств доставки генетического материала невирусной природы. Так, с помощью разрабатываемых экспериментальных приемов были получены и проанализированы pH-зависимые профили реакций ДНК с поликатионами, что позволило выявить значимость протонирования аминогрупп поликатиона, включенного в состав комплекса, как фактора, существенно повышающего эффективность доставки генетического материала в клетки [24].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Препараты NaCl, HCl и NaOH имели квалификацию х.ч. Буферные растворы с ионной силой 0.02 моль/л и различными значениями pH готовили из образцов биологических буферов MES, HEPES, CAPS, CHES, TRIS фирмы "Sigma" (США). Во всех экспериментах растворителем служила бидистиллированная вода.

Препарат БЭ получен от фирмы "Sigma" (США). Концентрацию растворов БЭ определяли спектрофотометрически с помощью мольного коэффициента экстинкции $\epsilon_{480} = 5600$ л/(моль см) [25].

Использовали препарат натриевой соли ДНК из тимуса теленка (~10000 пар оснований) фирмы "Sigma" (США) без дополнительной очистки. Концентрацию фосфатных групп ДНК [P] в растворе определяли спектрофотометрически, исходя из мольного коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 6500$ л/(моль см) [26].

Поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭП) со среднечисленной степенью полимеризации $P_n = 10, 20, 40$ и средневесовой степенью полимеризации $P_w = 100, 1300$ получали исчерпывающим

алкилированием 10%-ных метанольных растворов поли-4-винилпиридина соответствующих степеней полимеризации ("Aldrich", США) пятикратным избытком бромистого этила при нагревании до 60°C в течение 20 ч в герметично запаянной ампуле [27]. Продукты реакции осаждали в сухой диэтиловый эфир. Степень алкилирования полученных образцов, которую определяли из ИК-спектров по полосам поглощения алкилированного ($\nu = 1640 \text{ cm}^{-1}$) и неалкилированного ($\nu = 1600 \text{ cm}^{-1}$) звеньев, составляла более 95% [15].

Частично алкилированный поли-4-винилпиридиний бромид (ПЭП-β) с разной степенью алкилирования β синтезировали алкилированием фракции поли-4-винилпиридина со средневесовой степенью полимеризации $P_w = 100$ бромистым этилом по методике получения ПЭП. Аликвоты отбирали из реакционной смеси каждые 2 ч и осаждали в сухой эфир. Полученные таким методом образцы имели степени алкилирования $\beta = 25$ и 45%.

3,6-Ионен бромид синтезировали реакцией Меншуткина из 1,3-дибромпропана и N,N,N',N'-тетраметилгексаметилендиамина согласно методике [28]. Молекулярная масса образца соответствовала средней степени полимеризации 35, т.е. 70 ионным зарядам на молекулу.

Поли-N,N-диметилдиаллиламмоний хлорид (ПДМДАА) со средневесовой степенью полимеризации $P_w = 1200$ использовали в виде 40 мас. % водного раствора производства фирмы "Wako Pure Chemical Industries" (Япония).

Поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМ) получали радикальной полимеризацией 50%-ного бензольного раствора мономера. M_w , определенная светорассеянием в метаноле при 25°C, соответствовала средневесовой степени полимеризации $P_w = 700$.

Разветвленный полиэтиленимин (ПЭИ) применяли в виде 50 мас. % водного раствора производства фирмы "Scientific Polymer Products" (США). В молекуле полимера содержалось в среднем 1200 аминогрупп.

Использовали гидробромид поли-L-лизина со средневесовой степенью полимеризации $P_w = 1000$ и гистон H1 из тимуса теленка фирмы "Sigma" (США), а также полипропилениминовый дендример третьей генерации (DAB-Am-16) фирмы "Al-

drich" (США), содержащий 16 первичных аминогрупп и 14 третичных аминогрупп, находящихся соответственно на периферии молекулы и в ее внутренней сфере.

Методы исследования

Спектрофотометрические измерения проводили на УФ-спектрофотометре "Hitachi 150-20" (Япония) и ИК-спектрофотометре "Specord M-80" (Германия) в термостатированных ячейках при температуре 25°C и непрерывном перемешивании.

Флуориметрические измерения осуществляли с помощью спектрофлуориметра фирмы "Jobin Yvon-3CS" (Франция) в термостатируемой кварцевой ячейке (25°C) при непрерывном перемешивании раствора. Длина волны возбуждения составляла 535 нм, длина волны регистрации 595 нм.

Растворы ДНК и БЭ смешивали непосредственно в кювете, конечная концентрация фосфатных групп ДНК [P] = 4×10^{-5} моль/л, концентрация бромистого этидия [БЭ] = 1×10^{-5} моль/л. Интерполиэлектролитные комплексы ДНК с поликатионами получали титрованием раствора комплекса ДНК · БЭ растворами полиаминов, добавляя очередную порцию титранта с интервалом в 2 мин. Титрование полученных комплексов растворами низкомолекулярных электролитов осуществляли в той же ячейке параллельно с титрованием комплекса ДНК · БЭ.

Потенциометрическое титрование водных растворов полиаминов и смесей полиаминов с ДНК проводили на pH-метре "MultiLab 540" (Германия) с помощью стеклянного каломельного комбинированного электрода "Metler Toledo" в термостатируемой ячейке (25°C) в атмосфере аргона. 10 мл раствора полиамина концентрации 3×10^{-3} моль/л или эквимольную смесь полиамина с ДНК титровали 0.1 моль/л раствором HCl. Порции титранта (5 мкл) добавляли с помощью микрошприца "Hamilton" и снимали показания с интервалом 3 мин, достаточным для установления постоянных значений pH.

Седиментационные измерения осуществляли с помощью аналитической ультрацентрифуги "Spinco-E" фирмы "Beckman" (США) при скорости вращения ротора 48000 об/мин и температуре 25°C. Седиментационные профили регистрировались

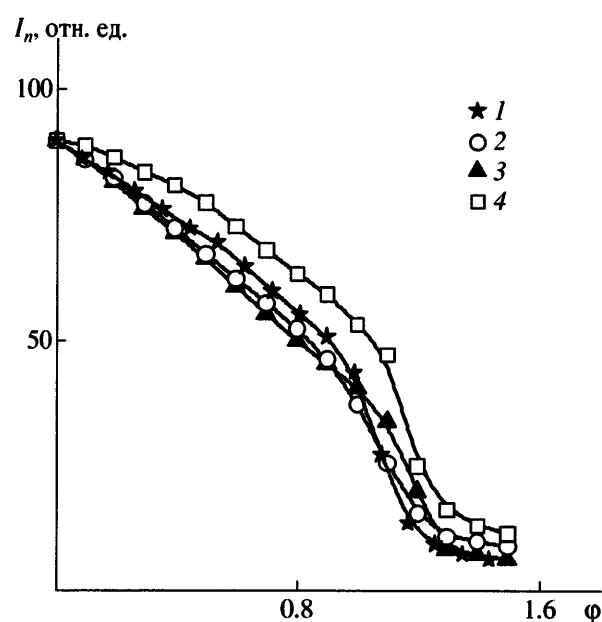


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения ϕ для смесей растворов комплекса ДНК · БЭ и полиаминов ПЭП (1), 3,6-ионен (2), ПДМДАА (3), гистон H1 (4), pH 9.0.

