**Hyaluronic acid with grafted poly(L-lysine) chains for intracellular delivery system of genetic constructions**

Polina Teterina

Institute of Chemistry (Saint-Petersburg State University) and Institute of Technical Chemistry (Leibniz University of Hannover)

L-2021a-2\_r, 1 month

Dr. Viktor Korzhikov-Vlakh/Prof. Dr. Thomas Scheper

1. Аннотация

­­Работа посвящена получению графт-сополимера гиалуроновая кислота-*графт*-поли(L-лизин) и изучению способности данного сополимера выступать в качестве системы доставки нуклеиновых кислот, а именно малых интерферирующих РНК и плазмидных ДНК. Химическая часть этого проекта выполнялась в Институте химии Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург, Россия). В ходе этой работы были получены и охарактеризованы привитые сополимеры гиалуроновая кислота-*графт*-поли(L-лизин) (ГК-*г*-пЛиз) (гидродинамический диаметр и ζ-потенциал). Биологическая характеристика новых систем доставки генов была проведена в Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität, Ганновер (Германия). Изучение цитотоксичности in vitro относительно клеточных линий BEAS-2B, A549 показало снижение цитотоксичности разработанного полимерного вектора по сравнению с поли(L-лизином). Интернализация полиплексов в клетки НЕК 293 была продемонстрирована с помощью флуоресцентной микроскопии. Наконец, была продемонстрирована возможность использования полученных частиц для трансфекции малой интерферирующей РНК, а также модельной плазмидной ДНК.

1. Введение

Разработка новых эффективных систем доставки нуклеиновых кислот необходима для обеспечения эффективного функционирования данного класса новых лекарственных препаратов. Серьезными препятствиями на пути применения невирусных систем доставки в клинической практике являются сложности с высвобождением нуклеиновых кислот из комплексов с полимерами внутри клеток, а также токсичность систем доставки на основе поликатионов. Для эффективной трансфекции необходимо балансировать между внеклеточной защитой нуклеиновых кислот (НК), эффективным проникновением внутрь клеток и эффективным внутриклеточным высвобождением НК. Ранее в Лаборатории биомедицинской химии был разработан подход, основанный на формировании интерполиэлектролитных комплексов НК с такими поликатионами как хитозан и поли(L-лизин) в присутствии конкурирующего с НК полианиона - гепарина, способствующего более легкому высвобождению НК. Добавление гепарина снижало токсичность систем доставки, но при этом эффективность трансфекции была на достаточно высоком уровне. (Korzhikov-Vlakh, Katernuk, Pilipenko, & Lavrentieva, 2020; Pilipenko et al., 2019)

При этом, неизученным остаётся объединение поликатиона и конкурирующего полианиона внутри одной макромолекулы в виде привитого сополимера. В данной работе предпринята попытка объединения поликатиона и полианиона в единую молекулу, что перспективно с точки зрения увеличения эффективности высвобождения доставляемых нуклеиновых кислот в цитоплазму, а также с точки зрения снижения токсичности систем доставки. Для синтеза целевого сополимера была выбрана стратегия «графтирования на», с использованием стратегии азид-алкинового циклоприсоединения промотируемого напряжением цикла.

В течение периода финансирования были оценены биологические свойства полученных привитых сополимеров, такие как цитотоксичность, способность к интернализации в клетки и способность к трансфекции. Реализация данного проекта позволила выявить основные преимущества и недостатки разработанных сополимеров и понять дальнейшие этапы работы.

Korzhikov-Vlakh, V., Katernuk, I., Pilipenko, I., Lavrentieva, A., Guryanov, I., Sharoyko, V., … Tennikova, T. B. (2020). Photosensitive Poly-l-lysine/Heparin Interpolyelectrolyte Complexes for Delivery of Genetic Drugs. *Polymers*, *12*(5), 1077. https://doi.org/10.3390/polym12051077

Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., … Tennikova, T. (2019). pH-sensitive chitosan–heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells. *Pharmaceutics*, *11*(7). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070317

1. Методы клеточных экспериментов
   1. *Исследование цитотоксичности полимеров*

Для оценки токсичности полученных частиц использовали эпителиальные клетки легких человека (BEAS-2B), клетки аденокарциномы человека (A549). Изучали цитотоксичость графт-сополимера ГК-*графт*-пЛиз как в свободной форме, так и в составе полиплексов с олигонуклеотидом dT18 посредством флуориметрического метода с использованием реагента CellTiterBlue (CTB). Данный подход основан на способности живых клеток восстанавливать резазурин в флуоресцирующий резоруфин. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах, при этом не использовали лунки по краю планшета. В каждую доступную лунку высевали по 8000 клеток в 100 мкл культуральной среды для исследования цитотоксичности в течение 24 часов. Через 24 часа инкубирования с питательной средой клетки прикреплялись ко дну планшета. После чего среду удаляли и добавляли к клеткам раствор наночастиц в питательной среде в концентрациях 100, 50, 25, 12.5, 6.25 мкг/мл. Делали по 3 повтора на каждую точку. После инкубирования клеток с наночастицами в течение 24 часов, отбирали жидкую среду и добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора CTB в базальной среде (соотношение базальная среда к CTB 10:1). Затем инкубировали клетки при 37 °С на протяжении 1 часа. Жизнеспособность клеток оценивали измеряя флуоресценцию CTB (λвозбуждения= 544 нм, λэмиссии= 590 нм). В качестве контроля использовали клетки, инкубированные без исследуемых наночастиц. Полученные результаты нормировали по отношению к контролю. Из значений флуоресценции клеток, инкубированных с частицами, а также контрольных растворов, вычитали значения флуоресценции лунок, содержащих только среду с CTB.

