

## ПЕРЕНОС НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТКАНИ И КЛЕТКИ (НА ПУТИ К ГЕННОЙ ТЕРАПИИ)

Ю. А. ЧИЗМАДЖЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

### ON THE WAY TO GENE THERAPY

Yu. A. CHIZMADZHEV

*Some ways of DNA delivery to the cells in the context of increasing interest to gene therapy are described. The main attention is given to the electrotransfection – DNA transfer under influence of the short pulses of the strong electric field.*

*Статья посвящена описанию существующих способов доставки молекул ДНК в клетки в контексте все возрастающего интереса к генной терапии. Наиболее подробно обсуждается электротрансфекция, то есть перенос ДНК под действием кратковременных импульсов сильного электрического поля.*

[journal.issep.rssi.ru](http://journal.issep.rssi.ru)

### ВВЕДЕНИЕ

Живая клетка – это многопрофильный завод, который имеет собственные силовые станции (митохондрии), цеха для производства белков-запчастей (рибосомы), разветвленную рельсовую сеть (микротрубочки), по которой молекулы-тягачи (например, кинезин) перевозят необходимые грузы. Работа этого предприятия управляется центральным компьютером (совокупность хромосом), который находится в клеточном ядре. Каждая хромосома содержит множество генов, каждый из которых представляет собой особую последовательность оснований нуклеотидов в молекулах ДНК; именно здесь сосредоточена генетическая память клетки, а также закодированы рабочие инструкции. Можно сказать, что геном клетки – это жесткий диск центрального компьютера, а носителями оперативной памяти являются молекулы РНК, которые организуют синтез белков, необходимых для нормальной жизни клетки. Если в каком-то гене произойдут изменения – мутации, это может отразиться на биосинтезе определенного белка, в результате чего будет нарушен метаболизм клетки. В таких случаях говорят о патологиях генетического происхождения.

Уже в середине прошлого века вскоре после формулировки центральной догмы молекулярной биологии о потоке генетической информации от ДНК к РНК и далее к белку в научной литературе появились высказывания о принципиальной возможности коррекции дефектных генов, ответственных за развитие определенных заболеваний. С тех пор, набирая темп, развиваются научные исследования, направленные на создание генной терапии. Специалисты сходятся во мнении, что решение этой проблемы будет найдено, но не ранее, чем через 10–15 лет, так как необходимо преодолеть много серьезных трудностей. При этом речь идет об излечении заболеваний, вызванных нарушениями в одном гене. К сожалению, многие распространенные заболевания, такие, как диабет, артриты, болезнь Альцгеймера и др., являются результатом мутаций во многих

генах. Возможности генной терапии в этих случаях выглядят проблематичными.

Чтобы отремонтировать или заменить дефектный ген, используют следующие подходы: 1) в геном дополнительно встраивается нормальный ген, 2) дефектный ген заменяется на нормальный с помощью отработанных генно-инженерных манипуляций, 3) дефектный ген пытаются отремонтировать, вызывая селективную обратную мутацию, 4) понижается степень активности дефектного гена. Проведение всех этих “ремонтных работ” в клеточном ядре представляет огромные трудности. Интеграция вводимой ДНК в геном — это сложный и недостаточно изученный процесс. Чтобы получить стабильный эффект, терапевтическая ДНК должна достаточно долго функционировать в клетках. Когда введение ДНК, отвечающей за продукцию необходимого белка, приводит к его экспрессии, говорят об успешной трансфекции. В настоящее время ситуация такова, что пациенты должны подвергаться многократным сеансам генной терапии. Введение в клетки молекул ДНК, или их фрагментов, или других макромолекул, играющих роль ремонтного инструмента, — задача, прямо скажем, непростая, так как практически любая клетка окружена мембраной, которая призвана ограждать клетку от непрошенных гостей. Чтобы справиться с этой трудностью, используются физические, химические и биологические методы, каждый из которых имеет определенные достоинства в сочетании с набором недостатков. Некоторые из этих методов научно обоснованы, а другие носят эмпирический характер. Мы подробно остановимся на этих вопросах, поскольку именно им посвящена данная статья.

