

ПРОЦЕСС КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК В РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИЛИЗИН И ЕГО ОЛИГОПЕПТИДЫ

Касьяненко Н.А., Дрибинский Б.А.

Санкт Петербургский государственный университет

ул. Университетская наб. 7/9, г. Санкт Петербург, 199034, РФ

e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Аннотация. Проводится сравнение конденсации ДНК в растворе, содержащем поли-L-лизин с различным числом мономеров $n = 2, 3, 5, 325$ в присутствии низкомолекулярной соли 5 mM NaCl . Было показано, что, несмотря на идентичные результаты конденсации ДНК, индуцированной полилизинном и его олигомерами, кинетика компактизации ДНК и конформационные изменения макромолекулы до ее конденсации зависят от того, принадлежат ли конденсирующие агенты к высокомолекулярным поликатионам или коротким олигомерам. Вторичная и третичная структуры ДНК были изучены с помощью спектральных методов (сектрофотометрия, флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм), а также с использованием динамического рассеяния света, низкоградиентной вискозиметрии, двулучепреломления в потоке и атомной силовой микроскопии. В последнем случае изображения были получены после фиксации молекул ДНК из раствора на поверхность слюды в присутствии ионов магния.

Ключевые слова: конденсация ДНК, поли-L-лизин, олигопептиды, кинетика компактизации ДНК.

PROCESS OF DNA PACKAGING IN SOLUTIONS WITH POLYLYSINE AND ITS OLIGOPEPTIDES

Kasyanenko N.A., Dribinsky B.A.

Saint Petersburg State University

Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Abstract. A comparison of DNA condensation in a solution containing the poly-L-lysine with the different number of monomers $n = 2, 3, 5, 270, 325$ was carried out in the presence of low molecular electrolyte 5 mM NaCl . It was shown that despite the identical results of DNA condensation induced by compounds (poly-L-lysine and its oligopeptides), the kinetic of DNA packaging and conformational changes prior to condensation depends on whether they belong to a long polycations or short oligomers. DNA secondary and tertiary structures were examined using Spectral methods (Spectrophotometry, Fluorescent Spectroscopy, Circular Dichroism), and with Dynamic Light Scattering, Low Gradient Viscometry, Flow Birefringence, and AFM. AFM images were obtained after DNA fixation from solutions on mica surface with Mg ions.

Key words: DNA condensation, poly-L-lysine, oligopeptides, kinetic of DNA packaging

Несмотря на то, что конденсация высокомолекулярной ДНК в растворе (переход из конформации сильно набухшего статистического клубка в компактное состояние с образованием наночастиц определенной формы) исследуется на протяжении многих лет, интерес к подобным конформационным изменениям ДНК в последнее время возрос в связи потребностями генетической инженерии. Это обусловлено необходимостью создания эффективных и нетоксичных генных векторов. Полилизин в качестве конденсирующего агента в подобных системах используется достаточно широко [1-6], однако недостаточно высокая эффективность трансфекции генных векторов с полилизинном мешает его применению в этом качестве. Однако этот полимер является хорошим компонентом для исследования свойств интерполиэлектrolитных комплексов на основе ДНК. В данной работе рассматриваются особенности формирования ДНК-полимерных комплексов при использовании высокомолекулярного полилизина и его олигомеров. Ранее было показано [1], что полилизин со степенью полимеризации (n) более 16 вызывает конденсацию ДНК в растворах малой ($0,005 \text{ M NaCl}$) и большой (1 M NaCl) ионной силы при зарядовом отношении $N/P > 1$, тогда как олигопептиды с тремя и пятью мономерными остатками лизина вызывают конденсацию ДНК только в растворах малой ионной силы ($0,005 \text{ M NaCl}$), а при больших концентрациях поддерживающего электролита NaCl компактизации ДНК не наблюдается. Еще одно отличие действия олигопептидов и полилизина заключается в том, что короткие пептидные цепочки индуцируют конденсацию ДНК не при $N/P > 1$, а при достижении их определенной концентрации в растворе, характерной для каждого соединения. Олигопептиды, как и полилизин, при определенной концентрации в растворе ДНК способствуют образованию сферических или близких к ним по форме частиц (см. рис. 1). Бипептид компактизацию ДНК не индуцирует. В работе использовали высокомолекулярную тимусную ДНК и полилизин со степенью полимеризации 327, 270, 5, 3 и 2 фирмы Sigma.