ли по изменению оптической плотности растворов при длине волны $\lambda = 260$ нм, а в опытах с бромистым этидием – при $\lambda = 510$ нм. Концентрация ДНК в седиментационных измерениях составляла 4×10^{-4} моль/л. Профили снимали через 20 мин после начала вращения ротора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кооперативность электростатического связывания ДНК с поликатионами

Типичные кривые флуориметрического титрования раствора комплекса ДНК · БЭ растворами катионных полимеров представлены на рис. 1 в виде зависимостей интенсивности флуоресценции I_n от мольного отношения ϕ звеньев поликатиона и фосфатных групп ДНК, $\phi = [\text{поликатион}]/[P]$. Кривые состоят из двух практически линейных участков. Состав смеси, соответствующий точке излома, обозначим через ϕ_{cr} .

Рассмотрим состояние исследованных систем до и после точки излома на примере системы ДНК-БЭ-ПЭП, у которой $\phi_{cr} \approx 0.9$ (рис. 1, кривая 1). Титрование в области $\phi < \phi_{cr}$ сопровождается изменением спектра поглощения (рис. 2, кривые 2–6) и появлением изобesticкой точки при длине волны $\lambda = 510$ нм, которая смешена по от-

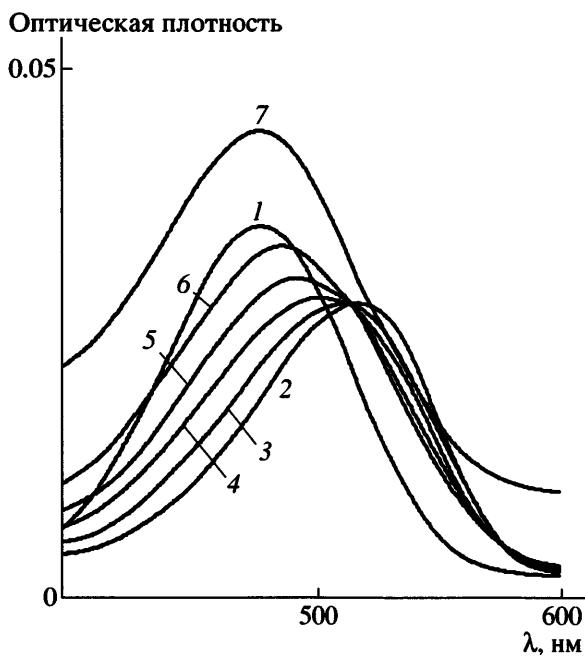


Рис. 2. Спектры поглощения свободного БЭ (1), комплекса ДНК · БЭ (2) и смесей комплекса ДНК · БЭ с ПЭП (3–7). $\phi = 0.2$ (3), 0.4 (4), 0.6 (5), 0.8 (6) и 1.0 (7). $P_w(\text{ПЭП}) = 100$, pH 9.0.

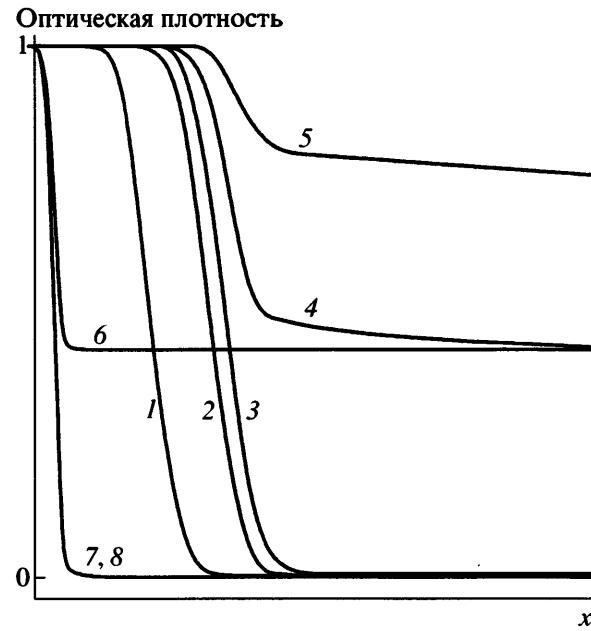


Рис. 3. Седиментационные профили комплекса ДНК · БЭ (1) и системы (ДНК · БЭ)-ПЭП (2–8). $\phi = 0.2$ (2), 0.4 (3), 0.6 (4), 0.8 (5), 1.0 (6), 1.2 (7) и 1.5 (8). $P_w(\text{ПЭП}) = 100$, pH 9.0.

ношению к изобестической точке, присущей спектрам смесей ДНК и БЭ ($\lambda_0 = 500$ нм) [5]. Несовпадение величин λ и λ_0 указывает на существование двух состояний, которые не соответствуют свободному красителю. Одно из указанных состояний разумно приписать молекулам зонда, интеркалированным в свободные участки ДНК, а другое – молекулам, встроенным в связанные с ПЭП участки ДНК. Доказательством этому служат седиментограммы смесей компонентов, полученные сканированием при $\lambda = 510$ нм (рис. 3). При введении ПЭП в раствор комплекса ДНК · БЭ вплоть до $\phi = 0.5$ обнаруживается единственный пик растворимого комплекса (ДНК · БЭ)-ПЭП (рис. 3, кривые 2, 3). Затем в системе появляются быстро седиментирующие частицы другого комплекса, доля которых возрастает с увеличением ϕ , а доля растворимого комплекса (ДНК · БЭ)-ПЭП при этом падает (кривые 4, 5). При $\phi \approx \phi_{cr} \approx 0.9$ практически весь БЭ обнаруживается в быстро седиментирующей фракции (кривая 5).

Поведение системы резко меняется при $\phi > \phi_{cr}$. На спектрах поглощения появляется полоса с максимумом при $\lambda = 480$ нм (рис. 2, кривая 7), характерная для свободного БЭ (кривая 1). В то же

время на седиментограммах обнаруживается фракция неседиментирующих молекул несвязанного БЭ, доля которого увеличивается с ростом ϕ (рис. 3, кривые 6–8). Иными словами, крутой участок кривой 1 флуориметрического титрования (рис. 1) обусловлен вытеснением зонда из комплекса.

Проведенные нами аналогичные опыты с другими поликатионами показали, что все системы претерпевают одни и те же изменения и лишь несущественно отличаются друг от друга значением характеристического состава ϕ_{cr} . При его достижении во всех смесях наблюдалось фазовое разделение, о чем свидетельствовали появление опалесценции и увеличение оптической плотности, обусловленное светорассеянием (рис. 2, кривая 7). Выделение этидия из комплекса происходит в узком интервале изменения состава смеси вблизи точки эквивалентности зарядов, что разумно объяснить хорошо известным коллапсом молекул ДНК – переходом их в компактную форму, который осуществляется при тех же степенях нейтрализации нуклеиновой кислоты и протекает как высоко кооперативный процесс [29, 30]. Связывание ДНК с ПЭП сопровождается только незначительным изменением амплитуд положи-

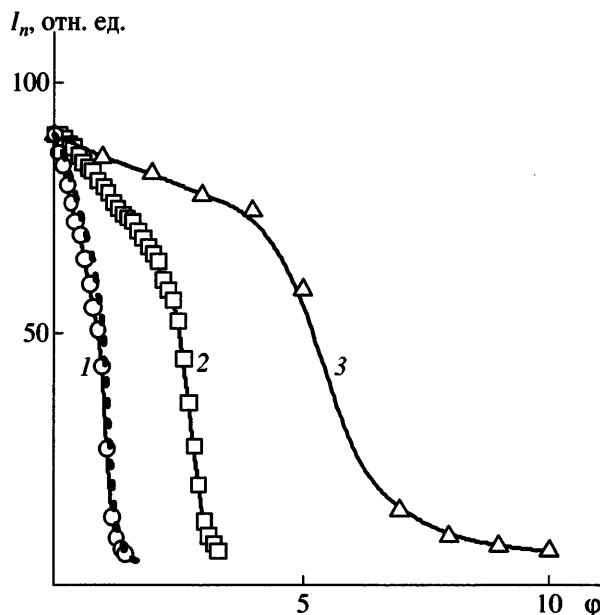


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения ϕ в смесях растворов комплекса ДНК · БЭ и ПЭП- β разной степени алкилирования $\beta = 98$ (1), 45 (2) и 25% (3). Штриховая кривая соответствует соотношению ϕ , рассчитанному с учетом только заряженных алкилированных звеньев ПЭП- β . $P_w(\text{ПЭП}) = 100$, pH 9.0.

