



УДК 602.643:675.043.42

ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ РЕПОРТЕРНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ СУИЦИДНОГО ГЕНА БИНАЗЫ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2024 г. Е. В. Дудкина*, Э. А. Васильева**, В. В. Ульянова*.,
Л. Я. Захарова**, О. Н. Ильинская*

* Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета,
Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

** Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Россия, 420088 Казань, ул. Арбузова 8

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 21.06.2023 г.

Принята к публикации 22.06.2023 г.

Среди современных генотерапевтических методов борьбы с онкологическими заболеваниями особой значимостью и перспективностью отличается суицидальная генотерапия, основанная на доставке в клетки-мишени цитотоксического агента. В качестве одного из таких агентов может рассматриваться ген рибонуклеазы *Bacillus pumilus* 7P – биназы, обладающей высоким противоопухолевым потенциалом и низкой иммуногенностью. Помимо выбора трансгена еще одним фактором, влияющим на эффективность генотерапии, является способ доставки нуклеиновой кислоты в клетки-мишени. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) обладают высокой функциональной активностью и представляют собой перспективные средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Цель данной работы – оценка возможности использования геминальных ПАВ как средств доставки генетической конструкции на основе гена цитотоксичной биназы в опухолевые клетки. Для подбора условий трансфекции была создана репортерная генетическая конструкция, несущая ген биназы, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP. Опухолевые клетки аденокарциномы легких человека A549 трансфицировали с использованием коммерческого реагента Липофектамина 3000, эффективность трансфекции оценивала по интенсивности флуоресценции белка TurboGFP. Для устранения токсического действия биназы на клетки-реципиенты в состав генетической конструкции был введен ген ингибитора РНКазы – барстара. Методами динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии была показана высокая комплексообразующая способность геминальных ПАВ в отношении репортерной системы. Для ПАВ 16-6-16ОН обнаружена наибольшая трансфицирующая активность при низком уровне цитотоксичности. Таким образом, доказана возможность использования геминальных ПАВ для доставки терапевтических нуклеиновых кислот в опухолевые клетки.

Ключевые слова: трансфекция, зеленый флуоресцентный белок, рибонуклеаза, биназа, цитотоксичность, противоопухолевая активность, геминальные ПАВ

DOI: 10.31857/S0132342324010027, EDN: QSMROG

Сокращения: РНКазы – рибонуклеаза; ПАВ – поверхностно-активные вещества; TurboGFP – улучшенный вариант зеленого флуоресцентного белка SorGFP из копеподы *Pontellina plumata*; ЭБ – этидий бромид; D_h – гидродинамический диаметр; ЦТАБ – цетилтри-метиламмоний бромид.

Автор для связи: (тел.: +7 (843) 233-78-65; эл. почта: ulyanova_vera@mail.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка новых подходов в борьбе с онкологическими заболеваниями – один из основных вызовов, стоящих перед исследователями всего мира. Несмотря на достижения современной медицины, традиционное лечение рака отличается высокой эффективностью лишь на начальных стадиях заболевания. При прогрессировании болезни стандартные противоопухолевые протоколы теряют свой терапевтический эффект ввиду низкой селективности применяемых препаратов, возникновении лекарственной устойчивости у злокачественных клеток и высокой системной токсичности химиотерапевтических агентов [1].

Среди современных методов лечения рака особые перспективы имеет генная терапия. Благоприятный терапевтический эффект генотерапии рака достигается путем введения в клетки-мишени терапевтических нуклеиновых кислот с целью замены мутантных генов, модификации их последовательности или регуляции генетической экспрессии при ее нарушениях [2, 3]. Терапевтические гены подбирают с учетом молекулярной патофизиологии болезни для таргетного воздействия на отдельные звенья онкогенеза. Основные подходы генотерапии включают блокирование экспрессии определенных генов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или интерферирующих РНК; редактирование генома с помощью нуклеаз ZFN, TALENs или CRISPR/Cas; суицид опухолевых клеток под действием цитотоксичных белков; онколитическую вирусную терапию и иммунотерапию [4–7]. Для генотерапевтических методов борьбы с онкологическими заболеваниями, как и для других противоопухолевых подходов, необходимо выполнение трех главных условий: генные конструкции и системы их доставки должны обладать низкой иммуногенностью, высокой селективностью и

эффективностью. Еще один важный аспект – минимизация риска возникновения резистентности у раковых клеток.

Одним из многообещающих противоопухолевых агентов, обладающих всеми перечисленными качествами, выступает секретируемая рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus pumilus* 7P – биназа. Противоопухолевый потенциал биназы детально изучен, охарактеризованы ее физико-химические свойства [8, 9]. Фермент отличается низкой иммуногенностью и селективной цитотоксичностью в отношении различных видов опухолевых клеток, экспрессирующих определенные онкогены [10–12]. Гибель раковых клеток происходит по пути апоптоза, а не некроза, что также является преимуществом РНКазы [13]. Кроме того, ферментативная природа белка исключает возможность возникновения резистентности к биназе при ее терапевтическом применении. Согласно приведенным данным, биназа представляется идеальным кандидатом для создания на ее основе суицидальной генетической конструкции, введение которой в опухолевые клетки-мишени будет приводить к их элиминации.

Помимо выбора целевого гена эффективность генотерапевтического подхода лимитируется методом доставки генетического материала в клетки-реципиенты. Для безопасной и эффективной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в настоящее время разработаны системы доставки на основе вирусных и невирусных векторов [14], которые защищают нуклеиновую кислоту от деградации, обеспечивают эффективную доставку целевого гена в клетки-мишени и минимизируют воздействие на другие клетки организма [15]. Наиболее часто терапевтическую нуклеиновую кислоту инкапсулируют в полимерные носители или векторы вирусного происхождения [16].

Существуют различные способы доставки трансгена с использованием вирусных и невирусных векторов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [14]. Наиболее часто рассматриваются полимерные носители и векторы вирусного происхождения [16]. По состоянию на 2017 г. ~70% всех клинических испытаний генной терапии проведено с использованием вирусных векторов. Однако существует несколько серьезных опасений относительно применения вирусов в качестве носителей, включая иммуногенность, инсерционный мутагенез, а также сообщения о смерти после введения вирусных векторов в организм [17]. Поэтому в последнее время значительное внимание уделяется разработке и применению новых невирусных подходов для специфической доставки терапевтических нуклеиновых кислот к клеткам-мишеням, таким как липидные наночастицы и частицы на основе полимеров полиэтиленimina, полиэтиленгликоля, полилизина, хитозана и др. [18–20].

