

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГИСТОНОВЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОПРЕПАРАТОВ  
В ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ**

***А.И. Кузьмич, О.А. Ракитина, М.В. Зиновьева, Д.А. Дидыч, И.В. Алексеенко***

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, Россия*

Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) являются перспективной мишенью противоопухолевой генной терапии, в связи с чем актуальной проблемой является разработка способов направленной доставки ДНК в эти клетки. Возможным решением этой проблемы могут быть носители ДНК, способные селективно связываться со специфическими молекулами на поверхности ОАФ. Таким характеристическим белком этих стромальных клеток является рецептор фактора роста тромбоцитов бета-типа, PDGFRb. Ранее был описан пептидный лиганд YG2, способный связываться с поверхностью PDGFRb-позитивных клеток и накапливаться внутри них. Также известно, что человеческий гистон H2A способен осуществлять доставку плазмидной ДНК в различные клетки млекопитающих. Мы предположили, что слияние гистона H2A с YG2 способно улучшить эффективность доставки ДНК в PDGFRb-позитивные ОАФ. Целью данной работы были биотехнологическое получение гистона H2A, слитого с лигандом к PDGFRb, и оценка его свойств, как носителя ДНК.

В ходе работы была получена генно-инженерная конструкция, кодирующая гибридный гистон H2A-YG2. В бактериальной системе этот белок был наработан, выделен и очищен в два этапа с помощью ионообменной и обращено-фазовой ВЭЖ хроматографий. Выход очищенного белка составлял около 8,5 мг на литр культуры, чистота составляла не менее 90 %. Путем измерения подвижности ДНК в агарозном геле показано, что H2A-YG2 способен связывать плазмидную ДНК с той же эффективностью, как и немодифицированный рекомбинантный гистон H2A. Методом динамического светорассеяния было показано, что в диапазоне зарядового соотношения N/P от 2,5 до 15 оба белка формируют с плазмидной ДНК комплексы с гидродинамическим радиусом порядка несколько сотен нанометров и слабopоложительным поверхностным зарядом (z-потенциал около +20 мВ). На PDGFRb-позитивной и негативной линиях клеток млекопитающих была оценена интернализация комплексов гистонов H2A и H2A-YG2 с плазмидной ДНК, меченной флуорофором ТМ-родамином. В случае PDGFRb-позитивной линии клеток NIH/3T3, суммарное количество захваченных клетками комплексов увеличивалось в 1,5 раза при использовании модифицированного гистона, однако, доля захвативших комплексы клеток не увеличивалась. При этом модификация не влияла на интернализацию комплексов в случае PDGFRb-негативной линии HEK293T. При снижении температуры во время инкубации клеток с комплексами до +4 градусов Цельсия наблюдалось резкое снижения уровня интернализации комплексов ДНК с гистонами в клетки, что свидетельствует об участии энерго-зависимого эндоцитоза в этом процессе. При трансфекции клеток линии NIH/3T3 комплексами гистонов с плазмидой pCMV-EGFP-P2A-luc2, кодирующей два репортерных белка, наблюдалось увеличение активности люциферазы luc2 в лизатах клеток в 5 раз при модификации гистона лигандом к PDGFRb, в то время как для HEK293T значимые изменения не детектировались. Также с помощью проточной цитометрии было выяснено, что доля трансфицированных клеток в случае NIH/3T3 увеличивалась в 3,1 раза при внесении в H2A пептидной модификации, а суммарная флуоресценция EGFP увеличивалась в 7 раз. В то же время, для HEK 293T наблюдалось увеличение доли и суммарной флуоресценции при использовании H2A-YG2, однако, это увеличение было менее выражено, чем для NIH/3T3 (доля увеличивалась в 2,5 раза, а флуоресценция – в 2,6 раз).

Таким образом, нам удалось получить новый рекомбинантный гистон H2A-YG2 и показать, что введенная пептидная модификация приводит к улучшению трансфицирующих свойств гистона H2A в случае как PDGFRb-позитивных, так и PDGFRb-негативных клеток, однако, такое улучшение было существенно более выражено для PDGFRb-позитивной линии. Это позволяет нам рассматривать созданный носитель в качестве потенциально пригодного для индустриального биотехнологического производства, а также обладающего повышенной тропностью к стромальным клеткам опухолей.

***Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00194 (17-00-00190).***