тельной и отрицательной полос (275 и 247 нм) при сохранении симметрии спектра кругового дихроизма [10]. Анализ УФ-спектров комплексов ДНК и ПЭП также указывает на преимущественно электростатический характер связывания компонентов, не осложненный в заметной степени специфическим взаимодействием ПЭП с основаниями ДНК [31].

Из совокупности приведенных данных следует, что процесс вытеснения интеркалированного БЭ из ДНК на крутых участках кривых рис. 1 (при $\phi > \phi_{cr}$) в основном регулируется электростатическими взаимодействиями. Весомым аргументом в пользу этого служат результаты титрования раствора ДНК · БЭ растворами поликатионов с разной плотностью заряда на цепях [16], в частности ПЭП- β различной степени алкилирования β (рис. 4). Состав смеси $\phi = [\text{поликатион}]/[P]$ рассчитывали исходя из средней массы звена ПЭП- β . Полученные таким образом кривые 1–3 свидетельствуют о снижении эффективности тушения и росте значений ϕ_{cr} при уменьшении β . Однако если принять во внимание, что в условиях опытов при pH 9.0 неалкилированные пиридиновые зве-

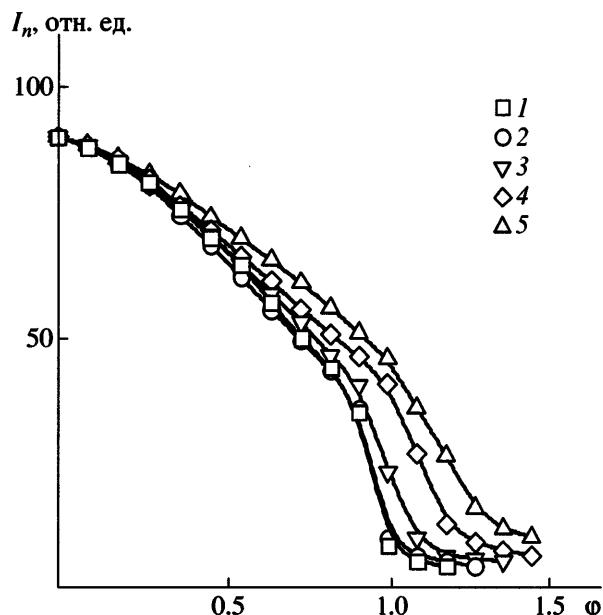


Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения ϕ в смесях растворов комплекса ДНК · БЭ и ПЭП разной степени полимеризации $P = 1300$ (1), 100 (2), 40 (3), 20 (4) и 10 (5). pH 9.0.

ния ПЭП- β депротонированы, и пересчитать концентрацию поликатиона с учетом только заряженных алкилированных звеньев ПЭП- β , то все данные с хорошим приближением описываются одной кривой (рис. 4, штриховая кривая), практически совпадающей с кривой титрования исчерпывающее алкилированным ПЭП (рис. 4, кривая 1). Аналогичная картина наблюдалась в растворах блочных или привитых сополимеров 2- trimetilаминоэтилметакрилата различного состава, где для всех поликатионов ярко выраженное тушение флуоресценции происходило при $\phi \approx 0.8$ –1.0 [32]. Таким образом, вытеснение интеркалированного этидия является следствием кооперативного электростатического взаимодействия ДНК с катионным полимером.

К такому же выводу можно прийти, анализируя влияние длины цепи полiamина на флуоресценцию БЭ [16]. Уменьшение степени полимеризации исчерпывающее алкилированного ПЭП от 1300 до 100 (рис. 5, кривые 1, 2) практически не сказалось на тушении, тогда как дальнейшее укорачивание цепи приводило к смещению кривых в сторону больших ϕ и их сглаживанию. Такое снижение эффективности тушения является результатом вполне предсказуемого ослабления

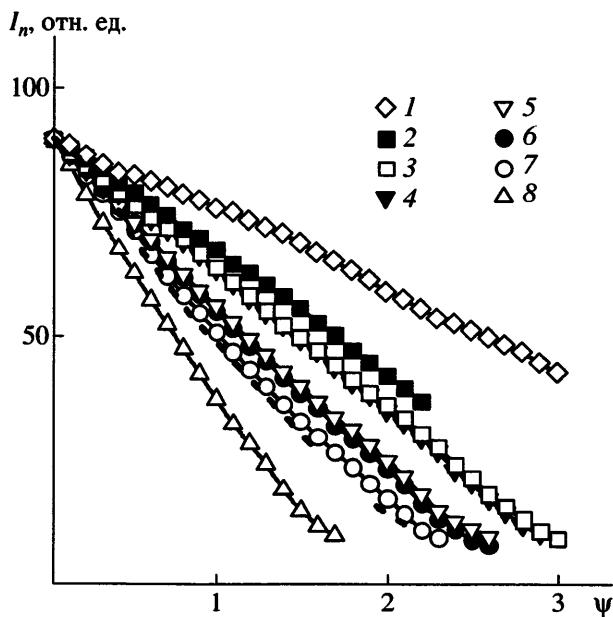


Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения $\psi = [\text{все аминогруппы}]/[\text{P}]$ в смесях растворов комплекса ДНК · БЭ и ПЭИ при pH 9.5 (1), 9.0 (2), 8.5 (3), 8.0 (4), 7.5 (5), 7.0 (6), 6.5 (7) и 6.0 (8). Штриховая кривая соответствует титрованию комплекса ДНК · БЭ полипропиленимииновым дендримером DAB-Am-16.

электростатического взаимодействия при переходе от высокомолекулярных образцов к олигомерам, состоящим из двадцати (кривая 4) и, особенно, десяти заряженных звеньев (кривая 5). Невысокая кооперативность связывания ДНК с указанными олигомерами отражается вырождением крутого участка на кривой тушения. Подобная сглаженность присуща флуоресцентным кривым, характеризующим ассоциацию низкомолекулярных олигоаминов (аналогов спермина) с ДНК из тимуса теленка [9, 33]. Таким образом, кооперативность электростатического связывания ДНК с противоположно заряженными полимерами может быть, по крайне мере качественно, оценена по виду флуориметрической кривой.

Отсутствие на этой кривой крутого участка, свидетельствующее о невысокой кооперативности связывания, может быть вызвано не только малой длиной поликатиона, но и стericическими затруднениями и(или) частичным разрушением ионных пар в комплексе.

