



УДК 577.113.6

КОМПОЗИТЫ ПЕПТИДО-НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ТИТАНА. I. СОЗДАНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДНК/ПНК-ДУПЛЕКСЫ, И ДОСТАВКА ИХ В КЛЕТКИ HeLa

© 2012 г. Н. В. Амирханов*, **, Р. Н. Амирханов*, **, В. Ф. Зарытова*, **, #

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

**Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 10.02.2012 г. Принята к печати 12.05.2012 г.

С целью исследования возможности использования TiO_2 -наночастиц для транспортировки пептидо-нуклеиновых кислот (ПНК) в эукариотические клетки был осуществлен синтез олигомера ПНК и разработан метод иммобилизации ПНК в виде гибридного ДНК/ПНК-дуплекса на TiO_2 -наночастицах, покрытых полилизин (PL), с образованием наноконструкта $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК/ПНК}$. Связывание ДНК/ПНК-дуплекса с $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -наночастицами осуществлено за счет электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными аминогруппами PL. Удержание ПНК в составе наноконструкта осуществлено за счет нековалентных Уотсон-Криковских взаимодействий между ПНК и комплементарной ДНК. Емкость полученных наноконструктов, в зависимости от условий иммобилизации, составляла 10–30 нмоль ПНК на 1 мг частиц TiO_2 , что соответствовало ~1–3 молекулы ПНК на одну частицу TiO_2 размером 5–6 нм. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано, что флуоресцеин-меченные ПНК ($^{\text{Flu}}$ ПНК) в составе наноконструкта $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/^{\text{Flu}}$ ПНК способны без использования специальных трансфекционных агентов, электропорации или других вспомогательных процедур эффективно проникать в клетки HeLa и удерживаться в них.

Ключевые слова: наночастицы; диоксид титана; пептидо-нуклеиновые кислоты, доставка в клетки; полилизин; конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) являются аналогами нуклеиновых кислот (НК), в которых сохранены нуклеиновые основания, а сахарофосфатный остов НК заменен псевдопептидной цепью, построенной из повторяющихся единиц *N*-(2-аминоэтил)глицина [1]. ПНК, в отличие от ДНК или РНК, имеют незаряженный скелет, поэтому формируемые ими в физиологи-

ческих условиях ПНК/ДНК- или ПНК/РНК-дуплексы более стабильны, по сравнению с аналогичными ДНК/ДНК- или ДНК/РНК-дуплексами [1–3]. ПНК устойчивы к действию нуклеаз и протеаз [4, 5]. Такие свойства ПНК делают их перспективными соединениями в качестве геннаправленных лекарственных препаратов. Однако сами по себе ПНК плохо проникают через клеточные мембраны [2, 6], и это одна из причин того, что они до сих пор не используются в медицине.

Для внедрения НК и их аналогов в клетки используют различные вирусные и невирусные способы доставки. Вирусные способы доставки, хотя и являются наиболее эффективными на сегодняшний день, однако обладают рядом недостатков, основной из которых это индуцирование вирусными векторами иммунного ответа той или иной силы (см. например, обзор [7]).

К невирусным способам относятся: доставка с помощью трансфекционных агентов, метод электропорации или использование других вспомогательных процедур, способствующих проникновению НК через клеточные мембраны. Использо-

Сокращения: АЕЕА – аминоэтоксисетил; Bhoc – бензгидрилоксикарбонил; DIEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; FBS – эмбриональная телячья сыворотка; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; Flu – остаток флуоресцеина; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметил уронийгексафторфосфат; IMDM – модифицированная Исковым среда Дульбекко; K_d – равновесная константа диссоциации; NMM – *N*-метилморфолин; PBS – калий-фосфатный буфер, содержащий 0.01 М KH_2PO_4 , 0.14 М NaCl, pH 7.5; PL – полилизин; PS – полистирол, TBS – Трис-НСl-буфер, содержащий 0.01 М Трис-НСl, 0.14 М NaCl, pH 7.5. ПНК – пептидо-нуклеиновая кислота; $^{\text{Flu}}$ ПНК – флуоресцеин-меченная ПНК.

Автор для связи: +7 (383) 363-51-23; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: zarytova@niboch.nsc.ru.

ние таких методов не всегда благоприятно влияет на жизнедеятельность клеток, поскольку при доставке могут образовываться эндосомные компартменты, внутри которых антисмысловая НК остается недоступной для своей мишени. В случае целого организма в некоторых случаях такие способы доставки не применимы в принципе (например, метод *электропорации*, или обработка клеток ионами Ca^{2+}). Существующие проблемы и методы доставки НК и их аналогов в клетки достаточно полно отражены в обзорах [2, 6–9].

В последнее время для решения проблем транспорта лекарственных средств в клетки начинают привлекать наноматериалы (см., например, обзоры [9–12]). Основными требованиями при их выборе для этих целей являются: безвредность для живого организма, способность проникать через клеточные мембраны и возможность *обратно* присоединять лекарственные препараты. Сами наночастицы в этих случаях выполняют роль переносчика или транспортера лекарственного препарата.

Диоксид титана (TiO_2) широко используется в медицине как биосовместимый материал. Наночастицы TiO_2 способны проникать через клеточные мембраны эукариотических клеток без привлечения каких-либо вспомогательных процедур [13, 14]. Структура поверхности наночастиц TiO_2 позволяет проводить на них иммобилизацию различных органических соединений [15–20], в том числе, лекарственных препаратов [20]. Сами по себе молекулы диоксида титана не токсичны. Согласно сертификату FDA (управление по контролю за продуктами и лекарствами, США), в 1966 г. диоксид титана признан безопасным и безвредным для человека веществом. Соединения на основе диоксида титана широко используются в косметике и в качестве пищевых добавок. Более того, исследования последних лет показали, что наночастицы TiO_2 в относительно низких дозах (вплоть до 200 мкг/мл) не проявляют какого-либо заметного замеряемого токсического эффекта и не оказывают вредного воздействия на клетки млекопитающих [21], на бактерии [22] и на животных [23]. Перечисленные свойства диоксида титана делают его потенциально привлекательным в качестве *транспортера* лекарственных препаратов, в том числе антисмысловых олигонуклеотидов и их ПНК-аналогов, в клетки млекопитающих.

Мы предположили, что транспорт ПНК в клетки можно осуществить путем создания наноконструктов, в состав которых будет входить ПНК и наноразмерные частицы диоксида титана, способные проникать в клетки.

Ранее доставляемые молекулы ПНК или ДНК присоединяли к TiO_2 -частицам ковалентно с ис-

пользованием допаминсодержащих ПНК- или ДНК-олигомеров [24, 25]. При этом, будучи прочно связанной с носителем, ПНК или ДНК, из-за стерических препятствий, создаваемых самим носителем, может оказаться мало доступной для взаимодействия с НК-мишенью внутри клетки. С этой точки зрения, привлекательной кажется идея фиксации целевой ПНК или ДНК на наночастицах в составе ДНК/ПНК- или ДНК/ДНК-дуплексов, прочность которых при конструировании может легко регулироваться длиной перекрывания комплементарных пар оснований в дуплексе. После доставки в клетки, ДНК/ПНК- или ДНК/ДНК-дуплексы при нарушении термодинамического равновесия в физиологических условиях могут распадаться, в результате чего ПНК или ДНК будут отделяться от TiO_2 -носителя и станут доступными для взаимодействия с НК-мишенью. Метод иммобилизации ДНК или ПНК на TiO_2 -частицах в виде комплементарных комплексов в литературе не описан.

Целью данной работы является создание наноконструктов на основе наночастиц диоксида титана с иммобилизованными на них ПНК в виде гибридных ДНК/ПНК-дуплексов и исследование способности полученных наноконструктов проникать в клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез ПНК

Синтез ПНК-олигомера (ПНК) проводили стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [1] согласно приведенной схеме 1, на пептидом синтезаторе PS3, который был приспособлен для синтеза пептидо-нуклеиновых кислот [26, 27]. Структура синтезированного олигомера ПНК включала в себя 16-звенную произвольно выбранную последовательность ПНК, содержащую на N- и C-концах цепи по две аминоксипропиононкетильные (АЕЕА) линкерные группы (схема 1). Введение АЕЕА-групп необходимо было для придания ПНК-олигомеру большей растворимости в воде. Средний выход присоединения одного мономерного звена, определяемый путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, составил 95.8%. Конечный выход олигомера ПНК после 20 шагов конденсации на твердофазном носителе составил 42.7%. Целевой продукт после удаления с полимерного носителя и деблокирования всех защитных групп очищали оФВЭЖХ, собирая нужные фракции и анализируя их методом MALDI TOF-масс спектроскопии.