* 1. *Изучение проникновения частиц в клетки*

Для получения качественных данных о внутриклеточном проникновении исследуемых частиц использовали флуоресцентную микроскопию. В каждую лунку стеклянной 8-луночной камеры высевали по 20 000 клеток в 300 мкл среды, после чего клеткам дали возможность прикрепиться и расти при культивировании в CO2 инкубаторе. Через 24 часа среду удалили и добавили суспензию предварительно сформированных полиплексов графт-сополимера ГК-*графт*-пЛиз с олигонуклеотидом 6-Fam-dT18 при N/P = 10 в 200 мкл культуральной среды (концентрация 25 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 4 часов, затем среду удаляли и промывали дважды 0.01 М ФБС (pH 7,4), нагретым до температуры 37°С. Затем клетки фиксировали 4% раствором PFA (200 мкл на лунку) при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего жидкость над клетками была удалена.

Для изучения локализации ядер клетки окрашивали красителем DAPI (1 мкг/мл DAPI в буферном растворе Макильвейна,pH 6.8), обладающим селективностью к двуцепочечной ДНК. Клетки окрашивали (200 мкл раствора красителя на лунку) на протяжении 10 минут. Фотографии были получены с использованием планшетного ридера Cytation 5 при увеличении в 20 раз.

* 1. *Изучение нокдауна экспрессии GFP-белка миРНК, инкапсулированной в частицы*

Клетки фибробластов мышей NIH 3T3, продуцирующие зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein – GFP), были использованы для тестирования эффективности нокдауна GFP-белка молекулами миРНК. Для этого на лунку 96-луночного планшета высевали по 5000 клеток в 100 мкл среды и оставляли культивироваться. Через 24 часа среда была удалена и в каждую лунку добавили 200 мкл суспензии полиплексов в культуральной среде, содержащих 6 пмоль миРНК и соответствующее количество полимера из рассчитанного значения N/P.

Через 72 часа после трансфекции методом проточной цитометрии была оценена интенсивность флуоресценции клеток.

* 1. *Изучение трансфекции клеток плазмидной ДНК, инкапсулированнной в частицы*

Клетки почек эмбриона человека (HEK 293) были использованы для изучения трансфекции молекулами плазмидной ДНК. Для этого на лунку 24-луночного планшета высевали по 40000 клеток в 500 мкл среды и оставляли культивироваться. Через 24 часа среда была удалена и в каждую лунку добавили 500 мкл суспензии полиплексов в культуральной среде, содержащих 300 нг плазмиды и соответствующее количество полимера из рассчитанного значения N/P.

Через 72 часа после трансфекции методом проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии была оценена интенсивность флуоресценции клеток.

1. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ
   1. *Изучение цитотоксичности*

Для оценки цитотоксичности графт-сополимеров ГК-*г*-пЛиз, были использованы эпителиальные клетки легких человека (BEAS-2B) и клетки аденокарциномы человека (A549). Время инкубирования составило 24 ч. Количество жизнеспособных клеток определяли при помощи CellTiter-Blue теста, в основе которого лежит способность живых метаболически активных клеток переводить резазурин в резоруфин. Количество жизнеспособных клеток измеряли по флуоресценции CTB красителя (λвозбуждения= 544 нм, λэмиссии= 590 нм). Измеренную флуоресценцию в контрольных лунках, где к клеткам не были добавлены исследуемые частицы, приравнивали к 100% и определяли процент выживших клеток по формуле:

Данные о выживаемости клеток, полученные с помощью CTB-метода, выражались в координатах концентрация частиц, мг/мл-выживаемость, %. Цитотоксичность была изучена для свободных полимеров (**Рис. 1**). Для сравнения исследовали цитотоксичность пЛиз.

 

**Рисунок 1.** Выживаемость клеток, инкубированных с ГК-*г*-пЛиз.

Из представленных данных видно, что пЛиз обладает значительным токсическим действием по отношению к клеткам, что хорошо согласуется с литературными данными. В то же время, полученные графт-сополимеры эффективно снижают цитотокический эффект, что расширяет диапазон доступных для использования концентраций.

* 1. *Изучение проникновения частиц в клетки*

С целью визуализации внутриклеточного проникновениячастиц в клетки были сформированы полиплексы графт-сополимеров с флуоресцентно меченым модельным олигонуклеотидом Fam-dT18.