Так, большое число разветвлений в молекуле полиэтиленимина стericически препятствует обра-

зованию высокоупорядоченной системы солевых связей с ДНК. Соответственно кривые флуориметрического титрования данным полиамином, представленные в виде зависимости I_n от состава смеси ψ , учитывающего все аминогруппы ПЭИ, имеют сглаженный вид (рис. 6) с минимальным тушением флуоресценции в щелочных средах (pH 9.5, кривая 1). Последовательное нарастание эффективности тушения при уменьшении pH (кривые 2–8) обусловлено протонированием первичных, вторичных и третичных аминогрупп ПЭИ. Тем не менее, даже при pH 6.0, когда между компонентами образуется подавляющее большинство солевых связей и эффективность тушения приближается к максимально возможной, крутой участок на кривой не появляется (кривая 8). Отсутствует он и на кривой титрования высокоразветвленным полипропиленимииновым дендримером DAB-Am-16 третьего поколения, содержащим 16 первичных аминогрупп на поверхности (рис. 6, штриховая кривая). Известно, что стericические затруднения снижают полноту электростатического связывания жесткой двусpirальной молекулы ДНК с такими дендримерами, ограничивая его в основном взаимодействием фосфатных групп ДНК с аминогруппами на поверхности молекулы, тогда как для гибкой полиакриловой кислоты оказываются доступными и третичные аминогруппы, находящиеся во внутренней сфере дендримера [34]. Напротив, линейные полииамины, содержащие аминогруппы одного из перечисленных выше типов, обладают способностью кооперативно вытеснять краситель из двойной спирали. Это следует из характерного немонотонного хода флуоресцентных кривых, полученных титрованием раствора ДНК · БЭ при pH ≤ 8 раствором ПДМАЭМ с третичными аминогруппами в макромолекуле (рис. 7, кривые 1–3) или при pH ≤ 9 раствором гидробромида поли-L-лизина, несущего в цепи первичные аминогруппы (кривые 6, 7).

Данные по тушению раствором ПДМАЭМ при различных pH (рис. 7, кривые 1–5) или раствором ПЭП при разной концентрации хлористого натрия (рис. 8) убедительно показывают, что частичное разрушение солевых связей в комплексах за счет депротонирования полиамина или в результате введения соли может приводить не только к снижению эффективности тушения, но и к качественному изменению вида флуоримет-

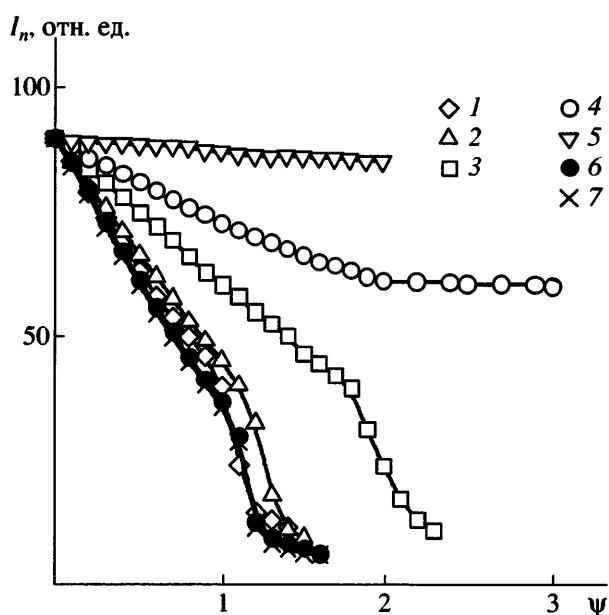


Рис. 7. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения $\psi = [\text{все аминогруппы}]/[\text{P}]$ в смесях растворов комплекса ДНК · БЭ с ПДМАЭМ (1–5) и поли-L-лизином (6, 7) при pH 6.0 (1, 6), 7.0 (2), 8.0 (3), 8.5 (4) и 9.0 (5, 7).

тических кривых. Подщелачивание среды при титровании раствором ПДМАЭМ, как и повышение ионной силы при титровании раствором ПЭП, сопровождается последовательным нарастанием интенсивности флуоресценции, которое особенно сильно оказывается на состоянии крутого участка. В результате этот участок полностью исчезает при pH > 8.2 или при $[\text{NaCl}] > 0.07$ моль/л. Вид кривых, полученных при pH 8.5 (рис. 7, кривая 4) или в 0.15 моль/л NaCl (рис. 8, кривая 4), весьма схож с видом кривой титрования ДНК · БЭ олигомерным амином, в частности коротким полипептидом KALA [13], который неспособен существенно компактизовать молекулу ДНК. Во всех случаях тушение флуоресценции осуществляется только на первом участке титрования, а затем состояние интеркалированного БЭ практически не меняется.

pH-профили реакции комплексообразования и конкурентных реакций в растворах ДНК

Из сравнения кривых, представленных на рис. 6 и 7, следует, что pH-зависимости электростатического связывания ПЭИ и ПДМАЭМ с ДНК различаются. Так, в щелочных средах вводимый ПДМАЭМ вообще не тушит флуоресценцию, то-

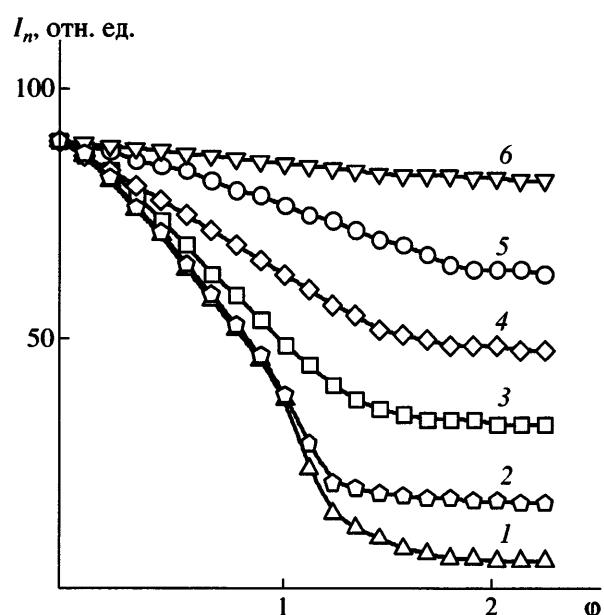


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции I_n от соотношения ϕ в смесях растворов комплекса ДНК · БЭ с ПЭП при $[\text{NaCl}] = 0$ (1), 0.05 (2), 0.10 (3), 0.15 (4), 0.20 (5) и 0.25 моль/л (6). pH 7.0.

гда как ПЭИ продолжает оказывать заметное воздействие на интеркалированный БЭ (ср. соответствующие кривые, полученные при pH 9.0). В то же время поли-L-лизин существенно превосходит ПЭИ как тушитель, причем кривая титрования этим полипептидом при pH 9.0 практически совпадает с кривой титрования полиамином ПДМАЭМ при pH 6.0 (рис. 7). Иными словами, значения степени превращения θ в реакциях между ДНК и катионным партнером, которая определяется как отношение числа образующихся солевых связей к максимально возможному их количеству [34], зависят от pH и отличаются друг от друга.

