УДК: 579.842.11:577.112.7:578.865.1 DOI: 10.15372/SSMJ20180605

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО АПОЛИПОПРОТЕИНА A-I В КАЧЕСТВЕ ТРАНСПОРТЕРОВ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

**Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Мария Владимировна КОТОВА, Роман Александрович КНЯЗЕВ, Наталия Викторовна ТРИФОНОВА, Лев Михайлович ПОЛЯКОВ**

*НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины*
*630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

В связи с широким развитием явления РНК-интерференции перед исследователями стоит задача получения эффективных переносчиков малых интерферирующих РНК (миРНК). Ранее нами получен модифицированный рекомбинантный полипептид на основе аполипопротеина A-I человека (апо A-I), способный связываться с плазмидными ДНК. **Цель исследования** – изучение способности модифицированных рекомбинантных белков апо A-I переносить миРНК в опухолевые клетки. **Материал и методы**. Исследования проводились на модели трансформированных макрофагов мышей линии RAW 264.7, стабильно экспрессирующих ген зеленого флуоресцирующего белка GFP (клеточная линия клона 8A3). В качестве переносчиков миРНК использовали рекомбинантный про-апо A-I и модифицированный аналог про-апо A-I, несущий на C-конце 10 аминокислотных остатков лизина (апоAK10). Для трансфекции использовали липофектамин 2000 (lipofectamine 2000). Белки получали из соответствующих штаммов-продуцентов *E. coli*. Объектом переноса служил дуплекс миРНК, в котором один нуклеотид был комплементарен матричной РНК гена *gfp*. Измерение флуоресценции клеток проводили с помощью флуоресцентного планшетного анализатора. **Результаты и их обсуждение**. Обнаружено, что белки про-апо A и апо AK10, меченные флуоресцеина изотиоцианатом, проникают в клетки линии RAW 264.7. Результаты исследования РНК-интерференции показали, что инкубация клеток с миРНК и липофектамином 2000 вызывает снижение флуоресценции клеток линии 8A3, что свидетельствует о корректном подборе миРНК к матричной РНК гена *gfp*. В то же время флуоресценция клеток клона 8A3 при культивировании с миРНК и рекомбинантными формами про-апо A-I и апо AK10 не отличалась от флуоресценции контрольных клеток, инкубированных только с миРНК. **Заключение.** Рекомбинантные модифицированные формы про-апо A-I и апо AK10 проникают в трансформированные мышиные макрофаги линии RAW264.7, однако не способствуют явлению РНК-интерференции в этих клетках.

**Ключевые слова:** аполипопротеин A-I, рекомбинантные формы про-апо A-I и апо AK10, РНК-интерференция, миРНК, макрофаги линии RAW264.7.

В настоящее время явление РНК-интерференции представляется очень перспективным инструментом для генотерапии, поэтому поиск эффективных переносчиков малых интерферирующих РНК (миРНК) становится актуальной задачей. В литературе показано, что аполипопротеины могут являться переносчиками генетического материала, в частности, белковый компонент липопротеинов высокой плотности – аполипопротеин A-I (апо A-I) [8, 13]. Единичные работы, касающиеся данной проблемы, демонстрируют участие апо A-I в составе полисом в переносе олигонуклеотидов через гематоэнцефалический барьер [10]. Показана способность рекомбинантных липопротеинов высокой плотности транспортировать малые интерферирующие РНК против вируса гепатита C в гепатоциты через SR-B1-рецепторный путь [9]. Рецепторы к апо A-I находятся во многих тканях [8], что очень важно для рецепторно-опосредованного захвата клетками комплексов «апо A-I-миРНК». Липидный компонент аполипопротеинов может обеспечивать формирование контейнерной структуры, аналогичной липосомам, которая должна защи-

***Рябченко А.В.*** *– к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail borrelia@mail.ru*
***Котова М.В.*** *– младший научный сотрудник, e-mail zerokiri@mail.ru*
***Князев Р.А.*** *– к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail Knjazev_roman@mail.ru*
***Трифонова Н.В.*** *– младший научный сотрудник, e-mail nataliya-tverdohleb@yandex.ru*
***Поляков Л.М.*** *– д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail plm@niibch.ru*

щать экзогенную миРНК от разрушения в моделях *in vivo*. Нам кажется, что наиболее вероятным способом доставки таких комплексов («апо А-I-миРНК») к опухолевым клеткам является их прямое введение в кровоток живого организма.

