



УДК 547.964.4:547.963.32

КАТИОННЫЕ ОЛИГОПЕПТИДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОФИЛЬНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК В КЛЕТКУ

© 2005 г. И. А. Гурьянов^{*,#}, Г. П. Власов^{*}, Е. А. Лесина^{**}, А. В. Киселев^{**},
В. С. Баранов^{**}, Е. В. Авдеева^{***}, В. И. Воробьев^{***}

^{*}Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, Санкт-Петербург, Большой просп., 31;

^{**}Институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург;

^{***}Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 01.08.2003 г. Принята к печати 27.01.2004 г.

Катионные, в том числе амфипатические, α -спиральные олигопептиды используются для целевой доставки ДНК в клетки эукариот. Это связано с их ДНК-компактизирующими свойствами и со способностью вызывать в ряде случаев дестабилизацию липидного бислоя клетки. Для совмещения ДНК-связывающей и мембранной активности в одной молекуле синтезированы пептиды на основе лизина с различным количеством и расположением гидрофобных остатков декановой кислоты, ковалентно присоединенных к остаткам лизина. Пептиды были выбраны со структурой, способствующей формированию α -спирали. Показана зависимость их ДНК-связывающей способности и мембранной активности комплексов ДНК–пептид от строения пептида. Изучение гемолиза эритроцитов под действием комплексов, содержащих ДНК плазмиды рCMV *LacZ*, и особенностей трансфекции этих комплексов обнаружили корреляцию между гемолитической активностью и уровнем экспрессии гена *lacZ* в клетках.

Ключевые слова: катионные α -спиральные олигопептиды; невирусные носители ДНК; гемолиз; трансдукция; трансфекция.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск эффективных методов систематической доставки генов в клетки эукариот является одним из важнейших направлений развития генной терапии [1–4]. Для введения в кДНК клетки маркерных или “терапевтических” генов используются три основных подхода: 1) применение рекомбинантных вирусных векторов, 2) физические методы трансфекции (электропорация, инъекции ДНК, метод “генного ружья” и т. д.) и 3) применение невирусных систем для доставки ДНК в клетку [5, 6]. Носители на основе рекомбинантных вирусов (например, аденовируса (ADV), ретровирусов (RV), вируса герпеса типа 1 (HSV-1)) имеют ряд преимуществ по сравнению с остальными методами из-за их высокой специфичности к определенным типам тканей и способности к эффективной трансфекции, но потенциальная патогенность, возможность сильного иммунного ответа и ограничение в количестве ДНК, которую нужно

упаковать в небольшие частицы, делают необходимым поиск невирусных векторных систем, лишенных этих недостатков и одновременно обладающих некоторыми преимуществами вирусных носителей. Одно из направлений поиска невирусных систем для трансфекции – моделирование способов проникновения в клетку вирусов. Выбор модели обуславливается ее способностью к компактизации трансформирующей ДНК или РНК, к специфическому связыванию с поверхностью клетки, к проникновению через мембранные структуры клетки и наличием сигнала ядерной локализации для активного транспорта в ядро [7–10].

Часто мембраноактивные фрагменты белков вируса являются α -спиральными и амфипатическими [11, 12]. В данной работе для совмещения в одной молекуле комплексобразующих и мембраноактивных свойств был синтезирован ряд пептидов с различным содержанием и расположением остатков гидрофобных аминокислот и лизина, в том числе лизинов, ацилированных остатками декановой кислоты. Была показана зависимость гемолитической активности и степени спиральности пептида от увеличения его гидрофобности. Также была показана способность пептидов к комплек-

Сокращения: Acst – ацетамидометил; Ahx – ϵ -аминокапроновая кислота; DIC – динизопропилкарбодимид; TFA – трифторуксусная кислота; TFE – трифторэтанол.

[#]Автор для переписки (тел.: (812) 323-10-50; эл. почта: iguryanov@mail.ru).

Таблица 1. Структура синтезированных пептидов

Пептид	Структура*	$M_{\text{экс}}$
FP	C(Acm)–Ahx–YKAKKKKKKKWK–NH ₂	1877.1
FP1	C(Acm)–[K(C10)]–Ahx–YKAKKKKKKKWK–NH ₂	2161.6
FP4	C(Acm)–Ahx–WK[K(C10)]KK[K(C10)]KKK[K(C10)]KYK[K(C10)]KK–NH ₂	3063.0

* Acm – ацетамидометил; Ahx – ϵ -аминокапроновая кислота; K(C10) – N^ε-деканойллизин.

сообразованию с ДНК, защите ДНК от нуклеазно-го расщепления, транспорту ДНК в клетку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в ядро клетки чужеродных генов – одна из важных задач генной терапии. Несмотря на все усилия по поиску вирусных систем, переносимых генетический материал в клетки, достичь высокой эффективности вирусной доставки пока не удалось. Искусственный носитель ДНК должен соответствовать ряду требований, в том числе быть способным компактизировать ДНК и переносить ее через мембраны клетки. Часто это достигается применением липосом (липоплекс) [13]. Использование мембраноактивных компактизирующих пептидов может существенно увеличить эффективность трансдукции. Такие пептиды очень часто имеют амфипатическую α -спиральную структуру: одна сторона спирали – гидрофильна, а другая – гидрофобна [14–16]. Подобные структуры образуются при чередовании гидрофильных и гидрофобных аминокислот (положения $i \rightarrow i + 3/4$) [17–19]. Одним из примеров таких пептидов является JTS-1 (GLFEALLELLESLWELLLEA), введение которого в комплекс пептида K-8 (YKAK₈WK) с ДНК резко повышает уровень экспрессии гена люциферазы в клетках HepG2 в 6000 раз [6, 20]. Однако сам по себе JTS-1 не способен связывать ДНК, вследствие отсутствия в нем положительно заряженных групп. В настоящей работе с целью поиска структуры, способной к комплексообразованию с ДНК с одновременным усилением взаимодействия такого носителя с мембраной клетки [21], был синтезирован ряд пептидов с различным содержанием и расположением неприродных гидрофобных остатков (табл. 1). Для возможности дальнейшей модификации пептидов через сульфгидрильную группу в качестве N-концевых использовались остатки цистеина, отделенные от основной последовательности остатком ϵ -аминокапроновой кислоты.

