

На правах рукописи



**ЧИНАК ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА**  
**СТРУКТУРА ПЕПТИДА RL2 И МЕХАНИЗМ ЕГО ПРОНИКНОВЕНИЯ**  
**В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.3 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

**Рихтер Владимир Александрович**, к.б.н.

**Кулигина Елена Владимировна**, к.б.н.

Официальные оппоненты:

**Жарков Дмитрий Олегович**, д.б.н., доцент., чл.корр. РАН,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, зав. лаб.

**Есипов Роман Станиславович**, д.х.н., Государственный  
Научный Центр Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г.н.с.,  
зав. лаб.

**Карпенко Лариса Ивановна**, д.б.н., доцент, Федеральное  
бюджетное учреждение науки Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по  
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия  
человека., в.н.с.

Защита состоится «15» сентября 2023 г. в 10:00  
на заседании диссертационного совета ИХБФМ. при Институте  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:  
630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте  
<http://www.niboch.nsc.ru>.

Автореферат разослан «10» августа 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.х.н.



Пестряков П.Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Плазматическая мембрана клетки непроницаема для макромолекул и гидрофильных соединений, что, в частности, значительно снижает эффективность проникновения в клетку лекарственных препаратов. Таким образом, способ взаимодействия биологически активных молекул с клетками-мишенями и их проникновение внутрь клетки необходимо учитывать при разработке новых лекарственных препаратов.

CPP (Cell-penetrating peptides) – это специфический класс пептидов, способных с высокой эффективностью проникать через плазматическую мембрану клеток, благодаря особенностям их физико-химических свойств. Наиболее общими особенностями структуры CPP являются значительное содержание положительно заряженных, а также гидрофобных аминокислотных остатков, сближенных в пространственной структуре пептида. Длина CPP, как правило, не превышает 30 - 40 а.о. (Kauffman W. et al., 2015). CPP способны доставлять в клетки молекулы различной природы, состава и размера, например, белки и нуклеиновые кислоты. На основе CPP создано множество противовоспалительных и противоопухолевых агентов. В настоящее время согласно данным ресурса [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) более 25 препаратов на основе CPP проходят клинические испытания.

Ранее в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен фрагмент каппа-казеина с молекулярной массой 8,6 кДа, индуцирующий апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 в культуре. Этот пептид был назван лактаптином. Был получен ряд рекомбинантных аналогов лактаптина, из которых аналог RL2, наиболее близкий по свойствам к природному пептиду, был выбран для дальнейших исследований. Было показано, что RL2 проникает в цитоплазму как онкотрансформированных, так и здоровых клеток человека, индуцируя апоптотическую гибель лишь раковых клеток и не снижая жизнеспособность немалигнизированных (Semenov D. et al., 2010). Аминокислотный состав RL2 и его способность эффективно проникать в цитоплазму различных клеток делают его похожим на пептиды CPP, однако для отнесения RL2 к CPP этих данных было недостаточно. Настоящая работа посвящена изучению структуры и механизма проникновения в клетку рекомбинантного аналога лактаптина, RL2.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось изучение структуры и механизма проникновения в клетки рекомбинантного аналога лактаптина RL2 и исследование возможности использования RL2 для доставки в клетки нуклеиновых кислот.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Установить вторичную структуру рекомбинантного аналога лактапина RL2.
2. Исследовать возможные механизмы проникновения RL2 в опухолевые клетки человека.
3. Оценить возможность использования RL2 для доставки нуклеиновых кислот различной длины и состава в клетки человека.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.**

При изучении структуры рекомбинантного аналога лактапина RL2 показано, что препарат RL2 представляет собой смесь аддукта мономера RL2 с  $\beta$ -меркаптоэтанолом и димера RL2, стабилизированного межмолекулярными дисульфидными (S-S) связями.

При исследовании вторичной структуры RL2 установлено, что RL2 является неупорядоченным пептидом, склонным к  $\alpha$ -спирализации в мембраноподобном окружении. Идентифицирован участок  $\alpha$ -спирализации.

Показано, что RL2 проникает в клетку частично по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и частично - по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану.

Установлено, что RL2 способен доставлять в клетки нуклеиновые кислоты различной длины и состава (плазмидную ДНК, siРНК и мяоРНК) в составе нековалентных комплексов.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Рекомбинантный аналог лактапина RL2 – нестрого упорядоченный пептид, способный к частичной структуризации в мембраноподобном окружении и при повышении температуры в физиологическом растворе. Препарат RL2 представляет собой смесь димера и аддукта мономера RL2 с  $\beta$ -меркаптоэтанолом.
2. RL2 проникает в клетку по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и прямым проникновением через плазматическую мембрану.
3. Структура, свойства и механизм проникновения RL2 в клетки позволяет отнести этот пептид к пептидам класса CPP (Cell-Penetrating Peptides).
4. RL2 способен доставлять в опухолевые клетки человека нуклеиновые кислоты различной длины и состава в составе нековалентных комплексов.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых международных и российских журналах. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Новосибирск, 2015), Медико-биологический форум «Биомедицина–2016» (Новосибирск, 2016), Объединённый научный форум, включающий Международную научную конференцию по биоорганической химии «XII чтения памяти

академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017), Международный конгресс Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2017), Международная конференция «Постгеном 2018» (Казань, 2018). Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Дагомыс, 2019), Международные конгрессы FEBS и YSF FEBS «Molecules of life: Toward new horizons» (онлайн-конференция, 2021).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка цитированной литературы и приложения А. Работа изложена на 135 страницах, включает 41 рисунок, 4 таблицы и приложение с 6 рисунками. Список литературы содержит 202 литературных источника.

