

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Чинак Ольга Александровна

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы**

**Структура противоопухолевого пептида лактаптина и
механизм его проникновения в клетки человека**

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.03 Молекулярная биология

Новосибирск - 2018

Введение

Способ взаимодействия биологически активных веществ с клетками-мишенями является важным звеном механизма действия этих веществ. Понимание механизма проникновения биологически активных соединений в клетки является ключевым при разработке противоопухолевых препаратов и преодолении множественной лекарственной устойчивости.

Ранее было показано, что рекомбинантный пептид RL2 проникает в цитоплазму как раковых клеток MCF-7 и MDA-MB-231, так и немалигнизированных клеток MSC, индуцируя апоптотическую гибель раковых клеток, но не снижает жизнеспособность нормальных. Однако механизм проникновения RL2 в клетки оставался невыясненным.

В рамках данной работы была исследована структура пептида RL2 и механизмы его проникновения в клетки.

Получение флуоресцентно меченого RL2

Для визуализации внутриклеточного распределения RL2, методами проточной цитофлуорометрия и флуоресцентной микроскопии был получен его флуоресцентно меченый конъюгат RL2-Rho. На рисунке 1 представлена схема реакции присоединения 5(6) - карбокситетраметилродамина по аминогруппе к пептиду RL2.

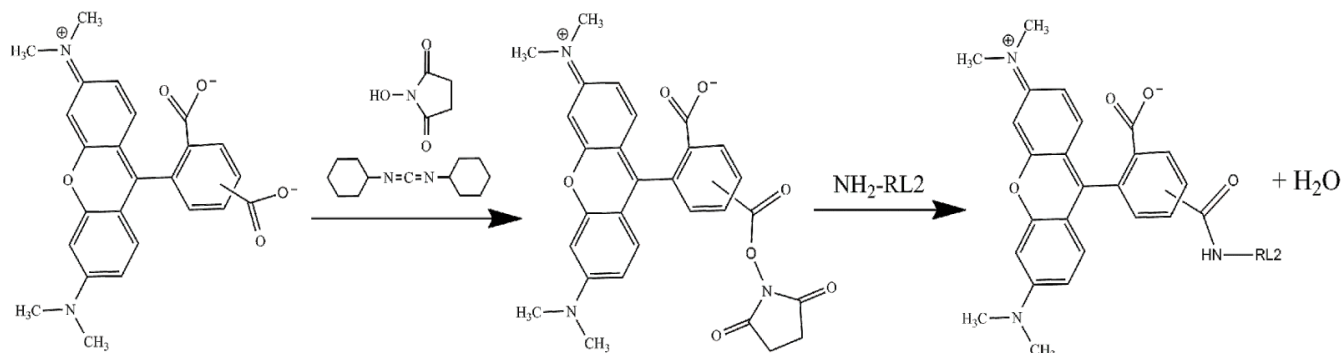


Рис. 1. Схема реакции присоединения 5(6)- карбокситетраметилродамина к RL2. Анализ поглощения УФ-спектров показал, что эффективность включения флуоресцентного красителя в состав конъюгата RL2-Rho составила 1 моль 5(6)-карбокситетраметилродамина на 1 моль RL2.

Электрофоретический анализ конъюгата выявил белковые продукты соответствующие мономеру, димеру, тримеру, тетрамеру и пентамеру RL2, образованные в результате поперечных сшивок молекул RL2 5(6)-кабокситетраметилродамином, этерифицированным гидроксисукцинимидом по обеим карбоксильным группам.

Максимальная массовая доля конъюгата приходится на мономерную форму RL2-Rho и составляет 60% по результатам денситометрического анализа в программе Gel Analyser.

