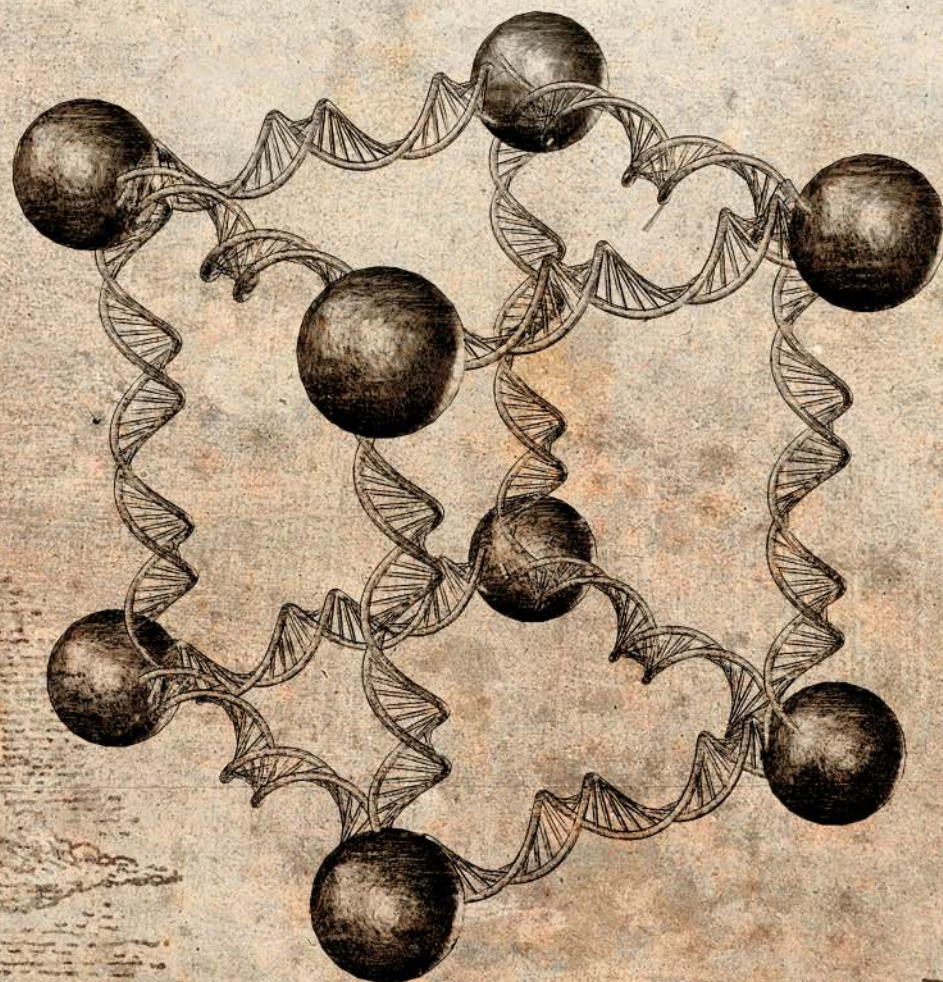


Д. В. ПЫШНЫЙ, А. Г. ВЕНЬЯМИНОВА, А. Н. СИНЯКОВ, М. А. ЗЕНКОВА, В. В. ВЛАСОВ

НУКЛЕИНОВЫЙ КОНСТРУКТОР

*В нанодавние времена в наностране люди строили дома из нанокирпичей, которые валялись в информационном поле.
Нанофольклор*



ПЫШНЫЙ Дмитрий Владимирович — кандидат химических наук, доцент, заместитель директора, заведующий лабораторией бионанотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 95 научных работ, в том числе 6 патентов



ВЕНЬЯМИНОВА Алия Гусейновна — кандидат химических наук, доцент, заведующая лабораторией химии РНК Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор 156 научных работ, в том числе 5 патентов



СИНЯКОВ Александр Николаевич — кандидат химических наук, заведующей лабораторией медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 85 научных работ, в том числе 15 патентов

Молекулы относительно простых соединений имеют размеры меньше одного нанометра. Однако в разряд нанообъектов попадают и биологические макромолекулы, такие как белки и нуклеиновые кислоты, а также еще более крупные молекулярные «клеточные машины» и даже самые «простые» живые организмы — вирусы. Фундаментальными исследованиями этих объектов традиционно занималась и занимается молекулярная биология. Наряду с этим ученые работали над проблемами синтеза природных макромолекул, создания и применения их искусственных аналогов с новыми свойствами, причем делали это задолго до того, как нанотехнологии были объявлены государственным приоритетом



ЗЕНКОВА Марина Аркадьевна — доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 120 научных работ и 3 патентов



ВЛАСОВ Валентин Викторович — академик РАН, доктор химических наук, профессор, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 200 научных работ, в том числе 9 патентов



Нанотехнологии — современный подход к использованию таких свойств вещества, которые определяются его структурными элементами нанометровых размеров. Последнее означает, что при переходе вещества из макро- и микро- в наносостояние может происходить резкое, скачкообразное изменение его характеристик: физических, химических и биологических. Нанотехнология, а точнее, ее «теоретическая» ветвь, *нанонаука (nanoscience)*, как раз и занимается изучением причин появления у вещества подобных квантовых свойств.

В практической области существование феномена «нановещества» позволяет разрабатывать технологии направленного изменения свойств материалов за счет их специфического структурирования на наноуровне. Продуктом нанотехнологий становятся необычные по свойствам материалы; ультрамалые замысловатые пространственные структуры; невидимые глазу совершенные механизмы, способные выполнять только им подобные операции на микроскопическом уровне.

Один нанометр (одна миллионная часть миллиметра) соответствует величине несложной молекулы, а

В природе сложные органические молекулы и надмолекулярные комплексы образуются по принципу самоорганизации из более простых молекул.

Бионанотехнология стремится установить принципы взаимодействия таких структур, чтобы воспроизвести природный процесс самосборки в искусственной системе.

Это позволяет не только «синтезировать» в пробирке разнообразные биологические структуры (от единичного фермента ДНК-лигазы до рибосомы или вирусоподобной частицы), но и шагнуть дальше, создавая биологические микрообъекты с заданными свойствами, которых в природе не существует

наиболее простые соединения, такие как вода, имеют значительно меньший размер. Основными деталями бионанотехнологического конструктора являются значительно более крупные органические молекулы, а также *супрамолекулярные комплексы* — сложно организованные надмолекулярные структуры. Их размер составляет от нескольких нанометров до десятков и сотен.

Роль главных структурных элементов в бионаноконструировании отводится молекулам нуклеиновых кислот — ДНК и РНК. Дело в том, что эти биополимеры обладают удивительной способностью самоорганизовываться в характерные пространственные конструкции — двуцепочечные структуры, удерживаемые комплементарными взаимодействиями. Это позволяет использовать нуклеиновые кислоты не только в качестве носителя генетической информации (записанной в последовательности биополимера четырьмя «буквами»-нуклеотидами), но и как удобные строительные блоки при создании наноконструкций.

Сегодня нуклеиновые кислоты являются доступным материалом благодаря разработке эффективных мето-

дов синтеза. Так, с помощью специальных приборов — синтезаторов можно в автоматическом режиме производить нуклеотидные цепи длиной до сотни звеньев. Поскольку «ассортимент» таких молекул ограничен лишь изобретательностью самого наноконструктора, сфера применения нуклеиновых кислот благодаря их доступности и практичности быстро расширяется.