**Вклад автора.** Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с его непосредственным участием. Исследование структуры RL2 методом ЯМР спектроскопии выполнено в Лаборатории магнитного резонанса биомолекулярных систем НИОХ СО РАН к.х.н., с.н.с. Шернюковым А.В. и м.н.с. Овчеренко С.С. Анализ формы частиц RL2 методом атомно-силовой микроскопии проведён в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН к.ф.-м.н. Голышевым В.М. Исследование доставки нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2 проведено совместно с м.н.с. Патраковой Е.А. (лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Структура рекомбинантного аналога лактапина RL2

#### 1.1. Первичная структура RL2

Рекомбинантный аналог лактапина RL2 содержит фрагмент κ-казеина с 23 по 134 а.о., N-концевой остаток метионина и олигогистидиновую последовательность на C-конце, облегчающую процесс хроматографической очистки пептида (Патент РФ № 2317304). Первичная структура RL2 представлена на рисунке 1.

MN**Q**K**Q**PAC**H**E    N**D**E**R**P**F**Y**Q**K**T**    A**P**Y**V**P**M**Y**Y**V**P**    N**S**Y**P**Y**Y**G**T**N**L**  
**Y****Q****R****R**P**A**I**A**I**N**    N**P**Y**V**P**R**T**Y**Y**A**    N**P**A**V****V**R**P**H**A****Q**    I**P****Q****R****Q****Y**L**P**N**S**  
**H**P**P**T**V**V**R**R**P**N    L**H**P**S**F**I**A**I**P**P**    K**K**I**Q**D**K**I**I**I**P**    T**I**G**G**S**H**N**H**N**H**N    H

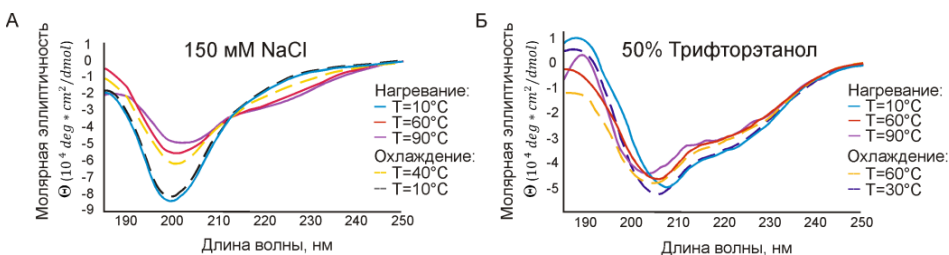
**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность RL2. **Красным** цветом выделены положительно заряженные аминокислотные остатки, **зелёным** – гидрофобные и алифатические аминокислотные остатки.

RL2 имеет суммарный положительный заряд, а его аминокислотная последовательность обогащена гидрофобными аминокислотными остатками, образующими кластер в районе с 21 по 41 а.о.

RL2 на 16,5% состоит из остатков пролина. Иминогруппа пролина не может входить в состав  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складок, что накладывает значительные ограничения на образование элементов вторичной структуры пептида RL2. Многие остатки пролина в структуре RL2 сближены с остатками глутамина (3 - 6, 42 - 45, 67 - 78, 99 - 104 а.о.). Такие Pro, Gln-богатые сайты широко распространены в структуре казеиновых белков и стимулируют неспецифические белок-белковые взаимодействия, приводя к слипанию молекул белков.

### 1.2. Вторичная структура RL2

Чтобы оценить вторичную структуру RL2 и её термодинамическую стабильность в гидрофильном и гидрофобном окружении, были сняты спектры кругового дихроизма RL2 в физрастворе и в 50% трифторэтаноле в диапазоне температур от 10 до 90° С.



**Рис. 2.** Спектры кругового дихроизма RL2, полученные при температурной денатурации и ренатурации пептида, в физиологическом растворе (А) и в 50% трифторэтаноле (Б).

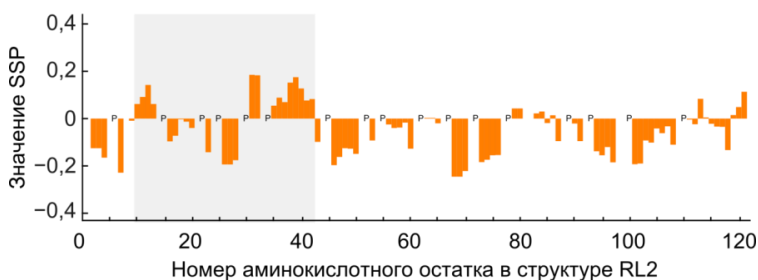
Спектры RL2 в физрастворе характеризуются глубоким минимумом при 198 нм, который указывает на большую долю неупорядоченных участков в структуре пептида. Нагревание раствора RL2 до 90° С приводит к уменьшению глубины этого пика, что говорит об уменьшении количества неупорядоченных участков. Более того, этот пик смещается вправо в сторону 206 нм, а в районе 222 нм появляется пик с молярной эллиптичностью меньше нуля. В совокупности, появление пиков на 206 и 222 нм указывает на то, что содержание  $\alpha$ -спиралей увеличивается. Спектр денатурированного RL2 после охлаждения практически не отличается от исходного спектра (голубая и черная линии), это свидетельствует о том, что денатурация RL2 обратима.

В 50% трифторэтаноле вторичная структура RL2 термодинамически стабильна, то есть практически не изменяется при повышении температуры от 10°С до 90°С (голубая и фиолетовая линии, соответственно). При этом,

структура RL2 в гидрофобных условиях сходна с его структурой в физиологическом растворе при 90°C.

