

УДК 577.21

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК И РНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ В КЛЕТКИ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ *in vitro* И *in vivo*

© 2022 г. А. А. Загоскин^а, М. В. Захарова^а, М. О. Нагорных^{а, б, *}

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

^бНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354349 Россия

*e-mail: derbanner@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2022 г.

После доработки 25.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Возможность редактирования генетической информации, которая появилась относительно недавно благодаря активному внедрению в исследовательскую и биомедицинскую практику программируемых нуклеаз, открыла широкие перспективы применения, в том числе в таких важных областях, как здравоохранение и агробиотехнологии. Одним из наиболее важных вопросов совершенствования технологий редактирования генетической информации, особенно в контексте терапевтического применения, остается вопрос доставки редакторов в клетки и ткани, а также управляемой и безопасной экспрессии этих трансгенов. В настоящий момент существуют системы вирусной и невирусной доставки. В представленном обзоре мы рассмотрим структурные элементы невирусных экспрессионных векторов на основе ДНК и РНК, используемых в геномном редактировании, а также способы доставки этих векторов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: экспрессионный вектор, синтетические мРНК, доставка генов, геномное редактирование, Cas9, ZFN, TALEN, геномная терапия, наночастицы

DOI: 10.31857/S002689842206026X

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент существуют три основных варианта генетических редакторов – это системы, основанные на использовании ZFN, TALEN и CRISPR/Cas. Применение таких систем сопряжено с созданием векторов для экспрессии этих белков. В настоящее время широкое применение получили вирусные и невирусные экспрессионные векторы. К невирусным относятся векторы на основе ДНК, а также синтетических мРНК. В общих чертах структура векторов на основе ДНК, применяемых в редактировании генома, мало чем отличается от векторов экспрессии других терапевтических рекомбинантных белков. В обоих вариантах присутствуют такие структурные элементы, как промоторы, энхансеры, поли(А)-последовательности, селективные маркеры, сайт инициации репликации и т.д. Отличия в структуре касаются специфических элементов, необходимых для функционирования редакторов генома и в каждой системе редактирования имеют свои особенности. Так, в большинстве случаев с последовательностью геномного редактора сливаются сигнал ядерной локализации, а векторы, несущие системы CRISPR-Cas, содержат промото-

ры для РНК-полимераз типа II и III, поскольку кроме белков необходимо получать гидовую (направляющую) РНК.

Молекулы РНК также можно использовать в качестве экспрессионного вектора для синтеза терапевтических белков, в том числе для генетического редактирования клеточной ДНК, причем такой способ доставки имеет ряд существенных преимуществ перед ДНК-векторами. Так, при использовании РНК вероятность интеграции вектора или его частей в геном крайне мала, что практически исключает события мутагенного характера. Вторым существенным преимуществом является то, что РНК в комплексе с липидными наночастицами представляет собой биodeградируемый носитель. Еще один плюс РНК состоит в том, что такому вектору не нужно сначала попасть в ядро клетки – трансляция трансгена происходит сразу после попадания в цитоплазму. Наконец, транзитный характер экспрессии трансгена с РНК также лучше поддается контролю, что позволяет избежать чрезмерной продукции таких трансгенов, как молекулы генных редакторов, и снижает риск неспецифичного редактирования генома клетки. Необходимо отметить и основные

недостатки использования искусственных РНК-носителей. Ограничения прежде всего обусловлены нестабильностью РНК, а также высокой иммуногенностью чужеродной РНК, что связано со сформированными эволюцией механизмами противовирусного иммунитета у эукариот.

Потенциал биомедицинского использования синтетических мРНК был продемонстрирован в 1990 году в эксперименте по экспрессии разных белков в клетках скелетных мышц мышей. Однако проблемы с вне- и внутриклеточной стабильностью, иммуногенностью РНК, а также сложность масштабного производства затормозили распространение использования синтетических мРНК в терапевтических целях. В настоящее время синтез одноцепочечных молекул РНК *in vitro* — это широко распространенная лабораторная процедура, которая активно используется как для изучения РНК, так и для получения терапевтических препаратов на основе РНК. Этот способ применим для биохимического и молекулярного анализа РНК, изучения РНК-белковых взаимодействий, а также для структурного анализа комплексов, создания РНК-аптамеров, синтеза функциональных мРНК для экспрессии и получения малых РНК, влияющих на экспрессию генов (например, направляющих РНК для генных редакторов). Кроме того, синтезированные *in vitro* РНК сыграли важную роль в разработке РНК-вакцин и инструментов редактирования генома CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, а также в создании плюрипотентных стволовых клеток и методов диагностики, основанных на амплификации РНК.

В данном обзоре мы рассмотрим основные структурные элементы экспрессионных векторов на основе ДНК и РНК, в том числе, используемых в редактировании генов, а также способы их доставки *in vitro* и *in vivo*.

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ

Промоторы

Промотор — это нуклеотидная последовательность, с которой специфически связывается комплекс РНК-полимеразы, что приводит к инициации транскрипции нуклеотидной последовательности, расположенной ниже промотора. В клетках млекопитающих присутствуют несколько типов РНК-полимераз, каждая из которых взаимодействует со специфическими промоторами. Чаще всего исследователей интересуют промоторы, которые способны взаимодействовать с РНК-полимеразой II, поскольку именно эта полимераза ответственна за синтез мРНК, с которых синтезируются полипептиды [1]. Функционирование любого

промотора осуществляется за счет взаимодействия белков, входящих в состав РНК-полимеразы, с определенными нуклеотидными мотивами в составе промотора. В структуре промоторов млекопитающих, взаимодействующих с РНК-полимеразой II, выделяют около 10 различных мотивов, из которых наиболее известны инициатор и TATA-бокс, но помимо них есть еще MTE, BREu, BREd, XCPE1 и другие [2]. Большинство мотивов имеют фиксированное положение на промоторе относительно точки старта транскрипции, однако, например, CpG-островки могут располагаться в различных позициях. В строении промоторов важно как положение мотивов, так и их состав. На основе этих двух параметров промоторы делят на два типа: рассеянные и сфокусированные. К рассеянному типу чаще всего относятся промоторы, обеспечивающие экспрессию генов домашнего хозяйства. В них часто отсутствуют инициатор и TATA-бокс, но содержится большое количество CpG-островков. Эти промоторы обеспечивают стабильную умеренную экспрессию контролируемого гена. В качестве примера можно рассмотреть промотор гена фосфоглицераткиназы человека (hPGK). Этот промотор содержит большое количество CpG-островков, однако в нем отсутствуют TATA-бокс и последовательность инициатора. В промоторах сфокусированного типа, напротив, чаще всего мало CpG-островков, но присутствуют мотивы, обеспечивающие сильное взаимодействие с комплексами РНК-полимеразы. Это, к примеру, инициатор и TATA-бокс [3]. В клетке такие промоторы обычно обеспечивают экспрессию на высоком уровне в короткие сроки. Промоторы этого типа часто встречаются в геномах вирусов. К промоторам сфокусированного типа относятся промотор вируса SV40 или промотор гена *EFla* человека. Поскольку при создании векторов исследователи хотят добиться высокого уровня экспрессии рекомбинантных белков, они используют промоторы именно сфокусированного типа. На практике оказывается, что многие такие промоторы имеют вирусную природу, к примеру, промотор SV40 или цитомегаловируса (CMV). Иногда возникает потребность в РНК-продукте, структура которого отличается от структуры мРНК. В частности, это необходимо для получения направляющей РНК для системы редактирования генома CRISPR/Cas. С этой целью используют промотор, который взаимодействует с РНК-полимеразой III, например, промотор U6 [4]. Помимо промоторов, обеспечивающих стабильную экспрессию, существуют и индуцируемые промоторы. Промоторы этого типа могут относиться как к рассеянному, так и к сфокусированному, однако в состав такого промотора входит регуляторный элемент, через который и осуществляется контроль экспрессии [5]. В качестве примера можно привести такую индуци-

бельную систему, как Tet-On или термоиндуцибельный промотор Hsp70. Такие промоторы бывают выгодными при цитотоксичности синтезируемого белка, или когда необходимо дать клеточной культуре время для роста, прежде чем экспрессировать целевой ген. Промоторы еще одного типа, имеющие много общего с индуцибельными промоторами, это тканеспецифичные промоторы, которые могут относиться как к рассеянному, так и к сфокусированному типу, но содержат мотив или мотивы, с которыми специфически взаимодействует какой-либо белок. В большинстве случаев таким белком является тканеспецифичный фактор транскрипции. Из-за того, что экспрессия гена под контролем таких промоторов будет происходить строго в определенном типе ткани, их применяют при генетическом редактировании *in vivo* [6]. В качестве примера можно привести промотор SLPI, активный в некоторых видах карцином и на низком уровне обеспечивающий экспрессию гена ингибитора секретируемой лейкопротеазы в печени. Промоторы бывают различной “силы”, т.е. определяют разный уровень экспрессии гена. Они могут обеспечивать как стабильную экспрессию генов, так и экспрессию в определенном типе тканей под действием некоего индуктора, имеют разный размер, который может колебаться от сотен до тысяч нуклеотидов – все эти параметры нужно подбирать, исходя из потребностей эксперимента.