Следует подчеркнуть, что конденсация ДНК сопровождается появлением частиц, для которых характерна унимодальная функция распределения по размерам, как это следует из данных метода динамического светорассеяния (см. рис. 2), что отражает гомогенность системы после конденсации ДНК. Гидродинамический радиус формируемых частиц лежит в интервале от 80 до 150 нм. В работе использовали установку PhotoCor, с линейным 16-ти битовым коррелятором и HeNe лазером Uniphase 1135P с длиной волны излучения 632 нм и мощностью $1 \times 10^{-2} \text{ Вт}$. Диапазон углов наблюдения был выбран от 40 до 90 градусов, в процессе измерений температура составляла $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Для получения функции распределения по временам релаксации из автокорреляционной функции интенсивности использовали программное обеспечение DynaLS.

Как видно из рисунка 2, при использовании полилизина высокой степени полимеризации в рассматриваемом временном масштабе размер частиц не изменяется, тогда как олигопептиды в течение 20 сек. вызывают формирование малых частиц, которые затем со временем организуют немного более крупные формы.

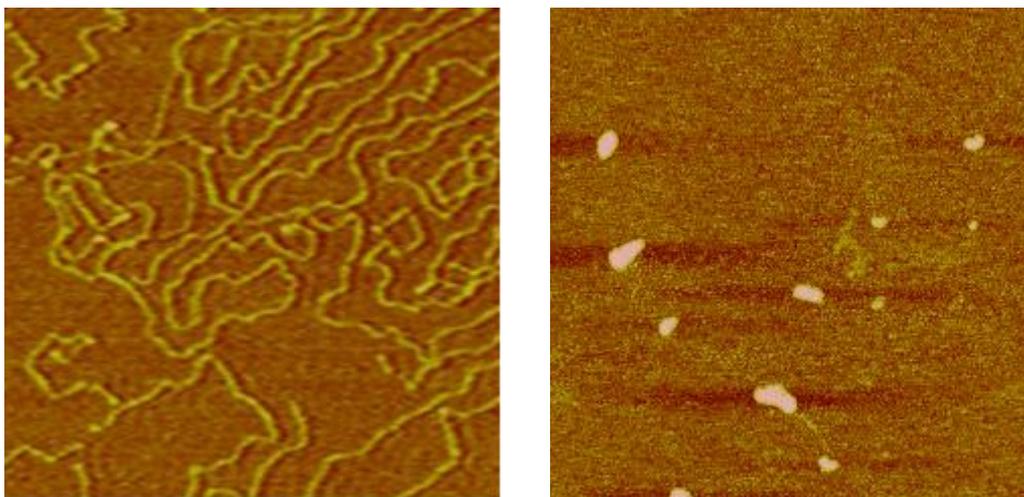


Рисунок 1 – АСМ-изображение свободной тимусной ДНК, высаженной из раствора с $C(\text{ДНК})=0,0001\%$ (слева) и конденсированной ДНК, полученной при использовании пентализина (справа). Масштаб $2 \times 2 \mu\text{m}$. Использовали микроскоп Nanoscope IVa (Veeco/Digital Instruments). Работали в режиме постоянного контакта. В качестве подложки использовали слюду. При иммобилизации молекул ДНК на подложку использовали раствор MgCl_2

