

Механизм интернализации нуклеиновых кислот эукариотическими клетками

Лекция для студентов 4 курса Факультета естественных наук, специальность «биология» в курсе «Химия биополимеров»

2. Нуклеиновые кислоты (НК) – это, в первую очередь, один из основных компонентов любой живой системы. Широко известна их роль в качестве хранителей и переносчиков генетической информации. Помимо генетической функции, а также непосредственного участия в синтезе белков в форме рибосомальных и транспортных РНК, НК внутри эукариотической клетки также принимают активное участие в ее жизнедеятельности в качестве регуляторных молекул (нетранслируемые короткие и длинные РНК). В течение жизни эукариотическая клетка многоклеточного организма встречается и с НК из экстраклеточного пространства. Это, безусловно, НК вирусов и бактерий, но, кроме того, это могут быть и собственные НК организма, продуцируемые другими клетками. В зависимости от формы, в которой такие НК циркулируют во внеклеточном пространстве, отличается и их способность проникать внутрь клеток. Так, многие вирусы используют специфические механизмы доставки собственных НК в инфицируемые клетки. Поглощение здоровыми клетками НК опухолевого происхождения относят к одному из возможных механизмов метастазирования. Не исключено, впрочем, что этот процесс является частным примером более общего механизма обмена между разными клетками организма молекулами РНК по экзосомальному пути (то есть пути переноса материала от одной клетки к другой в составе экзосом – специфических наноразмерных везикул, продуцируемых многими типами клеток). (мы не будем их здесь рассматривать)

Идея о возможности использования НК в качестве терапевтического материала уходит корнями во времена первых экспериментов по генетическому маркированию клеточных линий и началу исследований механизмов трансформации клеток вирусными частицами. В дальнейшем, когда стали доступны методы рекомбинирования молекул ДНК, клонирования последовательностей отдельных генов и включения их в состав экспрессирующих конструкций, была продемонстрирована возможность коррекции фенотипа путем представления необходимого генетического материала в клетки-мишени, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Развитие химического синтеза коротких молекул НК – олигонуклеотидов – породило новый класс биологически активных НК антропогенного происхождения. Протяженные НК, доставляемые в клетки в рамках генотерапевтического воздействия, кодируют последовательность недостающего (или «правильного») белка, либо отвечают за экспрессию регуляторных шпилечных РНК, которые в результате процессирования способны выполнять в

клетке регуляторную функцию. В то же время, механизмы терапевтического действия коротких олигонуклеотидов более разнообразны. Их биологическая активность может быть основана на способности связываться по принципу комплементарного взаимодействия со специфическими последовательностями НК внутри клетки (в зависимости от типа олигонуклеотида это приводит к блокировке транскрипции или трансляции, разрушению специфической клеточной РНК или коррекции процессинга РНК), на конкуренции за связывание с транскрипционными факторами, они могут оказывать регуляторное или иммуностимулирующее действие.

Таким образом, в тех или иных условиях эукариотическая клетка может встретиться с НК, совершенно разными как по форме и размеру, так и по биологической активности.

3. Каким же образом НК могут проникать внутрь эукариотической клетки?

В отличие от клеток микроорганизмов, для которых перенос генетического материала между особями является эффективным и значимым процессом, клетки высших многоклеточных животных обладают целым рядом защитных механизмов, препятствующих проникновению в них чужеродных молекул ДНК и РНК, что в первую очередь связано с защитой от вирусов. Захват клетками НК в свободной форме (т.е. в отсутствие трансфицирующих агентов – в англоязычной литературе обозначается терминами “naked” или “free”) в целом считается малоэффективным, что обусловлено представлениями о свойствах клеточной мембраны и самих НК (исключение может составлять процесс переноса НК в составе экзосом).

Поверхность эукариотических клеток имеет общий отрицательный заряд благодаря содержанию в мембране фосфатидилсерина, гликолипидов и гликопротеинов. Вследствие этого возникает электростатическое отталкивание между клеточной мембраной и молекулами НК, имеющими отрицательно заряженный сахарофосфатный остов, что снижает эффективность связывания НК с клетками. Транспорт плазмидной ДНК (пДНК) и других протяженных НК также затруднен в связи с их относительно большим размером, жесткой пространственной структурой и невысокой подвижностью в биологических жидкостях и цитоплазме клеток.

Долгое время было принято считать, что олигонуклеотиды и пДНК не проникают через мембраны эукариотических клеток. Однако первые эксперименты с клеточными культурами, а позднее – и *in vivo* – показали, что при добавлении к клеткам НК в отсутствие каких-либо трансфицирующих агентов способны проявлять специфическую биологическую активность, воздействуя на функции клеточных РНК и ДНК или вызывая экспрессию переносимых ими генов (в случае плазмидных конструкций), что косвенно свидетельствует о попадании этих НК внутрь клеток. Несмотря на активные исследования в области фармакокинетики и биологической активности НК до сих пор нет единого мнения в вопросе о механизмах их проникновения через мембраны клеток. В зависимости от используемой экспериментальной модели исследователи зачастую приходят к

существенно различающимся выводам относительно преобладания того или иного механизма интернализации НК клетками. Вероятно, даже в случае использования незаряженных аналогов олигонуклеотидов молекулы НК имеют слишком крупный размер, чтобы преодолевать клеточную мембрану путем пассивной диффузии. Это привело к предположению, что олигонуклеотиды и протяженные НК проникают в клетки по пути эндоцитоза – процесса поглощения клетками объектов окружающей среды путем адсорбирования их мембраной с последующим ее впячиванием внутрь клетки и образованием везикул, в которых захваченные извне объекты проходят последующую утилизацию. Среди предполагаемых механизмов, которые могут участвовать в интернализации НК клетками, разными исследовательскими группами назывались практически все известные типы эндоцитоза.

4. Типы эндоцитоза отличаются друг от друга по наличию или отсутствию специфического покрытия образуемых везикул, по составу покрытия, по размеру везикул и дальнейшим путям утилизации поглощаемых веществ.

В случае классического клатрин-зависимого эндоцитоза поверхностные рецепторы и связанные с ними лиганды взаимодействуют с адаптерными белками (включая AP-2) и многочисленными вспомогательными факторами, которые обеспечивают кластеризацию рецепторов в специализированных участках клеточной мембраны стягиваемых клатриновой сетью. В инвагинации мембраны участвуют также другие белки (SNX9, амфифизин), отпочковывание везикулы происходит благодаря GTP-азе динамину. После этого эндосома быстро теряет клатриновое покрытие под действием ауксина и hsc70. Изначально размер везикул, образуемых при клатрин-зависимом эндоцитозе, не превышает 150 нм, но затем их объем существенно возрастает в результате слияния в зрелые эндосомы и последующего взаимодействия с лизосомами. По пути клатрин-зависимого эндоцитоза в клетки проникают многие важные рецепторы и лиганды, включая связанные с холестерином частицы липопротеинов низкой плотности (LDL), трансферрин, различные рецепторы, связанные с активацией G-белков.

Кавеолы представляют собой небольшие инвагинации клеточной мембраны разной формы, богатые холестерином и гликофинголипидами, а также содержащие кавеолин 1. В стабилизации кавеолярной структуры также участвуют другие покрывающие белки – кавины. Кавеолярный эндоцитоз играет важную роль в гомеостазе холестерина и транспорте гликофинголипидов; при участии этого механизма в клетки попадают некоторые вирусы, например, вирус SV-40, холерный токсин (СТxB), GPI-белки (=гликофосфатидилинозитол-ассоциированные белки). Некоторые лиганды, транспортируемые в клетки по кавеолярному пути, могут также использовать и другие пути эндоцитоза. Предположительно, динамин может способствовать отпочковыванию кавеолярных везикул, однако это не так хорошо подтверждено, как в случае клатрин-зависимого пути. Помимо кавеолина с кавеолами могут быть связаны многие другие белки, в частности, молекулы, принимающие участие в сигнальной трансдукции.

В некоторых случаях были описаны кавеолин- и клатрин-независимые пути эндоцитоза. Например, мембранные белки флотиллины способствуют организации липидных доменов, что может также приводить к эндоцитозной активности подобно кавеолярному пути. Некоторые авторы указывают, что в случае образования флотиллин-содержащих везикул не требуется участие динамина.

Другим ключевым механизмом эндоцитоза, играющим важную роль в поглощении жидкой фазы, является путь CLIC/GEEC (аббревиатура расшифровывается как Клатрин- и Динамин- Независимая Транспортировка и GPI-AP-Обогащенный Ранний Эндосомальный Компаратмент). В этом случае происходит формирование крупных тубулярных эндосом, богатых GPI-белками (включая фолатный рецептор FR α), которые, как правило, содержат декстраны – маркеры жидкой фазы. Как видно из названия пути, для интернализации не требуется участие динамина, вместо этого отрыв от мембраны осуществляется благодаря активности GRAF1 (GTPаза, содержащая BAR-домен).

Существуют и другие кавеолин- и клатрин-независимые пути эндоцитоза. К ним относится путь интернализации формы рецептора IL2, некоторых калиевых каналов, а также рецептора иммуноглобулина FC ϵ R1. Этот путь включает динамин-зависимое отпочковывание эндосом от плазматической мембраны. Другой механизм, приводящий к формированию как везикулярных, так и тубулярных образований связан с поглощением белков главного комплекса гистосовместимости первого типа. В этом случае роль динамина пока не определена.