Если степень превращения θ пропорциональна эффективности тушения, то из данных флуориметрического титрования, проведенного для каждого поликатиона при различных значениях pH, можно получить pH-профили соответствующих реакций комплексообразования и провести их сравнительную оценку. В общем случае условие пропорциональности выполняется на начальном участке флуоресцентных кривых, обычно вплоть до $\psi = 1$, где введение поликатиона сопровождается линейным уменьшением I_n . Для повышения чувствительности определения расчет степени

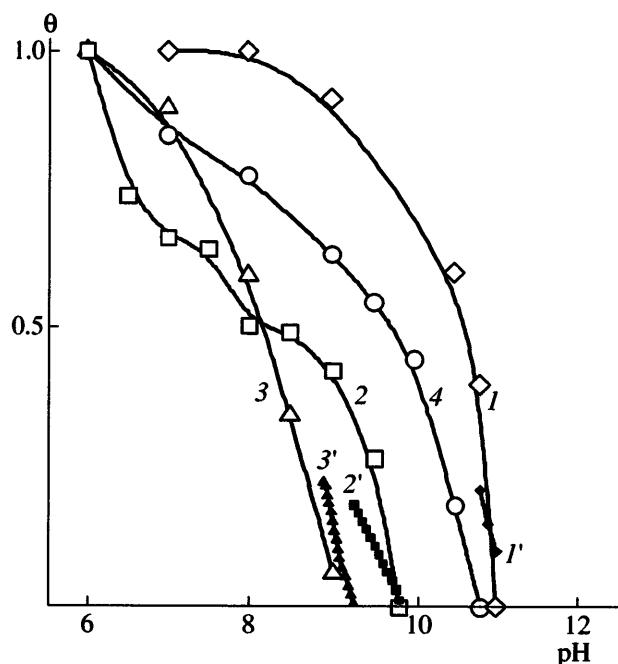


Рис. 9. pH-профили реакций ДНК с поли-*L*-лизином (*1*, *1'*), ПЭИ (*2*, *2'*), ПДМАЭМ (*3*, *3'*) и дендримером DAB-Am-16 (*4*), полученные из флуориметрических кривых (*1*–*4*) и кривых потенциометрического титрования (*1'*–*3'*).

превращения разумно проводить при таком составе смеси ДНК и поликатиона, при котором тушение осуществляется наиболее эффективно. Значение θ становится равным единице, когда при фиксированном составе смеси интенсивность флуоресценции достигает своего минимального значения и не меняется при дальнейшем подкислении среды. Тогда величины θ могут быть рассчитаны по формуле

$$\theta = \frac{I_c - I_n}{I_c - I_0}, \quad (1)$$

где I_c – интенсивность флуоресценции комплекса ДНК · БЭ, I_n – интенсивность флуоресценции смеси ДНК с выбранным полиамином при данном pH, а I_0 – минимальная интенсивность флуоресценции смеси того же состава, найденная из флуоресцентных кривых при подкислении среды.

На рис. 9 приведены полученные таким образом зависимости θ от pH для ПЭИ (кривая 2) и ПДМАЭМ (кривая 3), которые определяли из флуоресцентных кривых, представленных на рис. 6 и 7 при фиксированном составе смеси $\psi = 1$. Для построения профиля реакции ДНК с поли-*L*-

лизином (рис. 9, кривая 1) использовали кривые 6 и 7 рис. 7, а также кривые титрования, полученные в более щелочных средах. Видно, что pH-профили реакций комплексообразования группируются в щелочной области, причем кривая для поли-*L*-лизина с первичными аминогруппами в цепи и высоким значением $pK_b = 10.4$ занимает крайне правую позицию (кривая 1), тогда как левая позиция кривой 3 в этой группе согласуется с относительно низким $pK_b = 6.2$ ПДМАЭМ, несущего в цепи третичные аминогруппы. Во всех случаях зависимости смещены в щелочные среды, если сравнивать с кривыми нейтрализации соответствующего свободного полиамина. Это не удивительно, поскольку присутствие сильно заряженного полиамиона, в нашем случае ДНК, способствует протонированию полиамина или, что то же, образованию интерполимерных солевых связей [35].

В принципе pH-профиль интерполиэлектролитной реакции можно получить из кривой потенциометрического титрования эквимольной смеси полиамиона и полиамина, как подробно изложено в работе [34]. Однако такой подход пригоден для описания только начальной стадии реакции ($\theta < 0.25$), когда расчет степени превращения θ корректен. Мы провели потенциометрическое титрование смесей ДНК с полиаминами, рассчитали значения θ указанным способом и получили зависимости θ от pH для различных пар ДНК–полиамин [15]. Найденные таким образом pH-профили реакций ДНК с теми поликатионами, которые мы использовали для флуориметрического титрования при различных pH, представлены на рис. 9. Видно, что эти зависимости (кривые *1'*–*3'*) достаточно хорошо совпадают с начальными участками соответствующих флуоресцентных кривых (кривые *1*–*3*). Это совпадение указывает на пригодность флуоресцентного метода для определения pH-профилей реакций с участием ДНК.

Помимо порядка следования pH-профилей реакций по оси абсцисс, располагающихся в соответствии со значениями pK_b полиаминов (рис. 9, кривые *1*–*3*), веским аргументом в пользу флуоресцентного подхода служит вид этих профилей. Так, разветвленные цепи ПЭИ содержат примерно равное количество первичных, вторичных и третичных аминогрупп, причем основности первичных и вторичных аминогрупп практически

совпадают, но значительно отличаются от основности третичных аминогрупп. Соответственно профиль этой реакции (рис. 9, кривая 2) имеет немонотонный вид с двумя ярко выраженными участками. Правую ветвь, располагающуюся в щелочных средах, разумно отнести к протонированию первичных и вторичных аминогрупп ПЭИ, включенного в комплекс с ДНК, тогда как третичные аминогруппы поликатиона протонируются и образуют солевые связи с ДНК в нейтральных средах, что отражается левой ветвью кривой 2. Ничего подобного не наблюдается при взаимодействии ДНК с поликатионами, имеющими в цепях аминогруппы одного типа. Как и в случае поли-L-лизина (кривая 1), профиль реакции с ПДМАЭМ (кривая 3) имеет гладкий вид с монотонным возрастанием θ при подкислении среды, хотя сам профиль располагается существенно левее по оси абсцисс, что обусловлено упомянутой разницей в основности первичных и третичных аминогрупп.

Примечательно, что полученный тем же способом профиль реакции ДНК с полипропиленими новым дендримером DAB-Am-16 (рис. 9, кривая 4) явно немонотонен. Как и в случае ПЭИ (кривая 2), он состоит из двух разнесенных по шкале pH участков, которые можно отнести к протонированию первичных и третичных аминогрупп дендримера в комплексе. Характерно, что число тех и других групп в молекуле DAB-Am-16 практически одинаково, а вклад протонирования третичных групп, которое осуществляется в нейтральных средах, в глубину превращения оказывается существенно ниже (кривая 4). Этот результат хорошо соответствует сделанному в работе [34] выводу о практическом исключении третичных аминогрупп, находящихся во внутренней сфере дендримера, из электростатического взаимодействия с фосфатными группами ДНК вследствие стерических затруднений. Полученный нами pH-профиль свидетельствует об участии таких групп в электростатическом связывании дендримера с ДНК только в нейтральных средах и в сравнительно небольшом количестве.

Совокупность изложенных данных указывает на пригодность разрабатываемого нами флуоресцентного метода для построения зависимостей θ от pH в смесях ДНК с различными катионными партнерами и их сравнительной оценки. К преимуществам такого подхода следует отнести воз-

можность получения полного pH-профиля интерполиэлектролитной реакции и широкий рабочий интервал изменения кислотности среды, который ограничивается лишь областью существования комплекса ДНК · БЭ, соответствующей $4 < \text{pH} < 11$ [1]. Оба обстоятельства позволяют распространить применимость метода на подавляющее большинство синтетических полиаминов и эффективно связывающиеся с ДНК катионные биополимеры.