Амфифильные соединения, прежде всего катионные ПАВ, находят широкое применение при создании и модификации наноконтейнеров для доставки лекарственных веществ, в том числе нуклеиновых кислот [21–23]. Применение наноразмерных носителей позволяет решать проблемы повышения биодоступности лекарств, защиты от преждевременной биodeградации, снижения побочных эффектов и пр. С точки зрения практического использования большой интерес представляют дикатионные геминальные ПАВ, содержащие две головные группы, несущие длинноцепочечные алкильные радикалы, связанные между собой спейсерным фрагментом [23, 24]. Такие ПАВ обладают низкими значениями критической концентрации мицеллообразования [25], что позволяет значительно снижать их дозировки и, соответственно, токсичность лекарственных композиций. В ряде работ была показана зависимость эффективности

трансфекции ДНК от длины спейсерного фрагмента геминальных ПАВ [23, 26, 27]. Лучшие результаты были получены для амфифилов с коротким либо длинным спейсером. В литературе широко освещается влияние структуры головной группы [28] и длины углеводородного радикала ПАВ [29] на комплексообразующую способность амфифилов с макромолекулой ДНК. Функционализация головной группы геминальных ПАВ (например, введение гидроксипропановой группы) может способствовать дополнительным взаимодействиям ПАВ–ДНК за счет водородного связывания.

В связи с вышесказанным целью данной работы была оценка возможности использования геминальных ПАВ как средства доставки генетической конструкции на основе гена цитотоксичной биназы в опухолевые клетки-мишени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суицидальная генотерапия – одно из перспективных направлений генотерапии рака, основанное на введении в опухолевые клетки трансгенов, вызывающих клеточный суицид путем инициации в них апоптоза [30]. Чаще всего в качестве целевого гена используют гены, кодирующие ферменты вирусного или бактериального происхождения, способные превращать пролекарство в цитотоксический агент [31]. В настоящее время тестируют гены дифтерийного токсина, рицина, а также комплексы фермент–пролекарство, например, цитозиндеаминазы, превращающей 5-фторцитозин в противоопухолевый агент 5-фторурацил [32–34]. Гены цитотоксичных РНКаз обладают большим потенциалом для использования в суицидальной генотерапии рака. Внедрение гена цитотоксической биназы без добавления пролекарств будет приводить к индукции апоптоза в опухолевых клетках, не оказывая при этом

токсического воздействия на нормальные клетки организма.

Репортерная генетическая конструкция на основе гена биназы. Для подбора условий доставки генотерапевтической конструкции на основе гена биназы в опухолевые клетки нами была создана репортерная генетическая конструкция, несущая ген биназы, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP, и ген ингибитора РНКазы барстара. Гены биназы и барстара клонировали в вектор pTurboGFP-C под контроль конститутивного промотора цитомегаловируса P_{CMVIE} , обеспечивающего высокий уровень экспрессии целевого гена в клетках эукариот. Для этого генетическую кассету, содержащую гены биназы и барстара, получали путем ПЦР-амплификации с плазмиды pML163 (рис. 1). Далее вектор pTurboGFP-C и вставку “биназа–барстар” рестрицировали по сайтам XhoI и BamHI, полученные фрагменты лигировали. Успешность проведенного клонирования подтверждали с помощью ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования. ПЦР полученной генетической конструкции с использованием праймеров F-Bin-Xho и R-Brst-BamH выявила наличие клонируемой вставки “биназа–барстар” в составе вектора pTurboGFP-C. Рестрикция эндонуклеазами XhoI и BamHI подтвердила наличие двух фрагментов, соответствующих размеру вектора и клонированной вставки (рис. 1).

Таким образом, в ходе проведенного клонирования была получена репортерная генетическая конструкция pTurboGFP-Bi-Brst, в которой ген биназы клонирован в одной открытой рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP и состыкован с геном ингибитора барстара. Такая репортерная система позволяет по интенсивности флуоресценции TurboGFP, отражающей уровень экспрессии слитого с ним трансгена, как качественно, так и количественно оценивать эффективность трансфекции плазмидной

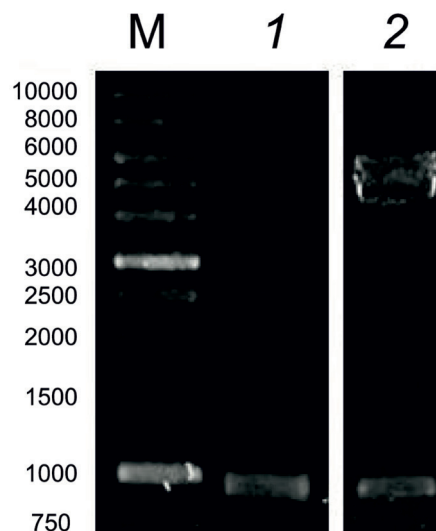


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов клонирования генетической кассеты “биназа–барстар” в вектор pTurboGFP-C: М – маркер длин ДНК 1 кб (Сибэнзим, Россия); 1 – ПЦР-продукт “биназа–барстар”; 2 – полученная генетическая конструкция pTurboGFP-Bi-Brst, рестрицированная по сайтам XhoI и BamHI.

ДНК в опухолевые клетки [35, 36]. Субклонирование гена ингибитора РНКазы на данном этапе обеспечивает защиту реципиентных клеток от цитотоксического действия биназы при подборе условий трансфекции опухолевых клеток. В дальнейших экспериментах при характеристике цитотоксического потенциала суицидальной генетической конструкции на основе гена биназы ген ингибитора РНКазы будет удален из ее состава.