При проведении оценки поглощения меченых полиплексов после инкубации с клетками методом флуоресцентной микроскопии наблюдали присутствие наночастиц во внутриклеточном пространстве, что выражалось в появлении флуоресценции, обусловленной меченным олигонуклетидом, внутри цитоплазмы клеток (**Рис. 2**). При этом наибольшую интенсивность показывал графт-сополимер ГК-г-пЛиз с 14% степенью привки.



**Б**

**А**

**Рисунок 2.** Фотографии клеток HEK 293, инкубированных с флуоресцентно мечеными полиплексами **13b**: синяя флуоресценция, соответствующая ядрам клеток, окрашенных красителем DAPI (А), зеленая флуоресценция, соответствующая распределению меченых полиплексов в клетках (счастиц=25 мкг/мл) (Б).

* 1. *Изучение нокдауна GFP-белка миРНК, инкапсулированной в полиплексы*

Для тестирования эффективности нокдауна использовали клетки фибробластов мышей (NIH-3T3), экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein; GFP). Сами по себе клетки флуоресцируют из-за наличия в их геноме встроенного гена, ответственного за синтез GFP белка, однако введение в них молекул миРНК, способных к интерференции с этим геном должно вызывать деградацию матричной РНК, что приводит к замедлению синтеза GFP на некоторое время.

В данной работе методом проточной цитометрии была исследована эффективность нокдауна экспрессии GFP за 3 дня с использованием полученных графт-сополимеров ГК-*г*-пЛиз в качестве системы доставки миРНК.

Для количественной оценки нокдауна был выбран сополимер ГК-*г*-пЛиз со степенью прививки 14% как лучше проникающий в клетки по данным флуоресцентной микроскопии. При этом использовались различные значения N/P (**Рис. 3**).



**Рисунок 3.** Снижение интенсивности флуоресценции клеток в результате трансфекции миРНК.

Из представленных данных видно, что значение N/P заметно влияниет на эффективность нокдауна, при увеличении N/P растет эффективность трансфекции, что хорошо согласуется с общепринятыми представлениями. Более того, при значении N/P = 25 вообще не наблюдалось уменьшения сигнала флуоресценции, что говорит о наличии порогового значения. Значение N/P = 45 привело к заметному снижению интенсивности флуоресценции GFP-клеток в 3 раза.

Таким образом, было установлено, что полученные графт-сополимеры комплексованные с молекулами миРНК способны к нокдауну генов *in vitro*.

* 1. *Изучение трансфекции клеток плазмидой в составе полиплексов*

На последнем этапе работы была исследована способность полученных графт-сополимеров к доставке полинуклеотидов в живые клетки на примере плазмидной ДНК, несущей ген GFP. Трансфекция проводилась в клетки почек эмбриона человека (HEK 293).

Оценивали эффективность трансфекции плазмиды как визуально с использованием флуоресцентного микроскопа (**Рис. 4**), так и методом проточной цитометрии (**Табл. 1)**, количественно оценивая, размер популяции флуоресцирующих клеток, увеличивающийся после трансфекции.

A picture containing nature

Description automatically generatedA picture containing night sky

Description automatically generatedA picture containing nature

Description automatically generated

**В**

**Б**

**А**

**Рисунок 4.** Фотографии клеток HEK 293, инкубированных с полиплексами, несущими плазмиду, кодирующую GFP: светлое поле (А), зеленая флуоресценция, соответствующая клеткам, начавшим экспрессировать GFP белок (Б), наложение двух изображений (В).

Для количественной оценки нокдауна был выбран сополимер ГК-*г*-пЛиз со степенью прививки 14% как лучше проникающий в клетки по данным флуоресцентной микроскопии. При этом использовались различные значения N/P.

Из полученных микрофотографий видно, что через 3 суток после трансфекции наблюдается появление флуоресценции GFP-белка, что означает, что плазмида успешно достигла ядра.

Данные, полученные с использованием метода проточной цитометрии, показали, что эффективность трансфекции, определяемая как процент флуоресцирующий клеток от всей популяции растет с увеличением значения N/P, что соотносится с предыдущим экспериментом по нокдауну генов.

**Таблица 1.** Эффективность трансфекции клеток HEK 293 плазмидной ДНК, несущий ген GFP в составе полиплекса с ГК-г-пЛиз.

|  |  |
| --- | --- |
|  | Процент флуоресцирующих клеток |
| Контроль | 0 % |
| N/P = 5 | 0.80 ± 0.14 % |
| N/P = 10 | 11.7 ± 3.1 % |

# 

1. ****РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ****

* Продемонстрировано снижение цитотоксичности разработанного полимерного вектора по сравнению с поли(L-лизин)ом;
* Качественно показана способность проникновения полученной системы в клетки
* Продемонстрирована возможность использования полученных частиц для трансфекции малой интерферирующей РНК, блокирующей синтез зелёного флуоресцентного белка, а также модельной плазмидной ДНК, содержащей ген зелёного флуоресцентного белка