На примере мастопорана было показано [17], что введение одного гидрофобного остатка в пептидную цепь не только не мешает взаимодействию пептида с нуклеиновой кислотой, но и может способствовать появлению у пептида способности к компактизации. Оптимальным в указанном случае оказалось введение остатка каприновой

(декановой) кислоты – дальнейшее увеличение длины гидрофобного радикала не приводило к существенному увеличению связывающей способности. Кроме того, с увеличением длины гидрофобного радикала можно ожидать ухудшения растворимости соединения в воде. Поэтому для модификации катионных пептидов в данной работе была выбрана декановая кислота в виде N^ε-ацильного заместителя отдельных остатков лизина.

Доказательства чистоты (ВЭЖХ) и подтверждения строения синтезированных пептидов с помощью масс-спектрометрии приведены на рис. 1, 2.

Изучение структуры пептидов методом КД.

Для изучения структурных характеристик синтезированных пептидов были проведены измерения спектров КД в различных условиях (рис. 3). Как видно из приведенных результатов (табл. 2), по мере увеличения гидрофобности пептидов происходило увеличение их спиральности, однако в кислой среде структура становилась неупорядоченной вследствие отталкивания положительных зарядов ϵ -аминогрупп лизина. У JTS-1, напротив, в кислой среде происходила нейтрализация отрицательных зарядов глутаминовой кислоты и содержание α -спирали увеличивалось. Максимально спирализованными пептиды становились в 80%-ном трифторэтанол, который по своим диэлектрическим свойствам близок мембранам клетки и часто используется для изучения конформационных характеристик пептидов в гидрофобном окружении. Таким образом, вследствие высокого содержания α -спирали и гидрофобности можно предположить значительную мембранную активность пептидов, модифицированных остатками декановой кислоты.

Гемолитическая активность пептидов. Важным фактором, влияющим на проникновение ДНК с но-

Таблица 2. Содержание (в процентах) α -спиральных участков в структуре пептидов в различных средах

Пептид	0.01 н. NaOH	0.01 н. HCl	80% TFE
FP	8	Неупоряд.	25
FP1	25	Неупоряд.	70
FP4	27	Неупоряд.	63
JTS-1	15	45	70

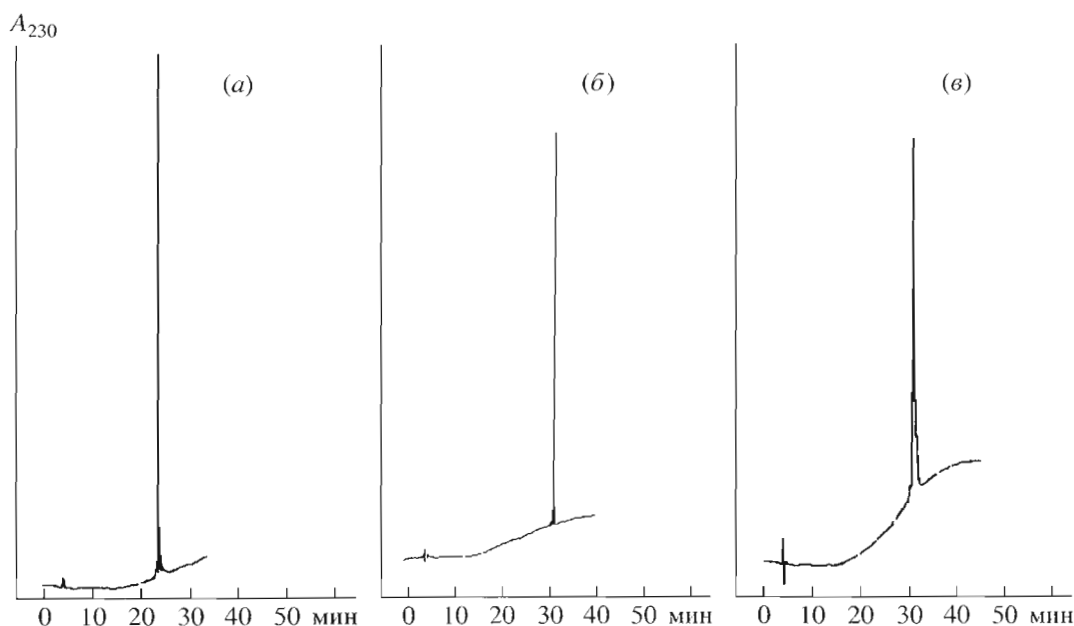


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖХ синтезированных пептидов FP (а), FP1 (б), FP4 (в). Колонка Nucleosil C18, 4,6 × 150 мм, элюент: вода–ацетонитрил–0.1% TFA, скорость 1 мл/мин, детекция при 230 нм. Градиент ацетонитрила 10–40% (а, б), 30–60% (в) за 25 мин.

сителем в клетку, является его эндосомолитическая способность, то есть способность к проникновению через мембраны эндосом в цитоплазму клетки. В качестве модели биологических мембран были выбраны мембраны эритроцитов. Гемолитическая активность находилась в зависимости от гидрофобности пептидов и pH среды (рис. 4). С увеличением гидрофобности гемолитическая активность возрастала: FP4 ≈ JTS-1 > FP1 > FP. При этом пептид FP на мембраны эритроцитов влияния не оказывал. Пептиды FP4 и JTS-1 показали максимальную активность, которая проявлялась при значениях pH среды, не вызывающих их агрегацию за счет уменьшения зарядов на остатках глутаминовой кислоты и лизина. С уменьшением концентрации пептида JTS-1, в отличие от FP4, его гемолитическая активность возрастала, а затем резко падала [6]. В то же время на активность FP1 значение pH среды влияния не оказывало. Таким образом, обнаруживается корреляция между гемолитической активностью и содержанием в пептиде α-спиральной конформации, которую, как показывают данные спектров КД, пептиды приобретают в гидрофобном окружении, в том числе, по-видимому, и при взаимодействии с эритроцитарной мембраной. У гидрофобных пептидов можно ожидать гораздо более сильного взаимодействия с мембранами клетки и внутриклеточными структурами по сравнению с пептидом, не модифицированным остатками декановой кислоты, и наличие у пептида FP4 pH-зависимой мембранной активности, которая близка мембранной активности JTS-1, вероятно, должно

способствовать более легкому освобождению комплекса из эндосом клетки.