Комплексообразование ПАВ с ДНК. Для оценки возможности использования ПАВ в качестве трансфицирующих агентов на первом этапе нами был проведен анализ характера взаимодействия ПАВ с полученной репортерной конструкцией. Гидродинамический диаметр (D_h) липоплексов ПАВ–ДНК (комплексов ПАВ–ДНК) определяли методом динамического рассеяния света (рис. 2). Размер липоплексов ПАВ–ДНК оценивали при варьировании мольного соотношения компонентов. Так, первичное распределение размеров, усредненных

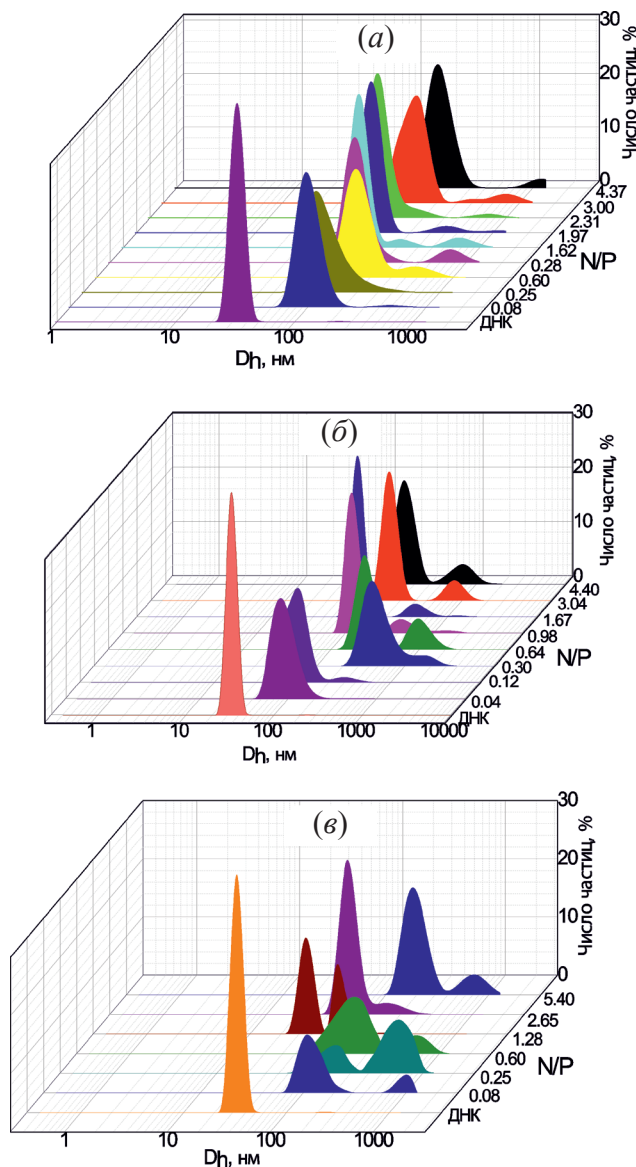


Рис. 2. Распределение агрегатов по размеру, усредненное по числу частиц: 16-6-16ОН/ДНК (а), 16-6-16/ДНК (б) и ЦТАБ/ДНК (в), при различном соотношении ПАВ/ДНК. $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; 25°C .

по интенсивности, показало наличие двух популяций частиц с гидродинамическим диаметром ~ 33 и ~ 237 нм с преобладанием частиц малого размера. D_h индивидуальных мицелл геминальных (16-6-16 и 16-6-16ОН) и монокатионного (ЦТАБ) ПАВ в районе критической

концентрации мицеллообразования (0.01 мМ для 16-6-16 ОН, 0.04 мМ для 16-6-16, 1 мМ для ЦТАБ) составило 5–10 и 2–5 нм соответственно (рис. 2). Добавление 16-6-16ОН к раствору ДНК (рис. 2а) даже в незначительных количествах приводило к формированию смешанных комплексов большего размера (~ 100 нм). Также наблюдалось формирование более крупных смешанных агрегатов размером 500–700 нм, которые сохранялись во всем диапазоне концентраций. Стоит отметить, что при формировании комплексов 16-6-16ОН/ДНК варьирование мольного соотношения компонентов незначительно влияло на размер смешанных агрегатов. В случае 16-6-16 при низких концентрациях наблюдалось образование частиц с $D_h \sim 100$ нм (рис. 2б). В области нейтрализации заряда ДНК D_h смешанных агрегатов увеличивался до 250–400 нм (при соотношении ПАВ/ДНК 0.3–0.64), что, вероятно, обусловлено слипанием частиц. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ D_h снова уменьшался до 120–140 нм.

Оценка заряда смешанных композиций показывает, что с увеличением мольного соотношения ПАВ/ДНК происходит компенсационное изменение ζ -потенциала от -84 мВ (ζ -потенциал индивидуальной макромолекулы ДНК) до $+38 \text{ мВ}$ (рис. 3). Важный параметр – соотношение, соответствующее нулевому значению ζ -потенциала. Величина $(N/P)_0$ уменьшается

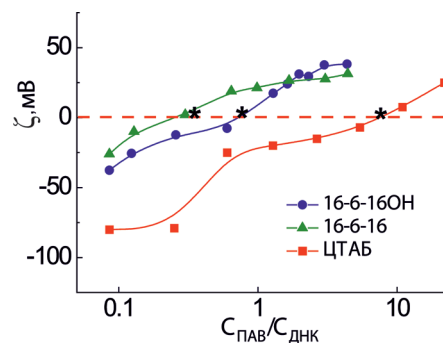


Рис. 3. Изменение электрокинетического потенциала комплексов ПАВ–ДНК при различном соотношении компонентов. $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; 25°C .

в ряду ЦТАБ > 16-6-16ОН > 16-6-16 ($7.50 > 0.74 > 0.27$). Этот результат свидетельствует о том, что электростатические взаимодействия вносят значительный вклад при комплексообразовании ПАВ/ДНК.

На следующем этапе методом флуоресцентной спектроскопии с использованием зонда-интеркалятора этидий бромид (ЭБ) оценивали степень связывания ПАВ с ДНК. Показано, что при взаимодействии ЭБ с нуклеотидными основаниями ДНК наблюдается рост интенсивности флуоресценции. При конкурентном связывании катионного ПАВ с фосфатными группами ДНК происходит вытеснение ЭБ с поверхности макромолекулы и тушение его флуоресценции. Степень тушения флуоресценции ЭБ зависит от структуры головной группы ПАВ. Как и ожидалось, в случае геминальных ПАВ (рис. 4а, 4б) снижение флуоресценции ЭБ происходит при более низких соотношениях ПАВ/ДНК по сравнению с монокатионным ЦТАБ (рис. 4в). При наличии гидроксизетильного фрагмента процесс тушения протекает в 2 раза более активно (рис. 4а).