При макропиноцитозе поглощение веществ клеткой происходит благодаря образованию крупных выпячиваний клеточной мембраны, формируемых с участием полимеризации актина. Макропиносомы не имеют специфического покрытия в отличие от кавеол и клатрин-зависимых эндосом и могут обладать достаточно большими размерами (до 5 мкм в диаметре). Формирование макропиносом происходит при участии сокращений цитоскелета (актин-миозинового комплекса), а потому подвержено регуляции Rac GTPаз и семейством PAK-киназ (*p21-активируемые киназы*). Динамин, по-видимому, не играет определенной роли в этом процессе. Макропиноцитоз представляет эффективный способ неспецифического поглощения клеткой из внеклеточного пространства больших количеств растворенных соединений. Судьба веществ, проникающих в клетки по этому механизму, зависит от типа клеток: например, в макрофагах содержимое макропиносом полностью переходит в лизосомальный компартмент клетки, в то время как в клетках эпидермальной карциномы человека линии A431 макропиносомы не сливаются с другими клеточными органеллами и частично встраиваются обратно в мембрану. Принято считать, что макропиносомы в значительно большей степени проницаемы для различных соединений, чем покрытые везикулы.

Фагоцитоз и некоторые другие механизмы поглощения клетками особо крупных частиц являются достаточно узко-специфичными, характерными для строго определенных типов клеток. В связи с этим весьма маловероятным представляется возможность их участия в интернализации НК большинством типов клеток.

Актиновый цитоскелет клетки играет важную роль в большинстве случаев протекания эндоцитоза, описанных здесь. Тем не менее не всегда процесс поглощения требует присутствия актиновых волокон. Некоторые аденовирусы попадают в клетки по клатрин-, кавеолин-, динамин- и актин-независимому пути. Интересно, что согласно недавно полученным данным, фосфоротиоатные антисмысловые олигонуклеотиды могут проникать в клетки похожим способом.

Итак, существует множество различных путей эндоцитоза, причем, наиболее вероятно, приведенный здесь список еще не полон. С другой стороны, из схемы видно, что попадая в клетку по пути эндоцитоза поглощенные соединения не попадают непосредственно в цитоплазму, а тем более – в ядро клетки. Ключевые внутриклеточные мембранные компартменты, которые может пройти поглощенное вещество, включают ранние и рециркулирующие эндосомы, поздние эндосомы или мультивезикулярные тела, лизосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Процесс внутриклеточной сортировки и транспорта как правило не случаен и довольно строго организован. Многие патогенные микроорганизмы используют это качество в свою пользу (так называемый «ретроградный транспорт»), что позволяет вирусным частицам и некоторым бактериальным токсинам попадать в транс-отдел аппарата Гольджи, откуда получают возможность доступа и в цитозоль. Такой путь мог бы оказаться оптимальным для терапевтически-активных молекул олигонуклеотидов, которым необходимо покинуть ограниченные мембраной везикулы, чтобы достигнуть своих биологических мишеней в цитоплазме или внутри ядра.

В более ранних исследованиях механизмов проникновения НК в клетки было предположено, что олигонуклеотиды переносятся через мембрану путем активного транспорта, причем этот процесс может зависеть от температуры, концентрации и структуры олигонуклеотида и используемой линии клеток. Полагали, что основную роль в переносе играет адсорбционный и жидкофазный эндоцитоз. В процессе накопления экспериментальных данных о взаимодействии НК с эукариотическими клетками, было обнаружено, что их интернализация протекает с участием различных механизмов. Помимо адсорбционного эндоцитоза было показано вовлечение фагоцитоза и макропиноцитоза, обеспечивающих проникновение в клетки молекул размером до 2 нм. Вероятно, при высоких концентрациях НК в среде, когда происходит насыщение мембранных рецепторов, макропиноцитоз может быть преобладающим механизмом интернализации НК клетками.

При небольших концентрациях олигонуклеотидов во внеклеточном пространстве эндоцитоз может протекать в результате взаимодействия с белками,

расположенными в мембране клетки. Большое количество клеточных белков, с разной специфичностью и эффективностью связывающих олигонуклеотиды и протяженные молекулы НК было выделено и описано многими авторами. Выявленные в этих работах белки обладают различным сродством к поли-, олиго- и зачастую мононуклеотидам. Уровень связывания олигонуклеотидов этими белками сильно различается. На основании полученных данных некоторыми авторами высказывались предположения о том, что транспорт молекул ДНК в лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и клетки скелетных мышц происходит путем взаимодействия с НК с белками, расположенными на клеточной поверхности. Тем не менее, не было описано конкретных механизмов этих процессов.

Так или иначе, большинство авторов указывают на то, что НК проникают в клетки именно по путям эндоцитоза. Существуют данные о возможном вовлечении и других механизмов. Так, было предложено, что небольшие молекулы НК могут проходить через мембрану клеток благодаря наличию в ней специальных белковых каналов. Также рассматривалась возможность попадания НК в цитоплазму путем прохождения через локальные отверстия в клеточной мембране.

5. Было предпринято множество попыток идентифицировать эндогенные рецепторы одно- и двуцепочечных олигонуклеотидов, что однако привнесло крайне мало ясности в понимание механизмов транспортировки экстраклеточных НК. Во многих случаях выявленные белки не были окончательно охарактеризованы, отсутствуют какие-либо прямые свидетельства того, что они действительно принимают активную роль во взаимодействии олигонуклеотидов с клеткой.

Для изучения взаимодействия НК с клетками *in vitro* были использованы олигонуклеотиды и протяженные молекулы НК, содержащие радиоактивные и флуоресцентные метки или биотин, либо несущие алкилирующие и фотоактивируемые группы, способные модифицировать клеточные белки, связывающие такие производные НК (метод аффинной модификации). Оценка эффективности связывания НК клетками проводили, применяя как гетерогенные НК, так и гомогенные олиго- и полинуклеотиды, содержащие только один (или два в случае двуцепочечных НК) тип нуклеотидов, например, олиго(dT) или поли(dA:dT). В результате изучения взаимодействия НК с культурами клеток различными исследовательскими группами было обнаружено и в разной степени охарактеризовано большое количество белков, способных связывать НК. Молекулярная масса выделенных белков варьировала от 15 до 147 кДа .

Было высказано предположение об участии интегринов и scavenger рецепторов в этом процессе. Однако, полученные данные оказались противоречивыми. Также был описан предположительный транспортный белок для олигонуклеотидов, но это исследование также не получило дальнейших экспериментальных подтверждений со стороны других групп. Интересным кандидатом явился

гомолог млекопитающих белка транспорта дцРНК (двуцепочечной РНК) SID-1 у *C. elegans*. SID-1 определенное играет ключевую роль в передаче сигналов РНК-интерференции от клетки к клетке у беспозвоночных. Увы, первичная публикация о роли SID-1 в проникновении siRNA в клетки млекопитающих пока не получила какого-либо продолжения.

Наиболее убедительными примерами возможных клеточных рецепторов, связывающих олигонуклеотиды, являются Toll-Like рецепторы. TLR9 связывает ДНК, содержащие CpG-богатые последовательности, TLRs7/8 связывает одноцепочечные РНК, тогда как TLR3 связывает двуцепочечные РНК. Как правило, эти рецепторы находят скорее в эндосомальных мембранах, чем на поверхности клеток, не исключено, что в некоторых случаях они действительно способны принимать участие в накоплении олигонуклеотидов внутри клеток. К примеру, известно, что присоединение CpG-мотива к siRNA может существенно повышать эффективность ее поглощения и биологического действия.

Bennett с соавторами был выделен белок массой 30 кДа, связывающий биотинилированную ДНК фага λ на поверхности нейтрофилов человека. Связанная таким образом ДНК проникала внутрь клеток, где происходила ее деградация до мононуклеотидов. Позднее с помощью метода проточной цитометрии было обнаружено, что данный белок выявляется также на 67% лимфоцитов и 98% моноцитов человека. Количество белка 30 кДа на поверхности лимфоцитов составило 5×10^5 молекул на клетку.

Дуплет белков с молекулярной массой 79 кДа, связывающий алкилирующее производное олигонуклеотида $p(dT)_{16}$, был выявлен группой под руководством Власова на поверхности клеток линий COS-1, Vero, L-671, Ag 17-1, CHO, B7. Кроме того, на поверхности гепатоцитов мыши был обнаружен дуплет белков массой 83 кДа, также связывающий алкилирующее производное олигонуклеотида. Используя биотинилированные производные 16- и 18-звенных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце фотоактивируемую группу п-азидотетрафторбензальдегидразон- β -аланил, с помощью электронной микроскопии авторами было показано, что в результате проникновения в клетки линии А-9 олигонуклеотиды накапливаются в ядре. На поверхности клеток этой линии были обнаружены НК-связывающие белки массой 70 и 75 кДа. Gasparro с соавторами в экспериментах по изучению связывания с клетками [^{32}P]-меченой ДНК обнаружили три ДНК-связывающих белка размером 28, 59 и 79 кДа на поверхности человеческих лимфоцитов. Также три ДНК-связывающих белка было выявлено на клетках скелетной мышцы кролика путем инкубации с [^{32}P]-меченой линейаризованной плазмидой pBluescript. С помощью аффинной модификации фотоактивируемыми производными 21-звенных фосфодиэфирного и фосфоротиоатного олигонуклеотидов два олигонуклеотид-связывающих белка массой 100-110 кДа было обнаружено на клетках KB, HepG2, HL-60 и H1. Было показано, что количество таких белков варьирует в зависимости от используемой клеточной линии. Несколько других белков, связывающих нуклеиновые кислоты, было описано различными исследовательскими группами.