Образование комплексов пептидов с ДНК. Способность пептидов к связыванию ДНК была исследована с помощью гель-электрофореза комплексов ДНК–пептид с различным молярным соотношением компонентов (метод гель-ретардации) [22]. Электрофоретическая подвижность при увеличении количества пептида в комплексе постепенно уменьшалась (рис. 5). Полная задержка плазмиды в случае пептидов FP и FP1 происходила уже при зарядовом соотношении ДНК–пептид 1 : 1 и 1 : 0.5 соответственно. Причем для FP1 наблюдалось увеличение плотности комплексов при возрастании содержания носителя в комплексе, о чем свидетельствовало практически полное исчезновение флуоресценции связанного с ДНК бромистого этидия в лунках геля. В случае FP4 полная задержка ДНК происходила при зарядовом соотношении ДНК–пептид 1 : 0.7.

Защита ДНК в составе комплекса с амфипатическими пептидами от действия ДНКазы I. Полная защита плазмиды от действия гидролитических ферментов происходит при более высоком содержании синтезированных пептидов в комплексе, чем необходимо для полной компактизации ДНК. Это было показано при изучении устойчивости плазмидной ДНК в составе комплексов ДНК–FP, ДНК–FP1 и ДНК–FP4 к действию ДНКазы I (рис. 6). Эффективная защита плазмидной ДНК носителем FP от действия фермента наблюдалась начиная с зарядо-

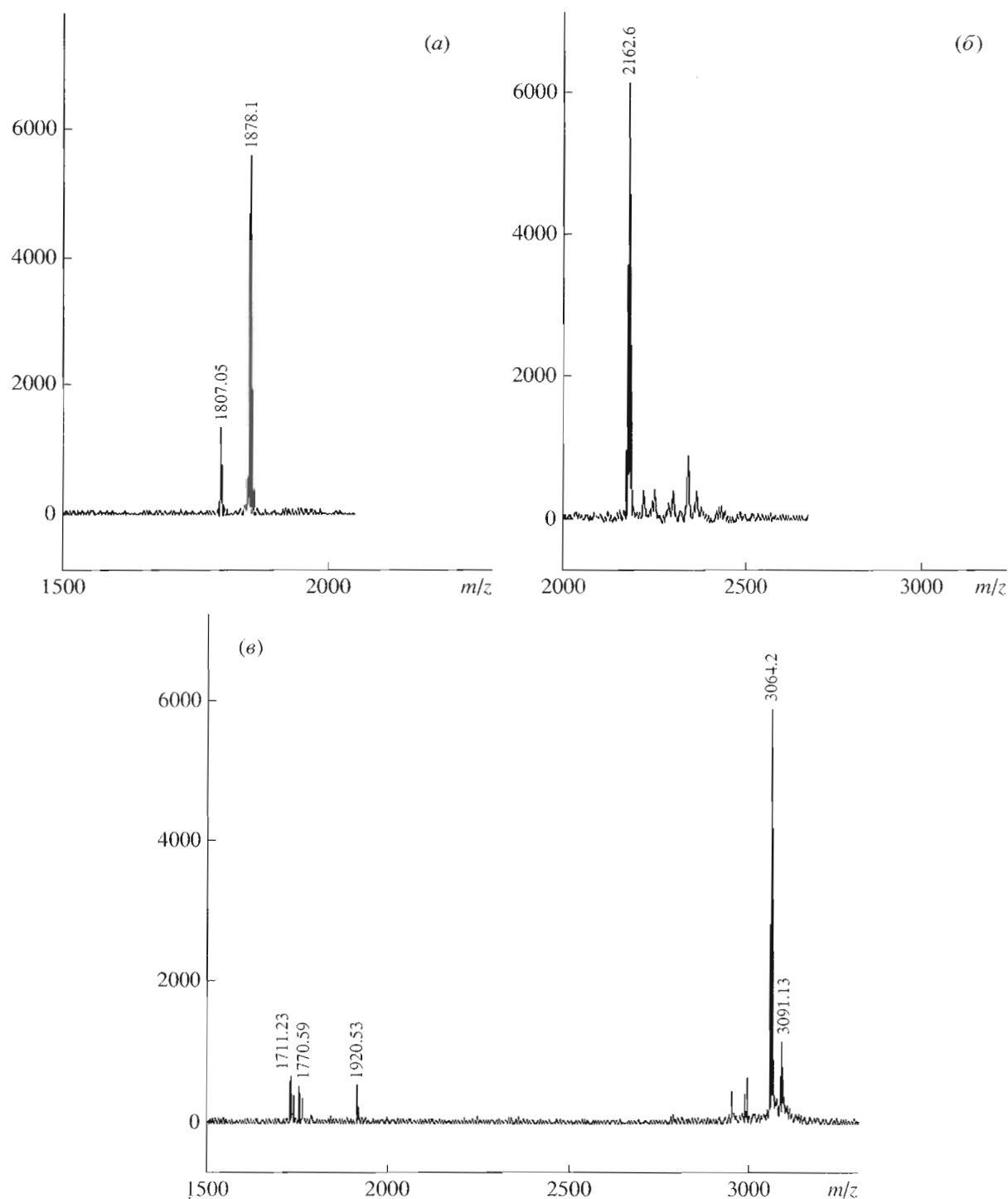


Рис. 2. Спектры MALDI TOF синтезированных пептидов – FP (а); FP1 (б); FP4 (в) в воде, pH 6.4.

вого соотношения 1 : 1.4. При зарядовом соотношении 1 : 0.7, помимо конформационных форм, характерных для интактной плазмиды, в геле можно было видеть фрагменты гидролизованной ДНК, что свидетельствует о ее частичном распаде. Пептиды FP1 и FP4 достаточно эффективно защищали ДНК начиная с соотношения 1 : 0.7.