Таким образом, в структуре частично упорядоченного пептида RL2 при нагревании в физрастворе происходит образование или стабилизация  $\alpha$ -спиралей. При этом, денатурация RL2 при нагревании до 90°C является обратимой. Структура RL2 при 90°C в физрастворе схожа с его структурой в гидрофобном окружении.

Для определения локализации участка RL2, который  $\alpha$ -спирализуется при нагревании, были сняты спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и на их основе проведен расчет показателя SSP (secondary structure propensity), который показывает склонность каждого аминокислотного остатка к образованию альфа- или бета- структуры. Значения выше нуля указывают на тенденцию к образованию альфа-спиралей, а меньше нуля – бета-складок.



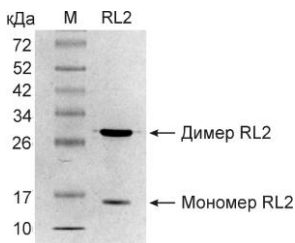
**Рис. 3.** Значения величин SSP для аминокислотных остатков RL2, рассчитанные из данных спектров ЯМР RL2 (химических сдвигов ядер Ca, C $\beta$  и Na каждого аминокислотного остатка, извлеченных после отнесения сигналов в стандартной совокупности белковых спектров тройного резонанса  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), обогащённого тяжёлыми изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ . Спектры ЯМР и значение SSP получены сотрудником НИОХ СО РАН к.х.н., с.н.с. Шернюковым А.В.

На рисунке 3 можно видеть, что значения SSP не превышают 0,25 по абсолютной величине. Это означает, что аминокислотные остатки существуют в виде  $\alpha$ -спирализованных или  $\beta$ -складчатых элементов не более 25% времени. При этом, в структуре RL2 лишь в районах с 9 по 12 и с 35 по 42 а.о. подряд расположено 4 и более аминокислотных остатка с тенденцией к  $\alpha$ -спирализации.

Таким образом, участки RL2 с 9 по 12 и с 35 по 42 а.о способны приобретать или стабилизировать конформацию  $\alpha$ -спирали в мембраноподобных средах и при нагревании в физиологическом растворе.

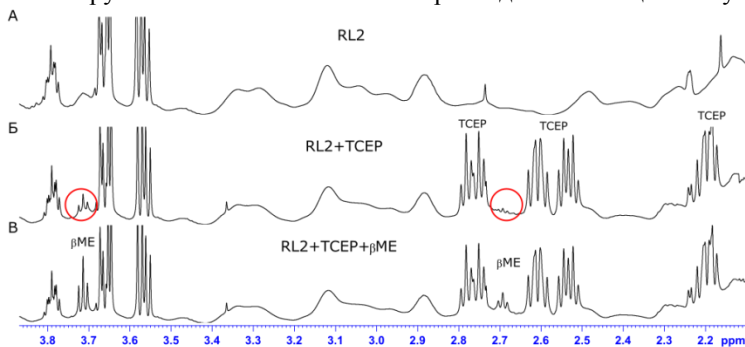
### 1.3 Димеризация RL2

RL2 содержит один остаток цистеина. Согласно данным электрофоретического анализа в невозстанавливающих условиях, RL2 представляет собой смесь димерной и мономерной форм. (Рис. 4).



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ RL2 в 13% ПААГ в невозстанавливающих условиях. М – набор белков с известными молекулярными массами.

Чтобы проверить, не связан ли цистеин мономерного RL2 с малой молекулой, блокирующей димеризацию пептида, было необходимо удалить эту молекулу, восстановив Cys. Для этого был проведён анализ спектров ЯМР RL2 в присутствии и отсутствии восстановителя ТСЕР, который не содержит тиоловых групп и не может ковалентно присоединиться к цистеину (Рис. 5).



**Рис. 5.**  $^1\text{H}$  ЯМР спектры образца RL2, однородно обогащённого  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , в отсутствие восстановителей (А), в присутствии ТСЕР (Б) и в присутствии  $\beta\text{ME}$  и ТСЕР (В). Спектры ЯМР получены сотрудниками НИОХ СО РАН к.х.н., с.н.с. Шернюковым А.В. и м.н.с. Овчеренко С.С.

После добавления ТСЕР к образцу RL2, в спектре появились дополнительные пики, не относящиеся ни к ТСЕР, ни к RL2. Мы предположили, что эти пики могут соответствовать  $\beta$ -меркаптоэтанолу, присоединившемуся к RL2 в процессе получения и хроматографической очистки пептида. Для подтверждения данного предположения к этому же образцу был добавлен  $\beta$ -меркаптоэтанол. Относительная интенсивность исследуемых пиков увеличилась, при этом новых пиков обнаружено не было. Таким образом, препарат RL2 содержит аддукт RL2 с  $\beta$ -меркаптоэтанолом (RL2- $\beta\text{ME}$ ).

#### **1.4 Гидродинамический диаметр частиц RL2**

RL2 содержит «липкие» последовательности, обогащенные остатками пролина и глутамина, что может приводить к образованию агрегатов. Чтобы



оценить диаметр частиц RL2, были сняты спектры динамического светорассеяния RL2 в буферных растворах с pH 5,5 - 8,0 в присутствии и в отсутствие 150 мМ хлорида натрия (Табл.1).

Таблица 1. Зависимость диаметра частиц RL2 от pH и ионной силы.