Хорошей иллюстрацией сказанному могут служить результаты исследования взаимодействия ДНК с поли-L-гистидином [36]. Значение I_0 в уравнении (1) находили из кривой титрования комплекса ДНК · БЭ полипептидом при pH 4. Полученный из флуоресцентных кривых pH-профиль реакции располагался в слабо кислых средах. Приведенные данные могут иметь большое значение для подтверждения механизма биологического действия этого и других имидазольных полимеров, использование которых существенно повышает эффективность доставки генетического материала в клетки. Выявленная флуоресцентным методом способность имидазольных групп полиплекса протонироваться при значениях pH, которые характерны для среды внутри лизосом и эндосом, свидетельствует в пользу гипотезы о действии таких групп как своеобразных насосов протонов [37]. В соответствии с данной гипотезой после захвата полиплекса клеткой по механизму эндоцитоза он попадает в слабо кислую среду эндосом или лизосом. При этом полиамин ведет себя как губка, которая всасывает протоны и соответствующее количество противоионов (Cl^-) из внешней среды, что приводит к повышению осмотического давления, набуханию лизосом и эндосом и их последующему разрушению с выходом трансгенного материала в цитозоль, что обеспечивает успешность его доставки в целом. Аналогичные флуоресцентные измерения, проведенные с частично алкилированными поли-N-алкил-4-винилпиридиниевыми катионами, показали, что в присутствии сильнозаряженной молекулы ДНК неалкилированные пиридиновые группы полиамина протонируются в слабо кислых средах со сдвигом на две-три единицы pH в нейтральную область по сравнению с поли-4-винилпиридином. Иными словами, полиамины с ароматическими третичными аминогруппами в цепи тоже могут активно воздействовать на лизосомы и эндосомы,

что подтвердили биологические тесты. Введение неалкилированных звеньев в поли-N-алкил-4-винилпиридиневые катионы резко (на порядок) повышало эффективность транспорта [24].

В уже цитированной работе [36] и одновременно в работе по исследованию связывания алифатических ионенов с ДНК [38] мы предложили использовать флуоресцентный подход для получения pH-профилей конкурентных интерполиэлектролитных реакций. Для этого в раствор ДНК · БЭ вводили эквимольное (по ионогенным группам) количество поликатиона-конкурента и титровали смесь поликатионом при различных pH. Поскольку и в этом случае в достаточно широком начальном интервале объемов титранта кривые титрования остаются линейными, интенсивность флуоресценции смеси можно поставить в однозначное соответствие с составом комплекса ДНК–поликатион. Отношение тушения флуоресценции в системе ДНК–поликатион–полианион–конкурент ($I_c - I_n$)₁ к таковому в отсутствие полианиона–конкурента ($I_c - I_n$)₀ при фиксированном составе смеси φ численно равно доле связей θ, образованных поликатионом с ДНК в конкурентной реакции:

$$\theta = \frac{(I_c - I_n)_1}{(I_c - I_n)_0} \quad (2)$$

Таким образом, использование флуоресцентного подхода позволяет судить о селективности связывания поликатиона с ДНК в присутствии полианиона–конкурента и выявлять факторы, влияющие на нее. При увеличении степени полимеризации поликарбонатного аниона связывание ионена с ДНК переставало доминировать, и предпочтительным становилось взаимодействие ионена с поликарбонатом–конкурентом, а при добавлении в тройную смесь хлористого натрия усиливалась тенденция к комплексообразованию цепей ионена с нуклеиновой кислотой [38]. Если в присутствии полистиролсульфонатного аниона взаимодействие поли-L-гистидина с ДНК полностью блокировалось во всем изученном диапазоне pH, то наличие в смеси менее сильного конкурента, в частности поликарбонатного аниона, приводило к распределению заряженного полипептида между ним и ДНК, причем селективность связывания с ДНК возрастила с уменьшением длины цепи конкурента [36]. Степень полимеризации ионеновых поликатионов оказывала большое

влияние на равновесие конкурентной реакции в их смесях с ДНК и полиметакрилатным анионом [39]. Олигомерные ионены не проявляли склонности к селективному связыванию с каким-либо из этих поликатионов, но по мере увеличения длины цепей появлялась, а затем резко усиливалась их способность к “молекулярному узнаванию”. Селективность связывания достаточно высокомолекулярных ионенов зависела от плотности заряда, причем ионены с большим расстоянием между зарядами в цепи предпочтительно связывались с ДНК, тогда как более сильнозаряженные ионены селективно связывались с полиметакрилатным анионом.

Результаты изучения конкурентных интерполиэлектролитных реакций имеют важное значение, в частности, для моделирования процесса вы свобождения ДНК из ее комплекса с поликатионом–носителем внутри клетки, в котором могут участвовать отрицательно заряженные конкуренты различной природы [36]. Исследование этого ключевого этапа доставки ДНК может перейти на качественно новую ступень с применением и дальнейшим развитием обсуждаемого нами флуоресцентного метода. Как детально изложено в работах [36, 38], обработка данных по тушению, полученных для тройных смесей, позволяет не только устанавливать отношение констант связывания поликатиона с каждым из полианионов, но и вычислять абсолютные значения указанных констант. Выявление корреляции между константой связывания поликатиона с ДНК и его пригодностью для транспорта нукleinовой кислоты может составить основу для конструирования носителей, способных высвобождать связанный генетический материал внутри живой клетки при изменении среды.

Стабильность полиэлектролитных комплексов ДНК в водно–солевых средах

Интеркаляция БЭ приводит к частичному раскручиванию двойной спирали и ее удлинению [1, 5], что может сопровождаться заметным ослаблением электростатического взаимодействия ДНК с катионным партнером. Так, последовательное вымывание гистонов из комплекса (ДНК · БЭ)–гистон осуществляется в градиенте концентрации соли и происходит в интервале 0.2–0.6 моль/л NaCl, а в отсутствие БЭ тот же результат достигается при значительно более высокой ионной силе

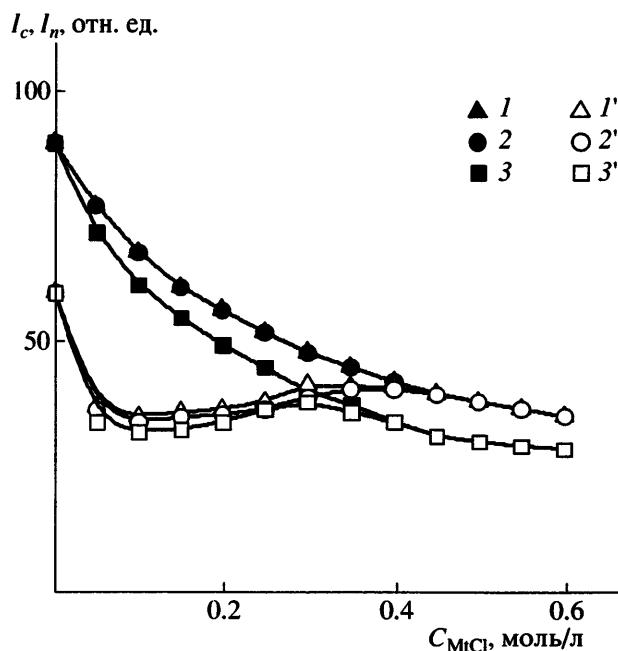


Рис. 10. Зависимость интенсивности флуоресценции I_c , растворов комплекса ДНК · БЭ (1–3) и растворов (ДНК · БЭ)–ПЭП состава $\phi = 0.8$ ($1'$ – $3'$) I_n от концентрации соли C_{MgCl_2} . $Mt = \text{Na}$ (1, $1'$), K (2, $2'$) и Li (3, $3'$); $P_n(\text{ПЭП}) = 40$; pH 9.0.

0.4–1.4 моль/л NaCl. Это, в частности, означает, что разрабатываемый флуоресцентный подход лишь с оговорками может быть использован для определения количественных параметров связывания ДНК с поликатионами. Тем не менее приведенные выше данные показывают, что он вполне применим для сравнительного анализа средства различных положительно заряженных объектов к ДНК.

