

Нуклеиновые кислоты:



МЕХАНИЗМ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ

Нуклеиновые кислоты



«Природные»

- **Внутриклеточные:**
 - ДНК (ядерная, митохондриальная)
 - РНК (мРНК, рРНК, тРНК, миРНК, регуляторные нетранслируемые РНК)
- **Экстраклеточные:**
 - РНК и ДНК инфекционного происхождения
 - апоптотические тела
 - НК опухолевых клеток
 - экзосомальные мРНК и миРНК

«Техногенные»

- **Длинные:**
 - пДНК
 - экспрессирующие кассеты
 - искусственные хромосомы
 - вирусные геномы
- **Короткие:**
 - антисмысловые олигонуклеотиды
 - антигенные олигонуклеотиды
 - сплайсинг-корректирующие олигонуклеотиды
 - siRNA
 - аптамеры
 - ловушки факторов транскрипции
 - CpG олигонуклеотиды

Как НК могут попасть в клетку?



- Водорастворимость – НК не могут проникнуть через клеточную мембрану путем пассивной диффузии
 - Отрицательно заряженный остов – электростатическое отталкивание НК от поверхности клетки
- Большой размер и малая подвижность (для длинных молекул НК)



Предположение о наличии активных биологических механизмов поглощения клетками НК

Типы эндоцитоза

клатрин-независимый

клатрин-зависимый

динамин-независимый

динамин-зависимый

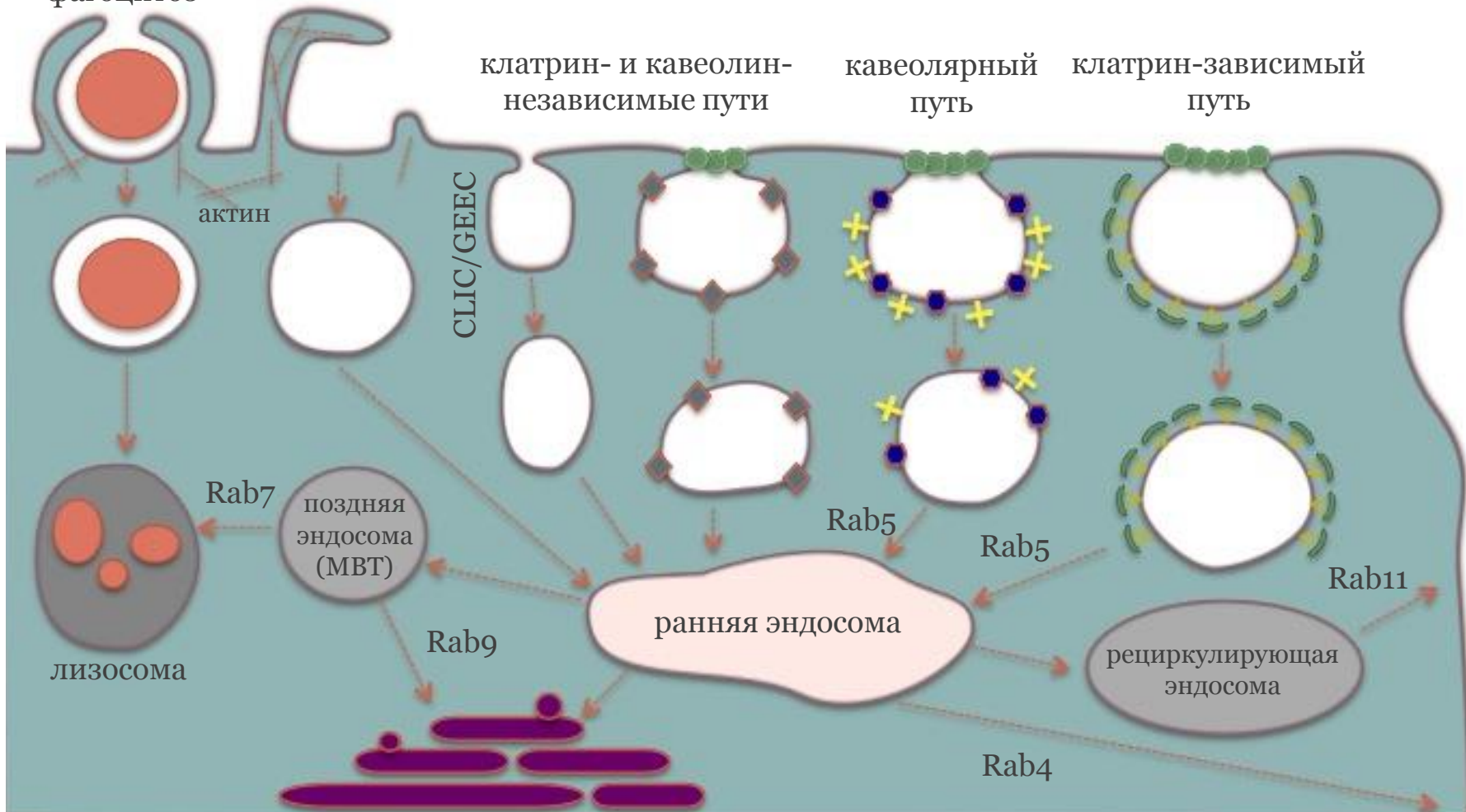
фагоцитоз

макропиноцитоз

клатрин- и кавеолин-
независимые пути

кавеолярный
путь

клатрин-зависимый
путь



▲ - клатрин

◆ - флотиллин

✚ - кавин

● - динамин

■ - кавеолин



Взаимодействие с клетками *in vitro*

Методы:

- аффинная модификация
- радиоизотопы
- флуоресцентное мечение
- гены-маркеры

- Обнаружены различные белки размером от 15 до 150 кДа, связывающие НК:
 - scavenger рецепторы
 - интегрины
 - SID-1
 - TLRs
 - ...
- В связи с использованием разных типов клеток, методов исследования и типов НК сравнение отдельных результатов затруднено.
- В большинстве описанных случаев проникновение НК в клетки происходит независимо от нуклеотидной последовательности.
- Существуют частные случаи избирательного связывания/поглощения клетками фрагментов определенного нуклеотидного состава:
 - CpG-олигонуклеотиды
 - G-богатые (квадриплекс-образующие) последовательности
 - конкатемерные комплексы
- Возможная альтернатива рецептор-опосредованному механизму – макропиноцитоз.

