

НАНОПОЛІМЕРИ НА ОСНОВІ ПОЛІ-ДМАЕМ – ПЕРСПЕКТИВНІ ВЕКТОРИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ У РОСЛИННІ КЛІТИНИ

Водорозчинні розгалужені полімери на основі полі-ДМАЕМ (N,N-диметиламіноетил метакрилату) широко використовують у водних системах керованої доставки ліків та ДНК у цільові клітини, тканини або органи-мішені [1]. Такі важливі характеристики нанополімерних носіїв, як оптимальне співвідношення їх ціни до ефективності трансдукції, доступність для застосування, низька алергенність та, насамперед, здатність полімерів зв'язувати нуклеїнові кислоти, що не залежить від розміру молекул ДНК, значно поліпшують ефективність доставки фізіологічно активних речовин, що на даний час робить нанополімерні олігоелектроліти більш сприятливими біологічними векторними системами в порівнянні із векторами на основі вірусних частинок [2]. Але, на жаль, ефективність поглинання клітинами комплексів ДНК із нанорозмірними носіями була підтверджена в більшості випадках в експериментах *in vitro* та на культурах клітин ссавців, у той час як у дослідженнях *in vivo* використання поліплексних комплексів обмежене такими проблемами, як тенденція до агрегації та адсорбції наночастинок

до непроникних поверхонь, порушення процесу вивільнення наноконструктивів із ендосом, цитотоксичність високих концентрацій нанополімерів для деяких типів клітин [2].

Актуальність даної роботи полягає у дослідженні цитотоксичного впливу нових синтезованих нанополімерів типу BG-2, BG-2с, BG-2f, BG-2сq, BG-2cf, MP-1 та 83/6 на основі полі-ДМАЕМ на різні типи рослинних клітин, а також у визначенні ефективності трансформації протопластів тютюну (*Nicotiana tabacum L.*) за використання полімерів даного типу.

Матеріали і методи

Нанополімери на основі полі-ДМАЕМ. Олігоелектролітні носії (Рис. 1) були синтезовані шляхом контрольованої радикальної полімеризації у полярному органічному розчиннику під інертною атмосферою із аргону [3].

Плазмідна ДНК. У якості плазмідної ДНК використовували бінарний вектор *pGreen 0029* [4], що містив послідовність репортерного гена жовтого флуоресцентного білка *yfp* (yellow fluorescent