Эффективность трансформации клеток комплексами ДНК–FP, ДНК–FP1, ДНК–FP4. Изучение эффективности трансформации клеток комплексами пептидов FP, FP1 и FP4 с маркерным геном *lacZ* (плазмида pCMV*lacZ*) было проведено в каждом случае при соотношениях ДНК–носитель, близких к соотношениям, соответствующих максимальной защите ДНК от действия ДНКазы I

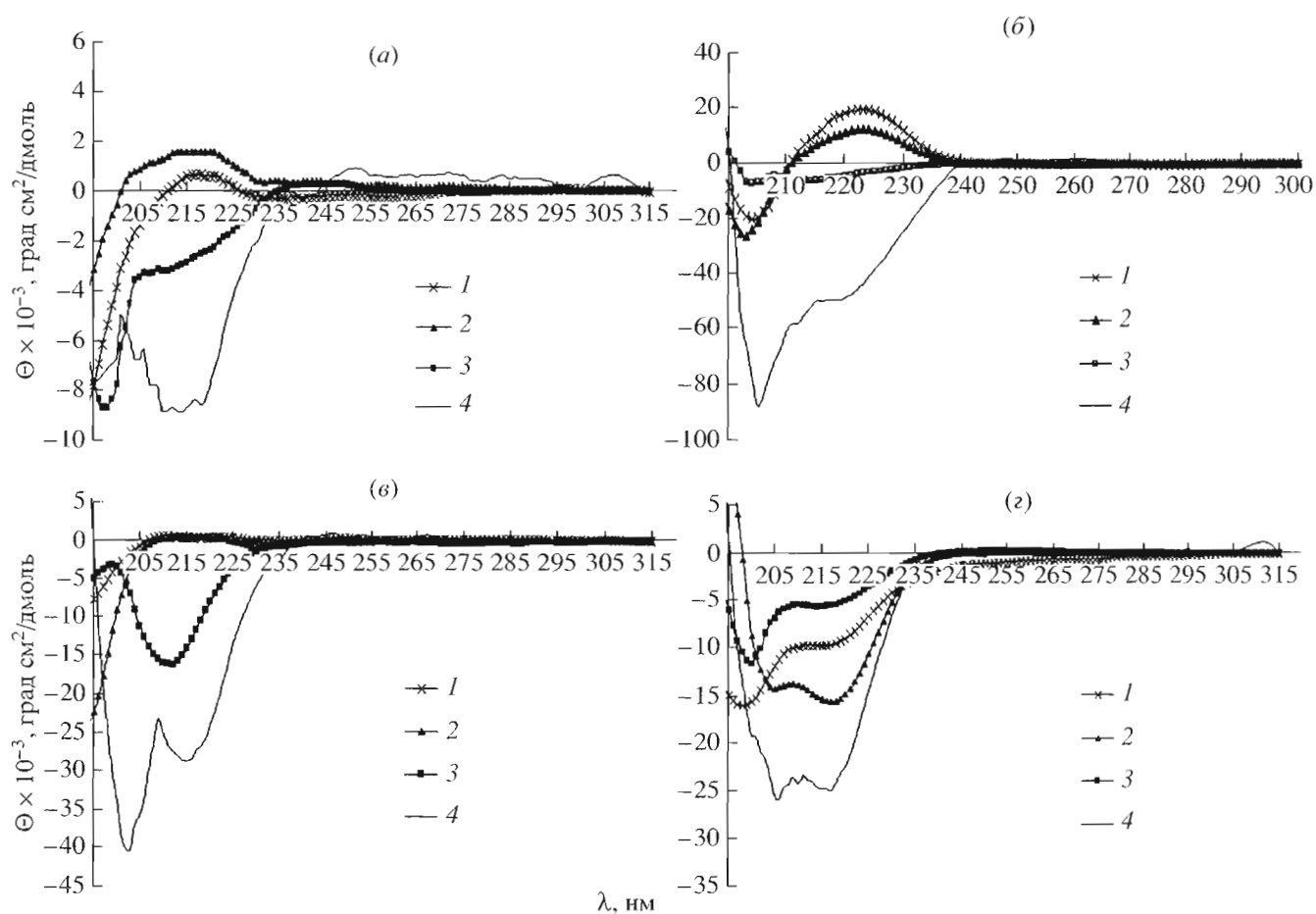


Рис. 3. Спектры КД пептидов FP (а), FP1 (б), FP4 (в), JTS-1 (г) в воде, pH 6.4 (1), HCl, pH 3.0 (2), NaOH, pH 10.0 (3), 80% TFE (4).

(рис. 7). По результатам анализа было показано, что эффективность трансформации, обеспечиваемая пептидом-носителем FP, составляет менее 0.01% и достоверно не отличается от эффекта введения нативной ДНК. Максимальная эффективность трансформации с использованием пептида FP1 достигалась при зарядовом соотношении ДНК-носитель 1 : 2.8 и составляла около $0.34 \pm \pm 0.05\%$ клеток. Наиболее эффективным зарядовым соотношением ДНК-FP4 было 1 : 1.4, которое обеспечивало экспрессию в $3.61 \pm 0.7\%$ клеток. Таким образом, введение в структуру пептида четырех остатков декановой кислоты существенно увеличило уровень экспрессии плазмиды, что может быть объяснено достаточно высокой скоростью освобождения комплексов из эндосом клеток вследствие наличия собственной мембранной активности данного пептида.

Для исследования эндосомолитических свойств пептидов FP1 и FP4 был проведен ряд трансформаций клеток *in vitro* комплексами ДНК-пептид в присутствии хлорокина, действие которого заключается в основном в нарушении процесса закисления эндосом и тем самым в препятствии дей-

ствию гидролитических ферментов. Обработка клеток хлорокином позволяет более полно проявиться собственным мембраноактивным свойствам носителя. В результате экспериментов было показано, что присутствие хлорокина увеличивает эффективность трансфекции комплексом ДНК-FP1 с $0.08 \pm 0.02\%$ до $5.15 \pm 0.31\%$. На эффективность трансфекции комплексом ДНК-FP4 хлорокин, напротив, действия почти не оказал. Содержание трансфицированных клеток осталось практически тем же.