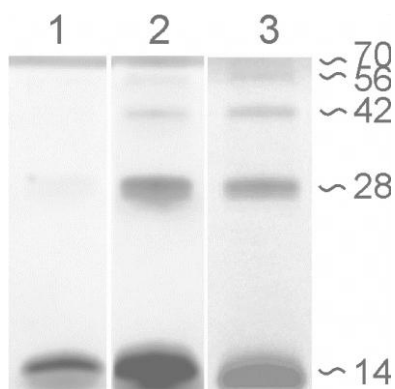


Рис. 2. Электрофоретический анализ RL2-Rho и RL2 в ПААГ; дорожки: 1 – RL2, 2, 3 – RL2-Rho; дорожки 1, 2 окрашены кумасси, 3 – детекция флуоресценции.

Анализ путей эндоцитоза RL2 в раковых клетках человека

Для исследования путей эндоцитоза RL2, проводили сравнительный анализ эффективности проникновения RL2-Rho в клетки эстроген-зависимой аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и клеток эстроген-независимой аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в присутствии различных ингибиторов эндоцитоза: М β CD (6,4 мкг/мл), нистатин (37,5 мкг/мл), EIPA (3 мкг/мл), цитохалазин Д (10 мкг/мл), хлорпромазин (30 мкг/мл), диназор (25,8 мкг/мл), вортманнин (0,03 мкг/мл), NaN₃ (1%) методом проточной цитофлуориметрии.

Согласно полученным данным (Рис. 3)

Из полученных данных следует, что инкубация клеток с нистатином или М β CD – ингибиторами пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами, и с азидом натрия – неспецифическим ингибитором всех путей эндоцитоза, приводит к снижению эффективности проникновения RL2-Rho, однако не более чем на 45%.

Таким образом, путь эндоцитоза по которому RL2 проникает в клетки MCF-7 и MDA-MB-231 является рафт-зависимым, а проникновение основного количества RL2 в клетки происходит по пути альтернативному эндоцитозу.

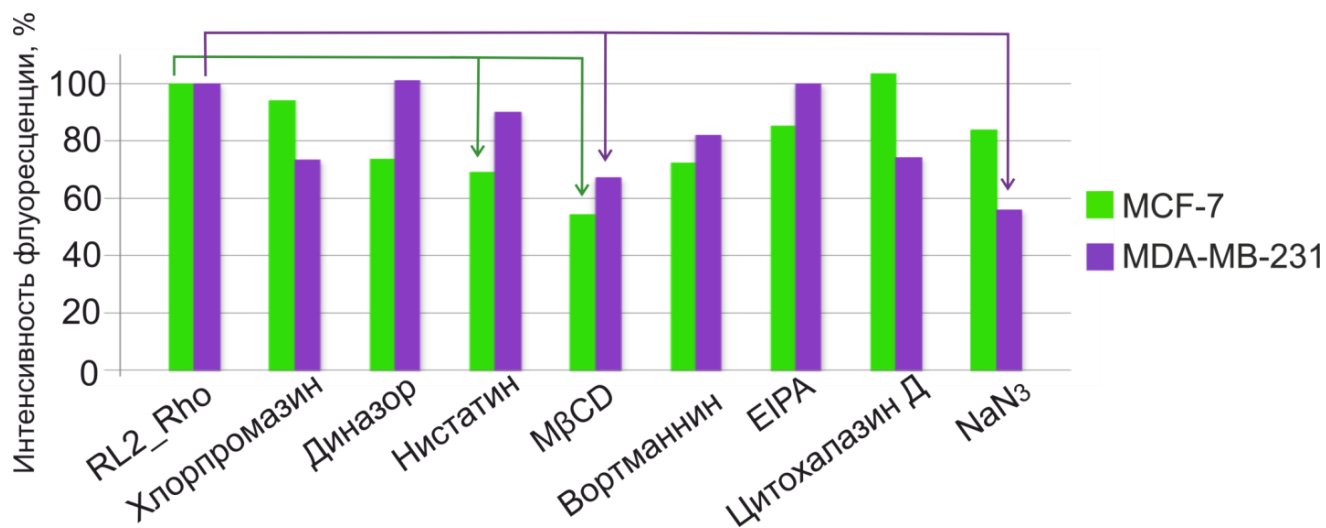


Рис. 3. Влияние ингибиторов эндоцитоза на поглощение RL2-Rho клетками MCF-7; стрелками отмечены достоверные изменения интенсивностей флуоресценции, $p \geq 0,05$.