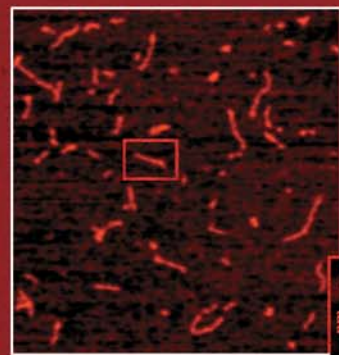
От покрытий до моторов

Самым простым примером самоорганизованной сборки наноструктур из нуклеиновых кислот является формирование *ДНК-конкатемеров* — полимерных структур из блоков, образованных лишь парой *олигонуклеотидов* (фрагментов ДНК). С помощью подобного подхода можно сконструировать также дву- и трехмерные структуры. При создании плоских и объемных конструкций наряду с «простыми» олигонуклеотидами используются также их *конъюгаты* (от лат. *conjugatio* — соединение) с другими нанообъектами неорганической или органической природы, например, с молекулами белка.

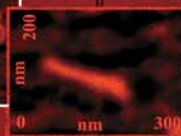


а — конструирование протяженных линейных структур из ДНК-наноблоков

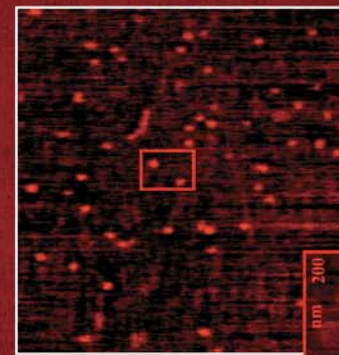
1,4 мкм



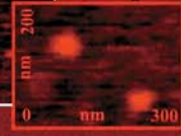
а



1,4 мкм



б



б — конструирование нелинейных структур из модифицированных ДНК-наноблоков

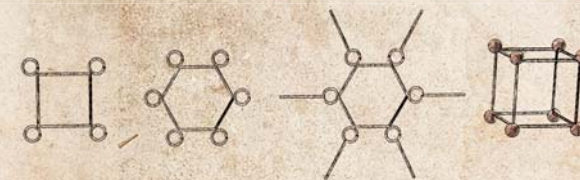


Флуоресценция полупроводниковых частиц сульфида кадмия (CdS)

R=0,95 нм 1,08 нм 1,15 нм 1,30 нм 1,49 нм 1,56 нм

◀ Простые линейные (а) и кольцевые (б) структуры из нуклеиновых кислот (ДНК-конкатемеры) можно получить из ДНК-блоков — двуцепочечных структур, на концах которых находится одноцепочечный фрагмент. Если нуклеотидные последовательности концевых участков будут комплементарны друг другу, то произойдет самопроизвольная сборка полимерной цепи.

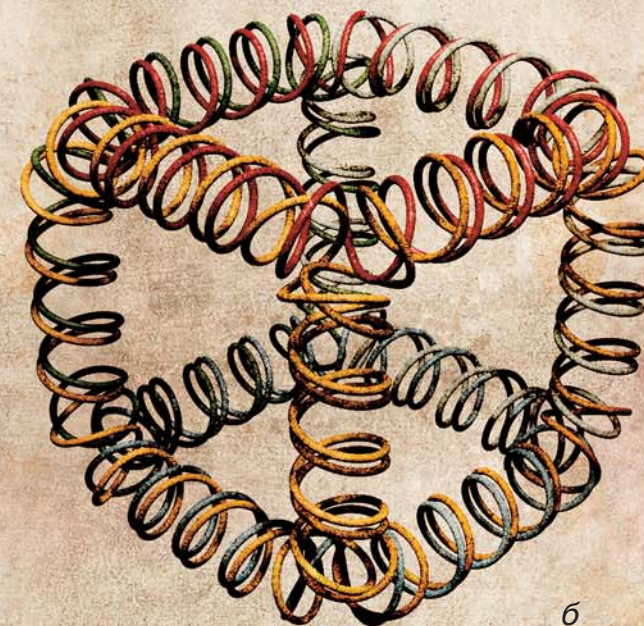
Образцы ДНК получены О. Виноградовой (ИХБФМ СО РАН); их изображения с помощью атомно-силовой микроскопии — Е. Родякиной (ЦКП СО РАН «Наноструктуры») (Новосибирск)



Примеры возможных ДНК-конструкций



а



б

Используя принцип взаимной комплементарности отдельных фрагментов в составе олигонуклеотидных наноблоков и различные модификации, изменяющие структурные параметры спиральных доменов, можно получать самособирающиеся наноструктурированные пленки (а) и объемные конструкции (б)

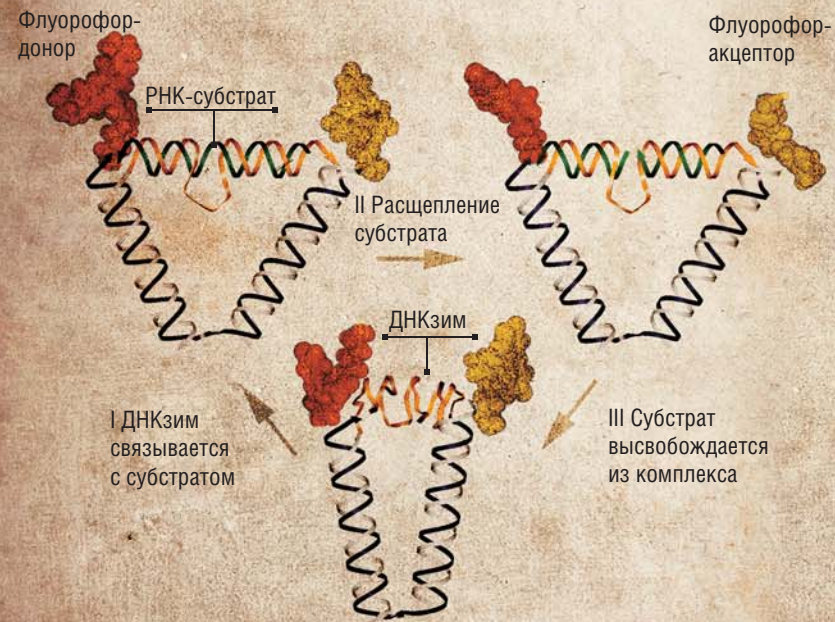
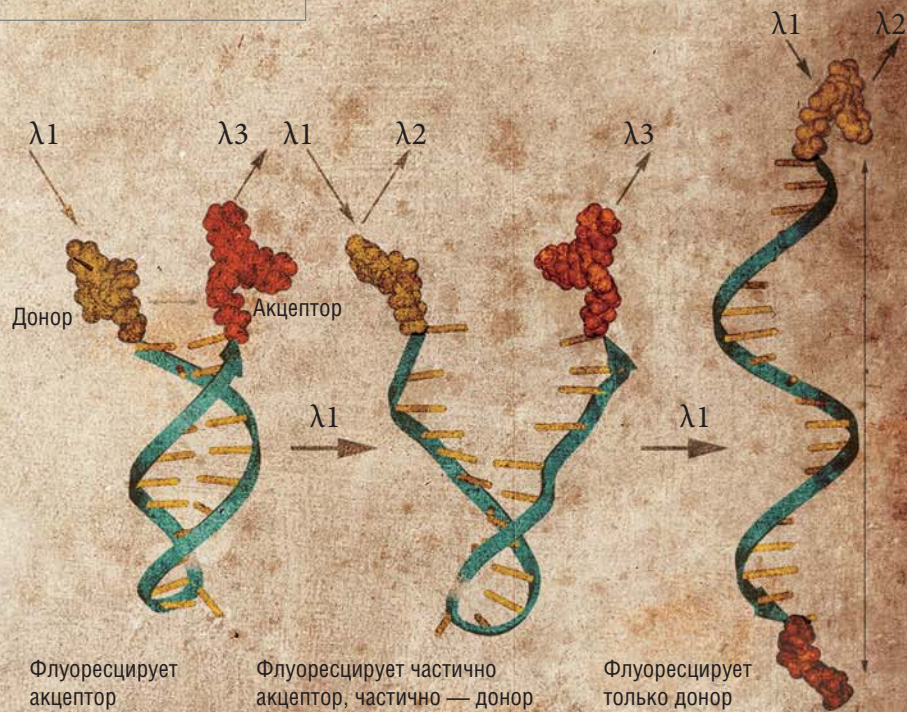
◀ Полупроводниковые наночастицы — квантовые точки — на основе сульфида кадмия флуоресцируют в водных растворах. Длина волны испускаемого ими света зависит от величины частиц: при увеличении размеров наблюдается смещение из коротковолновой (голубой) в длинноволновую (красную) область видимого спектра. Такие частицы используются в качестве эффективных меток при создании линейки олигонуклеотидных зондов для биоаналитических целей.