На основании полученных спектров была рассчитана степень связывания ПАВ/ДНК (рис. 5). Для всех изученных амфифилов достигалась высокая степень связывания (90%), однако при различном соотношении компонентов системы. В случае геминальных ПАВ эффективное комплексообразование с ДНК наблюдалось при более низких соотношениях ПАВ/ДНК. Высокая степень связывания между компонентами достигалась при концентрациях геминальных ПАВ меньше концентрации ДНК (ПАВ/ДНК < 1), а в случае ЦТАБ – при 10-кратном превышении концентрации амфифила (соотношение ПАВ/ДНК ≥ 1).

Таким образом, исследованные геминальные ПАВ проявили высокую комплексообразующую способность в отношении ДНК при соотношении

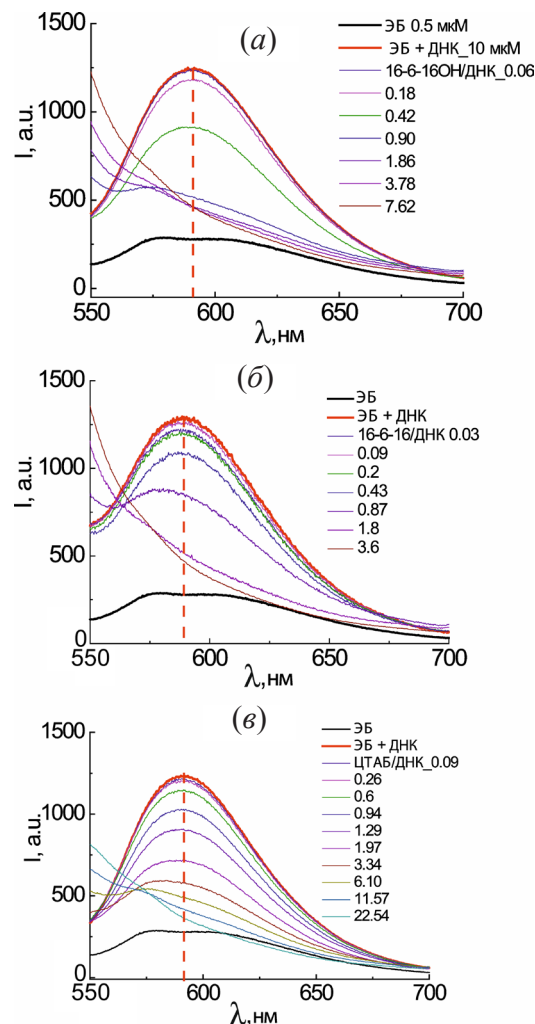


Рис. 4. Спектры флуоресценции комплексов этидий бромид/ДНК в присутствии 16-6-16ОН (а), 16-6-16 (б) и ЦТАБ (в). $C_{\text{ДНК}} = 10 \text{ мкМ}$; $C_{\text{ЭБ}} = 0.5 \text{ мкМ}$; 25°C .

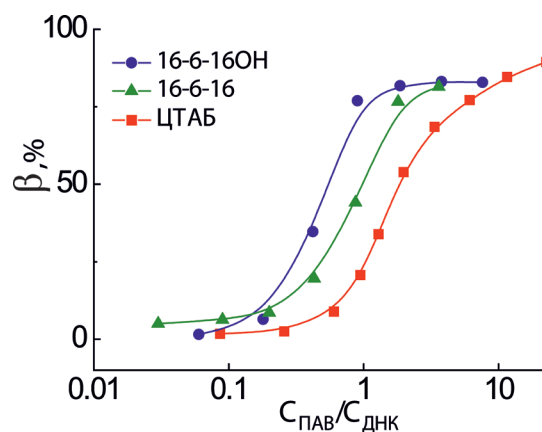


Рис. 5. Зависимость степени связывания ПАВ 16-6-16ОН, 16-6-16 и ЦТАБ с ДНК от соотношения компонентов при 25°C .

ПАВ/ДНК <1 , что подтверждает возможность использования синтезированных ПАВ в качестве трансфицирующих агентов для доставки репортерной генетической конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в клетки эукариот.

Эффективность трансфекции опухолевых клеток репортерной генетической конструкцией. Для доставки репортерной генетической конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в опухолевые клетки A549 использовали геминальные ПАВ и коммерческий реагент Липофектамин 3000. Первоначально подбирали условия для эффективной трансфекции клеток A549 Липофектамином 3000, варьируя соотношение трансфицирующего агента и ДНК, количество нуклеиновой кислоты и время культивирования. В ходе работы были исследованы стандартные варианты соотношения ДНК и Липофектамина 3000 – 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 5. Количество ДНК в лунке составляло 200 нг. Известно, что увеличение коли-

чества ДНК до определенного предела увеличивает эффективность трансфекции [35], в связи с этим нами был также проанализирован вариант доставки трансгена в количестве 500 нг/лунку и соотношении Липофектамина 3000 и ДНК 1 : 1. Клетки выращивали в течение 72 ч, оценивая эффективность трансфекции каждые 24 ч. Качественный анализ эффективности проведенной трансфекции оценивали по интенсивности флуоресценции репортерного белка TurboGFP.

Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что максимальный уровень интенсивности флуоресценции репортерного белка в клетках A549 наблюдался на 48 ч инкубации после проведенной трансфекции (рис. 6). При этом наиболее эффективным вариантом для доставки трансгена было соотношение ДНК/Липофектамин 3000 и ДНК 1 : 3 при количестве ДНК 200 нг/лунку (рис. 6).