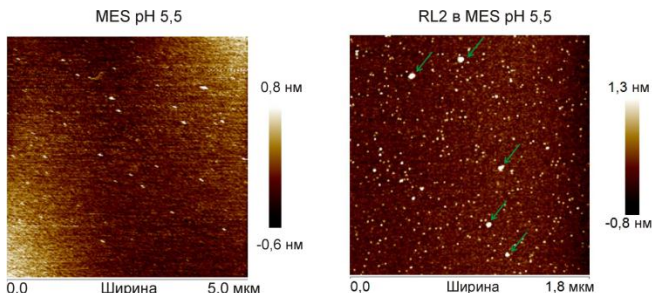
		pH 5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8
0 мМ NaCl	Малые частицы, нм	7,2 ± 0,7	6,9 ± 0,5	-	7,0 ± 0,9	7,0 ± 0,8	-
	Большие частицы, нм	220,3 ± 60,8	210,5 ± 55,6	254,9 ± 58,6	147,8 ± 27,3	161,5 ± 39,4	170,7 ± 21,1
150 мМ NaCl	Малые частицы, нм	6,6 ± 0,1	6,2 ± 0,3	-	-	-	-
	Большие частицы, нм	196,1 ± 25,8	241,7 ± 40,8	255,9 ± 52,7	295,2 ± 18,1	699,4 ± 59,2	721,1 ± 35,0

Из данных таблицы видно, что в отсутствие соли при pH от 5,5 до 7,5 образец RL2 содержит два вида частиц: с диаметрами около 7 и более 140 нм. В присутствии NaCl в кислых условиях также обнаруживаются частицы около 7 нм, однако уже при pH 6,5 частицы с малым диаметром отсутствуют. При этом увеличение pH приводит к резкому увеличению диаметра частиц от 196 до 721 нм.

В ранее снятых ЯМР спектрах видны лишь частицы RL2 с малым диаметром. При этом были обнаружены лишь остатки Cys, связанные с β-меркаптоэтанолом, но не остатки цистина димерного RL2. Мы предполагаем, что это связано с большей склонностью димеров RL2 к образованию крупных частиц, которые не видны в спектре.

Метод динамического светорассеяния позволяет оценить гидродинамический диаметр частиц, который приближен к реальному диаметру лишь для сферических частиц. Форма частиц RL2 была исследована методом атомно-силовой микроскопии (Рис. 6). Полученные изображения показали, что в образце RL2 в буфере MES обнаруживаются как частицы буфера, так и более крупные частицы с высотой до 8 нм, которые предположительно соответствуют RL2. Визуально частицы RL2 имеют форму, приближенную к глобулярной.

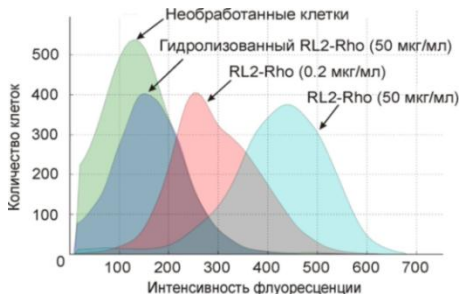
Таким образом, препарат RL2 представляет собой смесь гомодимера и аддукта RL2 с βМЕ. Частицы RL2 имеют глобулярную или овоидную форму, а их размер зависит от pH и ионной силы.



**Рис. 6.** Определение формы частиц RL2 в 25 mM MES методом атомно-силовой микроскопии. Стрелками обозначены частицы RL2. Микроскопия проведена в Лаборатории биомедицинской химии к.ф.-м.н. Голышевым В.М.

## 2. Проникновение RL2 в клетки

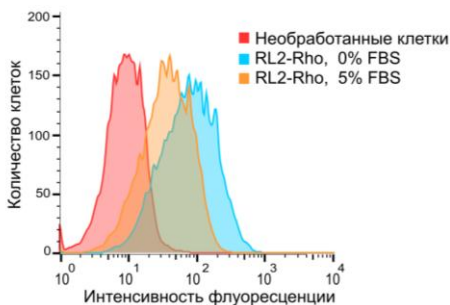
Исследование эффективности проникновения RL2 в клетку было оценено методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 7). Для этого клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 инкубировали с RL2, меченным флуоресцентным красителем 5(6)-карбокситетраметилпроламином (RL2-Rho). После чего конъюгат удаляли с поверхности клеток трипсином.



**Рис. 7.** Диаграмма распределения клеток MCF-7, инкубированных с RL2-Rho (0,2 - 50 мкг/мл) или RL2-Rho, гидролизированным протеиназой К, по интенсивности флуоресценции.

Чтобы понять, не обусловлено ли проникновение конъюгата RL2-Rho в клетки свойствами красителя, клетки также были обработаны конъюгатом, гидролизированным протеиназой К. Из представленных данных видно, что интенсивность флуоресценции клеток MCF-7, инкубированных с гидролизированным конъюгатом, практически не отличается от интенсивности флуоресценции необработанных клеток. Таким образом, проникновение RL2-Rho в клетки обусловлено свойствами RL2, а не флуоресцентного красителя. Также можно видеть, что при увеличении концентрации конъюгата в культуральной среде от 0,2 до 50 мкг/мл, интенсивность флуоресценции клеток значительно увеличивается, что указывает на дозозависимое проникновение RL2-Rho в клетки в этом диапазоне концентраций.

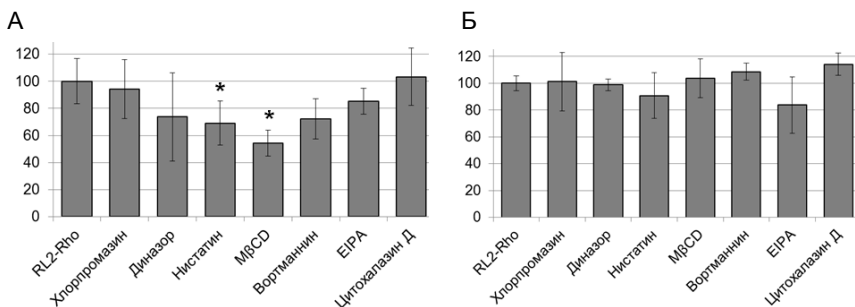
При подборе условий проведения эксперимента оказалось, что наличие в культуральной среде сыворотки снижает эффективность проникновения RL2-Rho в клетки. Вероятно, это происходит из-за связывания RL2 с отрицательно заряженными белками сыворотки. (Рис. 8).