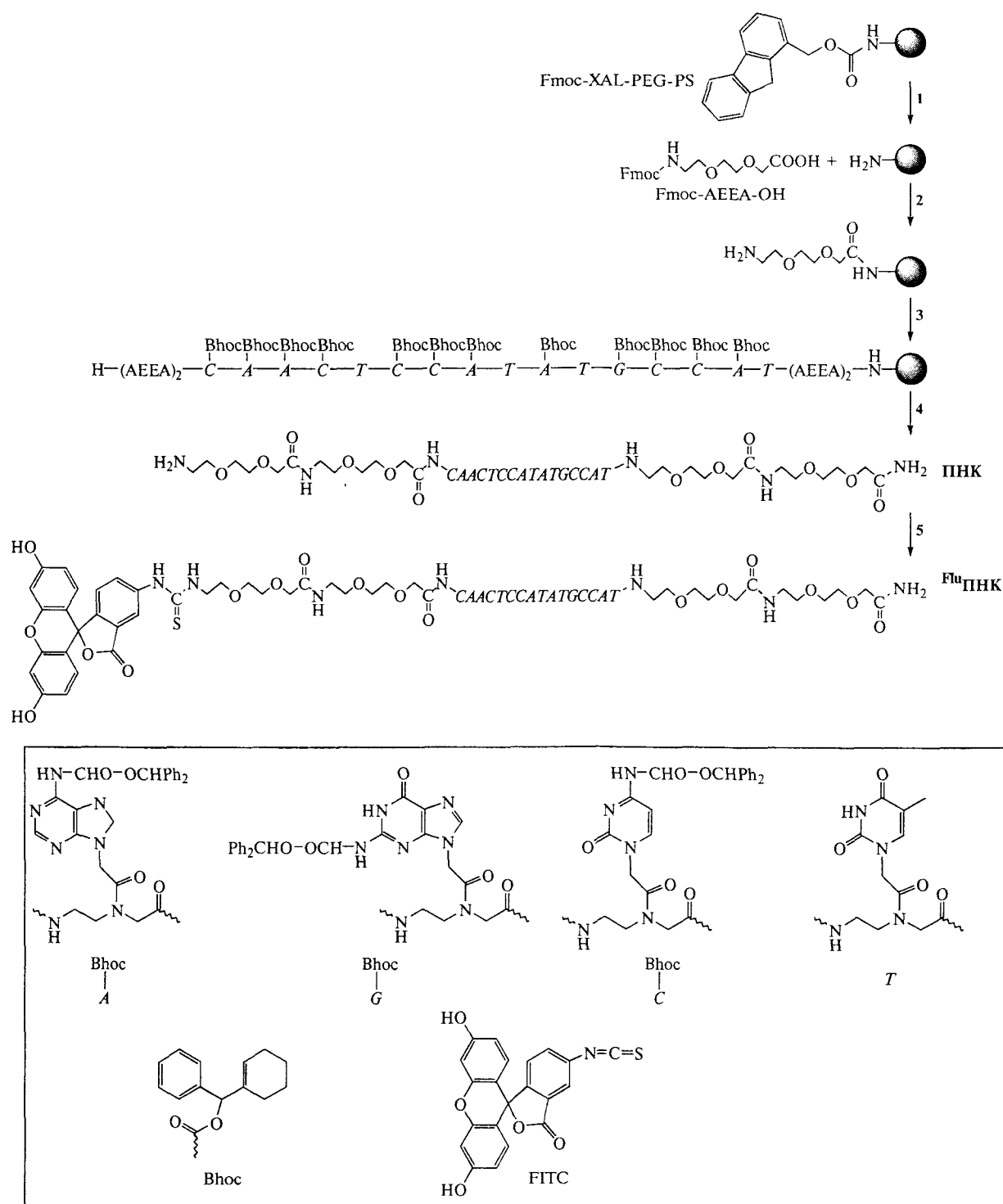


Схема 1. Твердофазный синтез олигомера ПНК (стадии 1–4) и его флуоресцентного производного ФлуПНК (стадия 5).

Структура модельных ДНК/ПНК и ДНК/ДНК дуплексов и их характеристики

Олигомер	Структура дуплекса	Длина перекрытия п.о.	т. пл., °С	Дуплекс	K_d (37°C), М
ПНК ДНК ₁	$^N\text{CAAC TCCA TAGCCAT}^C$ 3'TTTTCTAGTTGAGGTAT5'	10	51.0	P ₁	7.6×10^{-8}
ПНК ДНК ₂	$^N\text{CAAC TCC ATA TGCCAT}^C$ 3'CTAGTTGAGGTATACGGTACAT5'	16	73.8	P ₂	3.2×10^{-13}
ДНК ₃ ДНК ₁	5'CAACTCCATATGCCAT3' 3'TTTTCTAGTTGAGGTAT5'	10	34.3	D ₁	4.0×10^{-6}
ДНК ₃ ДНК ₂	5'CAACTCCATATGCCAT3' 3'CTAGTTGAGGTATACGGTACAT5'	16	57.9	D ₂	8.5×10^{-11}

Значения т. пл. получены при концентрации дуплексов 2 мкМ в PBS буфере. Ошибка измерений т. пл. составляет $\pm 1^\circ\text{C}$, для величин K_d ошибка составляет 15%.

Комплексообразующие свойства синтезированного олигомера ПНК

Важной особенностью молекул ПНК является их способность образовывать прочные комплементарные комплексы с НК [28, 29]. С использованием синтезированных олигомеров ПНК и комплементарных им дезоксирибоолигонуклеотидов ДНК₁ или ДНК₂ получены гибридные ДНК/ПНК-дуплексы и изучена их термическая стабильность. В таблице представлены значения температур плавления (т. пл.) и величины равновесных констант диссоциации (K_d) дуплексов с различным числом перекрытия комплементарных пар оснований.

Из этих данных, видно, что термостабильность исследованного ДНК/ПНК-дуплекса P₁, образованного олигомером ПНК с комплементарным 18-звенным ДНК-олигонуклеотидом ДНК₁ с числом перекрытия комплементарных пар оснований 10, выше стабильности соответствующего ДНК/ДНК-дуплекса D₁ на 17°C, а термостабильность ДНК/ПНК-дуплекса P₂, сформированного олигомером ПНК с 22-звенным ДНК-олигонуклеотидом ДНК₂ с числом перекрытия 16, выше термостабильности соответствующего ДНК/ДНК-дуплекса D₂ на 16°C. Следует отметить, что полученные данные о том, что термостабильность ДНК/ПНК-дуплексов P₁ и P₂ существенно выше стабильности соответствующих ДНК/ДНК-дуплексов D₁ и D₂, хорошо согласуются с литературными данными [28, 29] и косвенно подтверждают структуру синтезированного олигомера ПНК. Аналогичные закономерности по термостабильности исследованных ДНК/ДНК- и ДНК/ПНК-дуплексов P₁, P₂ и D₁, D₂ наблюдаются при сравнении их величин K_d (таблица).

Синтез флуоресцеин-меченного ПНК-олигомера (Flu-ПНК)

Для оценки эффективности иммобилизации ПНК на наночастицах и исследования способности создаваемых наноконструкций проникать в клетки, в состав ПНК была введена флуоресцентная метка – остаток флуоресцеина (Flu).

Остаток Flu был введен в олигомер ПНК постсинтетически по свободной аминогруппе после полного деблокирования и удаления с полимерного носителя (схема 1) путем реакции ПНК с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) в водной смеси органических растворителей (DMSO/CH₃CN/H₂O) в присутствии диизопропилэтиламина (DIEA), необходимого для депротонирования N-концевой аминогруппы ПНК.

Использование смеси органических растворителей и воды было обусловлено, с одной стороны, необходимостью предотвращения выпадения в осадок ПНК в безводном органическом растворителе (DMSO), с другой, – необходимостью максимально уменьшить содержание воды в реакционной смеси для предотвращения гидролиза FITC в водном растворе. После проведения реакции осуществляли очистку и выделение конечного продукта Flu-ПНК с помощью офВЭЖХ (рис. 1). Из рис. 1а видно, что на хроматограмме пик, соответствующий исходному ПНК-олигомеру, полностью исчезает и появляется новый пик с большим временем удерживания, соответствующий целевой Flu-меченной ПНК (сравни профили 1 и 2 на рис. 1а). Полученные данные свидетельствуют, что в используемых условиях при действии FITC исходный олигомер ПНК практически количественно превращается в соединение Flu-ПНК.

Следует отметить, что сам по себе остаток флуоресцеина довольно гидрофобен, поэтому при офВЭЖХ время удерживания Flu-ПНК-конъюгата заметно увеличивается в сравнении с временем удерживания исходного ПНК-олигомера и его коротких фрагментов. Это позволило для синтеза

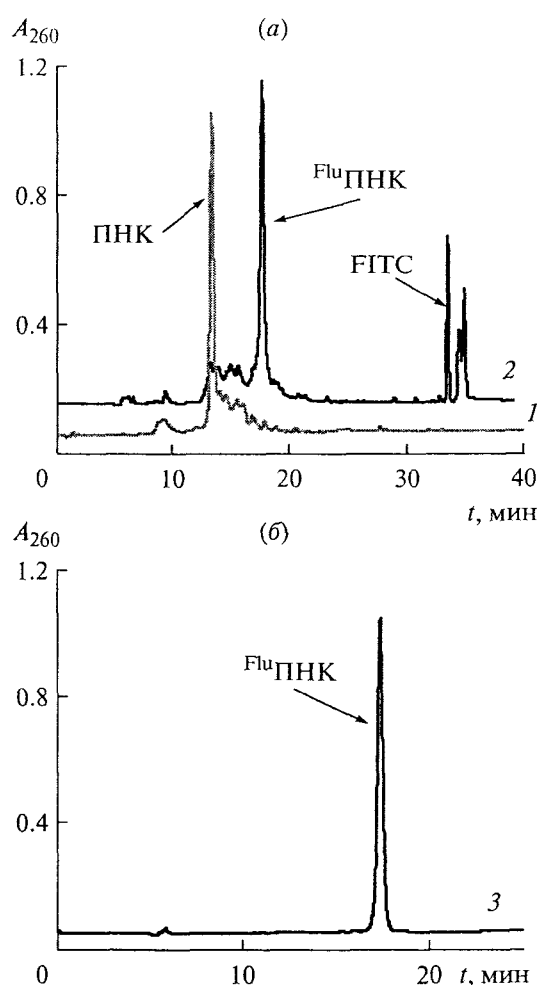


Рис. 1. Профиль оФВЭЖХ: (а) 1 – исходного (неочищенного) олигомера ПНК перед реакцией с FITC, 2 – реакционной смеси, содержащей соединение Flu ПНК, после реакции ПНК олигомера ПНК с FITC (1 час, 20°C); (б) 3 – очищенного соединения Flu ПНК, после хроматографии. Условия хроматографии смотри в разделе “Эксперимент. часть”.