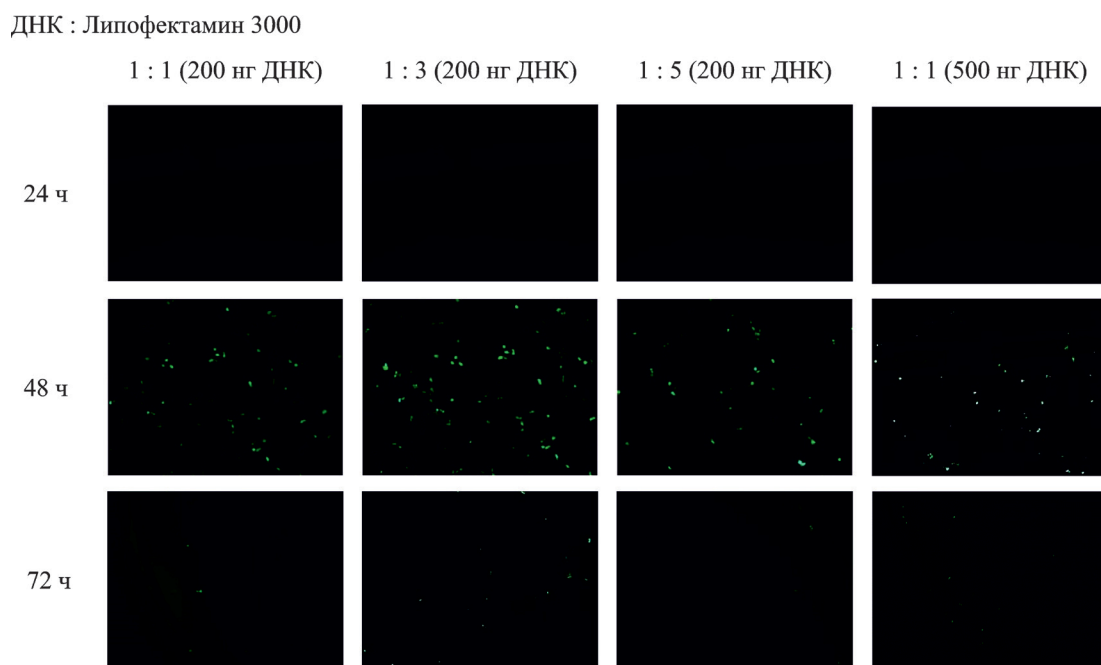


Рис. 6. Оценка эффективности трансфекции Липофектамином 3000 клеток A549 методом флуоресцентной микроскопии с увеличением 100 $\times$.

Для количественной оценки эффективности трансфекции клеток A549 использовали метод проточной цитофлуорометрии, с помощью которого можно оценить количество TurboGFP-позитивных клеток в популяции. В ходе анализа было показано, что доля клеток, экспрессирующих ген флуоресцентного белка TurboGFP, составляет 1%. Окрашивание клеток мероцианином 540 позволила оценить количество апоптотических клеток в популяции. Показано, что среди трансфицированных клеток ~25% находится в апоптозе, что указывает на легкую степень токсичности Липофектамина 3000.

В экспериментах с комплексами ДНК–ПАВ клетки A549 трансфицировали комплексом ДНК–ПАВ в соотношении 1 : 3; 1 : 5 и 1 : 7 (для ПАВ 16-6-16ОН и 16-6-16) и 1 : 7; 1 : 10 и 1 : 15 (для ПАВ ЦТАБ) и инкубировали в течение 48 ч. Показано, что трансфекция клеток A549 наиболее эффективно проходила с использованием ПАВ 16-6-16ОН при соотношении ДНК/ПАВ 1 : 10, при котором количество клеток в популяции, экспрессирующих

ген зеленого флуоресцентного белка, составило 3% (табл. 1). Однако данное количество ПАВ значительно снижало жизнеспособность клеток A549: количество апоптотирующих клеток составило 19.4% (табл. 1). При обработке клеток ПАВ 16-6-16 эффективность трансфекции варьировала в диапазоне 0.1–0.6%, при этом цитотоксичность ПАВ при наиболее эффективном варианте трансфекции составила 28.5%. ПАВ ЦТАБ оказался наименее эффективным: количество трансфицированных клеток для него составило всего 0.1–0.2% в популяции (табл. 1), при этом с увеличением количества ПАВ резко возрастала его цитотоксичность. Все данные были получены при культивировании клеток в течение 24 ч, поскольку после 48 ч флуоресценция TurboGFP не детектировалась.

Структурные формулы исследованных катионных ПАВ представлены на рис. 7.

Таким образом, среди исследованных трансфицирующих агентов наиболее эффективным для доставки репортерной генетической конструкции

Таблица 1. Цитофлуорометрический анализ клеток, трансфицированных геминальными ПАВ (16-6-16ОН и 16-6-16) и ЦТАБ

Клетки, %*	ДНК/16-6-16ОН			ДНК/16-6-16			ДНК/ЦТАБ		
	1 : 3	1 : 7	1 : 10	1 : 3	1 : 7	1 : 10	1 : 7	1 : 10	1 : 15
Трансфицированные	2.9	1.0	3.0	0.1	0.4	0.6	0.2	0.1	0.1
Апоптотические	8.7	10.1	19.4	8.4	9.1	28.5	5.0	44.0	75.0

* За 100% принято общее количество клеток в популяции.

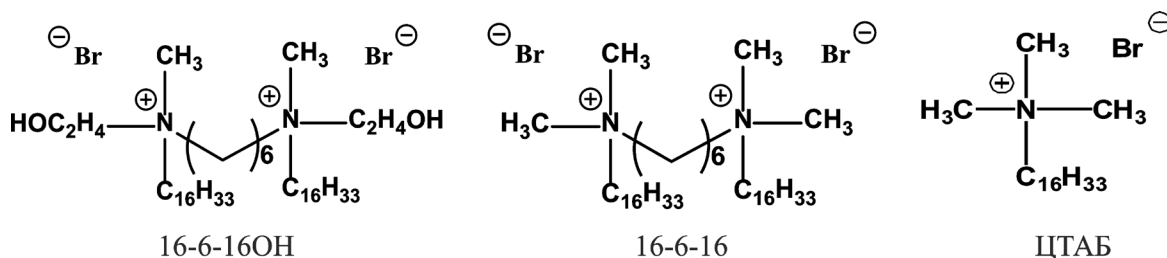


Рис. 7. Структурные формулы исследованных катионных ПАВ.

на основе гена биназы оказалось ПАВ 16-6-16ОН. В соотношении ДНК/ПАВ 1 : 3 эффективность трансфекции составила 2.9% при наименьшей цитотоксичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды и клетки. В работе использовали плазмиду pML163, несущую полноразмерные гены биназы (GenBank: X15545.1) и барстара (GenBank: X53697.1) [37], а также вектор pTurboGFP-C (Евроген, Россия), обеспечивающий экспрессию гена флуоресцентного белка TurboGFP в клетках млекопитающих под контролем промотора цитомегаловируса P_{CMV} IE.