**Рис. 8.** Проникновение RL2-Rho в концентрации 50 мкг/мл в клетки MCF-7 в присутствии и в отсутствие 5% FBS.

### 2.1 Анализ путей эндоцитоза RL2 в раковые клетки человека

Для исследования возможных путей эндоцитоза RL2 в клетки, клетки прединкубировали 30 минут с одним из ингибиторов эндоцитоза, затем добавляли RL2-Rho и инкубировали ещё 60 минут. После чего конъюгат удаляли с плазматической мембраны трипсином и анализировали клетки методом проточной цитофлуорометрии.



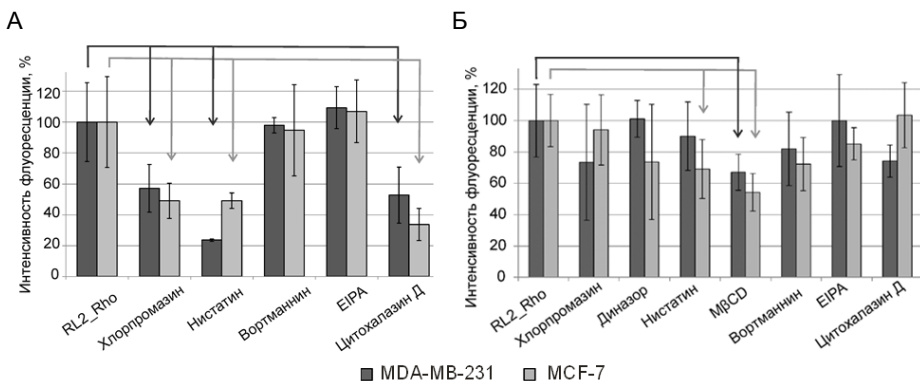
**Рис. 9.** Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho в концентрации 10 мкг/мл (А) и 50 мкг/мл (Б) в клетки MCF-7 в присутствии 5% FBS; \* –  $p \leq 0,05$ . Достоверность различия между средними значениями распределений оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

На рисунке 9 представлены данные исследования зависимости эффективности проникновения конъюгата RL2-Rho в клетку от его концентрации в культуральной среде. Показано, что в присутствии сыворотки при концентрации конъюгата 50 мкг/мл ни один из ингибиторов эндоцитоза достоверно не влиял на его проникновение в клетки MCF-7 (Рис. 9Б). При концентрации RL2-Rho 10 мкг/мл нистатин и MβCD достоверно снижали

эффективность проникновения (Рис. 9А). Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана именно эта концентрация RL2-Rho.

При исследовании влияния ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho в клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 в отсутствие сыворотки было показано, что в бессывороточных условиях достоверно подавляют эндоцитоз родаминового конъюгата ингибитор клатринзависимого эндоцитоза – хлорпромазин, макропиноцитоза – цитохалазин Д и ингибитор пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами – нистатин (Рис. 10А).

При наличии сыворотки в культуральной среде к снижению эффективности проникновения конъюгата приводят лишь ингибиторы пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами – нистатин или MβCD. Эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231 в присутствии MβCD составляет 67%, а в клетки MCF-7 в присутствии нистатина и MβCD – 70% и 54%, соответственно (Рис. 10Б).

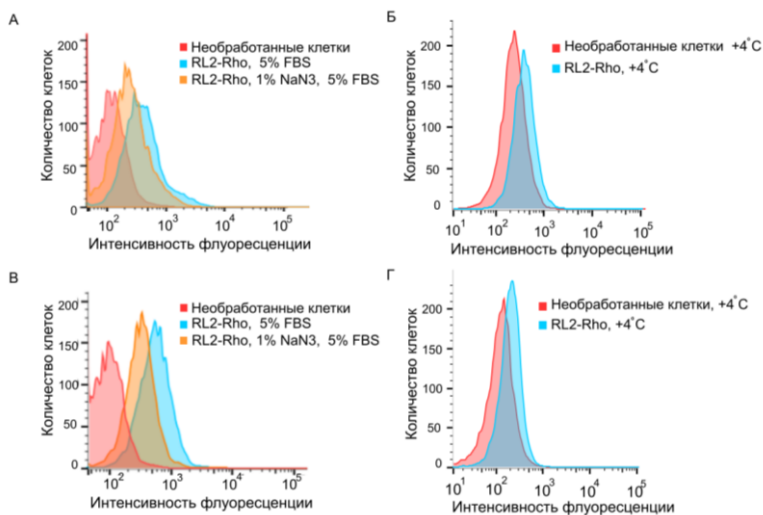


**Рис. 10.** Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho (10 мкг/мл) в клетки MCF-7 и MDA-MB-231 в отсутствие (А) и в присутствии 5% FBS (Б); Стрелками отмечены достоверные изменения интенсивностей флуоресценции,  $p \leq 0,05$ . Достоверность различия между средними значениями распределений оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Таким образом, единственный путь эндоцитоза, по которому RL2 проникает в клетку как в присутствии, так и в отсутствие сыворотки – это эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами. При этом в присутствии сыворотки ни один из ингибиторов эндоцитоза не блокирует проникновение RL2 в клетки.