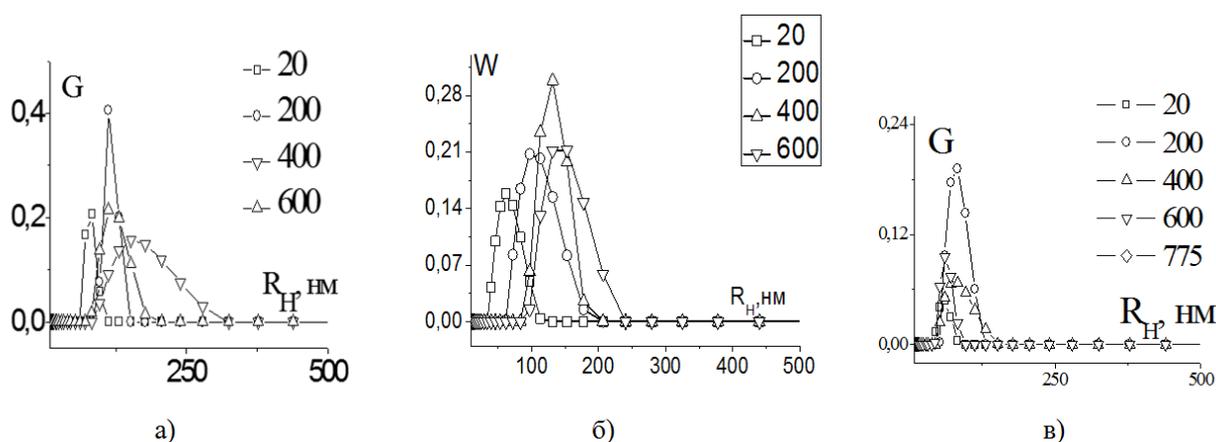


Рисунок 2 – Функция распределения по размерам (гидродинамический радиус) для комплекса ДНК с трилизином, $C(\text{трилизина}) = 7,2 \cdot 10^{-4} \text{ M(N)}$ (а), пентализином, $C(\text{пентализина}) = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M(N)}$. (б) и полилизином 327, $N/P = 1,25$ (в) в $0,005 \text{ M NaCl}$. У графиков указано время после сливания растворов ДНК и олигопептидов (в секундах. Угол рассеяния 90° градусов)

Таким образом, пентализин и трилизин сходным образом влияют на конформацию ДНК в растворе. Они индуцируют образование дискретных наночастиц приблизительно одного размера. При этом пентализин конденсирует макромолекулу при меньших концентрациях, чем трилизин. Заметим, что характер влияния полилизина на конформацию ДНК для цепочек достаточной длины ($n > 17$) не зависит от количества мономерных звеньев поликатиона. При этом конденсация ДНК приводит к формированию частиц, размер которых практически не зависит от длины полилизина.

Мы предполагаем, что после смешивания растворов ДНК с полилизином достаточно быстро происходит образование конденсированных частиц, а затем происходит увеличение их размера. Полученные характерные времена: порядка 20-30 секунд соответствуют временам образования частиц, а время τ порядка 150-350 секунд характерно для второго процесса. Естественно предположить, что увеличение интенсивности рассеянного света в первые секунды измерений связано с постепенным образованием частиц и увеличением их количества в растворе.

В литературе существуют данные о конденсации ДНК при её взаимодействии с полиаминами. Рассматривается три этапа: связывание конденсирующего агента с ДНК (с характерным временем порядка миллисекунд), быстрая внутримолекулярная конденсация ДНК при концентрациях агента, превышающих некоторое пороговое значение (времена порядка секунд) и медленная межмолекулярная конденсация (порядка 100 секунд). В условиях нашего эксперимента для полилизина не удается зарегистрировать первый этап с характерными временами порядка нескольких миллисекунд.

Кинетика процесса конденсации ДНК олиго- и полилизинном в растворах малой ионной силы была изучена также методом флуоресценции с использованием спектрофлуориметра Hitachi. Временные зависимости интегральной интенсивности рассеяния были получены путем измерения сигнала под углом 90 градусов (см. рис. 3). Из этих данных видно, что для растворов свободной ДНК и ДНКс полилизинном при $N/P < 1$ интенсивность светорассеяния очень низка, что указывает на отсутствие конденсации ДНК в системе, в то время как при $N/P > 1$ интенсивность резко возрастает в результате появления конденсированных структур. Причем при $N/P > 1,25$ происходит падение интенсивности рассеянного света, связанное, по-видимому, с частичным выпадением комплексов в осадок. Максимум рассеяния наблюдается при зарядовом соотношении N/P , вызывающем падение вязкости растворов ДНК практически до нуля. В этом случае АСМ-изображения демонстрируют формирование сферических наночастиц.