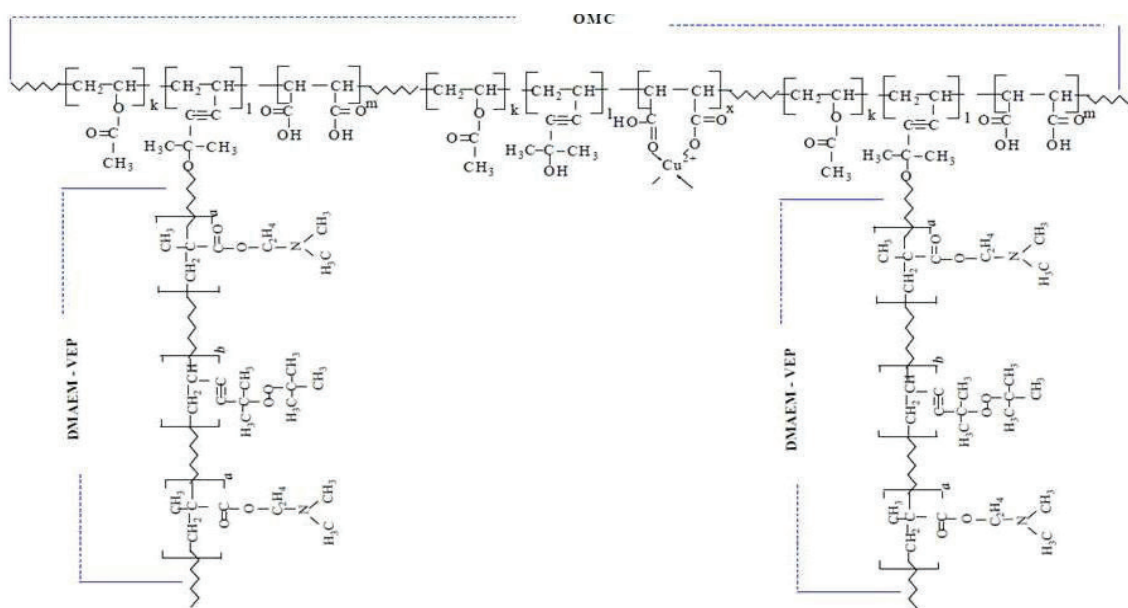


Рис. 1. Загальна схема структури молекули полі-ДМАЕМ



Рис. 2. Схема конструкції pGreen0029 (г tip yfp): LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК, nos – промоторні та термінаторні послідовності нопалінсинтази, *nptII* – ген стійкості до канаміцину, P35S – 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), *yfp* – ген жовтого флуоресцентного білка, *γ tip* – ген білка tonoplast intrinsic protein, CaMV PolyA – термінатор ВМЦК.

protein), зливу з послідовністю гена мембранного білка *γ TIP* (tonoplast intrinsic protein) під контролем 35S промотора та термінатора вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК), а також селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до антибіотика канаміцину, під контролем промотора та термінатора нопалінсинтази (рис. 2).

Рослинний матеріал. Для ізолювання протопластів використовували вирощені в умовах *in vitro* рослини *N. tabacum L.* Для цього насіння тютюну стерилізували у 5%-ному розчині гіпохлориту натрію та вирощували на базовому агаризованому середовищі Мурасіге-Скуга [5] протягом місяця. Після того, як листкові пластинки рослин тютюну досягали площі 1,5–2,5 см², їх використовували для подальшого виділення протопластів.

Виділення протопластів. Протопласти виділяли відповідно до методики [6]. Молоді листки тютюну нарізали тонкими смужками та витримували у суміші ферментів 0,6% Celullase Onozuka R-10 (Serva) та 0,3% Driselase (Sigma) на основі розчину 0,5 М сахарози та 5мкМ CaCl₂ у темряві за температури 26 °С протягом 16–17 год. Надалі протопласти відмивали від ферментної суміші та ресуспендували після центрифугування у розчині W5 (154 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 125 мМ CaCl₂; 5 мМ глюкози; рН 5,7) [7].

Трансформація протопластів тютюну комплексами плазмідної ДНК із носіями полі-ДМАЕМ. На пластикові чашки Петрі діаметром 35 мм наносили 300–400 мкл суспензії протопластів. Концентрація клітин у суспензії складала 4*10⁶ – така концентрація є оптимальною для проведення трансформації за використання поліетиленгліколю. У кожну чашку Петрі додавали по 10 мкл розчинів комплексів плазмідної ДНК *pGreen 0029* (1 мкг/мкл) із полімерами BG-2cf, BG-2f, BG-2q, BG-2cq, BG-2c, MP-1 та 83/6 в концентраціях 0,01, 0,1, 0,25 та 0,5% та інкубували їх протягом 10 хв. Після інкубації до розчину із протопластами та наночастинками додавали середовище 8p [8] у співвідношенні 1:1 та залишали на добу у темря-

ві за температури 24 °С. Ефективність полі-ДМАЕМ-опосередкованої трансформації протопластів оцінювали візуально за інтенсивністю флуоресценції білка YFP, яку спостерігали за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), об'єктиву 20X та світлофільтру Fs 44 HE 5 [9].

Тест на цитотоксичність. Здатність нанополімерів викликати загибель клітин оцінювали після обробки протопластів стоковим розчином пропідій йодиду (5 мкг/мкл) [10]. Життєздатність клітин оцінювали при 200-кратному збільшенні за лізисом протопластів у неполяризованому світлі, а також за флуоресценцією ядер під світлофільтром Fs 15 HE 3 [9].