## МЕТОДЫ ТРАНСФЕКЦИИ

Казалось бы, проще всего прибегнуть к инъекции соответствующей плазмиды — внутримышечно или внутривенно и посмотреть, что из этого получится. Такие попытки неоднократно делали в опытах на животных, причем инъекции проводили, как правило, локально, адресуясь либо к скелетным мышцам, либо к сердечной мышце или печени. Однако быстрая деградация ДНК-нуклеазами и активный фагоцитоз не позволяли получить требуемый уровень трансфекции. Чтобы радикально повысить его, на практике используются три физических метода: ткань обрабатывают либо короткими электрическими импульсами, либо ультразвуком или, наконец, обстреливают из “генного пистолета”, который заряжен микроскопическими золотыми пулями, на поверхности которых адсорбирована ДНК. Эти способы роднит общая идея — все они обратимо разрушают плазматические мембраны и открывают прямой и быстрый доступ ДНК к клеточному ядру. Первые два из этих методов ранее апробированы

на клеточных суспензиях, где была получена высокая эффективность трансфекции. Все они неплохо работают и на тканевом уровне. К достоинствам физических методов следует отнести то обстоятельство, что они базируются на строгой теории, подтвержденной многочисленными исследованиями. Наряду с физическими распространены и химические методы, в рамках которых в организм вводится ДНК, защищенная липидами или полимерами, которые заодно способствуют и преодолению мембранного барьера. К сожалению, механизм взаимодействия таких комплексов с мембранами до сих пор не выяснен.

На практике наибольшее распространение имеет, пожалуй, биологический метод трансфекции, который основан на использовании вирусов-векторов. Идея метода проста и изящна, хотя он и таит в себе немалые опасности. На собственном опыте мы знаем, насколько успешно вирус гриппа во время очередной эпидемии атакует наши беззащитные клетки, внедряя в них свою РНК. Вот эта уникальная способность вирусов “вскрывать сейфы” используется в генной терапии. Генные инженеры умеют так прооперировать вирус, что вместо его собственной ДНК или РНК он получает нормальный терапевтический ген. При этом вирус сохраняет способность сливаться с клеткой-мишенью, в которую он впрыскивает здоровый ген, способный заменить больной. Все выглядит как в сказке, но happy end не гарантирован: появившийся в организме вирус потенциально является источником токсичности и непредсказуемой иммунной реакции. Более того, вирус-вектор в организме пациента может восстановить свою инфекционность. Поэтому неудивительно, что физические методы трансфекции приобретают все больше сторонников.

## ЭЛЕКТРОТРАНСФЕКЦИЯ

ДНК — это огромная гидрофильная молекула, которая несет значительный отрицательный заряд. Поэтому ее перенос через липидные мембраны, представляющие собой высокий гидрофобный барьер, крайне затруднен. Однако сравнительно простая модификация ДНК различными химическими агентами индуцирует трансфекцию клеток млекопитающих (см. обзор [1]). Механизм переноса ДНК в подобных случаях, к сожалению, до сих пор не выяснен. Еще эффективнее оказывается обработка суспензии клеток электрическими импульсами (см. обзор [2]), которая применима в равной мере ко всем типам клеток. Универсальность электротрансфекции обеспечила этому методу широкое распространение. Многочисленные исследования, проводившиеся во всем мире в течение двух последних десятилетий, позволили прояснить интригующий вопрос о механизме электроиндуцированного переноса

ДНК через мембраны. Этому способствовало установление корреляции между электротрансфекцией и электропорацией мембран, которая была уже досконально изучена.

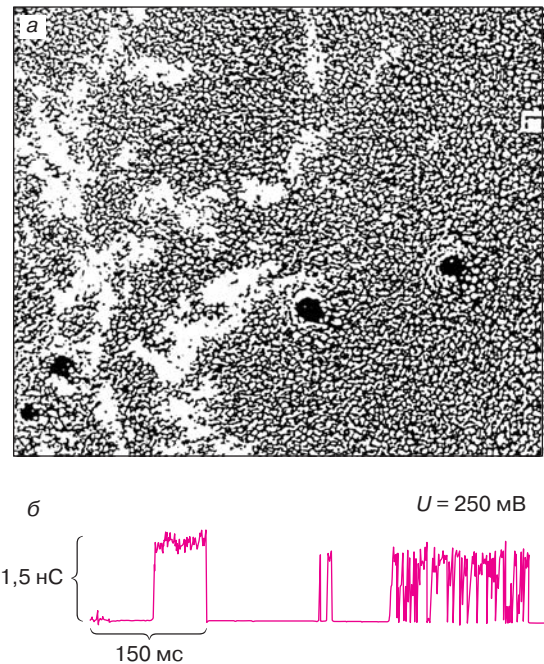
## ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ

Мы не будем останавливаться на всех перипетиях увлекательной истории о выяснении природы воздействия электрических полей на мембраны, тем более что в какой-то мере они отражены в статьях, опубликованных ранее в “Соросовском Образовательном Журнале” [3, 4]. Ограничимся обсуждением тех вопросов, которые имеют принципиальное значение для выяснения механизмов переноса ДНК через мембраны.

В ходе многочисленных исследований установлено, что воздействие на клетки импульсов электрического поля высокой напряженности (0,5–15 кВ/см в зависимости от типа клеток) и различной длительности импульса (10 мкс – 50 мс) ведет к сильному увеличению проницаемости плазматической мембраны для малых ионов, низко- и высокомолекулярных веществ. Если электрическая обработка является слишком интенсивной, происходит необратимое разрушение мембран, приводящее к гибели клеток. При умеренной обработке после некоторого времени релаксации проницаемость мембран возвращается к исходному уровню, то есть явление носит обратимый характер. Основные сведения о механизме воздействия электрического поля на мембраны получены из измерений на бислоиных липидных мембранах (БЛМ). В этих опытах была обнаружена крайне резкая зависимость среднего времени жизни  $t$  бислоев от приложенного потенциала  $U$ : при изменении  $U$  от 100 до 600 мВ  $t$  изменяется на пять порядков величины – от минут до миллисекунд. Были предложены два различных механизма электрического пробоя: электромеханический и статистический. Согласно первому, разрушение БЛМ происходит в результате однородной по всей мембране электрострикции, а согласно второму, оно носит локальный характер и является следствием возникновения и роста пор. Сейчас уже нет сомнений в справедливости второго механизма, так как наличие пор документировано электронной микроскопией (рис. 1, а) и подтверждено электрической регистрацией одиночных липидных пор, средний размер которых составляет 0,5 нм, а время их жизни от 1 до 100 мс (рис. 1, б). Работа  $\Delta W$ , которую необходимо совершить для образования поры радиуса  $r$  в мембране записывается в виде

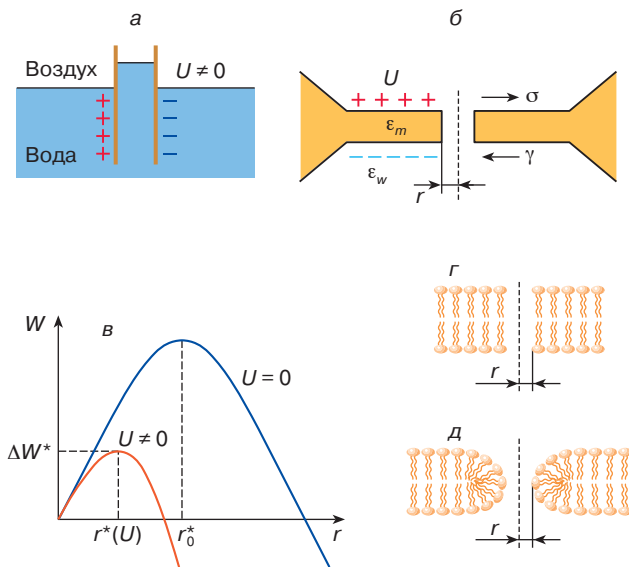
$$\Delta W = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma - \pi r^2 C_m \left( \frac{\epsilon_w}{\epsilon_m} - 1 \right) \frac{U^2}{2}, \quad (1)$$

где  $\gamma$  – линейное натяжение на кромке поры,  $\sigma$  – натяжение мембраны,  $C_m$  – ее удельная электрическая ем-