Чтобы понять, существует ли альтернативный эндоцитозу путь проникновения RL2 в клетку, мы ингибировали весь эндоцитоз двумя способами: химическим, инкубируя клетки с азидом натрия - блокатором синтеза АТФ в клетке, и физическим, культивируя клетки при температуре

+4° С, что значительно замедляет большинство метаболических процессов и, в частности, ингибирует эндоцитоз (Рис. 11).



**Рис. 11.** Ингибирование эндоцитоза RL2-Rho (10 мкг/мл) в клетках MCF-7 (А, Б) и MDA-MB-231 (В, Г) с помощью азид натрия (А, В) и при понижении температуры до +4°С (Б, Г).

Согласно полученным данным RL2-Rho проникает в клетки MDA-MB-231 и MCF-7 и при инкубации с азидом натрия в присутствии (Рис. 10 А и В) и в отсутствие сыворотки (данные не представлены), и при пониженной температуре в бессывороточной среде (Рис. 10 Б и Г). Следовательно, RL2 способен проникать в клетки по механизму, альтернативному эндоцитозу, вероятно, – прямым проникновением через клеточную мембрану.

Таким образом, RL2 обогащен гидрофобными аминокислотными остатками, имеет положительный заряд, является неупорядоченным пептидом, способным динамично изменять вторичную структуру, и может проникать в клетку как эндоцитозом, так и прямым проникновением через мембрану. Все вышеперечисленные свойства позволяют отнести RL2 к пептидам CPP.

### 3. Доставка нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2

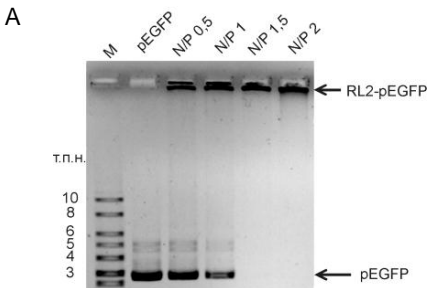
В настоящее время генная терапия является быстроразвивающейся областью наномедицины, поскольку технологии, позволяющие регулировать экспрессию генов с помощью доставляемых в клетки НК, в перспективе могут стать основой терапевтических подходов для лечения многих заболеваний, не поддающихся коррекции на сегодняшний день.

Поскольку RL2 обладает свойствами CPP, было интересно исследовать его способность доставлять в клетки биологически активные нуклеиновые кислоты (НК) разной длины и состава.

### 3.1 Доставка длинной двухцепочечной ДНК в клетки с помощью RL2

#### 3.1.1 Анализ физико-химических свойств комплекса RL2-pEGFP

Возможность доставки с помощью RL2 длинной двухцепочечной ДНК оценивали на примере плазмидной ДНК pEGFP, несущей ген зеленого флуоресцентного белка. Нековалентные комплексы были сформированы в соответствии с зарядным соотношением N/P, рассчитанным по формуле (Рис. 12Б). Связывание RL2 с pEGFP при образовании комплексов оценивали методом ретардации в агарозном геле (Рис. 12А).



**Б**

где  $n = 23$ ,  $m = 9400$ ,  $C$  – концентрация в моль/л

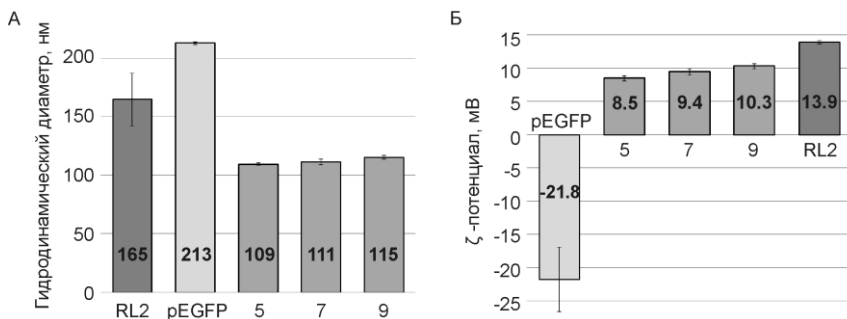
$$N/P = \frac{n(" + " \text{заряженных групп в RL2}) \times C_{RL2}}{m(\text{PO}_4^- \text{ групп в ДНК})} \times \frac{C_{RL2}}{C_{\text{ДНК}}}$$

**Рис. 12.** Электрофоретический анализ комплексов RL2-pEGFP в 0,5% агарозном геле (А). М – набор ДНК с известными молекулярными массами, pEGFP – плазида; N/P 0,5 - N/P 2 - комплексы RL2-pEGFP с зарядными соотношениями 0,5 – 2; Формула для расчёта зарядного соотношения N/P (Б).

Электрофоретический анализ комплексов с зарядными соотношениями менее 1 выявил свободную плазмиду, не вовлечённую в комплекс, и продукт с низкой подвижностью, соответствующий комплексу RL2-pEGFP. При N/P более 1,5 все молекулы плазмиды оказывались вовлечены в комплекс с RL2.

Для оценки размеров комплексов RL2-pEGFP и их поверхностного заряда были измерены гидродинамический диаметр и  $\zeta$ -потенциал комплексов методами динамического и электрофоретического светорассеяния, соответственно (Рис 13).

Из данных гистограммы (Рис. 13А) видно, что гидродинамические диаметры комплексов изменяются незначительно при увеличении количества RL2 в комплексе (при N/P от 5 до 9) и составляют 109 - 115 нм, что меньше, гидродинамических диаметров молекул RL2 и pEGFP в тех же условиях. Таким образом, при образовании комплекса происходит компактизация обоих компонентов. Согласно литературным данным, наночастицы такого размера способны эффективно проникать в клетки посредством эндоцитоза.



