

Received: 2010.01.18
Accepted: 2010.03.15
Published: 2010.03.31

Surfaktanty gemini jako nośniki genów*

Gemini surfactants as gene carriers

Teresa Piskorska, Ewa Obłąk

Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Surfaktanty gemini stanowią stosunkowo nową klasę związków amfifilowych, złożonych z dwóch cząsteczek klasycznego związku powierzchniowo czynnego połączonych częścią łącznikową. Związki te bardzo łatwo łączą się z DNA tworząc kompleksy i efektywnie pośredniczą w procesach transfekcji. Dzięki swojej budowie nośniki oparte na nich mogą dostarczać niemal dowolnej wielkości DNA, co nie jest możliwe przy zastosowaniu wektorów wirusowych. Ponadto, są one znacznie bezpieczniejsze dla żywych organizmów, z punktu widzenia działań niepożądanych.

Słowa kluczowe:

surfaktanty gemini • czwartorzędowe sole amoniowe • nośniki genów • transfekcja

Summary

Gemini surfactants are a new class of amphiphilic compounds built from two classic surfactant moieties bound together by a special spacer group. These compounds appear to be excellent for creating complexes with DNA and are effective in mediating transfection. Thanks to their construction, DNA carrier molecules built from gemini surfactants are able to deliver genes to cells of almost any DNA molecule size, unattainable when using viral gene delivery systems. Moreover, they are much safer for living organisms.

Key words:

gemini surfactants • quaternary ammonium salts • gene carriers • transfection

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=907946>

Word count:

2949

Tables:

–

Figures:

2

References:

31

Adres autorki:

dr Ewa Obłąk, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: ewa.oblak@microb.uni.wroc.pl

* Praca częściowo finansowana z grantów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N303 068 534 oraz nr N N209 337 737.

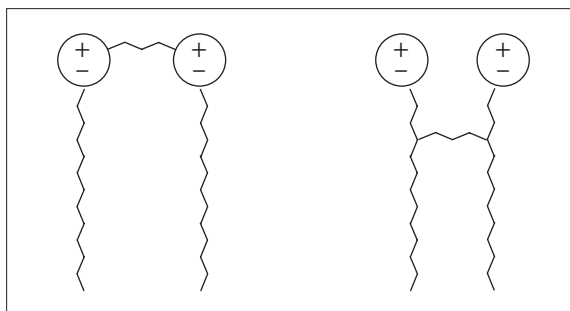
1. WSTĘP

Rozwój genetyki i inżynierii genetycznej w ostatnich latach zaowocował odkryciem licznych technik pozwalających na dostarczanie kwasów nukleinowych do komórek docelowych. Mimo że część z nich stała się już rutynowymi procedurami, to wciąż poszukiwane są nowe, bardziej efektywne strategie dostarczania genów. Najprostszą metodą dostarczenia do komórki fragmentów DNA jest ich bezpośrednie podanie, niestety niska wydajność tej metody jest przyczyną, dla której konieczne jest zastosowanie odpowiednich systemów, zapewniających ochronę podawanego fragmentu DNA przed degradacją i zwiększających efektywność transfekcji. Dodatkowo system taki powinien być jak najbardziej bezpieczny i możliwy do zastosowania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Niestety wiele stosowanych dotąd metod nie spełnia wszystkich wymogów bezpieczeństwa lub jest za mało wydajna by mogły być z powodzeniem stosowane w próbach *in vivo*. Coraz większa popularność terapii genowej, niesie ze sobą rozwój strategii dostarczania genów, w tym także niewirusowych. W porównaniu z niosącymi ryzyko wektorami wirusowymi syntetyczne nośniki genów są łatwiejsze w przygotowaniu, nie zagrażają mutagenozą, nie są immunogenne i charakteryzują się wysokim stopniem biodegradacji. Dzięki tym cechom stają się coraz bardziej popularne. Jedną z takich nowo opracowanych technik jest użycie, jako nośnika DNA surfaktantów gemini. Jest to grupa związków powierzchniowo czynnych, w których dwie cząsteczki standardowego surfaktantu zostały ze sobą połączone odpowiednią grupą chemiczną. Dzięki swojej charakterystycznej budowie wykazują one niezwykłą zdolność do tworzenia stabilnych kompleksów z kwasami nukleinowymi i wydajnego pośredniczenia w transfekcji [5,8,11,20,30].

2. BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE SURFAKTANTÓW GEMINI

Surfaktanty gemini stanowią stosunkowo nową klasę związków amfifilowych. W swojej budowie zawierają dwie grupy hydrofilowe (tzw. „główki” – head group) i dwa alifatyczne łańcuchy połączone razem sztywnym, bądź bardziej podatnym na odkształcenia łącznikiem [8,13]. Jako łączniki wykorzystywane mogą być wszelkie wiązania mające dwulamaną symetrię lub wykorzystujące dwie jednakowe cząsteczki (często wykorzystuje się np. mostki dwusiarczkowe, amidy itd.), ich modyfikacja wpływa między innymi na stopień biodegradacji surfaktantów gemini. Grupa łącząca dwie cząsteczki związku powierzchniowo czynnego, może wiązać dwie hydrofilowe główki lub łączyć cząsteczki pod nimi, pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi (ryc.1).

Grupy jonowe tak zbudowanych surfaktantów mogą być kationowe (np. grupy amoniowe) lub anionowe (np. grupy fosfatylowe), można stosować również grupy polarne nienaładowane, takie jak cukry czy polietyery. Długie hydrofobowe łańcuchy alkilowe surfaktantów gemini zwykle zbudowane są z kwasów tłuszczowych [5,30]. Z ich długością wzrasta powierzchniowa czynność związku [5,23,30]. Wzrost hydrofobowości może jednak powodować nierozpuszczalność związku, z kolei zwiększenie hydrofilowości główek polarnych zwiększa ją. Podobnie działa obecność grup hydrofilowych w części łącznikowej surfaktantu



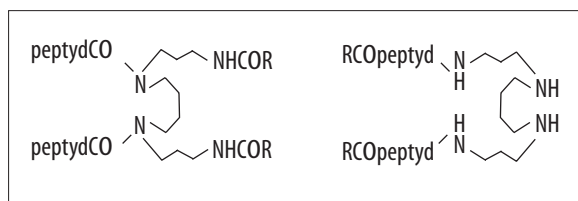
Ryc. 1. Model budowy cząsteczki surfaktantu gemini

gemini [5,30]. Dzięki swoistej budowie surfaktantów gemini możliwe jest dowolne operowanie ich budową i otrzymywanie związków o różnorodnych właściwościach.

Surfaktanty gemini są w stanie niezwykle wydajnie obniżyć napięcie powierzchniowe, ich powierzchniowa czynność jest nawet 1000-krotnie wyższa niż w przypadku konwencjonalnych surfaktantów [14,23,30]. Dodatkowo wykazują one zdolność do tworzenia stabilnych miceli w znacznie niższych stężeniach i są znacznie lepiej rozpuszczalne od większości „tradycyjnych” związków amfifilowych. Wiele z nich charakteryzuje się również wysokim stopniem biodegradacji [10,14,19,23,30]. W przeciwieństwie do swoich monomerycznych odpowiedników, które w roztworach wodnych formują sferyczne micelle surfaktanty gemini mogą przyjmować znacznie bardziej rozbudowane struktury np. przechodzą w fazę odwróconą heksagonalną. Dzieje się tak dzięki pewnej elastyczności grup łączących dwa monomery, co pozwala na odkształcanie się cząsteczek [7,11]. Jedną z grup surfaktantów gemini, które tworzą w roztworach bardzo różnorodnie struktury są te zawierające grupy węglowodanowe. Rodzaj stworzonych przez nie form zależy ściśle od pH roztworu, mogą to być małe stabilne pęcherzyki, duże cylindryczne lub małe globularne micelle [6]. Uformowane przez surfaktanty gemini micelle charakteryzują się również o wiele większą stabilnością i długością życia, niż te formowane przez związki monomeryczne [4,10].

2.1. Surfaktanty gemini, jako środki dezynfekujące i konserwujące

Wiele z surfaktantów gemini ma wyjątkowe właściwości antybakteryjne skierowane zarówno przeciwko bakteriom G^+ jak i G^- , mają także zdolności grzybobójcze. Najsilniejsze właściwości bakteriobójcze wobec mikroorganizmów wykazują surfaktanty gemini oparte na czwartorzędowych solach amoniowych (CSA), ich pojedyncze odpowiedniki mają silne działanie bakteriobójcze, grzybobójcze, hamują również wzrost drożdży poprzez inhibicję H^+ -ATP-azy [15,16,21,31]. Dzięki tym właściwościom CSA stosowane były od lat, jako środki dezynfekujące, czyszczące i konserwujące. Jednak związki typu gemini są bardziej efektywne i mają szerszy zakres działania. Oprarte na CSA surfaktanty gemini są w stanie hamować wzrost bakterii już w znacznie niższych stężeniach niż związki monomeryczne [21,24,31]. Efektywność bakteriobójcza surfaktantów gemini zmienia się w zależności od długości i typu grupy łączącej dwie bliźniacze podjednostki cząsteczki. W przeciwieństwie do pojedynczych CSA, obecność



Ryc. 2. Schemat budowy niektórych surfaktantów gemini wykazujących największą efektywność transfekcji

dwóch łańcuchów hydrofobowych i podatnego na odkształcenia łącznika w ich odpowiednikach gemini, wzmacnia zdolności do agregacji i adsorpcji, a w efekcie do destabilizacji błony cytoplazmatycznej [22]. Właściwości bakteriobójcze wykazują również surfaktanty gemini oparte na kwasach żółciowych. Mechanizm ich oddziaływania na komórki bakteryjne nie jest jeszcze dokładnie poznany, przypuszcza się, że dużą rolę odgrywają w nim oddziaływania elektrostatyczne między cząsteczkami surfaktantu, a ujemnie naładowanymi cząsteczkami na powierzchni błon komórkowych bakterii [17].