Энхансеры

Энхансеры увеличивают уровень экспрессии гена за счет повышения локальной концентрации транскрипционных факторов. Как и промоторы, энхансеры осуществляют свою функцию, используя множество мотивов, которые привлекают транскрипционные факторы. [7]. В геноме энхансеры чаще всего находятся далеко от контролируемого промотора, вплоть до того, что промотор и энхансер могут располагаться на разных хромосомах [8]. При этом за счет архитектуры ДНК энхансеры находятся около подконтрольного промотора, что является обязательным условием работы энхансера. Однако в векторах энхансеры располагаются перед промотором. Эукариотические энхансеры чаще всего имеют довольно большой размер, поэтому широкое применение нашли вирусные варианты этих элементов, имеющие небольшой размер. Так, широко используется энхансер CMV [9], с которым сливают как вирусные, так и эукариотические промоторы. Большинство векторов, используемых в настоящее время, содержат энхансер, так как это позволяет повысить уровень экспрессии целевого гена.

Нетранслируемые последовательности

Трансляция полипептида начинается с инициаторного кодона (старт-кодона) AUG, но для ее успешной инициации необходимо, чтобы старт-кодон находился в определенном нуклеотидном окружении – в последовательности Козак. Этот мотив довольно консервативен: у высших эукариот он представлен последовательностью GCC(A/G)CCATGG, особенно важными в которой являются нуклеотиды в положении –3 и +4 [10]. Функционирование последовательности Козак осуществляется за счет взаимодействия с 40S субъединицей рибосомы и факторами инициации трансляции. В процессе сканирования мРНК рибосома задерживается на вторичной структуре, образованной последовательностью Козак, что повышает вероятность инициации трансляции [11]. При создании вектора последовательность Козак обязательно встраивают непосредственно перед геном, поскольку без нее эффективность трансляции будет значительно ниже. С 3'-конца мРНК располагается поли(А)-хвост – последовательность, которая значительно повышает стабильность мРНК и эффективность трансляции. Для синтеза поли(А) в составе мРНК в плазмиду должен быть включен сигнал полиаденилирования – консервативная последовательность с мотивом AATAAA, за которым следует GT-богатая область. мРНК без поли(А)-хвоста подвергается быстрой деградации клеточными нуклеазами, что негативно влияет на общую эффективность экспрессии трансгена [12]. Поэтому включение в экспрессионную кассету сигнала полиаденилирования после каждой белоккодирующей последовательности также является обязательным этапом при создании вектора, экспрессирующего рекомбинантный белок.

Селективный маркер

Селективный маркер помогает провести отбор успешно трансформированных клеток. Зачастую в качестве такого элемента используют гены устойчивости к какому-либо антибиотику, это позволяет быстро отобрать трансфицированные клетки по принципу их выживаемости после добавления соответствующего антибиотика в питательную среду. К тому же присутствие гена устойчивости к антибиотику позволяет убедиться, что плазида не будет элиминирована клеткой со временем, поскольку при постоянном давлении антибиотика клетке для выживания необходимо экспрессировать ген устойчивости к антибиотику. В целях экономии места селективный маркер можно экспрессировать в одной рамке считывания вместе с трансгеном, используя 2А пептид или IRES-элемент [13]. Однако стоит учитывать, что уровень экспрессии под контролем IRES-элемента значительно ниже чем под контролем про-

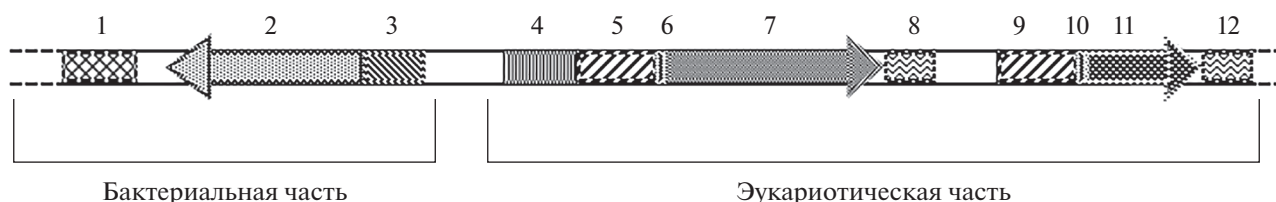


Рис. 1. Структура базового вектора для эукариотической экспрессии терапевтических белков. 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 9 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 10 – последовательность Козак; 7 – ген целевого белка; 8, 12 – сигнал полиаденилирования; 11 – эукариотический селективный маркер.

мотора. Помимо генов устойчивости, в качестве маркера селекции в эукариотических клетках используют также флуоресцентные белки, такие как GFP. В таком случае трансформанты отбирают с помощью клеточных сортеров. Такой подход уместен, когда необходимо временно экспрессировать трансген, после чего желательно, чтобы плазмида была элиминирована из клетки и в дальнейшем не нагружала клеточный трансляционный аппарат [14]. В частности, такой подход используется при создании плазмид, несущих генные редакторы. Свечение флуоресцентных белков позволяет отобрать трансформанты, а генетические редакторы работают в течение короткого срока, после чего плазмида утилизируется путем деградации. Также в плазмидах присутствует “бактериальная” часть, которая необходима для получения большого количества плазмиды перед трансфекцией эукариотических клеток. В бактериальной части в обязательном порядке присутствует прокариотический селективный маркер, чаще всего это ген устойчивости к ампициллину. Этот ген позволяет культивировать клетки *Escherichia coli* на среде, содержащей ампициллин, и, что важнее, удерживать плазмиду в клетке.

Сигнальный пептид

Зачастую бывает недостаточно просто экспрессировать целевой ген, необходимо обеспечить секрецию белка из клетки или его поступление в компартмент, в котором он должен функционировать. С этой целью используют сигнальные пептиды, кодируемые 5'-концевым участком нуклеотидной последовательности трансгена. В итоге синтезированный белок доставляется в клеточный компартмент, определяемый сигнальным пептидом. Генетические редакторы обычно сливаются с сигналами ядерной локализации, вследствие чего синтезированный редактор доставляется в клеточное ядро, где и проявляет свою активность [15].

Точка начала репликации

Еще один важный компонент бактериальной части вектора – точка начала (ориджин) реплика-

ции. Это область, с которой начинается синтез копий плазмиды в бактериальной клетке. По сути это регуляторный участок, от которого зависит количество копий плазмиды в клетке: бывают низкокопийные и высококопийные ориджины репликации. Поскольку исследователям чаще всего необходимо получить большое количество копий плазмиды, широкое распространение получил высококопийный ориджин репликации ColE1 [16].

Использование экспрессионных векторов на основе ДНК для доставки геномных редакторов

Суммируя все сказанное, карту базового вектора для экспрессии рекомбинантных терапевтических белков можно схематично представить следующим образом. Базовый вектор должен иметь бактериальную часть, которая будет состоять из ориджина репликации для получения большого количества копий плазмиды в *E. coli* и прокариотического селективного маркера устойчивости вектора в клетках *E. coli*. В “эукариотической” части вектора должны находиться слитые энхансер и промотор, под контролем которого будет экспрессироваться некий целевой белок. С 5'-конца последовательности, кодирующей белок, должна располагаться последовательность Козак, а с 3'-стороны – сигнал полиаденилирования с терминатором. Если вектор предполагается использовать *in vitro*, то необходим эукариотический селективный маркер, контролируемый вторым промотором, такой как ген устойчивости к антибиотику, поскольку этот маркер тоже является белком, необходимы также последовательности Козак и поли(A) (рис. 1).