Эндоцитоз RL2 в раковых и нераковых клетках человека

Для подтверждения механизма проникновения RL2 в раковые и нераковые клетки человека, эффективность проникновения RL2-Rho в фибробласты крайней плоти h-FF1 и аденокарциному человека MCF-7 и MDA-MB-231 была проанализирована методом флуоресцентной микроскопии (рис. 4).

Из полученных данных, видно, что RL2-Rho проникает в клетки всех исследованных линий, как в присутствии, так и в отсутствие азид натрия. RL2-Rho, что подтверждает проникновение RL2 в раковые и нормальные клетки по механизму альтернативному эндоцитозу.

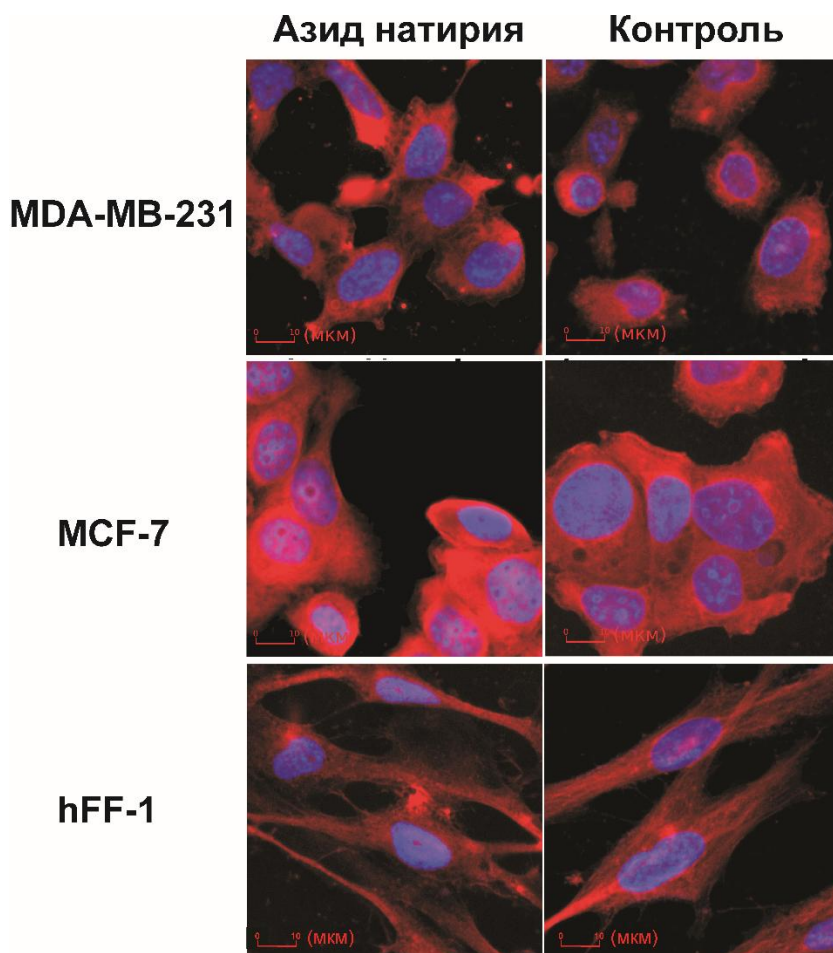


Рис. 4. Распределение RL2-Rho в клетках MDA-MB-231, MCF-7 и h-FF1, инкубированных в присутствии азид натрия и без него; красным цветом, отмечены области локализации RL2-Rho, синим, области внутриядерной локализации DAPI.

Структура пептида RL2

Известно, что проникновение пептидов в клетки зависит от их структурных особенностей. Чтобы проследить взаимосвязь между механизмом проникновения RL2 в клетки и его структурой, структура RL2 была исследована методами кругового дихроизма (КД), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и динамического светорассеяния.

Аминокислотная последовательность RL2 обогащена положительно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Вероятно, такой состав обеспечивает электростатическое взаимодействие пептида с плазматической мембраной.