На основании полученных результатов можно предположить наличие у пептида-носителя FP4 собственных эндосомолитических свойств, которые выражены значительно более ярко по сравнению с пептидом FP1, что согласуется с результатами экспериментов по гемолизу эритроцитов. Вследствие близости гемолитических свойств пептидов FP4 и JTS-1 можно сделать вывод о близости их эндосомолитических свойств. Однако, в отличие от JTS-1, FP4 может компактизовать ДНК и защищать ее от действия гидролитических ферментов, присутствующих в эндосомах и лизосомах клетки.

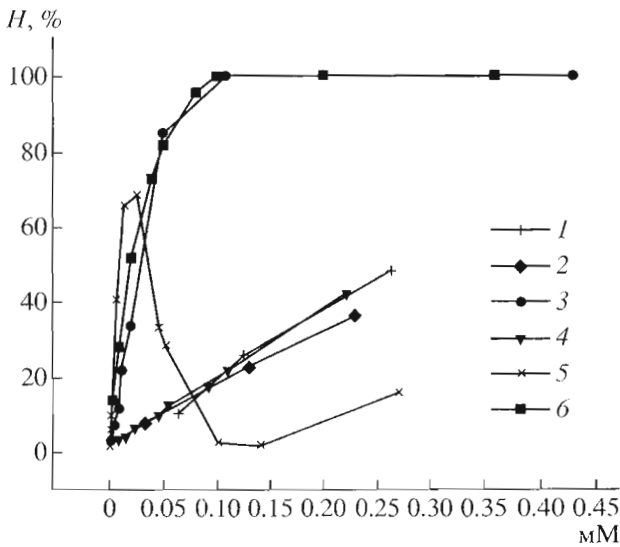


Рис. 4. Гемолитическая активность пептидов: FP1 (1, 2); FP4 (3, 4); JTS-1 (5, 6) при pH 5.0 (1, 3, 5) и pH 7.8 (2, 4, 6).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали производные *L*-аминокислот, диизопротилкарбодимид (DIC), трифторуксусную кислоту, трифторметансульфо кислоту, тиаунизол, этандитиол, 1-гидроксибензотриазол (HOBT) производства Fluka (Германия), 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -*D*-галактопиранозил (X-gal) производства Sigma (США), ДНКазу I (Promega, США), хлорокин, протеиназу К (Sigma, США), Escort TM (Promega, США). Растворители ОАО “Вектон” (Санкт-Петербург) очищены перед использованием. Эксперименты по трансформации *in vitro* проводили на клеточных культурах эпителиальной карциномы человека HeLa (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Культивирование проводили на среде RPMI 1640 (ООО “Биолот”, Санкт-Петербург), содержащей сыворотку крови эмбрионов коров (ООО “Биолот”, Санкт-Петербург) и

антибиотик гентамицин (ОАО “Дальхимфарм”, Хабаровск).

В экспериментах по компактизации ДНК, защите от ферментативного расщепления и трансформации плазмиды использовали плазмидную ДНК рCMVlacZ, любезно предоставленную д-ром Шольтом (Университет им. Эразма Роттердамского, Роттердам, Нидерланды). Изучение комплексообразования методом КД проводили с использованием ДНК тимуса теленка с молекулярной массой 8.6 МДа (Serva, Германия).

Оборудование. Пептиды синтезировали на полуавтоматическом пептидном синтезаторе NPS 4000 (Neosystem Laboratories, Франция) на *n*-метилбензгидриламиновой смоле (Neosystem Laboratories, Франция). При очистке пептидов с помощью гель-хроматографии использовали BioGel P2 (BIORAD Laboratories, США), детекцию осуществляли на спектрометре 2138 Uvicord S (Прага). Для дальнейшей очистки продуктов использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ на приборе Waters 600E (США) на колонке Vydac C-18 4.6 \times 150 мм (аналитическое разделение) и Vydac C-18 22 \times 250 мм (Supelco, США) (препаративное разделение). Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе ААА Т339 М (Microtechna, Прага, Чехословакия). Для проведения ТСХ использовали пластинки Silufol (Kavalier, Чехословакия).

Масс-спектрометрический анализ пептидов (MALDI TOF) проводили на приборе “Voyager-DE” (США) с использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Государственный политехнический университет, Санкт-Петербург). Спектры КД получали на дихрографе “Mark V” (Gobin Ivan, Франция). Подсчет клеток в экспериментах по трансформации проводили с использованием светового микроскопа Karl Zeiss (Германия).

Синтез пептидов. *N*^ε-Деканоил-*N*^α-трет-бутил-оксикарбониллизин. К раствору 1.7 г (0.01 моль) декановой кислоты и 2 г (0.011 моль) пентафторфенола в 25 мл хлороформа и при охлаждении льдом добавляли раствор 2.3 г (0.011 моль)

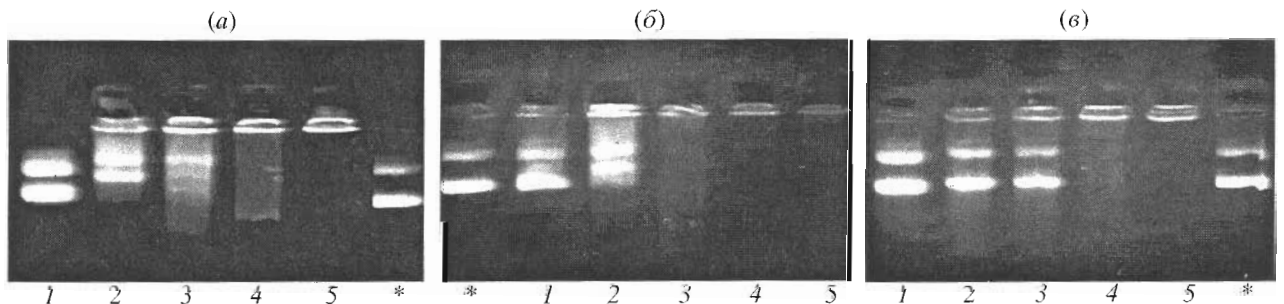


Рис. 5. Оценка эффективности связывания плазмиды рCMVlacZ с пептидами: электрофорез в 0.8% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0.5 мкг/мл), комплексов с пептидами FP (а), FP1 (б), FP4 (в) при зарядовых соотношениях ДНК-пептид: 1 : 0.1 (1); 1 : 0.3 (2); 1 : 0.5 (3); 1 : 0.7 (4); 1 : 1 (5). Звездочкой отмечена интактная ДНК.