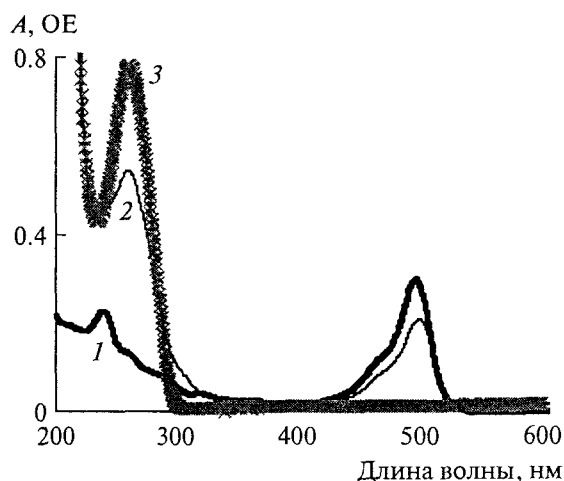


Рис. 2. Спектры оптического поглощения FITC (1), очищенной Flu ПНК (2) с помощью оФВЭЖХ, исходной ПНК (3) до реакции с FITC. Спектры снимали в PBS буфере, pH 7.5, содержащем 50% CH_3CN .

Flu ПНК использовать полученный олигомер ПНК без очистки, что существенно сократило время синтеза и выделения целевой Flu ПНК.

Спектры оптического поглощения полученного Flu ПНК (рис. 2) демонстрируют присутствие характерного для флуоресцеина максимума поглощения при 495 нм, а также характерного для ПНК максимума поглощения при 260 нм (кривая 2). Исходная ПНК не имеет поглощения в области 495 нм (кривая 3), а сам по себе флуоресцеиновый краситель не имеет характерного максимума поглощения при 260 нм (кривая 1). Эти спектральные данные подтверждают структуру полученного Flu ПНК, которое далее было использовано для его иммобилизации на TiO_2 -частицах и последующей детекции ПНК в составе нанокompозита внутри клеток.

Иммобилизация ПНК в составе дуплекса ДНК/ПНК на наночастицах TiO_2 , покрытых полилизин

Сами по себе ДНК, ПНК или их гибридные ПНК/ДНК-дуплексы плохо фиксируются на TiO_2 -частицах. В нашем случае емкость таких олигомерных композитов не превышала величины 1–2 нмоль на 1 мг частиц, что примерно на порядок меньше максимально возможной стерически доступной емкости для частиц размером 5 нм [30].

Известно, что электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) TiO_2 -наночастиц при нейтральных или физиологических значениях pH 7–8 – обычно величина отрицательная [31]. Это свойство TiO_2 -наночастиц позволяет эффективно иммобилизовать на их поверхность положительно заряженные поликатионы, например полилизин, с образованием композита $TiO_2 \cdot PL$ [17–19]. Связывание PL с TiO_2 -носителем в этом случае нековалентное, но достаточно прочное [18]. Получаемый таким образом $TiO_2 \cdot PL$ -композит в нейтральных условиях содержит положительно заряженные аминогруппы лизина и может быть использован для электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот [19].

Поскольку молекулы ПНК не имеют заряда и не могут напрямую быть иммобилизованы на композите $TiO_2 \cdot PL$, мы предложили проводить связывание ПНК с $TiO_2 \cdot PL$ опосредованно, используя предформированный гибридный ДНК/ПНК-дуплекс (схема 2). В данном случае присоединение ДНК/ПНК-дуплекса к композиту $TiO_2 \cdot PL$ осуществляли за счет электростатических взаимодействий отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК (в составе дуплекса ДНК/ПНК) и положительно заряженных аминогрупп полилизина (в составе $TiO_2 \cdot PL$), а удерживание ПНК в составе нанокompозита в общем виде осуществляли за

счет нековалентных Уотсон-Криковских взаимодействий между ПНК и комплементарной ДНК (схема 2). Прочность фиксации ПНК в составе полученного $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК/ПНК}$ -наноконструкта должна зависеть от числа перекрывающихся

комплементарных пар в гибридном ДНК/ПНК-дуплексе (или от термостабильности используемого ДНК/ПНК-дуплекса) и при конструировании может легко регулироваться изменением длины этого перекрывания.

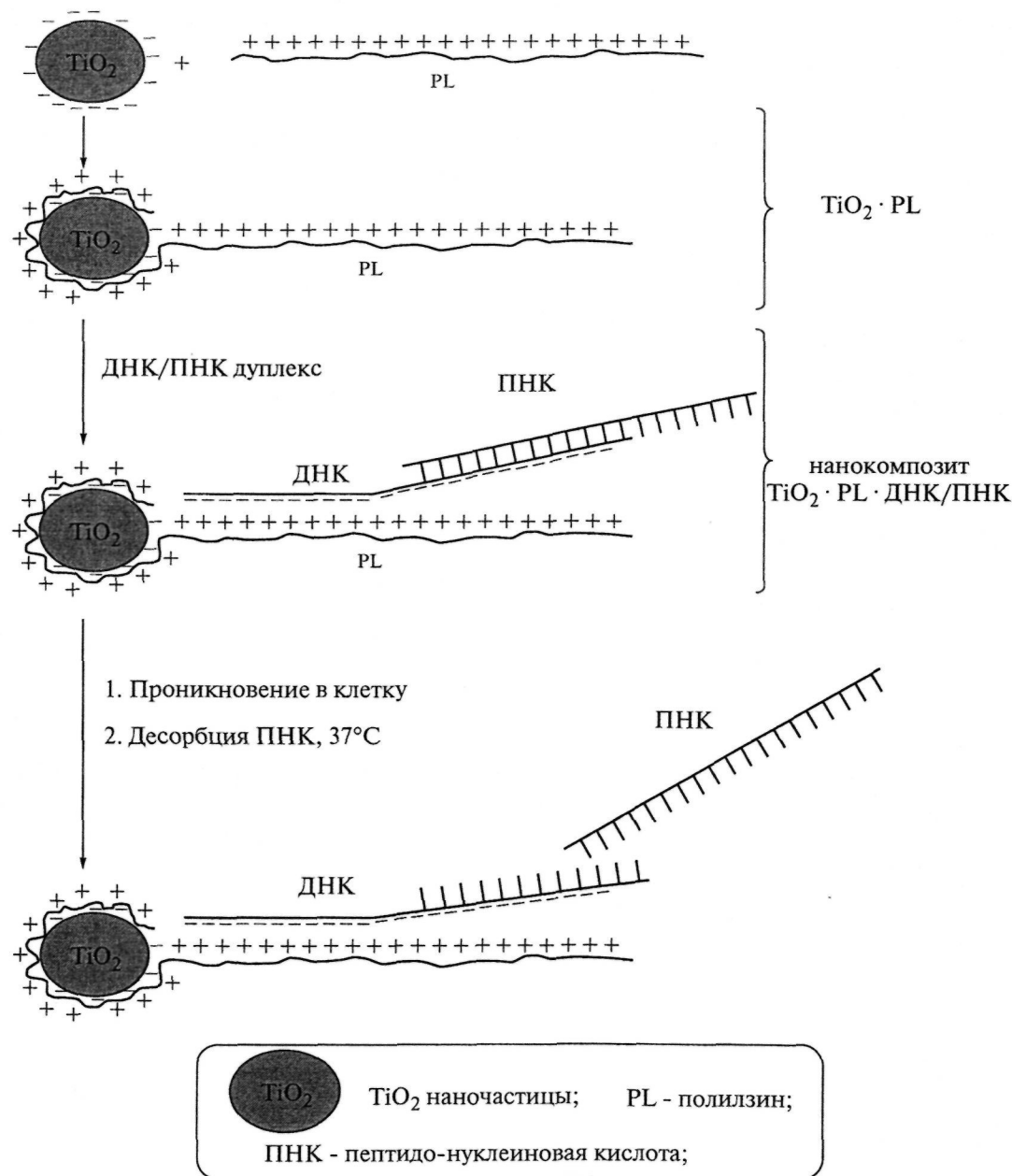


Схема 2. Схема *обратимой* иммобилизации ПНК в виде гибридного ДНК/ПНК дуплекса на TiO_2 наночастицах, покрытых полилизинном (PL). Связывание ДНК/ПНК дуплекса с $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ наночастицами происходит за счет *электростатических* взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными аминогруппами PL. Удерживание ПНК в составе наноконструкта осуществляется за счет *нековалентных Уотсон-Криковских* взаимодействий между ПНК и комплементарной ДНК. При нарушении термодинамического равновесия ПНК молекулы способны диссоциировать из такого наноконструктивного комплекса. Значком "плюс" обозначены положительные заряды на полилизине. Значком "минус" обозначены отрицательные заряды на поверхности TiO_2 частиц и отрицательные заряды межнуклеотидных фосфатов в ДНК.