Как следует из кривых флуориметрического титрования ДНК · БЭ раствором ПЭП при различных концентрациях добавленной соли (рис. 8), интенсивность флуоресценции БЭ может служить индикатором состояния полиэлектролитного комплекса в водно-солевых средах. Обработка данных титрования с помощью приема, который мы использовали для получения pH-профилей, т.е. путем измерения значений I_n при фиксированном составе смеси и построения на их основе профиля разрушения полиэлектролитного комплекса [40], не приводит к удовлетворительному результату, поскольку не учитывает влияние ионной силы на флуоресценцию интеркалированного этидия. Число мест связывания красителя в комплексе ДНК · БЭ не меняется даже в концен-

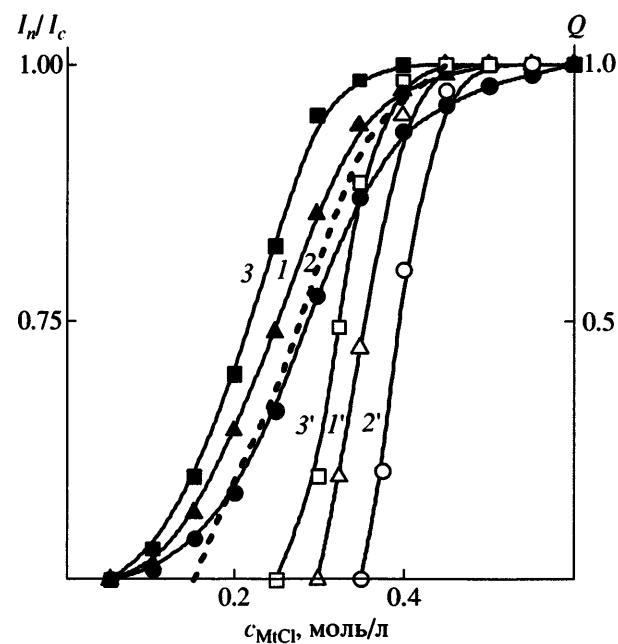


Рис. 11. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции I_n/I_c раствора комплекса (ДНК · БЭ)–ПЭП с $\phi = 0.8$ ($1'$ – $3'$) и определенной из седиментограмм доли Q выделившегося из комплекса ДНК–ПЭП поликатиона ($1'$ – $3'$) от концентрации соли C_{MgCl_2} . $Mt = \text{Na}$ (1, $1'$), K (2, $2'$) и Li (3, $3'$). $P_n(\text{ПЭП}) = 40$, pH 9.0. Штриховая кривая – профиль разрушения комплекса (ДНК · БЭ)–ПЭП, полученный из седиментограмм.

тированных растворах низкомолекулярных солей [1, 5]. Тем не менее интенсивность флуоресценции раствора ДНК · БЭ существенно падает уже на первых этапах введения низкомолекулярного электролита (рис. 10, кривые 1–3), что обусловлено конформационными изменениями двойной спирали с экспонированием молекул интеркалированного БЭ в раствор [1]. Поэтому данные флуоресцентных измерений смесей полиэлектролитов в водно-солевых растворах, например ДНК и ПЭП (рис. 10, кривые $1'$ – $3'$), следует нормировать на значения интенсивности флуоресценции I_c комплекса ДНК · БЭ, полученные в тех же условиях и при той же концентрации соли. При такой поправке существенно изменяется вид кривых титрования (рис. 11, кривые 1–3), хотя очевидно, что диапазон ионной силы, соответствующий возгоранию флуоресценции, при этом не меняется.

Для ответа на вопрос о том, насколько адекватно полученные кривые отражают процесс диссоциации полиэлектролитного комплекса, мы

проводили седиментационные исследования смесей ДНК и ПЭП. Анализ седиментограмм показывает, что практически в том же интервале изменения ионной силы происходит выделение из комплекса (ДНК · БЭ)–ПЭП в раствор свободных цепей поликатиона, доля Q которых растет (рис. 11, штриховая кривая). Это соответствие позволяет использовать данные флуоресцентных измерений для количественной оценки глубины разрушения солевых связей в присутствии интеркалятора и построения соответствующих профилей разрушения полиэлектролитного комплекса. Характерно, что разрушение комплексов ДНК–ПЭП, определенное из седиментограмм их водно-солевых растворов, не содержащих БЭ, осуществляется при более высокой ионной силе (рис. 11, кривые 1'–3'). Следовательно, наличие интеркалированного красителя ослабляет электростатическое связывание ДНК с поликатионом подобно тому, как это наблюдалось для комплексов ДНК с гистонами. Отметим, что интеркаляция БЭ понижает стабильность полиэлектролитного комплекса, но не приводит к изменению ряда связывания с ним катионов щелочных металлов. Как следует из кривых 1–3 и 1'–3' на рис. 11, для комплексов (ДНК · БЭ)–ПЭП и комплексов ДНК–ПЭП такой ряд одинаков и имеет вид $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, совпадающий с рядом связывания этих катионов с ДНК [41].

Таким образом, стабильность комплексов ДНК с поликатионами удобно оценивать по кривым флуориметрического титрования смесей (ДНК · БЭ)–поликатион растворами низкомолекулярных солей. С помощью этого подхода мы выявили влияние различных факторов на устойчивость полиэлектролитных комплексов в водно-солевых растворах [15, 16]. Установлено [16], что степень полимеризации и плотность заряда цепи полиамина, а также структура N-алкильных заместителей его аминогрупп могут существенно влиять на диссоциацию комплекса, которая к тому же зависит от природы вводимого низкомолекулярного электролита. Так, по способности разрушать комплекс ДНК–ПЭП катионы и анионы располагаются в ряды $\text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > (\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ и $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$, которые совпадают с уменьшением сродства тех же противоионов к ДНК и катионному партнеру. Другим важным фактором, который может определять стабильность комплексов ДНК, является струк-

тура аминогрупп поликатиона [15]. Диссоциация полиэлектролитных комплексов, образованных поликатионами с четвертичными аминогруппами, не зависит от pH и наиболее подвержена действию вводимой соли, тогда как первичные аминогруппы обеспечивают наивысшую стабильность комплекса в широком интервале изменения pH. Полиамины с третичными аминогруппами образуют с ДНК комплексы с промежуточной устойчивостью, которая существенно зависит от pH.

Недавно мы использовали тот же экспериментальный подход для исследования устойчивости комплексов ДНК с полибетаинами в солевых средах [20, 42]. Высокая чувствительность метода позволила экспериментально доказать существование комплексов в нейтральных и слабощелочных средах, когда разноименно заряженные группы в бетаиновых группировках образуют наиболее прочные ионные пары. Этот фактор определяет относительно невысокую устойчивость полиэлектролитных комплексов в нейтральных средах, которую можно контролировать изменением длины алкильного спейсера между зарядами в бетаиновом звене. Существенно, что в слабокислых средах комплексы полибетаинов с ДНК значительно упрочнялись из-за протонирования карбоксилатных групп, приводящего к разрушению бетаиновых ионных пар и превращению полибетаина в высокозаряженный поликатион. Такой результат указывает на перспективность использования полибетаинов как носителей генного материала, способных обеспечивать выход целевой ДНК из эндосом и лизосом в цитозоль по описанному выше механизму насоса протонов.

Приведенные данные могут составить основу для создания полиэлектролитных систем с заданной и контролируемой стабильностью в водно-солевых средах, что особенно важно для конструирования эффективных средств доставки генетического материала в клетку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом изложенных данных кратко перечислим основные достоинства разрабатываемого флуоресцентного подхода, делающие его особенно перспективным для исследования полиэлектролитных комплексов на основе ДНК.