MNQKQPACHENDERPFYQKTAPYVPMYYVPNSYPYYGTNLYQRRPAIAINNPYVPRTY
YANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRRPNLHPSFIAIPPKKIQDKIIPPTIGGSHHHHHH

Рис. 5. Аминокислотная последовательность RL2. Красным цветом выделены положительно заряженные аминокислотные остатки, зелёным – гидрофобные и алифатические аминокислотные остатки.

Для исследования вторичной структуры RL2 в различных средах и её термодинамической стабильности, был проведен анализ спектров КД RL2 при температурах от 10 до 90°C в физиологическом растворе и в 50% трифторэтаноле (ТФЭ). Полученные данные свидетельствуют о том, что RL2 является частично упорядоченным пептидом. Для определения локализации упорядоченного участка пептида RL2, был проведен ЯМР-спектроскопический анализ RL2, меченного парамагнитной меткой MTSL по цистеину в 8 положении. Полученные данные подтвердили, что N-конец RL2 имеет упорядоченную вторичную структуру.

При нагревании в водном растворе во вторичной структуре RL2 происходит увеличение доли α -спиралей на ~ 10%. При последующем охлаждении структура денатурированного пептида восстанавливается. Таким образом, RL2 является обратимо денатурирующим пептидом.

В 50% трифторэтаноле вторичная структура RL2 термодинамически стабильна, а при температурах выше 10°C коррелирует со структурой в физиологическом растворе при 90°C. Таким образом, частично упорядоченный белок RL2 способен к дальнейшей структуризации в мембраноподобных средах.

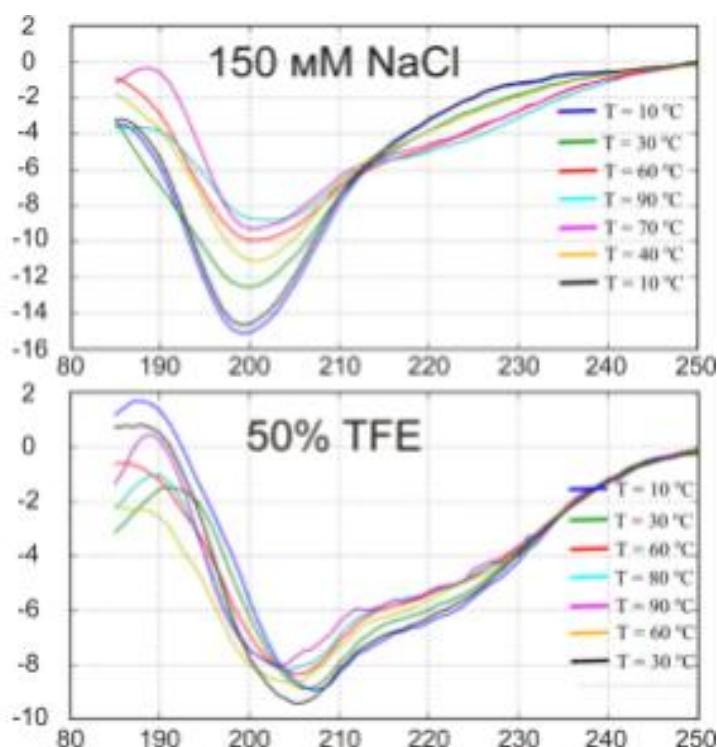


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма RL2, полученные в процессе температурной денатурации и ренатурации в физиологическом растворе и 50% ТФЭ.

Поскольку RL2 – фрагмент κ-казеина, известного своей способностью образовывать олигомеры и агрегаты, размер частиц RL2 был измерен методом светорассеяния. Было обнаружено, что RL2 представляет собой смесь моно-, ди-, олигомерных форм и агрегатов. Диаметр мономерного и димерного RL2 составляет 7 нм, олигомеров около 194 нм, а агрегатов – более 1 мкм. Кроме того, на диаметр олигомерных частиц и их представленность в растворе влияют такие факторы, как pH и ионная сила. В условиях близких к внеклеточному пространству, RL2 находится преимущественно в олигомерной форме с диаметром частиц 770 нм.