**Рис. 1.** а – электронная микрофотография, демонстрирующая появление пор в мембране эритроцита. Их диаметр составляет десятки нанометров; б – проводимость одиночных пор в липидном бислое, порожденных электрическим полем

кость,  $\epsilon_w$  и  $\epsilon_m$  – диэлектрические постоянные водного раствора и материала мембраны соответственно, а  $U$  – разность потенциалов, приложенная к мембране. Первые два члена в формуле (1) вполне очевидны: первый учитывает увеличение внутренней энергии при образовании кромки поры, а второй – ее уменьшение благодаря уменьшению площади плоской поверхности раздела липид–раствор. Третье слагаемое в формуле (1) представляет особый интерес, так как именно оно описывает зависимость изменений внутренней энергии от электрического поля. Вспомним популярный школьный опыт. Представьте, что в воду перпендикулярно к границе раздела вода–воздух полупогружены две плоские металлические пластины, образующие конденсатор, частично заполненный водой, частично воздухом (рис. 2, а). Если приложить к пластинам разность потенциалов, то полярная жидкость в конденсаторе поднимается на определенную высоту, так как это уменьшает электрическую составляющую свободной энергии. Высота поднятия жидкости ограничена ростом гравитационной компоненты свободной энергии и может быть найдена из условия баланса этих двух компонентов. Теперь вернемся к липидному бислою, который подобен конденсатору с низкой диэлектрической постоянной; роль металлических пластин играют растворы



**Рис. 2.** а – подъем полярной жидкости в плоском конденсаторе (подробности в тексте); б – линейное натяжение  $\gamma$  стремится захлопнуть пору, а натяжение  $\sigma$  способствует ее росту. Действие электрического поля эквивалентно повышению  $\sigma$ ; в – изменение свободной энергии мембраны как функция радиуса поры имеет колоколообразный вид, что говорит о метастабильности системы; г – гидрофобная пора является предшественницей гидрофильной поры, которая показана на рис. 2, д

электролитов, окружающие бислои (рис. 2, б). Если приложить к бислою электрическое напряжение и образовать водную пору, то она будет стремиться к расширению, так как это сопровождается уменьшением электрической компоненты свободной энергии, так же как в приведенном выше школьном опыте. Зависимость  $\Delta W(r)$ , описываемая формулой (1), показана на рис. 2, в. Из него следует, что энергия гидрофильной поры зависит от ее радиуса, причем она вначале растет, а потом падает. Иными словами, на кривой этой зависимости имеется энергетический барьер. Если поры узкие, то их расширение невыгодно, поскольку требует дополнительной энергии. Однако если за счет тепловых флуктуаций возникает широкая пора, отвечающая максимальной энергии, то дальше она будет расширяться самопроизвольно. Это приводит в конце концов к разрушению мембраны. При наложении электрического поля высота барьера существенно понижается, а значит, уменьшается и время жизни бислоя. Из формулы (1) легко находятся высота активационного барьера и среднее время жизни мембраны.

Поры в мембранах, о которых шла речь выше, имеют гидрофильную кромку, выстланную полярными головками липидных молекул (рис. 2, д). Возникают они

из малых и короткоживущих пор с гидрофобной кромкой в ходе реориентации липидных молекул (рис. 2, з). В модельных бислоях определенного химического состава при умеренной электрообработке удастся накопить чрезвычайно большое количество метастабильных пор, не приводящих к немедленному разрушению мембраны. В этом случае принято говорить об обратимом пробое или обратимой электропорации. Состав клеточных мембран таков, что там реализуется как раз обратимая электропорация, что и делает данный метод перспективным с точки зрения биотехнологии и генной терапии.