К сожалению, большинство из описываемых в литературе НК-связывающих белков, обнаруженных на поверхности различных культивируемых клеток, не были окончательно охарактеризованы, и их роль в процессе поглощения клетками НК остается неясной. Погрешность в определении молекулярной массы белков может приводить к тому, что один и тот же белок в разных работах может быть описан как несколько различных НК-связывающих белков.

Согласно данным группы Лактионова выделенные ими белки массой 68 и 38 кДа соответствуют обнаруженным ранее этими же исследователями белкам 60-63 и 35 кДа. Сложность в сравнении полученных данных усугубляется использованием исследователями разных линий клеток и типов НК. Лишь в единичных работах выявленные белки были не только охарактеризованы по молекулярной массе, но и определены. Так, обнаруженный группой под руководством Лактионова белок массой 38 кДа был выделен с помощью аффинной хроматографии на Ультрагеле-А2 с иммобилизованным олигонуклеотидом рCAGTAATATCTAGGA и идентифицирован как глицеральдегид-3'-фосфатдегидрогеназа= Полоса, соответствующая белку массой 68 кДа, выявленная этой же группой исследователей, оказалась смесью четырех разных белков: альбумин, кератин K1, кератин K10 и кератин K2e. В работе Benimetskaia с соавторами было показано, что основным белком, связывающим олигонуклеотиды на поверхности нейтрофилов, натуральных киллерных клеток и макрофагов является гепарин-связывающий интегрин Mac-1. Стимуляция экспрессии этого белка в клетках сопровождалась усилением связывания и интернализации клетками фосфодиэфирных и фосфоротиоатных олигонуклеотидов. При этом для связывания алкилирующего производного фосфодиэфирного олигонуклеотида требовалось присутствие ионов кальция и магния, в то время как связывание производного фосфоротиоатного олигонуклеотида слабо зависело от концентрации этих ионов.

На основании результатов экспериментов по ингибированию связывания НК обнаруженными экстраклеточными белками можно заключить, что они обладают разной, довольно низкой специфичностью по отношению к НК и некоторым другим анионным молекулам.

Так, было показано, что связывание ДНК с 30 кДа белком, обнаруженным Bennett с соавторами, ингибируется в присутствии немеченой пДНК, но не поли(dA:dT), РНК или мононуклеотидами. Аффинная модификация алкилирующим производным олигонуклеотида НК-связывающих белков массой 75-80 кДа, выделенных группой под руководством Власова, ингибируется в присутствии тРНК, одноцепочечной и двуцепочечной ДНК. Ингибирование взаимодействия олигонуклеотидов с белками 100-110 кДа, обнаруженных этой же исследовательской группой на мембранах клеток HerG2, наблюдается при добавлении к клеткам двуцепочечной ДНК, тРНК и декстрансульфата, но не мононуклеотидов.

Эффективность связывания НК всеми перечисленными выше белками, вероятно, не зависит от их последовательности. Уникальным примером специфического поглощения клетками НК со строго определенной последовательностью является взаимодействие с аптамерами – молекулами НК, имеющими определенную пространственную структуру, которая обеспечивает их специфическое связывание с клеточными белками. Другим примером влияния последовательности олигонуклеотида на эффективность проникновения в клетки служит взаимодействие олигонуклеотидов, содержащих поли(dG)-последовательности, со scavenger рецепторами. В данном случае наличие полигуаниновых мотивов приводит к формированию олигонуклеотидами супрамолекулярных тетрамерных комплексов, которые являются лигандами для рецепторов этого типа.

Таким образом, исследования взаимодействия НК с эукариотическими клетками *in vitro* привели к обнаружению НК-связывающей активности как некоторых известных клеточных белков, так и к выделению поверхностных мембранных белков, чья биологическая функция остается на сегодняшний день неопределенной. Белки, с разной эффективностью связывающие короткие и протяженные молекулы НК, были выявлены на различных типах культивируемых клеток, что укрепило представление об основной роли рецептор-опосредованного эндоцитоза в интернализации НК при их невысокой концентрации в среде.

В результате сравнения литературных данных, описывающих характер взаимодействия НК с различными культурами эукариотических клеток легко заметить высокую гетерогенность полученных на сегодняшний день результатов. Отличия в эффективности связывания НК разными типами клеток отчасти подтверждают теорию преобладания рецептор-опосредованного эндоцитоза в процессе интернализации молекул НК клетками.

Альтернативным объяснением служит предположение о различии механизмов, вовлекаемых в этот процесс разными типами клеток. Согласно недавно опубликованным данным, полученным Wittrup с соавторами, проникновение ДНК в клетки может происходить посредством протеогликан-зависимого макропиноцитоза, что оспаривает предположение о специфическом рецептор-опосредованном транспорте. Протеогликаны, как и НК, являются полианионными молекулами и представляют одну из основных составляющих клеточной мембраны. Wittrup с соавторами показали, что клетки, имеющие генетически обусловленный дефицит протеогликанов в мембране проявляют значительно меньшую способность поглощать ДНК. Это парадоксальное наблюдение авторы объясняют взаимодействием с ДНК некоторых белков, экскретируемых клетками и присутствующих в кондиционированной культуральной среде. По результатам масс-спектрометрии в среде были обнаружены НК-связывающие белки, принимающие участие в макромолекулярном транспорте, который зависит от наличия протеогликанов в клеточной мембране. Основываясь на комплексном анализе данных, полученных в результате экспериментов с клетками, имеющими различные генетические или индуцированные нарушения в цепи взаимодействия

белков, определяющих основные известные сценарии протекания эндоцитоза, а также данных исследования внутриклеточной колокализации, авторы данной работы приходят к выводу, что ДНК проникает в клетки путем макропиноцитоза. При этом исследователи наблюдали, что существенная часть интернализируемой ДНК попадает в ядро, где может происходить экспрессия транспортируемых генов.

Эти результаты частично перекликаются с данными, полученными другой исследовательской группой, занимавшейся изучением механизма проникновения пДНК в кератиноциты. Для выявления механизма интернализации в этом исследовании клетки обрабатывали флуоресцентно-меченой пДНК в присутствии амилорида и N,N-диметиламилорида - ингибиторов макропиноцитоза, нистатина и филипина - ингибиторов клатрин-независимого эндоцитоза и хлорпромазина - ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза. Известно, что кавеолы занимают существенную часть базолатеральной поверхности кератиноцитов, однако ингибирование этого механизма не оказывало влияние на интернализацию ими пДНК. Также не было обнаружено подавления процесса поглощения кератиноцитами пДНК в присутствии ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза, тогда как добавление к клеткам амилорида и N,N-диметиламилорида приводило к десятикратному снижению эффективности проникновения пДНК в кератиноциты. Анализ с помощью конфокальной микроскопии не выявил колокализации интернализированной плазмиды с FITC-меченым трансферрином - маркером клатрин-зависимого транспорта; напротив, декстрансульфат - известный маркер жидкофазного эндоцитоза демонстрировал сходный с пДНК характер внутриклеточного распределения. Полученные данные указывают, что проникновение пДНК в кератиноциты, по-видимому, происходит путем макропиноцитоза. При этом авторами данного исследования впервые было обнаружено, что поглощенная кератиноцитами пДНК является транскрипционно активной в культуре клеток, однако синтеза белка, кодируемого репортерным геном, зафиксировано не было.

6. Процесс интернализации как коротких, так и протяженных НК культивируемыми клетками за исключением особых случаев является малоэффективным. В связи с неутешительными результатами, полученными в экспериментах *in vitro*, многие исследователи пришли к выводу о необходимости использования искусственных систем трансфекции. Однако данные экспериментов с культурами клеток зачастую существенно отличаются от результатов, наблюдаемых *in vivo*. Ввиду необходимости учитывать множество факторов, влияющих на эффективность трансфекции *in vivo*, интерпретация получаемых результатов также является сложной задачей. Так, многие биохимические трансфектанты, обеспечивающие эффективную доставку к внутриклеточным мишеням *in vitro*, инактивируются при введении в организм животного. С другой стороны, эффективность интернализации коротких и длинных молекул НК в организме может происходить с привлечением иных механизмов или дополнительных факторов, позволяющих получать результаты трансфекции, превышающие ожидаемые.

После внутрисуставного введения в синовиальную ткань *in vivo* химически модифицированных рибозимов наблюдалось специфичное снижение уровня мРНК интерлейкин 1 α индуцируемого стромелизина, что свидетельствовало о проникновении данной НК в клетки-мишени. Кроме того, было показано, что при интратекальной инъекции флуоресцентно меченые олигонуклеотиды захватывались нейронами спинного корневого ганглия в отсутствие дополнительных трансфицирующих соединений. В этом случае введенный олигонуклеотид подавлял экспрессию периферического тетродоксин-устойчивого натриевого канала NaV1.8, что приводило к нейтрализации невропатической боли, вызванной повреждением спинномозгового нерва.