Статистична обробка даних. Кількісне оцінювання отриманих даних експериментів із визначення ефективності трансформації та цитотоксичних впливів нанополімерів на протопласти тютюну було здійснено за використання камери Горяєва та програмного пакету Microsoft Office Excel 2007. Для кожної концентрації носіїв було обраховано по 300 клітин, досліди проводили у трьох повторностях.

Результати та обговорення

Якісна оцінка ефектів впливу комплексів нанополімерів на основі полі-ДМАЕМ із плазмідною ДНК на протопласти *N. tabacum*. Через добу культивування протопластів тютюну із комплексами плазмідна ДНК/полі-ДМАЕМ у контрольних зразках з додаванням лише 10 мкг плазмідної ДНК більшість клітин мала ідеальну сферичну форму із хлоропластами, рівномірно розподіленими по всій цитоплазмі (рис. 3. А). При внесенні в клітинну суспензію незначних концентрацій (0,01 та 0,1%) нанополімерів спостерігали деформацію мембран протопластів та втрату ними сферичної форми (рис. 3. Б).

При додаванні більш високих концентрацій носіїв в комплексі із ДНК (0,25 та 0,5%) спостерігався лізис клітин (рис. 3. В) та формування значних за розмірами конгломератів із клітинного дебрису. Крім того, при додаванні нанополімерів

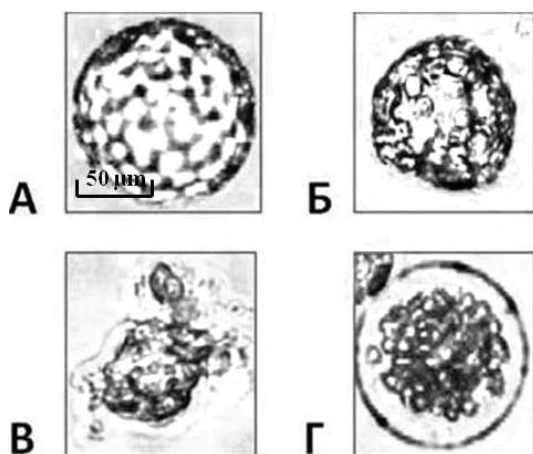


Рис. 3. Цитотоксичні ефекти впливу нанополімерів на протопласти: А – протопласти ідеальної сферичної форми у відсутності впливу носіїв (контроль); Б – клітини з незначною деформацією плазматичної мембрани; В – лізис протопластів; Г – скупчення хлоропластів біля центру клітини

типу 83/6 у концентраціях 0,01, 0,1, 0,25 та 0,5% у клітинах спостерігалось скупчення хлоропластів у центрі протопластів (рис. 3. Г).

Кількісна оцінка токсичного впливу комплексів ДНК/полі-ДМАЕМ на протопласти *N. tabacum*. Для кожного із семи типів нанополімерів та для кожної із досліджуваних концентрацій у 0, 0,01, 0,1, 0,25 та 0,5 % . Обраховані клітини умовно було поділено на три групи: неушкоджені (живі), деформовані та мертві. При додаванні до клітинної суспензії концентрації у 0,1 % носіїв BG-2f, BG-2cq, MP-1, BG-2q, 83/6 кількість живих клітин була близькою до 50 %, а вже при додаванні тих самих полімерів у концентрації 0,25 % кількість живих клітин була нижчою за кількість пошкоджених. Саме тому за концентрації у 0,1 % виконували подальші порівняння цито-