Другим перспективным направлением получения переносчиков миРНК является конструирование полипептидов, несущих различные функциональные модули [5, 6]. Ранее мы пытались увеличить аффинность рекомбинантного апо А-I к ДНК путем добавления в структуру гена с 3′-конца фрагмента ДНК, кодирующего 10 аминокислотных остатков (а.о.) лизина [3]. Модифицированный апо А-I получил название апо АК10 и был способен, в отличие от нативного белка, задерживать ДНК размером 1000–5000 пар нуклеотидов (п.н.) в агарозном геле. Кроме того, на примере эндонуклеазы рестрикции Hinf I было показано, что белок в определенной степени способен защищать плазмидную ДНК от гидролиза. Ранее мы изучили возможность использования нативного и рекомбинантного апо А-I нативной формы для доставки миРНК в опухолевые клетки макрофагов лини RAW 264.7, стабильно экспрессирующие ген зеленого флуоресцирующего белка GFP (клеточная линия клона 8А3). Однако снижения флуоресценции в этих клетках обнаружено не было, что, возможно, обусловлено отсутствием специфического взаимодействия белка с миРНК. Получение модифицированного апо АК10, связывающего ДНК и обладающего большим аффинитетом, чем апо А-I нативной формы, позволяет по-новому изучить вопрос использования апо АК10 для доставки миРНК в опухолевые клетки. В связи с этим целью нашего исследования являлось изучение способности модифицированных рекомбинантных белков апо А-I (про-апо А-I и апо АК10) переносить миРНК в опухолевые клетки на модели мышиных макрофагов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Рекомбинантный апо А-I нативной формы и модифицированный апо АК10 получали из соответствующих штаммов-продуцентов *Escherichia coli*, сконструированных ранее в нашей лаборатории [3]. Для наработки биомассы использовали клетки *E. coli* штамм BL21(DE3). Из музейного клона продуцента выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37 °С и на следующий день переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37 °С до оптической плотности $D_{600}$ = 0,8–1,2 о.е., добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до 0,05 мМ, инкубировали 18 ч при 30 °С, после чего осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, осадок замораживали и хранили до выделения белка. Клетки разрушали ультразвуком в буфере с мочевиной (100 мМ дигидрофосфата натрия, 10 мМ трис(гидроксиметил) аминометана, 6 М мочевины, 20 мМ имидазола, pH 8,0). Клеточный дебрис осаждали 20 мин при 15000 об/мин (~27000 g), а супернатант (лизат) использовали для выделения белков аффинной хроматографией на сорбенте «Ni-NTA Superflow» («Qiagen», США). Хроматографию проводили в аналогичном буфере, целевую фракцию белка элюировали буфером с добавлением имидазола до 250 мМ. Белки обессоливали методом диализа против стандартного фосфатно-солевого буфера pH 7,4–7,5 (ФСБ) и стерилизовали фильтрованием через поливинилиденфторидный фильтр с размером пор 0,22 мкм «Syringe-DivenFilters» («JetBiofilm», Корея). Качественный анализ белков проводили в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли.

Конъюгаты белков с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) получали путем инкубации белков с ФИТЦ в течение ночи в карбонатном буфере pH 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Конъюгат от избытка метки отделяли с помощью гель-фильтрации. Образование конъюгата подтверждали спектрофлуориметрически на наличие характерных для ФИТЦ пиков возбуждения (490 нм) и эмиссии (520 нм), а также в ПААГ. Концентрацию белков при λ = 280 нм измеряли на спектрофотометре «Evolution 300» («ThermoFisher Scientific», США), флуориметрические измерения конъюгата «апо А – ФИТЦ» выполняли на спектрофлуорофотометре «RF-5301PC» («Shimadzu», Япония).