Рассмотрение кинетики конденсации ДНК, индуцированной олигопептидами (три- и пентализином) показало, что в целом процесс протекает сходным образом с наблюдаемым для полилизина значительной длины, но есть и отличия. Наблюдается более существенная по сравнению с полилизинном зависимость интенсивности рассеяния от времени (при том же временном интервале измерений) при достижении концентраций пептидов в растворе, вызывающих конденсацию ДНК. Эти данные согласуются с результатами вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления, спектрофотометрии и кругового дихроизма.

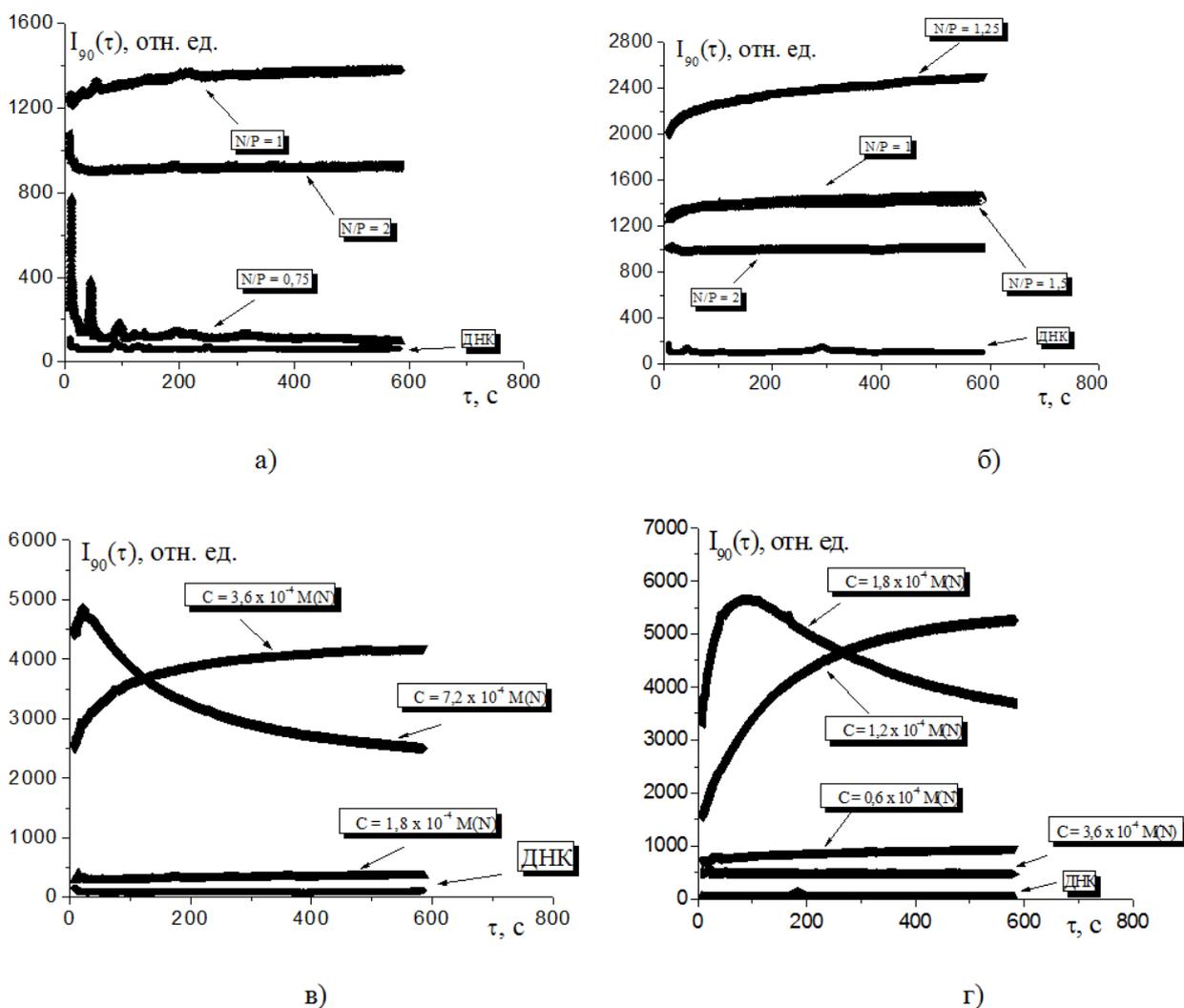
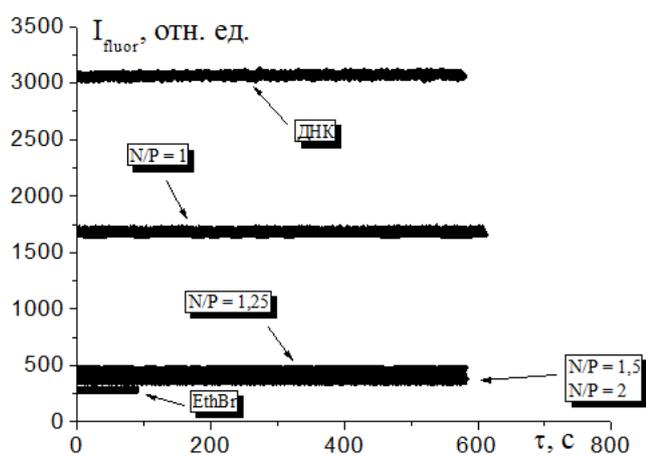