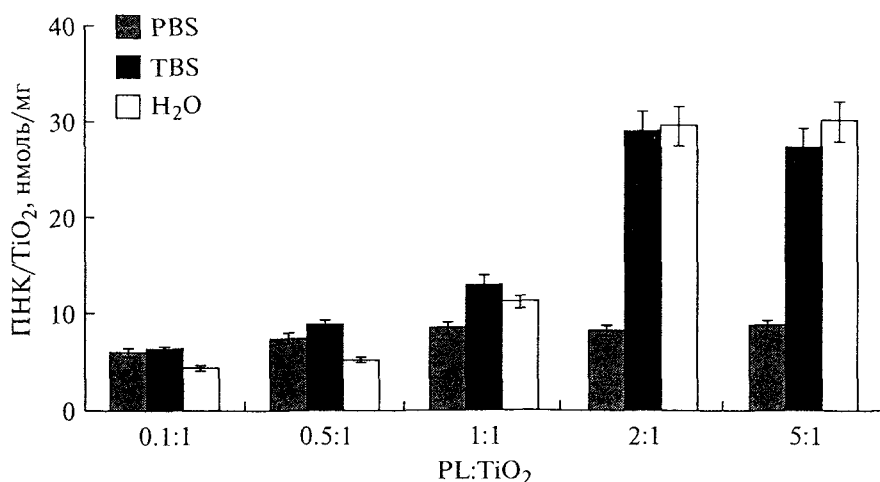


Рис. 3. Зависимость эффективности иммобилизации $^{5'}\text{PНК}$ в виде ДНК₂/ $^{5'}\text{PНК}$ -дуплекса на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композитах от мольного соотношения $\text{PL} - \text{TiO}_2$ и состава буфера.

Например, при конструировании нанокompозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_2/\text{ПНК}$ с достаточно прочно удерживаемой ПНК может быть использован дуплекс P_2 (таблица) с перекрыванием 16 комплементарных пар оснований и величиной K_d равной 3.2×10^{-13} М. Для получения нанокompозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_1/\text{ПНК}$ с относительно слабо удерживаемой ПНК может быть использован дуплекс P_1 с перекрыванием комплементарных пар оснований 10 и величиной K_d равной 7.6×10^{-8} М (таблица). Таким образом, меняя число перекрываемых нуклеотидных пар, могут быть сконструированы нанокompозиты с различной и регулируемой прочностью иммобилизации ПНК.

Можно полагать, что на эффективность иммобилизации НК будет влиять количество аминогрупп в $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите. С целью подбора оптимальных условий для иммобилизации ДНК/ПНК-дуплекса на поверхности $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита было изучено влияние мольного соотношения $\text{TiO}_2\text{--PL}$ в составе $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ на эффективность иммобилизации дуплекса. Исследование проводили при фиксированном 10-кратном мольном избытке ДНК/ПНК-дуплекса относительно исходных TiO_2 -частиц, используя $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композит с различным соотношением $\text{TiO}_2\text{--PL}$ (см. эксперимент. часть). Эффективность иммобилизации ПНК определяли в различных буферных системах по отношению количества сорбированного на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композитах флуоресцеин-меченного олигомера $^{5'}\text{ПНК}$ в составе ДНК₂/ $^{5'}\text{ПНК}$ -дуплекса к количеству добавляемого дуплекса (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что степень иммобилизации олигомера $^{5'}\text{ПНК}$ при соотношении PL--TiO_2 , равном 0.1 : 1, составляет около 5 нмоль ПНК на

1 мг TiO_2 -частиц. При соотношении PL--TiO_2 , равном 0.5 : 1 и 1 : 1, эта величина медленно возрастает, а при соотношении 2 : 1 максимальная эффективность иммобилизации достигает величины 30 нмоль/мг. Дальнейшее увеличение доли PL в $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите не приводит к увеличению степени иммобилизации. Отсюда следует, что при соотношении PL--TiO_2 , равном 1 : 2, происходит насыщение $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита ДНК/ПНК-дуплексом, и дальнейшее увеличение доли PL в $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите не приводит к увеличению эффективности иммобилизации ПНК в виде ДНК/ПНК-дуплекса. Таким образом, емкость и прочность фиксации ПНК в составе полученного $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{ПНК}$ -нанокompозита зависит не только от исходной стабильности ДНК/ПНК-дуплекса, но и от эффективности электростатического связывания ДНК/ПНК-дуплекса с поверхностью $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -частиц, что, в свою очередь, зависит от соотношения $\text{TiO}_2\text{--PL}$ в составе $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{ПНК}$ -композита.

На эффективность иммобилизации дуплекса существенное влияние оказывает также тип используемого буфера. Например, максимальная емкость иммобилизации дуплекса в PBS-буфере достигает 8–9 нмоль/мг (рис. 3). В Трис-НСI-буфере или в воде емкость иммобилизации ПНК/ДНК-дуплекса увеличивается и может достигать величины 30 нмоль/мг (рис. 3). Вероятно, это обусловлено тем, что в воде и в Трис-НСI-буфере нет бидентантных или тридентантных лигандов, таких как анионы трехосновной фосфорной кислоты, которые эффективно связывается с PL и конкурирует за его связывание с ДНК.

Степень иммобилизации 8–9 нмоль ПНК на 1 мг (8.3 нмоль) TiO_2 -частиц (при соотношении

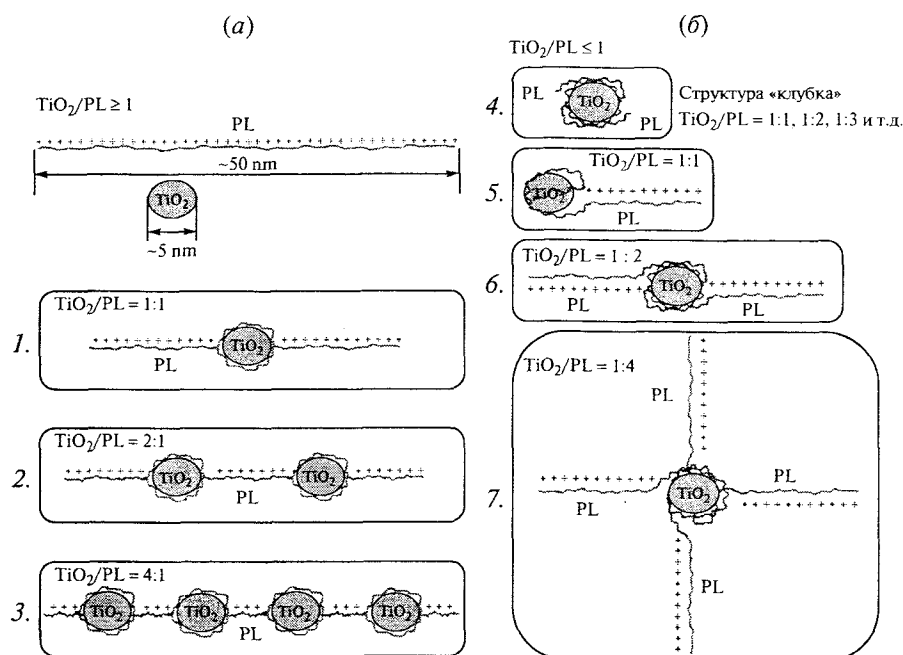


Рис. 4. Возможные структуры комплексов $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$, образуемые при молярном избытке наночастиц ($\text{TiO}_2/\text{PL} \geq 1$) (а) и при молярном избытке полилизина ($\text{TiO}_2/\text{PL} \leq 1$) (б).

$\text{PL}-\text{TiO}_2$, равном 1 : 1) соответствует иммобилизации 1 молекулы ПНК на одну частицу TiO_2 (учитывая, что наночастицы TiO_2 размером 5 нм содержат около 1500 молекул TiO_2 [30]; подробнее см. также эксперимент. часть). Другими словами, в случае иммобилизации ПНК в виде ПНК/ДНК-дуплекса на одну наночастицу TiO_2 иммобилизуется не менее одной молекулы дуплекса. Из стерических соображений, исходя из размеров частиц TiO_2 (5–6 нм) и диаметра двойной спирали ДНК/ДНК- или ПНК/ДНК-дуплекса (порядка 2.5 нм [30]), это вполне разумная емкость наноконкомпозита, поскольку в среднем каждая отдельно взятая частица задействована в связывании, по крайней мере, с одной молекулой дуплекса.