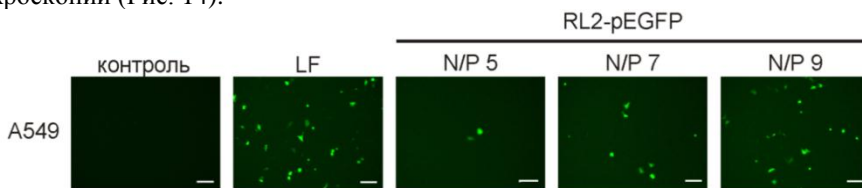
**Рис. 13.** Гидродинамический диаметр (А) и  $\zeta$ -потенциал (Б) комплексов RL2-pEGFP с зарядными соотношениями N/P 5 - 9. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Измерение  $\zeta$ -потенциала комплексов показало, что поверхностный заряд RL2-pEGFP в диапазоне N/P от 5 до 9 положителен и с ростом N/P комплексов увеличивается, приближаясь к значению поверхностного заряда RL2 (Рис. 13Б). Мы полагаем, что такое увеличение  $\zeta$ -потенциала обусловлено увеличением количества катионных групп молекул RL2, экспонированных на поверхность комплексов.

Таким образом, комплексы RL2-pEGFP с N/P от 5 до 9 положительно заряжены и имеют гидродинамический диаметр 109 - 115 нм.

### 3.1.2 Анализ проникновения RL2-pEGFP в клетки

Доставку pEGFP в клетки с помощью RL2 изучали на клетках аденокарциномы лёгкого человека A549 методом флуоресцентной микроскопии (Рис. 14).



**Рис. 14.** Уровень белка EGFP в клетках A549. Контроль - трансфекция клеток плазмидой pEGFP; LF - трансфекция клеток плазмидой с помощью липофектамина; N/P 5, N/P 7, N/P 9 - трансфекция клеток комплексами RL2-pEGFP с N/P = 5 - 9. Размер бара 100 мкм.

Эффективность доставки в клетки плазмиды pEGFP в комплексах с RL2 и с липофектаминами оценивали по наличию репортерного белка EGFP в клетках через 24 часа после начала инкубации клеток с препаратами. Полученные данные показывают, что в клетках, инкубированных с плазмидой без трансфицирующего агента, флуоресцентный сигнал отсутствует. В клетках,

инкубированных с комплексами RL2-pEGFP, происходит синтез EGFP, причём увеличение содержания RL2 в комплексах приводит к увеличению количества клеток, экспрессирующих EGFP.

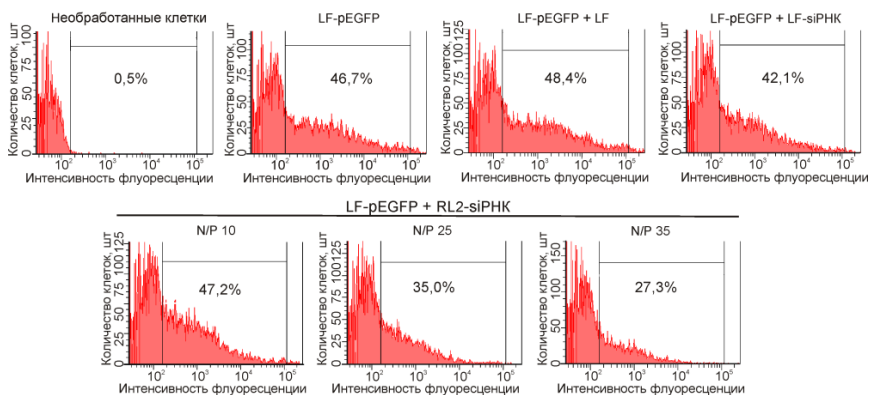
При N/P = 9 (соответствующем конечной концентрации RL2 в среде 10 мкг/мл) количество флуоресцирующих клеток сопоставимо с количеством клеток, экспрессирующих EGFP, при трансфекции липофектаминоом.

Таким образом, RL2 обеспечивает интернализацию плазмидной ДНК pEGFP в клетки в составе нековалентных комплексов RL2-pEGFP, сохраняя её функциональную активность.

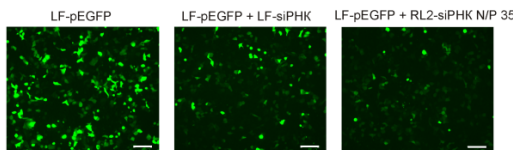
### 3.2 Доставка короткой двуцепочечной РНК в клетки с помощью RL2

Далее была исследована возможность доставки в клетки с помощью RL2 двуцепочечной РНК небольшого размера на примере siРНК. Для этого клетки A549 трансфицировали одновременно комплексом плазмиды pEGFP с липофектаминоом и комплексом RL2 с siРНК, нацеленной на ген *egfp*. Эффективность РНК интерференции оценивали методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии (Рис. 15).

А



Б



**Рис. 15.** Подавление уровня белка EGFP в клетках A549 при одновременной трансфекции клеток комплексами LF-pEGFP и RL2-siPHK; Цитофлуориметрический анализ (А); Микроскопический анализ (Б). Размер бара 100 мкм.



Полное связывание siРНК с RL2 происходит при зарядных соотношениях более 10, поэтому для эксперимента были сформированы комплексы RL2-siРНК с N/P 10, 25 и 35. Цитофлуориметрический анализ трансфицированных клеток показал, что чем больше зарядное соотношение комплексов RL2-siРНК, тем меньше количество флуоресцирующих клеток и интенсивность их флуоресценции. При зарядном соотношении комплексов больше 25 эффективность подавления гена-мишени выше, чем при обработке клеток siРНК в комплексе с Lipofectamine. При этом, количество RL2 во всех исследованных комплексах не достигало значения IC50 (при N/P = 35 концентрация RL2 в среде составляла 45 мкг/мл при IC50 = 390 мкг/мл).