Транспортировка терапевтических агентов в нервные ткани является сложной задачей, особую важность которой придает низкая эффективность традиционных методов терапии применительно к опухолям мозга и растущее количество данных о молекулярных механизмах развития нейродегенеративных заболеваний. Использование специфических препаратов на основе НК является одним из возможных альтернативных способов лечения подобных нарушений. В исследовательской группе под руководством Hoekstra было показано, что для эффективной трансфекции антисмысловых олигонуклеотидов в культуре нервных клеток требуется использование катионных липосом или других искусственных методов трансфекции, поскольку при добавлении к клеткам олигонуклеотидов в свободной форме основная их часть оказывается в полости эндосом и не проявляет специфической биологической активности. Этой же группой авторов было обнаружено, что при инъекции антисмыслового олигонуклеотида в мозговую ткань крыс *in vivo* в отсутствие катионных липидов происходит поглощение молекул олигонуклеотида как нервными, так и соматическими клетками. При этом олигонуклеотиды диффузно распределяются в цитоплазме клеток и обнаруживаются в ядре. В качестве предположительного механизма, по которому происходит интернализация олигонуклеотидов клетками нервной ткани, исследователи предлагают активность транспортного канала НК, аналогичного каналу, представленному в клетках почечных каналов крыс, обнаруженному *in vitro*. Основанием для этого предположения служат данные по ингибированию трансфекции с участием свободного олигонуклеотида при обработке ткани антителами к каналу, найденному в почках. К сожалению, на сегодняшний день не получено дальнейших подтверждений участия в транспорте НК подобного типа каналов.

В то время как в экспериментах на клеточных культурах плазмидная ДНК (пДНК) при простом ее добавлении к культуре практически не проникает в клетки и оказывается неактивной, в условиях введения той же свободной ДНК в организм *in vivo* может наблюдаться эффективная экспрессия доставляемого гена. Несмотря на меньшую эффективность по сравнению с искусственными методами доставки отсутствие каких-либо значительных побочных эффектов сделало этот способ трансфекции весьма привлекательным и наиболее приемлемым на сегодняшний день для доставки генетических вакцин и многих препаратов на основе НК, находящихся на стадии клинических испытаний и направленных на лечение таких заболеваний как мышечная дистрофия Дюшенна, периферическая лимбальная ишемия и сердечная ишемия. Недостатком метода доставки в

организм в свободной форме можно считать необходимость введения очень больших количеств пДНК, что связано как с ее быстрой деградацией под действием нуклеаз, так и с невысоким уровнем попадания в клетки-мишени. В нескольких работах было показано, что введение свободной пДНК позволяет добиться продолжительной экспрессии доставляемого гена в случае трансфекции клеток, находящихся в постмитотическом состоянии (например, клетки мышечной ткани), или медленно делящихся клеток в том случае, если экспрессируемый белок не вызывает интенсивного иммунного ответа.

Впервые эффективная трансфекция протяженных свободных НК была показана Wolff с соавторами при инъекции мРНК и пДНК в скелетную мышцу. Интересно, что этот результат был получен в процессе исследования, когда введение НК в отсутствие трансфектантов должно было служить контрольным экспериментом для оценки трансфицирующей активности катионных липидов. Сходные результаты по экспрессии доставляемых конструкций были получены после прямых инъекций в другие органы и ткани, такие как печень, сердце и щитовидная железа. Было показано, что при использовании внутривенных инъекций кератиноциты и дендритные клетки способны эффективно поглощать пДНК *in vivo*, поэтому кожная ткань тоже представляет собой привлекательную мишень для генной терапии. Кроме того, Huang с соавторами было обнаружено, что свободная пДНК может эффективно проникать в клетки легочного эндотелия, при условии достаточно длительного взаимодействия НК с клетками для связывания с предполагаемым рецептором.

Тем не менее, по сравнению с результатами, достигаемыми с использованием искусственных систем трансфекции, эффективность доставки во всех упомянутых выше случаях была достаточно невысокой и отличалась существенной вариабельностью, особенно в экспериментах с крупными животными, такими как нечеловекообразные приматы. Позднее при тестировании новых трансфекционных комплексов пДНК с амфипатическими соединениями и белками для трансфекции в гепатоциты *in vivo* в работах Budker с соавторами и Zhang с соавторами вновь была обнаружена экспрессия доставляемого гена в контрольных экспериментах. Вопреки ожиданиям исследователей оказалось, что при доставке свободной плазмиды наблюдался наибольший уровень экспрессии маркерного гена. Авторами этого исследования было показано, что быстрое введение относительно большого объема раствора пДНК в воротную вену, печеночную вену и желчный проток мышей и крыс приводит к эффективной трансфекции клеток печени и экспрессии доставляемого генетического материала. Эти данные нашли подтверждение при проведении экспериментов на собаках и кроликах.

Дальнейшие исследования показали, что высокий уровень экспрессии доставляемого гена в гепатоцитах можно получить при простой быстрой инъекции большого объема раствора свободной пДНК в хвостовую вену у мышей. Быстрые внутрисосудистые инъекции при высоком давлении также позволили добиться высокого уровня экспрессии при доставке пДНК в мышечную ткань. В этом случае использовалось введение большого объема раствора свободной пДНК

в полость артерии при блокировании кровотока хирургическим путем. В других работах была показана эффективность использования венозных путей для доставки пДНК.

Гидродинамическая процедура показала себя достаточно эффективной не только для протяженных НК, но и для олигонуклеотидов: так, при трансфекции клеток печени с помощью инъекции в хвостовую вену было достигнуто эффективное противовирусное действие короткой шпилечной РНК, направленной против размножения вируса гепатита С.

Несмотря на высокий интерес к интернализации свободных НК клетками организма, исследователи пришли лишь к частичному пониманию механизмов этого процесса. 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. Известно, что эукариотические клетки в составе пространственной структуры ткани имеют существенно отличающиеся паттерны экспрессии генов и характер дифференцировки по сравнению с клетками, культивируемыми на плоской поверхности. Вполне вероятно, что при извлечении из организма многие типы клеток могут терять способность к поглощению НК.

Wolff с соавторами, первыми продемонстрировавшие эффективность доставки НК в организм в свободной форме, попытались исследовать и механизм данного процесса. Анализ проникновения ДНК в мышцы *in vivo* проводили с помощью световой и электронной микроскопии. Опираясь на полученные данные, авторы пришли к заключению, что проникновение ДНК в клетки происходит не в результате локального нарушения целостности клеточных мембран, которое может происходить в процессе инъекции раствора ДНК. На основании проведенного исследования Wolff с соавторами была предложена гипотеза о наличии специфического механизма трансмембранного транспорта НК в мышечные клетки, предположительно – с вовлечением кавеоларного транспорта.

Satkauskas с соавторами для изучения механизма интернализации НК мышечной тканью *in vivo* использовали инъекции гепарина. Результаты экспериментов показали, что гепарин является ингибитором транспорта пДНК в клетки мышечной ткани. Было обнаружено, что процесс интернализации НК является достаточно медленным: повышение накопления ДНК в клетках наблюдается через 4 ч после инъекции. Основываясь на полученных данных, авторы пришли к выводу, что эндоцитоз НК в этом случае происходит в результате их связывания с клеточными рецепторами. Это же заключение ранее было сделано в обзорной работе, опубликованной Budker с соавторами. В данном обзоре исследователями были последовательно рассмотрены три возможных механизма интернализации пДНК клетками в экспериментах *in vivo*: прохождение через крупные отверстия, образуемые в мембранах клеток в процессе инъекции раствора ДНК; диффузия через небольшие временные поры в мембранах клеток и рецептор-

опосредованный эндоцитоз. В качестве основных аргументов, оспаривающих участие в интернализации пДНК первых двух из перечисленных механизмов, Budker с соавторами приводят данные об избирательности проникновения пДНК в разные типы клеток, а также данные по исследованию кинетики поглощения пДНК клетками, не согласующиеся с предположением о пассивной диффузии молекул ДНК через поры в мембране. Так, в печени пДНК проникает преимущественно в гепатоциты, а в мышцах – в мышечные волокна, но не в клетки-сателлиты, что не может быть объяснено с точки зрения представления о повреждении мембран клеток в результате повышения давления при быстром введении раствора ДНК. Кроме того, против предположения о попадании пДНК в клетки в результате нарушения целостности мембран приводятся наблюдения, показывающие, что экспрессия трансфицируемых генов обнаруживается не только вокруг сайта введения раствора ДНК, но и в отдаленных тканях организма.

Попытка проверить возможность проникновения пДНК в клетки организма посредством прохождения через небольшие временные поры в мембране была осуществлена с помощью введения в хвостовую вену при повышенном давлении раствора ТОТО-1. ТОТО-1 представляет собой небольшую полярную молекулу, поэтому предполагали, что при наличии в мембране клеток локальных пор, способных пропускать молекулы ДНК, ТОТО-1 тоже будет аккумулироваться клетками. Однако поглощение ТОТО-1 гепатоцитами наблюдалось только при инъекции в 1% растворе Triton-X100, обеспечивающем частичное разрушение клеточных мембран. На основании приведенных результатов, а также, опираясь на предшествующий опыт исследования механизмов интернализации пДНК клетками организма *in vivo*, Budker с соавторами придерживаются гипотезы о рецептор-опосредованном транспорте и высказывают предположение о наличии в организме пока не выявленных НК-связывающих рецепторных белков семейства scavenger рецепторов. Тем не менее, предложенный авторами механизм не позволяет объяснить высокую эффективность трансфекции НК в клетки организма при использовании гидродинамической процедуры. Теоретически можно предположить, что повышение давления приводит к увеличению эффективности аккумуляции НК клеточными рецепторами либо к изменению внутренней структуры ткани, способствующему более эффективному проникновению НК к сайтам связывания на поверхности клеток.