В качестве клеточной модели использовали трансформированные мышиные макрофаги линии RAW 264.7 и ее производный моноклон 8А3, стабильно экспрессирующий ген *gfp* (Евроген, Россия). Клетки выращивали в среде RPMI-1640 с глутамином (Биолот, Россия), pH 7,4, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, в $CO_2$-инкубаторе («Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5 % $CO_2$ и 95 % воздуха, при температуре 37 °С, используя 24-луночные планшеты («Orange Scientific», США). Клетки для пересева снимали с планшетов 0,25%-м раствором трипсина, жизнеспособность оценивали методом исключения трипанового синего, концентрацию рассчитывали в камере Горяева. Музейные образцы клеток хранили в жидком азоте

в среде RPMI-1640 с добавлением 40 % эмбриональной сыворотки коров и 10 % диметилсульфоксида.

Клетки инкубировали с комплексом «белок-ФИТЦ» в течение 18 ч, его концентрация составляла 5, 10 и 20 мкг/мл. Для визуального анализа флуоресценции использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп «Axiovert 40 CFL» («Zeiss», Германия). Со смесью белков и миРНК клетки инкубировали в течение ~6 ч, меняли среду на свежую, инкубировали еще двое суток, дважды отмывали от среды ФСБ и исследовали на многофункциональном планшетном анализаторе «Varioskan Flash» («ThermoFisher Scientific» США), длинна волны возбуждения составляла 480 нм, испускания – 510 нм. Затем клетки снимали с планшета и рассчитывали их концентрацию. Исследование каждого образца повторяли не менее трех раз.

В работе использовали комплементарную пару олигорибонуклеотидов (по 22 нуклеотида каждый), содержащие на 3′-концах по два дезокситимидиновых остатка: 5′-CAAGCUGGAGAUCAAGUUCTT-3′ и 3′-TTGU UCGACCUCUAGUUCAAG-5′. Данные нуклеотиды были синтезированы *de novo* на заказ (ЗАО «Биосан», г. Новосибирск), из них образовывали дуплекс путем эквивалентного смешения каждого олигорибонуклеотида с концентрацией 40 пмоль/мкл. В раствор дополнительно добавляли диэтилпирокарбонат до конечной концентрации 1 мкМ. Смесь инкубировали при 45–50 °С в течение 20 мин, охлаждали в ледяной бане, разливали в пробирки на мелкие порции и хранили при –70 °С. При работе с олигорибонуклеотидами использовали автоклавированную воду, предварительно очищенную с помощью системы «Merck Millipore» («Merck KGaA», Германия), а также наконечники для дозаторов и пробирки с маркировкой об отсутствии РНКаз («Axygen», США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ($M$), ошибку среднего арифметического значения ($m$), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0{,}05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные белки про-апо A-I (далее по тексту апо A) и апо AK10 получали из соответствующих клеток-продуцентов *E. coli*, сконструированных нами ранее [3]. Белок про-апо A-I на N-конце содержал 6 а.о., характерных для проформы белка апо A – RHFWQQ, а на C-конце – 8 а.о. гистидина. Белок апо AK10, в дополнение к указанным остаткам, между собственно белком апо A-I и 8 а.о. гистидина содержал фрагмент, несущий 10 а.о. лизина – LDGPA**KKKKK**L**KKKKK**. Схематичная структура белка апо AK10 имела следующий вид: N′–RHFWQQ–структура апоA-I зрелой формы–LDGPAKKKKKLKKKKK–HHHH HHHH–C′. Выход рекомбинантных белков апо A и апо AK10 составил около 25–30 мг/л культуры клеток продуцентов.