Таким образом, результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют, что на эффективность иммобилизации ПНК влияет количество аминокислотных групп в $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите. Возможно, это обусловлено формированием различных структурных форм $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита при разных соотношениях $\text{PL}-\text{TiO}_2$. На рис. 4 представлены такие возможные структуры $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита при разных соотношениях $\text{PL}-\text{TiO}_2$, которые могут быть задействованы при иммобилизации ДНК/ПНК-дуплекса. При молярном избытке наночастиц по отношению к молекулам полилизина ($\text{PL} : \text{TiO}_2 < 1$) наиболее вероятной структурой может быть структура "бусинок" (рис. 4а структуры 1–3), когда несколько частиц TiO_2 прикреплены к одной молекуле полилизина путем обматывания цепи

полилизина поочередно вокруг каждой отдельно взятой частицы TiO_2 . В этом случае большая часть положительно заряженных аминокислотных групп полилизина затрачивается на связывание с поверхностью TiO_2 -частиц и меньшая часть остается на связывание с ДНК. Поэтому емкость таких наноконкомпозитов по иммобилизованной на них ДНК, должна быть небольшой. Такое предположение согласуется с данными, представленными на рис. 3: емкость $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК/ПНК}$ -композита при соотношениях $\text{PL} - \text{TiO}_2$, равных 0.1 : 1 и 0.5 : 1, не превышает величины 5–8 нмоль/мг.

Возможна также структура $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита в виде "клубка", когда вокруг одной частицы TiO_2 полностью обмотана одна или несколько молекул или цепей полилизина (рис. 4б, структура 4). Однако, структура "клубка" для связывания с отрицательной цепью ДНК представляется маловероятной, поскольку одни и те же положительно заряженные аминокислотные группы полилизина не могут быть задействованы одновременно для образования электростатического комплекса с ДНК и с поверхностью TiO_2 -частиц.

Можно предположить, что для эффективного связывания ДНК часть цепи полилизина должна свободно свисать с поверхности частицы. Такой вариант может реализоваться при эквимольном соотношении $\text{PL}-\text{TiO}_2$ (см. схема 1 и рис. 4б, структура 5) или молярном избытке полилизина относительно наночастиц (рис. 4, структура 6 или 7). Вероятнее всего, в этих случаях дуплексы

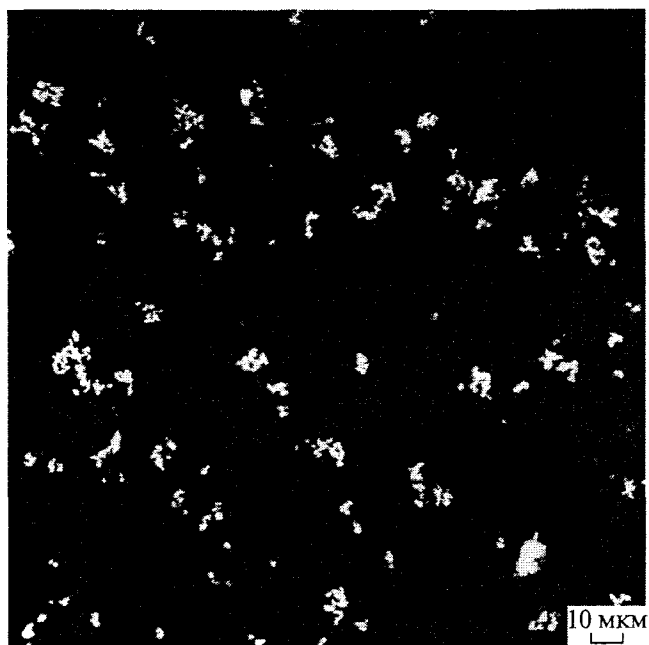


Рис. 5. Конфокальная лазерная флуоресцентная микроскопия суспензии $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_2/\text{FluПНК}$ наночастиц в PBS буфере в отсутствие клеток. Концентрация пробы 0.2 мг/мл по TiO_2 и 2 мкМ по ДНК/ПНК дуплексу, соотношение $\text{TiO}_2 : \text{PL} = 1 : 2$. Условия конфокальной микроскопии см. в “Эксперимент. части”.

ДНК/ПНК, иммобилизованные на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композице, располагаются на наночастицах перпендикулярно их поверхности, поскольку это наиболее энергетически выгодное состояние (из-за взаимного отталкивания отрицательно заряженных цепей ДНК). При этом вокруг одной наночастицы диаметром 5 нм, исходя из чисто геометрических соображений и принимая во внимание, что диаметр двойной спирали ДНК или ДНК/ПНК-дуплекса составляет около 2.5–3 нм, свободно могут “уместиться”, без каких-либо стерических затруднений или дополнительных энергетических затрат, около 4–5 молекул ДНК/ПНК-дуплексов.

В наших экспериментах по фиксации ДНК/ПНК-дуплексов на TiO_2 -наночастицах, покрытых молекулами полилизина (рис. 3), при соотношении $\text{PL}-\text{TiO}_2 \geq 1$ зарегистрирована эффективная иммобилизация 10–30 нмоль дуплекса на 1 мг частиц TiO_2 , т.е. до 1–3 молекул дуплекса на одну частицу TiO_2 . Вероятно такая же структура $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композица со свисающим концом PL будет предпочтительной для эффективной иммобилизации не только ДНК/ПНК-дуплексов, но и дуплексов ДНК/ДНК и одноцепочечной ДНК.

Таким образом, разработан метод эффективной иммобилизации на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композице ПНК в составе ДНК/ПНК-дуплекса за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК в ДНК/ПНК-дуплексе с

положительно заряженными аминогруппами полилизина в $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композице.

При удачном выборе буферного состава или специального вида поликатиона для иммобилизации на частицах (например, с четвертизованными положительно заряженными аминогруппами) имеется потенциальная возможность увеличения максимальной емкости TiO_2 -композицов по ДНК/ПНК-дуплексу. Это может быть принято во внимание при дальнейших построениях конструкций наноконпозицов, эффективно фиксирующих НК.

Способность созданных $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{FluПНК}$ -наноконпозицов проникать через мембраны клеток

Известно, что TiO_2 -наночастицы проникают в клетки млекопитающих [13, 14]. Предстояло выяснить, сохранят ли они эту способность после иммобилизации на них ДНК/ПНК-дуплекса в составе нековалентного наноконпозица $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{ПНК}$.

Для наблюдения за поведением в клетке ПНК в составе $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{ПНК}$ -наноконпозица была использована ПНК, меченная флуоресцеином (FluПНК). Транспорт полученных наноконпозицов в клетки исследовали с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Флуоресцентно-меченный наноконпозиц $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_1/\text{FluПНК}$ или $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_2/\text{FluПНК}$ получали, соответственно смешивая предварительно полученный $\text{ДНК}_1/\text{FluПНК}$ - или $\text{ДНК}_2/\text{FluПНК}$ -дуплекс с заранее приготовленным $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композицом и перед обработкой клеток наноконпозицы проверяли на возможность детектироваться конфокальной лазерной сканирующей микроскопией вне клеток (рис. 5).

Флуоресцеинмеченные $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}/\text{FluПНК}$ -наноконпозицы инкубировали с клетками HeLa в течение 24 ч в отсутствие сыворотки, клетки затем отмывали от избытка не связавшегося наноконпозица и дополнительно выдерживали в течение 24 ч в культуральной среде. В завершение, живые клетки без фиксации на слайдах были проанализированы конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопией (рис. 6а–г).

Ядра клеток непосредственно перед анализом конфокальной микроскопией были окрашены с синим флуоресцентным красителем *Hoechst 33342* (рис. 6а). Цитозоль клеток была окрашена красным флуоресцентным красителем *Cell Tracker Red* (рис. 6б). Как видно из рис. 6б, вся зеленая окраска, соответствующая флуоресцеинмеченой ПНК, перекрывается с красной окраской цитозоли (рис. 6в, г) и не перекрывается с синей окраской ядер (рис. 6а, г), что свидетельствует о том, что молекулы ПНК сосредоточены внутри клеток (и/или на поверхности мембран), но при этом не попадают в ядра клеток. Допуская, что это конфо-

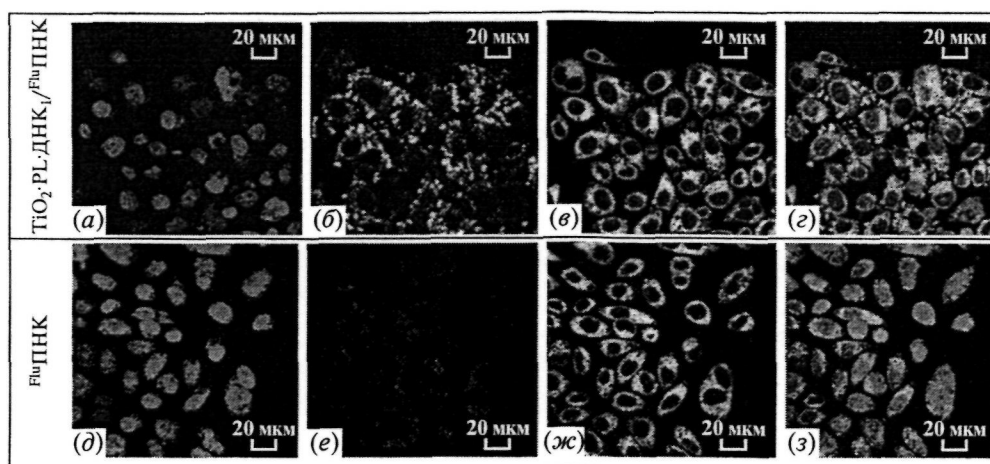


Рис. 6. Конфокальная лазерная флуоресцентная микроскопия клеток *HeLa* обработанных нанокomпозитом $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_1 / \text{Flu-PНК}$ (2 мкМ по ПНК) (а, б, е, з) или свободной Flu-PНК , не связанной с нанокomпозитом (2 мкМ) (д, е, ж, з) (контроль), после 24 ч инкубации и последующих 24 ч отмывки. Ядра клеток, окрашенные синим красителем *NucleoStain*, отображены в синих флуоресцентных каналах а, д; ПНК, меченная флуоресцеином, отображена в зеленых флуоресцентных каналах: б, е; цитозоль клеток окрашена красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red CMTPX (красные флуоресцентные каналы: в, ж); з и ж – наложение каналов: а, б, в и д, е, ж, соответственно. Указанная масштабная линейка 20 мкм. Условия конфокальной микроскопии см. в “Эксперимент части”.