Таким образом, siРНК в комплексе с RL2 проникает в клетку и эффективно высвобождается из комплекса, сохраняя свою биологическую активность.

### 3.3 Доставка короткой одноцепочечной РНК в клетки с помощью RL2

Эффективность доставки с помощью RL2 одноцепочечной РНК оценивали на примере синтетического аналога мяоРНК U25 длиной 70 нуклеотидов. U25 активирует каскад генов интерферонового ответа, снижая жизнеспособность раковых клеток человека *in vitro* (Nushtaeva A.A. et al., 2018).

Эффективность доставки цитотоксической мяоРНК, оценивали по снижению жизнеспособности клеток A549. МТТ анализ показал, что обработка клеток комплексами U25 с RL2 или с липофектаминам приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток (Рис. 16). При этом U25, LF и RL2 в использованных концентрациях не токсичны для клеток. Жизнеспособность клеток, инкубированных с комплексом LF-U25, достоверно ниже жизнеспособности клеток, обработанных комплексами RL2-U25 с зарядными соотношениями до 328 (что соответствует 0,15 мг/мл RL2).

Цитотоксическое действие комплексов RL2-U25 с меньшими зарядными соотношениями было ещё ниже, что подтверждает заключение о том, что эффективность доставки НК с помощью RL2 увеличивается с повышением зарядного соотношения комплексов.

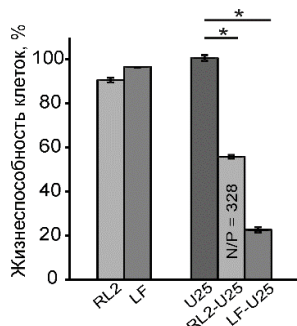


Рис. 16. Жизнеспособность клеток A549, обработанных аналогом мяоРНК U25 и комплексами RL2-U25 и LF-U25, \*P < 0,05.

Различие в цитотоксичности комплексов U25 с RL2 и с LF может быть связано с разницей в эффективности доставки РНК в клетку, эффективностью её диссоциации из комплексов, а также с различной устойчивостью аналога мяоРНК в культуральной среде и внутри клетки.

Таким образом, показано, что RL2 способен доставлять в клетки исследованные нуклеиновые кислоты, сохраняя их биологическую активность. Согласно полученным данным, эффективность доставки дцНК в клетки пропорциональна зарядному соотношению комплексов RL2 с НК, и наиболее эффективно RL2 доставляет короткую двуцепочечную РНК. Эффективность доставки короткой одноцепочечной РНК, помимо зарядного соотношения комплексов, определяется и другими факторами, требующими дополнительного изучения.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что RL2 представляет собой гомодимер, стабилизированный межмолекулярными дисульфидными связями. При добавлении  $\beta$ -меркаптоэтанола образуется аддукт мономера RL2 с малой молекулой. Молекулы RL2 склонны к агрегации и образуют частицы сферической или овоидной формы. При pH 5,5 и физиологической ионной силе RL2 существует преимущественно в виде частиц с гидродинамическим диаметром около 7 нм, а также в олигомерной форме, представленной частицами размером около 194 нм. При pH 7 и физиологической ионной силе RL2 существует в виде крупных частиц с гидродинамическим диаметром до 700 нм.
2. Установлено, что RL2 является нестрого упорядоченным пептидом. В гидрофобном окружении и в физиологическом растворе при повышении температуры от 10° С до 90° С в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о. образуется или стабилизируется  $\alpha$ -спираль.
3. Показано, что RL2 проникает в клетку частично по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и частично по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану как в присутствии, так и в отсутствие сыворотки. В бессывороточной среде RL2 также способен проникать в клетку макропиноцитозом и клатринзависимым эндоцитозом.
4. Полученные данные о структуре, свойствах и механизме проникновения RL2 в клетки позволяют отнести его к пептидам CPP.
5. Установлено, что RL2 способен доставлять в клетки нуклеиновые кислоты различного состава и длины (плазмидную ДНК, двуцепочечную siРНК и аналог одноцепочечной мяоРНК) в составе нековалентных комплексов с сохранением функциональной активности нуклеиновых кислот.

**Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. **Чинак О.А.**, Фомин А.С., Нуштаева А.А., Коваль О.А., Савельева А.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. Проникновение пептида лактапина в раковые клетки человека // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 4. – С. 401–410.
2. **Chinak O.A.**, Shernyukov A.V., Ovcherenko S.S., Sviridov E.A., Golyshev V.M., Fomin A.S., Pyshnaya I.A., Kuligina E.V., Richter V.A., Bagryanskaya E.G. Structural and Aggregation Features of a Human  $\kappa$ -Casein Fragment with Antitumor and Cell-Penetrating Properties // Molecules. – 2019. – V. 24. – N. 16. – P. e2919. – doi: 10.3390/molecules24162919.
3. **Chinak O.A.**, Patrakova E.A., Pyshnaya I.A., Stepanov G.A., Zhuravlev E.S., Richter V.A., Koval O.A. Nucleic Acids Delivery Into the Cells Using Pro-Apoptotic Protein Lactaptin // Front. Pharmacol. – 2019. – V. 10. – P. e1043. doi: 10.3389/fphar.2019.01043.

Подписано в печать 30.06.2023 г. Печать офсетная.  
Бумага офсетная. Формат бумаги 60x84, 1/16 печ.л. 1,27л  
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в типографии «Срочная полиграфия»  
ИП Малыгин Алексей Михайлович  
600090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф.104  
Тел. (383) 217-43-46, 8-913-922-19-07