За основу модели клеток млекопитающих была выбрана мышиная клеточная макрофагальная линии RAW 264.7. Из литературы известно, что на макрофагах имеются рецепторы к апо A-I. Исходя из этого, мы предположили, что клетки линии RAW 264.7 также будут способны к рецепторно-опосредованному поглощению комплексов «апо AK10-миРНК». Для проверки этого предположения были получены конъюгаты рекомбинантного апо A и апо AK10 с флуоресцирующим красителем ФИТЦ и изучено их проникновение в клетки линии RAW 264.7. Клетки инкубировали с конъюгатами в течение ~18 ч, после чего дважды отмывали ФСБ и анализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе. Светящиеся клетки интерпретировали как поглотившие конъюгат. Типичный пример результатов инкубирования клеток линии RAW 264.7 и конъюгата «апо AK10-ФИТЦ» представлен на рис. 1.

Наибольшее количество светящихся клеток обнаруживалось при максимальной исследуемой концентрации конъюгата 20 мкг/мл и составляло около одной четверти от их общего числа. При этом количество светящихся клеток при исполь-

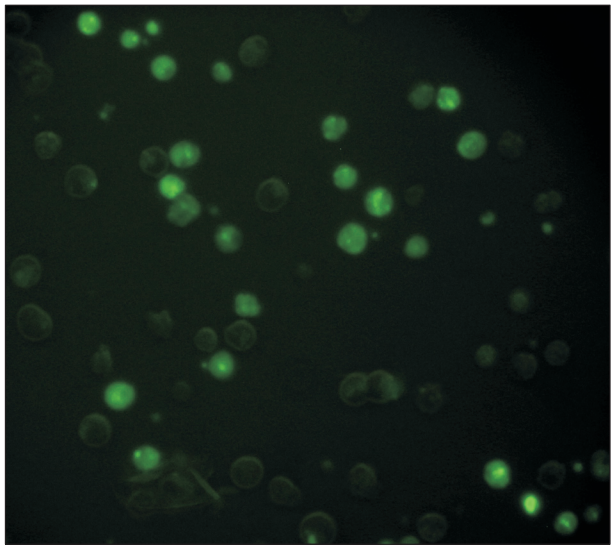

***Рис. 1.*** *Микроскопия клеток RAW 264.7, инкубированных с конъюгатом «апо AK10-ФИТЦ», в флуоресцентном режиме (× 40)*