кальный снимок с довольно тонким срезом (200–300 нм), а размер клеточных ядер равен около 10 мкм и что все срезы были получены путем среза ядра посередине, можно заключить, что молекулы Flu-PНК локализованы в цитоплазме клеток. Параллельно в контрольных экспериментах с клетками, использовали свободную Flu-PНК без ее фиксации на наночастицах TiO_2 (рис. 6д–з). Показано, что такая Flu-PНК , не иммобилизованная на наночастицах TiO_2 (рис. 6д–з), не проникает через клеточные мембраны (рис. 6е). Контрольные эксперименты со свободным флуоресцеиновым красителем также показали, что свободный флуоресцеин не способен накапливаться в клетках (данные не приведены). Сумма полученных данных свидетельствует, что молекулы ПНК сами по себе или за счет флуоресцентного красителя не способны проникать в клетки. Они проникают только в составе $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_1 / \text{Flu-PНК}$ -нанокomпозита и в таком виде накапливаются внутри клеток.

Таким образом, разработан метод иммобилизации ПНК в составе гибридного ДНК/ПНК-дуплекса на поверхности наночастиц диоксида титана, покрытых полилизинном, с образованием $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{ДНК}_1 / \text{ПНК}$ -нанокomпозитов, способных транспортировать пептидо-нуклеиновые кислоты в эукариотические клетки *HeLa* без использования специальных трансфекционных агентов, электропорации или других вспомогательных процедур.

В заключение следует отметить, что предложенный способ нековалентной иммобилизации ПНК позволяет не только создавать композиты,

способные транспортировать молекулы ПНК в клетки, но и регулировать прочность удерживания в них ПНК. Для создания оптимальных нанокomпозитов, стабильных в условиях их транспортировки и способных к высвобождению из гибридного дуплекса (из состава нанокomпозита) после попадания в клетки, важно оценить диапазон необходимой прочности удерживания ПНК. Решение этого вопроса с привлечением кинетических и термодинамических исследований создаваемых нанокomпозитов будет представлено в следующем сообщении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидо- и ПНК-олигомерного синтеза фирм “Sigma Chemical Co”, Fisher Scientific”, Bachem (США), Protein Technologies (США). Полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin функционализированный 9-Fmoc-аминоксантен-3-илоксильным фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия), ПНК-мономеры фирмы ASM Research Chemicals, Германия, флуоресцеинизотиоцианат (FITC) (90%), (Sigma Aldrich, США), ацетонитрил (ос.ч.) (Криохром, Россия), DMF (ос.ч.) (Реахим, Россия), *N*-метилморфолин (99%) (Acros Organics), трифторуксусную кислоту (HPLC grade) (Fisher Chemicals, Бельгия), *m*-крезол (99%), (Sigma Aldrich, США). Гидробромид поли-*L*-лизина (Sigma Aldrich, США, M_w 15000–30000) перед использованием тщательно сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 .

Приготовление 0.2 мМ раствора полилизина в воде. Навеску гидробромид поли-*L*-лизина (4.5 мг)

растворяли в 1 мл воды, получали 21.6 мМ раствор в расчете на мономерную единицу гидробромида лизина ($M_w = 209$) или на 1 свободную аминогруппу. Принимая во внимание среднюю молекулярную массу используемого полилизина равной 22500 и, соответственно, степень полимеризации полилизина $n \sim 108$, считали концентрацию раствора полилизина равной 0.2 мМ.

В работе использовали фосфатно-солевой буфер, содержащий 0.01 М KH_2PO_4 , 0.14 М NaCl , pH 7.5 (PBS) и Трис- HCl -солевой буфер, содержащий 0.01 М Трис- HCl , 0.14 М NaCl , pH 7.5 (TBS).

В работе использовались клетки линий HeLa (цервикальная карцинома человека) из банка клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде IMDM (модифицированная Исковым среда Дульбекко), содержащей 10% FBS (эмбриональная телячья сыворотка), антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 0.1 мкг/мл стрептомицина), в атмосфере 5% CO_2 при 37°C.

Для конфокальной микроскопии живых (не фиксированных) клеток использовали 8-луночные планшеты Lab-Tek™ Chambered Coverglass (Nunc GmbH & Co. KG, Германия).

УФ-спектры водных растворов ПНК- и ДНК-олигонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Концентрацию ДНК- и ПНК-олигомеров определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины молярных коэффициентов поглощения моно- и динуклеотидов при длине волны 260 нм [32]. Флуоресценцию регистрировали на спектрофотометре Varian Cary Eclipse Fluorescence (Varian, США) (возбуждение при 495 нм; поглощение при 521 нм).

Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters 600E с использованием детектора Waters 484 (Waters, США) на колонке Altima C18 5u (10 × 250 мм) (Alltech, США). Условия хроматографии: УФ детекция при 260 нм, линейный градиент ацетонитрила от 20% до 50% в 0.1% TFA в течение 30 мин при скорости потока 3 мл/мин. Растворы после хроматографии концентрировали упариванием в концентраторе Eppendorf Concentrator 5301 (LabWrench, Канада).

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов (2 мМ) проводили с использованием системы анализа температуры плавления нуклеиновых кислот TMSPC-8 (Shimadzu, Япония), оборудованной терморегулируемым восьмисекционным держателем путем замера изменения оптического поглощения раствора при его нагревании от 5 до 95°C или охлаждением от 95 до 5°C в PBS-буфере при длине волны 260 нм. Скорость изменения температуры составляла 0.5°C/мин.

ДНК-олигонуклеотиды синтезировали в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН

на твердофазном синтезаторе ASM 800 (Biosset, Новосибирск) стандартным фосфитамидным методом и очищены обращенно-фазовой хроматографией. Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях, визуализацию олигонуклеотидов в геле проводили с помощью окраски "Stains-All".

ПНК-олигомеры синтезировали стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии (схема 1) [1] на пептидом синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США), приспособленном для синтеза ПНК, по ранее описанному способу [25, 26]. На каждой стадии деблокирования определяли количество отщепившихся Fmoc-групп, измеряя количество образованного фульвен-пиперидинового аддукта [33] методом УФ-спектрометрии ($\epsilon_{301} = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). По завершении синтеза ПНК-олигомеры отщепляли от носителя и деблокировали по стандартной методике обработкой полимерного носителя 20% раствором *m*-крезола в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре в течение 2 ч с последующим высаживанием неочищенного продукта ПНК в диэтиловый эфир. Целевой продукт после удаления с полимерного носителя и полного деблокирования групп очищали офВЭЖХ, собирая нужные фракции, анализируя их методом MALDI-TOF-масс спектроскопии. В результате был получен конечный гомогенный продукт с молекулярной массой ($[M + \text{H}^+] = 4838.0$), соответствующий искомой последовательности ПНК с расчетной массой ($[M + \text{H}^+] = 4838.4$).

Флуоресценци-меченную ПНК ($^{\text{Flu}}$ ПНК) синтезировали путем введения остатка флуоресцеина по 5'-концевой первичной аминогруппе ПНК (схема). В качестве реакционноспособного производного флуоресцеина использовали FITC. К 26 мкл раствора ПНК (4 OE_{260} , 35.8 нмоль) в 50% CH_3CN добавляли 50 мкл DMSO, 5 мкл диизопропилэтиламина и перемешивали. После этого к раствору добавляли 21.6 мкл раствора FITC (215 нмоль) в DMSO (шестикратный мольный избыток FITC по отношению к ПНК). Смесь инкубировали в темноте в течение 1–2 ч при комнатной температуре. Затем проводили выделение Flu-меченной ПНК $^{\text{Flu}}$ ПНК с помощью офВЭЖХ на колонке Altima C18 5u (10 × 250 мм) (Alltech, США) в градиенте 20–50% CH_3CN в 0.1% TFA при скорости элюции раствора градиента 3 мл/мин (рис. 2а). Собирали фракции со временем удерживания на колонке 17.7 мин (рис. 1а). Время удерживания исходной немодифицированной ПНК в этих же условиях составляла 13.4 мин. После хроматографии фракции, содержащие целевой продукт, объединили и упарили досуха, растворяли в 50% CH_3CN и измеряли УФ-видимый спектр ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ нм}$ и 495 нм). Спектр флуоресценции продукта в PBS-буфере при pH 7.5 имеет

максимум поглощения при длине волны $\lambda_{\text{ex}} = 498$ нм и максимум излучения при длине волны $\lambda_{\text{em}} = 515$ нм. Выход целевого продукта составил 52.3%, относительно исходно взятой ПНК.