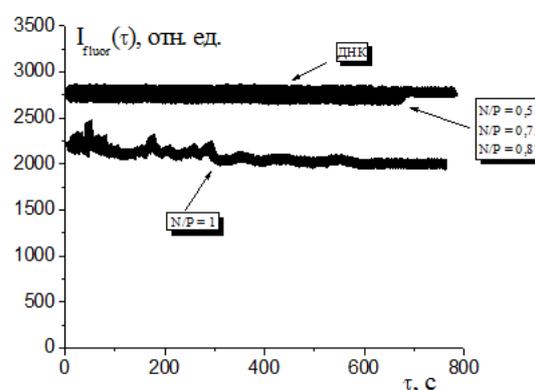
Рисунок 3 – Временные зависимости интенсивности рассеяния для растворов ДНК с полилизинном 327(а, б), трилизинном (в) и пентализинном (г) в 0,005 М NaCl, измеренной под углом 90 градусов. Величины N/P , C (трилизина) и C (пентализина) даны у соответствующих зависимостей, $\lambda_{ex} = 400$ нм

Мы рассмотрели флуоресценцию этидиума бромида (EthBr) после его добавления в растворы ДНК, содержащие полилизин и его олигопептиды. Использовали отношение концентраций этидиума бромида к концентрации ДНК (выраженной в молях пар оснований) $C_{EthBr}/C_{ДНК} = 1/5$. Как известно, свободная ДНК практически не флуоресцирует. В свободном состоянии этидиум бромид, так же как и ДНК, флуоресцирует слабо, но в связанном с ДНК состоянии, когда он интеркалирует в двойную спираль, квантовый выход флуоресценции меняется на порядок. Существует точка зрения что при конденсации ДНК этидиум бромид выходит в раствор, и при этом наблюдается падение квантового выхода флуоресценции.