Фото Р. Анарбаева (ИХБФМ СО РАН)

В том числе можно получить упорядоченные пленочные структуры, где неорганические наночастицы выступают в качестве узлов-разветвителей. Такие материалы рассматриваются в качестве перспективных самособирающихся покрытий-шаблонов для полупроводниковых структур при создании современных микросхем. А объемные наноконструкции могут служить в качестве уникальных биосовместимых контейнеров для упаковки фармакологических препаратов и их адресной доставки к органам-мишеням.

Еще одним примером новых материалов служат конъюгаты олигонуклеотидов с квантовыми точками — по-

Метод FRET позволяет установить относительное расположение двух молекул или частей одной молекулы. Для этого используют две флуоресцентные метки — донорную и акцепторную, причем частота эмиссии донора должна соответствовать частоте возбуждения акцептора. Когда эти два флуорофора удалены друг от друга не более чем на несколько десятков ангстрем («спарены»), происходит перенос энергии флуоресценции с донора на акцептор. По мере увеличения расстояния между ними перенос энергии уменьшается, в результате чего флуоресценция акцептора начинает падать, а донора — увеличиваться



Проследить за движениями частей мотора можно благодаря особым флуоресцирующим меткам на концах ДНКзима. Акцептор способен снимать энергию с донора посредством FRET-эффекта, сам ее не переизлучая. Флуоресценция в системе появляется лишь тогда, когда акцептор удаляется от донора. По изменению интенсивности излучаемого системой света можно судить о работе нанодвигателя

лупроводниковыми наночастицами, способными к флуоресценции в видимом диапазоне света. Наборы олигонуклеотидных зондов, меченных с помощью такой технологии, упрощают решение ряда биологических задач (например, параллельного отслеживания нескольких процессов в живой клетке), а также используются в области медицинской ДНК-диагностики и компьютерной томографии.

На основе нуклеиновых кислот можно создавать и так называемые *клеточные молекулярные машины*, или *бионанодвигатели*, — наноустройства, способные автономно совершать движения, трансформируя энергию химических реакций в механическую работу. Важной характеристикой молекулярных наномашин является их автономность или самоуправление. Наномоторы имеют множество потенциальных применений, таких как обработка информации и регуляция химических реакций, а также молекулярная сборка в различных наноэлектронных приборах и биосенсорах.

В 2004 г. созданы ДНК-наномоторы, действующим началом которых является ДНКзим «10-23» — своеобразный фермент на основе ДНК. Эти «двигатели» способны производить механические движения до тех пор, пока доступно «топливо» — РНК-субстрат. Хотя эти наноустройства вполне автономны, есть возможность регулировать их работу «извне», например, добавляя или убирая субстрат-топливо (по аналогии с автомобильным «подаванием» или «сбрасыванием» газа). Более того, наномотор можно остановить и потом запустить вновь — для этих целей служат специально

сконструированные олигонуклеотидные цепочки «тормоз» и «удаление».

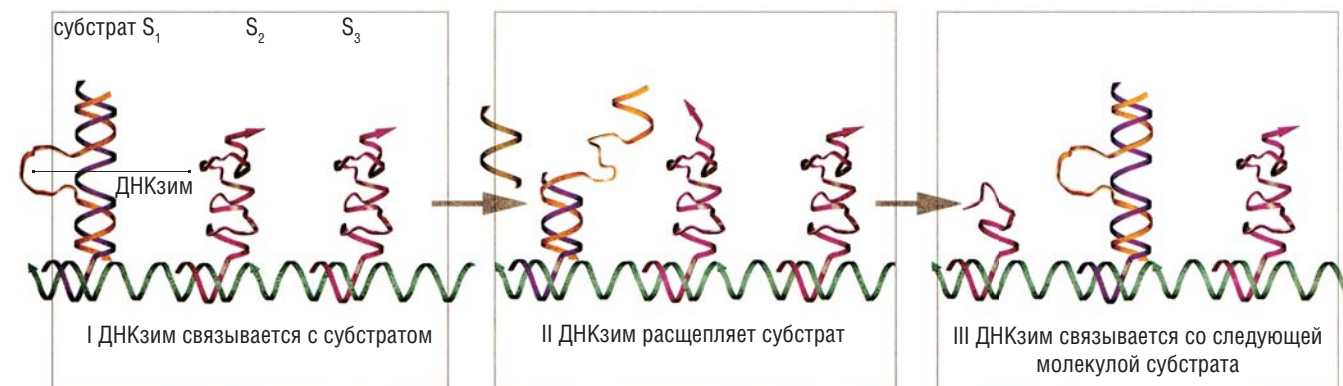
В 2005 г. сконструирован более сложный нанодвигатель, управляемый ДНКзимом «10-23», способный автономно перемещаться по определенной траектории, заданной олигонуклеотидной цепочкой. Подобные системы в будущем могут использоваться для транспортировки молекул-«грузов».

Молекулы нуклеиновых кислот служат потенциальной основой для создания еще ряда устройств и соединений. В так называемых *нанопереклечателях* используется способность двуцепочечной спирали нуклеиновых кислот менять свою конформацию под воздействием внешних факторов, например, при связывании со специфическими веществами-лигандами. Если такой чувствительный участок соединяет два элемента наноконструкции, то при добавлении лиганда конструкция перестраивается. Таким способом можно, например, менять уровень флуоресценции нанообъекта.