2.2. Budowa i właściwości surfaktantów gemini wykorzystywanych jako nośniki genów

Dzięki niemalże nieograniczonym możliwościom modyfikacji budowy surfaktantów gemini, możliwe jest otrzymanie związków o nieco innym charakterze niż te powszechnie wykorzystywane przez lata do dezynfekcji, konserwacji itd. Zmiana grup budujących główki surfaktantu może powodować nadanie cząsteczkom odmiennych właściwości, na przykład pochodne amin zawierające w główce reszty cukrowe stają się doskonałymi nośnikami genów i nie wykazują właściwości bakteriobójczych [20]. Zwykle surfaktanty gemini służące jako nośniki DNA buduje się w oparciu o naturalnie występujące w komórkach, związki takie jak kwasy tłuszczowe, α -aminokwasy, lipidy, węglowodany. Pozwala to na maksymalne ograniczenie potencjalnej cytotoksyczności oraz wpływa na ich wysoki stopień biodegradacji [8]. Dotychczas przebadano pod kątem transferu DNA około 250 grup surfaktantów gemini, a wśród nich można wyróżnić około 20 odrębnych typów strukturalnych. Większość z nich wykazała stosunkowo dużą wydajność w transfekcji *in vitro* [27].

Spośród tych 20 typów związków przebadanych pod kątem przenoszenia genów, najdokładniej poznano cztery z nich. Są to surfaktanty oparte na syntetycznych dimerach cysteiny, oparte na N,N' -bis(3-aminopropyl)butano-1,4-diaminie, aminach i otrzymywane z symetrycznych kwasów dikarboksylowych (ryc. 2). W większości z nich główki zbudowane są z kationowych polipeptydów, które na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych wiążą się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwasów nukleinowych [8,18,20].

3. SURFAKTANTY GEMINI JAKO POTENCJALNE NOŚNIKI GENÓW

Surfaktanty gemini mogą kompleksować DNA w stężeniach znacznie niższych od tradycyjnych związków amfifilowych. Proces ten opiera się w ich przypadku na oddziaływaniach małych skupisk cząsteczek surfaktantu z DNA. Wiązanie odbywa się dzięki przyciąganiu elektrostatycznemu (głównie obdarzonych ładunkiem główek)

i oddziaływaniom hydrofobowym. Proces ten okazuje się najbardziej wydajny dla związków, które agregują w jak najniższych stężeniach, tak jak większość surfaktantów gemini. Wykazano, że pojedyncze surfaktanty są znacznie mniej wydajne w kompleksowaniu DNA niż ich odpowiedniki gemini. Wyróżniamy kilka rodzajów struktur, jakie przyjmują kompleksy surfaktant-DNA, zależą one od budowy związku powierzchniowo czynnego [8]. Surfaktanty gemini mające w swojej budowie aminy, głównie czwartorzędowe sole amoniowe tworzą z DNA kompleksy o strukturze lamellarnej z cząsteczką kwasu nukleinowego zamkniętą wewnątrz dwuwarstwy utworzonej przez cząsteczki surfaktantu lub formują odwrócone heksagonalne struktury, gdzie DNA otoczone jest cylindrycznymi micellami (badania spektrofotometryczne z użyciem wąskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego). Przyjmowanie przez kompleksy odpowiedniej struktury zależy między innymi od stosunku molowego surfaktantu do kwasów nukleinowych i budowy cząsteczek łącznikowych [21,26,27]. Zdolność do przyjmowania przez lipopleksy utworzone z surfaktantów gemini, danej struktury w dużej mierze zależy od charakteru łącznika. Surfaktanty gemini mające łącznik polimetylenowy oraz główkę zbudowaną z czwartorzędowych soli amoniowych, przyjmowały strukturę lamellarną lub odwróconą heksagonalną w zależności od długości łącznika. Im dłuższy jest łącznik między dwoma pojedynczymi cząsteczkami surfaktantu tym bardziej podatne na odkształcenia są z nich uformowane lipopleksy. Taki łącznik jest w stanie zmienić konformację lipopleksu, redukując kontakt grup węglodorowych z wodą, co skutkuje przyjęciem przez kompleks odwróconej struktury heksagonalnej [25]. Dla większości surfaktantów gemini opartych na peptydach, podobnie jak dla tych opartych na symetrycznych kwasach dikarboksylowych, zawierających bardziej sztywną część łącznikową, obserwuje się jedynie lipopleksy o fazie lamellarnej. Łącznik polimetylenowy nadaje również zdolność do przybierania odwróconej heksagonalnej fazy surfaktantom gemini zawierającym główki cukrowe, które dodatkowo wykazują możliwość zmiany fazy lipopleksu w zależności od pH otoczenia, w którym się znajdują [1,8].

Dzięki temu, że surfaktanty gemini w wydajny sposób wiążą kwasy nukleinowe i to w znacznie niższych stężeniach, niż stosowane dotychczas popularnie kationowe lipidy, bardzo dobrze sprawdzają się w pośredniczeniu w procesach transfekcji. Wydajność tych procesów z użyciem surfaktantów gemini, jako nośnika DNA znacznie przewyższa poziom, jaki można otrzymać z użyciem ich monomerycznych odpowiedników. Przykładowo surfaktanty gemini, których cząsteczka zawierała w części polarnej polimer oligolizyny wykazywały dużą wydajność transfekcji, zaś ich pojedyncze odpowiedniki nie były w stanie dostarczać genów do komórek. Podstawowa struktura cząsteczek surfaktantu gemini pozwala na niemal nieograniczone możliwości modyfikacji ich budowy, zarówno ich właściwości, jak i zdolności do efektywnego pośredniczenia w transfekcji. W większości najwydajniejszych w transfekcji surfaktantów gemini polarną główkę cząsteczki tworzą oligopeptydy lub pochodne czwartorzędowych soli amoniowych. Największe zainteresowanie wzbudzają systemy oparte na węglodorach, które dzięki swoim niezwykłym właściwościom ułatwiają ucieczkę przenoszonego ładunku z endosomu, znacznie podwyższając efektywność transfekcji [8].

Modyfikacje chemiczne cząsteczek znacząco wpływają na efektywność transfekcji np. przedłużenie łańcuchów węglowodorowych surfaktantów gemini zawierających główkę opartą na polimerach lizyny istotnie ją zwiększało. Również modyfikacje grupy łącznikowej cząsteczek wpływają na efektywność transfekcji [12]. Budowa główki surfaktantu gemini ma także wpływ na efektywność transfekcji. Związki oparte na peptydach wykazują największą wydajność przy zastosowaniu tetrapeptydu, wyniki takie otrzymano zarówno dla lizyny, jak i histydyny i argininy. Nawet niewielkie zmiany w budowie tej części cząsteczki surfaktantu mogą dawać duże zmiany efektywności. Na przykład związek oparty na N,N'-bis(3-aminopropyl)butano-1,4-diaminie z główką Lys-Lys-ε-Lys-Ser jest jednym z najefektywniejszych surfaktantów gemini, a podobna cząsteczka z dwoma lizynami połączonymi wiązaniem ε, nie wykazuje aktywności [8,18]. Dobór odpowiednich parametrów budowy cząsteczki surfaktantu gemini jest niezwykle istotny, ponieważ już niewielkie zmiany struktury mogą zwiększyć lub obniżyć efektywność transfekcji. Prawdopodobnie dzieje się tak, ponieważ kompleksy tworzone przez niektóre cząsteczki z DNA są tak mocne, że nie są one w stanie uwolnić przenoszonego kwasu nukleinowego w odpowiednim momencie (choć nie można wykluczyć wpływu innych oddziaływań poza elektrostatycznymi) [3]. Modyfikacje chemiczne główek surfaktantów pozwalają na nadanie im dodatkowych właściwości, które mogłyby w przyszłości zwiększyć nie tylko efektywność transfekcji. Możliwe jest zastosowanie do budowy główki surfaktantu związków, które wiązałyby się jedynie z wybraną grupą receptorów na powierzchni komórek docelowych, to spowodowałoby, że tak zbudowane nośniki działałyby w sposób swoisty, podobnie jak wektory wirusowe. Włączenie sekwencji korespondującej z sygnałem lokalizacji jądrowej NLS pozwoliłoby na zwiększenie wydajności ekspresji [8].

Niezwykle istotną cechą surfaktantów gemini wpływającą na wydajność transfekcji jest ich pośredniczenie w ucieczce wektora z endosomu. Prawdopodobnie istotną rolę w tym procesie odgrywa możliwość zmian struktury lipopleksów. Zmiana fazy lamellarnej na odwróconą heksagonalną powoduje fuzję błony endosomalnej z cząsteczkami surfaktantu gemini, destabilizację endosomu i uwolnienie DNA do cytoplazmy. Zdolność do takiej zmiany fazy zależy od budowy cząsteczki. Proces ten może być indukowany zmianą pH oraz w niektórych wypadkach zmianą stężenia surfaktantu, może to mieć wyjątkowe znaczenie dla zastosowania tej klasy związków, jako nośników genów [8,29]. Jednym z rodzajów surfaktantów gemini, które po utworzeniu kompleksów z DNA pośredniczą w zmianie struktury lipopleksu w zależności od pH, jest związek zawierający cukrową główkę i łącznik złożony z sześciu grup metylenowych. Surfaktant ten wykazuje wyjątkową wydajność w procesie dostarczania genów do komórki. Uformowane przez niego lipopleksy zmieniają strukturę z fazy lamellarnej na odwróconą heksagonalną w pH, poniżej 5,57, co odpowiada kwaśnemu środowisku wnętrza endosomu. Prawdopodobnie dzieje się tak dzięki współoddziaływaniu podwójnych uprotonowanych cząsteczek surfaktantu z grupami fosforanowymi DNA. Zmiana z fazy lamellarnej na odwróconą heksagonalną obserwowana dla danego typu surfaktantów gemini, wiąże się ze zmniejszeniem rozmiaru główki polarnej cząsteczek, co może być

efektem tego właśnie oddziaływania, podwójnie naładowanych główek i grup fosforanowych DNA, prowadzącego do lokalnej neutralizacji ładunków i ich dehydratacji [1,8]. W procesie zmiany struktury lipopleksu niezwykle ważną rolę odgrywa charakter łącznika. Największa zdolność do przyjmowania fazy odwróconej heksagonalnej wykazują surfaktanty gemini zawierające polimetylenowy łącznik złożony z około sześciu grup metylenowych (zarówno oparte na poli-peptydach, węglowodanach jak i czwartorzędowych solach amoniowych) [8,27]. Otrzymane dotąd wyniki sugerują, że najbardziej wydajny wektor zbudowany z surfaktantów gemini powinien zawierać taką właśnie grupę łącznikową. Istotna może się okazać też obecność w cząsteczce dwóch atomów azotu, które mogą ulec protonacji w zakresie fizjologicznego pH, dwóch nienasyconych łańcuchów węglowodorowych i hydrofilowej cukrowej główki [8].

Efektywność transfekcji z zastosowaniem różnego rodzaju surfaktantów gemini, podobnie jak przy zastosowaniu klasycznych związków amfifilowych, może być znacznie zwiększona przez dodanie lipidów lub peptydów pomocniczych. Dodatek neutralnych kolipidów, takich jak L-dioleilofosfatydyloetanolamina (DOPE), która ułatwia zmianę konformacji anionowych błon endosomu i jego destabilizację, znacznie poprawia wydajność transfekcji w przypadku surfaktantów gemini opartych na peptydach. W tym celu można również stosować lipofektaminę [3].

4. ZASTOSOWANIE SURFAKTANTÓW GEMINI JAKO NOŚNIKÓW GENÓW – AKTUALNY STAN

Dzięki wyjątkowej budowie surfaktantów gemini, możliwe jest syntetyzowanie ich licznych wariantów. Niewielkie zmiany grupy łączącej dwie cząsteczki związku powierzchniowo czynnego mogą decydować o dużej zmianie ich właściwości. Duża wydajność transfekcji, jaką można uzyskać stosując jako nośniki tego typu związki spowodowała wzmożone badania nad ich zastosowaniem. Jak dotąd przebadano efektywność transfekcji z użyciem różnego rodzaju surfaktantów gemini, na różnorodnych komórkach zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich. Za pomocą poszczególnych grup tych związków transfekowano różnorodne komórki ssące wybranymi genami. W badaniach zwykle używano genu lucyferazy, dzięki czemu łatwo można było określić czy dany związek efektywnie pośredniczy w transfekcji. W celu porównania otrzymanych wyników z efektywnością standardowo używanych nośników niewirusowych, komórki transfekowano również Lipofektaminą 2000. Wyniki tych badań są niezwykle obiecujące [1,3,8,18].

Niezwykle aktywnymi przENOŚNIKAMI genów okazały się oparte na cysteinie surfaktanty z oligolizynową główką, zawierającą jedno lub więcej wiązań ε. Stanowiły one grupę najbardziej wydajnych nośników genów wśród surfaktantów gemini opartych na peptydach. W grupie tej przebadano liczne kombinacje aminokwasów budujących główkę surfaktantu gemini [12]. Lizyna okazała się aminokwasem budującym główki surfaktantów, które najwydajniej pośredniczyły w transfekcji (przebadane pod tym względem arginina i histydyna dawały o wiele mniej zadowalające wyniki) [8]. Najlepsze wyniki otrzymano dla tetrapeptydu. Dla porównania przetestowano również pojedyncze analogi surfaktantów opartych na cysteinie, lecz



nie wykazywały one aktywności, jako przenośniki genów. W związkach tych hydrofobowe łańcuchy monomerów połączone były grupą serynową. Rozbudowana część łącznikowa poprawiała w większości wypadków efektywność transfekcji, podobnie jak wydłużone łańcuchy hydrofobowe.

Na efektywność transfekcji w znacznym stopniu wpływała również natura wiązań między aminokwasami w główce surfaktantu. Optymalne wyniki otrzymano dla tetrapeptydu z podwójnym wiązaniem ϵ , co zapewniało odpowiednio silną interakcję z ujemnie naładowanymi cząsteczkami DNA. Tak zbudowane surfaktanty gemini dostarczały geny nawet do komórek układu nerwowego, których transfekcja następuje z wielką trudnością i wykazywała o wiele lepszą wydajność niż lipofektamina 2000 (wyższa 2–5 razy) [12].

O wiele wydajniejszymi nośnikami genów (w porównaniu z surfaktantami gemini opartymi na cysteinie) okazały się surfaktanty gemini oparte na aminach. Wiele z nich wykazywało wydajność transfekcji o wiele wyższą niż tradycyjnie stosowane lipidy kationowe, większość z tych związków zawierała pochodne bromków [20,25]. Wśród surfaktantów gemini opartych na aminach najbardziej wydajne okazały się te oparte na N,N'-bis(3-aminopropyl)butano-1,4-diaminie. Podobnie jak w przypadku surfaktantów gemini opartych na peptydach niewielkie modyfikacje grup budujących główki hydrofilowe związku znacząco wpływały na efektywność transfekcji [8,18]. Najbardziej wydajne okazały się te związki, których grupa polarna stanowiła tetrapeptyd zawierający lizynę i serynę, z pojedynczym wiązaniem ϵ (Lys-Lys- ϵ -Lys-Ser). Podobnie zbudowany surfaktant gemini, w którego główce występowały dwa wiązania ϵ był jednym z najmniej aktywnych w swojej grupie [8].

Kolejnym typem surfaktantów gemini przebadanych pod kątem pośredniczenia w transfekcji, są te których budowa oparta jest na kwasach dikarboksylovych. Surfaktanty z tej grupy charakteryzują się dużym stopniem biodegradacji, dzięki czemu zastosowanie tego typu związków, jako nośników genów byłoby o wiele bezpieczniejsze dla organizmów żywych. Efektywność transfekcji, jaką można osiągnąć używając tych surfaktantów, określano dostarczając do komórek gena lucyferazy i mierząc jego aktywność. Do większości badań zastosowano surfaktanty gemini oparte na kwasie winowym. Modyfikacja główek cząsteczek, podobnie jak w pozostałych przypadkach miała znaczny wpływ na efektywność transfekcji (zmiany te wpływały na tworzenie stabilnych kompleksów z DNA). Przetestowano kilka serii surfaktantów gemini opartych na kwasie winowym, w każdej z nich cząsteczki zawierały inaczej zbudowaną główkę. Największą wydajność zaobserwowano dla związków, których grupy hydrofilowe zbudowane były z lizyny oraz etylenodiaminy. Niestety związki te wykazywały większą niż sądzono toksyczność, dodatkowo były znacznie mniej wydajne, jako nośniki genów niż inne grupy surfaktantów gemini. Związki zawierające w swojej

główce jedynie etylenodiaminę były nieaktywne, jako nośniki genów [2].

Najwydajniejszymi przenośnikami genów wśród przetestowanych surfaktantów gemini, jak dotąd okazały się te oparte na symetrycznych diaminach z węglowodanową główką (zwykle zredukowaną glukozą). Część łącznikowa w tego typu surfaktantach gemini zbudowana była z łańcuchów polimetylenowych. Modyfikacje długości łącznika, czy budowy hydrofilowej główki lub hydrofobowych ogonów, zmieniły efektywność transfekcji poszczególnych surfaktantów, jednak w grupie tej obserwowano dużą wydajność w niemalże wszystkich przetestowanych seriach [8].

Prawdopodobnie duża efektywność transfekcji, jaką otrzymano przy zastosowaniu, jako nośnika DNA tego związku, jest wynikiem zdolności do zmiany struktury lipopleksu z lamellarnej na odwróconą heksagonalną pod wpływem kwaśnego środowiska panującego we wnętrzu endosomu. Ułatwia to ucieczkę wektora z pęcherzyków endosomalnych, co się wiąże ze zwiększeniem ekspresji przenoszonych genów [9]. Najwydajniejszym w tej grupie związków okazał się surfaktant z łącznikiem zawierającym sześć grup metylenowych i z główką zbudowaną z glukozy lub mannozy [1,8]. Łącznik złożony z sześciu grup metylenowych pozwalał na częste i spontaniczne zmiany fazy lipopleksu pod wpływem zmiany pH, co zwiększało prawdopodobieństwo ucieczki z endosomu, a więc i efektywność transfekcji [1]. Najbardziej wydajne z tego typu surfaktantów gemini dostarczają geny do około 70% komórek poddanych transfekcji, przy czym charakteryzują się wyjątkowo niską toksycznością. Surfaktanty gemini zawierające cukrową główkę okazują się na tyle obiecujące jako nie-wirusowe nośniki genów, że obecnie prowadzi się badania nad ich zastosowaniem *in vivo*. Związki z glukozową oraz mannozową główką w kompleksie z genami lucyferazy podano dożylnie myszom. Ekspresja podanego genu była zauważalna w większości ich organów z wyjątkiem płuc. Otrzymane wyniki wskazują, że zawierające cukrową główkę surfaktanty gemini nie tylko wydajnie transfekują komórki *in vitro*, ale także w przeciwieństwie do większości stosowanych dotąd klasycznych kationowych lipidów nie reagują tak mocno z płynami ustrojowymi. Podawanie dożylnie lipopleksów uformowanych przez substancje, takie jak np. DOTAP, wymagało również zastosowania związków pomocniczych, np. cholesterolu. Badana grupa surfaktantów gemini tego nie wymagała [28].

Duża efektywność transfekcji, jaka charakteryzuje badane grupy surfaktantów gemini, w połączeniu ze stosunkowo małą toksycznością sprawiają, że obecnie coraz więcej klas tych związków przechodzi badania nad ich zastosowaniem *in vivo*. Ponieważ większość z nich wykazuje w takich warunkach aktywność zbliżoną do otrzymanych *in vitro*, prawdopodobnie już wkrótce będą powszechnie stosowane, jako alternatywne do wirusowych nośników genów [8].

PIŚMIENNICTWO

[1] Bell P.C., Bergsma M., Dolbnya I.P., Bras W., Stuart M.C., Rowan A.E., Feiters M.C., Engberts J.B.: Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003; 125: 1551–1558

[2] Buijnsters P.J., García Rodríguez C.L., Willighagen E.L., Sommerdijk N.A., Kremm A., Camilleri P., Feiters M., Nolte R.J., Zwanenburg B.: Cationic gemini surfactants based on tartaric acid: synthesis, aggregation, monolayer behaviour, and interaction with DNA. *Eur. J. Org. Chem.*, 2002; 8: 1397–1406

- [3] Camilleri P., Kremer A., Edwards A.J., Jennings H.A., Jenkins O., Marshall I., McGregor C., Neville W., Rice S.Q., Smith R.J., Wilkinson M.J., Kirby A.J.: A novel class of cationic gemini surfactants showing efficient *in vitro* gene transfection properties. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 2000: 1253–1254
- [4] Groth C., Nydén M., Holmberg K., Kanicky J.R., Shah D.O.: Kinetics of the self-assembly of gemini surfactants. *J. Surf. Det.*, 2004; 7: 247–254
- [5] Hati S.K., Moulik S.P.: Gemini surfactants: a distinct class of self-assembling molecules. *Curr.Sci.*, 2002; 82: 1101–1111
- [6] Johnsson M., Wagenaar A., Engberts J.B.: Sugar-based gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition at acid pH and reversible vesicle flocculation near neutral pH. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003; 125: 757–760
- [7] Karaborni S., Esselink K., Hilbers P.A., Smit B., Karthäuser J., van Os N.M., Zana R.: Simulating the self-assembly gemini (dimeric) surfactants. *Science*, 1994; 226: 254–256
- [8] Kirby J.A., Camilleri P., Engberts J.B., Feiters M.C., Nolte R.J., Söderman O., Bergsma M., Bell P.C., Fielden M.L., García Rodríguez C.L., Guédat P., Kremer A., McGregor C., Perrin C., Ronsin G., van Eijk M.C.: Gemini surfactants: new synthetic vectors for gene transfection. *Angew. Chem (Int. Ed.)*, 2003; 42: 1448–1457
- [9] Koltover I., Salditt T., Rädler J.O., Safinya C.R.: An inverted hexagonal phase of cationic liposome-dna complexes related to dna release and delivery. *Science* 1998; 281: 78–81
- [10] Komorek U., Wilk K.A.: Surface and micellar properties of new nonionic gemini aldonamide-type surfactants. *J. Colloid Interface Sci.*, 2004; 227: 206–211
- [11] Komorek U., Wilk K.A., Maliszewska I., Syper L.: Novel glucose-derived gemini surfactants with 1,1'ethylenebisurea spacer: preparation, thermotropic behavior and biological properties. *J. Surfact. Deterg.* 2006; 9: 115–124
- [12] McGregor C., Perrin C., Monck M., Camilleri P., Kirby A.J.: Rational approaches to the design of cationic gemini surfactants for gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001; 123: 6215–6220
- [13] Menger F.M., Keiper J.S.: Gemini surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000; 39: 1906–1920
- [14] Menger F.M., Littau C.A.: Gemini surfactants: a new class of self-assembling molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993; 115:10083–10090
- [15] Obląg E., Baçal J., Lachowicz T.M.: A quaternary ammonium salt as an inhibitor of plasma membrane H⁺-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 2000; 5: 315–324
- [16] Obląg E., Lachowicz T.M., Łuczynski J., Witek S.: Comparative studies of biological activities of the lysosomotropic aminoesters and quaternary ammonium salts on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 2001; 6: 871–880
- [17] Ronsin G., Kirby A.J., Rittenhouse S., Woodnutt G., Camilleri P.: Structure and antimicrobial activity of new bile acid-based gemini surfactants. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2002; 2: 1302–1306
- [18] Ronsin G., Perrin C., Guédat P., Kremer A., Camilleri P., Kirby A.J.: Novel spermine-based cationic gemini surfactants for gene delivery. *Chem. Commun.*, 2001; 21: 2234–2235
- [19] Rosen M.J., Tracy D.J.: Gemini surfactants. *J. Surf. Det.*, 1998; 1: 547–554
- [20] Ryhänen S.J., Säily M.J., Pauku T., Borocci S., Mancini G., Holopainen J.M., Kinnunen P.K.: Surface charge density determines the efficiency of cationic gemini surfactant based lipofection. *Biophys. J.*, 2003; 84: 578–587
- [21] Shirai A., Sumitomo T., Yoshida M., Kaimura T., Nagamune H., Maeda T., Kourai H.: Synthesis and biological properties of gemini quaternary ammonium compounds, 5,5'-[2,2'-(alpha, omega-polymethylenedicarbonyldioxy)diethyl]bis-(3-alkyl-4-methylthiazolium iodide) and 5,5'-[2,2'-(p-phenylenedicarbonyldioxy)diethyl]bis(3-alkyl-4-methylthiazolium bromide). *Chem. Pharm. Bull.*, 2006; 54: 639–645
- [22] Shukla D., Tyagi V.K.: Cationic gemini surfactants: a review. *J. Oleo Sci.*, 2006; 55: 381–390
- [23] Sokolowski A., Wilk K.A., Komorek U., Rutkowski B., Syper L.: Aggregation properties of cationic gemini surfactants in aqueous solution. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 2002; 36: 51–64
- [24] Tan H., Xiao H.: Synthesis and antimicrobial characterization of novel L-lysine gemini surfactants pended with reactive groups. *Tetrahedron Lett.*, 2008; 49: 1759–1761
- [25] Uhríková D., Hanulová M., Devínsky F., Lacko I., Funari S.S., Balgavý P.: Interaction of DNA with butane-1,4-diyl-bis(dimethylalkylammonium bromide) gemini surfactants. http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/2004_report/part1/contrib/46/11702.pdf (2004)
- [26] Uhríková D., Rapp G., Balgavý P.: Condensed lamellar phase in ternary DNA-DLPC-cationic gemini surfactant system: a small-angle synchrotron X-ray diffraction study. *Bioelectrochem.*, 2002; 58: 87–95
- [27] Uhríková D., Šabíková A., Hanulová M., Funari S.S., Lacko I., Devínsky F., Balgavý P.: The microstructure of DNA-EYPC- gemini surfactants aggregates: a small angle X-ray diffraction study. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana*, 2007; 55: 170–182
- [28] Wasungu L., Scarzello M., van Dam G., Molema G., Wagenaar A., Engberts J.B., Hoekstra D.: Transfection mediated by pH-sensitive sugar-based gemini surfactants; potential for *in vivo* gene therapy applications. *J. Mol. Med.*, 2006; 84: 774–784
- [29] Wasungu L., Stuart M.C., Scarzello M., Engberts J.B., Hoekstra D.: Lipoplexes formed from sugar-based gemini surfactants undergo a lamellar-to-micellar phase transition at acidic pH. Evidence for a non-inverted membrane-destabilizing hexagonal phase of lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1758: 1677–1684
- [30] Zana R.R., El Ouafi Alami: Gemini surfactants. *Novel Surfactants Preparation Applications and Biodegradability*, vol. 114, K. Holmberg (ed.), Surfactant Science Series, New York 2003; 385–405
- [31] Zhou F., Zhang J., Sun X., Wang Q., Sun Y.: Antibacterial characteristics of novel gemini-type quaternary ammonium salt bonded to cotton fiber. *JFBI*, 2008; 11: 85–92

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