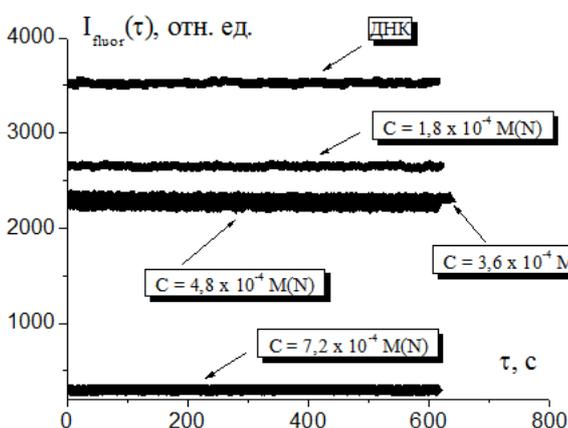
Из рисунка 4 а, б хорошо видно, что интенсивность флюоресценции красителя не меняется до $N/P = 1$, т.е. можно говорить о том, что до конденсации ДНК влияния полилизина на связывание красителя с ДНК не наблюдается. При $N/P > 1$ происходит скачкообразное уменьшение флюоресценции, а при $N/P > 1,25$ наблюдается её падение до значений, практически совпадающих с флюоресценцией свободного этидиума бромидом. Следовательно, в этом случае вся ДНК в растворе сконденсирована. Вместе с тем, данные по флюоресценции указывают на наличие некоторого количества свободной ДНК в комплексах с отношением зарядовым $N/P = 1$. При добавлении красителя после формирования комплексов ДНК-поликатион интенсивность флюоресценции не меняется в течение всего времени эксперимента. Это указывает на то, что количество свободной ДНК в растворе остается неизменным, следовательно, и количество конденсированной ДНК не меняется. Процесс конденсации ДНК протекает очень быстро (характерное время, согласно проведенной оценке, составляет около 25 ± 5 с.). Интересно отметить, что предварительное связывание ДНК с этидиум бромидом перед добавлением полилизина в систему приводит к иному результату. Интенсивность флюоресценции со временем падает, что может отражать вытеснение красителя при образовании конденсированных структур. В этом случае характерное время τ порядка 450 секунд отражает формирование конденсированных структур, что сопровождается вытеснением этидиума бромидом с ДНК.



а)



б)



в)

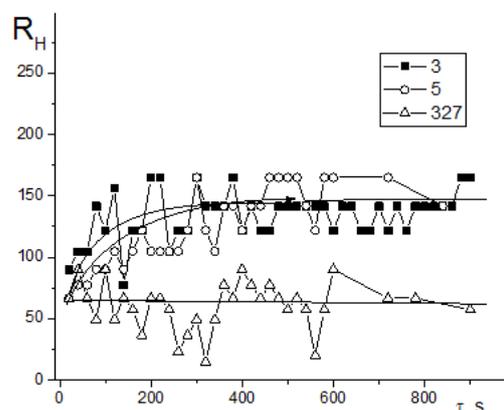


Рисунок 4 – Временные зависимости интенсивности флюоресценции этидиума бромидом в растворе ДНК с полилизин 327 в $0,005$ М NaCl. $\lambda = 600$ нм. К комплексу ДНК-полилизин добавляли EthBr (а) и к предварительно сформированному комплексу ДНК-EthBr добавляли полилизин (б). На рис. в приведены зависимости интенсивности флюоресценции растворов комплексов ДНК-EthBr с трилизин в $0,005$ М NaCl. $\lambda = 600$ нм. Олигопептид добавляли после связывания ДНК с красителем. На рис. г представлены временные зависимости гидродинамического радиуса конденсированных частиц ДНК-полилизин 327, $N/P = 1,25$. (3), ДНК-пентализин (2), $C(\text{пентализина}) = 1,8 \cdot 10^{-4}$ М(N) (б) и ДНК-трилизин (1), $7,2 \cdot 10^{-4}$ М(N) (в) в $0,005$ М NaCl от времени

Данные, полученные при изучении флюоресценции этидиума бромидом в растворах ДНК с трилизин, представлены на рисунке 4 с. Для систем с концентрациями трилизина в диапазоне от $1,8 \cdot 10^{-4}$ М(N) до

$4,8 \cdot 10^{-4}$ M(N) происходит постепенное падение флюоресценции с увеличением концентрации олигопептида в растворе. Это может отражать постепенное вытеснение этидиум бромидом с ДНК при ее связывании с трилизиним. Заметим, что в этом эксперименте трилизин добавлялся после окрашивания ДНК этидиум бромидом. Надо отметить, что на протяжении всего эксперимента интенсивность флюоресценции для всех систем не менялась. Т.е. процесс взаимодействия ДНК с трилизиним происходит настолько быстро, что мы изучаем уже равновесную систему. Для раствора ДНК с $C(\text{трилизина}) = 7,2 \cdot 10^{-4}$ M(N) наблюдается падение флюоресценции до значений, практически совпадающих с флюоресценцией свободного этидиума бромида. Следовательно, в этом случае вся ДНК в растворе сконденсирована. Эти результаты хорошо согласуются с данными по динамическому светорассеянию. Распределения частиц по размерам после конденсации ДНК носят унимодальный характер. При использовании олигопептидов происходит постепенное укрупнение конденсированных частиц, размеры которых возрастают от 80 до 140 ± 20 нм. Однако в этом случае образование более крупных частиц происходит быстрее, чем для систем ДНК-пентализин (характерное время порядка 200 секунд). Подчеркнем, что неизменность флюоресценции показывает, что вся ДНК сконденсирована и изменения размеров относятся уже к конденсированным частицам.