Современные возможности в области компьютерного моделирования и синтеза компонентов нуклеиновых кислот практически неограничены, что позволяет уже сейчас «строить» разнообразные причудливые супрамолекулярные фигуры, форма и предназначение которых ограничиваются лишь фантазией (Aldaye, Palmer, Sleiman, 2008)

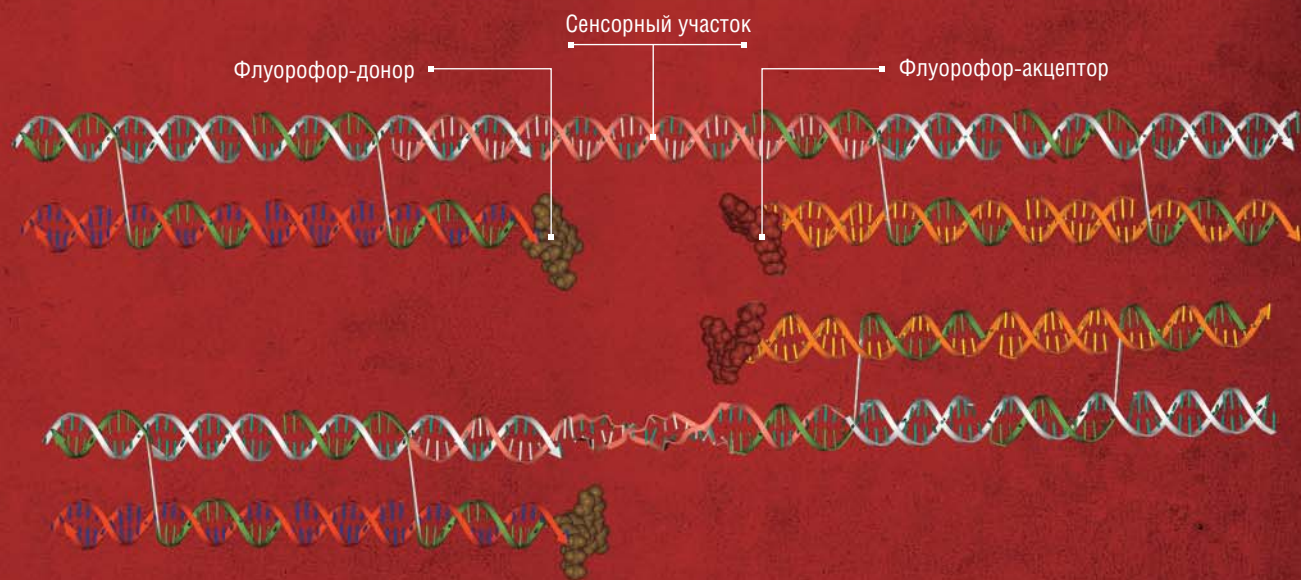
Наномотор на основе ДНКзима «10-23» представляет собой структуру из соединенных и сведенных вместе жестких спиральных стержней. Он работает на «топливе» — РНК-субстрате: химическая энергия ковалентных связей преобразуется в механические движения по сведению-разведению стержней. ДНКзим связывается с субстратом и расщепляет его на два продукта, которые затем высвобождаются из комплекса. Этот процесс сопровождается изменением конформации молекулы, в результате чего и совершаются движения.

Наномотор можно остановить и потом запустить вновь. Для этих целей существуют специально сконструированные олигонуклеотиды «тормоз» и «удаление». Цепь «тормоз» по строению очень схожа с субстратом-топливом, но представляет собой ДНК, которая не расщепляется ДНКзимом и «замыкает» мотор в инактивированном состоянии. Цепь «удаление» полностью комплементарна цепи «тормоз» и способна вытеснить последнюю из каталитического центра наномотора, тем самым вновь его запуская. По: (Chen, Wang, Mao, 2004)



Топливом для «шагающего» наномотора на основе ДНКзима «10-23» также служит РНК-субстрат, ряд молекул которого ($S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$) зафиксирован на определенном расстоянии друг от друга на общей матрице. Связавшись с одной из молекул субстрата, ДНКзим расщепляет его

по определенному участку. Часть разрушенной молекулы субстрата освобождается, что позволяет ДНКзиму «переползти» на новую близлежащую молекулу субстрата. Последнюю ждет та же участь, но результат налицо — направленное перемещение совершено. По: (Tian, He, Chen et al., 2005)



Нанопереклюатель состоит из жестко сочлененных нуклеотидных структур, соединенных в центральной части сенсорным фрагментом — участком, чувствительным к составу внешней среды. В исходном состоянии этот фрагмент находится в форме классической правозакрученной спирали. При этом пара флуорофоров, входящих в структуру переключателя, оказываются расположенными близко друг от друга, что обеспечивает FRET-зависимое свечение акцептора. При появлении в среде специфических веществ, связывающихся с сенсорным участком, его структура резко меняется: спираль переходит в левозакрученную форму. Такая перегруппировка структуры приводит к изменению спектра флуоресценции системы. Функция выполнена — сигнал подан

Рассматривая различные наноустройства, нельзя не упомянуть об *аптамерах* — уникальных молекулах, сконструированных на основе нуклеиновых кислот. Аптамер представляет собой трехмерную структуру-«ключ», специфично подходящую к «замку» — определенной молекуле-мишени. В результате их взаимодействия образуются прочные стабильные надмолекулярные комплексы. Благодаря этому можно обнаружить молекулы веществ даже в сверхмалых концентрациях. Аптамеры являются важными деталями бионаноконструктора, которые используются при разработке различных супрамолекулярных устройств, в том числе биосенсоров.

Диагностируем мутации

В то время как одни достижения бионанотехнологии пока следует рассматривать лишь как некие прототипы устройств отдаленного будущего (так, сегодня вряд ли можно найти достойную работу наномотору), другие незамедлительным образом внедряются в важнейшие

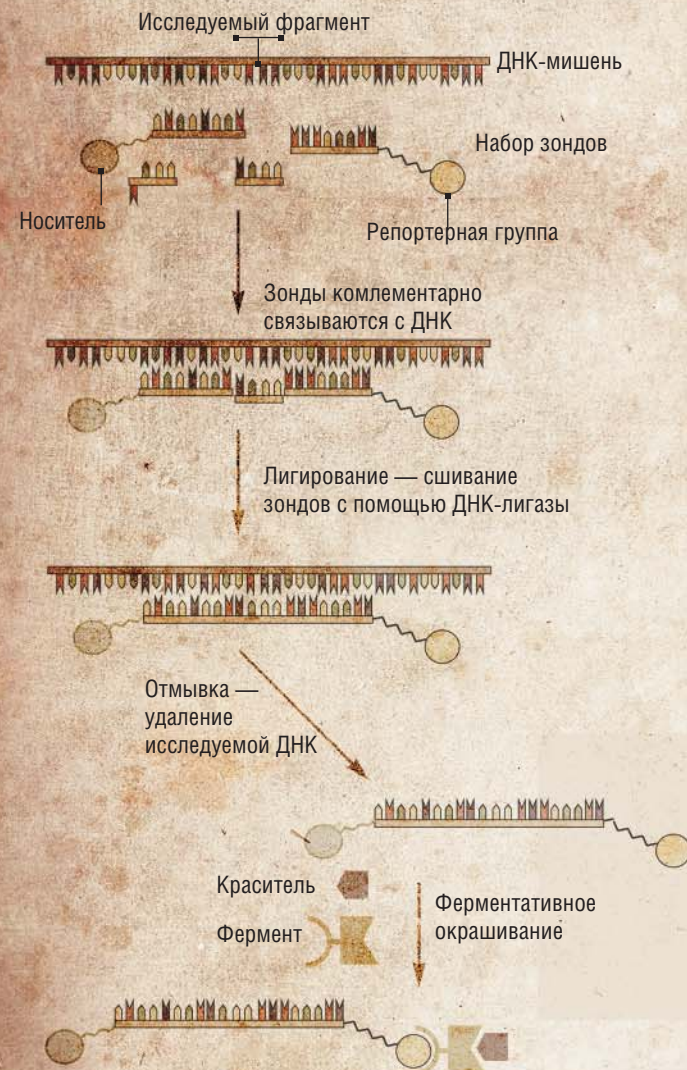
прикладные области, в частности, в медицинскую диагностику. В их числе — диагностические сенсоры на основе нуклеиновых кислот, часть которых разрабатывалась в последние полтора десятилетия в ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Назначение подобных конструкций — распознавать с высокой точностью целевые последовательности ДНК благодаря специфическому связыванию нанозондов с ДНК-мишенями.

