

УДК 541.64; 577.11

## **ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ (ALA, ARG, HIS И GLU) НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИПЕРРАЗВЕТВЛЁННЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ ЛИЗИНА, РАЗЛИЧИЯ В ФОРМИРОВАНИИ КОМПЛЕКСА С ДНК\***

Скворцова Е.В.<sup>1</sup>, Воробьев В.И.<sup>1</sup>, Тарасенко И.И.<sup>2</sup>, Власов Г.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,*

<sup>2</sup>*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт – Петербург.*

Направленные изменения определённых свойств организма с целью лечения генетически обусловленных заболеваний требуют осторожного подхода, сводя к минимуму биологический риск. Поиски вектора среди полимерных носителей для доставки терапевтических генов важны и перспективны. Необходимо учитывать способность вектора связывать и компактизовать ДНК, обеспечивать проникновение в клетки мишени с целью ядерной транслокации ДНК. Вектор должен защищать ДНК от деградации нуклеазами крови и клетки, быть нетоксичным и неимунногенным. Компоненты, входящие в состав носителя были биосовместимыми и биodeградируемыми. Перспективными представляются поликатионные носители, структура которых близка к сферической.

Таким образом, создание векторов на основе биodeградируемых лизиновых макромолекул различной топологии является перспективным направлением поиска носителей ДНК. Линейные полилизины в комплексе с ДНК отвечают низкому уровню трансфекционной активности, тогда как полилизины с пространственной структурой близкой к сферической имеют более высокие показатели. Новые разработки в области пептидного синтеза гиперразветвлённых полиаминокислот на основе лизина освобождают от трудоёмких и длительных методик и позволяют получать соединения по структуре близкие к лизиновым дендримерам.

Нами были синтезированы и изучены сферические структурно упорядоченные полилизины (рис. 1-А), гиперразветвлённые полилизины (ГРПЛ), модифицированные по концевым аминокетильным группам лизина остатками агинина и гистидина (рис. 1-Б), и топологически неупорядоченные сферические гомо- и гетерополимеры (рис. 1-В). Ряд характеристик изученных носителей ДНК приведен в Таблице.

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 07-04-01072).

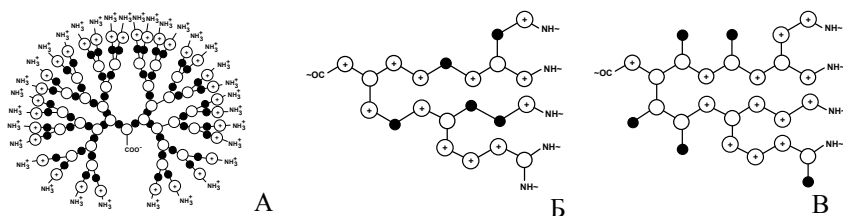


Рисунок 1. Топология строения носителей ДНК. А – дендример, Б – суперразветвленный со вставками, В – суперразветвленный, модифицированный по конечным ε-N-группам. ⊕ - остаток лизина ○ -ε-N-ациллизин ● - аминокислота-модификатор.

Таблица. Биодegradуемые носители ДНК на основе лизина.

Название	Топология	Вставка	X:Lys	Мол. масса, кДа
PL	линейный	нет	-	100 <sup>***</sup>
SPL	суперразветвленный	нет	-	95 <sup>*/100<sup>***</sup></sup>
PLAla-11	со вставками	-Ala-	1.3:1	400 <sup>*</sup>
PLGlu-14	со вставками	-Glu-	1:1	26 <sup>***</sup>
PLArg-17	модифицированный	-Arg-	1:1	100 <sup>***</sup>
PLHis-19	модифицированный	-His-	1:1	110 <sup>***</sup>
PLHis-20	модифицированный	-His-	10:1	600 <sup>***</sup>
D5-His	дендример	-His-	1:1	11.540 <sup>**</sup>

\* ГПХ –метод, \*\* MALDI TOF –метод, \*\*\* Метод светорассеяния

Для изучения вторичной структуры представленных полимеров и их способности взаимодействовать с ДНК был использован метод спектроскопии кругового дихроизма (КД). Метод чувствителен к конформации макромолекул и изменениям вторичной структуры полипептидного носителя и ДНК при их взаимодействии.

Способность пептидной цепи к образованию α-спиральной структуры определяется природой и последовательностью аминокислот. Также в работе чётко показано значение топологии полимера. Суперразветвленные гомо-, гетерополилизины и полилизины модифицированные по конечным аминогруппам в растворах с различными значениями pH изменяют вторичную структуру в зависимости от строения и доли дополнительных аминокислот. Так в кислой и нейтральной среде для PLGlu укладка в α-спиральную структуру составляет 32-40%, противоположный знак заряда Lys и Glu позволяет до 87% остатков свернуться в α-спираль в трифурэтаноле

(ТФЭ). Гетерополимер PLAla, с незаряженной боковой группой укладывается в  $\alpha$ -спираль как в кислой и нейтральной среде, так и при щелочном pH. Полимеры модифицированные Arg и His обладают сильно выраженными основными свойствами, они отдают свои протоны только при очень высоких значениях pH. Модификация дендримера дополнительными аминокислотами не приводит к изменениям структуры, с изменением pH раствора спектр практически остается неизменным, и только в ТФЭ глобула несколько разворачивается, следовательно, заряд аминогрупп в случае дендримеров имеет меньшее значение чем топология.