Отметим, что результаты всех используемых методов хорошо согласуются между собой и подтверждают высказанную точку зрения. Таким образом, принципиальное различие конденсации ДНК, индуцированной поликатионами при $N/P > 1$, и наблюдаемой при добавлении в раствор олигопептидов при достижении их критических концентраций в растворе заключается в том, что в первом случае конденсированные частицы не меняют размера с течением времени (гидродинамический радиус таких частиц порядка 70 ± 20 нм), тогда как в присутствии олигопептидов быстрое образование частиц такого же размера приводит в дальнейшем к их укрупнению (гидродинамический радиус порядка 140 нм). Примерно после 300 секунд в системе устанавливается равновесие.

Совокупность полученных в работе данных указывает на разницу в связывании поликатионов достаточной длины и олигомеров с ДНК в растворе. При взаимодействии полианион-поликатион в разбавленном растворе из-за экранировки заряда полиионов низкомолекулярными противоионами их взаимодействие осуществляется только при определенных условиях ($N/P > 1$). При достижении этих условий происходит компактизация ДНК с образованием наночастиц сферической или тороидальной формы. Связывание полиионов при этом неравновесно. Иная картина наблюдается при конденсации ДНК, индуцированной олигоионами. Их взаимодействие с ДНК проявляется уже при малых их концентрациях в растворе, причем связывание равновесно. Гидродинамический радиус конденсированных частиц, образующихся при использовании сильно разбавленных растворов ДНК, по данным динамического светорассеяния в равновесии составляет (70 ± 20) нм для поликатионов и (130 ± 30) нм для олигомеров.

Конденсация ДНК, индуцированная поликатионами при $N/P > 1$, протекает быстро (менее 20 с.), размер конденсированных частиц не меняется с течением времени, тогда как при использовании олигопептидов после быстрой конденсации ДНК с образованием частиц такого же размера происходит их дальнейшее укрупнение, которое заканчивается через 250-300 секунд.

Авторы выражают благодарность за частичное финансирование исследований (грант СПбГУ 11.37.290.2015), а также Кононову Алексею Игоревичу за помощь в осуществлении экспериментов по изучению флюоресценции систем.

Список литературы / References:

1. Kasyanenko N., Dribinsky B. Similarities and differences in the influence of polycations and oligomers on DNA conformation and packaging. *Int J Biol Macromol.*, 2016, vol. 86, pp. 216-223.
2. Matthews C., Jenkins G., Hilfinger J., Davidson B. Poly-l-lysine (PLL)-mediated DNA condensation has been studied as a model for DNA compaction to nanoparticles and for the use of DNA nanoparticles for gene delivery applications *Gene Ther.*, 1999, vol. 6, pp. 1558-1564
3. Hansma H.G. DNA collapse by PLL leads to structures of various shapes (i.e. toroids, spheroids, or rods) and sizes, depending on its ratio to DNA and the conditions of the medium *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2001, vol. 52, pp. 71-92.
4. Nayvelt I., Thomas T., Thomas T.J. Mechanistic differences in DNA nanoparticle formation in the presence of oligolysines and poly-l-lysine. *Biomacromolecules*, 2007, vol. 8, pp. 477-484.
5. Mann A., Richa R., Ganguli M. DNA condensation by poly-l-lysine at the single molecule level: role of DNA concentration and polymer length. *J. Control. Release*, 2008, vol. 125, pp. 252-262.
6. Elder R.M., Emrick T., Jayaraman A. Understanding the effect of polylysine architecture on DNA binding using molecular dynamics simulations. *Biomacromolecules*, 2011, vol. 12, pp. 3870-3879.