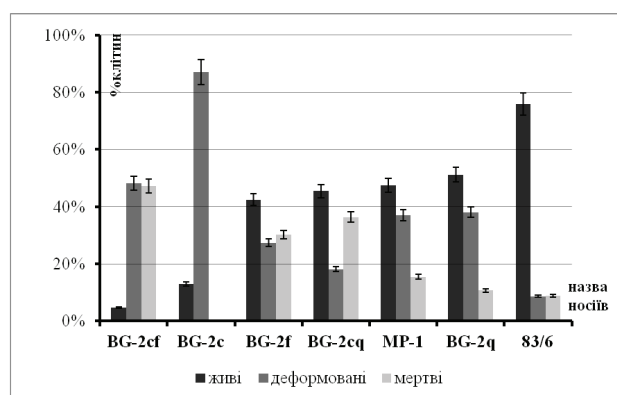


Рис. 4. Порівняння впливу полімерів на протопласти тютюну

токсичних та трансформуючих властивостей носіїв. Із семи наноконкомпозитів, використаних в дослідженні, за концентрації 0,1% найбільш суттєво на життєздатність протопластів впливали полімери типу BG-2cf та BG-2c. При додаванні 0,1 % нанополімерів типу BG-2f, BG-2cq та MP-1 до протопластів, кількість живих клітин складала приблизно 40–50 %. При додаванні концентрації 0,1 % нанополімерів типу BG-2q та 83/6 до культури протопластів, кількість живих клітин була вищою за 50 %, тому носії BG-2q та 83/6 були віднесені до найменш токсичних для протопластів *N. tabacum*. Отже, із всіх досліджених полімерів, композити типу 83/6 мали найменший вплив на життєздатність клітин – у концентрації 0,1 % цих полімерів сумарна кількість пошкоджених клітин складала 24,1 %. У результаті порівняння цитотоксичного впливу нанополімерів на протопласти тютюну за концентрації 0,1 % носіїв було виявлено, що цитотоксичність досліджуваних типів носіїв зменшувалась у наступному порядку: BG-2cf, BG-2c, BG-2f, BG-2cq, MP-1, BG-2q, 83/6 (рис. 4). Токсичність різних типів наноносіїв, за умов використання однакової концентрації, варіювала, очевидно, у зв'язку із відмінностями їх хімічної будови. Так, носії, що демонстрували найнижчу токсичність – такі, як 83/6 та MP-1, мали у своїй будові менш короткі нерозгалужені бічні ланцюги, тоді як бічні ланцюги більш токсичних носіїв, а саме носіїв групи BG, були довгими та розгалуженими.

Кількісна оцінка ефективності транзйентної трансформації протопластів *N. tabacum* за використання комплексів ДНК/полі-ДМАЕМ. За використання концентрації у 0,1 % полімерів типів BG-2cf, BG-2c, BG-2f, BG-2q, BG-2cq, MP-1, 83/6 було виконано порівняння ефективності перенесення векторної конструкції *pGreen 0029*. Ефективність транзйентної трансформації протопластів тютюну оцінювалась через 24 год після проведення трансформації за флуоресценцією білка YFP.

Як видно із рис. 5, найвищу ефективність перенесення трансгена у протопласти тютюну демонстрували наноносії типу 83/6 – транзйентна експресія білка YFP детектувалась у 12% протопластів. За використання інших наноносіїв, частка протопластів, у яких було виявлено транзйентну експресію гена *yfp*, зменшувалась у наступному порядку: BG-2q, BG-2f, BG-2c, BG-2cf (рис. 5).

Висновки

У даній роботі було досліджено можливість використання полімерних наноносіїв на основі ДМАЕМ у якості переносників екзогенних ДНК у рослинні протопласти. Було встановлено помірну

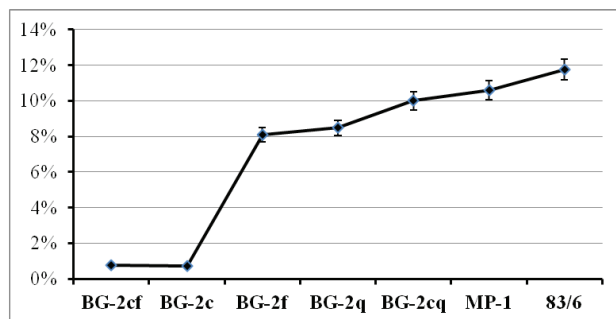


Рис. 5. Частка протопластів *N. tabacum*, трансформованих при використанні полімерів на основі ДМАЕМ в концентрації 0,1 %

токсичність наночасинок для протопластів, що варіювала залежно від типу використаного носія. Най-

меншу токсичність демонстрували носії 83/6, BG-2q, MP-1, токсичність решти досліджених полімерів зростала у наступному порядку: BG-2c, BG-2f, BG-2c, BG-2cf. У результаті проведення генетичної трансформації протопластів комплексами ДНК з різними наночасинками було показано транзиторну експресію білка YFP у протопластах тютюну. Також було встановлено, що використання полімерів із найменшим ступенем токсичності для протопластів в якості носіїв ДНК сприяє більш ефективному перенесенню трансгена. Так, найбільшу кількість протопластів, у яких було зареєстровано транзиторну експресію білка YFP, було відмічено за використання полімерів 83/6 у якості носіїв ДНК.