Неясным остается и вопрос о специфичности связывания НК с клетками *in vivo* и влиянии структуры и типа НК на эффективность взаимодействия с предполагаемыми рецепторами. Данные, полученные разными исследовательскими группами по ингибированию проникновения пДНК в клетки при гидродинамической процедуре, являются противоречивыми. Так, Budker с соавторами было показано, что введение пДНК, кодирующей ген люциферазы, в хвостовую вену мышей в присутствии различных полианионов, включая некодирующую пДНК, обработанную ультразвуком ДНК спермы лосося, поли(dC) и поли(I), приводило к подавлению экспрессии доставляемого репортерного гена в печени. Наибольшее ингибирующее действие (~ десятикратное снижение уровня экспрессии люциферазы) оказывали некодирующая пДНК и ДНК спермы лосося, тогда как гомогенные полинуклеотиды поли(dC) и поли(I) были менее эффективными ингибиторами поглощения клетками пДНК. С другой стороны,

было выявлено, что предварительное введение полианионов оказывает влияние на доставку пДНК в клетки при обычной инъекции, но не снижает эффективность доставки при гидродинамической процедуре. Этой исследовательской группой было высказано предположение, что для эффективного проникновения в клетки в результате инъекций при повышенном давлении вводимые соединения должны обладать достаточно большим молекулярным весом. Данное предположение объясняет наблюдение, указывающее что ТОГО-1 (молекулярная масса менее 1 кДа) не проникал в клетки при введении в организм с помощью гидродинамической процедуры. В результате дальнейших исследований этими же авторами с использованием пропидий йодида – маркера целостности клеточной мембраны - были получены данные, свидетельствующие в пользу гипотезы о возможности проникновения пДНК в клетки через небольшие временные отверстия в плазматической мембране.

Вероятно, естественный транспорт НК в эукариотические клетки происходит при участии различных молекулярных процессов. Хотя многие авторы отдают предпочтение гипотезе о рецептор-опосредованном транспорте, другими исследовательскими группами были получены данные, позволяющие выдвинуть предположение о наличии альтернативных путей интернализации НК клетками. Также не исключается возможность вовлечения как одних и тех же, так и разных белков в процесс транспорта через мембрану клеток организма разных НК: коротких олигонуклеотидов, одноцепочечных РНК и ДНК и двуцепочечных ДНК.

7. Введение химических модификаций в НК, например, присоединение липофильных заместителей или использование неприродных аналогов НК приводит к изменению физико-химических и некоторых биохимических свойств. Так, присутствие в составе молекулы липофильных заместителей может повысить эффективность взаимодействия олигонуклеотидов с липидными компонентами клеточной мембраны. Модифицированные аналоги олигонуклеотидов могут проникать в клетки с вовлечением разных механизмов.

Первые исследования в области применения олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов проводились с немодифицированными олигодезоксирибо- и олигорибонуклеотидами, имеющими природный сахарофосфатный остов. Несмотря на положительные результаты, полученные при использовании немодифицированных олигонуклеотидов в биологических экспериментах, их применение достаточно ограничено, что связано в первую очередь с быстрой деградацией олигонуклеотидов с природным скелетом под действием нуклеаз, а также, в некоторых случаях, с недостаточно высокой эффективностью их связывания с комплементарной последовательностью. В связи с этим был разработан целый ряд различных неприродных аналогов НК, среди которых многие имеют модифицированный скелет молекулы (фосфоротиотаты, метилфосфонаты, PNA – peptide nucleic acids и другие), в других используется модификация по рибозному кольцу НК (2'-O-алкильные производные, LNA – locked nucleic acids и другие). Структура наиболее широко используемых модифицированных аналогов нуклеотидов представлена на слайде.

Каждая из этих модификаций приводит к изменению свойств олигонуклеотидов, включая снижение подверженности деградации нуклеазами, способность активировать рибонуклеазу H, стабильность дуплекса, образуемого с комплементарной последовательностью и характер взаимодействия с различными компонентами клетки. С точки зрения химической структуры олигонуклеотиды, содержащие модифицированные звенья, можно разделить на имеющие отрицательно заряженный скелет молекулы (как природные фосфодиэфирные нуклеотиды), и олигонуклеотиды, имеющие нейтральный или положительно заряженный скелет молекулы. К модифицированным аналогам олигонуклеотидов с незаряженным скелетом относятся метилфосфонаты, а PNA и морфолино олигонуклеотиды в зависимости от условий в растворе имеют незаряженный или положительно заряженный остов.

Эффективность взаимодействия с клетками разных аналогов олигонуклеотидов с отрицательно заряженным скелетом молекулы существенно зависит от типа модификации. В работе Zhao с соавторами было исследовано проникновение полностью фосфоротиоатного олигонуклеотида, фосфодиэфирного олигонуклеотида и олигонуклеотида, содержащего фосфодиэфирные и метилфосфонатные звенья, в клетки селезенки мыши. Было показано, что проникновение в клетки фосфоротиоатного олигонуклеотида происходит почти в 10 раз более эффективно, чем в случае использования немодифицированного фосфодиэфирного олигонуклеотида. Наименьшую эффективность проникновения в клетки продемонстрировал гибридный фосфоротиоатный-метилфосфонатный олигонуклеотид.

Фосфоротиоаты относятся к одним из первых полученных модифицированных аналогов олигонуклеотидов. Такие нуклеотиды содержат атом серы вместо кислорода в составе межнуклеотидной связи. Первый антисмысловый препарат, одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) в 1998 г, - Формивирсен ("Formivirsen", "ISIS Pharmaceuticals", США) представляет собой фосфоротиоатный олигонуклеотид, действие которого направлено на подавление развития цитомегаловирусной инфекции и используется для лечения больных СПИД.

Было показано, что фосфоротиоатные олигонуклеотиды с высокой эффективностью взаимодействуют со многими клеточными белками, а также белками сыворотки крови. Константы диссоциации комплексов фосфоротиоатных олигонуклеотидов с некоторыми белками на порядок меньше таковых для фосфодиэфирных олигонуклеотидов. Интересно, что эффективность связывания фосфоротиоатных олигонуклеотидов с белками rsCD4, GP120 и P80 зависит от длины используемого модифицированного олигонуклеотида. Аналоги олигонуклеотидов с незаряженным остовом (морфолиноолигонуклеотиды и PNA), а также большинство siRNA при введении в организм достаточно быстро экскретируются почками. В то же время, фосфоротиоатные олигонуклеотиды обладают достаточно высоким уровнем связывания с белками плазмы, а потому

задерживаются в организме на более продолжительное время. Предпочтительное связывание и поглощение клетками почечных канальцев, а также Купферовскими клетками печени было отмечено как для бессмысленных фосфоротиоатных аналогов, так и для siRNA. При исследовании проникновения фосфоротиоатных олигонуклеотидов в культуру клеток печени, а также в ткани печени мыши привело к предположению о наличии двух механизмов захвата этих олигонуклеотидов клетками: продуктивного и непродуктивного. Непродуктивный механизм, вероятно, включает транспортировку поглощенных олигонуклеотидов в лизосомальный компартмент. Активация РНКазы H в результате бессмысленного действия происходит в случае транспортировки олигонуклеотидов к месту встречи с пре-мРНК. Несколько противоречивым в данном случае выглядит результат, показывающий, что непродуктивный путь не блокируется siRNA, воздействующей на клатрин-зависимый эндоцитоз, но при этом ингибируется siRNA, направленной на экспрессию AP2M1 – адаптерного белка клатрин-зависимого пути.

Однако высокая активность фосфоротиоатных аналогов имеет и обратную сторону. При введении в организм способность фосфоротиоатных олигонуклеотидов эффективно связываться с различными белками приводит не только к повышению уровня проникновения в клетки, но и к целому спектру побочных эффектов, включая активацию каскада комплемента и острую гипотензию. Кроме того, интенсивное связывание с белками сыворотки крови снижает эффективность транспорта конъюгатов фосфоротиоатов через гематоэнцефалический барьер, что затрудняет их использование для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Фосфоамидатные и 2'-O-метильные аналоги олигонуклеотидов тоже имеют отрицательно заряженный скелет молекулы. Было проведено сравнение эффективности проникновения фосфоротиоатного, фосфоамидатного и 2'-O-метильного олигонуклеотидов, а, кроме того, метилфосфонатного олигонуклеотида и PNA, имеющих незаряженный скелет молекулы, в клетки линий HL60, 504 и в мышечные фибробласты. Эффективность интернализации клетками различных аналогов олигонуклеотидов уменьшалась в ряду фосфоротиоатный олигонуклеотид > 2'-O-метильный, фосфоамидатный олигонуклеотиды > PNA и метилфосфонатный олигонуклеотиды. PNA-олигонуклеотид демонстрировал более эффективное проникновение в клетки, чем метилфосфонатный олигонуклеотид, однако это различие наблюдалось лишь при длительной инкубации (через 9 ч после добавления к клеткам), что связано с более линейным характером кинетики интернализации клетками PNA. При этом уровень проникновения в клетки фосфоротиоатного олигонуклеотида превышал уровень проникновения метилфосфонатного производного в 8-10 раз, а 2'-O-метильного и фосфоамидатного – в 3-5 раз. Было высказано предположение, что низкая эффективность интернализации клетками олигонуклеотидов с незаряженным скелетом связана с тем, что они слабее связываются с белками на поверхности плазматической мембраны. При проведении экспериментов по связыванию различных модифицированных аналогов с клетками линии HL60 было показано, что добавление метилфосфонатного аналога не приводит к снижению количества комплексов фосфодиэфирного олигонуклеотида с НК-

связывающим белком, обнаруженным на поверхности этих клеток. Это может быть обусловлено тем, что проникновение метилфосфонатов в клетки протекает по иному механизму, отличному от транспорта фосфоротиоатов. Полагают, что наиболее вероятным механизмом транспорта в клетки олигонуклеотидов, содержащих метилфосфонатные связи является жидкофазный или адсорбционный эндоцитоз.