Диагностические системы, предлагаемые новосибирскими биохимиками, представляют собой своего рода кассеты из наборов коротких синтетических фрагментов ДНК. Последние способны связываться с исследуемой ДНК, формируя так называемые *тандемные комплексы*.

В результате фундаментальных исследований этих комплексов удалось создать на их основе тест-системы для выявления точечных мутаций в ДНК. А ведь подобные мутации нередко являются причиной серьезных наследственных заболеваний, а также определяют патогенность различных штаммов микроорганизмов и вирусов.



Диагностические системы для детекции ДНК состоят из наборов коротких синтетических олигонуклеотидов, способных связываться с исследуемой одноцепочечной ДНК с формированием тандемных комплексов. Преимущество простого тандемного комплекса (а) — более высокая эффективность связывания отдельных олигонуклеотидов-зондов за счет кооперативных взаимодействий, возникающих при посадке таких зондов на соседних участках ДНК-мишени. Сшитый тандемный зонд (б) благодаря вставкам различной природы, ковалентно соединяющим олигонуклеотидные блоки, обладает такими свойствами, как способность к комплексообразованию, устойчивость/чувствительность к действию ферментов. *Разработка ИХБФМ СО РАН*



Метод высокоточного анализа генетического материала основан на ферментативном лигировании простого тандемного комплекса, образующегося при добавлении к исследуемой ДНК набора разных олигонуклеотидов-зондов. Лигирование (сшивание с помощью фермента ДНК-лигазы) трех коротких зондов (один из них «пришит» к твердотельному носителю, а другой несет репортерную группу) происходит только на полностью комплементарном участке цепи исследуемой ДНК. Основываясь на строении конкретного зонда, присоединившегося к исследуемому участку ДНК, можно выявить точечные мутации — последовательности ДНК, отличающиеся друг от друга лишь одним нуклеотидом. Визуализация результатов анализа достигается с помощью окрашивания продуктов ферментативных реакций. Это исключает необходимость использования дорогостоящей техники для регистрации результатов анализа. *Разработка ИХБФМ СО РАН*



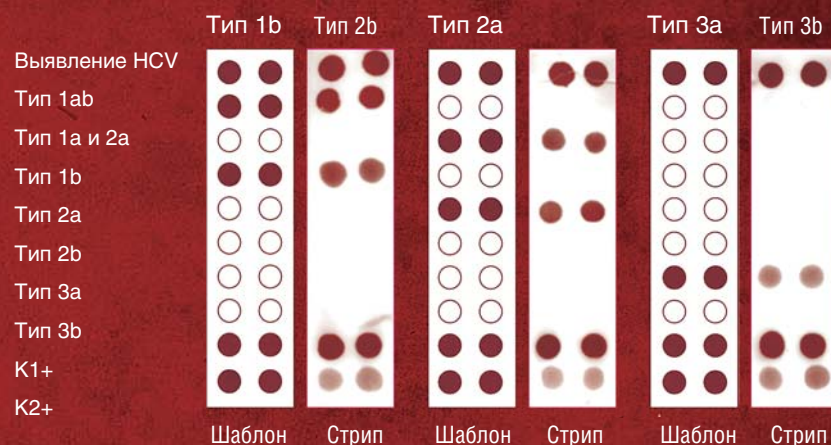
Носитель окрасился лишь в тех пробирках, где произошло комплементарное связывание исследуемой ДНК с конкретным набором молекул-зондов

Пример результатов генотипирования вируса гепатита С с помощью биочипа, позволяющего установить принадлежность вирусов из клинических проб к одному из шести диагностически значимых субтипов вируса: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b.

Биочип изготовлен в виде капроновых полосок — «стрипов», несущих набор специфичных олигонуклеотидных зондов. Он позволяет провести параллельный анализ сразу нескольких участков в образце ДНК вируса. Сравнив с шаблоном изображение, полученное после проявления биочипа, можно классифицировать вирус, что дает возможность определить степень его опасности для пациента.

K1+ — контроль системы мечения зондов, K2+ — контроль системы выявления метки.

Фото Е. Дмитриенко (ИХБФМ СО РАН)



Разработанные в ИХБФМ СО РАН способы анализа структуры ДНК с использованием составных олигонуклеотидных конструкций в качестве специфических зондов признаны патентноспособными. На их основе уже разработаны тест-системы для выявления полиморфизма в различных локусах Y-хромосомы человека, точечной мутации в гене фенилаланингидроксилазы, а также для генотипирования различных вирусов

Кроме того, с помощью этих тест-систем можно выявить и другие локальные нарушения в ДНК-последовательностях, такие как потеря сегмента ДНК, олигонуклеотидные замены и т. п.

Еще одно перспективное направление использования материалов из арсенала бионанотехнологии в медицинской диагностике — создание новых типов нанозондов для современных методов количественного анализа ДНК, таких как метод «ПЦР в реальном времени» (*Real-time PCR*). Этот метод используется для детекции и одновременного определения количества молекул ДНК-мишени в образце.

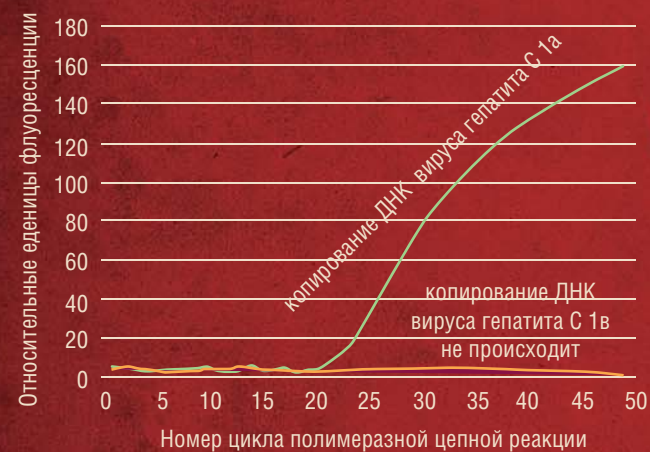
Транспорт для лекарства

Важнейшая проблема в клинической практике — адресная доставка в клетки-мишени биологически активных макромолекул, таких как «терапевтические гены». Чтобы решить ее, необходимо обеспечить защиту этих препаратов во время транспорта и концентрирование их в определенных клетках.

Одно из основных препятствий для использования препаратов на основе нуклеиновых кислот — низкая эффективность их проникновения внутрь клеток, *трансфекции*. Проблема трансфекции обусловлена тем, что млекопитающие обладают рядом механизмов, препятствующих проникновению в них чужеродных молекул ДНК и РНК — генетического материала потенциально болезнетворных агентов (вирусов, бактерий и т. п.)

Вдобавок самим клеткам трудно захватывать нуклеиновые кислоты, находящиеся в свободном («раздетом», как говорят специалисты) состоянии, из-за наличия своеобразного электростатического барьера. Дело в том, что клеточная мембрана и сахарофосфатный остов молекул нуклеиновых кислот обладают одноименным — отрицательным — зарядом, вследствие чего между ними возникает электростатическое отталкивание.