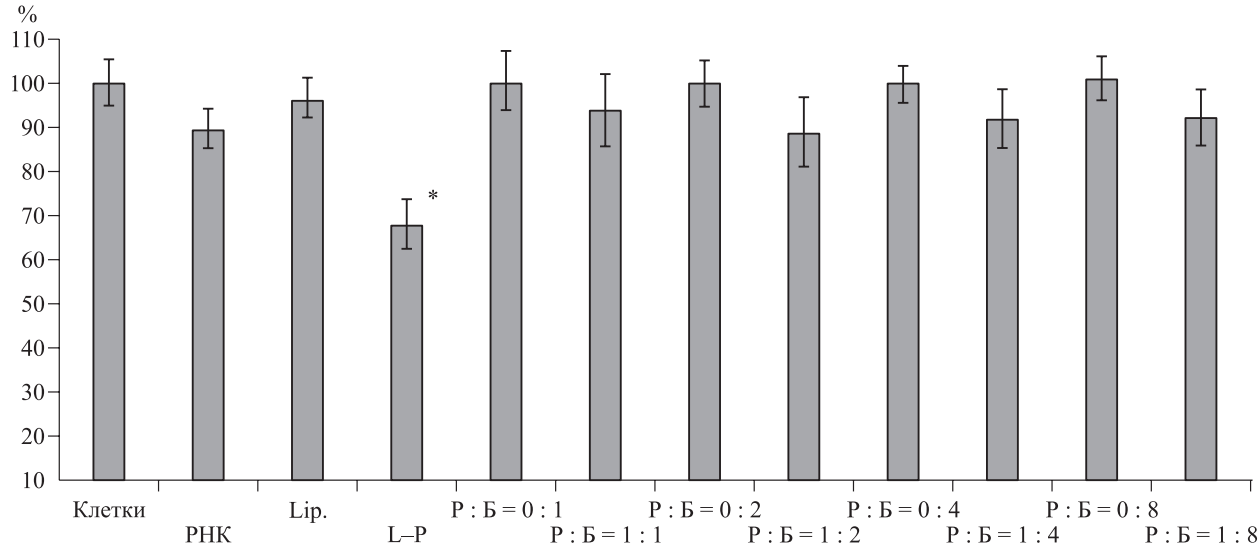


***Рис. 2.*** *Интенсивность флуоресценции клеток 8А3. Клетки – контрольные клетки, интенсивность их флуоресценции принята за 100 %; РНК – клетки, инкубированные с миРНК; Lip. – клетки, инкубированные с липофектамином 2000; L–P – клетки, инкубированные со смесью липофектамина 2000 и миРНК; Р : Б – клетки, инкубированные со смесью миРНК и апо АК10 при различных молярных соотношениях, от 1 : 1 до 1 : 8 (столбцы 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8) либо в отсутствие миРНК (столбцы 0 : 1, 0 : 2, 0 : 4, 0 : 8); * – отличие от интенсивности флуоресценции контрольных клеток и клеток, инкубированных с миРНК, статистически значимо при $p < 0,05$*

зовании конъюгатов из рекомбинантного апо А и модифицированного белка апо АК10 было примерно одинаковым. Полученные результаты с конъюгатами позволили предполагать, что клетки будут способны также поглощать и немеченный белок апо АК10 и будут пригодны в качестве модели для изучения апо АК10 в качестве переносчика миРНК.

На основе клеток RAW 264.7 фирмой «Евроген» с помощью лентивирусного вектора pCD-TagGFP2-Puro получена моноклональная клеточная линия 8А3, стабильно экспрессирующая ген *gfp* [4] и использованная нами для изучения РНК-интерференции. В качестве олигонуклеотидов миРНК применялась пара олигонуклеотидов, описанная в работе [4]. Олигонуклеотиды были синтезированы *de novo*, из них образовывался дуплекс путем эквивалентного смешения, как описано в разделе «Материал и методы», который использовался в экспериментах по подавлению флуоресценции клеток с помощью рекомбинантного апо А, апо АК10 и липофектамина 2000. Дуплекс инкубировали с белками при комнатной температуре в течение 20 минут и затем добавляли к клеткам моноклона 8А3. миРНК вносили в количестве 20 пмоль на лунку, поскольку в серии предварительных экспериментов установили, что оно является оптимальным при трансфекции липофектамином 2000. Молярные соотношения миРНК/белок были следующими: 1 : 1 (20 пмоль/0,665 мкг), 1 : 2 (20 пмоль/1,33 мкг), 1 : 4 (20 пмоль/2,66 мкг) и 1 : 8 (20 пмоль/5,32 мкг). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные с миРНК (20 пмоль), и клетки, инкубированные только с белком в аналогичных количествах, в качестве положительного контроля – клетки, инкубированные со смесью миРНК и липофектамина 2000 (20 пмоль/2 мкл). Инкубирование длилось ~6 ч, после чего среду меняли на свежую, не содержащую трансфицирующих реагентов, и через ~40 ч после клетки промывали дважды буфером ФСБ, определяли их флуоресценцию, после чего снимали клетки с планшетов и измеряли их концентрацию. Флуоресценцию контрольных клеток принимали за 100 %, данные образцов были пересчитаны на флуоресценцию 200 000 клеток.

На диаграмме с результатами анализа (рис. 2) представлены только те клетки, на которых исследовалось их инкубирование с апо АК10. Статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции клеток, которое наблюдалось только в образцах, инкубированных со смесью миРНК и липофектамина 2000, составило 62,3 ± 5,4 % от уровня флуоресценции контрольных клеток. Выраженность уменьшения интенсивности флуоресценции GFP соответствовала литературным данным, согласно которым при использовании данной пары олигонуклеотидов на клетках различного типа уровень флуоресценции снижался до 50–90 % [13]. Это подтверждает корректность подобранной нами пары олигорибо-

нуклеотидов для изучения РНК-интерференции на клетках RAW 264.7 линии 8А3. В клетках, инкубированных со смесью миРНК и рекомбинантных апо А и апо АК10, даже в соотношениях с максимальным количеством белка (миРНК/белок = 20 пмоль/5,32 мкг) интенсивность флуоресценции была такой же, как в контрольных клетках и инкубированных только с миРНК. Эти результаты говорят о том, что на данной модели апо АК10 не способствовал РНК-интерференции.

Полученные результаты можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, несмотря на то, что апо АК10 способен взаимодействовать с фрагментами ДНК размером 5000–1000 п.н., нет полной уверенности, что белок специфически связывался с дуплексом малой РНК размером 22 п.н. и, соответственно, образовывал стабильные комплексы. Во-вторых, при проникновении комплекса «белок – нуклеиновая кислота» в клетку он в первую очередь оказывается в эндосомах, внутренняя среда которых постепенно закисляется [2, 6], что приводит к деградации нуклеиновой кислоты. Поэтому, если белок не обладает каким-либо защитным средством, как правило, это может быть фьюзогенный мотив, способствующий высвобождению комплексов из эндосом, нуклеиновая кислота в составе комплекса неспецифически гидролизуется и далее не способна выполнять свои функции. В используемых нами переносчиках – рекомбинантном апо А и апо АК10 – такие фьюзогенные мотивы отсутствуют, что могло быть одной из причин отрицательных результатов РНК-интерференции. В-третьих, хотя нами и продемонстрировано, что апо АК10 способен защищать плазмидную ДНК от гидролиза эндонуклеазами рестрикции на примере Hinf I [1], белок мог недостаточно защищать дуплекс РНК от нуклеаз, присутствующих в культуральной среде за счет добавления эмбриональной сыворотки коров. Это также могло приводить к гидролизу дуплекса РНК, а соответственно, и к отсутствию эффекта снижения флуоресценции в опытных клетках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как рекомбинантный белок про-апо А-I человека, так и его модифицированная форма апо АК10 проникают в трансформированные мышиные макрофаги линии RAW 264.7, однако в комплексе с миРНК они не способствуют снижению флуоресценции клеток. Вероятной причиной этого является отсутствие специфического взаимодействия апо А с миРНК, а также недостаточная защищенность миРНК в комплексе с белком от нуклеаз и эндосом клетки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Спектрометрические измерения» (НИИ биохимии ФИЦ ФТМ) и ЦКП «Современные оптические системы» (НИИ экспериментальной и клинической медицины ФИЦ ФТМ).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Котова М.В., Рябченко А.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М.* Получение модифицированного рекомбинантного аполипопротеина А-I для переноса нуклеиновых кислот // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. 2017. (12-2). 317–321.

2. *Розенкранц А.А., Уласов А.В., Сластникова Т.А., Храмцов Ю.В., Соболев А.С.* Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки // Биохимия. 2014. 79. (9). 1148–1168.

3. *Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М.* Изучение рекомбинантного аполипопротеина А-I как переносчика плазмидных ДНК на модели гепатоцитов крыс // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (6). 10–15.

4. *Рябченко А.В., Котова М.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М.* Изучение аполипопротеина А-I как переносчика малых интерферирующих РНК // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. 2017. (12-1). 123–127.

5. *Canine B.F., Hatefi A.* Development of recombinant cationic polymers for gene therapy research // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. 62. (15). 1524–1529.

6. *Canine B.F., Wang Y., Ouyang W., Hatefi A.* Development of targeted recombinant polymers that can deliver siRNA to the cytoplasm and plasmid DNA to the cell nucleus // J. Control. Release. 2011. 151. (1). 95–101.

7. *Danielle L.M., Kasey C.V.* Lipoprotein carriers of microRNAs // Biochim. Biophys. Acta. 2016. 1861. (12). 2069–2074.

8. *Farve G., Tazi K., Le G., Bennis F., Hachem H., Soula G.* High density lipoprotein3 bindings sites are related to DNA biosynthesis in the adenocarcinoma cell line A549 // J. Lipid. Res. 1993. 34. (7). 1093–1106.

9. *Kim S.I., Shin D., Lee H., Ahn B.Y., Yoon Y., Kim M.* Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I bound cationic liposomes // J. Hepatol. 2009. 50. (3). 479–488.

*Kratzer I., Werning K., Panzenboeck U., Bernhart E., Reicher H., Wronski R., Windisch M., Hammer A., Malle E., Zimmer A., Sattler W.* Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier // J. Control. Release. 2007. 117. (3). 301–311.

11. *Lee H., Kim S.I., Shin D., Yoon Y., Choi T.H., Cheon G.J., Kim M*. Hepatic siRNA delivery using recombinant human apolipoprotein A-I in mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. 378. (2). 192–196.

12. *Tabet F., Vickers K.C., Cuesta Torres L.F., Wiese C.B., Shoucri B.M., Lambert G., Catherinet C., Prado-Lourenco L., Levin M.G., Thacker S., Sethupathy P., Barter P.J, Remaley A.T., Rye K.A*. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells // Nat. Commun. 2014. 5. 3292.

13. *Tschuch C., Schulz A., Pscherer A., Werft W., Benner A., Hotz-Wagenblatt A., Barrionuevo L.S., Lichter P., Mertens D*. Off-target effects of siRNA specific for GFP // BMC Mol. Biol. 2008. 9. 60.

# STUDY OF MODIFIED RECOMBINANT APOLIPOPROTEIN A-I AS A CARRIER OF SMALL INTERFERRING RNA

**Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Mariya Vladimirovna KOTOVA, Roman Aleksandrovich KNYAZEV, Nataliya Viktorovna TRIFONOVA, Lev Mikhaylovich POLYAKOV**

*Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine 630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

With the widespread development of the phenomenon of RNA interference, currently, researchers are puzzled to obtain effective carriers of small interfering RNA (siRNA). Previously, we obtained a modified recombinant polypeptide based on human apolipoprotein A-1 (apoA-I), capable of binding to plasmid DNA. The aim of the investigation was to study the possibilities of modified recombinant proteins of apolipoprotein A-I to transfer siRNA into tumor cells. **Material and methods.** The studies were performed on a model of transformed macrophages of mice RAW 264.7 that stably expressed the green fluorescent protein (GFP) gene (line of clone 8A3). Recombinant pro-apo A-I, its modified analog, carrying at the C-terminus of 10 amino acid residues of lysine (apo AK10), and Lipofectamine 2000 transfection reagent were studied as siRNA carriers. Proteins were obtained from the corresponding *E. coli* producer strains. The transfer object was a siRNA duplex, in which one nucleotide was complementary to the matrix RNA of GFP gene. Cell fluorescence was measured on the second day using a fluorescent plate analyzer. **Results and discussion.** The results of the study showed that proteins pro-apoA and apoAK10 labeled with fluorescein isothiocyanate penetrate the RAW 264.7 cells. The results of the study RNA interference showed that the incubation of cells with a mixture of miRNA and Lipofectamine 2000 caused a decrease in the fluorescence of the 8A3 cell lines, which indicates a correct selection of siRNA to the matrix RNA of the gfp gene. However, when 8A3 cells were incubated with a mixture of miRNA and recombinant pro-apo A-I and apo AK10, a decrease in fluorescence relative to the control cells incubated only with miRNA was not observed. **Conclusion**. It was shown that both the recombinant protein pro-apo A-I and the modified apoAK10 penetrate the transformed mouse macrophages of the line RAW264.7, but do not promote RNA interference in these cells.

**Key words:** apolipoprotein A-I, recombinant protein, pro-apo A-I, pro AK10, RNA interference, siRNA, RAW264.7 macrophages.

***Ryabchenko A.V.*** *– candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail borrelia@mail.ru*
***Kotova M.V.*** *– junior researcher, e-mail zerokiri@mail.ru*
***Knyazev R.A.*** *– candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail Knjazev_roman@mail.ru*
***Trifonova N.V.*** *– junior researcher, e-mail nataliya-tverdohleb@yandex.ru*
***Polyakov L.M.*** *– doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory, e-mail plm@niibch.ru*