Исходя из общих знаний о механизмах трансмембранного транспорта принято полагать, что даже полианионы меньшего размера, чем олигонуклеотиды, не проникают в цитоплазму путем пассивной диффузии через липидный бислой. В литературе имеется множество данных, показывающих, что свободные олигонуклеотиды слабо проникают через клеточную мембрану независимо от того, несут ли они отрицательный заряд или имеют незаряженный скелет молекулы. В то же время, в работе Sazanі с соавторами при сравнении антисмыслового действия нескольких модифицированных аналогов олигонуклеотидов было обнаружено, что морфолино-олигонуклеотиды и PNA обладали большей эффективностью по сравнению с остальными тестируемыми олигонуклеотидами, имеющими анионный остов. В случае PNA наблюдаемый эффект зависел от количества групп L-лизина на С-конце молекулы. Авторами работы было выдвинуто предположение, что PNA, содержащие лизин, проникали в клетку посредством механизма, сходного с интернализацией белков, содержащих CPP последовательность ("cell penetrating peptide" – пептид, проникающий в клетку).

Группой под руководством Stein был введен специальный термин – гимнозис (gymnosis) – для обозначения условий проникновения олигонуклеотидов в клетки в отсутствие каких-либо дополнительных соединений. Этой группой было опубликовано несколько работ, описывающих транспорт антисмысловых олигонуклеотидов-гапмеров, состоящих из фосфоротиоатных звеньев, ограниченных на концах олигонуклеотида LNA-модификацией или новым типом модификации – 2'F-ANA (2'-деокси, 2'-флуороарабино НК). Авторами было показано, что при соблюдении некоторых условий и использовании микромолярных концентраций такие олигонуклеотиды эффективно проникали во многие культуры клеток, а также *in vivo* при введении мышам. Исследование внутриклеточного распределения гапмерных олигонуклеотидов показало, что LNA-содержащие компоненты могут быть ассоциированы с Р-тельцами, которые принято считать сайтами активности siRNA.

8. Поскольку полианионная природа молекул НК считается одной из основных причин низкой эффективности их неспецифического захвата клетками, разумным могло оказаться предположение, что наличие гидрофобных заместителей в составе доставляемой НК может оказать благоприятное влияние на взаимодействие с клеточными мембранами и в конечном итоге привести к переносу внутрь клеток. Действительно, ранние работы по исследованию проникновения в клетки олигонуклеотидов, ковалентно связанных с липофильными молекулами, такими как алифатические линейные заместители, фосфолипиды, додекандиол, ундецил и холестерин, показали большую

эффективность связывания клеточными мембранами и повышенную биологическую активность полученных конъюгатов по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами. Наибольшее применение среди исследованных липофильных конъюгатов нашла модификация олигонуклеотидов холестерином. Конъюгаты с холестерином немодифицированных олигонуклеотидов и их химически модифицированных аналогов были получены многими исследовательскими группами, причем присоединение холестерина к олигонуклеотиду проводили как с 5'-, так и с 3'-конца. Было показано, что конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов с холестерином обладают повышенной способностью проникновения в культивируемые клетки и проявляют специфическое биологическое действие при более низких концентрациях олигонуклеотида. Положительным аспектом этого результата является не только то, что снижение эффективной концентрации олигонуклеотидов позволяет уменьшить их побочное воздействие на обрабатываемые клетки, но и возможность понижения предполагаемой стоимости лечения с помощью таких препаратов.

Повышение специфической биологической активности олигонуклеотидов в результате ковалентного присоединения холестерина было продемонстрировано и в экспериментах с животными моделями. Так, внутрибрюшинное введение крысам фосфоротиоатного олигонуклеотида, несущего холестерин на 5'-конце, гомологичного последовательности гена *CYP2B1*, приводило к специфическому подавлению экспрессии гена-мишени, однако при этом уменьшалось время, необходимое для выведения активного олигонуклеотида из циркуляции. Группой под руководством Van Berkel была исследована фармакокинетика фосфоротиоатного олигонуклеотида, имеющего в своем составе два остатка холестерина, присоединенные по 3'- и по 5'-концам. Согласно полученным результатам основная часть модифицированного олигонуклеотида после внутривенной инъекции крысам поглощалась органами ретикулоэндотелиальной системы, через 90 мин после инъекции преобладающая часть олигонуклеотидов (более 80% дозы) была обнаружена в клетках печени. Авторами данного исследования было предложено использовать модифицированные олигонуклеотиды, несущие холестерин на обоих концах молекулы, для направленного воздействия на молекулярные мишени, специфичные именно для клеток печени.

Зависимость биологической активности фосфоротиоатных антисмысловых олигонуклеотидов от количества модификаций холестерином (по обоим или по одному концу молекулы), а также от положения модификации (по 3'- или по 5'-концу) было исследовано на модели дифференцированных клеток РС12. Олигонуклеотид, содержащий холестерин на 5'-конце, был более эффективен, чем фосфоротиоатный олигонуклеотид без холестерина, но в целом проявлял достаточно низкую активность в отношении подавления экспрессии гена-мишени. Присоединение холестерина на 3'-конец приводило к повышению эффективности селективного ингибирования экспрессии гена мишени, а наибольший уровень подавления экспрессии наблюдался для конъюгата, содержащего холестерин на обоих концах олигонуклеотида. Возможно, в данном случае повышение активности антисмыслового олигонуклеотида было связано

не только с большим уровнем его интернализации клетками, но и с большей устойчивостью конъюгата к действию экзонуклеаз.

Проникновение в клетки холестерин-модифицированных олигонуклеотидов, вероятно, обусловлено несколькими молекулярными механизмами. Неспецифическое связывание липопротеинами низкой плотности (LDL), присутствующими в биологических жидкостях, может обеспечить доставку холестерин-олигонуклеотидов в клетки благодаря связыванию с рецепторами липопротеинов, а также интернализации образуемых комплексов пиноцитозом. Несвязанные липопротеинами холестерин-олигонуклеотиды могут проникать в клетку благодаря взаимодействию молекулы холестерина с гидрофобной частью клеточной мембраны и последующему захвату по пути пиноцитоза. Было также сделано предположение о возможности связывания бис-холестерин-фосфоротиоатных олигонуклеотидов scavenger рецепторами клеток ретикулоэндотелиальной системы. Среди других возможных механизмов, вносящих вклад в повышение эффективности интернализации клетками и биологической активности холестерин-модифицированных олигонуклеотидов по сравнению с немодифицированными называют возможное изменение путей внутриклеточного транспорта, снижение экзоцитоза поглощенных клетками олигонуклеотидов, повышение устойчивости олигонуклеотидов к действию клеточных ферментов.

Помимо бессмысленных олигонуклеотидов ковалентное присоединение холестерина было использовано для трансфекции siРНК. Поскольку siРНК представляет собой двуцепочечную молекулу, в данном случае возможно введение вспомогательных групп в смысловую цепь, оставляя бессмысловую цепь немодифицированной. Было показано, что внутривенное введение мышам siРНК, гомологичной мРНК гена *apoB*, кодирующего аполипопротеин В, приводило к деградации специфической мРНК в клетках печени и тонкого кишечника. В результате происходило снижение количества аполипопротеина в крови животных и уменьшение общего уровня холестерина.

Липофильные молекулы обеспечивают неспецифическое либо низкоспецифическое повышение эффективности проникновения НК в клетки. Возможно присоединение к олигонуклеотидам различных лигандов, специфично связываемых рецепторами клеток определенного типа. Ранние работы в этой области включают использование конъюгатов бессмысленных олигонуклеотидов с фолатом, предположительно, связываемых фолатным рецептором на поверхности клеток. Аналогичным образом были использованы галактозаминовый конъюгаты (взаимодействие с азиалогликопротеиновым рецептором) и присоединение к siRNA инсулиноподобного фактора роста первого типа. В большинстве подобных работ олигонуклеотиды были соединены с соответствующим лигандом через поли-L-лизин (PLL): конъюгаты лигандов с PLL путем нековалентного взаимодействия с олигонуклеотидом образовывали коацерваты, специфически узнаваемые клеточными рецепторами. Такие коацерваты представляют собой достаточно гетерогенные системы, что затрудняет их фармакологическое использование.