Анализ аминокислотного состава, вторичной структуры RL2 и способов его проникновения в клетки, показал схожесть RL2 с пептидами класса CPP (Cell-penetrating Peptides). Структура большинства пептидов CPP обогащена положительно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Такой аминокислотный состав позволяет им взаимодействовать с плазматической мембраной и что способствует его поглощению как по пути эндоцитоза, так и по пути прямого проникновения через плазматическую мембрану. Неупорядоченные CPP способны динамично изменять вторичную структуру, а также локально концентрироваться при взаимодействии с клеточной мембраной, что обеспечивает их прямое проникновение через клеточную мембрану.

Такое сходство свойств позволяет нам отнести RL2 к классу CPP и предположить, что механизм проникновения RL2 в клетки, альтернативный эндоцитозу – прямое проникновение через плазматическую мембрану, характерное для CPP.

Эффективность доставки нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2

Известно, что пептиды класса CPP способны проникать внутрь клеток, а также доставлять широкий спектр связанных с ними молекул, таких как наночастицы, белки, антибиотики, нуклеиновые кислоты и т.д. Доставка грузовых молекул осуществляется в виде как ковалентных, так и нековалентных комплексов.

Поскольку RL2 обладает свойствами CPP, его способность доставлять грузовые молекулы в клетки была изучена на примере плазмидной ДНК pEGFP, кодирующей зеленый флуоресцентный белок EGFP. Анализ нековалентного связывания RL2 с pEGFP в составе комплексов, был проведен методом ретардации в агарозном геле. Нековалентные комплексы RL2 : pEGFP получали в результате смешивания пептида с ДНК в

соответствии с рассчитанным зарядным соотношением N/P. Соотношение рассчитывали по следующей формуле:

$$N/P = \frac{n(\text{NH}_3^+ \text{ групп в RL2})}{m(\text{PO}_4^- \text{ групп в плазмиде})}$$

Электрофоретический анализ показал, что количественное связывание RL2 с плазмидой наблюдается при N/P = 2. При увеличении N/P до 5 вся плазмида оказывается связанной с RL2 (Рис. 7).