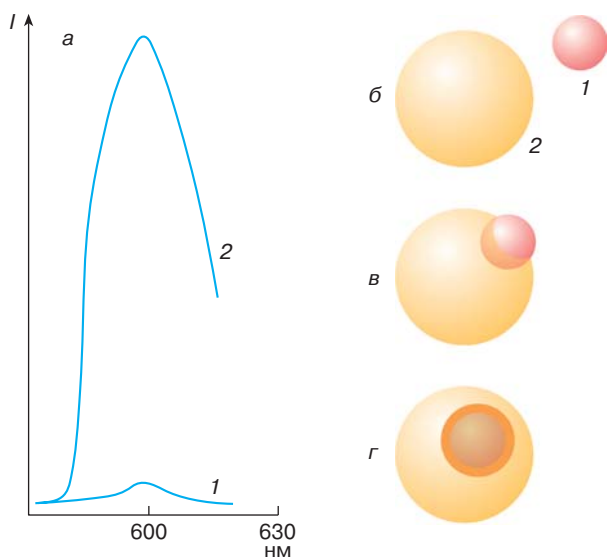
### МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ДНК

Итак, мы знаем, что: 1) электрическое поле способствует трансфекции, 2) электрическое поле вызывает порацию мембран, 3) между порацией и трансфекцией имеется корреляция. Поэтому хотелось бы заявить, что ДНК проникает через мембрану, используя поры, если бы не известные проблемы с верблюдом, который не желает пролезать через игольное ушко. Действительно, несоответствие размеров пор и ДНК носит разительный характер. Электрообработкой удастся вводить в клетки ДНК размерами 150–200 тыс. пар оснований, что дает эффективный диаметр статистического клубка в растворе более 2000 нм. Диаметр двойной спирали ДНК 2 нм, а диаметр суперскрученной плазмидной ДНК несколько больше. Напомним, что средний размер пор составляет примерно 0,5 нм. Эти цифры заставляют хотя бы на время отвлечься от пор и подумать о каком-то варианте эндоцитоза, при котором адсорбция ДНК на мембране инициирует образование инвагинации с последующим проникновением внутрь клетки. Обратимся в связи с этим к красивым опытам, выполненным в лаборатории В.Г. Будкера [5] в ходе исследования взаимодействия ДНК с однослойными липосомами. Прежде всего была измерена степень захвата радиоактивно меченой ДНК липосомами в зависимости от концентрации  $Mg^{2+}$ . При отсутствии или при малых концентрациях  $Mg^{2+}$  липосомы вообще не “заглатывали” ДНК. С ростом концентрации  $Mg^{2+}$  степень захвата доходила до нескольких процентов. Роль  $Mg^{2+}$  состояла, видимо, в том, что эти ионы способствовали адсорбции ДНК на поверхности липосом. В следующей серии опытов изучался захват ДНК липосомами при наложении короткого импульса сильного электрического поля. Степень захвата повышалась примерно в 10 раз, причем эффект наблюдался даже при отсутствии ионов  $Mg^{2+}$ . Удалось показать, что ДНК, проникая в липосомы окружена липидной оболочкой, то есть реализуется процесс типа эндоцитоза (рис. 3, а–г). Доказано это с помощью использования радиоактивно меченой ДНК и водорастворимого красителя

этидий-бромид (EtB), флуоресценция которого резко возрастает после его связывания с ДНК (рис. 3, а). Оказалось, что после проникновения ДНК в липосомы флуоресценция EtB остается той же, что была в контроле, но резко возрастает после озвучивания суспензии, в результате чего разрушаются все липидные оболочки и возникает возможность для связывания EtB с ДНК.

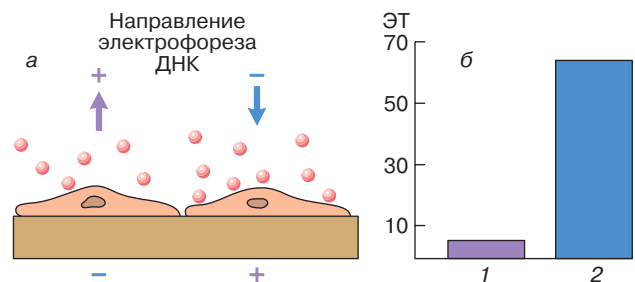
Возникает естественный вопрос: а в чем, собственно, заключается роль электрической обработки, которая, очевидно, вызывает обратимую порацию мембраны. Почему электропорация способствует захвату ДНК липосомами, который идет по эндоцитозному пути? Можно попытаться объяснить это следующим образом. Представьте, что у вас в руках находится надутая волейбольная камера, и попытайтесь надавить на нее пальцем, чтобы сформировать инвагинацию. Сделать это будет значительно легче, если давление в камере немного снизить. Если появление пор снижает давление и соответственно натяжение мембраны, будет легче создать инвагинацию и осуществить захват ДНК липосомой. К сожалению, эта гипотеза не была проверена экспериментами.