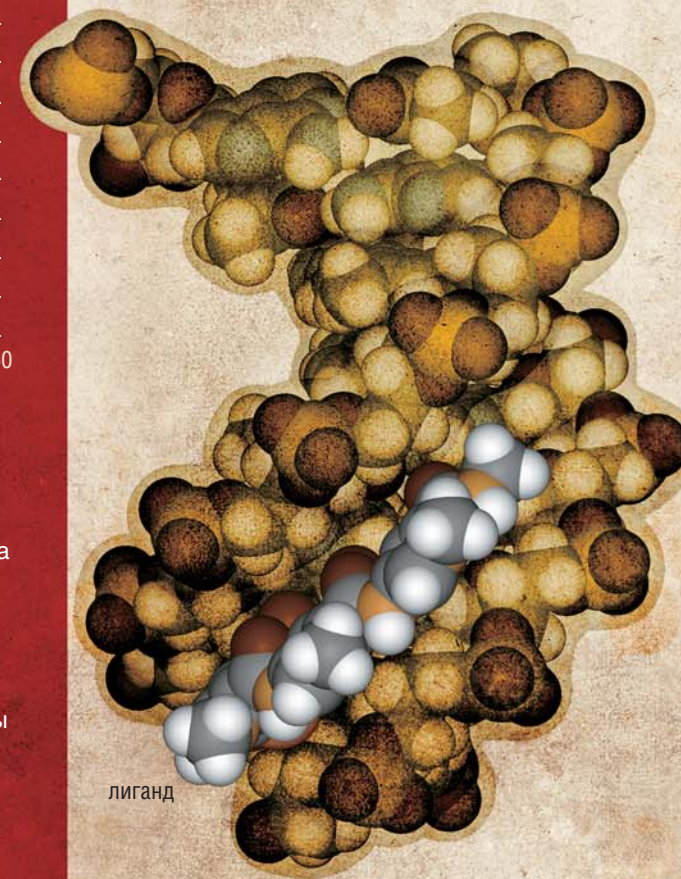
Транспорт в клетку протяженных нуклеиновых кислот осложняется еще и их относительно большим размером, жесткой пространственной структурой и



«Зримый» результат генотипирования образца вируса гепатита С (ВГС) с помощью метода «ПЦР в реальном времени», полученный при использовании ВГС-1a-специфичного TaqMan-зонда и фрагментов ДНК, соответствующих генотипам ВГС 1a и 1b.

Рост флуоресценции, отражающий степень разрушения ДНК-полимеразой зонда на комплементарной ДНК-матрице, свидетельствует о процессе копирования конкретной мишени. Зонды созданы на основе конъюгатов олигонуклеотидов с малобороздочным лигандом. ИХБФМ СО РАН

Справа — пример укладки малобороздочного лиганда в малой бороздке двойной спирали ДНК



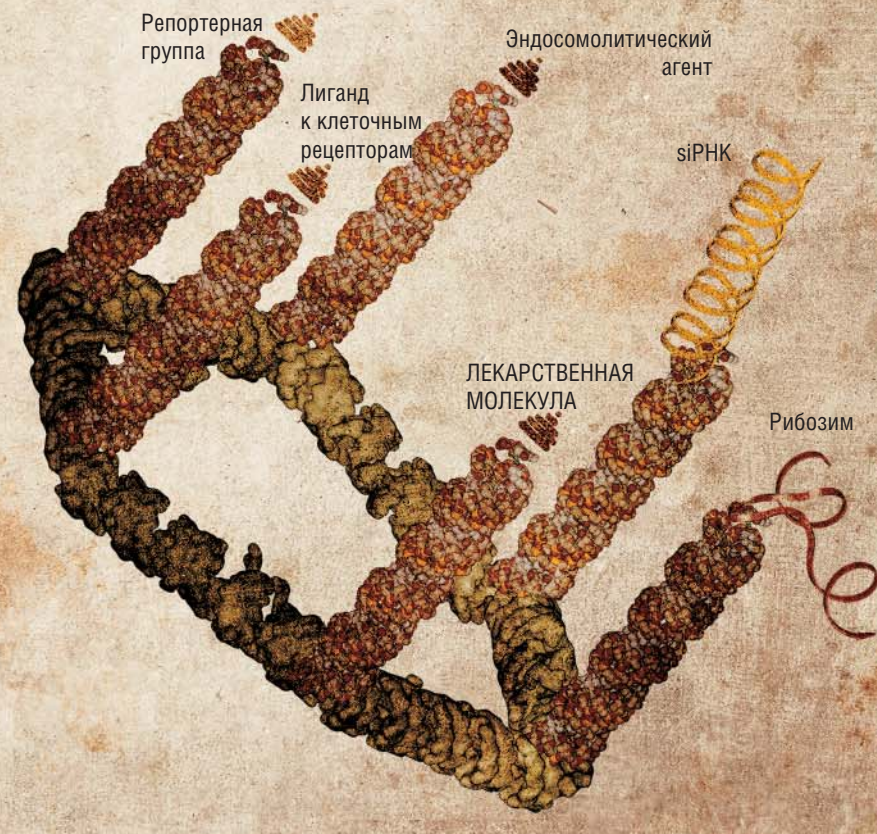
Зримые различия

На основе олигонуклеотидных зондов разработан точный и высокоэффективный метод «ПЦР в реальном времени» (*Real-Time PCR*), позволяющий не только детектировать ДНК-мишень, но и определять точное количество молекул этой мишени.

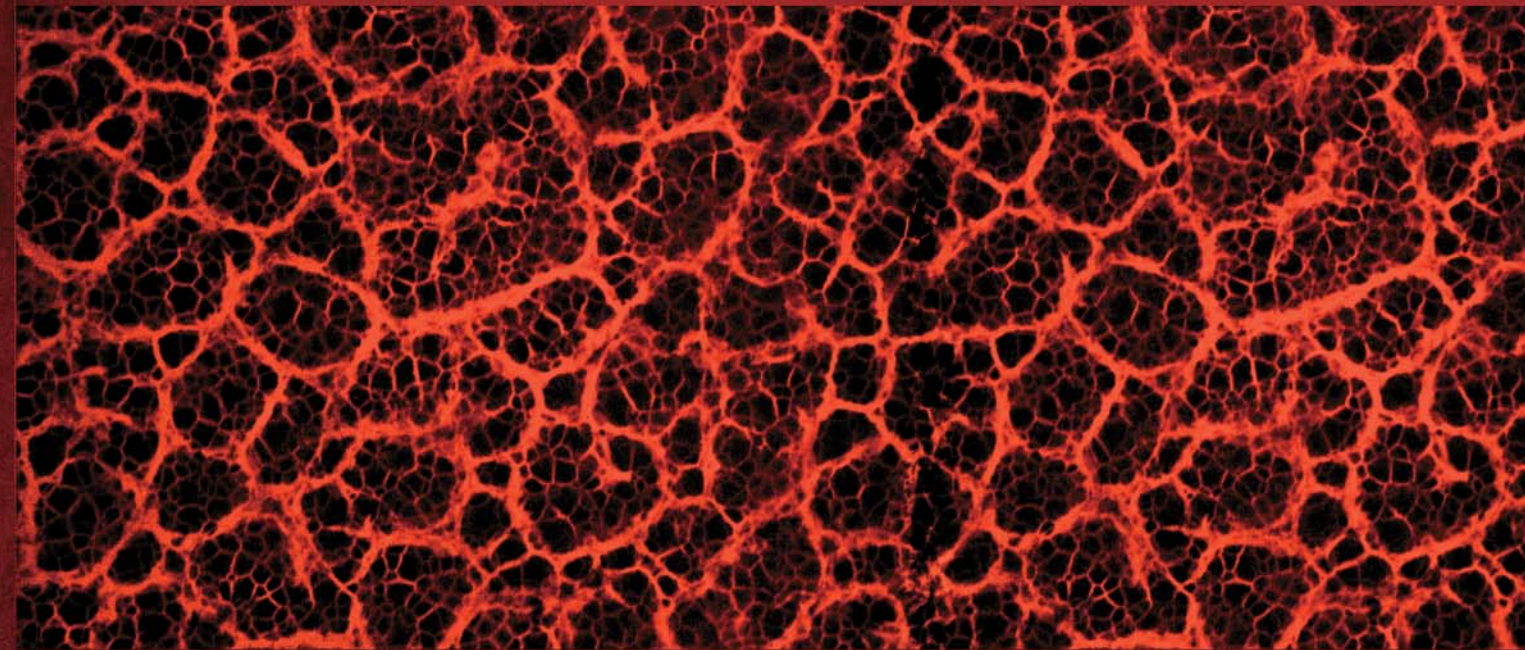
Суть обычной полимеразной цепной реакции (ПЦР) состоит в том, что на основе нуклеотидной последовательности первичной ДНК-матрицы с помощью фермента ДНК-полимеразы синтезируются цепи ДНК, служащие матрицами в следующем цикле копирования. В результате можно получить неограниченное число копий первичной ДНК. Метод «ПЦР в реальном времени» отличается тем, что позволяет определять количество ДНК по мере ее накопления в реакции. Наиболее перспективным является подход, основанный на использовании TaqMan-зондов. Они представляют собой олигонуклеотиды с флуоресцентной меткой на одном конце и «тушителем» флуоресценции — на другом, который

поглощает излучение от флуоресцентной метки, делая его незаметным для систем детекции. ДНК-полимераза обладает способностью разрушать фрагменты двухцепочечной структуры, встречающиеся ей по ходу синтеза второй цепи на матрице одноцепочечной ДНК. Та же участь постигает и TaqMan-зонды, которые комплементарно присоединяются к определенному участку ДНК-мишени. В результате разрушения зонда флуоресцентная метка отделяется от тушителя, что приводит к появлению регистрируемой флуоресценции.

Недостатком метода является его низкая чувствительность для распознавания ДНК-мишеней, отличающихся друг от друга всего одной заменой нуклеотида. Для решения этой проблемы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН предложено использовать в качестве зондов конъюгаты коротких олигодезоксирибонуклеотидов с малобороздочными лигандами — синтетическими молекулами, прочно связывающимися с двойной спиралью ДНК



Трехмерная модель-схема гипотетической полифункциональной наночастицы — гексамера молекулы РНК, несущей различные функциональные группы, которые обеспечивают адресную доставку конструкции в клетки-мишени; сигнализируют о доставке агента по адресу; определяют внутриклеточную локализацию конструкции; воздействуют на передачу генетической информации и другие биохимические процессы в клетках.
По: (Khaled, Guo et al., 2005)



Пример перспективных материалов для создания микро- и наноканальных мембран для биотехнологических целей, разработанных в Институте физики полупроводников СО РАН. Сканирующий электронный микроскоп. Результаты предоставлены к. ф.-м. н С. И. Романовым (ЦКП СО РАН «Наноструктуры», Новосибирск)

невысокой подвижностью в биологических жидкостях и цитоплазме клеток.

Методы трансфекции постоянно совершенствуются на протяжении уже более трех десятилетий. Наиболее современные из них основаны на использовании хитроумных конструкций на основе наноконструкций нуклеиновых кислот и их конъюгатов с органическими лигандами или наночастицами.

Некоторые встречающиеся в природе молекулы РНК обладают свойством формировать компактные молекулярные комплексы. Среди них φ29 — короткая (117 нуклеотидов) РНК бактериофага, участвующая в упаковке его ДНК-генома в белковую оболочку. На основе этой РНК сконструированы наночастицы так называемой «упаковочной» рRNA («packing RNA»). Благодаря образованию водородных связей между отдельными доменами она может путем самосборки образовывать димеры, тримеры и гексамеры размерами до 10–30 нм (Shu, Huang et al., 2003; Khaled, Guo, Li et al., 2005).

Такие комплексы рRNA служат в качестве упаковывающего каркаса для «терапевтических» молекул нуклеиновых кислот. Их удастся еще дополнительно «функционализировать», как говорят биологи, — путем присоединения различных функциональных группировок задать адрес доставки и клеточное назначение. Это могут быть так называемые *репортерные группы*, позво-

ляющие контролировать эффективность трансфекции; генонаправленные молекулы (рибозимы, малые siРНК), нарушающие выполнение определенных генетических клеточных программ; лиганды клеточных рецепторов и мембранных белков, определяющие адресованный захват наноконструкции клетками-мишенями.

Примером такой адресующей группировки может служить всем известный фолат (фолиевая кислота, витамин B₉). Рецепторы к нему обычно отсутствуют на поверхности нормальных дифференцированных тканевых клеток, но во множестве присутствуют на поверхности клеток различных опухолей. В результате остаток фолата, присоединенный к наноконструкции, должен обеспечить ее доставку преимущественно в раковые клетки.

Эксперименты по доставке подобных рRNA-комплексов, несущих биологически активный олигонуклеотид (рибозим или интерферирующую siРНК), показали, что они эффективно проникают в опухолевые клетки, имеющие фолатные рецепторы, где и подавляют работу генов-мишеней.

Поскольку рRNA-молекула способна образовывать гексамерные комплексы, то можно увеличить ее функциональность путем присоединения к ней до шести различных субъединиц. В результате селективность и эффективность терапевтической наноконструкции могут значительно возрасти.

Самосборка наночастиц на основе рRNA является контролируемым процессом, что дает возможность определять их размер путем манипуляции со структурными доменами. Димеры и тримеры рRNA образуют частицы размером 20–40 нм. Подобные структуры достаточно крупны, чтобы исключить их быстрое выведение из циркулирующей крови, но при этом не достигают критического (более 100 нм) размера, когда проникновение комплексов в клетки затрудняется.

Холестериновый посыльный

Другой подход к решению проблемы доставки терапевтических нуклеотидных последовательностей в клетку состоит в повышении эффективности их естественного транспорта через клеточную мембрану. Этот подход основан на формировании различных супрамолекулярных структур.