В качестве примера строения вектора, несущего генетический редактор на основе ZFN, можно рассмотреть векторы, представленные в работе Zou J. и соавт. [17]. Предложенный ими вектор содержит целевой ген – последовательность, кодирующую химерный белок, состоящий из домена нуклеазы FokI и собственно цинковых пальцев, которые направят нуклеазу к нужному участку генома. Кроме того, с 5'-стороны последовательности, кодирующей белок, находится сигнал ядерной локализации. В качестве маркера селекции вектор со-

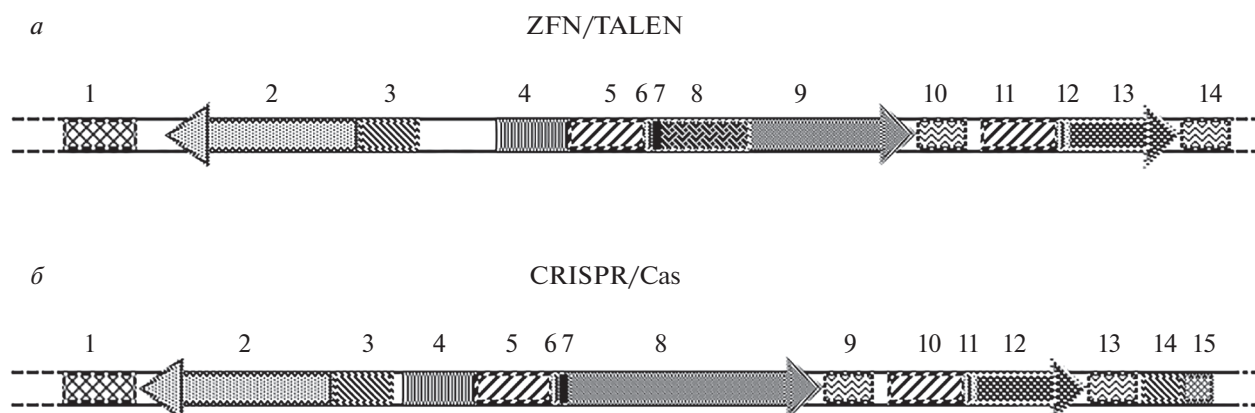


Рис. 2. Строение векторов для экспрессии генетических редакторов в эукариотических клетках. *а* – Векторы экспрессии для редактирования генома с использованием ZFN и TALEN очень похожи, отличается лишь элемент 8. Так, в первом случае нацеливание осуществляется цинковыми пальцами, а во втором – эффекторным ДНК-связывающим доменом. 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 11 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 12 – последовательность Козак; 7 – сигнальный пептид ядерной локализации; 8 – цинковые пальцы/эффекторный ДНК-связывающий домен; 9 – эндонуклеаза FokI; 10, 14 – сигнал полиаденилирования; 13 – эукариотический селективный маркер; *б* – 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 10 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 11 – последовательность Козак; 7 – сигнальный пептид ядерной локализации; 8 – белок Cas, обладающий эндонуклеазной активностью; 9, 13 – сигнал полиаденилирования; 12 – эукариотический селективный маркер; 14 – промотор U6, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой III; 15 – последовательность направляющей РНК.

держит ген устойчивости к бластицидину, обеспечивающий быстрый отбор трансфицированных клеток. В остальном это типичный вектор для синтеза рекомбинантных белков (рис. 2*а*). Редакторы могут быть направлены не только в клеточное ядро, но и в митохондрии [18]. Поскольку компартмент, в котором должно происходить редактирование, отличен от ядра, то с N-конца белка поместили сигнал транспорта в митохондрии. Синтезируемый белок поступал в митохондрии, где проявлялась активность эндонуклеазы FokI.

Нацеливание на участок-мишень в технологии, основанной на использовании TALEN, обеспечивали эффекторные ДНК-связывающие домены, а расщепление осуществлял домен нуклеазы FokI. Эффекторные ДНК-связывающие домены – это небольшие, довольно консервативные участки, состоящие из 33–34 аминокислотных остатков с вариабельными остатками в позициях 12 и 13. Взаимодействие с ДНК происходит за счет вариабельных аминокислот. Если несколько таких узнающих доменов расположить последовательно, то можно узнавать различные мотивы в ДНК. Таким образом, в данном случае синтезируется химерный белок, который состоит из домена TALEN и нуклеазы FokI, соединенных спейсером. Следовательно, вектор для экспрессии генетического редактора на основе TALEN также не будет отличаться от базового вектора, определяющего синтез рекомбинантных белков, поскольку весь редактор представляет собой один

большой белок [19] (рис. 2*а*). В качестве примера можно рассмотреть работу Kim Y.H. и соавт., которые попытались с помощью генетического редактора на базе TALEN изменить набор антигенов на поверхности эритроидных клеток-предшественников, чтобы получить кровь универсальной I группы из крови любой другой группы [20]. К нуклеотидной последовательности, кодирующей TALEN, присоединили сигнал ядерной локализации, в остальном этот вектор можно назвать стандартным, за исключением одной особенности – в нем отсутствует эукариотический селективный маркер, но это обусловлено спецификой и требованиями эксперимента. К недостаткам систем, основанных на ZFN и TALEN, относится сложность создания узнающих доменов, а иногда и невозможность подобрать модули для узнавания нуклеотидной последовательности. Преимуществом же является относительно небольшой размер вектора экспрессии.

В отличие от ZFN и TALEN генетический редактор на базе CRISPR/Cas представляет собой комплекс, состоящий из эндонуклеазы Cas и направляющей РНК. В этом и будет заключаться основное отличие вектора экспрессии редактора CRISPR/Cas [21]. Синтезируемая направляющая РНК по структуре существенно отличается от РНК, синтезируемых РНК-полимеразой II. В направляющей РНК отсутствуют кеп и поли(А)-хвост, характерные компоненты мРНК. Для синтеза такой РНК необходимо использовать РНК-

полимеразу III, следовательно, в состав вектора должен входить промотор, который способен взаимодействовать с такой полимеразой. Наиболее часто используется промотор U6 человека [22]. В остальном же состав вектора будет таким же, как у типового вектора, используемого для синтеза рекомбинантных белков (рис. 2б). В качестве примера можно рассмотреть вектор из исследования, выполненного Gabriel C.H и соавт. [23]. В этой работе редактор на базе CRISPR/Cas использовали для получения нокаутов генов. В качестве селективного маркера использовали GFP, который экспрессировали с той же рамки считывания, что и белок Cas9. Для получения двух белков между Cas9 и GFP поставили 2A пептид. Еще одно отличие состоит в том, что промотор, под контролем которого экспрессировали Cas9, не был слит с энхансером, вместо этого после промотора находился интрон. Этот элемент также может усилить экспрессию целевого продукта.

Таким образом, можно сказать, что помимо стандартных элементов в состав экспрессионного вектора могут входить различные функциональные элементы. Если необходимо поместить плазмидную ДНК в вирусные частицы, то вектор должен содержать участки, с которыми специфически взаимодействует вирусный капсид. Экспрессия трансгена может модулироваться также путем включения каких-либо регуляторных элементов. В конечном итоге выбор элементов зависит либо от требований эксперимента, либо от области терапевтического применения генного редактирования.

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ мРНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ

Структура природных мРНК

мРНК, синтезируемая в ядре, подвергается различным модификациям, после чего она транслируется в цитоплазме. После модификации 5'- и 3'-концов мРНК становится функционально активной. Транскрибируемая мРНК подвергается сплайсингу, а также двум значительным модификациям. К первому трифосфату с 5'-конца премРНК через особую 5'-5'-связь добавляется 7-метилгуанозин и образуется структура, известная как кеп. Эта структура защищает зрелую мРНК от деградации, а также способствует ядерному транспорту и эффективной трансляции. Вторая модификация – посттранскрипционное добавление на 3'-конец молекулы РНК поли(А)-хвоста примерно из 100–250 остатков аденозина. Добавление поли(А)-хвоста придает стабильность молекуле мРНК, способствует экспорту мРНК в цитозоль и вместе со структурой 5'-кепа участвует в образовании трансляционно-компетентного рибонуклеопротеинового комплекса. Зрелая мРНК

образует кольцевую структуру (замкнутую петлю), соединяя кеп с поли(А)-хвостом через кеп-связывающий белок eIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E) и поли(А)-связывающий белок (PABP), которые взаимодействуют с eIF4G (эукариотический фактор инициации трансляции 4G). Таким образом, основные требования к функциональной мРНК – это наличие кепа (7-метилгуанозина) на 5'-конце и поли(А)-хвоста на 3'-конце [24].

Транскрипция и кепирование синтетических мРНК

Транскрипция – один из основных биологических процессов, формирующих центральную догму молекулярной биологии. ДНК-зависимые РНК-полимеразы, которые осуществляют эту стадию передачи генетической информации, распространены во всех формах жизни. Как правило, эти ферменты представляют собой сложные мультисубъединичные комплексы, которые осуществляют транскрипцию генов прокариот и эукариот *in vivo*. *In vitro* мРНК синтезируют с использованием полимераз бактериофагов (Т7, Т3 и SP6) – односубъединичных ферментов, для активности которых требуются только ионы Mg^{2+} . Матрицей для транскрипции *in vitro* выступает молекула ДНК (ПЦР-фрагмент или линейаризованная плазида), которая содержит последовательность соответствующего промотора. Далее фермент синтезирует комплементарную молекулу РНК, по окончании процесса транскрипционный комплекс диссоциирует, так что ДНК-матрица и фермент могут повторно использоваться в реакции. Благодаря этому процессу выход синтетической мРНК может достигать миллиграммовых количеств. После транскрипции РНК обрабатывают ДНКазой I для удаления ДНК-матрицы и очищают перед кепированием. Этот метод позволяет с высоким выходом получить РНК с 5'-трифосфатными концами, которые далее необходимо преобразовать в кеп-структуры [25].