Экстраполировать эти результаты на случай клеток было бы слишком смело, а провести описанные выше опыты с клетками практически невозможно, так как их

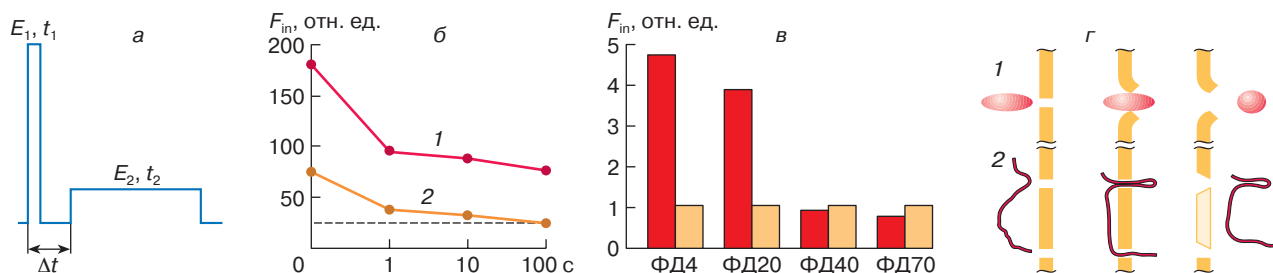


**Рис. 3.** а – спектры флуоресценции I липосом с этидийбромидом, подвергнутых электрообработке (12,5 кВ/см, 0,3 мс) в присутствии ДНК и отмытых стандартным образом от несвязавшейся ДНК, получены до (1) и после (2) ультразвуковой обработки суспензии; б–г – плазмидная ДНК (красные кружки, (1)) адсорбируется на поверхности липосомы (2), в результате чего образуется инвагинация, а затем минилипосома внутри липосомы (2), содержащая ДНК

внутренняя организация слишком сложна. Электронная микроскопия клеток *E. coli* после их электротрансфекции плазмидной ДНК не выявила появления внутри клеток каких-либо везикулярных образований. Одновременно с этим накопилось множество косвенных данных, которые говорят в пользу прохождения ДНК через электропоры. Перечислим наиболее впечатляющие результаты, полученные В.А. Кленчиным, С.И. Сухаревым и др. [6, 7], которые в известной степени решили проблему “малая пора – большая ДНК”. Прямыми опытами было доказано, что электрофорез ДНК, то есть увлечение этих молекул электрическим полем, играет важнейшую роль и на стадии переноса ДНК из объема раствора к поверхности клетки, и во время прохождения ДНК через мембрану (рис. 4, а, б). Предложенная двухимпульсная методика (рис. 5, а), когда вслед за коротким мощным импульсом после определенной задержки следует низковольтный длинный импульс, позволила отдельно управлять порацией и переносом. Было установлено, что введение плазмидной ДНК до порирующего импульса является необходимым условием высокого уровня трансфекции. Если же ДНК вводится между порирующим и форетическим импульсами, трансфекция практически равна нулю. Отсюда следует принципиальный вывод – электрическое поле оказывает мощное давление на плазмидную ДНК и опосредованно на мембрану в области малой поры, расширяя ее и деформируя мембрану. Это подтверждено прямыми опытами с использованием декстранов разного размера (рис. 5, б, в). А именно, в течение десятков секунд после прохождения ДНК поры остаются настолько расширенными, что в клетки проникают декстраны крупного размера с молекулярным весом до 20 000. Таким образом, электротрансфекция чем-то похожа на обстрел ткани из “генного пистолета”, только роль золотых пуль здесь играют молекулы



**Рис. 4.** а – схематическое изображение экспериментальной системы, позволяющей изучать роль направления электрического поля в электротрансфекции. Красными точками показаны молекулы ДНК; б – зависимость эффективности трансфекции в монослое от полярности импульса: 1 – электрофорез ДНК от клеток, 2 – к клеткам