Использование метода позволяет избегать дорогостоящей и трудоемкой процедуры ковалентного связывания флуоресцентной метки с ДНК, которая часто приводит к значительному повреждению двойной спирали.

Метод универсален, поскольку он не предполагает использования специальных поликатионов-тушителей и пригоден для исследования широкого круга катионных (био)полимеров различной структуры.

С помощью разрабатываемого подхода возможно проведение экспресс-оценки сродства различных поликатионов с ДНК простым измерением интенсивности флуоресценции растворов.

Метод позволяет предсказывать поведение тройных полиэлектролитных систем и осуществлять тонкий контроль за равновесием и кинетикой конкурентных реакций в смесях растворов комплексов ДНК и полианионов различной химической природы.

Продемонстрированные в работе возможности получения полных профилей реакций комплексообразования и конкурентных интерполиэлектролитных реакций открывают пути решения важной практической задачи, связанной с созданием полиэлектролитных систем, содержащих ДНК, которые обладают контролируемой стабильностью и способны доставлять генетический материал в ядра клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Le Pecq J.-B., Paoletti C.* // *J. Mol. Biol.* 1967. V. 27. № 1. P. 87.
2. *Pasternack R.F., Caccam M., Keogh B., Stephenson T.A., Williams A.P., Gibbs E.J.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. № 18. P. 6835.
3. *Burns V.W.F.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. V. 133. № 2. P. 420.
4. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.
5. *Angerer L.M., Moudrianakis E.N.* // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 63. № 3. P. 505.
6. *Nordmeier E.* // *J. Phys. Chem.* 1992. V. 96. № 14. P. 6045.
7. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
8. *Morgan A.R., Lee J.S., Pulleyblank D.E., Murray N.L., Evans D.H.* // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. № 3. P. 547.
9. *Stewart K.D.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 152. № 3. P. 1441.
10. *Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Каргов С.И., Жирякова М.В., Кабанов В.А.* // *Докл. РАН.* 1995. Т. 342. № 5. С. 626.
11. *Plank C., Tang M.X., Wolfe A.R., Szoka F.C.* // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. № 2. P. 319.
12. *Dufourcq J., Neri W., Henry-Toulme N.* // *FEBS Lett.* 1998. V. 421. № 1. P. 7.
13. *Wyman T.B., Nicol F., Zelphati O., Scaria P.V., Plank C., Szoka F.C., jr.* // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 10. P. 3008.
14. *Toncheva V., Wolfert M.A., Dash P.R., Oupicky D., Ulbrich K., Seymour L.W.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1380. № 3. P. 354.
15. *Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Kudaibergenov S.E.* // *Biopolymers. Nucleic Acid Sciences.* 1999. V. 52. № 2. P. 94.
16. *Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V.* // *Macromol. Chem. Phys.* 1999. V. 200. № 11. P. 2533.
17. *Chen W., Turro N.J., Tomalia D.A.* // *Langmuir.* 2000. V. 16. № 1. P. 15.
18. *Tang M.X., Szoka F.C., jr.* // *Gene Ther.* 1997. V. 4. № 8. P. 823.
19. *Read M.L., Bettinger T., Oupicky D.* Methods in Molecular Medicine / Ed. by Findeis M.A. Totowa; New York: Humana Press Inc., 2001. V. 65. P. 131.
20. *Izumrudov V.A., Domashenko N.I., Zhiryakova M.V., Davydova O.V.* // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. № 37. P. 17391.
21. *Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Gouiko A.V.* // *Langmuir.* 2002. V. 18. № 26. P. 10348.
22. *Xu Y., Szoka F.C., jr.* // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 18. P. 5616.
23. *Eastman S.J., Siegel C., Tousignant J., Smith A.E., Cheng S.H., Scheule R.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1325. № 1. P. 41.
24. *San Juan A., Letourneur D., Izumrudov V.A.* // *Bioconjugate Chemistry.* 2007. V. 18. № 3. P. 922.
25. *Waring M.J.* // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. № 1. P. 269.
26. *Olins D.E., Olins A.L., von Hippel P.H.* // *J. Mol. Biol.* 1967. V. 24. № 2. P. 157.

27. Izumrudov V.A., Bronich T.K., Saburova O.S., Zezin A.B., Kabanov V.A. // *Macromol. Chem., Rapid Commun.* 1988. V. 9. № 1. P. 7.
28. Rembaum A., Baumgartner W., Eisenberg A. // *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* 1968. V. 6. № 3. P. 159.
29. Manning G.S. // *Biopolymers.* 1980. V. 19. № 1. P. 37.
30. Manning G.S. // *Biopolymers.* 1981. V. 20. № 6. P. 1261.
31. Miller I.R., Bach D. // *Biopolymers.* 1968. V. 6. № 2. P. 169.
32. Oupicky D., Koňák Č., Ulbrich K. // *J. Biomaterials Sci.* 1999. V. 10. № 5. P. 573.
33. Basu H.S., Schwietert H.C.A., Feuerstein B.G., Marston L.J. // *Biochem. J.* 1990. V. 269. № 2. P. 329.
34. Kabanov V.A., Zezin A.B., Rogacheva V.B., Gulyaeva Zh.G., Zansochova M.F., Joosten J.G.H., Brackman J. // *Macromolecules.* 1999. V. 32. № 6. P. 1904.
35. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
36. Zelikin A.N., Trukhanova E.S., Putnam D.A., Izumrudov V.A., Litmanovich A.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 45. P. 13693.
37. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 16. P. 7297.
38. Зеликин А.Н., Труханова Е.С., Изумрудов В.А., Литманович А.А. // Высокомолек. соед. Б. 2003. Т. 45. № 9. С. 1595.
39. Trukhanova E.S., Izumrudov V.A., Litmanovich A.A., Zelikin A.N. // *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. № 6. P. 3198.
40. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Akritskaya N.I. Advanced Macromolecular and Supramolecular Materials and Processes / Ed. by Geckeler K.E. New York; Boston; Dordrecht; London; Moscow: Kluwer Academic / Plenum Publ., 2003. P. 277.
41. Куэнцов И.А., Каргов С.И., Козлов А.Г. // Молек. биология. 1984. Т. 18. № 6. С. 1583.
42. Izumrudov V.A., Domashenko N.I., Zhiryakova M.V., Rakhnyanskaya A.A. // *Macromol. Chem., Rapid Commun.* 2005. V. 26. № 13. P. 1060.

A Fluorescent Method Based on the Competitive Displacement of Intercalated Dyes for the Study of DNA Polyelectrolyte Complexes: Advantages and Perspectives

M. V. Zhiryakova and V. A. Izumrudov

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia
e-mail: izumrud@genebee.msu.su*

Abstract—The interaction of cationic (bio)polymers with DNA may cause the transfer of the intercalated cationic dye ethidium bromide from the double helix to solution. This effect is accompanied by probe fluorescence quenching. The effective displacement of ethidium from nucleic acid that has been discovered in the study of the cooperative electrostatic binding of DNA to salts of polymeric bases forms the basis of the fluorescent method useful for the investigation of polyelectrolyte complexes of DNA. By the example of a wide range of model polycations, this approach is shown to be fruitful for estimation of the cooperative character of interactions, construction of pH-dependent profiles of complexation reactions and competitive binding, and creation of systems with desired and controlled stability in aqueous–saline solutions. This evidence is of special importance for the design of polyelectrolyte means effective for delivery of genetic materials to the cell.