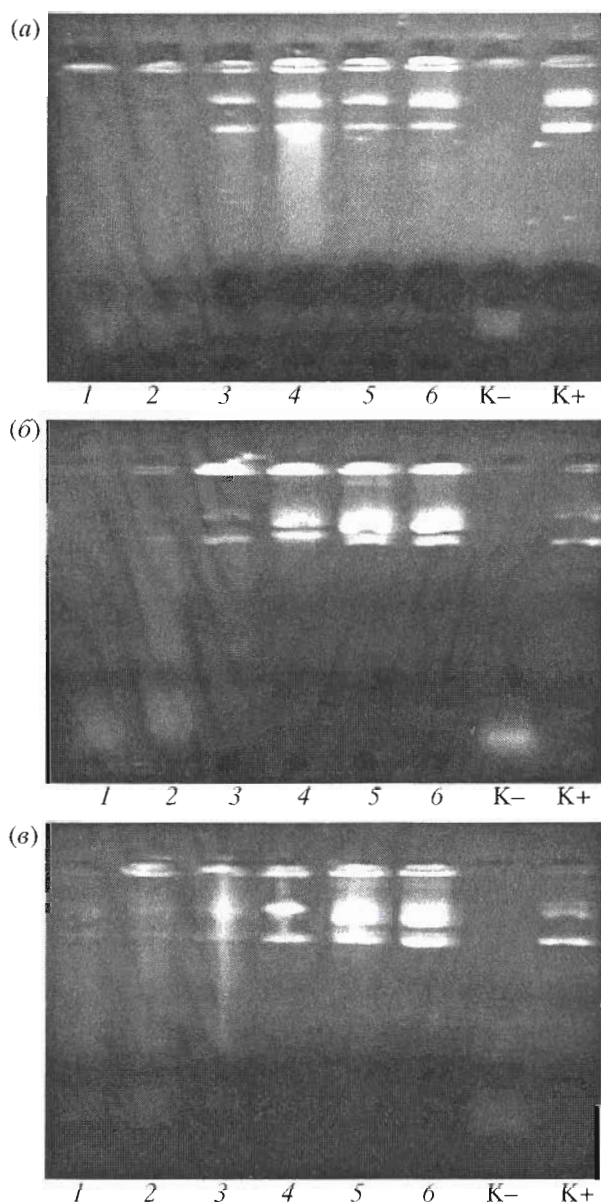


Рис. 6. Эффективность защиты плазмидной ДНК от ДНКазы I с помощью пептидов FP (а), FP1 (б), FP4 (в). Соотношения ДНК–пептид: 1 – 1 : 0.2; 2 – 1 : 0.4; 3 – 1 : 0.5; 4 – 1 : 0.7; 5 – 1 : 1.4; 6 – 1 : 2.8; К– – без пептида; К+ – интактная ДНК.

N,N'-дициклогексилкарбодиимида в 15 мл хлороформа. Через 3 ч к реакционной смеси добавляли несколько капель уксусной кислоты, раствор фильтровали от *N,N'*-дициклогексилмочевины и упаривали в вакууме.

К раствору пентафторфенилового эфира декановой кислоты в 25 мл DMF добавляли 2.5 г (0.01 моль) α -*трет*-бутилоксикарбониллизина и 2 мл триэтиламина. Через 24 ч раствор разбавляли 200 мл 1 н. серной кислоты и продукт экстрагировали этилацетатом. Затем этилацетатный раствор дважды промывали водой, сушили над

безводным сульфатом натрия и упаривали. Выход 3.7 г R_f 0.62 (в системе хлороформ–метанол–уксусная кислота, 85 : 10 : 5) и 0.4 (петролейный эфир–этилацетат, 1 : 3).

Твердофазный синтез пептидов проводили с помощью Вос-стратегии с использованием *пара*-метилбензгидриламиновой смолы в качестве полимерного носителя, *N,N'*-диизопропилкарбодиимида/NOBt в качестве конденсирующего агента и трифторуксусной кислоты на стадии деблокирования. В расчете на 1 г смолы (емкость 0.5 ммоль/г) использовали следующий протокол: (1) деблокирование: 65% TFA, хлористый метилен (2×10 мл) 1 мин, 15 мин соответственно; (2) промывка: хлористый метилен (3×10 мл), DMF (2×10 мл); (3) депротонирование: 10% TEA, 1 мин, DMF (2×10 мл) 2 мин; (4) промывка: DMF (2×10 мл); (5) конденсация: Вос-аминокислота (1.5 ммоль), диизопропилкарбодиимид (1.5 ммоль), 1 М раствор NOBt в DMF (1.5 мл); (6) промывка: DMF (2×10 мл), хлористый метилен (2×10 мл); нингидриновый тест. При неполной конденсации (наличие положительной нингидриновой реакции) протокол повторяли с этапа (3). Полное деблокирование и снятие пептида с полимера проводили с использованием трифторметансульфоуксусной кислоты (1 мл) в TFA (10 мл) в присутствии 1 мл тиоанизола и 0.5 мл этандитиола в течение 1 ч при охлаждении льдом и 1.5 ч без охлаждения. Затем добавляли 100 мл диэтилового эфира и выпавший осадок отфильтровывали. Полученный пептид растворяли в 30 мл TFA, фильтровали для удаления смолы и высаживали в 200 мл сухого диэтилового эфира. Нонадекапептид JTS-1 получали согласно методике [20]. Предварительную очистку пептидов проводили с помощью гель-хроматографии на колонке (600 \times 25 мм) с BioGel P2 (Pharmacia, США), элюент – 6% раствор уксусной кислоты в воде, детекция при 226 нм.