Биотинилирование антисмысловых олигонуклеотидов было использовано в качестве компонента системы доставки, содержащей комплексы модифицированного олигонуклеотида с конъюгатом авидина и человеческого сывороточного альбумина (HSA). Биотинилированные по 3'-концу олигонуклеотиды полностью защищены от деградации с 3'-конца сывороточными экзонуклеазами и при этом сохраняют биологическую активность по отношению к мРНК мишени. Образование комплекса с конъюгатом авидина позволяло в 84 раза увеличить уровень проникновения олигонуклеотида в лимфоциты. Известно, что НК не проходят через гематоэнцефалический барьер, пропускающий лишь липофильные молекулы размером менее 600 Да. Это затрудняет доставку препаратов на основе НК в клетки мозга при введении в кровотоки. Использование конъюгатов биотинилированных олигонуклеотидов с авидином, соединенным со стрептавидином или моноклональными антителами, направленными к рецептору трансферрина, позволило преодолеть это препятствие и достичь эффективного проникновения олигонуклеотидов в клетки-мишени в экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

Некоторые белки обладают способностью при взаимодействии с клетками транспортироваться через мембрану во внутриклеточное пространство. Фрагменты этих белков (10 – 15 аминокислот), благодаря которым происходит их транспорт через клеточную мембрану, были названы пептидами, проникающими в клетки (СРР) или белковыми доменами трансдукции (РТД). К ним относятся пептид Tat ВИЧ, пенетратин, транспортан и некоторые другие. Несмотря на то, что первичная структура СРР очень разнообразна, все они являются положительно заряженными (в основном, за счет высокого процентного содержания аргинина) и имеют в своем составе аминокислоты с объемными гидрофобными боковыми группами. Изначально предполагалось, что СРР проникают в клетку путем транслокации через мембрану (некоторые из последних исследований по-прежнему поддерживают это предположение). Однако, большинство полученных результатов указывают на то, что катионные СРР сначала связываются с отрицательно заряженными протеогликанами на поверхности клетки и поглощаются по пути эндоцитоза – то есть попадают в состав эндосом. Разные исследования связывают проникновение Tat и его конъюгатов с такими процессами как клатрин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, кавеоларный транспорт (в зависимости от типа клеток и экспериментальных условий). В целом, небольшие молекулы при присоединении к СРР проникают в клетки легче, чем крупные. Образующиеся эндосомы проходят сквозь мембрану и высвобождают свое содержимое в цитоплазму или другие клеточные компартменты.

Вскоре после открытия СРР было предложено их использование для трансфекции НК и трансдукции белковых молекул в клетки. Ковалентное присоединение СРР к НК было осуществлено различными способами: например, через дисульфидные или тиоэфирные связи или через образование имида малеиновой кислоты. Предполагали, что такие “мостики” будут легко гидролизироваться в клетке, высвобождая НК. К преимуществам использования СРР можно отнести отсутствие

негативного влияния белков сыворотки крови на проникновение комплекса CPP-НК в клетки, что отличает этот тип доставки НК от большинства других искусственных систем трансфекции.

CPP были успешно использованы для повышения эффективности проникновения в клетки олигонуклеотидов и их синтетических аналогов: фосфоротиоатов и PNA, а также пДНК. Например, в работе Rogers с соавторами был использован конъюгат олигонуклеотида, гомологичного последовательности репортерного гена *supFGL*, с транспортным пептидом гомеодомена *Antennapedia*. Трансфекция олигонуклеотида в клетки должна была приводить к индукции точечных мутаций в гене-мишени. Было показано, что полученный конъюгат индуцировал появление мутаций в 20 раз чаще, чем немодифицированный олигонуклеотид, что свидетельствовало о повышении эффективности проникновения в клетку. Интересен тот факт, что последовательность используемого олигонуклеотида влияла на эффективность проникновения в клетки в этих экспериментах. Следует отметить, что большей эффективностью проникновения в клетки обладают конъюгаты CPP с олигонуклеотидами, имеющими незаряженный скелет, например, с PNA или морфолиноолигонуклеотидами. Конъюгаты CPP со сплайсинг-корректирующими олигонуклеотидами, содержащими эти типы модификаций, показали хороший уровень специфического биологического действия на животной модели мышечной дистрофии Дюшенна.

Аптамеры представляют собой молекулы НК, обладающие высоким сродством к определенным белкам или небольшим молекулам, причем эффективность и избирательность связывания аптамеров с лигандами сравнимы со сродством специфических антител. В отличие от антител и вирусных белков аптамеры не обладают иммуноиндуцирующими свойствами, что делает их перспективными для использования в качестве адресующих групп, направленных на взаимодействие с клеточными рецепторами. Получение аптамеров, селективно связывающихся с определенным экстраклеточным рецептором осуществляется с помощью процедуры SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). На сегодняшний день выделены аптамеры ко многим биологическим маркерам, включая маркеры определенных типов опухолевых клеток. Присоединение аптамеров было использовано для направленной доставки в клетки-мишени антисмысловых олигонуклеотидов и siРНК. PSMA – мембранный белок, гиперэкспрессируемый опухолевыми клетками при раке простаты. Использование siРНК, соединенной с аптамером к данному белку, позволило осуществить селективное снижение экспрессии гена-мишени, что приводило к гибели опухолевых клеток на ксенотрансплантатной модели рака простаты. При этом siРНК не проникала в здоровые клетки, то есть не происходило нарушение жизнедеятельности нормальных тканей. В другой работе сходные химерные молекулы siRNA-аптамер, направленные на экспрессию генов *Upf2* и *Smg1*, подавляли рост опухоли *in vivo*.

9. Образование НК некоторых структур и наличие в их составе определенных нуклеотидных последовательностей может приводить к повышению эффективности транспорта в клетки. Так, проникновение олигонуклеотидов

через клеточную мембрану может быть усилено при образовании молекулами олигонуклеотидов супрамолекулярных комплексов и их аккумуляции на поверхности клеток. Кроме того, существуют данные о том, что некоторые клетки способны сиквенс-специфически захватывать комплексы НК, обеспечивая их транспорт к внутриклеточным мишеням.

Бактериальная ДНК и олигонуклеотиды, содержащие CpG мотивы, являются сильными активаторами клеток иммунной системы. Их воздействие на клетки включает активацию, поликлональную пролиферацию и секрецию иммуноглобулинов В-клетками, секрецию цитокинов макрофагами и дендритными клеткам, прямую и непрямую стимуляцию Т-клеток, индуцирующее влияние на гемопоэз. CpG-содержащие олигонуклеотиды благодаря своей способности индуцировать иммунный ответ первого типа в Т-хэлперах были предложены в качестве нового класса вспомогательных лекарственных средств для использования при терапии аллергических реакций, лечения инфекционных и онкологических заболеваний. Для проявления иммуностимулирующего действия CpG олигонуклеотиды, наиболее вероятно, должны быть способны проникать внутрь клеток мишеней для взаимодействия с белком TLR9 (Toll-like receptor 9). Было показано, что CpG олигонуклеотиды, содержащие полигуаниновые последовательности, обладают повышенной способностью проникать в клетки, что, возможно, обусловлено их связыванием со scavenger рецепторами. Scavenger рецепторы представляют собой интегрированный в мембрану гликопротеиновый тример и обладают необычайно широкой для мембранного рецептора субстратной специфичностью. Лигандами этих рецепторов являются различные полианионы, включая некоторые химически модифицированные белки, такие как LDL и M-BSA, полисахариды, фосфолипиды, а также и полирибонуклеотиды. Интересен тот факт, что такие полирибонуклеотиды, как поли(I) и поли(G) связываются scavenger рецепторами и могут быть использованы в качестве их конкурентных ингибиторов, а для поли(C), поли(U) и поли(A) такой активности показано не было. В работе Pearson с соавторами было выявлено, что необходимым требованием для связывания и конкурентного ингибирования полирибонуклеотидами scavenger рецептора 1го типа является образование квадруплексных структур. Дело в том, что молекулы полинуклеотидов, богатые гуанином, способны формировать межмолекулярные и внутримолекулярные четырехцепочечные правозакрученные спирали благодаря образованию G-квартетов между четырьмя гуанинами

Квадруплексы играют важную структурную и регуляторную роль в функционировании природных НК; в частности, было показано, что G-богатые теломерные и центромерные повторы образуют четырехцепочечные комплексы в физиологических условиях. С другой стороны, образование квадруплексов может быть использовано для повышения захвата биологически активных олиго- и полинуклеотидов определенными типами клеток путем взаимодействия со scavenger рецепторами. Впервые повышение эффективности взаимодействия с лимфоцитами для поли(G) НК было продемонстрировано в 1998 г. Pisetsky и Reich на клетках селезенки мыши. Аналогичный эффект был обнаружен и для некоторых других типов клеток. При исследовании влияния введения поли(G)

последовательностей в CpG олигонуклеотиды на их иммуностимулирующие свойства разные группы исследователей наблюдали положительное или отрицательное влияние введения этого мотива на биологическую активность олигонуклеотидов в зависимости от его локализации в последовательности олигонуклеотида и наличия модификаций скелета молекулы. В работе Dalpke с соавторами было показано, что олигонуклеотиды, имеющие центральный CpG мотив и поли(G) последовательность на 3'-конце (5 последовательно идущих гуанинов), более эффективно поглощаются клетками, чем олигонуклеотиды без поли(G) последовательности. Этот же олигонуклеотид проявлял большую иммуностимулирующую активность по отношению к активации Т хелпер иммунного ответа первого типа в экспериментах *in vivo*, чем CpG олигонуклеотид, не содержащий поли(G).