ДНК/ДНК- и гибридные ДНК/ПНК-дуплексы готовили путем смешивания эквимольных количеств исходных олигонуклеотидов в буфере (PBS или TBS). Концентрации дуплексов составляла от 2 до 20 мкМ. Смеси инкубировали 5 мин при 90°C, затем охлаждали до 25°C в течение 30 мин и хранили их во льду до использования. В таблице приведены структуры использованных в работе дуплексов и их экспериментальные значения температур плавления и значения равновесных констант диссоциации, K_d , полученные в растворе. Для экспериментов с TiO_2 -частицами применяли гибридные ДНК/ПНК-дуплексы, приготовленные с использованием образцов ПНК или ее флуоресцентно-меченного аналога $^{\text{Flu}}$ ПНК и комплементарной ДНК – “холодной” (не меченой) или $5'$ - ^{32}P -меченой, полученной с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы [34].

Наночастицы диоксида титана были получены гидролизом TiCl_4 в воде по стандартной методике [30]. Размер полученных наночастиц, по данным динамического светорассеяния [35, 36] на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Англия), составил 4–6 нм. Исходя из того факта, что наночастицы TiO_2 , размером 5 нм, содержат около 1500 молекул TiO_2 [30], масса одного моля наночастицы будет составлять $1500 \times 79.9 = 119850$ г, а одного наномоля – 0.11985 мг. То есть в 1 мг TiO_2 -наночастиц будет содержаться $1/0.11985 = 8.3$ нмоль этих наночастиц (8.3 нмоль/мг). Полученную величину (8.3 нмоль/мг) далее использовали для расчета количества TiO_2 -наночастиц в наномолях, исходя из веса наночастиц в мг.

$\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композиты с разными мольными соотношениями TiO_2 –PL получали смешиванием TiO_2 и PL в соответствующем водном буфере. Для приготовления 1 мл TiO_2 –PL-композита (в мольном соотношении TiO_2 –PL = 1 : 1) смешивали 0.2 мл суспензии частиц TiO_2 (5 мг/мл, 8.3 нмоль/мг) и 41.5 мкл 0.2 мМ PL (8.3 нмоль) в буфере (обычно TBS или PBS). Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 10–20 с, выдерживали 10–20 мин при постоянном перемешивании при комнатной температуре, затем осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при скорости вращения ротора центрифуги 7 тыс. об./мин. Осадок дважды промывали 1 мл соответствующего буфера и затем суспендировали осадок в 1 мл используемого буфера (PBS или TBS). Полученный композит имел концентрацию по TiO_2 -частицам 1 мг/мл (8.3 нмоль/мл) и 8.3 нмоль/мл по полилизину. Мольное соотношение TiO_2 -частица- PL = 1 : 1 (одна TiO_2 -частица содержит 1500 молекул TiO_2). Аналогично были получены и остальные образцы $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композитов с мольными соотношениями PL– TiO_2 -частица, рав-

ными 0.1 : 1, 0.5 : 1, 2 : 1 и 5 : 1. Максимально возможную степень привязки PL к частицам TiO_2 проверяли по иммобилизации “холодной” или радиоактивно-меченой $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{ДНК}$ на поверхность полученного $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита (см. ниже). Максимальная эффективная привязка полилизина по этим данным составила 16.6 нмоль/мг, т.е. 16.6 наномолей полилизина (или 1760 наномолей остатков первичных аминогрупп полилизина) на 1 мг (8.3 наномолей) TiO_2 -частиц, что соответственно составляет 2 молекулы полилизина (или ~200 остатков первичных аминогрупп полилизина) на одну частицу TiO_2 (1500 молекул TiO_2).

Иммобилизацию одноцепочечной ДНК на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композитах проводили в 200 мкл PBS (или специально указанного) буфера. К 20 мкл разбавленного $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита с концентрацией по TiO_2 0.5 мг/мл (4.16 нмоль/мл, 10 мкг, 0.083 нмоль) добавляли 10–50 мкл (1 нмоль) “холодного” или радиоактивно меченого $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{ДНК}$ олигонуклеотида, добавляли 20 мкл соответствующего десятикратного буфера (PBS или TBS) и доводили объем реакционной смеси водой до 200 мкл. Пробу озвучивали ультразвуком в течение 10–20 с, выдерживали 5 мин при постоянном перемешивании при комнатной температуре, затем осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при скорости вращения 12 тыс. об./мин. Супернатант собирали и, в случае использования “холодного” ДНК олигонуклеотида, измеряли оптическое поглощение супернатанта при 260 нм. По полученной величине вычисляли остаточное количество не иммобилизовавшейся ДНК и, соответственно, долю ДНК, иммобилизовавшейся на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите. В случае радиоактивно-меченой ДНК измеряли отдельно радиоактивность супернатанта и осадка. По соотношению радиоактивности в супернатанте и осадке определяли долю не иммобилизовавшейся ДНК и, соответственно, долю ДНК, иммобилизовавшейся на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композите. Эффективность иммобилизации ДНК на TiO_2 -PL-композитах TBS-буфере при мольных соотношениях PL – TiO_2 , равных 1 : 1, 2 : 1 и 5 : 1, по этим данным составила 11, 29 и 30 нмоль/мг, соответственно.

Иммобилизацию ПНК в виде ДНК/ПНК-дуплекса на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композитах с различным мольным соотношением PL– TiO_2 проводили аналогично иммобилизации одноцепочечной ДНК в 200 мкл PBS (или другого указанного) буфера. К 20 мкл охлажденного до 0°C $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -композита с концентрацией по TiO_2 1 мг/мл (8.3 нмоль/мл, 20 мкг, 0.167 нмоль) добавляли 100 мкл заранее приготовленного охлажденного 20 мкМ $^{\text{Flu}}$ ПНК /ДНК-дуплекса (2 нмоль) и доводили объем реакционной смеси PBS или специально указанным буфером до 200 мкл. Пробу обрабатывали ультразвуком в течение 10–20 с, выдерживали 5 мин при постоянном перемешивании во льду, затем осадок отделяли цен-

трифугированием в течение 2 мин при скорости вращения ротора центрифуги 12 тыс.об./мин. Супернатант собирали и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны поглощения λ_{ex} равной 498 нм и длине волны излучения λ_{em} равной 517 нм. То же самое проводили и с контрольным калибровочным образцом Flu ПНК/ДНК-дуплекса, но с добавлением 20 мкл воды вместо суспензии $TiO_2 \cdot PL$ -композиата и измеряли общую интенсивность флуоресценции полученного раствора. По соотношению интенсивности флуоресценции в супернатанте и в контрольном образце вычисляли остаточное количество не иммобилизовавшегося Flu ПНК/ДНК-дуплекса и, соответственно, долю дуплекса, иммобилизовавшегося на $TiO_2 \cdot PL$ -композиате. В случае радиоактивно-меченной ДНК измеряли отдельно радиоактивность супернатанта и осадка. По соотношению радиоактивности в супернатанте и осадке определяли долю не иммобилизовавшейся ДНК и, соответственно, долю ДНК, иммобилизовавшейся на $TiO_2 \cdot PL$ -композиате. Полученные данные по эффективности иммобилизации Flu ПНК в виде ДНК/ Flu ПНК-дуплекса на $TiO_2 \cdot PL$ -композиатах с различным соотношением TiO_2 и PL в композиате представлены на рис. 3.

Приготовление образцов $TiO_2 \cdot PL \cdot ДНК/^{Flu}$ ПНК-композиата для трансфекции в клетки и конфокальной микроскопии. К 25 мкл охлажденного до 0°C $TiO_2 \cdot PL$ -композиата с мольным соотношением TiO_2-PL 1 : 2 и с концентрацией по TiO_2 4 мг/мл (0.100 мг) добавляли 25 мкл заранее приготовленного охлажденного до 0°C 40 мкМ (1 нмоль) Flu ПНК/ДНК-дуплекса (Flu ПНК/ДНК₁ или Flu ПНК/ДНК₂). Пробы обрабатывали ультразвуком в течение 10–20 с и добавляли 450 мкл среды IMDM без сыворотки и антибиотиков и сразу использовали для трансфекции в клетки. Часть приготовленного наноконпозиата до обработок им клеток отдельно анализировали конфокальной микроскопией (рис. 5). Для этой цели пробы разбавляли в 450 мкл PBS-уфера и затем аликвоту в виде капли помещали на предметное стекло и каплю сверху накрывали и прижимали покровным стеклом. Анализ частиц конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопией проводили на приборе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Использовали объектив 63x/1.40 Oil DIC M27 (рис. 5). Для сканирования использовали лазерную линию 488 нм без фильтра. Толщина оптических срезов 0.40 мкм.