Дальнейшую очистку осуществляли препаративной ВЭЖХ, элюент А – 0.1% водный раствор TFA, элюент В – раствор ацетонитрила в элюенте А, скорость элюции – 1 мл/мин при аналитической ВЭЖХ, 10 мл/мин в препаративном выделении. Чистота полученных пептидов составляла >95%. Структура полученных пептидов была подтверждена масс-спектрометрически и аминокислотным анализом.

Определение гемолитической активности (аналогично работе [6]). Эритроциты человека были выделены из свежей крови путем центрифугирования при 1500 об/мин на центрифуге Janetzki (Германия) в присутствии 3.8% цитрата натрия, промыты трижды 0.9% раствором хлорида натрия. В каждом эксперименте пептид растворяли в выбранной концентрации в 0.15 мл буферного раствора: 0.01 М Na_2HPO_4 , 1.6 мМ NaH_2PO_4 , 0.15 М NaCl, pH 5.0 или 7.8. Затем добавляли 10 мкл суспензии эритроцитов. Смесь инкубировали при 37°C течение 1 ч при периодическом встряхивании. Степень гемолиза

определяли по изменению поглощения (λ 492 нм) супернатанта после отделения клеток центрифугированием. За 0% гемолиза принимали поглощение после инкубации эритроцитов в буферном растворе, за 100% – в воде. Приведенные данные являются усредненным результатом трех независимых измерений.

Спектроскопия КД. КД-спектры были получены при комнатной температуре. Измерения проводили в интервале длин волн от 195 до 320 нм. Рабочая концентрация раствора пептида – 30 мкг/мл. Для снятия спектров использовали кюветы с длиной оптического пути 1 см или 0.2 см. Оценку конформационного состояния пептидов производили с помощью программы CDNN V2.1 (разработана Д. Бом, Институт биотехнологии, Виттенберг, Германия).

Получение комплексов пептид–ДНК плазмиды рСМVlacZ. Изучение их устойчивости методом гель-ретардации. К 20 мкл водного раствора, содержащего 1 мкг плазмидной ДНК, постепенно добавляли 20 мкл раствора, содержащего различные количества пептида. После 1-часовой инкубации образовавшиеся комплексы анализировали методом гель-ретардации (по уменьшению электрофоретической подвижности ДНК в 0.8% агарозном геле, содержащем 2.7 мкл бромистого этидия на 400 мг сухой агарозы). Данные (рис. 5) являются результатом двух независимых экспериментов.

Анализ устойчивости плазмидной ДНК в комплексах с пептидами к гидролизу нуклеазами. Для каждого из синтезированных пептидов-носителей было проведено сравнение эффективности защиты от гидролиза ДНКазой I плазмидной конструкции рСМVlacZ в составе комплексов с пептидами при различном зарядовом соотношении ДНК–пептид. К растворам комплексов добавляли 0.1 ед. акт. ДНКазы I и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Инактивацию ДНКазы I проводили при 70°C в течение 15 мин. Затем комплекс обрабатывали протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией [23]. Состояние ДНК оценивали с помощью гель-электрофореза. В качестве отрицательного контроля (К–) использовали обработанную ДНКазой I некомпактизованную ДНК. В качестве положительного контроля (К+) использовали нативную плазмидную ДНК. Данные являются результатом двух независимых экспериментов.

Оценка эффективности трансформации клеток комплексами пептид–ДНК плазмиды рСМV LacZ (рис. 6). Клетки рассеивали в 24-луночные планшеты за 24 ч до трансфекции комплексов из расчета 15000 клеток на лунку с 1 мл стандартной культуральной смеси (среда RPMI, сыворотка эмбрионов коров FBS 10%, гентамицин 0.01 мкг/мл). За 10 мин до внесения суспензии комплексов ДНК–пептид клетки промывали средой RPMI и

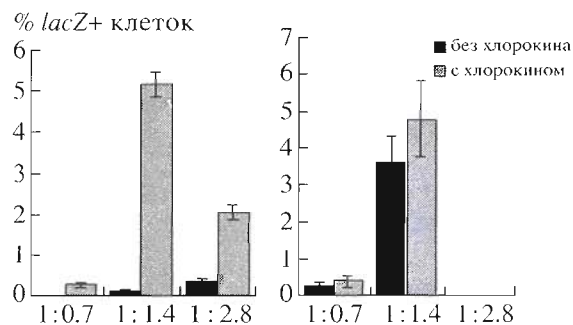


Рис. 7. Зависимость эффективности трансфекции клеток HeLa от зарядовых соотношений ДНК/FP1 и ДНК/FP4.

вносили 500 мкл среды RPMI без сыворотки в лунку. Трансформацию клеток проводили путем добавления в среду 200 мкл суспензии комплексов ДНК–носитель, содержащих 5 мкг ДНК. При проведении трансформации в присутствии хлорокина его концентрация составляла 100 мкМ. Смесь аккуратно перемешивали и планшеты с клетками помещали в термостат с температурой 37°C и 5%-ным содержанием CO₂ на 2 ч. Затем клетки промывали средой RPMI и вносили 1 мл стандартной культуральной смеси в лунку. В качестве положительного контроля использовали плазмидную ДНК, компактизованную коммерческим носителем EscortTM. В качестве отрицательного контроля использовали нативную ДНК.