Wu с соавторами использовали процедуру SELEX для определения структуры олигонуклеотидов, обладающих повышенной способностью проникать в В клетки первичной культуры хронической миелоидной лейкемии человека]. Авторам исследования не удалось обнаружить единой сходной последовательности для всех выделенных олигонуклеотидов (R-аптамеров), однако общей чертой всех выделенных аптамеров являлось наличие поли(G) мотива на 3'-конце. Согласно данным ВЭЖХ все выделенные R-аптамеры в физиологических условиях образовывали мультимерные агрегаты. Наиболее вероятно, что агрегация R-аптамеров тоже обусловлена формированием G-квартетов. Авторы данного исследования наблюдали зависимость между способностью олигонуклеотидов к агрегации и эффективностью их проникновения в опухолевые клетки. Было показано, что интернализация R-аптамеров клетками является насыщаемым процессом, что подтверждает предположение авторов о проникновении аптамеров в клетки по пути рецептор-опосредованного эндоцитоза. Исследователи предполагают, что молекулярный механизм транспорта R-аптамеров в В клетки может быть связан с активностью либо рецепторов семейства scavenger, либо других поверхностных рецепторов, участвующих в транспорте через мембрану крупных отрицательно заряженных молекул. Интересно, что позднее другой группой исследователей под руководством Sczakiel был обнаружен гексануклеотидный мотив TCGTGT, при наличии которого CpG олигонуклеотид проявлял высокую иммуностимулирующую активность и тоже обладал повышенной эффективностью проникновения в клетки. Поскольку данный мотив не содержит последовательных гуанинов, возможно, интернализация этого олигонуклеотида происходит с вовлечением поверхностных белков другого типа.

Взаимодействие со scavenger рецепторами олигонуклеотидов, содержащих поли(G) последовательности, также использовали для направленного транспорта антисмысловых олигонуклеотидов в макрофаги. В модельной системе зараженных макрофагов антисмысловой олигонуклеотид, гомологичный участку сайта инициации трансляции мРНК вируса везикулярного стоматита (VSV) и имеющий на 3'-конце полигуаниновую последовательность, эффективно проникал в клетки и подавлял размножение вируса.

Олигонуклеотиды, имеющие G-богатые последовательности способны образовывать в растворе два типа супрамолекулярных структур: четырехцепочечные квадруплексы и так называемые “frayed wires” (=DNA_{FW}, то есть ДНК в форме “растрепанной нити”). Было показано, что эти два типа комплексов отличаются друг от друга как по стехиометрии образования, так и по некоторым другим свойствам (например, по подверженности метилированию с помощью диметилсульфата), что связано с разными взаимодействиями между гуанинами, участвующими в их стабилизации. Олигонуклеотиды, последовательность которых удовлетворяет формуле $d(N_xG_y)$ или $d(G_yN_x)$, где $x > 5$, $y > 10$, а N – любой нуклеотид, преимущественно образуют DNA_{FW}, если же количество гуанинов в цепи меньше (5-8), то происходит формирование квадруплексов. DNA_{FW} состоят из агрегатов нескольких олигонуклеотидов и при разделении с помощью гель-электрофореза дают распределение в несколько полос, соответствующих ассоциации двух, трех, четырех и т.д. исходных олигонуклеотидов. DNA_{FW} включают два структурных элемента: стебель, формируемый в результате нековалентных взаимодействий между поли(G) последовательностями олигонуклеотидов, и свободных концов олигонуклеотидов. Стебель DNA_{FW} стабилен по отношению к химической и термической денатурации, а также устойчив к деградации под действием ферментов. Свободные концы олигонуклеотидов в составе DNA_{FW} тоже обладают повышенной стабильностью к действию нуклеаз; при этом свободные одноцепочечные концы олигонуклеотидов могут участвовать в образовании канонических Уотсон-Криковских водородных связей. При исследовании проникновения DNA_{FW} в клетки гепатомы Yanze с соавторами показали, что этот процесс является насыщаемым и зависит от температуры, при которой производится инкубация олигонуклеотидов с клетками. Основываясь на данных конкурентного ингибирования проникновения в клетки DNA_{FW} и одноцепочечной ДНК, авторы данного исследования полагают, что проникновение в клетки олигонуклеотидов, образующих DNA_{FW}, происходит благодаря рецептор-опосредованному эндоцитозу с участием тех же рецепторов, которые обеспечивают захват клетками одноцепочечных НК. При этом эффективность проникновения олигонуклеотидов в составе DNA_{FW} в цитоплазму и ядра клеток выше, чем в одноцепочечной форме; DNA_{FW} более стабильны в клеточной среде, чем одноцепочечные НК. Позднее этой же группой исследователей были получены данные по стабильности и фармакокинетике DNA_{FW} *in vivo*. Результаты этого исследования подтвердили повышенную стабильность и более продолжительное время полужизни в DNA_{FW} в организме по сравнению с одноцепочечной НК.

ДНК в клетке находится преимущественно в форме дуплекса, в то время как большинство молекул РНК синтезируются и выполняют свои функции в форме одной цепи, которая приобретает в клетке сложную вторичную и третичную структуру с образованием внутри- и межмолекулярных нековалентных связей. Свойство определенных природных молекул РНК формировать внутри- и межмолекулярные комплексы было применено для получения трансфицирующих наночастиц в серии исследований группы под руководством Guo. Авторы использовали малые РНК бактериофага phi29 для формирования гетерогенных структур, несущих различные функциональные домены. рRNA (“packing RNA” – то

есть “упаковывающая” РНК) представляет собой небольшую молекулу РНК длиной 117 нт. и играет важную роль в упаковке ДНК бактериофага в прокапсид. Благодаря образованию водородных связей между шпильками рRNA может образовывать димеры, тримеры и гексамеры, размер этих частиц составляет 10-30 нм. За формирование комплексов рRNA отвечает центральный участок последовательности молекулы, образующий две шпильки, на 5'- и 3'-концах РНК расположены последовательности, образующие двуцепочечную структуру, отвечающую за взаимодействие с ДНК вируса.

Было показано, что сборка вторичной структуры этих двух функциональных доменов происходит независимо и введение модификаций в 5'- или 3'-части молекулы рRNA не приводит к нарушению формирования супрамолекулярных комплексов. Guo с соавторами были получены конъюгаты рRNA с различными функциональными группами: аптамером к CD4 рецептору, фолатом, рибозимом, siРНК к маркерным генам и про-/антиапоптотическим генам семейства *BCL-2* и флуоресцентными молекулами FITC и родамин.

Использование адресующих групп является одним из подходов, позволяющих обеспечить селективное связывание доставляемых комплексов с клетками-мишенями. Рецепторы к фолату обычно не представлены на поверхности клеток здоровых сформировавшихся тканей, но гиперэкспрессируются в различных типах опухолей, поэтому присоединение фолата к доставляемому комплексу может обеспечить селективный транспорт биологически активных НК в опухолевые клетки. Guo с соавторами использовали различные комбинации полученных химерных рRNA для образования ди- и тримерных наноккомплексов, содержащих адресующую группу, доставляемую биологически активную НК (рибозим или siРНК) и флуоресцентную группу. Результаты экспериментов с культурами опухолевых клеток *in vitro* и *ex vivo* показали, что полученные наноккомплексы эффективно проникают в клетки, экспрессирующие соответствующие рецепторы, и подавляют экспрессию генов-мишеней.

10. Guo с соавторами была предложена концепция использования комплексов НК, состоящих из различных функциональных доменов, для разработки препаратов на основе НК, направленных на лечение хронических заболеваний. Молекула рRNA бактериофага phi29 может образовывать гексамерные комплексы, то есть возможно получение наночастицы, образуемой в результате агрегации шести субъединиц, каждая из которых будет нести отдельную функциональную группу. Самосборка молекул НК в наночастицы является специфическим процессом, а манипуляции со структурными доменами позволяют предсказуемо контролировать размер образуемых комплексов. Наночастицы размером 20-40 нм, формируемые в результате ди- и тримеризации молекул рRNA, являются достаточно крупными структурами для того чтобы исключить быстрое выведение из кровотока, но при этом не достигают критического размера (более 100 нм), при котором проникновение комплексов в клетки становится низкоэффективным. Использование субъединиц, самоассоциирующихся в растворе в супрамолекулярный комплекс, несущий несколько функциональных групп, позволяет избежать необходимости ковалентного присоединения к

доставляемой НК дополнительных лигандов, которое может привести к снижению ее биологической активности.

Эффективность транспорта различных НК в эукариотические клетки и привлечение тех или иных механизмов их интернализации, зависит от многих факторов, включая размер молекул НК, их вторичную и третичную структуру, наличие химических модификаций и адресующих групп. Не менее важную роль играет способ введения НК в организм и тип трансфицируемых клеток. Доставка НК в клетки в отсутствие специальных трансфектантов приводит к меньшему побочному действию на организм, кроме того, наличие определенных структурных элементов в составе молекул НК в некоторых случаях позволяет достигать достаточно эффективной трансфекции клеток-мишеней. В случае необходимости достижения большего уровня трансфекции в экспериментах *in vitro* и *in vivo* применяют различные искусственные системы трансфекции.