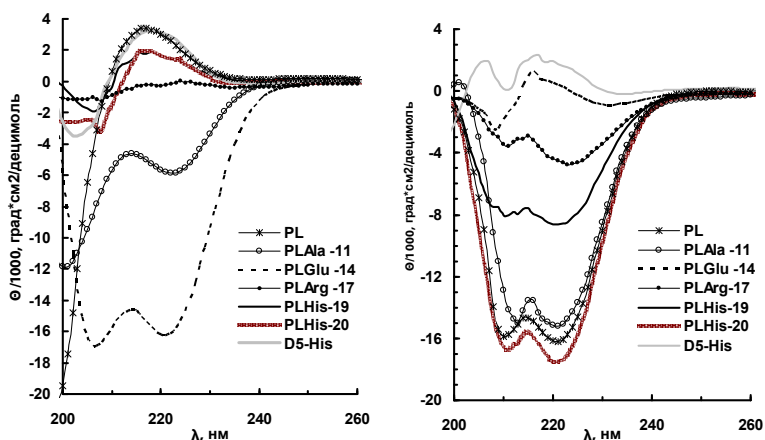


Рисунок 2. Спектры кругового дихроизма в 0.01M HCl (слева) и 0.01M NaOH (справа) полилизинных полимеров

Все изученные нами полипептиды влияют на конформацию ДНК, и это влияние зависит от входного весового соотношения компонентов ( $r$ ) в комплексе. Показано, что с изменением  $r$  происходит изменение конформации обоих компонентов, что свидетельствует об их взаимодействии (рис 3). В некоторых случаях, с ростом содержания пептидного компонента происходят лишь небольшие изменения, которые проявляются в незначительных отклонениях наблюдаемых спектров от теоретической суммы спектров компонентов. В других случаях при увеличении  $r$  сверх некоторого предельного значения происходит образование крупных частиц, быстро осаждающихся при центрифугировании. В таких системах происходит сильное ослабление наблюдаемой оптической активности. В ряде систем наблюдалось

критическое значение  $r$ , при котором агрегация и осаждение комплекса особенно эффективны. При удалении от критического значения  $r$  в обе стороны происходит восстановление типичных для комплексов ДНК-полипептид полос КД (рис. 3, справа).

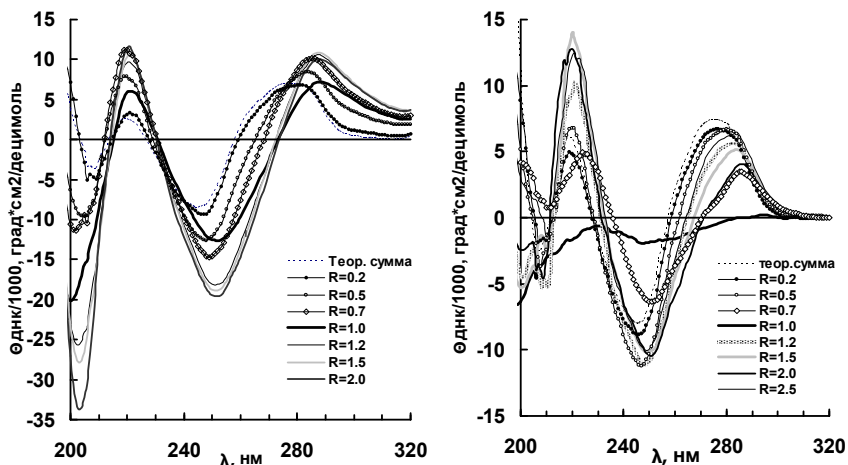


Рисунок 3. Изменение спектров кругового дихроизма при взаимодействии полимера PLHis-19 с ДНК (слева) и дендримера D5-His с ДНК (справа) при различных весовых соотношениях  $r$ . Пунктиром показан спектр, ожидаемый в отсутствие взаимодействия при  $r$  1.0 (теоретическая сумма).

Общий вывод из изучения комплексов ДНК с ГРПЛ: структура ДНК меняется во всех исследованных системах. Эти изменения имеют сложный характер и зависят от природы и топологии носителя, от природы модификаторов. Отмечено и обратное влияние ДНК на потенциальный носитель, наиболее существенное для сополимеров со вставками. Это может быть связано с большей конформационной подвижностью этих носителей по сравнению с дендримерами.

Введение гетерологичных аминокислотных вставок позволяет управлять физико-химическими свойствами лизинового полимера и его ДНК-связывающей активностью. Разработка новых методик синтеза полимеров топологически близких к дендримерам, которые позволяют создавать комплексы с ДНК, имеющий высокую трансфекционную активность приближает нас к созданию полимерного носителя отвечающего установленным требованиям.