Через 48 ч после введения комплексов измеряли активность β -галактозидазы следующим образом. Клетки на культуральных планшетах фиксировали 0.5%-ным глутаровым альдегидом в PBS (состав PBS – 1.7 мМ КН₂РО₄, 5.2 мМ Na₂НРО₄, 150 мМ NaCl, pH 7.5), промывали PBS, содержащим 2 мМ MgCl₂, затем раствором детергента (0.01% дезоксихолат натрия, 0.02% Nonidet P-40, 2 мМ MgCl₂), после чего инкубировали 16 ч в смеси X-gal (2 мг/мл), K₃Fe(CN)₆ (5 мМ), K₄Fe(CN)₆ (5 мМ), MgCl₂ (2 мМ) в PBS. Затем планшеты промывали PBS и анализировали на фазово-контрастном световом микроскопе. Наличие β -галактозидазы в ядрах трансфицированных клеток определяли по специфическому фиолетовому окрашиванию. Критерием эффективности трансфекции комплексов пептидов с ДНК являлась доля клеток, экспрессирующих бактериальную β -галактозидазу. Данные по активности β -галактозидазы являются результатом трех независимых экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате синтеза и исследования ряда пептидов с различным содержанием и расположением остатков гидрофобных аминокислот и лизина, в том числе лизинов, модифицированных остатками декановой кислоты, было показано, что способность к

трансфекции ДНК возрастает по мере увеличения количества остатков декановой кислоты в их составе. Наиболее перспективным представителем исследованной группы в настоящее время представляется пептид FP4, обладающий выраженной эндосомолитической активностью. Дальнейшая модификация пептида FP4 (введение сигнала ядерной локализации, лиганда для направленного транспорта к определенным типам клеток) должна способствовать увеличению его эндосомолитических и трансфекционных свойств и, по-видимому, поможет существенно увеличить уровень экспрессии гена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Garipey J., Kawamura K.* // Trends in Biotechnology. 2001. V. 19. P. 21–28.
2. *Singh D., Kiarash R., Kawamura K., LaCasse E.C., Garipey J.* // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 5798–5809.
3. *Morris M.C., Chaloin L., Heitz F., Divita G.* // Current Opinion in Biotechnology. 2000. V. 11. P. 461–466.
4. *Niidome T., Anzai Sh., Sonoda J., Tokunaga Y., Nakahara M., Hatakeyama T., Aoyagi H.* // J. Pep. Sci. 1999. V. 5. P. 298–305.
5. *Singh D., Bisland S.K., Kawamura K., Garipey J.* // Bioconjug. Chem. 1999. V. 10. P. 745–754.
6. *Duguid J.G., Li C., Shi M., Logan M.J., Alila H., Rolland A., Tomlinson E., Sparrow J.T., Smith L.C.* // Biophysical J. 1998. V. 74. P. 2802–2814.
7. *Rittner K., Benavente A., Bombard-Sorlet A., Heitz F., Divita G., Brasseur R., Jacobs E.* // Molecular Therapy. 2002. V. 5. P. 104–114.
8. *Vaysse L., Arveiler B.* // Bioch. Biophys. Acta. 2000. V. 1474. P. 244–250.
9. *Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Garipey J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2056–2060.
10. *Zelphati O., Uyechi L.S., Barron L.G., Szoca F.C.* // Bioch. Biophys. Acta. 1998. V. 1390. P. 119–133.
11. *Nir Sh., Nieva J.* // Progress in Lipid Research. 2000. V. 39. P. 181–206.
12. *Liu L.-P., Li Sh.-Ch., Goto N.K., Deber Ch.M.* // Biopolimers. 1996. V. 39. P. 465–470.
13. *Scott E.S., Wiseman J.W., Evans M.J., Colledge W.H.* // J. Gene Medicine. 2001. V. 3. P. 125–134.
14. *Niidome T., Urakava M., Takaji K., Matsuo Y., Ohmori N., Wada A., Hirayama T., Aoyagi H.* // J. Peptide Res. 1999. V. 54. P. 361–367.
15. *Deber Ch.M., Li Sh.-Ch.* // Biopolimers. 1995. V. 37. P. 295–318.
16. *Cornut I., Buttner K., Dasseux J.-L., Dufourcq J.* // FEBS Lett. 1994. V. 349. P. 29–33.
17. *Ohmori N., Niidome T., Hatakeyama T., Mihara H., Aoyagi H.* // J. Peptide Res. 1998. V. 51. P. 103–109.
18. *Niidome T., Wakamatsu M., Wada A., Hirayama T., Aoyagi H.* // J. Pep. Sci. 2000. V. 6. P. 271–279.
19. *Marqusee S., Baldwin R.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 8898–8902.
20. *Gottschalk S., Sparrow J.T., Hauer J., Mims M.P., Leland F.E., Woo S.L.C., Smith L.C.* // Gene Therapy. 1996. V. 3. P. 448–457.
21. *Huang Ch.-Y., Uno T., Murphy J.E., Lee S., Hamer J.D., Escobedo J.A., Cohen F.E., Radhakrishnan R., Dwariki V., Zuckermann R.N.* // Chemistry & Biology. 1998. V. 5. P. 345–354.
22. *Ohsaki M., Okuda T., Wada A., Hirayama T., Niidome T., Aoyagi H.* // Bioconjug. Chem. 2002. V. 13. P. 510–517.
23. *Маниатис Е., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.

Cationic Oligopeptides Modified with Lipophilic Fragments: Use for DNA Delivery to Cells

I. A. Gur'yanov[#], G. P. Vlasov^{*}, E. A. Lesina^{}, A. V. Kiselev^{**},
V. S. Baranov^{**}, E. V. Avdeeva^{***}, and V. I. Vorob'ev^{***}**

[#]Phone: +7 (812) 323-1050; e-mail: iguryanov@mail.ru

^{*}Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi prosp. 31, St. Petersburg, 119004 Russia

^{**}Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences,
St. Petersburg, 199034 Russia

^{***}Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

Cationic oligopeptides, including the amphipathic α -helical peptides, are applied to the targeted delivery of DNA to eukaryotic cells due to their DNA-compacting properties and the ability to destabilize the cell lipid bilayer in some cases. We synthesized the peptides differing in the number and location of residues of decanoic acid covalently attached to Lys residues in order to combine the DNA-binding and the membrane activities in a single molecule. We chose peptide structures that assisted in the formation of α -helices. The DNA-binding ability of the peptides and the membrane activity of their complexes with DNA were shown to depend on the structure. The study of erythrocyte hemolysis by complexes with DNA of the pCMV *LacZ* plasmid and the peculiarities of transfection of these complexes revealed a correlation between the hemolytic activity and the expression level of the *lacZ* gene in the cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cationic α -helical oligopeptides, hemolysis, nonviral DNA carriers, transduction, transfection