Исследования взаимодействия НК с эукариотическими клетками *in vivo*

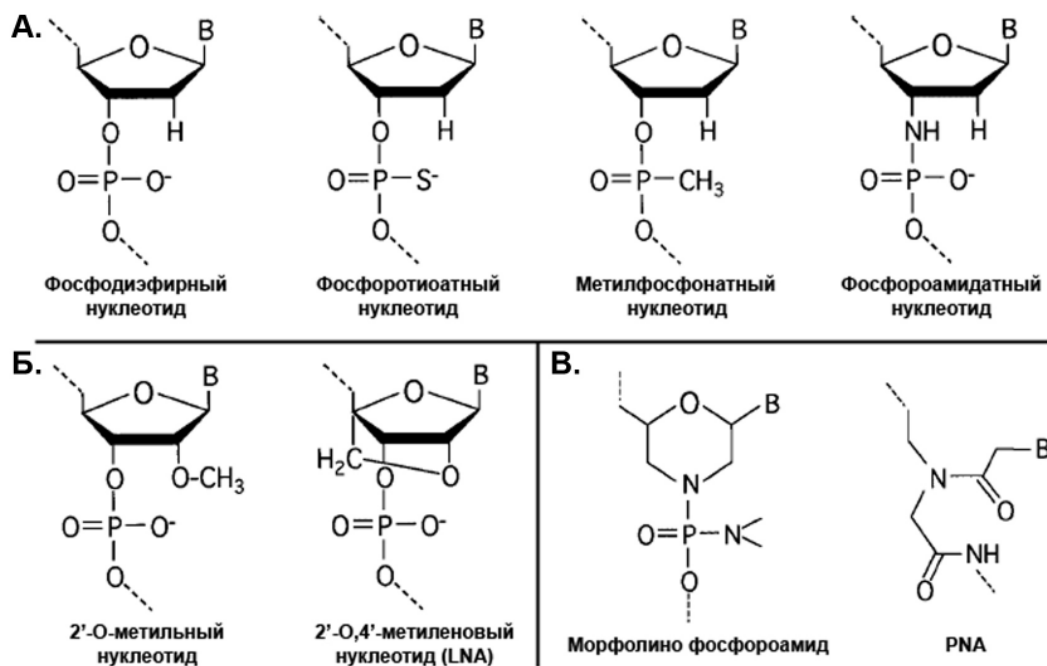


- Процесс интернализации НК в культуре клеток, как правило, малоэффективен.
- Результаты экспериментов по проникновению НК в *клетки in vitro* и *in vivo* могут не совпадать друг с другом.
- Интернализации коротких и длинных молекул НК в организме может происходить с привлечением иных механизмов или дополнительных факторов, позволяющих получать результаты трансфекции, превышающие ожидаемые.
- Судьба НК внутри организма может зависеть от метода введения препарата: внутривенно, подкожно, внутримышечно, ингаляция, обработка слизистой, «прямое» введение в целевую ткань, введение под давлением.
- Введение свободной пДНК позволяет добиться продолжительной экспрессии доставляемого гена в случае трансфекции клеток, находящихся в постмитотическом состоянии (мышечная ткань), в том случае, если экспрессируемый белок не вызывает интенсивного иммунного ответа.
- Сложность детального исследования механизмов интернализации НК клетками в экспериментах *in vivo* связана с отсутствием экспериментальной модели, позволяющей воссоздать условия, в которых клетки находятся, функционируя как часть целостного организма.
- Наиболее вероятным механизмом интернализации НК в организме по-прежнему принято считать рецептор-опосредованных эндоцитоз.

Модифицированные аналоги олигонуклеотидов

Введение модификаций приводит к изменению физико-химических и биологических свойств олигонуклеотидов:

- растворимости в водной фазе
- наличие заряда
- температуры плавления дуплекса с комплементарной последовательностью
- подверженности деградации нуклеазами



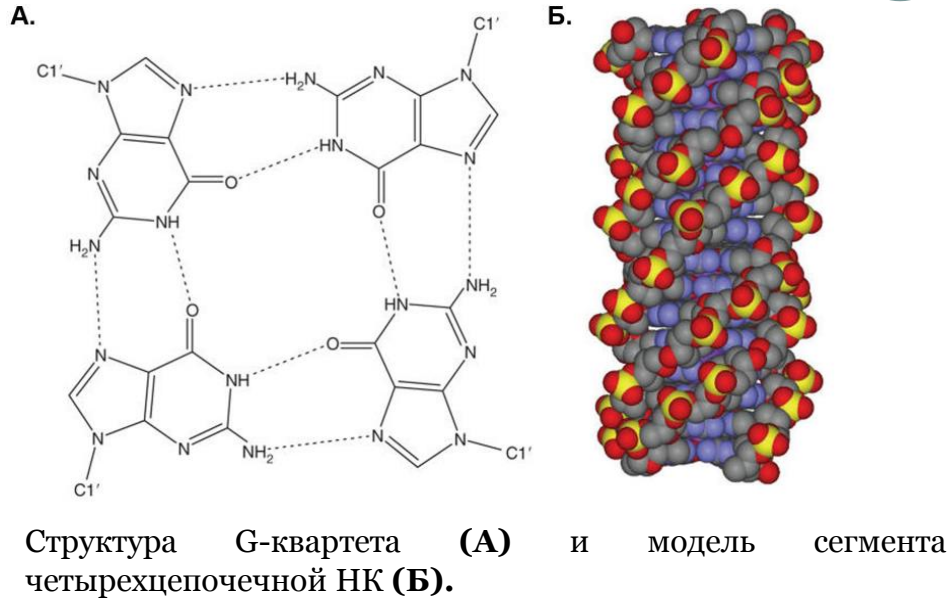
- Структура немодифицированного фосфодиэфирного нуклеотида и аналогов нуклеотидов, содержащих модификацию межнуклеотидной связи (**A**), рибозного кольца (**B**) или имеющие модифицированный скелет молекулы (**B**). “B” – азотистое основание.

Использование адресующих и мембрано-связывающих групп



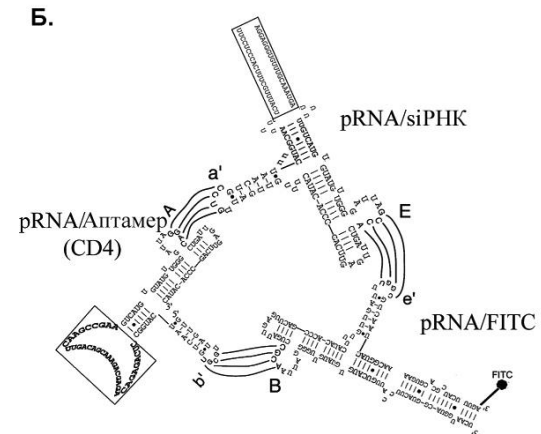
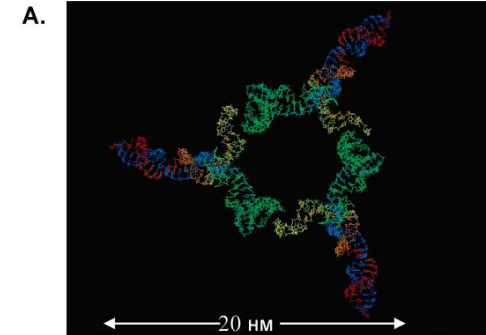
- Ковалентное соединение олигонуклеотидов с липофильными молекулами приводит к повышению эффективности связывания клеточными мембранами и биологической активности по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами.
- Помимо липофильных молекул, обеспечивающих низкоспецифическое повышение эффективности проникновения НК в клетки, возможно присоединение к олигонуклеотидам различных лигандов, специфично связываемых рецепторами клеток определенного типа.
- Фрагменты некоторых белков (10 – 15 аминокислот), обладающие способностью инициировать их транспорт внутрь клеток, - пептиды, проникающие в клетки (CPP) или белковые домены трансдукции – также могут быть использованы для направленной доставки НК в клетки.
- Аптамеры - молекулы НК, обладающие высоким сродством к определенным белкам или небольшим молекулам. Получение аптамеров, селективно связывающихся с определенным экстраклеточным рецептором осуществляется с помощью процедуры SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). Присоединение аптамеров было использовано для направленной доставки в клетки-мишени антисмысловых олигонуклеотидов и siRNA.

Влияние структуры НК на взаимодействие с клетками



- Образование квадруплексов может быть использовано для повышения захвата биологически активных олиго- и полинуклеотидов клетками путем взаимодействия со scavenger рецепторами.

- Свойство природных молекул РНК бактериофага ϕi29 формировать внутри- и межмолекулярные комплексы было применено для получения трансфицирующих наночастиц, имеющих разные функциональные домены.

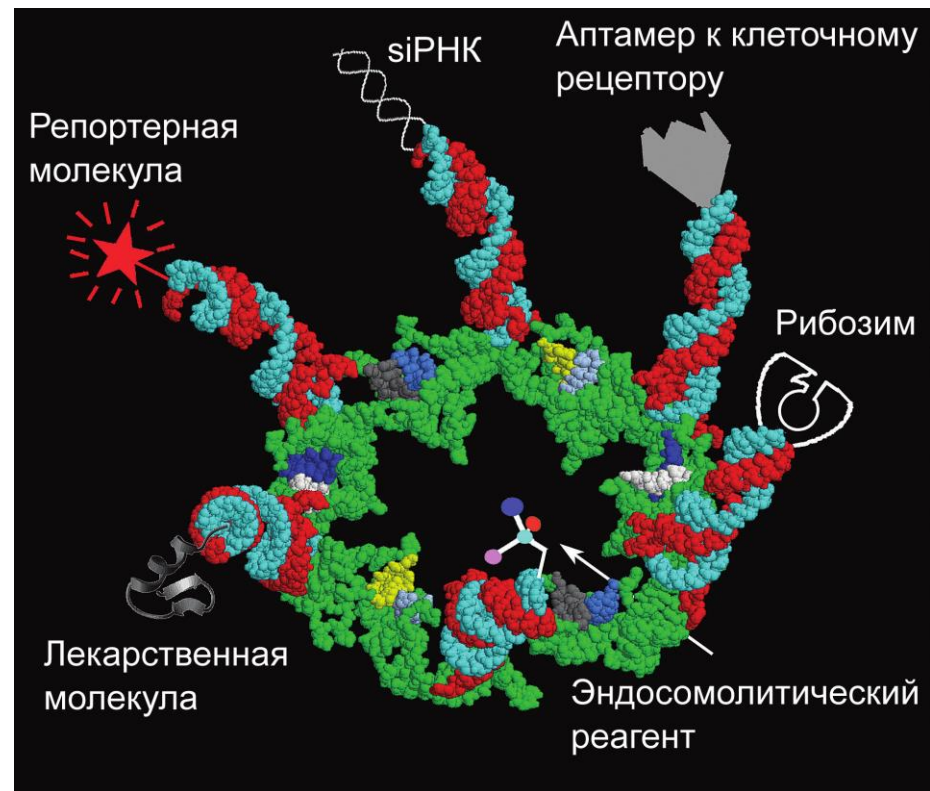


Модель наночастицы, образуемой гибридными pRNA бактериофага ϕi29 **(А)**, и схема образования тримера **(Б)**, содержащего pRNA.

Комплексы НК, состоящие из функциональных доменов

- Молекула рRNA бактериофага phi29 может образовывать гексамерные комплексы (возможность получения структуры, содержащей шесть функциональных единиц).

- Использование принципа самосборки позволяет избежать ковалентного присоединения дополнительных лигандов к биологически активному домену.



Модель гипотетической полифункциональной наночастицы – гексамера молекулы рRNA – содержащей различные активные группы