Проникновение наноконпозиатов в эукариотические клетки и анализ клеток конфокальной микроскопией. За сутки до трансфекции клетки HeLa высевали в 8-луночные планшеты Lab-Tek™ Chambered Coverglass (по 8×10^3 клеток на лунку) и культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях в среде IMDM с 10% FBS-сывороткой, содержащей антибиотиков. Перед трансфекцией клетки промывали PBS и средой IMDM без

сыворотки и антибиотиков. После последней промывки добавляли к ним 500 мкл предварительно приготовленного $TiO_2 \cdot PL \cdot ДНК/^{Flu}$ ПНК-наноконпозиата в среде IMDM. Конечная концентрация пробы составляла 0.2 мг/мл по TiO_2 и 2 мкМ по ПНК или ПНК/ДНК-дуплексу, соотношение $TiO_2 - PL = 1 : 2$. Клетки с пробами инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях, затем клетки промывали средой IMDM и инкубировали следующие 24 ч в полноценной среде IMDM, содержащей FBS-сыворотку и антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 0.1 мкг/мл стрептомицина). Клетки промывали средой без FBS-сыворотки и антибиотиков и окрашивали цитозоль клеток красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red CMTPX (Invitrogen, США) (рис. 6б). Затем окрашивали ядра клеток с синим флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Invitrogen, США) (рис. 6а). Живые клетки сразу после окрашивания анализировали конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопией на приборе LSM 510 Meta (Zeiss, Германия) (рис. 6а–г). Использовали объектив 40x/1.30 Oil DIC и для сканирования лазерные линии 405, 488 и 543 нм; фильтры BP 420–480, BP 505–530, LP 560. Толщина оптических срезов 0.21 мкм. Флуоресцеин-меченные наноконпозиаты (зеленый цвет) в черно-белом варианте проявляются как белые точки (рис. 6б). Аналогичным образом проводили контрольные эксперименты с клетками с использованием свободной Flu ПНК без ее иммобилизации на наночастицах TiO_2 (рис. 6д–з).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Байбородину С.И. за помощь в проведении конфокальной флуоресцентной микроскопии образцов клеток, Лактионову П.П. за помощь при организации работы с клетками, Пышной И.А. за помощь при замере размера наночастиц. Работа поддержана интеграционным проектом СО РАН № 61, грантами РФФИ № 08-04-01045-а и № 11-04-01408а, а также Государственным контрактом № 16.512.11.2267.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nielsen P.E.* Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. Wymondam; United Kingdom: Horizon Bioscience, 2004.
2. *Shiraishi T., Nielsen P.E.* // Methods in Molecular Biology. 2011. V. 751. P. 209–221.
3. *Анципович С.И.* // Успехи химии. 2002. Т. 71. № 1. С. 81–96.
4. *Demidov V.V., Potaman V.N., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchard O., Sönnichsen S.H., Nielsen P.E.* // Biochem. Pharmacol. 1994. V. 48. P. 1310–1313.
5. *Hamilton S.E., Iyer M., Norton J.C., Corey D.R.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996. V. 6. P. 2897–2900.

6. Koppelhus U., Nielsen P.E. // Adv. Drug Deliv Rev. 2003. V. 55. P. 267–280.
7. Богданенко Е.В., Свиридов Ю.В., Московцев А.А., Жданов Р.И. // Вопросы медицинской химии. 2000. № 3. С. 226–245.
8. Järver P., Langel U. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. P. 260–263.
9. Torchilin V.P. // AAPS J. 2007. V. 9. P. E128–E147.
10. Кузнецова С.А., Орецкая Т.С. // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 9–10. С. 40–52.
11. Liua G., Swierczewskaa M., Leea S., Chena C. // Nano Today. 2010. V. 5. P. 524–539.
12. Torchilin V.P. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. Series: Fundamental Biomedical Technologies. V. 4. 2008. XIV. 474 p.
13. Cai R., Hashimoto K., Itoh K., Kubota Y., Fujishima A. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991. V. 64. P. 1268–1273.
14. Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y. // 2007 / Environ. Sci. Technol. V. 41. P. 3018–3024.
15. Rajh T., Chen L.X., Lukas K., Liu T., Thurnauer M.C., Tiede D.M. // J. Phys. Chem. B. 2002. V. 106. P. 10543–10552.
16. Zhao D., Chen C., Wang Y., Ji H., Ma W., Zang L., Zhao J. // J. Phys. Chem. C. 2008. V. 112. P. 5993–6001.
17. Roddick-Lanzilotta A.D., McQuillan A.J. // J. Colloid Interface Sci. 1999. V. 217. P. 194–202.
18. Levina A., Ismagilov Z., Repkova M., Shatskaya N., Shikina N., Tusikov F., Zarytova V. // J. Nanosciences Nanotechnology. 2011. V. 11. P. 1–9.
19. Зарытова В.Ф., Зиновьев В.В., Исмагилов З.Р., Левина А.С., Репкова М.Н., Шикина Н.В., Евдокимов А.А., Беланов Е.Ф., Балахнин С.М., Серова О.А., Байбородин С.И., Малыгин Э.Г., Загребельный С.Н. // Росс. нанотехнологии. 2009. Т. 4. С. 160–163.
20. Arora H.C., Jensen M.P., Yuan Y., Wu A., Vogt S., Paunesku T., Woloschak G.E. // Cancer Res. 2012. Jan 18. [Epub ahead of print]. PMID:22158944.
21. Jeng H.A., Swanson J.J. // Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst. Environ. Eng. 2006. V. 41. P. 699–711.
22. Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. // Chemosphere. 2008. V. 71. P. 1308–1136.
23. Liu H., Ma L., Zhao J., Liu J., Yan J., Ruan J., Hong F. // Biol Trace Elem Res. 2009. V. 129. P. 170–180.
24. Brown E.M., Paunesku T., Wu A., Thurn K.T., Haley B., Clark J., Priester T., Woloschak G.E. // Anal Biochem. 2008. V. 383. P. 226–235.
25. Paunesku T., Rajh T., Wiederrecht G., Maser J., Vogt S., Stojicevic N., Protic M., Lai B., Oryhon J., Thurnauer M., Woloschak G. // Nat Mater. 2003. V. 2. P. 343–346.
26. Amirkhanov N.V., Zhang K., Aruva M.R., Thakur M.L., Wickstrom E. // Bioconjug. Chem. 2010. V. 21. P. 731–740.
27. Amirkhanov N., Dimitrov I., Opitz A.W., Lai S., Wagner N.J., Thakur M.L., Wickstrom E. // Biopolymers. 2008. V. 89. P. 1061–1076.
28. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E. // Nature. 1993. V. 365. P. 556–568.
29. Giesen U., Kleider W., Berding C., Geiger A., Orum H., Nielsen P.E. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 5004–5006.
30. Rajh T., Saponjic Z., Liu J., Dimitrijevic N.M., Scherer N.F., Vega-Arroyo M., Zapol P., Curtiss L.A., Thurnauer M.C. // Nano Letters. 2004. V. 4. P. 1017–1023.
31. Kotsokochagia T., Cellesi F., Thomas A., Niederberger M., Tirelli N. // Langmuir 2008. V. 24. P. 6988–6997.
32. Richards E. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids / Ed / Fasman G.D. Cleaveland: CRC Press. 1975. V. 1. P. 589.
33. Chan W.C., White P.D. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach. New-York, USA: Oxford University Press Inc., 2000.
34. Perbal B. A Practical Guide to Molecular Cloning. New York: Academic Press Inc., 1984.
35. Tadjiki S., Assemi S., Deering C.E., Veranth J.M. Miller J.D. // J. Nanopart. Res. 2009. V. 11. P. 981–988.
36. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., McNeil-Watson F.K., Nobbmann U. // J. Nanopart. Res. 2008. V. 10. P. 823–829.

Composites of Peptide Nucleic Acids with titanium dioxide nanoparticles.

I. Construction of Nanocomposites Containing DNA/PNA Duplexes and Their Delivery into *HeLa* Cells

N. V. Amirkhanov^{a, b}, R. N. Amirkhanov^{a, b}, V. F. Zarytova^{a, b, #}

[#]Phone: (383) 363-51-24; fax: (383) 363-51-53; e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

^aInstitute of chemical biology and fundamental medicine, Siberian Branch of RAS, Lavrentiev Ave. 8, Novosibirsk, 630090, Russia

^bNovosibirsk State University, Pirogova st. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

In order to investigate the possibility of using titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles to transport peptide nucleic acids (PNA) in eukaryotic cells, a PNA oligomer has been synthesized, and method of PNA immobilization in the form of hybrid DNA/PNA duplexes on the surface of TiO₂ nanoparticles covered with polylysine (PL) has been designed. Attaching of DNA/PNA duplex on TiO₂ · PL nanoparticles occurred due to *electrostatic interactions* between the negatively charged DNA chain and the positively charged amino groups of PL. Binding of the PNA with the nanocomposite achieved through *noncovalent Watson-Crick* interactions between the PNA and complementary DNA. The capacity of obtained TiO₂ · PL · DNA/PNA nanocomposites depending on immobilization conditions was 10–30 nmol PNA per 1 mg of TiO₂ particles, which corresponds to ~1–3 PNA molecules per one TiO₂ particle with size of 4–6 nm. By method of confocal laser scanning microscopy on the example of the fluorescein labeled PNA oligomer ^{Flu}PNA it has been shown that the PNA molecules in composition of TiO₂ · PL · DNA/^{Flu}PNA nanocomposites effectively penetrate and accumulate in *HeLa* cells without the use of transfection agents, electroporation, or other auxiliary procedures has been shown.

Keywords: nanoparticles; titanium dioxide; PNA; cell delivery; polylysine; confocal laser scanning microscopy.