Штамм *Escherichia coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs, США) использовали для проведения генно-инженерных манипуляций.

Линии клеток аденокарциномы легких человека A549 были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Условия культивирования. Культивирование бактерий *E. coli* NEB 5-alpha проводили при 37°C в шейкер-инкубаторе Multitron Standart (INFORS HT, Швейцария) в среде Лурия–Бертани до достижения оптической плотности 0.4–0.8. При выращивании штаммов, несущих плазмиды на основе вектора pTurboGFP-C, в среду добавляли канамицин (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации 30 мкг/мл.

Опухолевые клетки A549 выращивали при 37°C на стандартной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина (по 100 ед.) в атмосфере 5% CO₂ до достижения культурой полного покрытия подложки.

ПЦР. Генетическую кассету “биназа–барстар” амплифицировали с плазмиды pML163 с использованием праймеров F-Bin-Xho: CAGTCGCTCGAG-

GCCGTCATTAATACGTTTG-3' и R-Brst-BamH: 5'-TAGTCGGGATCCGTTTCCATATTGTTTCATCTCC-3' и высокоточной полимеразы Pfu-SE (Сибэнзим, Россия) на термоциклере Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, США). Программа ПЦР включала первичную денатурацию (95°C – 3 мин); 25 циклов, состоящих из этапов денатурации ДНК (95°C – 30 с), отжига праймеров (52°C – 30 с) и элонгации (72°C – 2 мин); финальную элонгацию (72°C – 5 мин). ПЦР-продукт из реакционной смеси очищали с помощью GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific, США).

Рестрикция и лигирование. Вектор pTurboGFP-C и ПЦР-фрагмент “биназа–барстар” гидролизовали рестриктазами XhoI и BamHI в течение 3 ч. Рестрицированный ПЦР-продукт очищали от примесей с помощью набора GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific, США), рестрицированный вектор – с использованием набора LumiPure DNA Gel Extraction Kit (Люмипроб, Россия). Очищенные продукты рестрикции лигировали при 4°C в течение 14–16 ч с использованием T4 ДНК-лигазы (Евроген, Россия).

Электрофорез ДНК. Электрофорез ДНК проводили в горизонтальном 1–1.5%-ном агарозном геле в Tris-ацетатном буфере (pH 8.5) при напряжении 100 В в течение 45 мин. Гель просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм на трансиллюминаторе TCP-20 (Vilber Lourmat, Франция).

Трансформация. Трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* NEB 5-alpha плазмидной ДНК осуществляли методом температурного шока. Клетки высевали на агаризованную среду Лурия–Бертани с добавлением канамицина (30 мкг/мл), выращивали 16–18 ч и проводили отбор клонов.

Выделение плазмид. Из отобранных клонов выделяли плазмиды с использованием коммерческого

набора diaGene (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя.

Геминальные ПАВ. Геминальные ПАВ типа $m-s-m$ (где m – длина углеводородного радикала, s – длина спейсера между головными группами) 16-6-16 и его аналог с гидроксипентильным фрагментом 16-6-16ОН были синтезированы в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова в лаборатории высокоорганизованных сред по ранее описанной методике [38, 39]. Строение полученных соединений было подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии [39]. Монокатионный цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ; Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве соединения сравнения без предварительной очистки. Строение полученных соединений было подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Динамическое рассеяние света. Размер частиц и ζ -потенциал липоплексов определяли на фотонном корреляционном спектрометре динамического и электрофоретического рассеяния света ZetaSizer Nano (Malvern, Великобритания). Источником лазерного излучения служил He-Ne газовый лазер мощностью 10 мВт и длиной волны 633 нм. Угол рассеяния света составлял 173° . Гидродинамический радиус r рассчитывали из коэффициентов диффузии D по уравнению Стокса–Эйнштейна для сферических частиц:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r},$$

где k – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость растворителя; r – гидродинамический радиус.

ζ -Потенциал рассчитывали по уравнению Гельмгольца–Смолуховского:

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon},$$

где μ – электрофоретическая подвижность частиц, η – динамическая вязкость жидкости, ε – диэлектрическая проницаемость.

Флуоресцентная спектроскопия. Степень связывания плазмиды ДНК с амфифилами определяли с помощью спектрофлуориметра F-7100 (Hitachi, Япония) с использованием специального флуоресцентного зонда-интеркалятора этидий бромида (ЭБ). В раствор ДНК с концентрацией 10 мкМ (рН 8.0), приготовленный в Tris-HCl-буфере, добавляли ЭБ с концентрацией 10 мкМ. При встраивании ЭБ в ДНК детектировался флуоресцентный сигнал. Далее в эту смесь добавляли исследуемый раствор ПАВ, и происходило тушение флуоресценции ЭБ. Эту процедуру проводили до тех пор, пока не наблюдалось полное тушение флуоресценции ЭБ. Степень связывания ПАВ–ДНК рассчитывали по формуле:

$$\beta = \frac{I_{\text{связ}} - I_{\text{набл}}}{I_{\text{связ}} - I_{\text{своб}}},$$

где β – степень связывания; $I_{\text{связ}}$ – интенсивность флуоресценции связанного ЭБ с ДНК; $I_{\text{набл}}$ – интенсивность флуоресценции при добавлении порции ПАВ; $I_{\text{своб}}$ – интенсивность флуоресценции свободного ЭБ с ДНК.

Трансфекция опухолевых клеток. Доставку генетической конструкции в опухолевые клетки A549 методом липофекции проводили с использованием катионно-липидного реагента Липофектамина 3000 (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Опухолевые клетки A549 рассевали в 96-луночные культуральные планшеты по 15 тыс. клеток на лунку и выращивали до достижения конфлюентности 70–90% около 24 ч. Через 24 ч клетки трансфицировали плазмидой pTurboGFP-Bi-Brst. Для подбора оптимальных условий трансфекции были выбраны различные варианты соотношения Липофектамина 3000 и ДНК в лунке, в расчете, что 1 мкл Липофектамина 3000 соответствует 1 мкг ДНК (табл. 2). Клетки выращивали в течение 72 ч.