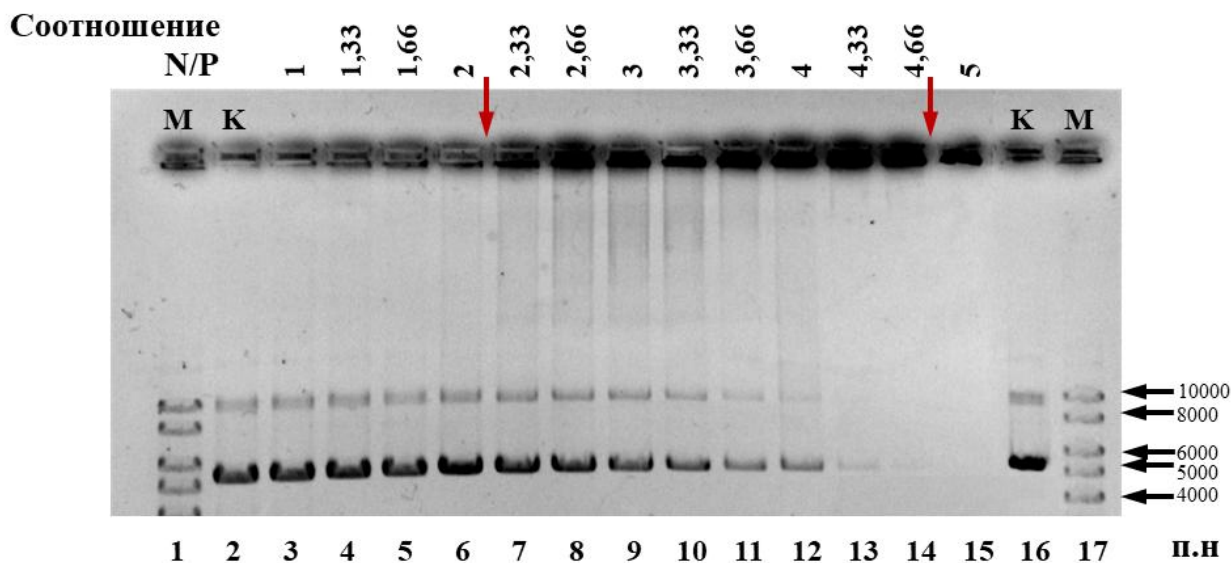


Рис. 7. Электрофоретический анализ RL2-pEGFP в 0,5% агарозном геле Дорожки: 1 и 17 – маркер, 2 и 16 – pEGFP (K); 3 и 15 – комплексы RL2-pEGFP с N/P от 1 до 5. Стрелками обозначены начало и количественного связывания RL2 с плазмидой и момент, связывания всей ДНК.

Чтобы оценить возможность внутриклеточной доставки pEGFP с помощью RL2, нековалентный комплекс RL2-pEGFP добавляли к клеткам аденокарциномы легкого A549. Клетки, трансформированные комплексом RL2-pEGFP, анализировали методом флуоресцентной микроскопии (Рис.8).

На рисунке 8, видно, что плазмида не проникает в клетки сама по себе, тогда как в клетках, инкубированных в присутствии комплексов RL2-pEGFP наблюдается, экспрессия зеленого флуоресцентного белка. Причём чем больше концентрация RL2 в комплексе, тем больше количество клеток, экспрессирующих EGFP. При N/P = 9 количество флуоресцирующих клеток сопоставимо с клетками, трансфицированными коммерчески доступным реагентом Lipofectamin.

Таким образом RL2 способен доставлять плазмидную ДНК в клетки человека.

Зависимость свойств комплексов RL2-pEGFP от их состава

Размеры и поверхностный заряд комплексов RL2-pEGFP с различными зарядными соотношениями были охарактеризованы методом динамического светорассеяния.

Оказалось, что размер комплексов изменяется незначительно увеличением количества RL2 в комплексах (N/P от 4,7 до 9) и оставляет около 110 нм, что меньше размеров RL2 и pEGFP по отдельности. Таким образом, обе молекулы компактизируются при формировании комплексов.