ЛІТЕРАТУРА

1. Скорохода Т.В. Поверхнево-активні α -аралкілпероксидовмісні телехелатні олігоелектроліти та блок-кополімери на їхній основі: автореферат дисертації на здобуття наук. ступ. канд. хім. наук. – Нац. університет «Львівська політехніка». – 2009 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ena.lp.edu.ua:8080/handle/ntb/3213>.
2. Agarwal S., Zhang Y., Maji S., Greiner A. PDMAEMA based gene delivery materials // Elsevier. – 2012. – 15, N 9. – P. 388–393.
3. Kas'yanenko N., Perevyazko I., Blokova M., Zyryanova I.M. Nanomaterials for Application in Medicine and Biology // Biofizika. – 2008. – 229. – P. 53–61.
4. Hunter P., Craddock C., Benedetto S., Roberts L., Frigerio L. Fluorescent Reporter Proteins for the Tonoplast and the Vacuolar Lumen Identify a Single Vacuolar Compartment in Arabidopsis Cells // Plant Physiology. – 2007. – 145. – P. 1371–1382.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
6. Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Rudas V.A., Gleba Y.Y., Blume Ya.B. Transfer of amiprofosmethyl resistance from a *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridisation // Theor Appl Genet. – 2000. – 100. – P. 847–857.
7. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana glauca* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // Theoretical and Applied Genetics. – 1981. – 59. – P. 191–195.
8. Kao K., Michayluk M. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. – 1975. – 126. – P. 105–112.
9. Operating manual. Axioskop 40/Axioskop 40 FL. Routine microscope [Електронний ресурс] // Carl Zeiss Light Microscopy. – 2001. – Режим доступу: <http://www.microscopy-news.com/news/carl-zeiss-axioskop-40-axioskop-40-fl-routine-microscope.html>.
10. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain [Електронний ресурс] // Invitrogen Molecular Probes. – 2006. – Режим доступу: <https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/PI.pdf>.

BUZIASHVILI A.YU.¹, FINIUK N.S.², STOIKA R.S.², BLUME YA.B.¹, YEMETS A.I.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: flora16.92@mail.ru

² Institute of Cell Biology, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanova str., 14/16

PDMAEMA BASED NANOPOLYMERS ARE PROMISING VECTORS FOR DELIVERY OF GENETIC MATERIAL INTO PLANT CELLS

Aims. Water soluble grafted polymers based on PDMAEMA (N,N-polydimethylaminoethyl metacrylate) are widely used in water systems for DNA and drug delivery to a target organs, tissues and cells. The significance of this research was in study of transformation efficiency and cytotoxic effects of novel synthesized PDMAEMA based nanoparticles, namely: BG-2, BG-2c, BG-2f, BG-2cq, BG-2cf, MP-1 and 83/6 on *Nicotiana tabacum* L. protoplasts. **Methods.** In the process of this study there was developed a new method of protoplast transformation with the use of PDMAEMA based nanoparticles. Moreover, there were used standart plant cell culture and fluorescence light microscopy methods. **Results.** The most effective for protoplast transformation was nanoparticles of 83/6 type in concentration of 0.1 %. Such transformation conditions showed the best efficiency and did not lead to significant effects on protoplast morphology. **Conclusions.** Finally, in a further studies related to the use of PDMAEMA based nanoparticles in plant transformation there should be used nanoparticles of 83/6 type in concentration of 0.1 %.

Keywords: PDMAEMA, protoplasts, plasmid DNA, plant transformation.