При использовании ПАВ в качестве трансфицирующего агента клетки A549 рассевали в 24-луночные планшеты по 50 тыс. клеток на лунку и выращивали

Таблица 2. Условия реакции, используемые при проведении трансфекции клеток A549 плазмидой pTurboGFP-C

Реагенты	Вариант			
	1	2	3	4
ДНК : Липофектамин 3000	1 : 1	1 : 3	1 : 5	1 : 1
ДНК в лунке, нг	200	200	200	500
Липофектамин 3000, мкл	0.2	0.6	1.0	0.5
Реагент Р3000, мкл	0.4	0.4	0.4	1.0

в течение 24 ч до достижения конfluenceности 70%. При проведении эксперимента использовали соотношение pTurboGFP-Bi-Brst и ПАВ 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7 (для 16-6-16ОН и 16-6-16) и 1 : 7, 1 : 10, 1 : 15 (для ЦТАБ), при котором ПАВ образуют стабильные комплексы с ДНК. Клетки инкубировали 48 ч.

Эффективность трансфекции оценивали каждые 24 ч. В качестве контроля использовали клетки без добавления трансфицирующих агентов.

Флуоресцентная микроскопия. Детекцию флуоресценции репортерного белка TurboGFP в трансфицированных и нетрансфицированных клетках проводили по истечении 24, 48 и 72 ч культивирования. Клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия) (увеличение 100×). Максимум возбуждения флуоресценции для TurboGFP составляет 482 нм, максимум эмиссии – 502 нм.

Проточная цитометрия. Трансфицированные клетки трипсинизировали с помощью 0.25%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Invitrogen, Россия) и собирали центрифугированием при 0.4 g в течение 5 мин. Собранные клетки ресуспендировали в 100 мкл среды DMEM и добавляли к ним раствор мероцианина 540 (Sigma-Aldrich, США) с конечной концентрацией 30 мкМ для детекции клеток, находящихся в апоптозе. Клетки инкубировали в темноте при комнатной

температуре в течение 10 мин. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные камптотецином (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. Исследование проводили с использованием цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Первичную обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software (BD, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы была оценена способность геминальных ПАВ (16-6-16 и 16-6-16ОН) выступать в качестве средств доставки в опухолевые клетки терапевтических генов. Для подбора условий трансфекции была создана репортерная генетическая система на основе вектора pTurboGFP-C, несущего ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP, слитого с геном биназы, и ген ингибитора бар-стара, нивелирующего токсичность РНКазы на данном этапе. Было показано, что геминальные ПАВ обладают высокой комплексообразующей способностью в отношении репортерной конструкции pTurboGFP-Bi-Brst при соотношении ПАВ/ДНК <1. Образование комплексов (липоплексов) обусловлено электростатическим взаимодействием положительно заряженных головных групп ПАВ с полианионом ДНК, сопровождается компенсацией заряда (переходом ζ -потенциала системы из области отрицательных значений в область положительных) и ком-

пактизацией макроиона. ПАВ 16-6-16ОН обеспечило наибольшую эффективность трансфекции репортерной конструкции рTurboGFP-Bi-Brst в опухолевые клетки A549 при низкой цитотоксичности, при этом эффективность коммерческого реагента Липофектамина 3000 оказалась в 3 раза ниже. Таким образом, было установлено, что геминальные ПАВ представляют перспективную и доступную альтернативу коммерческим трансфицирующим агентам.

В дальнейшем ПАВ 16-6-16ОН будет использовано в качестве средства доставки суицидальной генетической конструкции на основе гена биназы в опухолевые клетки для оценки ее цитотоксического потенциала.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.Р. Каюмову (д.б.н., доцент кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета) за возможность проведения исследований на флуоресцентном микроскопе, а также П.В. Зеленихину (к.б.н., доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета) за помощь в проведении цитофлуорометрического анализа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана Российским научным фондом (проект № 21-74-10036).

Исследование комплексообразования ДНК с амфифилами методами динамического/электрофоретического рассеяния света и флуоресцентной спектроскопии выполнены Э.А. Васильевой и Л.Я. Захаровой в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maeda H., Khatami M.* // Clin. Transl. Med. 2018. V. 7. P. 11.
<https://doi.org/10.1186/s40169-018-0185-6>
2. *Aiuti A., Roncarolo M.G., Naldini L.* // EMBO Mol. Med. 2017. V. 9. P. 737–740.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>
3. *Ye J., Lei J., Fang Q., Shen Y., Xia W., Hu X., Xu Q., Yuan H., Huang J., Ni C.* // Front. Oncol. 2019. V. 9. P. 1251.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01251>
4. *Sun W., Shi Q., Zhang H., Yang K., Ke Y., Wang Y., Qiao L.* // Discov. Med. 2019. V. 27. P. 45–55.
5. *Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., Abedi M.R.* // J. Gene Med. 2018. V. 20. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
6. *Cao G., He X., Sun Q., Chen S., Wan K., Xu X., Feng X., Li P., Chen B., Xiong M.* // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 1786.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01786>
7. *Nair J., Nair A., Veerappan S., Sen D.* // Cancer Gene Ther. 2020. V. 27. P. 116–124.
<https://doi.org/10.1038/s41417-019-0116-8>
8. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* // Bioessays. 2008. V. 30. P. 781–790.
<https://doi.org/10.1002/bies.20789>
9. *Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O.* // FEBS J. 2011. V. 278. P. 3633–3643.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08294.x>

10. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 361. P. 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.143>
11. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V.* // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. P. 4090–4097. <https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18210>
12. *Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. P. 1559–1567. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.005>
13. *Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.B., Zenkova M.A., Makarov A.A.* // *Cell Cycle.* 2013. V. 12. P. 2120–2131. <https://doi.org/10.4161/cc.25164>
14. *Sung Y.K., Kim S.W.* // *Biomater. Res.* 2019. V. 23. P. 8. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>
15. *Paunovska K., Loughrey D., Dahlman J.E.* // *Nat. Rev. Genetics.* 2022. V. 23. P. 265–280. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
16. *Hong S.H., Park S.J., Lee S., Cho C.S., Cho M.H.* // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. V. 12. P. 977–991. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.986454>
17. *Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G.* // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. V. 6. P. 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
18. *Zhang B., Yueying Z., Yu D.* // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. P. 937–944. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5298>
19. *Lee H.Y., Mohammed K.A., Nasreen N.* // *Am. J. Cancer Res.* 2016. V. 6. P. 1118–1134.
20. *Lee M., Chea K., Pyda R., Chua M., Dominguez I.* // *J. Biomol. Tech.* 2017. V. 28. P. 67–74. <https://doi.org/10.7171/jbt.17-2802-003>
21. *Kashapov R., Gaynanova G., Gabdrakhmanov D., Kuznetsov D., Pavlov R., Petrov K., Zakharova L., Sinyashin O.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6961. <https://doi.org/10.3390/ijms21186961>
22. *Kashapov R., Ibragimova A., Pavlov R., Gabdrakhmanov D., Kashapova N., Burilova E., Zakharova L., Sinyashin O.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 7055. <https://doi.org/10.3390/ijms22137055>
23. *Gabdrakhmanov D., Vasilieva E., Voronin M., Kuznetsova D., Valeeva F., Mirgorodskaya A., Lukashenko S., Zakharov V., Mukhitov A., Faizullin D., Salnikov V., Syakaev V., Zuev Yu., Latypov Sh., Zakharova L.* // *J. Phys. Chem.* 2020. V. 124. P. 2178–2192.
24. *Chauhan V., Singh S., Kamboj R., Mishra R., Kaur G.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 417. P. 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.059>
25. *Gonçalves R.A., Holmberg K., Lindman B.* // *J. Mol. Liq.* 2023. V. 375. P. 121335. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121335>
26. *Gan C., Cheng R., Cai K., Wang X., Xie C., Xu T., Yuan C.* // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. V. 267. P. 120606. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120606>
27. *Massa M., Rivara M., Donofrio G., Cristofolini L., Peracchia E., Compari C., Bacciottini F., Orsi D., Franceschi V., Fisicaro E.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 3062. <https://doi.org/10.3390/ijms23063062>
28. *Dasgupta A., Das P.K., Dias R.S., Miguel M.G., Lindman B., Jadhav V.M., Gnanamani M., Maiti S.* // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 8502–8508. <https://doi.org/10.1021/jp068571m>
29. *Yaseen Z., Rehman S.U., Tabish M., Kabir-ud-Din* // *J. Mol. Liq.* 2014. V. 197. P. 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.05.013>

30. Zarogoulidis P., Darwiche K., Sakkas A., Yarmus L., Huang H., Li Q., Freitag L., Zarogoulidis K., Malecki M. // J. Genet. Syndr. Gene Ther. 2013. V. 4. P. 16849. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000139>
31. Altanerova U., Jakubecova J., Benajova K., Priskakova P., Pesta M., Pitule P., Topolcan O., Kausitz J., Zduriencikova M., Repiska V., Altaner C. // Int. J. Cancer. 2019. V. 144. P. 897–908. <https://doi.org/10.1002/ijc.31792>
32. Dai L., Yu X., Huang S., Peng Y., Liu J., Chen T., Wang X., Liu Q., Zhu Y., Chen D., Li X., Ou Y., Zou Y., Pan Q., Cao K. // Cancer Biol. Ther. 2021. V. 22. P. 79–87. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1859870>
33. Qiu Y., Peng G.L., Liu Q.C., Li F.L., Zou X.S., He J.X. // Cancer Lett. 2012. V. 316. P. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.015>
34. Rama Ballesteros A.R., Hernández R., Perazzoli G., Cabeza L., Melguizo C., Vélez C., Prados J. // Cancer Gene Ther. 2020. V. 9. P. 657–668. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0137-3>
35. Baran Y., Ural A.U., Avcu F., Sarper M., Elçi P., Pekel A. // Turk. J. Hematol. 2008. V. 25. P. 172–175.
36. Wang Y.J., Shang S.H., Li C.Z. // J. Dent. Sci. 2015. V. 10. P. 414–422.
37. Znamenskaya L.V., Vershinina O.A., Vershinina V.I., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. // FEMS Microb. Lett. 1999. V. 173. P. 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13505.x>
38. Mirgorodskaya A.B., Bogdanova L.R., Kudryavtseva L.A., Lukashenko S.S., Konovalov A.I. // Russ. J. Gen. Chem. 2008. V. 78. P. 163–170. <https://doi.org/10.1134/S1070363208020023>
39. Zakharova L.Ya., Gabdrakhmanov D.R., Ibragimova A.R., Vasilieva E.A., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Ermakova E.A., Gogoleva N.E., Faizullin D.A., Pokrovsky A.G., Korobeynikov V.A., Cheresiz S.V., Zuev Yu.F. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2016. V. 140. P. 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.045>

Surfactants As a Means of Delivering a Reporter Genetic Construct Based on Binase Suicide Gene to Tumor Cells

E. V. Dudkina*, E. A. Vasilieva**, V. V. Ulyanova*[#], L. Ya. Zakharova**, and O. N. Ilinskaya*

[#]Phone: +7 (843) 233-78-65; e-mail: ulyanova_vera@mail.ru

* Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University,
 ul. Kremlevskaya 18, Kazan 420008 Russia

** Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
 ul. Akad. Arbuzova 8, Kazan, 420088 Russia

Among modern gene therapy methods for combating oncology, suicidal gene therapy based on the delivery of a cytotoxic agent to target cells is of particular importance and promise. As one of such genes, the gene for ribonuclease of *Bacillus pumilus* 7P, binase, can be considered; the enzyme has a high antitumor potential and low immunogenicity. In addition to the choice of a transgene, another factor influencing the effectiveness of gene therapy is the method of delivering the nucleic acid to target cells. Surfactants have high functional activity and are promising means of delivering therapeutic nucleic acids. The aim of this work was to evaluate the possibility of using geminal surfactants as a means of delivering a genetic construct based on the cytotoxic binase gene into tumor cells. To optimize the transfection conditions, a reporter genetic construct carrying the binase gene fused to the gene for the green fluorescent protein TurboGFP was created, which made it possible to evaluate the delivery efficiency by the fluorescence intensity. To eliminate the toxic effect of binase on recipient cells, the RNase inhibitor gene, barstar, was introduced into the genetic construct. A high complexing ability of geminal surfactants in relation to the reporter system was shown by methods of dynamic light scattering and fluorescence spectroscopy. For surfactant 16-6-16OH, the highest transfecting activity together with a low level of cytotoxicity was found. Thus, the study proved the possibility of using geminal surfactants for the delivery of therapeutic nucleic acids to target cells.

Keywords: transfection, green fluorescent protein, ribonuclease, binase, cytotoxicity, antitumor activity, geminal surfactants