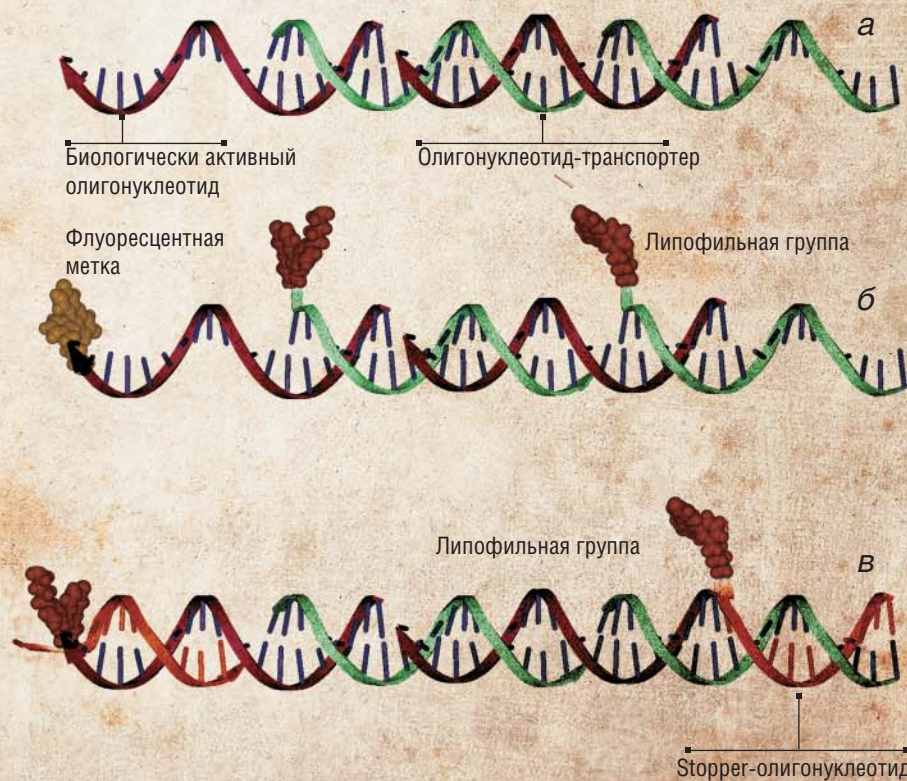
В частности, протяженные олигонуклеотидные наноконструкции, созданные в ИХБФМ СОРАН, активнее проникают в клетки разного тканевого происхождения из-за своего повышенного сродства к фосфолипидным мембранам клеток.

Эти наноконструкции представляют собой конкатимерные комплексы, т. е. длинные двуцепочечные моле-

кулы ДНК с перекрывающимися комплементарными нуклеотидными последовательностями. Одна из цепей представляет собой биологически активную молекулу, которую надо доставить в клетку (адресная молекула); другая цепь — молекулу-транспортёр (Gusachenko et al., 2008).

В качестве функциональной группировки в состав олигонуклеотидов-транспортёров вводят липофильный остаток холестерина, который способствует транспорту конструкции в клетку благодаря сродству с фосфолипидной клеточной мембраной. Нужно отметить, что функциональные группировки при этом присоединяют к транспортёру, а не к терапевтической молекуле, что позволяет сохранить высокую биологическую активность последней.

Проблема адресной доставки лекарства к органам- и клеткам-мишеням — одна из центральных в современной медицине. Бионанотехнологи создают на основе нуклеиновых кислот конструкции, способные нести сразу несколько функциональных групп, благодаря которым они успешно преодолевают барьеры на пути транспорта биологически активных молекул



Для доставки в клетку терапевтических форм нуклеиновых кислот используются конкатемерный комплекс. Разные типы комплексов создаются по единому принципу: первая цепь комплекса — биологически активный олигонуклеотид, который необходимо доставить внутрь клетки; последовательность второй цепи (транспортера) комплементарна и антипараллельна первой

а — немодифицированный конкатемер;

б — конкатемер, содержащий на разных цепях репортерную флуоресцентную группу и липофильные холестериновые группы, облегчающие транспорт через клеточную мембрану;

в — немодифицированный конкатемер, гибридный с липофильно-модифицированным stopper-олигонуклеотидом



Инкубация с конкатемерным комплексом

Процесс проникновения в клетки-мишени различных конкатемерных комплексов, несущих одинаковый терапевтический олигонуклеотид, можно визуально отследить благодаря флуоресцентной метке, входящей в его состав (зеленое свечение). Видно, что наличие липофильных холестериновых групп в составе комплекса способствует его транспорту в клетки

а — инкубация с немодифицированным конкатемерным комплексом;

б — инкубация с холестерин-модифицированным конкатемерным комплексом в течение 3 часов: комплексы накапливаются в цитоплазме клеток;

в — инкубация с холестерин-модифицированным конкатемерным комплексом в течение 17 часов: терапевтический олигонуклеотид проник из цитоплазмы в ядра клеток;

г — инкубация с конкатемерным комплексом, несущим только один остаток холестерина

Фотографии микропрепаратов ядер клеток линии 293, окрашенных Hoechst33258 (синее свечение), совмещены с фотографиями распределения конкатемерных комплексов, полученными с помощью флуоресцентной микроскопии (зеленое свечение).
Фото О. Гусаченко (ИХБФМ СО РАН)

Эта система доставки была испытана в экспериментах по транспорту так называемого *антисмыслового олигонуклеотида*, который вызывает выключение гена, кодирующего зеленый флуоресцирующий белок. В клетках, постоянно синтезирующих этот белок и обладающих благодаря этому зеленой флуоресценцией, такой наноконкомплекс вызывал снижение флуоресценции до 30%. Это свидетельствует о том, что антисмысловый олигонуклеотид проник в клетки и специфически подавил работу гена, кодирующего флуоресцирующий белок.

Кооперация и интеграция специалистов и проектов — залог успеха современных бионанотехнологических исследований. Эти принципы успешно реализуются в Сибирском отделении РАН

Сегодня большинство разработок в области бионанотехнологии реализуется в рамках междисциплинарных проектов. Для того, чтобы добиться успеха, принципиально необходимо тесное сотрудничество исследовательских организаций различного профиля.

В связи с этим нельзя не отметить совместные разработки новосибирских биохимиков и специалистов из Института физики полупроводников СО РАН, в распоряжении которых имеются уникальные микро- и нанопористые мембраны на основе кремния. Эти материалы являются перспективными платформами как для разработки современных биосенсорных устройств и проведения ДНК-диагностических исследований, так и для ультраселективного выделения клеток-мишеней.

Другим междисциплинарным проектом является разработка микро- и нанофлюидных устройств для амплификации (умножения) и анализа нуклеиновых кислот, которая проводится совместно со специалистами Института катализа СО РАН.

Кроме того, ряд институтов Сибирского отделения, работающих в областях химии, физики и даже петрографии, готовы предоставить ценные для развития бионанотехнологии объекты: нанопорошки (наносферы, нанотрубки, квантовые точки) и наноканальные материалы.

Возможность такого сотрудничества в области материалов и технологий в рамках интеграционных проектов Сибирского отделения РАН открывает перспективу создания у нас высокотехнологичных интеллектуальных биосенсоров и «умных» лекарственных препаратов, которые будут определять лицо медицины и биотехнологии завтрашнего дня.

Литература:

- Aldaye F.A., Palmer A.L., Sleiman H.F. *Assembling Materials with DNA as the Guide* // *Science*. — 2008. — V. 321. — P. 1795—1799.
- Chen Y., Wang M., Mao C. *An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2004. — V. 43. — P. 3554—3557.
- Gusachenko (Simonova) O.N., Pyshnyi D. V., Vlassov V. V., Zenkova M. A. *Modified concatemeric oligonucleotide complexes: new system for efficient oligonucleotide transfer into mammalian cells* // *Hum. Gene. Ther.* — 2008. — V. 19. — P. 532—546.
- Khaled A., Guo S., Li F., Guo P. *Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology* // *Nano Lett.* — 2005. — V. 5. — P. 1797—1808.
- Shu D., Huang L. P., Hoeplich S., Guo P. *Construction of phi29 DNA-packaging RNA monomers, dimers, and trimers with variable sizes and shapes as potential parts for nanodevices* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* — 2003. — V. 3. — P. 295—302.
- Simmel F. C., Dittner W. U. *DNA Nanodevices* // *Small*. — 2005. — V. 1, N. 3. — P. 284—299.
- Tian Y., He Y., Chen Y. et al. *DNAzyme that walks processively and autonomously along a one-dimensional track* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2005. — V.44. — P. 4355—4358.