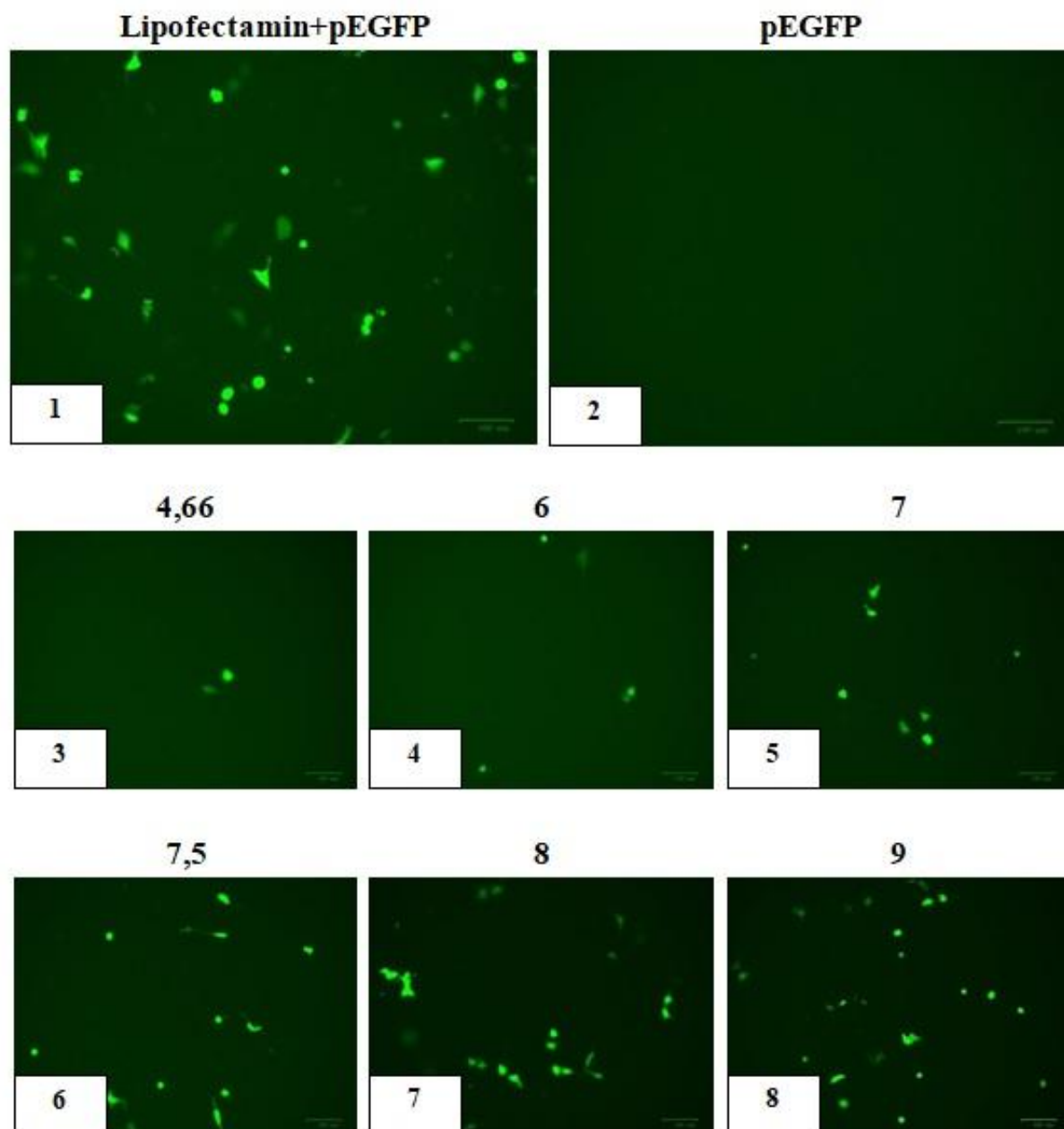


Рис. 8 Доставка pEGFP в клетки A549 1 –реагентом Lipofectamine; 2 – в свободной форме; 3-8 – пептидом RL2 в составе нековалентного комплекса RL2-pEGFP с соотношением N/P от 4,66 до 9.

Из данных рисунка 9 видно, что показало, что поверхностный заряд комплексов растет пропорционально N/P, приближаясь к поверхностному заряду олигомерной формы RL2. Таким образом, чем больше N/P комплекса, тем больше RL2 на его поверхности.