**Рис. 5.** а – протокол двухимпульсного эксперимента. Параметры импульсов:  $E_1, t_1, E_2, t_2$  – амплитуды (в В/см) и длительности первого и второго импульсов соответственно,  $\Delta t$  – задержка между импульсами; б – относительные количества захваченного клетками ФД20 при введении этого декстрана в суспензию клеток через различное время после электрообработки одним импульсом 1,5 кВ/см, 1 мс в присутствии 0,1 мг/мл ДНК (1) и без ДНК (2). Крайние левые значения на кривых ( $t = 0$ ) получены при введении ФД20 до приложения импульса. Штриховой линией показан уровень флуоресценции клеток в контроле без импульса. По оси ординат отложена интенсивность флуоресценции декстранов; в – относительное увеличение количества захваченных клетками декстранов различного размера при обработке импульсом 1,5 кВ/см, 1 мс в присутствии 0,1 мг/мл ДНК. Контрольные значения, полученные при отсутствии ДНК (светлые столбцы), во всех случаях приняты за единицу; г – возможные структурные изменения мембраны при взаимодействии с ДНК в сильном электрическом поле: 1 – расширение поры при прохождении ориентированной молекулы ДНК, 2 – возникновение разреза в мембране нитью ДНК, вовлеченной одновременно в две поры

плазмидной ДНК, увлекаемые не механической, а электрической силой (рис. 5, з 1). Механизм переноса через поры гигантских молекул ДНК, присутствующих в растворе в виде статистических глобул, должен отличаться от описанного выше, хотя и там движущей силой, видимо, является электрофоретическая (рис. 5, з 2).

### УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ОБРАБОТКА

Литературные данные, относящиеся к сравнительному исследованию эффективности трансфекции при электро- и ультразвуковой обработке клеточных суспензий, показали, что оба метода позволяют получить примерно 100-кратное увеличение трансфекции по сравнению с контролем. Это говорит о том, что ультразвук, как и электрическое поле, существенно повышает проницаемость клеточных мембран, хотя механизм его действия иной. Как известно, при излучении в жидкость звука во время полупериодов разряжения создаются условия для возникновения кавитации. Напомним, что кавитацией называется образование в жидкости газовых пузырьков, которые образуются в тех местах, где давление в жидкости становится ниже давления насыщенного пара этой жидкости. Во время полупериодов сжатия пузырьки схлопываются, создавая кратковременные (порядка  $10^{-6}$  с) импульсы давления вплоть до  $10^3$  атм, способные разрушить даже прочные материалы. Коллапс пузырька приводит к возникновению в жидкости локальных потоков и ударных волн. По-видимому, последние и являются причиной разрушения клеточных мембран. Если давление не

превышает нескольких атмосфер, увеличение проницаемости является обратимым.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Титомиров А.В., Зеленин А.В. Новые методы трансфекции клеток млекопитающих // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22, № 6. С. 1445–1450.
2. Черномордик Л.В. Электрический пробой биологических мембран // Успехи соврем. биологии. 1985. Т. 99. С. 67–80.
3. Антонов В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран // Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 10. С. 10–17.
4. Чизмаджев Ю.А. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин // Там же. 2000. № 8. С. 12–17.
5. Черномордик Л.В., Соколов А.В., Будкер В.Г. Электростимулируемый захват ДНК липосомами // Биол. мембраны. 1989. Т. 6, № 2. С. 212–217.
6. Кленчин В.А., Серов С.М., Сухарев С.И. и др. Электрофорез ДНК играет важную роль в электростимулируемой транслокации ДНК в клетки // Там же. 1991. Т. 8, № 7. С. 769–777.
7. Сухарев С.И., Кленчин В.А., Серов С.М. и др. О механизме электроиндуцируемого переноса ДНК через плазматическую мембрану // Там же. 1992. Т. 9, № 4. С. 405–419.

\* \* \*

Юрий Александрович Чизмаджев, доктор химических наук, профессор кафедры биофизики МГУ, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией биоэлектрохимии Института электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Лауреат Государственной премии СССР в области науки и техники и премии им. Дж. Милаццо Международного биоэлектрохимического общества. Область научных интересов – биофизика мембран. Автор 270 научных трудов и трех монографий.