Для эффективной трансляции синтетической мРНК необходимы кеп и поли(А)-хвост, характерные для зрелой мРНК, которые могут быть добавлены во время или после синтеза РНК в отдельных реакциях, катализируемых кепирующими ферментами и поли(А)-полимеразой соответственно (рис. 3). Дополнительно в искусственные молекулы РНК могут быть включены модифицированные внутренние основания, а также модифицированные кеп-структуры – все это повышает стабильность и трансляционную активность итоговой молекулы. В зависимости от выбранной стратегии кепирования используют два варианта реакции транскрипции *in vitro*: стандартный синтез с ферментативным кепированием после реакции транскрипции (посттранскрипционное кепирование) или включение аналога кепа в ходе транскрипции

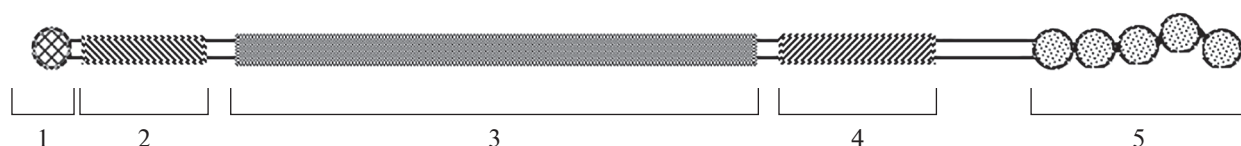


Рис. 3. Структура синтетической мРНК. 1 – кеп-структура; 2 – 5'-нетранслируемая область; 3 – открытая рамка считывания, кодирующая трансген; 4 – 3'-нетранслируемая область; 5 – поли(А)-хвост.

(котранскрипционное кепирование). Стратегии синтеза мРНК *in vitro* зависят от желаемого масштаба синтеза.

Посттранскрипционное кепирование мРНК часто выполняется с использованием ферментов вируса осповакцины. Этот ферментный комплекс превращает 5'-трифосфатные концы транскриптов *in vitro* в структуры m7G-кеп. Система кепирования вируса осповакцины включает три активности (РНК-трифосфатаза, гуанилилтрансфераза, гуанин-N7-метилтрансфераза), которые необходимы для образования полной структуры кеп 0 (m7Gppp5'N) с помощью GTP и донора метильной группы S-аденозилметионина. Дополнительно в ту же ферментативную реакцию можно включить 2'-О-метилтрансферазу, которая приводит к образованию структуры кеп 1, благодаря метилированию 2'-О-позиции следующего за кепом нуклеотида, что является природной модификацией многих эукариотических мРНК [26].

При котранскрипционном кепировании аналог кеп-структуры встраивается в РНК как первый нуклеотид синтезируемой молекулы. Аналог кеп-структуры вводится в реакцию транскрипции вместе с четырьмя стандартными нуклеозидтрифосфатами в оптимизированном соотношении аналога кеп-структуры и GTP, равном 4 : 1. Это позволяет инициировать образование значительного числа кеп-содержащих транскриптов среди синтезируемых молекул РНК. В результате образуется смесь транскриптов, из которых ~ 80% кепированы, а остальные имеют 5'-трифосфатные концы. Снижение общего выхода продуктов РНК обусловлено более низкой концентрацией GTP в реакции. При котранскрипционном кепировании используются синтетические аналоги кеп-структуры. Существует несколько аналогов, используемых для котранскрипционного кепирования РНК. Наиболее распространены стандартный аналог кеп-структуры – 7-метилгуанозин (m7G) и симметричный аналог кеп-структуры (ARCA), также известный как 3'-О-me-7-meGpppG. Стандартный аналог кеп-структуры m7G можно встроить в молекулу РНК как в прямой, так и в обратной ориентации, что значительно снижает общий уровень трансляции такого препарата мРНК. ARCA метилирован по 3'-положению m7G, что позволяет встраивать этот аналог кеп-структуры только в прямой ориентации и получать пул кепированных мРНК, трансляционная активность которых составляет

100%. Выход продуктов такой реакции ниже, чем в реакции транскрипции без синтетических аналогов кеп-структуры. Кеп-структуру ARCA можно конвертировать в структуру кеп 1, используя кеп-зависимую 2'-О-метилтрансферазу и S-аденозилметионин в последующей ферментативной реакции [27]. Также необходимо отметить, что получен ряд других синтетических аналогов кеп-структуры с улучшенными свойствами, в том числе, аналог кеп-структуры 1 компании “Trilink Biotechnol.” (США).

Модифицированные нуклеотиды и оптимизация нуклеотидного состава синтетических мРНК

Природные РНК, как правило, подвергаются созреванию не только с 5'- и 3'-концов, но и при помощи модификации отдельных нуклеотидов внутри молекулы. Использование модифицированных аналогов нуклеотидов в составе синтетических мРНК рассматривается как наиболее эффективный способ избегания активации клеточных сенсоров (TLR3, TLR7, TLR8, PKR), которые запускают иммунный ответ на чужеродную РНК (как правило, вирусную). Это означает, что синтез РНК *in vitro* можно проводить со смесью модифицированных нуклеотидов вместо обычной смеси трифосфатов А, G, C и U. Чаще всего используют такие модифицированные нуклеотиды, как встречающийся в природе 5'-метилцитидин и/или псевдоуридин (а также N1-метилпсевдоуридин), вместо C и U соответственно [28]. Показано, что это решение значительно влияет на стабильность мРНК в клетке, а также на эффективность трансляции и снижение клеточного иммунного ответа на такую РНК, что особенно важно в ряде терапевтических приложений мРНК, например, в задачах генного редактирования, заместительной белковой терапии или дифференцировки стволовых клеток при помощи кодируемых мРНК транскрипционных факторов. Так, экспрессия генного редактора ZFN с синтетических мРНК, содержащих модифицированные нуклеотиды, в тканях легких мыши была значительно выше, чем с немодифицированной мРНК [29]. Важно отметить, что выбор нуклеотидов может влиять на общий выход реакций синтеза мРНК *in vitro*. Практически можно получать мРНК с нужной модификацией. Транскрипты с полной заменой одного или нескольких нуклеотидов могут быть кепированы

посттранскрипционно или котранскрипционно путем включения ARCA или другого аналога кеп-па. Необходимо отметить также важность хроматографической очистки итоговых мРНК при помощи для минимизации неспецифического иммунного ответа [30]. Еще один фактор, влияющий на эффективность трансляции синтетической РНК — оптимизация состава кодонов транскрипта с учетом как организма, так и типа тканей и клеток. В ходе такой оптимизации отдельные редкие кодоны замещаются синонимичными, которые транслируются эффективнее. Чаще всего это приводит к усилению трансляции и стабильности РНК, но такой подход не всегда подходит для терапевтических белков. В некоторых случаях для корректного фолдинга белков, кодируемых синтетическими мРНК, необходимо снижение скорости трансляции на определенных участках последовательности, поэтому значение оптимизации кодонов в таких ситуациях неоднозначно [31].

5'- и 3'-нетранслируемые области синтетических мРНК

Стабильность и трансляционную активность мРНК в клетке во многом определяют 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR). Эти регуляторные области фланкируют кодирующую последовательность мРНК транскрипта. Они содержат различные мотивы и вторичные структуры, которые определяют стабильность мРНК, а также распознавание мРНК рибосомами и взаимодействие с компонентами трансляционного аппарата [32]. Включение таких последовательностей в состав синтетической мРНК может улучшить трансляцию и стабильность мРНК. Многие UTR, которые усиливают трансляцию мРНК, являются природными. Так, например, UTR мРНК альфа- и бета-глобина широко используются для создания синтетических мРНК. Более того, стабилизирующий эффект можно усилить, расположив последовательно две копии 3'-UTR мРНК бета-глобина. Аналогичные эффекты на синтетические мРНК оказывают UTR мРНК белка теплового шока 70 человека, альбумина, а также белков альфа-вируса [33].

В качестве альтернативы природным UTR можно использовать синтетические UTR, разработанные в лаборатории. Так, *de novo* сконструирована последовательность 5'-UTR длиной всего лишь 14 нуклеотидов, которая обеспечивает уровень экспрессии, сопоставимый с уровнем 5'-UTR альфа-глобина человека [34]. Современные скрининговые технологии позволяют экспериментально отбирать UTR с улучшенными свойствами [35].

Поли(А)-хвост синтетических мРНК

Полиаденилированный 3'-концевой участок мРНК, так называемый поли(А)-хвост, — это важный структурный элемент, определяющий продолжительность жизни молекул мРНК. Несмотря на ряд исключений, поли(А)-хвосты большинства природных молекул мРНК в клетках млекопитающих имеют длину до 250 нуклеотидов, и они постепенно укорачиваются в течение всего времени жизни мРНК в клетке. Кроме того, поли(А)-хвост играет важную роль в трансляции, а именно, в образовании трансляционно-активного комплекса мРНК с факторами трансляции [36]. Поскольку размер “хвоста” влияет на стабильность мРНК, предотвращая ее 3'-экзонуклеазную деградацию, то в синтетические мРНК желательно включать поли(А)-хвосты длиной примерно 100–120 нуклеотидов. Экспериментально показано, что если длина поли(А)-хвоста превышает 120 нуклеотидов, то это приводит к существенному увеличению событий рекомбинации с участием этой последовательности в клетках бактерий. В итоге это влияет на стабильность плазмиды, которая используется как матрица для синтеза мРНК *in vitro*, и снижает выход при наработке плазмиды в бактериальной культуре. Полиаденилирование мРНК *in vitro* можно осуществлять либо путем ферментативного добавления поли(А)-хвоста к кефированной мРНК с использованием рекомбинантной поли(А)-полимеразы, либо путем кодирования этой последовательности в плазмидном векторе [25]. Полиаденилирование при помощи отдельного фермента добавляет лишнюю стадию в процесс синтеза мРНК, а также не дает возможности точно контролировать количество включенных нуклеотидов во всех молекулах в ходе реакции. Поэтому второй подход, при котором поли(А)-хвост кодируется плазмидой, больше подходит для промышленного производства терапевтических мРНК.

Использование синтетических мРНК для доставки геномных редакторов

Безопасная невирусная доставка геномных редакторов открывает новые перспективы для терапевтического применения генного редактирования терапевтических мРНК хорошо зарекомендовала себя во время пандемии COVID-19. Комбинация мРНК и липидных наночастиц обеспечивает безопасную экспрессию антигенных или терапевтических белков *in vivo*, что подтверждается результатами клинических и доклинических испытаний. За последние годы проведены успешные эксперименты по геномному редактированию с использованием синтетических мРНК. Так, проведено редактирование гена транскретина (*Ttr*) в печени мышей, которое привело к снижению уровня сывороточного белка TTR более чем на 97% [37]. В этой работе использовали оригинальную систе-

му доставки, основанную на липидных наночастицах, что позволило провести одновременную упаковку мРНК, кодирующих Cas9, вместе с направляющими РНК [37]. Внутривенная совместная доставка мРНК Cas9 и направляющей РНК приводила к редактированию ДНК в тканях печени, почек и легких у мышей [38]. Использование наночастиц другого состава обеспечило эффективное высвобождение РНК внутри клеток благодаря восстановительной среде. Показан эффективный нокаут репортерного гена в клетках эмбриональной почки, накопление внутривенно вводимых наночастиц с мРНК в тканях печени, а также успешный нокаут гена-мишени (до 20% от уровня в сыворотке) [39]. Недавно возможности геномного редактирования с применением РНК-платформы доставки были показаны на примере коррекции мышечной дистрофии в клетках мышц, полученных от широкого круга доноров. Подтверждена безопасность доставки генных редакторов при помощи платформы синтетических РНК с точки зрения встраивания трансгена в геном, а также показана высокая эффективность редактирования с возможностью дозирования активности SpCas9 [40]. Показан терапевтический потенциал доставки генных редакторов с помощью липидных наночастиц с синтетическими РНК: нокаут гена *Angptl3* в печени мыши, проведенный с целью снижения уровня белка ANGPTL3, привел к снижению уровня липидов в крови и коррекции гиперхолестеринемии. Отмечена существенная длительность терапевтического эффекта (до 100 дней после единичной инъекции) и отсутствие неспецифичного редактирования в нескольких наиболее возможных местах, а также гепатотоксичности [41].

СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ВЕКТОРОВ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ДНК И РНК *in vitro* И *in vivo*

Для успешного применения средств геномного редактирования необходимы не только правильно сконструированные векторы экспрессии, но и эффективные безопасные способы доставки носителей генетической информации внутрь клеток *in vitro*, либо к тканям определенного типа *in vivo*. Эти способы разделяются на три главных вида (табл.1). Первый вид — биологическая доставка, к которой относится трансфекция в составе вирусных векторов либо вирусоподобных частиц. Второй способ — использование физических методов трансфекции. Наконец, третий вид — это химические методы трансфекции. В данном обзоре мы не касаемся вирусных векторов доставки трансгенов, поэтому остановимся только на физических и химических способах трансфекции экспрессионных векторов на основе нуклеиновых кислот.

Физические методы трансфекции

Электропорация. Электропорация, или же электротрансфекция — наиболее распространенный физический метод трансфекции. Традиционно электротрансфекцию проводят *in vitro* в кювете на клетках в суспензии, однако этот метод применим и *in vivo*. Клеточная взвесь с интересующей плазмидной ДНК или мРНК помещается между двумя электродами. Через среду с клетками подается серия коротких электрических импульсов, что приводит к резкому изменению напряжения на клеточной мембране, достигающему критического порога (между 250 и 500 мВ), и возникновению пор в клеточной мембране, через которые нуклеиновая кислота проникает в цитозоль. Под действием электрического поля ДНК и РНК движутся от анода к катоду [42]. Что интересно, более крупные поры в клеточной мембране образуются со стороны, обращенной к аноду, что также способствует проникновению довольно крупных молекул нуклеиновых кислот в клетку. После того как электрические импульсы прекращаются, поры постепенно релаксируют и закрываются. Электротрансфекция — весьма эффективный метод доставки ДНК и РНК, однако при проведении этой процедуры гибнет большое число клеток. Также следует отметить различия в эффективности трансфекции разных клеточных линий, классическим вариантом трансфекции можно модифицировать именно взвесь клеток, т.е. адгезированные клетки модифицировать не удастся. Однако недавно Maschietto и соавт. предложили способ электротрансфекции, обходящий это ограничение [43]. Предложено использовать для культивирования клеток планшеты, дно которых покрыто микроэлектродами. Планшеты представляют собой чипы для электропорации, в которые интегрированы массивы из тонкопленочных емкостных микроэлектродов. Каждый отдельный микроэлектрод представляет собой восьмиугольную структуру, образующую высокопроводящим кремнием *p*-типа, покрытую слоем оксида кремния толщиной 15 нм. Клетки растут на поверхности этих электродов, что позволяет использовать значительно более низкие токи, не теряя при этом в эффективности трансфекции. Утверждается, что эффективность трансфекции клеток СНО-К1 в этом случае достигает 60–80%, при этом высокий уровень смертности клеточной культуры после процедуры не наблюдался. Удалось также трансфицировать уже дифференцированные нейроны после 6 дней культивирования, хотя и с низкой эффективностью, составившей ~10%. Для применения этого подхода *in vivo* пришлось разработать ряд электродов, пригодных для использования в условиях в различных органах и тканях [44]. В целом этот метод хорошо принят для использования в клинических условиях из-за его простоты и относительно небольшого коли-

чества побочных эффектов. С использованием электропорации Kawasaki и соавт. смогли доставить генетический редактор CRISPR/Cas внутритробно [45]. Таким образом, на данный момент трансфекция посредством электропорации является весьма эффективным и дешевым способом доставки нуклеиновых кислот в клетки как *in vitro*, так и *in vivo*, ограниченным лишь доступностью соответствующей аппаратуры.

Генная пушка: принцип работы и применение. Как и электропорация, этот подход применим для доставки как плазмидных ДНК, так и мРНК. Изначально этот метод применяли для модификации растительных клеток, но его потенциал гораздо шире. С использованием генной пушки можно модифицировать различные типы клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Метод основан на бомбардировке клеток разогнанными до высоких скоростей комплексами из частиц тяжелых металлов размером около 1 мкм, покрытых нуклеиновыми кислотами. Сначала использовали частицы вольфрама, но этот металл токсичен для клеток, поэтому его часто заменяют на биологически инертные частицы золота [46]. Ускорение частицам можно придавать разными способами, на данный момент наиболее распространен разгон за счет короткого импульса инертного газа, к примеру гелия. Разогнанные частицы пробивают мембрану клетки и доставляют генетический материал в различные ее части. Нуклеиновые кислоты могут попасть как в цитозоль, так и в ядро или другие органеллы. С помощью этого подхода можно модифицировать пластиды и митохондрии. Главными ограничениями при применении биолистки для трансфекции *in vivo* являются размер самого оборудования и глубина проникновения частиц в организм. Этот подход может использоваться преимущественно для трансфекции эпителиальных и подкожных мышечных тканей в виду их доступности [47]. К главным преимуществам этого метода относятся его высокая эффективность, возможность доставки нескольких плазмид или мРНК одновременно, широкий спектр объектов модификации, возможность модификации уже дифференцированных и растущих в адгезионной культуре клеток. Но есть и ряд недостатков. Первый – высокая стоимость самой генной пушки, при относительно дешевой дальнейшей эксплуатации. Второй существенный недостаток – это высокая клеточная смертность во время процедуры переноса, однако, как сообщают O'Brien и Lummis, использование более низкого давления импульса (порядка 345 кПа) значительно снижает степень повреждения клеток [48]. Метод доставки с использованием генной пушки продолжает развиваться. К важным преимуществам этого метода относится универсальность, применимость к клеткам разного типа, при этом его использование сдерживается высокой стоимостью

оборудования. Вероятно, снижение стоимости привлечет к этому методу больше внимания.

Сонопорация для доставки ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*. В методе сонопорации перенос нуклеиновых кислот осуществляется за счет воздействия на клетки ультразвуковыми волнами. В результате воздействия ультразвука возникают такие эффекты, как кавитация, радиационное давление и микропотоки. Кавитация, т.е. возникновение и схлопывание микропузырьков воздуха, имеет очень высокое локальное давление и повышение температуры, что приводит к нарушению целостности клеточной мембраны, если пузырек схлопывается у поверхности клетки. В эти образовавшиеся поры и проникает нуклеиновая кислота под воздействием остальных эффектов, возникающих в процессе обработки низкочастотным ультразвуком [49]. Описан также способ доставки плазмидной ДНК с использованием комбинации сонопорации и микрофлюидных технологий, в дальнейшем названной методом акустофлюидной сонопорации. Как заявляют разработчики Belling и соавт., этот метод позволяет проводить трансфекцию с высокой скоростью и на большом количестве клеток. В методе акустофлюидной сонопорации смесь клеток и плазмидной ДНК пропускают через капилляр, в котором и происходит обработка ультразвуком. Исследователи, работавшие с клеточной линией Jurkat, сообщают, что им удалось добиться скорости трансфекции около 200000 клеток/мин и при этом жизнеспособность клеток после процедуры составляла около 80% [50]. Этот метод является эффективным и доступным аналогом физических методов трансфекции, хотя отмечается, что необходимо изучать последствия воздействия ультразвука на клетки, особенно на клеточное ядро, которое также подвержено локальным повреждениям в результате кавитации. Сонопорация применяется также для трансфекции *in vivo*, однако ее эффективность с этом случае значительно ниже, чем *in vitro*. Тем не менее, использование этого подхода позволило успешно доставить генетический редактор на базе CRISPR/Cas для лечения облысения по мужскому типу. Исследователи направили генетический редактор на ген *SRD5A2*, для доставки использовали комбинацию нанолипосомных частиц в качестве переносчика и сонопорации в качестве “активатора” частиц. Под действием кавитации частички лопались и доставляли плазмидные векторы непосредственно в клетки волосных луковиц [51].

Фототрансфекция. Трансфекция с помощью лазера осуществляется за счет локального разрушения клеточной мембраны. Пучок лазера фокусируется под микроскопом на клеточной мембране в области 1–2 мкм, после чего подается серия коротких высокоинтенсивных импульсов, что приводит к локальному разрушению мембраны.

При этом плазмидная ДНК из питательной среды проникает в клетку [52]. Продолжительность излучения исчисляется в фемтосекундах, используемая длина волны может значительно различаться и зависит, как правило, от имеющейся аппаратуры, а мощность рекомендуют использовать в диапазоне 50–100 мВт [53]. Однако метод имеет невысокую эффективность трансформации, порядка 25%, а также значительно более низкую пропускную способность в сравнении с ранее рассмотренными методами и подходит, скорее, для точечной трансфекции. Из преимуществ можно отметить применимость метода к клеткам, растущим и в суспензии, и в адгезионной культуре. Также отмечают низкую цитотоксичность данного подхода, что может быть важным при трансфекции одиночных клеток [54].

Химические методы трансфекции

Трансфекция с использованием фосфата кальция.

Трансфекция с использованием фосфата кальция это один из первых методов трансфекции клеток *in vitro* [55]. В основе метода лежит поглощение клетками комплексов, состоящих из плазмидной ДНК и фосфата кальция. Эти комплексы получают, смешивая CaCl_2 с ДНК, после чего добавляют буфер, содержащий соединения фосфора, например HEPES [56]. Образуются выпадающие в осадок комплексы, состоящие из фосфата кальция и плазмидной ДНК. Далее эти комплексы добавляют к клеткам, которые адсорбируют их из питательной среды. Главные преимущества этого метода – его простота и дешевизна. К минусам относится относительно низкая эффективность трансфекции, особенно дифференцированных клеток, и относительно высокий уровень цитотоксичности, а также применимость исключительно *in vitro* [57]. Метод был предложен в 70-х годах прошлого века, но до сих пор широко применяется и даже предпринимаются попытки оптимизации этого метода для повышения его эффективности [58].

Трансфекция с использованием поли-*L*-лизина.

Этот метод также основан на создании комплексов нуклеиновых кислот и носителя, которые поглощаются клеткой. В качестве носителя выступает полимер, состоящий из остатков аминокислоты лизина. Молекула, состоящая из ~10 остатков этой аминокислоты, имеет положительный заряд, за счет которого и образует комплексы с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот. Комплекс из поли-*L*-лизина и нуклеиновой кислоты также имеет суммарный положительный заряд, посредством которого взаимодействует с клеточной мембраной. В таком “классическом” варианте этот способ доставки ДНК имеет ряд недостатков. Во-первых, такие микро-частицы поглощаются лизосомами, где подверга-

ются деградации, что негативно сказывается на общей эффективности трансфекции. Во-вторых, сам комплекс поли-*L*-лизина имеет выраженную цитотоксичность [59]. Однако эти недостатки можно компенсировать, используя дополнительные агенты. Так, добавление такого эндосомоли-тического агента, как глицерин, в клеточную среду до проведения трансфекции решает проблему высвобождения комплексов поли-*L*-лизина из эндосом. А модификация поли-*L*-лизина с помощью PLGA (полилактидгликолид) снижает цитотоксичность и увеличивает общую эффективность трансфекции. При необходимости можно нацеливать комплексы поли-*L*-лизина на определенные типы клеток, присоединяя к полимеру сигнальные последовательности для связывания с поверхностными клеточными рецепторами. Таким же образом в некоторых работах решают проблему поглощения комплекса поли-*L*-лизина эндосомами [60]. Одно из главных преимуществ этого метода состоит в том, что его легко модифицировать под нужды экспериментатора и применять как *in vivo*, так *in vitro*. Однако этот метод обеспечивает не самый высокий уровень трансфекции. Кроме того, образующиеся комплексы имеют разный размер, что также может сказываться на эффективности трансфекции.

Трансфекция с использованием полиэтиленими-на. Полиэтиленимин (ПЭИ) – это полимер, имеющий высокий катионный потенциал за счет большого количества аминогрупп. Можно синтезировать молекулы ПЭИ, имеющие как линейную, так и разветвленную структуру [61], заданного размера и с различными модификациями. При добавлении отрицательно заряженной нуклеиновой кислоты ПЭИ образует с ней комплексы, которыми впоследствии и проводят трансфекцию. Взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной мембраной обусловлено суммарным положительным зарядом комплекса. В отличие от комплексов поли-*L*-лизина, комплексы ПЭИ достаточно легко покидают эндосомы за счет эффекта буферизации или “протонной губки” [62]. Все это приводит к высокой эффективности трансфекции, что является главным достоинством данного метода. Главный недостаток ПЭИ – его цитотоксичность, которая прямо пропорциональна размеру частиц комплексов и эффективности трансфекции. Для снижения цитотоксичности в состав комплексов вводят нейтральные гидрофильные сополимеры, такие как полиэтиленгликоль [63]. Трансфекция с применением ПЭИ нашла широкое применение в приложении *in vitro* как эффективный подход к доставке трансгена, но для доставки генетического материала *in vivo* этот подход мало пригоден.

Трансфекция с использованием хитозана. Хитозан – полимерный полисахарид, состоящий из повторяющихся единиц *D*-глюкозамина и *N*-аце-

Таблица 1. Способы доставки векторов экспрессии на основе ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*

Метод	Принцип	Преимущества	Недостатки
Электропорация	Проникновение НК происходит под воздействием серии коротких электрических импульсов	Простота проведения процедуры; низкая стоимость; широкий выбор электродов; может быть применена как <i>in vitro</i> , так и <i>in vivo</i>	Требуется специализированное оборудование; процедура сопровождается повреждением клеток/тканей
Биолистика	Частицы металла, покрытые молекулами НК разгоняют за счет импульса инертного газа, после чего частицы металла пробивают клеточную мембрану	Высокая эффективность трансфекции; возможность одновременной доставки разных векторов; широкий спектр объектов модификации; применимость <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	Высокая стоимость генной пушки и последующей эксплуатации; высокий уровень повреждения клеток в результате процедуры трансфекции; в условиях <i>in vivo</i> доступно ограниченное количество тканей
Сонопорация	Перенос НК за счет воздействия на клетки ультразвуковыми волнами	Высокая скорость и эффективность трансфекции в условиях <i>in vitro</i> ; высокая выживаемость клеток; применимость <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	Наличие аппаратуры; ограниченность применения и более низкая эффективность в условиях <i>in vivo</i>
Фототрансфекция	Локальное разрушение клеточной мембраны короткими импульсами лазера	Метод применим к клеткам, растущим и в суспензии, и в адгезии; низкий уровень цитотоксичности	Применим только <i>in vitro</i> ; низкая эффективность трансфекции относительно других физических методов; низкая пропускная способность; трудоемкость
Фосфат кальция	Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и фосфата кальция	Простота проведения процедуры; низкая стоимость	Низкая эффективность трансфекции; Выраженная цитотоксичность; применимость только в условиях <i>in vitro</i>
Поли- <i>L</i> -лизин	Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе <i>L</i> -лизина	Легко модифицируем под нужды экспериментатора; применимость как <i>in vivo</i> , так <i>in vitro</i>	Низкая эффективность трансфекции; образующиеся комплексы имеют разный размер; комплекс поли- <i>L</i> -лизина без добавления модификаций имеет выраженную цитотоксичность
Полиэтиленмин	Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе полиэтиленмина	Высокая эффективность трансфекции в условиях <i>in vitro</i>	Высокая цитотоксичность. Применимость преимущественно в условиях <i>in vitro</i>
Хитозан	Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе хитозана	Низкая цитотоксичность; применимость как <i>in vivo</i> так <i>in vitro</i>	Низкая эффективность трансфекции
Липофекция	Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и смеси липидов	Высокий уровень трансфекции; применимость как <i>in vivo</i> так <i>in vitro</i> ; легко модифицируется под нужды экспериментатора	Высокая цитотоксичность; образующиеся комплексы имеют разный размер

Примечание. НК – нуклеиновая кислота.

тил-D-глюкозамина. При pH 6.5 хитозан протонируется и становится растворимым в воде. После обработки он приобретает высокий положительный заряд. Как и прочие катионные полимеры, хитозан образует комплексы с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. Этот полимер содержит две гидроксильные группы, которые легко модифицируются под задачи исследователя [64]. Механизм проникновения хитозана в клетки такой же, как и у ПЭИ или комплексов поли-L-лизина. В отличие от других полимеров хитозан имеет низкую цитотоксичность, однако и эффективность трансфекции с использованием этого полисахарида значительно уступает другим вариантам трансфекции. Трансфекция с использованием хитозана рассматривается как перспективная альтернатива ПЭИ. Низкая цитотоксичность и возможность модификации делают хитозан довольно удобной платформой. И, хотя проводятся исследования, посвященные повышению эффективности трансфекции с использованием этого полимера, приемлемый уровень эффективности ПЭИ пока не достигнут [65].

Липофекция. В основе липофекции лежит доставка ДНК и РНК в составе липидных комплексов. Для создания комплексов используют положительно заряженные липиды и отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты. В качестве примера можно рассмотреть первый коммерчески доступный препарат Lipofectin[®], состоящий из положительно заряженного липида DOTMA и нейтрального липида DOPE. На сегодняшний день трансфекцию проводят с различными липидами, которые различаются свойствами и степенью воздействия на клетки. В частности, такие липиды, как DOTAP и DODAP, используемые для получения липосом YSK05, значительно менее цитотоксичны, чем компоненты Lipofectin[®], а липидный дендример MVLBG2 имеет высокий положительный заряд за счет чего хорошо взаимодействует с ДНК [66]. При смешивании нуклеиновой кислоты и катионного липида образуются липидные везикулы, содержащие ДНК или РНК. Суммарный заряд везикулы должен быть положительным, так как взаимодействие с клеточной мембраной происходит также за счет электростатических сил. Везикулы поглощаются клетками путем эндоцитоза. Липофекция обеспечивает высокий уровень трансфекции клеток *in vitro*, но вместе с тем обладает высокой цитотоксичностью, особенно, если говорить о таком классическом варианте, как Lipofectin[®] [67]. Еще один недостаток — высокая гетерогенность размеров комплексов, образующихся при получении везикул. Считается, что эта гетерогенность негативно сказывается на эффективности трансфекции. Однако простота химического синтеза и модификации катионных липидов делают этот подход очень гибким. К примеру, можно получить ли-

пидные наночастицы (LNP), которые “растворяются” при понижении pH после попадания везикул в лизосомы, что увеличивает эффективность трансфекции. LNP получают с использованием ионизируемого липида, полиэтиленгликоля, вспомогательного фосфолипида и холестерина. Ключевым компонентом является ионизируемый липид: при физиологических значениях pH он имеет нейтральный заряд, но при проникновении в эндосомы с кислым pH становится катионным. Изменение заряда частицы приводит к разрушению эндосом и высвобождению нуклеиновых кислот [68]. Этот подход применим *in vivo*, с его помощью осуществили нокаун гена *Angptl3* в печени мышей [41]. Липофекция, несмотря на свою выраженную цитотоксичность, позволяет проводить трансфекцию с высокой эффективностью. К тому же возможность модификации каждого звена катионного липида и комплекса в целом делает этот метод очень гибким.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами рассмотрены структурные элементы экспрессионных векторов на основе ДНК и синтетических мРНК, а также способы их доставки как *in vitro*, так и *in vivo*. Оптимально подобранные структурные компоненты таких векторов позволяют эффективно экспрессировать терапевтические белки, а также инструменты генного редактирования как в клетках, так и в тканях для успешного выполнения задач генной терапии. Благодаря выбору между векторными платформами, их структурными элементами и способами доставки трансгенов, в настоящее время существует возможность решения целого спектра экспериментальных биомедицинских и терапевтических задач, что подтверждается растущим количеством научных данных, а также результатами доклинических и клинических испытаний по использованию генных редакторов для коррекции наследственных и приобретенных патологий.

Работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF—193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang T.Y., Guo X. (2020) Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**(13), 5673–5688.

2. Romanova N., Noll T. (2018) Engineered and natural promoters and chromatin-modifying elements for recombinant protein expression in CHO cells. *Biotechnol. J.* **13**(3), 1700232.
3. Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Develop. Biol.* **339**(2), 225–229.
4. Wise T.G., Schafer D.J., Lambeth L.S., Tyack S.G., Bruce M.P., Moore R.J., Doran T.J. (2007) Characterization and comparison of chicken U6 promoters for the expression of short hairpin RNAs. *Animal Biotechnol.* **18**(3), 153–162.
5. Thaisuchat H., Baumann M., Pontiller J., Hesse F., Ernst W. (2011) Identification of a novel temperature sensitive promoter in CHO cells. *BMC Biotechnol.* **11**(1), 1–12.
6. Jeong H.J., Jung K.H. (2015) Rice tissue-specific promoters and condition-dependent promoters for effective translational application. *J. Integrative Plant Biol.* **57**(11), 913–924.
7. Li W., Notani D., Rosenfeld M.G. (2016) Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat. Rev. Genet.* **17**(4), 207–223.
8. Wang X., Cairns M.J., Yan J. (2019) Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization. *Nucl. Acids Res.* **47**(22), 11481–11496.
9. Daramola O., Stevenson J., Dean G., Hatton D., Pettman G., Holmes W., Field R. (2014) A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnol. Progr.* **30**(1), 132–141.
10. Kozak M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* **234**(2), 187–208.
11. Makrides S.C. (2003) Vectors for gene expression in mammalian cells. *New Comprehensive Biochem.* **38**, 9–26.
12. Hunter M., Yuan P., Vavilala D., Fox M. (2019) Optimization of protein expression in mammalian cells. *Curr. Protocols Protein Sci.* **95**(1), e77.
13. Ho S.C., Bardor M., Feng H., Tong Y.W., Song Z., Yap M.G., Yang Y. (2012) IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *J. Biotechnol.* **157**(1), 130–139.
14. Rasala B.A., Lee P.A., Shen Z., Briggs S.P., Mendez M., Mayfield S.P. (2012) Robust expression and secretion of xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One.* **7**(8), e43349.
15. Le Fourn V., Girod P.A., Buceta M., Regamey A., Mermoud N. (2014) CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metabolic Engin.* **21**, 91–102.
16. Cesareni G., Helmer-Citterich M., Castagnoli L. (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**(7), 230–235.
17. Zou J., Maeder M.L., Mali P., Pruetz-Miller S.M., Thibodeau-Beganny S., Chou B.K., Cheng L. (2009) Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* **5**(1), 97–110.
18. Gammage P.A., Rorbach J., Vincent A.I., Rebar E.J., Minczuk M. (2014) Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol. Med.* **6**(4), 458–466.
19. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Höning K., Hornung V. (2013) A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat. Biotechnol.* **31**(1), 76–81.
20. Kim Y.H., Kim H.O., Baek E.J., Kurita R., Cha H.J., Nakamura Y., Kim H. (2015) Rh D blood group conversion using transcription activator-like effector nucleases. *Nat. Commun.* **6**(1), 1–13.
21. O’Keeffe Ahern J., Lara-Sáez I., Zhou D., Murillas R., Bonafont J., Mencía Á., Wang W. (2021) Non-viral delivery of CRISPR-Cas9 complexes for targeted gene editing via a polymer delivery system. *Gene Therapy.* **29**, 157–170.
22. Lin S., Hirayama D., Maryu G., Matsuda K., Hino N., Deguchi E., Matsuda M. (2022) Redundant roles of EGFR ligands in the ERK activation waves during collective cell migration. *Life Sci. Alliance.* **5**(1), e202101206.
23. Gabriel C.H., Gross F., Karl M., Stephanowitz H., Hennig A.F., Weber M., Baumgrass R. (2016) Identification of novel nuclear factor of activated T cell (NFAT)-associated proteins in T cells. *J. Biol. Chem.* **291**(46), 24172–24187.
24. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(2), 113–127.
25. Grier A.E., Burleigh S., Sahni J., Clough C.A., Cardot V., Choe D.C., Jacoby K. (2016) pEVL: a linear plasmid for generating mRNA IVT templates with extended encoded poly(A) sequences. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **5**, 306.
26. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucl. Acids Res.* **44**(16), 7511–7526.
27. Stepinski J., Waddell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. (2001) Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG. *RNA.* **7**(10), 1486–1495.
28. Kariko K., Weissman D. (2007) Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **10**(5), 523.
29. Mahiny A.J., Dewerth A., Mays L.E., Alkhaled M., Mothes B., Malaeksefat E., Kormann M.S. (2015) *In vivo* genome editing using nuclease-encoding

- mRNA corrects SP-B deficiency. *Nat. Biotechnol.* **33**(6), 584–586.
30. Karikó K., Muramatsu H., Ludwig J., Weissman D. (2011) Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucl. Acids Res.* **39**(21), e142.
 31. Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**(7), 346–353.
 32. Chatterjee S., Pal J.K. (2009) Role of 5'-and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell.* **101**(5), 251–262.
 33. Babendure J.R., Babendure J.L., Ding J.H., Tsien R.Y. (2006) Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA.* **12**(5), 851–861.
 34. Trepotec Z., Aneja M.K., Geiger J., Hasenpusch G., Plank C., Rudolph C. (2019) Maximizing the translational yield of mRNA therapeutics by minimizing 5'-UTRs. *Tissue Engin. Part A.* **25**(1–2), 69–79.
 35. von Niessen A.G.O., Poleganov M.A., Rechner C., Plaschke A., Kranz L.M., Fesser S., Sahin U. (2019) Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Mol. Therapy.* **27**(4), 824–836.
 36. Eckmann C.R., Rammelt C., Wahle E. (2011) Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **2**(3), 348–361.
 37. Finn J.D., Smith A.R., Patel M.C., Shaw L., Youniss M.R., van Heteren J., Morrissey D.V. (2018) A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep.* **22**(9), 2227–2235.
 38. Miller J.B., Zhang S., Kos P., Xiong H., Zhou K., Perelman S.S., Siegwart D.J. (2017) Non-viral CRISPR/Cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angewandte Chemie.* **129**(4), 1079–1083.
 39. Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Wang M. (2019) Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv. Materials.* **31**(33), 19025.5.
 40. Stadelmann C., Di Francescantonio S., Marg A., Müthel S., Spuler S., Escobar H. (2022) mRNA-mediated delivery of gene editing tools to human primary muscle stem cells. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **28**, 47–57.
 41. Qiu M., Glass Z., Chen J., Haas M., Jin X., Zhao X., Xu Q. (2021) Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific *in vivo* genome editing of Angptl3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**(10), e2020401118.
 42. Andreason G.L., Evans G.A. (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques.* **6**(7), 650–660.
 43. Herrero M.J., Sendra L., Miguel A., Aliño S.F. (2017) Physical methods of gene delivery. In: *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders*. Ed. Brunetti-Pierrri N. Cham: Springer, 113–135.
 44. Young J.L., Dean D.A. (2015) Electroporation-mediated gene delivery. *Adv. Genetics.* **89**, 49–88.
 45. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A., Kawasaki H. (2016) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. *Sci. Rep.* **6**(1), 1–13.
 46. Uchida M., Li X.W., Mertens P., Alpar H.O. (2009) Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects.* **1790**(8), 754–764.
 47. Yen M.C., Lai M.D. (2013) Biolistic DNA delivery to mice with the low pressure gene gun. In: *Methods Mol. Biol.* Totowa: Humana Press, **940**, 169–174.
 48. Maschietto M., Dal Maschio M., Girardi S., Vassanelli S. (2021) *In situ* electroporation of mammalian cells through SiO₂ thin film capacitive microelectrodes. *Sci. Rep.* **11**(1), 1–11.
 49. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M. (2013) Sonoporation: gene transfer using ultrasound. *World J. Methodol.* **3**(4), 39.
 50. Belling J.N., Heidenreich L.K., Tian Z., Mendoza A.M., Chiou T.T., Gong Y., Jonas S.J. (2020) Acoustofluidic sonoporation for gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(20), 10976–10982.
 51. Ryu J.Y., Won E.J., Lee H.A.R., Kim J.H., Hui E., Kim H.P., Yoon T.J. (2020) Ultrasound-activated particles as CRISPR/Cas9 delivery system for androgenic alopecia therapy. *Biomaterials.* **232**, 119736.
 52. Tirlapur U.K., König K. (2002) Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature.* **418**(6895), 290–291.
 53. Mthunzi P., Dholakia K., Gunn-Moore F.J. (2010) Phototransfection of mammalian cells using femtosecond laser pulses: optimization and applicability to stem cell differentiation. *J. Biomed. Optics.* **15**(4), 041507.
 54. Thobakgale L., Manoto S., Lemboumba S.O., Maa-za M., Mthunzi-Kufa P. (2018) Femtosecond laser assisted photo-transfection and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Opt. Interact. Tissue and Cells. Internat. Soc. Optics Photonics.* **10492**, 1049205.
 55. Graham F.L., van der Eb A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **52**(2), 456–467.
 56. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. (2019) Calcium phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. *Cold Spring Harbor Protocols.* **2019**(10), 095430.
 57. Luo D., Saltzman W.M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* **18**(1), 33–37.
 58. Guo L., Wang L., Yang R., Feng R., Li Z., Zhou X., Xu X. (2017) Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**(3), 622–629.

59. Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* **7**(1), e61–e77.
60. Zhang M., Hong Y., Chen W., Wang C. (2017) Polymers for DNA vaccine delivery. *ACS Biomaterials Sci. Engin.* **3**(2), 108–125.
61. Ryu N., Kim M.A., Park D., Lee B., Kim Y.R., Kim K.H., Kim U.K. (2018) Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **14**(7), 2095–2102.
62. Rohiwal S.S., Dvorakova N., Klima J., Vaskovicova M., Senigl F., Slouf M., Stieger K. (2020) Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. *Sci. Rep.* **10**(1), 1–12.
63. Asayama S. (2020) Molecular design of polymer-based carriers for plasmid DNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Chem. Lett.* **49**(1), 1–9.
64. Критченков А.С., Andranovitš S., Скорик Ю.А. (2017) Хитозан и его производные: векторы в генной терапии. *Усп. химии.* **86**(3) 231–239.
65. Cao Y., Tan Y.F., Wong Y.S., Liew M.W.J., Venkatraman S. (2019) Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. *Marine Drugs.* **17**(6), 381.
66. Тараховский Ю.С. (2009) Трансфекция клеток ДНК-липидными комплексами-липоплексами. *Биохимия.* **74**(12), 1589–1602.
67. Kumar Y., Kuche K., Swami R., Katiyar S.S., Chaudhari D., Katare P.B., Jain S. (2020) Exploring the potential of novel pH sensitive lipoplexes for tumor targeted gene delivery with reduced toxicity. *Intern. J. Pharmaceutics.* **573**, 118889.
68. Cullis P.R., Hope M.J. (2017) Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol. Therapy.* **25**(7), 1467–1475.

Structural Elements of DNA and RNA Eukaryotic Expression Vectors for *in vitro* and *in vivo* Genome Editors Delivery

A. A. Zagoskin¹, M. V. Zakharova¹, and M. O. Nagornykh^{1, 2, *}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, 354349 Russia*

*e-mail: derbanner@gmail.com

Gene editing with programmable nucleases widely open new perspectives in such an important practical areas as healthcare and agriculture. The most challenging question for safe and effective therapeutic use of gene editing technologies is how to properly deliver and express gene editors within certain cells and tissues of different organisms. Virus-based and non-virus expression systems can be used for the successful delivery of gene editors. Here we will review delivery methods and structural elements for proper design of DNA and RNA vectors for *in vitro* and *in vivo* expression of gene editors.

Keywords: expression DNA vector, IVT RNA, mRNA-based delivery, genome editing, Cas9, ZFN, TALEN, gene therapy, nanoparticles