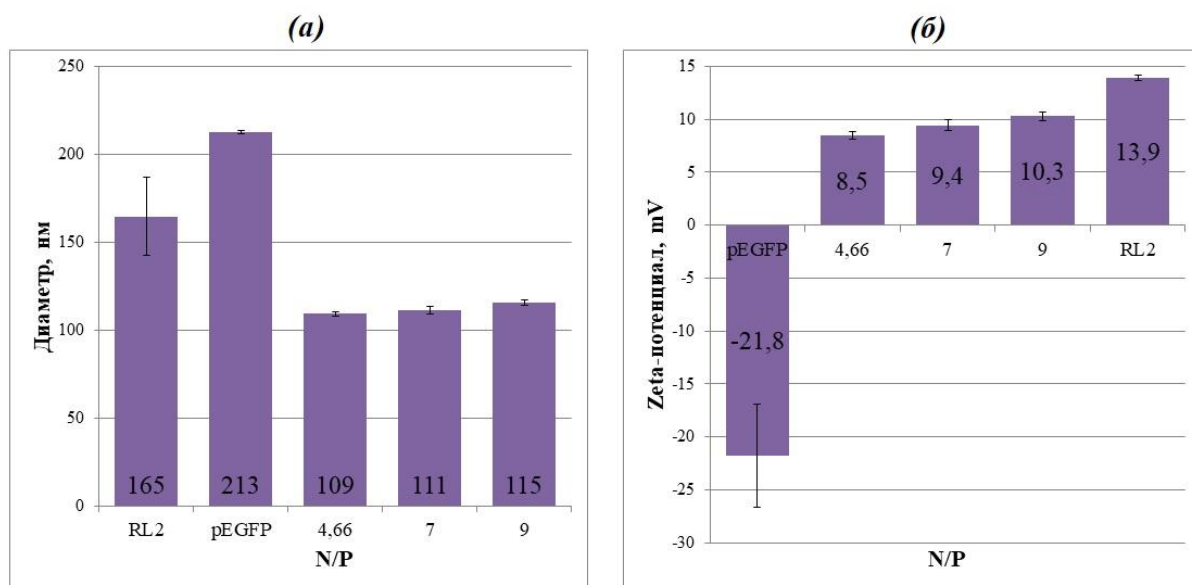


Рис. 9 Гидродинамический диаметр (а) и ζ -потенциал (б) комплексов RL2-pEGFP с зарядными соотношениями 4,66, – 9.

Мы можем предположить, что более эффективная трансформация клеток комплексами с большим N/P, связана с большим электростатическим взаимодействием комплексов с плазматической мембраной клеток или с большей сохранностью плазмиды в культуральной среде. Также это может быть связано с более эффективным выходом из цитоплазму из эндосом.

Выводы

1. Согласно данным проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии RL2 проникает в клетку частично по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и частично по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану.
2. Исследование структуры RL2 позволяют заключить, что RL2 – нестрого упорядоченный пептид с частично упорядоченным N-концом. Структура RL2 способна к частичной структуризации в мембраноподобных средах.
3. RL2 способен доставлять плазмидную ДНК в клетки в составе нековалентных комплексов.
4. В совокупности структура и механизм проникновения RL2 в клетки позволяют заключить, что он обладает свойствами CPP.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка ВАК:

Чинак О.А., Фомин А.С., Нуштаева А.А., Коваль О.А., Савельева А.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 4. – с. 401–410

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Чинак Ольга Александровна

«Структура противоопухолевого пептида лактапина и механизм его
проникновения в клетки человека»

Оценка оригинальности: 94.71%

Заимствования: 5.29%

№ документа: 995681

Имя исходного файла: Научный_доклад_Чинак.docx

Размер файла: 1.6 МБ

Размер текста: 10958

Слов в тексте: 1554

Число предложений: 71

Источники (доля в тексте – ссылка):

10.2% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

11.2% <http://www.list-org.com/company/814678>

11.2% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

5.4% <http://vvsu.ru/enter/high/asp/profile/disciplines/line/933/id/33770>

7.6% <https://docplayer.ru/32215216-Federalnoe-gosudarstvennoe-byudzhethnoe-uchrezhdenie-nau...>

10.4% <http://earthpapers.net/apoptoz-rakovyh-kletok-cheloveka-indutsiruemyy-rekombinantnym-...>

10.4% <http://geum.ru/aref/apoptoz-rakovih-kletok-cheloveka-induciruemyy-rekombinantnim-anal...>

17.7% <http://www.nanonewsnet.ru/articles/2009/dostavka-genov-v-kletku>

11.5% <http://naukarus.com/atsetonitril-v-vysokih-kontsentratsiyah-vyzyvaet-perehod-a-spiral...>

6.9% <https://www.bruker.com/ru/applications/pharma-biopharma/quality-assurance/vibrational...>

8.4% <http://earthpapers.net/konformatsionnye-izmeneniya-molekulyarnogo-shaperona-groel-v-r...>

5.3%

https://studbooks.net/1866911/meditsina/neposredstvennoe_peremeschenie_virusa_kletoch...

5.7% <http://biology-of-cell.narod.ru/cytoplasm13.html>

5.3% <https://biomolecula.ru/articles/dostavka-lekarstvennykh-preparatov-na-osnove-retseptov...>

Оригинальность работы составляет ___94.71___ % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум