

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Чинак Ольга Александровна

СТРУКТУРА ПЕПТИДА RL2 И МЕХАНИЗМ ЕГО ПРОНИКНОВЕНИЯ В
ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

1.5.3 Молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
к.б.н. Рихтер Владимир Александрович
к.б.н. Кулигина Елена Владимировна

Новосибирск – 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- A549 – клетки аденокарциномы лёгкого человека
- A431– клетки карциномы кожи человека
- AP – семейство адаптерных белков
- ARF6 – АДФ-рибозилтрансфераза человека (ADP-ribosylation factor 6)
- CPP – (Cell Penetrating Peptides) пептиды с высокой проникающей способностью
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DMEM – культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMEM/F-12 – культуральная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
- EIPA – 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид
- FITC – флуоресцеин-изотиоцианат
- FSC – прямое рассеяние света
- GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein)
- h-FF1 – фибробласты крайней плоти человека
- HoSu – N-гидроксисукцинимид
- Hsc70 – белок теплового шока (heat-shock cognate protein 70 kDa)
- IMDM – культуральная среда Iscove's Modified Dulbecco's Medium
- M β CD – метил- β -циклодекстрин
- MCF-7 – культура клеток аденокарциномы молочной железы человека
- MDA-MB-231 – культура клеток аденокарциномы молочной железы человека
- MSC – немалигнизированные стволовые клетки жировой ткани человека
- N/P – соотношение количества аминокрупп в рекомбинантном аналоге лактапина RL2 к количеству фосфатных групп в нуклеиновой кислоте
- L-15 – культуральная среда Leibovitz's L-15
- LF – Lipofectamine 3000
- NK – клетки натуральные киллеры
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PE – фикоэритрин
- pEGFP – плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок EGFP
- PMSF– Фенилметилсульфонилфторид
- R9 – нонааргинин (пептид с аминокислотной последовательностью RRRRRRRRR)
- RL2 – рекомбинантный аналог лактапина

RL2-Rho – конъюгат RL2 с 5(6) – карбокситетраметилпроламином
RPMI 1640 – культуральная среда Roswell Park Memorial Institute 1640
SP-сефароза – сульфопропилсефароза
SSC – боковое рассеяние света
TAMRA – 5(6)-карбокситетраметилпроламин
TAT – фрагмент белка трансактиватора транскрипции ВИЧ-1
FBS – эмбриональная бычья сыворотка (Fetal bovine serum)
X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-+бета-D-галактопиранозид
АСМ – атомная силовая микроскопия
а/а – антибиотик/антимикотик (10000 ЕД/мл пенициллина 0,1 мг/мл, стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина)
а.о. – аминокислотный остаток
БСА – бычий сывороточный альбумин
ГТФ – гуанозин-5'-трифосфат
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
ДМСО – диметилсульфоксид
ДСН – додецилсульфат натрия
ДЦК – N,N'-дициклогексил карбодиимид
ИПТГ – изопротилтиогалактозид
КД – круговой дихроизм
siРНК – малая интерферирующая РНК
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид
мяoРНК – малая ядрышковая РНК
НК – нуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – персульфат аммония
ТФЭ – трифторэтанол
ТЕАА – триэтиламмония ацетат
ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
ФЭУ – фотоэлектронный умножитель
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ОГЛАВЛЕНИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ПЕПТИДЫ СРР. СВОЙСТВА, МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1 Актуальность проблемы доставки лекарственных средств.....	11
1.2 История открытия СРР.....	11
1.3 Свойства и классификация СРР	15
1.4 Классификация СРР.....	17
1.4.1 Классификация СРР по физико-химическим свойствам	17
1.4.2 Классификация СРР по вторичной структуре	21
1.5 Механизмы проникновения СРР в клетки эукариот	22
1.5.1 Эндоцитоз СРР	25
1.5.2 Механизм прямого проникновения СРР в клетки эукариот	29
1.6 Функции СРР.....	34
1.7 Возможные применения СРР.....	35
1.7.1 СРР для доставки лекарственных средств в клеточные компартменты.....	39
1.8 Лактаптин и его рекомбинантные аналоги	42
1.9 Заключение.....	45
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	47
2.1 Материалы и оборудование	47
2.1.1 Реактивы и материалы.....	47
2.1.2 Плазмиды	48
2.1.3 Бактериальные штаммы	48
2.1.4 Буферные смеси и растворы.....	48
2.1.5 Растворы для хроматографии	49
2.1.6 Клеточные культуры.....	49
2.1.7 Олигодезоксирибонуклеотиды	49

2.1.8 Оборудование.....	50
2.2 Методы.....	50
2.2.1 Получение штаммов <i>E.coli</i> BL21(DE3), продуцирующих RL2	50
2.2.2 Биосинтез рекомбинантного белка RL2, обогащённого тяжёлыми изотопами ¹³ C, ¹⁵ N	50
2.2.3 Получение лизата и клеточного экстракта из биомассы клеток-продуцентов RL2	51
2.2.4 Хроматографическая очистка RL2	51
2.2.5 Измерение гидродинамического диаметра частиц RL2 и комплексов RL2-pEGFP методом динамического светорассеяния	52
2.2.6 Определение формы частиц RL2 методом атомно-силовой микроскопии	53
2.2.7 Исследование вторичной структуры RL2 методом спектроскопии кругового дихроизма	53
2.2.8 Синтез родаминового конъюгата RL2-Rho	53
2.2.9 Очистка RL2-Rho методом гель-фильтрации	54
2.2.10 Определение концентрации белка в растворе методом Бредфорда	54
2.2.11 Электрофоретический анализ белков в ПААГ	54
2.2.12 Культуры клеток	55
2.2.13 Анализ проникновения RL2-Rho в клетки аденокарциномы молочной железы человека методом проточной цитофлуориметрии	55
2.2.14 Анализ проникновения конъюгата RL2-Rho в клетки человека методом флуоресцентной микроскопии	56
2.2.15 Выделение плазмидной ДНК.....	57
2.2.16 Рестрикционный анализ плазмидной ДНК	57
2.2.17 Получение комплексов RL2-pEGFP и LF- pEGFP	57
2.2.18 Анализ связывания RL2 с плазмидной ДНК	58
2.2.19 Оценка стабильности комплексов RL2-pEGFP	58
2.2.20 Анализ проникновения RL2-pEGFP в клетки методом ОТ-ПЦР	58
2.2.21 Анализ функциональной активности проникшего в клетки RL2-pEGFP методом флуоресцентной микроскопии	59

2.2.22	Получение комплексов RL2-siРНК и LF-siРНК	59
2.2.23	Анализ связывания RL2 с siРНК.....	60
2.2.24	Анализ проникновения комплексов RL2-siРНК в клетки A549 методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии	60
2.2.25	Получение комплекса RL2-мяоРНК и LF-мяоРНК.....	61
2.2.26	Анализ цитотоксической активности комплексов RL2-мяоРНК методом МТТ теста.....	61
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		62
3.1	Структура RL2	62
3.1.1	Первичная структура RL2	62
3.1.2	Димеризация RL2	63
3.1.3	Вторичная структура RL2	65
3.1.4	Гидродинамический диаметр частиц RL2 и их форма	69
3.2	Проникновение RL2 в клетки	74
3.2.1	Получение флуоресцентно меченого RL2	74
3.2.2	Проникновение RL2-Rho в клетки человека.....	78
3.2.3	Анализ путей эндоцитоза RL2 в раковые клетки человека	79
3.2.4	Проникновение RL2 в онкотрансформированные клетки человека	85
3.3	Доставка нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2.....	89
3.3.1	Доставка плазмидной ДНК в клетки с помощью RL2.....	89
3.3.1.1	Анализ формирования комплекса RL2 с pEGFP	91
3.3.1.2	Анализ стабильности комплекса RL2-pEGFP в присутствии гепарина.....	92
3.3.1.3	Анализ физико-химических свойств комплекса RL2-pEGFP	93
3.3.1.4	Анализ проникновения RL2-pEGFP в клетки.....	94
3.3.2	Доставка siРНК в клетки с помощью RL2	97
3.3.2.1	Анализ формирования комплекса RL2 с siРНК	98
3.3.2.2	Анализ проникновения комплексов RL2-siРНК в клетки	99
3.3.3	Доставка цитотоксической РНК в клетки с помощью RL2.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		110

ВЫВОДЫ	112
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
ПРИЛОЖЕНИЕ А	133

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие биологически активных веществ (молекул) с клетками-мишенями и их проникновение внутрь клетки представляют собой важные звенья механизма действия таких молекул и являются ключевыми моментами, которые необходимо учитывать при разработке новых лекарственных препаратов, в том числе противоопухолевых.

Ранее в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен пептид - фрагмент к-казеина с молекулярной массой 8,6 кДа, индуцирующий апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 в культуре. 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 нормальных [1]. При этом механизм проникновения RL2 в клетки оставался невыясненным.

СРР – это специфический класс пептидов, способных благодаря особенностям их физико-химических свойств с высокой эффективностью проникать через плазматическую мембрану клеток и успешно преодолевать кишечный эпителиальный и гематоэнцефалический барьеры. Наиболее общими особенностями структуры СРР являются значительное содержание положительно заряженных, а также гидрофобных аминокислотных остатков, сближенных в пространственной структуре пептида. Длина СРР, как правило, не превышает 30 - 40 а.о. [2].

Одним из замечательных свойств СРР является их способностью доставлять в клетки молекулы различной природы, состава и размера, такие как белки, нуклеиновые кислоты и т.д. На основе СРР создано множество противовоспалительных и противоопухолевых агентов. В настоящее время более 25 препаратов на основе СРР проходят клинические испытания, согласно данным ресурса www.clinicaltrials.gov.

Настоящая работа посвящена изучению рекомбинантного аналога лактаптина, RL2, обладающего свойствами СРР.

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

Задачи исследования:

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 β -меркаптоэтанолом и димера RL2, стабилизированного межмолекулярными дисульфидными (S-S) связями.

При исследовании вторичной структуры RL2 установлено, что RL2 является неупорядоченным пептидом, склонным к α -спирализации в мембраноподобном окружении. Идентифицирован участок α -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 β -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 (он-лайн формат, 2021).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах, включает 41 рисунок, 4 таблицы и приложение с 6 рисунками. Список литературы содержит 201 литературный источник.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы, представленные в диссертации результаты и их анализ проведены лично автором или 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. (ЛГР ИХБФМ СО РАН).

ГЛАВА 1. ПЕПТИДЫ CPP. СВОЙСТВА, МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Актуальность проблемы доставки лекарственных средств

В организме человека существуют физиологические барьеры, защищающие организм от изменений окружающей среды, препятствующие проникновению бактерий, вирусов и вредных веществ и способствующие сохранению постоянного состава и свойств крови, лимфы и тканевой жидкости.

Наличие физиологических барьеров, в частности плазматической мембраны клетки, непроницаемой для макромолекул и гидрофильных соединений, может значительно влиять на эффективность лекарственных препаратов, и разработка средств доставки терапевтически активных молекул внутрь клеток является важным направлением современной биологии и медицины [3, 4].

В настоящее время разрабатывается множество систем доставки лекарственных препаратов в клетки на основе липосом, вирусных частиц, наночастиц и т.д. [5]. Особенный интерес вызывает доставка биологически активных соединений с помощью белков и пептидов, способных непосредственно проникать через плазматическую мембрану. К таким белкам относятся амилоидогенные белки, антимикробные пептиды, вирусные пептиды слияния, CPP (Cell-Penetrating Peptides), также известные как PTD (protein transduction domains) и MTS (membrane translocating sequences) [6, 7]. CPP способны с высокой эффективностью проникать через плазматическую мембрану, гематоэнцефалический (ГЭБ) и кишечный эпителиальный барьеры и доставлять в клетку связанные с ними молекулы, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного средства доставки [3,8–14].

1.2 История открытия CPP

Первый CPP, TAT пептид, соответствующий основной области белка трансактиватора транскрипции ВИЧ-1, был открыт в 1988 году. Группа Франкеля и Пабо показала, что TAT способен проникать в клетки и стимулировать экспрессию вирусных генов [15], опровергнув признанную гипотезу о непроницаемости плазматической мембраны для гидрофильных молекул. Позднее из гомеодомена белка из *Drosophila Antennapedia* был выделен пептид пенетратин, также способный свободно проникать в клетки [16].

Данные открытия стимулировали исследования механизма проникновения пептидов в клетки, появились многочисленные данные о способности целого ряда пептидов

непосредственно проникать через плазматическую мембрану. При этом, в ряде работ с использованием микроскопических методов было показано равномерное распределение СРР в цитоплазме, что указывало на способность пептидов проникать в клетки минуя эндосомы. Позже было установлено, что полученные результаты обусловлены неправильной фиксацией клеток, которая привела к лизису эндосом и вымыванию пептида [17]. Дальнейшие эксперименты по визуализации пептидов в живых клетках показали, что несмотря на важную роль эндоцитоза в интернализации СРР, при определенных концентрациях пептида имеет место прямая транслокация СРР через плазматическую мембрану [18]. Например, показано, что при обработке клеток карциномы шейки матки HeLa пенетратином в концентрации 50 мкМ, происходит сборка актиновых филаментов, а ингибитор макропиноцитоза 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA) снижает проникновение пенетратина внутрь клеток. При концентрации пенетратина 10 мкМ ингибитор макропиноцитоза не влиял на проникновение пептида. [19] Для октоаргинаина показано обратное: в суспензионные клетки лейкемии KG1a, KG1a и K562 и адгезионные клетки HeLa при низких концентрациях пептида (2 мкМ) проникновение происходит по пути эндоцитоза, а при более высоких – прямым проникновением через мембрану. При этом интересно, что в суспензионных культурах прямое проникновение наблюдается уже при 5 мкМ, тогда как в клетках HeLa лишь при 20 мкМ [20].

В 1994 году впервые была показана возможность доставки в клетки β -галактозидазы (фермента, используемого для коррекции непереносимости лактозы), связанной с пептидом TAT через ацетамидный линкер, активированный малеимидной группой. Эксперименты на мышинных моделях показали, что слитый белок TAT- β -Gal с молекулярной массой более 120 кДа при внутрибрюшинном введении экспериментальным животным проникает в большинство тканей организма кроме мозга, сохраняя при этом активность β -галактозидазы [21,22]. В одной из последующих работ в 1999 году мышам внутрибрюшинно вводили β -галактозидазу, конъюгированную с TAT пептидом через глициновый линкер, через 8 часов мозг извлекали, делали срезы и окрашивали их субстратом β -галактозидазы, X-Gal. Было показано синее окрашивание срезов мозга, свидетельствующее о ферментативной активности β -галактозидазы, что говорит не только об эффективном проникновении пептида TAT через ГЭБ, но и о его способности доставлять через ГЭБ полноразмерные биологически активные белки [22]. В дальнейшем достоверность этих результатов подвергалась сомнению. Было показано, что при внутривенном введении мышам β -галактозидазы, конъюгированной с моноклональным антителом к рецептору трансферрина (представленного на поверхности

эндотелиоцитов капилляров головного мозга), инактивация β -галактозидазы в мозге происходила уже через 4 часа [23]. Также были опубликованы данные о неудачных попытках доставки других ферментов, таких как β -глюкуронидаза и арилсульфатаза А, в мозг мышей с помощью ТАТ. Несмотря на неоднозначность полученных данных, эти исследования, дали мощный толчок к изучению структуры CPP, механизмов их проникновения в клетки, а также способов конъюгирования этих пептидов с различными молекулами [24].

В последние 10 лет активно исследуется вопрос применения CPP в медицине. Например, было показано, что некоторые CPP способны доставлять в клетки противоопухолевые препараты, преодолевая множественную лекарственную устойчивость – основную проблему химиотерапевтического лечения опухолей. Так, эффективность действия доксорубина в составе наночастиц ТАТ-PEG-Asp8-Dox, состоящих из пептида ТАТ, полиэтиленгликоля и полиаспарагиновой кислоты, в отношении клеток колоректального рака HCT8/ADR с фенотипом лекарственной устойчивости оказалась значительно выше эффективности этого химиопрепарата как такового. Кроме того, использование наночастиц ТАТ-PEG-Asp8-Dox для доставки лекарства уменьшало его «отток» из опухолевых клеток, опосредованный Р-гликопротеином, основным белком множественной лекарственной устойчивости [25]. Показано также более эффективное проникновение доксорубина в составе комплекса с пептидом рНЛIP в клетки MCF-7 и MCF-7/Adr с фенотипом множественной лекарственной устойчивости [26]. Сабо с соавторами показали, что метотрексат, ковалентно связанный с N-концом пенетратина или R8, более эффективно проникает в клетки рака молочной железы, устойчивые к метотрексату. Оказалось, что конъюгаты метотрексата с R8 имели меньшую цитотоксическую активность по сравнению с конъюгатами пенетратина. Более того, на активность конъюгатов в значительной мере влияли типы спейсеров, связывающих метотрексат и CPP [27].

Несколько препаратов на основе CPP находятся на разных стадиях клинических испытаний (Табл. 1), однако ни один из них пока не показал значимых результатов. Вероятно, дальнейшее изучение структуры этих пептидов и закономерностей их взаимодействия с клеткой необходимы для более эффективного использования пептидов этого класса для разработки систем доставки лекарственных средств.

Таблица 1. Примеры препаратов на основе СРР, находящихся на этапе клинических испытаний.

Код испытания	СРР	Действующее вещество	Показания к применению	Фаза испытаний	Идентификатор ClinicalTrials.gov
AM-111	TAT	Ингибитор N-концевой киназы c-Jun (JNK)	Острая потеря слуха вследствие воспаления внутреннего уха	Фаза III окончена в 2017	NCT02561091
XG-102	TAT	JNK	Послеоперационное воспаление глаз, катаракта	Фаза III окончена в 2017	NCT02508337 NCT02235272
P28GST	P28	Глутатион-S - трансфераза	Болезнь Крона	Фаза II окончена в 2018	NCT02281916
p28	p28	–	Солидные опухоли, не поддающиеся стандартным методам лечения	Фаза I окончена в 2014	NCT00914914
KAI-9803	TAT	Ингибитор протеинкиназы PKCδ	Инфаркт миокарда	Фаза II окончена в 2011	NCT00785954
KAI-1678	TAT	Ингибитор протеинкиназы PKCδ	Постгерпетическая невралгия, болевой синдром после травм спинного мозга и операций	Фаза II окончена в 2011	NCT01106716 NCT01135108 NCT01015235
RT001	MTS	Ботулотоксин А	атаксия Фридрейха, Детская нейроаксональная дистрофия	Фаза III	NCT03570931 NCT04102501
RT002	TransMT S1	Ботулотоксин А	Цервикальная дистония	Фаза II окончена в 2017	NCT02706795
AVI-5126	6-аминогексаноктоаргинин	Морфолин-новый олигонуклеотид	Сердечно-сосудистые заболевания, коронарное шунтирование	Фаза II окончена в 2009	NCT00451256

1.3 Свойства и классификация СРР

К настоящему времени описано около тысячи СРР, способных эффективно проникать в клетку как по механизмам эндоцитоза, так и прямым проникновением через плазматическую мембрану, обусловленным физико-химическими свойствами этих пептидов [2].

СРР разнородны по своему происхождению и свойствам [7]. На данный момент выявлено несколько наиболее общих особенностей структуры таких пептидов, имеющих решающее значение для их проникновения в клетки. СРР содержат множество положительно заряженных аминокислотных остатков, а также часто имеют гидрофобные аминокислотные остатки, расположенные кластерами или сближенные в пространственной структуре пептида. В среднем 35% аминокислотных остатков в составе СРР являются катионными, а средний заряд пептида при физиологических рН составляет +5. Длина СРР, как правило, не превышает 30 - 40 а.о., составляя в среднем 14 аминокислот [2].

Благодаря сильному электростатическому взаимодействию с поверхностями мембран, а также амфипатической природе, большинство СРР являются мембраноактивными пептидами, то есть эти пептиды способны связываться с мембраной, и, при достижении порогового значения локальной концентрации пептида на границе раздела водная среда - липидная мембрана, изменять собственную структуру, что в свою очередь может приводить к изменению свойств мембраны: нарушению структурной архитектуры мембранных доменов, изменению кривизны бислоя, усилению диффузии липидов между слоями мембраны и, вероятно, образованию структур, не являющихся бислойными [14, 15].

Таким образом, СРР представляют собой разнообразные мембраноактивные пептиды небольшого размера, способные эффективно проникать внутрь клетки (Табл.2).

Таблица 2. Аминокислотные последовательности некоторых CPP.

Пептид	Аминокислотная последовательность	Источник	Ссылка
Катионные CPP:			
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	Белок трансактиватор транскрипции ВИЧ-1	[15]
Полиаргинины	(R) <i>n</i> , 6 < <i>n</i> < 12	синтетический	[29,30]
CLIP6	KVRVRVRV ^D PPTRVRERVK	синтетический	[31]
dfTAT	(CK(ε-NH-TMR)RKKRRQRRRG) ₂ , ε-NH-TMR - тетраметилродамин	синтетический, (модификация TAT)	[32]
Гидрофобные CPP:			
SG3	RLSGMNEVLSFRWL	синтетический	[33]
Рер-7	SDLWEMMMVSLACQY	синтетический	[34]
TP2	PLIYLRLLRGQF	синтетический	[35]
SAP (sweet arrow peptide)	(VRLPPP) ₃	γ –зеин, запасный белок кукурузы	[9]
CPP-Ts	MNPKLLIVIGLLLATGVCSFAKALD EESLRKECNHLNEPCSDSDGDCCTSS EQCISTGSKYFCKGKQGP	яд бразильского жёлтого скорпиона <i>Tityus serrulatus</i>	[36]
Амфипатические CPP			
пенетратин	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia из <i>Drosophila melanogaster</i>	[16]
pVEC	LLIILRRRIRKQAHANHSK	кадгерин эндотелия сосудов	[37]
Рер-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	синтетический	[38]
ARF(1-22)	MVRRFLVTLRIRRACGPPRVRV	белок-регулятор клеточного цикла p14ARF	[39]
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	синтетический	[40]
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKK KRKV	синтетический	[38]
R6/W3	RRWRRWRR	синтетический	[41]
MAP	KLALKLALKALKAALA	синтетический	[42,43]
Транспортан	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAK KIL	яд осы <i>Vespula lewisii</i>	[44]
Кротамина	YKQCHKKGGHCFFPKEKICLPSSDF GKMDCRWRWKCKKGS	яд гремучей змеи <i>Crotalus durissus terrificus</i>	[45]

M918	MVTVLFRRLRIRACGPPRVV	регулятор клеточного цикла p14ARF	[18]
EB1	LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK	синтетический (модификация пенетратина)	[46]
SVS-1	KVKVKVKVDPPTKVVKVKV	синтетический	[47]
RVG9R3LC	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKR ASNGGGGRRRRRRRRRLLL	синтетический	[48]
PepFect14	AGYLLGKLLOOLAAAALLOOLL, O - орнитин	синтетический (модификация TP10)	[49]
PrP-CPP	бычий: MVKSKIGSWILVLFVAMWSDVGL CKKRPKP мышинный: MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC KKRPKP	прионный белок PrP ^C	[50]
PTD4	YARAAARQARA	синтетический	[51]
Вас 1-24	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	Фрагмент с 1 по 24 а.о. антимикробного белка Вас7	[52]
sC18*	GLRKRLRKFRNK	синтетический	[53]
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	синтетический	[54]
CAMP	YGRKKRRQRRLLRAALRKAAL	синтетический	[55]

1.4 Классификация CPP

CPP можно разделить по их происхождению, физико-химическим свойствам или способу взаимодействия с клетками [2].

По происхождению выделяют: 1) природные CPP, 2) химерные CPP, образованные в результате слияния двух природных последовательностей и 3) синтетические проникающие пептиды [56].

1.4.1 Классификация CPP по физико-химическим свойствам

Классификация CPP по физико-химическим свойствам является наиболее широко используемой и дает реальное представление о механизмах связывания CPP с липидным бислоем. Согласно этой классификации CPP разделяют на катионные, гидрофобные и амфипатические пептиды.

1.4.1.1 Катионные СРР

СРР с высоким суммарным положительным зарядом объединяют в класс катионных пептидов. Типичными катионными СРР являются ТАТ [15] и полиаргининовые пептиды, такие как R9, состоящий из девяти аминокислотных остатков аргинина (Табл. 2). Роль положительного заряда в повышении эффективности проникновения макромолекулы в клетку показана для различных последовательностей СРР. Впервые важность положительно заряженных аминокислотных остатков была продемонстрирована в 1965 году Райзер и Хэнкок, которые наблюдали увеличение поглощения альбумина опухолевыми клетками при добавлении полилизиновых пептидов и гистоновых белков, обогащённых остатками лизина [57].

Первоначальное взаимодействие между положительно заряженными СРР и плазматической мембраной имеет электростатическую природу: пептиды связываются с отрицательно заряженными протеогликанами и фосфолипидами [16, 44]. Кроме общего заряда пептида важно ещё и то, какими аминокислотными остатками он обеспечивается. Эксперименты по изучению эффективности проникновения СРР показали, что аналог пенетратина, содержащий аминокислотные остатки лизина на месте остатков аргинина, проникает в клетки в 2,4 – 6 раз менее эффективно [58]. Замена аргининовых остатков на лизиновые в пептиде CLIP6 также приводит к снижению эффективности его проникновения в клетку в 2 раза [31]. Такое различие эффективности проникновения пептидов в клетки связано с тем, что гуанидиниевые катионы в воде способны связываться как с гидрофобными, так и с гидрофильными группами, включая боковые цепи соседних остатков аргинина. Это свойство позволяет гуанидиновым группам аргинина, в отличие от аммониевых катионов лизина, формировать бидентатные водородные связи с фосфатными и сульфатными группами, что приводит к более эффективному связыванию пептидов с мембраной [31, 59]. Также пептиды, богатые аргинином, эффективнее образуют локальные скопления на поверхности мембраны, благодаря способности аргининовых остатков притягиваться друг к другу, тогда как в полилизиновых пептидах наблюдается взаимное отталкивание между боковыми группами лизиновых остатков [60]. Но при этом высокое содержание аргининовых остатков часто повышает мембранолитическую активность СРР [61].

Среди катионных пептидов выделяют также полигистидиновые пептиды. Первичное взаимодействие таких пептидов с клеткой может быть независимым от заряда, поскольку рН внеклеточной среды как правило ниже, чем рКа остатков гистидина [45, 46].

Таким образом, большинство известных СРР является катионными. Высокий положительный заряд обеспечивает таким пептидам возможность эффективно

взаимодействовать с отрицательно заряженной плазматической мембраной. Однако, положительный заряд не всегда является необходимым для проникновения CPP в клетки.

1.4.1.2 Гидрофобные CPP

Гидрофобные CPP является малочисленным и менее изученным классом пептидов. Этот класс включает пептиды, состоящие преимущественно из неполярных аминокислот (Табл. 2), например, пептид SG3, отобранный методом плазмидного дисплея для доставки GFP в клетки феохромоцитомы крыс PC12, и Pep-7, являющийся фрагментом пептида CHL8, полученного методом фагового дисплея к лимфоцитам линии WI-L2 В [21, 40].

Гидрофобные остатки в последовательностях CPP взаимодействуют с плазматической мембраной и облегчают транспорт пептида через мембрану [2]. Триптофан является важнейшим гидрофобным аминокислотным остатком, обеспечивающим поглощение гидрофобных CPP клеткой. π -электроны ароматического кольца участвуют в нековалентных взаимодействиях с хондроитином и гепарансульфатом на поверхности клетки [64], а ароматическая группа триптофана повышает гидрофобность пептида, облегчая его прохождение через мембрану [65–67]. Было установлено, что введение в структуру пептида TAT дополнительных остатков триптофана и фенилаланина заметно увеличивало эффективность его проникновения в клетки [66]. Более того, существуют данные о том, что пептиды, содержащие два триптофана подряд эффективнее проникают в ядро клеток [68]. Однако гидрофобные остатки участвуют и в процессах дестабилизации мембраны, поэтому их большое количество приводит к снижению жизнеспособности клеток.

Таким образом, механизм транслокации пептидов через мембрану зависит от их гидрофобности [66]. При этом существуют зависимость не только от количества гидрофобных аминокислотных остатков и их расположения, но также от того, какими остатками обеспечена гидрофобность пептида.

1.4.1.3 Амфипатические CPP

CPP, содержащие одновременно полярные и неполярные домены, относят к амфипатическим (Табл.2). Амфипатические CPP делятся на первично и вторично амфипатические, в зависимости от того, происходит ли формирование доменов на уровне первичной или вторичной структуры пептида [16, 44].

К первично амфипатическим CPP относятся ARF(1-22), представляющий собой N-концевой фрагмент белка p14ARF длиной 22 аминокислотных остатка, участвующего в регуляции клеточного цикла [39]; пептид, полученный из кадгерина клеток эндотелия

сосудов (pVEC) [37]; пептид Trp10, представляющий собой химерный белок, состоящий из фрагмента галанина – нейропептида, широко экспрессируемого в головном и спинном мозге и кишечнике человека и участвующего в модуляции потенциалов действия в нейронах, лизинового линкера и фрагмента мастопарана, выделенного из яда осы *Vespula lewisii* [40,69].

Некоторые первично амфипатические CPP содержат фрагмент ядерной локализации NLS. Например, к таким пептидам относятся: пептид MPG, полученный путем соединения гидрофильного NLS Т-антигена вируса SV40, линкера и гидрофобной последовательности гликопротеина слияния gp41 ВИЧ, а также пептид Per-1, состоящий из гидрофобного домена, богатого триптофаном (KETWWETWWTEW), спейсера (SQP) и гидрофильного домена, полученного из фрагмента ядерной локализации вируса SV-40 обезьян [40, 50, 51].

Первично амфипатические CPP эффективно связываются даже с цвитерионными мембранами в основном за счёт гидрофобных взаимодействий. На примере гигантских однослойных везикул – модели липидного бислоя с кривизной, близкой к кривизне клеточной мембраны, продемонстрировано, что первично амфипатический пептид TP10 взаимодействует предпочтительно с жидкими неупорядоченными областями мембраны. Высокое сродство CPP к неупорядоченным областям мембранных бислоев может быть связано с их способностью взаимодействовать как с углеводородным ядром, так и с фосфатными группами фосфолипидов [28].

Вторично амфипатические CPP имеют пространственно разделенные участки вторичной структуры, один из которых строго гидрофобный, а другой – полярный, заряженный или незаряженный. Типичными примерами таких пептидов являются пенетратин, искусственно созданные пептиды CADY, R6/W3, богатые остатками триптофана и аргинина, и модельный амфипатический пептид MAP (KLALKLALKALKAACKLA-NH₂), а также транспортан (TP10) [28].

Сочетание полярных и неполярных доменов играет ключевую роль во взаимодействии пептидов с липидными мембранами: заряженные аминокислотные остатки принимают участие в первоначальных взаимодействиях пептида с поверхностью мембраны, а гидрофобный домен имеет решающее значение для встраивания пептида в бислой. Электростатические взаимодействия вносят большой вклад в связывание с мембраной вторично амфипатических CPP по сравнению с первично амфипатическими. Таким образом, данные пептиды взаимодействуют преимущественно с анионными областями клеточных мембран эукариот [28].

Классификация CPP по физико-химическим свойствам отражает особенности аминокислотного состава пептидов, однако не отражает их пространственную организацию или способ проникновения в клетки. Среди пептидов CPP лишь немногие имеют упорядоченную вторичную структуру (кротамин, Рер-1) [72], тогда как наиболее распространены неупорядоченные пептиды, такие как ТАТ, R9, CLIP6 или пептиды с очень низким уровнем упорядоченности (пенетратин, рVEC и TP10) [31]. Часто амфипатические CPP, неупорядоченные в водных растворах, способны принимать упорядоченную вторичную структуру при связывании с липидными мембранами [31,41].

1.4.2 Классификация CPP по вторичной структуре

В зависимости от вторичной структуры, которую принимают проникающие пептиды при взаимодействии с мембраной, их разделяют на неупорядоченные, складчатые, спирализованные и пролин-богатые [26, 39].

Пептиды первой группы – неупорядоченные, такие как ТАТ и Arg9, оставались неупорядоченными в присутствии всех исследованных липидных составов. Во вторую группу входят пептиды рVEC, пенетратин и M918, которые принимают β -складчатую структуру в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидов. Пептиды TP10, MAP и EB1, относящиеся к третьей группе, в присутствии отрицательно заряженных фосфолипидов принимают спиральную конформацию. Более того, некоторые пептиды, такие как пенетратин и Рер-1, при взаимодействии с мембраной способны агрегировать. При этом остаётся неизвестным, обусловлена ли агрегация изменением структуры пептидов или большой локальной концентрацией этих пептидов на поверхности мембраны [7, 28].

В состав пролин-богатых пептидов, относящихся к 4 группе, входит большое количество остатков пролина, которые не способны включаться в состав элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -складок) из-за жесткости, присущей пирролидиновому кольцу пролина, и неспособности к образованию водородных связей. Однако пролин-богатые проникающие пептиды склонны к образованию полипролиновых спиралей I и II типа, PPI и PPII, соответственно. В отличие от аминокислотных остатков, остатки пролина могут находиться в полипептидных цепях в *цис*-конформации, например, PPI является правозакрученной спиралью, в которой все остатки пролина находятся в *цис*-конформации. Белки, обогащенные пролином, приобретают такую вторичную структуру, как правило, в неводных средах. Спираль PPII, напротив, является левозакрученной, а остатки пролина находятся в *транс*-конформации [63 - 65]. Остатки пролина в полипептидных цепях способны переходить из *цис*- в *транс*-конформацию под

действием внутриклеточного фермента пептидил-пролил цис/транс-изомеразы. Таким образом, обогащённые пролином пептиды могут иметь различные жесткие структуры при одной и той же аминокислотной последовательности [59, 60]. Примерами пролин-богатых CPP являются N-концевой фрагмент (Vas 1-24) антимикробного белка Vas 7, SAP (sweet agrow peptide (VRLPPP)₃), являющийся фрагментом N-конца запасющего белка кукурузы γ -зеина, и последовательность (PPR)_n, состоящая из повторов ProProArg [4, 40]. Предполагают, что амфипатические пептиды, обогащенные пролином, способны к самоорганизации в водном растворе: на первом этапе образуются цилиндрические мицеллы, после чего сформированные мицеллы образуют большие агрегаты [4, 53].

Интересно, что не для всех упорядоченных CPP поддержание вторичной структуры является необходимым для проникновения в клетки. Например, аминокислотные замены, приводящие к способности пептида приобретать альфа-спиральную структуру на поверхности мембраны, почти не влияют на его способность проникать в клетки [79]. Для некоторых других пептидов, напротив, образование стабильных вторичных структур необходимо для проникновения через мембрану. Например, *de novo* созданный пептид SVS-1 принимает на поверхности клеток β -шпильчатую структуру, а замена ^DPro на ^LPro, препятствующая образованию биоактивной β -шпильчатой конформации этого пептида, приводит к снижению его способности проникать через мембрану [47]. Также у CPP богатых аргинином, α -спирализация приводит к снижению полярности и свободной энергии, необходимой для переноса через гидрофобные мембраны [59, 67]. Важность образования α -спиралей была показана при сравнении эффективности проникновения пептида CL (RLLRLLR) и его аналога с той же первичной структурой, но который не образовывал α -спираль из-за замены одного ^LArg на ^DArg. Было показано, что спирализованный пептид проникал в клетки с большей эффективностью [80]. Для пептида WRAP и его аналогов также было показано, что α -спирализация важна для доставки НК. Более того длина спирали коррелирует с эффективностью доставки [81].

Поскольку знания последовательности и пространственной структуры пептида недостаточны для определения механизма его действия при различных условиях, интересной является классификация CPP, основанная на способе их проникновения в клетки.

1.5 Механизмы проникновения CPP в клетки эукариот

Несмотря на активное изучение процесса проникновения CPP в клетки, механизм такого проникновения остаётся не до конца понятным, а авторы статей приходят к разным выводам о способах взаимодействия с клетками одних и тех же пептидов. Это может быть

отчасти объяснено тем, что СРР могут проникать в клетки различными путями, при этом относительный вклад разных путей проникновения может изменяться в зависимости от температуры, ионной силы, состава мембраны, внеклеточной концентрации пептида и используемой линии клеток [2, 39, 65, 82].

Принято выделять два способа проникновения СРР в клетки: эндоцитоз и прямое проникновение [29, 55]. В зависимости от пути проникновения и степени нарушения целостности мембраны при проникновении в клетки, СРР можно разделить на следующие группы [2] (Рис.1):

1. Пептиды, спонтанно проникающие через плазматическую мембрану клеток. Такие пептиды даже при низких концентрациях проникают в клетки по энергонезависимому пути и не нарушают целостность клеточной мембраны. Примером такого пептида является пептид TP2, отобранный из пептидной библиотеки по признаку растворимости в воде и самопроизвольного проникновения через липидный бислой синтетических везикул без нарушения целостности мембраны [35].

2. Пептиды, временно нарушающие целостность мембраны. Эти поверхностно-активные пептиды способны кратковременно нарушать локальную структуру плазматической мембраны, что позволяет доставить пептид и связанные с ним молекулы в клетку. Например, проникающий пептид CLIP6 имеет низкую цитотоксическую активность в отношении раковых клеток человека A549, MCF-7 и Hela ($IC_{50} > 1$ мМ, $IC_{50} > 1$ мМ и $IC_{50} = 0,26$ мМ, соответственно) и обладает слабой гемолитической активностью в отношении человеческих эритроцитов $IC_{50} = 0,76$ мМ, что указывает на низкую степень повреждения мембран [31].

3. Пептиды, эффективно лизирующие плазматическую мембрану клеток. Такие пептиды приводят к гибели клеток при относительно невысоких концентрациях, поэтому они могут быть использованы для внутриклеточной доставки *in vitro* лишь при низких концентрациях. Например, пептид SVS-1 эффективно проникает в клетки, однако при высоких концентрациях лизирует клетки ($IC_{50} \sim 6$ мкМ для клеток A549 и $IC_{50} \sim 7$ мкМ для клеток MCF-7) [47]. К таким пептидам также относятся гидрофобные пептиды MAP ($IC_{50} = 2,1$ мкМ для клеток A549 и $IC_{50} = 1,8$ мкМ для клеток MCF-7) и TP10 ($IC_{50} \sim 2,5$ мкМ для клеток A549 и $IC_{50} \sim 1,4$ мкМ для клеток MCF-7), обработка которыми вызывает в 2–3 раза большую утечку внутриклеточной лактат дегидрогеназы, чем в необработанных клетках, что говорит о значительном повреждении клеточной мембраны. Повреждение плазматической мембраны также подтверждает тест на гемолитическую активность в отношении человеческих эритроцитов, показавший, что пептиды MAP и TP10 обладают

высокой гемолитической активностью: $IC_{50} = 14,2 \text{ мкМ}$ и $IC_{50} = 1,3 \text{ мкМ}$, соответственно [31].

4. Пептиды, проникающие в клетку по энергозависимому пути. В результате эндоцитоза эти пептиды оказываются в эндосомах. Далее происходит транслокация пептидов через мембрану эндосом. Например, dfTAT, являющийся гомодимером модифицированного пептида TAT, связывается с бис(моноацилглицеро)фосфатом – липидом, широко представленным в поздних эндосомах, что приводит к слиянию бислоев и утечке dfTAT из поздних эндосом [32].

5. Пептиды, проникающие в клетку по энергозависимому пути и разрушающие мембрану эндосом. Примерами таких пептидов являются кротамин, полигистидиновые пептиды, RVG9R3LC и PepFect14 [35, 45, 56].

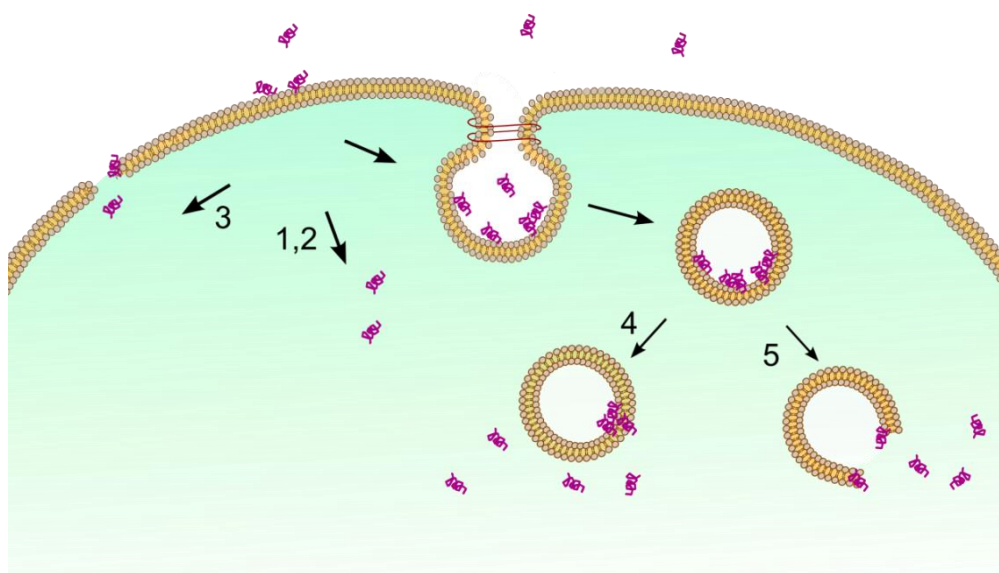


Рис. 1. Возможные пути проникновения пептидов СРР в клетку и их транспорта в цитоплазму. 1, 2 – СРР, спонтанно проникающие через плазматическую мембрану клеток, не нарушая или временно нарушая ее структуру. 3 – пептиды, лизирующие мембрану клеток в процессе прямого проникновения через неё. 4 – СРР, которые проникают в клетку по пути эндоцитоза и избегают эндосомального захвата не нарушая мембрану эндосомы. 5 – СРР, которые проникают в клетку по пути эндоцитоза и разрушают эндосомы.

Существуют СРР, эффективно проникающие только в конкретные линии клеток, например, пептид СТР (Cardiac Targeting Peptide), полученный методом фагового дисплея, проникает и доставляет связанные с ним молекулы в кардиомиоциты [85]. Однако

большинство проникающих пептидов абсолютно не специфичны (например, CLIP6 [31]), или имеют некоторую избирательность по отношению к нескольким линиям клеток. Например, кротамин проникает лишь в быстро делящиеся клетки [86], а механизм и эффективность проникновения пептида ТАТ достоверно отличается для различных клеточных линий [31]. Известно, что ТАТ связывается с протеогликанами клеточной мембраны (а именно гепарансульфатами), интегринами и хемокинами, а эти молекулы в свою очередь активируют различные пути эндоцитоза [87]. В частности гепарансульфат синдекан 4 считается потенциальным рецептором ТАТ и некоторых других СРР, богатых аргинином [15, 64]. Так, эффективность проникновения пептида ТАТ, а также пенетратина, R9 и TP10 в клетки СНО, дефицитные по гликозаминогликанам, значительно ниже, чем в клетки СНО дикого типа [30].

Первым этапом проникновения пептидов СРР является взаимодействие с плазматической мембраной клетки [7]. Большинство пептидов накапливаются на поверхности клетки, после чего, в зависимости от концентрации, пептиды могут стимулировать эндоцитоз или проникать непосредственно через плазматическую мембрану [15, 52]. Например, Arg9 в концентрации ≤ 5 мкМ проникает в клетки путем эндоцитоза, но при концентрации ≥ 10 мкМ может проникать непосредственно через мембрану [33]. При этом накопление пептидов на плазматической мембране в некоторых случаях приводит к её дестабилизации вплоть до лизиса. Показано, что СРР, имеющие в своём составе высоко гидрофобные домены, часто обладают мембранолитическими свойствами. В пептидах, не обладающих мембранолитической активностью, гидрофобные аминокислотные остатки, как правило, располагаются равномерно [89].

Таким образом, путь проникновения в клетки зависит от концентрации пептида. Эффективность прямого проникновения пептидов через клеточную мембрану находится в прямой зависимости от их мембранолитической активности, при этом, и эффективность проникновения и мембранолитическая активность зависят как от концентрации пептида, так и от линии клеток.

1.5.1 Эндоцитоз СРР

Эндоцитоз – это процесс поглощения клеткой из внеклеточного пространства различных веществ, неспособных пассивно проникать через поры плазматической мембраны. Эндоцитоз обеспечивает рециркуляцию рецепторов и липидов, регуляцию трансдукции сигнала, уничтожение чужеродных веществ и поглощение питательных веществ клеткой [3, 62]. Выделяют два вида эндоцитоза: фагоцитоз и пиноцитоз. Фагоцитоз наиболее характерен для клеток иммунной системы, например, дендритных

клеток и макрофагов, которые способны поглощать и расщеплять в фагосомах частицы размером более 500 нм. Пиноцитоз - процесс поглощения клеткой жидкости или растворенных в ней соединений, принято разделять на макропиноцитоз и рецептор-опосредованный пиноцитоз (Рис. 2).

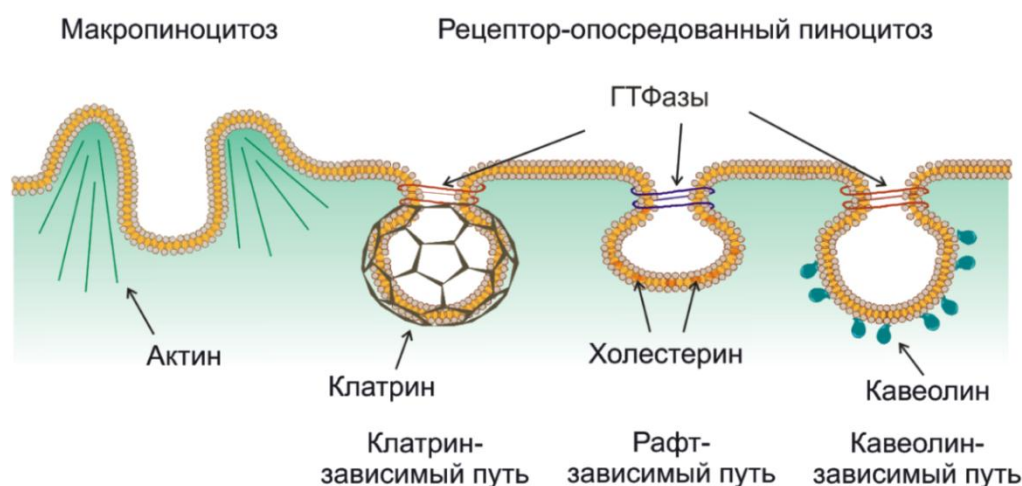


Рис. 2. Некоторые пути пиноцитоза.

Макропиноцитоз происходит при неспецифическом связывании молекул «груза» с плазматической мембраной. Крупные эндосомы, образующиеся в процессе макропиноцитоза, формируются при полимеризации и деполимеризации актиновых филаментов.

Рецептор-опосредованный пиноцитоз обеспечивает селективное поглощение молекул, обладающих высоким сродством к рецепторам, сконцентрированным на участках формирования везикул. Рецептор-опосредованный пиноцитоз классифицируется по вовлечению окаймляющего везикулы белка клатрина и вовлечённости различных ГТФаз, обеспечивающих отделение везикулы от мембраны.

Вне зависимости от морфологии эндосом, эндоцитоз происходит следующим образом: на первом этапе на поверхности плазматической мембраны образуется углубление, которое увеличивает свою кривизну, как правило за счёт полимеризации на её поверхности специальных белков (клатрина, кавеолина и др.), и формируя раннюю эндосому, несущую в себе молекулы, связанные с поверхностью мембраны, а также вещества, растворенные в захваченной внеклеточной среде. Затем перешеек, соединяющий плазматическую мембрану с формирующейся эндосомой, сужается, эндосома замыкается и отделяется внутрь клетки с помощью клеточных ГТФаз (Рис. 3). Содержимое ранней эндосомы имеет четыре пути транслокации в клетке: оно может быть

направлено в аппарат Гольджи непосредственно или через стадию мультивезикулярного тельца, и далее в лизосомы, или перенаправлено обратно на поверхность плазматической мембраны. В аппарат Гольджи, как правило, транспортируются специфичные белки, например, рецепторы, протеолитические ферменты и некоторые токсины [91]. Также содержимое ранней эндосомы может попасть в мультивезикулярные тельца, откуда может быть перенаправлено лизосому, где ее содержимое разрушается, или в рециркулирующую эндосому, обеспечивающую возвращение содержимого ранней эндосомы обратно на плазматическую мембрану. Некоторые вещества эндосомального содержимого необходимы клетке и должны быть высвобождены в цитозоль. Этот процесс опосредуется образованием интралюминальных пузырьков – повторных впячиваний мембраны мультивезикулярных телец с образованием, по существу, экзосомы внутри эндосомы. Затем мембрана интралюминальных везикул сливается с мембраной эндосомы, а её содержимое высвобождается в цитозоль [90].

На каждой стадии созревания везикулы имеют свой характерный pH, например, при переходе ранней сортирующей эндосомы в позднюю эндосому или мультивезикулярное тельце pH изменяется от 6 - 6,5 до 5.

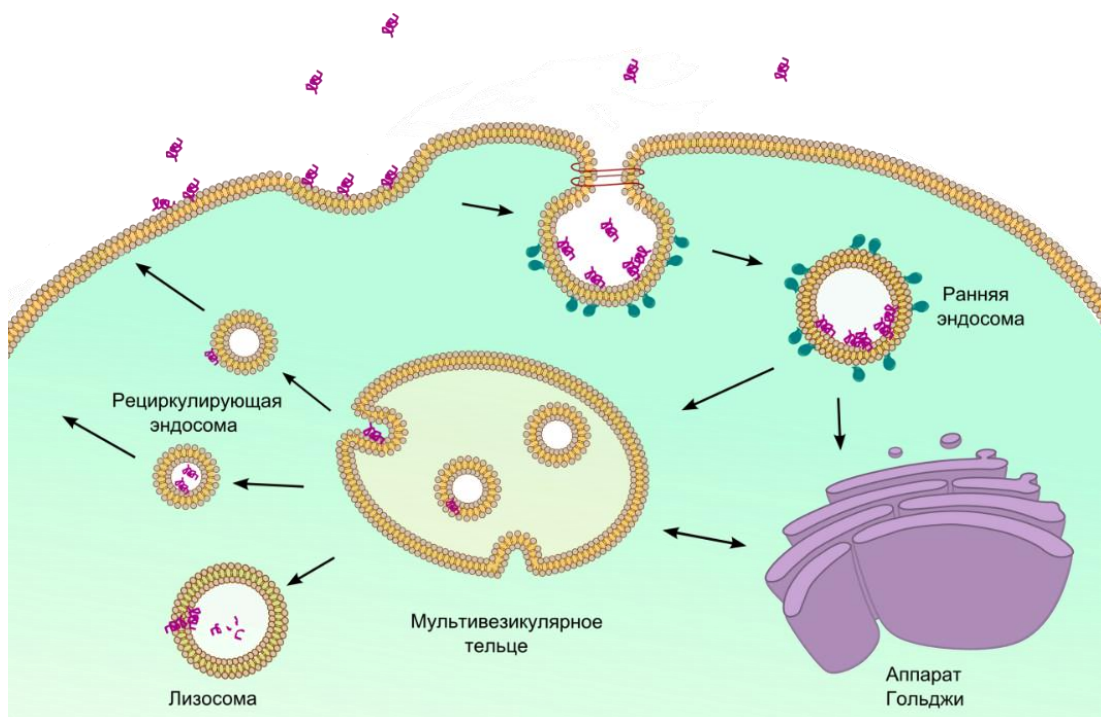


Рис. 3. Пути внутриклеточного транспорта пептидов, проникающих по механизму эндоцитоза. На поверхности мембраны образуется углубление, из него формируется эндосома, которая отщепляется внутрь клетки. Её содержимое может быть направлено в аппарат Гольджи или мультивезикулярное тельце, из которого далее оно может попасть в лизосомы, рециркулирующие эндосомы или в цитоплазму.

Большинство СРР (ТАТ, R9 и пенетратин) при проникновении в клетки попадают в эндосомы [31]. Для пептидов ТАТ и R9 показано проникновение множеством различных путей, таких как клатрин-зависимый и рафт-зависимый микропиноцитоз и макропиноцитоз. При этом вклад различных путей эндоцитоза в поглощение клетками этих пептидов варьирует в зависимости от концентрации пептидов и связанных с ними молекул [92]. Вещества, попадающие в клетку путём эндоцитоза, транспортируются с помощью эндосом в лизосомы с кислым рН, содержащие ферменты деградации. Длительный контакт СРР с кислой средой лизосом может приводить к преждевременной деградации как самого СРР, так и связанных с ним биологически активных молекул. Таким образом, для создания эффективной системы доставки на основе СРР необходимо избежать эндосомального захвата пептидов и связанных с ними грузов.

1.5.1.1 Избегание эндосомального захвата

Для СРР, проникающих в клетки по пути эндоцитоза, показана способность выходить из эндосом в цитоплазму. Этот процесс называется утечкой из эндосом. Утечка из эндосом является стадией, определяющей скорость проникновения СРР в целевой компартмент клетки и эффективность доставки связанных с ними молекул. Быстрая утечка пептида из эндосом позволяет уменьшить время контакта доставляемого груза с кислой средой и увеличить эффективность его доставки в целевой компартмент [66].

Существует несколько теорий, объясняющих механизм избегания эндосомального захвата СРР: первая заключается в дестабилизации мембраны эндосом, например, за счёт сильных гидрофобных взаимодействий. Известно, что остатки триптофана и фенилаланина, входящие в состав некоторых пептидов, способны погружать свои гидрофобные боковые радикалы в липидный бислой, дестабилизируя эндосомальную мембрану. При этом, как уже отмечалось выше, количество гидрофобных остатков в составе СРР и их относительное расположение является немаловажным [43, 52].

Также важен и липидный состав мембраны, с которой взаимодействует пептид. Например, пептид dfТАТ взаимодействует с бис(моноацилглицеро)фосфатом, широко представленным в мембранах поздних эндосом и лизосом и обеспечивающим текучесть этих мембран. Предполагают, что быстрая транслокация пептида dfТАТ через мембрану без разрушения поздней эндосомы связана именно с его взаимодействием с этими липидами [32].

Некоторые пептиды способны не только дестабилизировать, но и разрывать мембрану эндосом. Например, рН-чувствительный пептид GALA, имеющий отрицательный суммарный заряд во внеклеточном пространстве, в кислой среде эндосом

приобретает спиральную структуру, обеспечивающую ему способность лизировать эндосомальные мембраны [93]. Другим примером пептида, утекающего в цитозоль путем нарушения целостности поздних эндосом и лизосом, является пептид R9, конъюгированный с рецептор-связывающим лигандом и эндосомолитическим мотивом Leu Leu Leu. [48].

Широко известно, что лизировать эндосомы способны такие вещества, как хлорохин, хлорид аммония, полиэтиленмин, метиламин. Механизм действия этих эндосомолитических агентов связан с «эффектом протонной губки». Этот эффект основан на достаточно высокой буферной ёмкости веществ, которая приводит к изменению осмолярности везикулы. По мере того, как эндосома созревает, её рН начинает подкисляться из-за притока протонов, накачиваемых эндосомальной АТФазой из цитозоля в эндосому. Эндосомолитические агенты обычно содержат протонируемые вторичные или третичные аминогруппы с рКа, близкими к эндосомальному или лизосомальному рН. Аминогруппы забирают на себя накачиваемые протоны, забуферивая эндосому. По мере того, как ионы накапливаются внутри эндосомы, на мембране возникает большой градиент осмотического давления. Чтобы компенсировать этот градиент, в эндосому поступает вода. Таким образом, происходит осмотический отек эндосомы, за которым следует её разрыв и высвобождение содержимого в цитоплазму [94,95]. Предполагают, что такой же эффект позволяет преодолевать эндосомальный захват пептидам, содержащим полигистидиновую последовательность [49, 70, 71].

После выхода в цитоплазму СРР могут достигать целевого компартмента – ядра, митохондрий, эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи.

1.5.2 Механизм прямого проникновения СРР в клетки эукариот

При исследовании пенетратина было обнаружено, что его проникновение в клетки является пассивным, термо- и рецептор-независимым [16]. Такое проникновение пептидов в клетки было названо прямой транслокацией или прямым проникновением. Была выдвинута гипотеза о том, что прямая транслокация происходит посредством изменения физических свойств плазматической мембраны. Позднее существование этого процесса было подтверждено в условиях ингибирования различных путей эндоцитоза [92].

На примере многих катионных проникающих пептидов (ТАТ, R9, R12, пенетратин) показано, что путь проникновения пептидов в клетки зависит от концентрации пептида. При низких концентрациях пептиды проникают в клетки по пути эндоцитоза, накапливаясь в эндосомах, в то время как при высоких концентрациях эти пептиды способны проникать по пути прямого проникновения и локализуются в цитоплазме.

Вероятно, это связано с тем, что для прямого проникновения через плазматическую мембрану CPP необходимо достичь высокой локальной концентрации пептида на поверхности клетки [67, 17].

Существует несколько моделей, объясняющих прямую транслокацию CPP через липидный бислой [98].

1.5.2.1 Модель образования инвертированных мицелл

Образование инвертированных мицелл, впервые описанное в 1985 году [99], было предложено для объяснения прямой транслокации пептида [79]. Согласно этой модели, на первом этапе прямой транслокации пептиды из внеклеточной среды концентрируются на поверхности плазматической мембраны за счёт взаимодействия основных аминокислотных остатков пептида с отрицательно заряженными фосфолипидами плазматической мембраны. Далее происходит взаимодействие гидрофобных аминокислотных остатков пептида с гидрофобной частью мембраны, вызывающее дестабилизацию бислоя и образование мембранной инвагинации [65]. Сопутствующая реорганизация соседних липидов приводит к образованию инвертированной мицеллы, окружающей пептид. Затем при разрушении внутриклеточной части мембраны мицеллы пептид высвобождается внутрь клетки (Рис. 4).

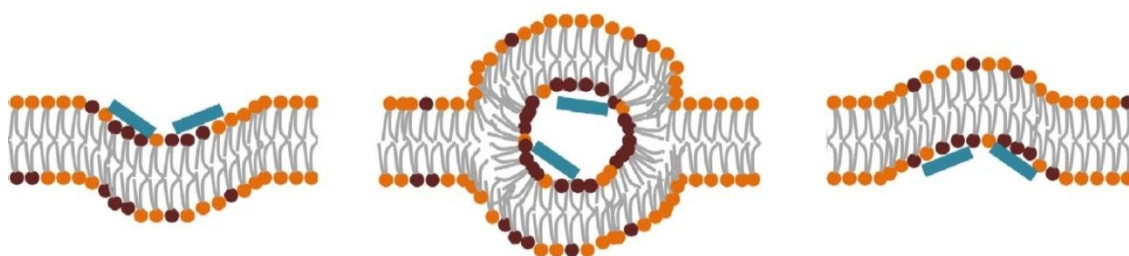


Рис.4. Схема образования инвертированной мицеллы из липидного бислоя мембраны при проникновении CPP в клетку. — катионный CPP, — отрицательно заряженный фосфолипид, — цвиттерионный фосфолипид.

Поскольку анионные фосфолипиды нейтрализуют заряд CPP, данная модель предполагает точную стехиометрию между транслоцированными внутрь клетки CPP и фосфолипидами, переместившимися из внешнего во внутренний листок бислоя [28].

По данным ^{31}P -ЯМР, замена остатков триптофана на фенилаланин ингибирует образование инвертированных мицелл [100]. Таким образом, гидрофобность остатков триптофана и их возможность формировать водородные связи с фосфатными группами

делает наличие этих остатков в составе пептида необходимым условием образования инвертированных мицелл [65].

1.5.2.2 Модель образования пор

Образование транзитных тороидальных пор в мембранах под действием СРР было описано для ТАТ пептида и пептидов, богатых аргинином (Рис. 5).



Рис.5. Схема образования поры в клеточной мембране при проникновении СРР в клетку. — катионный СРР, — отрицательно заряженный фосфолипид, — цвиттерионный фосфолипид.

Согласно этой модели сначала СРР взаимодействуют с фосфатными группами внешнего слоя мембраны. При этом расчёт энергии взаимодействия полиаргининовых пептидов с липидным бислоем показал, что эффективность проникновения этих пептидов зависит от величины их положительного заряда и количества отрицательных зарядов бислоя, в то время как пространственная конфигурация полипептидного скелета не имеет решающего значения [83].

При достижении пороговой локальной концентрации пептида на уровне глицериновых групп внешнего листка бислоя, положительно заряженные боковые цепи аминокислот притягивают фосфатные группы внутреннего листка бислоя. Это приводит к истончению липидного бислоя, проникновению молекул воды через бислой и формированию транзитной поры, через которую диффундирует пептид [101]. При образовании транзитных пор наблюдается свободная диффузия фосфолипидов между листками липидного бислоя.

Такой способ проникновения был предложен для первично амфипатического пептида TP10, который связывается с мембраной преимущественно в местах менее плотной упаковки липидов и образует амфипатическую α -спираль, стабилизируя эти дефекты липидного бислоя. В результате образуются поры, выстланные изнутри липидами, связанными пептидами. Интересно, что скорость индуцированного пептидом TP10 образования пор в липидных везикулах не зависит от содержания в этих везикулах отрицательно заряженных липидов [102].

Исследование проникновения СРР в клетки путём образования пор и временной дестабилизации мембраны усложняется тем фактом, что система репарации мембраны

маскирует поры, образованные СРР, и препятствует утечке эндогенных молекул из клетки. При повреждении плазматической мембраны клетки происходит локальный приток внеклеточного кальция в цитозоль, что в свою очередь активирует механизм экзоцитоза внутриклеточных везикул (в основном лизосом), которые сливаются с поврежденной плазматической мембраной и запечатывают ее в течение нескольких секунд [103].

На данный момент не получено непосредственного подтверждения этих моделей, за исключением модели образования инвертированных мицелл, для которой экспериментальные данные о перемещении фосфолипидов между внутренним и внешним листками бислоя согласуются с теоретическими.

Образование транзитных пор также является реалистичной моделью, поскольку рассчитанное пороговое соотношение концентрации липидов к пептидам, приводящее к образованию транзитных пор, совпадает с концентрацией, при которой пептид меняет пространственную ориентацию с параллельной мембране на встроенную в мембрану, этот переход подтвержден методом спектроскопии кругового дихроизма [102].

Важно отметить, что согласно модели инвертированных мицелл, пептиды остаются связанными с поверхностью мембраны и не контактируют непосредственно с гидрофобной частью липидного бислоя, тогда как при прямом проникновении по модели образования пор предполагается встраивание пептидов в мембрану [104].

1.5.2.3 Модель встраивания СРР между микродоменами мембраны

Клеточная мембрана неоднородна по своему составу, в ней существуют различные микродомены, имеющие более плотную упаковку. Между мембранными доменами могут возникать дефекты упаковки, которые более восприимчивы к проникновению СРР и могут быть местами формирования пор.

Более того, взаимодействие СРР с поверхностью мембраны также может приводить к образованию мембранных доменов. Например, взаимодействие пептида преимущественно с анионными липидами может инициировать реорганизацию плазматической мембраны и создание новых мембранных доменов. [65]. Также показано, что при взаимодействии катионных СРР с плазматической мембраной на внешнюю поверхность липидного бислоя транслоцируется кислая сфингомиелиназа, которая гидролизует сфингомиелин мембраны, создавая тем самым мембранные домены, обогащенные церамидом. Наличие таких доменов увеличивает эффективность прямого проникновения СРР в клетки [105].

1.5.2.4 Модель адаптивной транслокации CPP

Клеточная мембрана поддерживает электрический градиент между внутриклеточной и внеклеточной средой, обусловленный различной концентрацией электролитов. Если локальная концентрация положительно заряженных молекул на внешнем листке мембраны значительно увеличена, образуется высокий электрический градиент, обеспечивающий диффузию некоторых веществ через мембрану.

Модель адаптивной транслокации CPP основана на способности полиаргининовых пептидов частично маскировать свой положительный заряд благодаря образованию бидентатных связей между аминокислотными остатками аргинина и фосфатными группами фосфолипидов. Таким образом, образуется комплекс пептид-фосфолипид, имеющий меньшую полярность, чем пептид сам по себе. Благодаря низкой полярности такой комплекс способен диффундировать через мембрану внутрь клетки (Рис. 6) [65]. Такая диффузия обусловлена разницей потенциалов на плазматической мембране, вызванной высокой локальной концентрацией CPP на поверхности клетки.

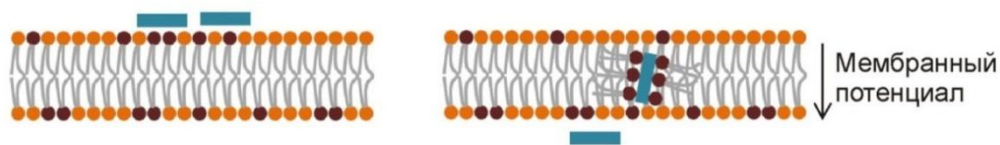


Рис. 6. Схема адаптивной транслокации CPP через мембрану клетки. ■ — катионный CPP, ● — отрицательно заряженный фосфолипид, ○ — цвиттерионный фосфолипид.

Таким образом, согласно данным литературы механизм проникновения CPP в клетки до конца не выяснен, и исследователи часто приходят к различным выводам о механизме взаимодействия с клетками одних и тех же пептидов. Исследования осложняются тем, что в зависимости от условий эксперимента (концентрация CPP, температура, используемая линия клеток) основной вклад в проникновение пептида в клетку будет вносить либо эндоцитоз, либо прямое проникновение через клеточную мембрану [2, 44, 59].

1.6 Функции CPP

CPP, как правило, являются частью различных белков, а их функция связана с доставкой полноразмерных белков внутрь клетки. Например, пенетратин представляет собой фрагмент гомеодомена *Antennapedia*, транскрипционного фактора плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Последовательность пенетратина необходима для интернализации всего белка, играющего решающую роль в межклеточных взаимодействиях при морфогенезе нейронов [16].

Некоторые проникающие пептиды, являющиеся фрагментами белков, сохраняют функцию полноразмерного белка, например, пептид ARF(1-22) (22 N -концевых аминокислотных остатка белка-супрессора опухолей p14ARF, участвующего в регуляции клеточного цикла), также как и p14ARF, способен, проникая в опухолевые клетки, вызывать их апоптоз [39].

Известно, что прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельдта-Якоба, почесуха овец и болезнь куру, связаны с превращением нормального прионного белка PrP^C, богатого α -спирализованными участками, в нерастворимый β -структурированный конформер PrP^{Sc}, который является инфекционным. Было показано, что N-концевые последовательности мышинового и бычьего прионных белков PrP^C (PrP-CPP) могут дестабилизировать клеточную мембрану и проникать в клетки. Однако интересно, что специфическое взаимодействие PrP-CPP с PrP^{Sc} препятствует преобразованию PrP^C в PrP^{Sc}, тем самым PrP-CPP проявляет сильную антиприонную активность [106].

CPP могут также реализовывать свои собственные функции, связываясь с лигандами внутри клетки. Например, трансактиватор транскрипции ВИЧ-1 TAT является регуляторным белком, который значительно повышает эффективность вирусной транскрипции [15]. Пептиды кротамин, CPP-Ts и мастопаран X являются основными компонентами ядов южноамериканской гремучей змеи каскавеллы (*Crotalus durissus terrificus*), бразильского жёлтого скорпиона *Tityus serrulatus* и осы *Vespula lewisii*, соответственно [107]. Пептид CPP-Ts, попавший в организм жертвы из яда скорпиона, вызывает высвобождение Ca²⁺ в кардиомиоцитах посредством активации ядерного рецептора инозитолтрифосфата InsP3R, вызывая тем самым увеличение частоты сокращения этих клеток, что приводит к аритмии, артериальной гипертензии и сердечной недостаточности [36].

Кротамин способен проникать через ГЭБ жертвы и обладает цитотоксической активностью в отношении быстроделящихся клеток. При проникновении в клетку кротамин связывается с центриолями хромосом делящихся клеток, вызывая цитотоксический эффект [8]. В экспериментах на крысах показано, что при введении в

гиппокамп кротамин индуцирует выделение ацетилхолина и дофамина в центральной нервной системе. Эти нейротрансмиттеры являются важными модуляторами процессов памяти. Таким образом, на основе кротамина возможно создание потенциального лекарства для улучшения памяти, однако необходимы дополнительные исследования для уменьшения токсичности этого пептида [108].

Таким образом, CPP обнаружены в организмах, принадлежащих к различным таксонам: вирусам, членистоногим, рептилиям, млекопитающим. Они являются доменами, необходимыми для доставки в клетки полноразмерных белков и/или способны реализовывать свои собственные функции.

1.7 Возможные применения CPP

Кроме выполнения функций, специфических для каждого конкретного пептида, CPP способны эффективно проникать в клетки различных линий, таких как Jurkat, HeLa, остеокласты и натуральные киллеры непроницаемые для ретровирусных векторов и липосом, и доставлять в них нуклеиновые кислоты, белки и гидрофильные молекулы [43, 94 - 96]. В отличие от электропорации и микроинъекций, трансформация клеток с помощью CPP возможна *in vivo*. CPP имеют низкую токсичность и возможности их применения для повышения эффективности широкого спектра лекарственных препаратов (противовоспалительных, противораковых, антимикробных, нейропротекторных, противовирусных и т.д.) активно исследуются [39, 79-81]. Например, доставка инсулина с помощью таких CPP, как TAT, pVEC, пенетратин и октолизин увеличивает биодоступность лекарства при всасывании из просвета кишечника [8].

Другой пример использования проникающих пептидов для неинвазивной доставки препаратов – создание слитых белков CPP-антиген для вакцинации людей или животных [115]. При онкологических заболеваниях для активации CD4 Т-клеток пациента проводят вакцинацию препаратами на основе собственных опухолевых антигенов. Однако, такая вакцинация зачастую обеспечивает слабый иммунный ответ, обусловленный коротким временем жизни комплексов антигенов с белками комплекса иммуногистосовместимости МНС, а также ограниченным поглощением и презентацией опухоль-специфических антигенов дендритными клетками. Доставка слитых белков CPP-антиген в дендритные клетки обеспечивает презентацию антигенов как в комплексе с МНСI, так и с МНСII, тем самым активируя не только CD4, но и CD8 Т-клетки и увеличивая продолжительность презентации антигенов. Таким образом, иммунизация вакцинами на основе слитых белков CPP-антиген увеличивает антиген специфический иммунный ответ по сравнению с иммунизацией только антигеном [85, 86]. Например, показано, что интраназальное

введении мышам вакцины на основе проникающего пептида Z12 и мультиэпитопного антигена обеспечивало эффективное проникновение слитого белка в дендритные клетки и мощный противоопухолевый иммунный ответ [118]. Внутривентрикулярное введение мышам-опухоленосителям вакцины, представляющей собой нановолокна, несущие фрагмент белка E7 вируса ВПЧ 16 и ТАТ пептида, значительно повышало процент инфильтрирующих опухоль CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также приводило к более эффективному подавлению роста опухолей по сравнению с иммунизацией мышей контрольными нановолокнами и нановолокнами, содержащими только антиген E7 [119]. CPP также можно использовать для доставки вакцин на основе НК [120, 121]. Например, созданы ДНК-вакцины против вируса гепатита С и ВИЧ, представляющие собой нековалентные комплексы CPP с плазмидной ДНК, кодирующей иммуногенные антигены. При иммунизации мышей такими комплексами было продемонстрировано повышение уровня антител в крови и уровня гамма-интерферона в спленocyтaх животных, что свидетельствует о повышении уровня CD4 Т-клеточного иммунного ответа [122, 123].

Исследования кинетики и биораспределения комплексов CPP с «грузами» *in vivo* показали, что CPP обеспечивают неспецифическую доставку связанных с ними молекул в клетки различных тканей [93, 94]. Терапевтические средства на основе CPP имеют быстрый клиренс и, как и большинство средств доставки лекарств, накапливаются в печени, почках, селезенке, кишечнике и легких. Однако использование в составе CPP модифицированных аминокислотных остатков (D-аминокислот, остатков неионогенных аминокислот и т.д.), стабилизация трехмерной структуры CPP, или введение остатков цистеина с обоих концов CPP для создания циклических структур, а также связывание CPP с защитными молекулами, такими как полиэтиленгликоль, позволяет преодолеть эти недостатки и повысить эффективность CPP в качестве средств доставки [14, 44, 124, 125].

Свойство проникающих пептидов равномерно распределяться по органам и тканям может быть использовано для доставки в клетки организма инструментов генной терапии и геномного редактирования. Например, существует целый класс генетических дистрофий, для лечения которых сейчас активно развивают подходы генной терапии, доставляя различные РНК в том числе с помощью CPP. Мышечная дистрофия Дюшенна, редкое заболевание с летальным исходом, вызванное мутациями в гене, кодирующем дистрофин. Такая мутация может приводить к дупликации в гене одного из экзонов, в результате чего белок дистрофин теряет свою функциональную активность. В данный момент для лечения миодистрофии Дюшенна одобрено несколько препаратов на основе морфолиновых олигонуклеотидов, однако для достижения значительных клинических

результатов требуется разработка эффективных способов доставки таких олигонуклеотидов в клетки-мишени [128]. Группой Пассини был предложен подход по конъюгированию морфолинового олигонуклеотида с CPP. На мышинной модели было показано, что уже при однократном внутривенном введении полученных конъюгатов уровень нормального белка дистрофина в различных мышцах в том числе, диафрагмальной и сердечной, значительно увеличивался, а эффект сохранялся в течение 2 месяцев [128]. Аналогичный подход был использован другой группой исследователей для коррекции миотонической дистрофии 1 типа. Это также генетическое заболевание, приводящее к мышечной дистрофии, однако вызвано оно удлинением 3'-нетранслируемой области гена миотонин протеинкиназы. Удлиненные РНК транскрипты приобретают более стабильную пространственную конформацию, накапливаются в ядре и обладают ярковыраженным цитотоксическим эффектом. Кроме того, такой транскрипт имеет большее сродство к белковым факторам сплайсинга, что приводит к нарушению сплайсинга. Для коррекции этого состояния мышам внутривенно вводили CPP Рірба, конъюгированный с антисмысловым морфолиновым олигонуклеотидом, мишенью которого являются мутантные транскрипты миотонин протеинкиназы. Было показано, что лечение таким конъюгатом приводило к устранению дефектов сплайсинга и миотонии у животных в отличие от лечения антисмысловым морфолиновым олигонуклеотидом без CPP [129]. Высокая эффективность такого подхода говорит об эффективности использования CPP в качестве инструментов генной терапии [128, 130].

Успешная доставка инструментов геномного редактирования, таких как CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, с помощью CPP была показана даже в трудно трансфицируемые клетки Jurkat и NK [51, 131]. Например, показано, что CPP 6His-СМ18-PTD4, состоящий из 6 гистидиновых остатков, эндосомолитического фрагмента СМ18 и проникающего пептида PTD4 – модифицированного варианта пептида TAT, доставлял системы CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1 эффективнее, чем коммерчески доступный липидный реагент CRISPRMax lipofectamine [51].

Однако при неспецифической доставке доза лекарственного препарата, необходимая для получения терапевтического эффекта, значительно возрастает и, соответственно, вероятность проявления токсических эффектов также увеличивается. В связи с этим на основе CPP, специфических к конкретным видам клеток, разрабатывают таргетные системы доставки. Например, получают CPP, отобранные методом фагового дисплея к определённым мишеням [4, 90]. К таким пептидам относятся CHL8 и СТР, позволяющие доставлять связанные с ними молекулы в лимфоциты линии WI-L2 В и кардиомиоциты, соответственно [39, 61].

Также разрабатывают методы таргетной доставки на основе активируемых CPP (АСPP). Этот подход обеспечивает высвобождение комплексов CPP с доставляемой молекулой только вблизи клеток или тканей-мишеней [50, 88, 91, 92]. При этом для защиты комплекса «катионный CPP-доставляемая молекула» используют анионный ингибитор, отщепляющийся вблизи ткани-мишени. Специфическим сигналом, активирующим АСPP, могут быть кислый pH, перекись водорода, инфракрасное излучение, наличие глутатиона [133] или специфических металлопротеиназ. Например, известно, что развитие атеросклероза зависит от изменений активности протеаз свертывающей системы крови, таких как тромбин. Для изучения активности таких металлопротеиназ *in vivo* создан пептид АСPP, состоящий из поликатионного фрагмента 9Arg, полианионного фрагмента 9Glu, фрагмента, расщепляемого тромбином, и флуоресцентного красителя. Продукт гидролиза такого АСPP накапливается в тканях с повышенной активностью тромбина и флуоресцирует. Таким образом, на основе АСPP создан зонд, позволяющий визуализировать атеросклеротические бляшки [135].

Другим примером является АСPP, состоящий из катионного пептида, конъюгированного с донорным флуоресцентным красителем флуоресцеином, линкера и анионного ингибитора, связанного с акцепторным флуоресцентным красителем Cy5. В неповрежденном АСPP происходит перенос энергии от донорного к акцепторному флуорофору, в результате чего наблюдается сильное излучение Cy5 и очень слабое излучение от флуоресцеина. Под действием эндогенного H₂O₂ линкер разрывается, высвобождая проникающий пептид, связанный с флуоресцентным красителем, вблизи ткани-мишени, что приводит к разгоранию флуоресцеина. Такой АСPP вводили мышам с индуцированным воспалением лёгких и контрольным животным. Через 6 часов лёгкие животных извлекали и оценивали флуоресцентный сигнал с помощью мультиспектральной макроскопической системы визуализации флуоресценции. Оказалось, что по сравнению с контролем соотношение эмиссии флуоресцеина / Cy5 у мышей с воспалением лёгких увеличилось в 2 раза. Таким образом, АСPP могут быть использованы как для диагностики, так и для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом [136].

Другим примером доставки лекарственного средства с помощью CPP в ткань-мишень является введение в поврежденную область сердца фибробластов, трансформированных плазмидой, продуктом экспрессии которой является слитый белок Gata4-VP22, состоящий из проникающего пептида VP22 и транскрипционного фактора Gata4, модулирующего адаптивную реакцию кардиомиоцитов в условиях повышенного стресса, такого как инфаркт миокарда или инсульт. Авторы исследования показали, что

наработанный Gata4-VP22 проникал в соседние кардиомиоциты, обеспечивая улучшение функции сердца, увеличение диаметра кардиомиоцитов и продолжительности жизни крыс [137].

Также показано, что некоторые CPP способны проникать не только в эукариотические, но и в прокариотические клетки [138]. Это свойство особенно важно в связи с развитием антибиотикорезистентности у бактерий. Предложены подходы по доставке с помощью CPP антисмысловых олигонуклеотидов для уменьшения роста некоторых патогенных бактерий. Например, доставка с помощью CPP антисмысловых пептидо-нуклеиновых кислот (ПНК), нацеленных на ген ДНК гиразы в *Streptococcus Pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae*, а также на ген бактериальной полимеразы у *S. pyogenes* и *S. Pneumoniae*, существенно подавляет жизнеспособность этих бактерий [139–141]. Кроме того, доставка в бактериальные клетки антисмысловых ПНК может быть использована и для подавления экспрессии изучаемых генов с целью выяснения функции белков, кодируемых этими генами. Эта задача всё ещё является актуальной, поскольку почти 30% всех белков бактерий с отсекументированными геномами аннотированы, как неохарактеризованные белки [142].

1.7.1 CPP для доставки лекарственных средств в клеточные компартменты

При доставке лекарственных средств в клетки важно учитывать, что действие некоторых из них зависит не только от эффективности проникновения в клетку, но и от достижения целевого внутриклеточного компартмента, такого как ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи [95, 96].

1.7.1.1. Ядро

Ядро – важнейшая органелла эукариотической клетки, в нём заключена бóльшая часть генетического материала клетки. Патологические изменения ядерных структур приводит к тяжёлым заболеваниям. Например, изменение свойств ядерной ламины в мышечных клетках ведет к изменению организации хроматина и развитию мышечной дистрофия Эмери-Дрейфуса [123, 124]. Лечение этого заболевания, а так же множества других заболеваний человека, вызванных нарушением экспрессии генов, например, онкологических заболеваний [102, 103] требует доставки биологически активных соединений в ядерный компартмент. Однако макромолекулы более 50 кДа не могут самостоятельно проникать через ядерные поры. Для проникновения таких молекул необходимо наличие специального пептидного фрагмента NLS (сигнал ядерной локализации). Существуют различные NLS, на основе которых созданы такие

проникающие пептиды как MPG, Pep-1, N50-sC18* и NrTP-sC18*, способные доставлять связанные с ними молекулы в ядро [50, 97]. Например, проникающий пептид sC18*, слитый с ядерным сигналом локализации N50 - фрагментом субъединицы p50 транскрипционного фактора NF-κB, или ядрышковым сигналом локализации NrTP – пептидом, сконструированным на основе кротаминина, эффективно проникают в ядро, обеспечивая доставку доксорубина. Исследования цитотоксической активности *in vitro* показали, что, эти CPP не обладают цитотоксической активностью, но при этом их комплексы с доксорубином обладают значительно большим цитотоксическим эффектом в отношении раковых клеток по сравнению с доксорубином. Таким образом, CPP, содержащие фрагменты ядерной и ядрышковой локализации, являются перспективными для доставки молекул в ядро клетки [53].

1.7.1.2 Митохондрии

Нарушение работы митохондрий обнаруживается при таких тяжёлых заболеваниях как диабет, кардиомиопатия, бесплодие, болезнь Паркинсона, мигрень, онкологические заболевания, а также инсульт. Поэтому доставка лекарственных средств в митохондрии является важным условием лечения широкого спектра заболеваний. Для решения этой задачи был создан ряд CPP, имеющих в своём составе фрагмент митохондриальной локализации [50, 98].

Группой Нойндорф была исследована группа пептидов, сконструированных на основе sC18 – проникающего пептида, полученного из С-концевого домена катионного антимикробного пептида CAP18 и сигнала митохондриальной локализации MTS. Показано, что некоторые из этих пептидов способны эффективно доставлять внутрь митохондрий цитостатический препарат хлорамбуцил, что обеспечивает усиление цитотоксического действия хлорамбуцила в отношении клеток HeLa в культуре [148].

Широко распространена доставка в митохондрии с помощью CPP антиоксидантов, таких как витамин E, или других препаратов, модулирующих уровень активных форм кислорода [103, 104]. Например, TAT, слитый с синтетическим пептидом CAMR, имеющим тропность к митохондриям, способен доставлять человеческий белок-антиоксидант металлопротеин 1A (hMT1A), что приводит к уменьшению генерации активных форм кислорода в клетках, что, в свою очередь, может быть важно для предотвращения болезни Паркинсона [55]. Пептид mtCPP-1, эффективно проникающий в митохондрии, сам по себе снижает уровень активных форм кислорода в митохондриях, а также способен доставлять в этот клеточный компартмент малые молекулы, например флуоресцентные красители [150].

Известны CPP, которые по-разному взаимодействуют с мембранами в зависимости от их состава. Например, (KLAKLAK)₂ не повреждает плазматическую мембрану при проникновении в клетки, однако разрушает мембрану митохондрий, вызывая апоптоз. Однако, этот пептид имеет недостаточно высокую активность по отношению к раковым клеткам, чтобы достигать терапевтически значимых внутриклеточных концентраций. В связи с чем, на его основе разработаны более эффективные модифицированные пептиды, например введение в структуру пептида 7 дополнительных остатков аргинина позволило значительно повысить цитотоксическую активность *in vitro* и *in vivo* [75, 130].

1.7.1.3. Лизосомы и эндосомы

Лизосомы участвуют в деградации различных макромолекул, их рециркуляции, а также в процессе аутофагии клеточных органелл. Эффективная деградация широкого спектра молекул в лизосомах осуществляется примерно 60 различными гидролазами, и дефицит таких ферментов приводит к накоплению их субстратов в различных органах и тканях организма. Такие редкие наследственные заболевания как болезнь Тея-Сакса, GM₁-ганглиозидоз, болезнь Фарбера, характеризующиеся нарушениями работы ЦНС с широким спектром проявлений и вызванные дефицитом ферментов деградации в лизосомах, называют болезнями лизосомного накопления [100, 101]. В клинической практике такие заболевания лечат фермент-заместительной терапией, однако, доставка ферментов, особенно в ЦНС, является низкоэффективной, что значительно снижает терапевтический эффект [102, 103]. Таким образом, системы доставки на основе CPP, способные преодолевать ГЭБ и доставлять лекарства в лизосомы, обладают значительным терапевтическим потенциалом для лечения заболеваний лизосомного накопления. Например, бримапитид, участвующий в клинических испытаниях как AM-111, является высокоселективным неконкурентным ингибитором длительного действия N-концевой киназы c-Jun (JNK). Пептид состоит из фрагмента (20 аминокислот), взаимодействующего с JNK, и модифицированного пептида TAT (PPRRRQRKRG). В состав бримапитида входят D-аминокислоты, обеспечивающие устойчивость пептида к протеазам. В 2017 г. завершена III фаза клинических испытаний бримапитида. Препарат исследовали в качестве терапевтического средства для лечения острого повреждения улитки внутреннего уха. При местном введении бримапитид диффундирует через клеточные мембраны и блокирует c-Jun N-концевую протеинкиназу, играющую решающую роль в развитии острой сенсорной потери слуха. Клинические испытания показали, что у пациентов, принимавших препарат, наблюдалось номинально значимое улучшение слуха

по сравнению с плацебо, однако улучшение слуха к 28 дню терапии (конечная точка эффективности) было достигнуто не для всех пациентов [156].

III фаза клинических испытаний бримапотида (под кодом XG-102, см. <https://clinicaltrials.gov/>) при лечении послеоперационного воспаления глаз в сравнении с применением дексаметазона показала, что однократное субконъюнктивальное введение в конце хирургической процедуры не уступает по эффективности применению дексаметазона в виде глазных капель 4 раза в день в течение 21 дня и может стать альтернативой постоперационному применению кортикостероидных препаратов [157].

В настоящее время более 25 препаратов на основе СРР проходят клинические испытания, но ни один из этих препаратов пока не одобрен к применению в клинической практике [40, 62, 88, 3].

1.8 Лактаптин и его рекомбинантные аналоги

Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования цитотоксического действия белков молока человека на опухолевые клетки. Белки плазмы молока разделяли хроматографически и исследовали их влияние на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Был обнаружен пептид с молекулярной массой 8,6 кДа, индуцирующий апоптотическую гибель клеток MCF-7 и получивший название лактаптин. Для идентификации этого пептида был проведён масс-спектрометрический анализ продуктов его трипсинолиза. Молекулярные массы продуктов гидролиза лактапина трипсином совпали с молекулярными массами пептидов, полученных трипсинолизом фрагмента 57-130 а.о. к-казеина человека [158] (Рис. 7).

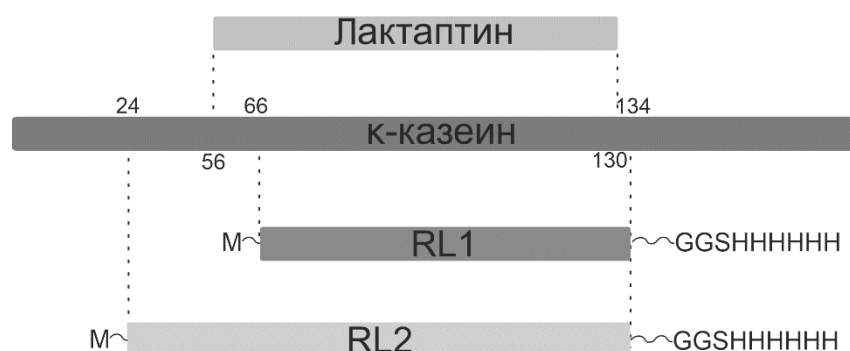


Рис. 7. Схема структур к-казеина человека, лактапина и его рекомбинантных аналогов RL1 и RL2. Прямоугольниками обозначены первичные структуры перечисленных белков. Цифрами отмечены номера аминокислотных остатков в структуре к-казеина; GGSНННННН — последовательность, добавленная к аминокислотным

последовательностям рекомбинантных пептидов и необходимая для их хроматографической очистки.

Поскольку препаративное получение лактапина из естественного источника (молоко человека) является затруднительным, был сконструирован ряд плазмид, позволяющих получать рекомбинантные аналоги лактапина в *E. coli*.

Ген, кодирующий к-казеин человека, имеет экзон-интронную организацию. Последовательность ДНК, кодирующая пептид лактапин, находится во втором и третьем экзонах. При создании плазмид, кодирующих аналоги лактапина, были выбраны последовательности ДНК, включающие в себя третий экзон гена (такая последовательность ДНК кодирует пептид, названный RL1) и последовательность из второго и третьего экзонов (кодирует пептид RL2). Такие плазмиды позволяют получать пептиды RL1, соответствующий фрагменту 66-130 а.о. к-казеина человека и содержащий усеченную последовательность лактапина, и RL2, который соответствует фрагменту к-казеина с 24 по 134 а.о., то есть содержит полную последовательность лактапина и ещё 32 а.о. в направлении N-конца (Рис. 7).

Оба аналога лактапина содержат C-концевую последовательность GGSНННННН, позволяющую эффективно выделять пептиды с помощью аффинной хроматографии на металл-хелатирующих сорбентах, и метионин на N-конце, необходимый для трансляции в прокариотической системе.

При оценке цитотоксической активности RL1 и RL2 в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 было показано, что жизнеспособность клеток MCF-7, обработанных 60 мкг/мл RL2 за 72 часа снижается на 60%, тогда как обработка рекомбинантным пептидом RL1 в аналогичных условиях приводит к снижению жизнеспособности клеток менее, чем на 20%. Таким образом, цитотоксическая активность RL2 значительно выше, чем RL1, что позволяет предположить, что N-концевой участок RL2 протяженностью 44 а.о., соответствующий фрагменту 23–66 а.о. к-казеина человека, который не входит в состав RL1, необходим для проявления цитотоксической активности RL2 в отношении опухолевых клеток [1].

Обработка клеток MCF-7 природным лактапином снижает жизнеспособность клеток на 60% в концентрации около 90 мкг/мл за 12 часов, тогда как жизнеспособность клеток, обработанных 100 мкг/мл RL2 за 48 часов снижается лишь на 20% [159]. Таким образом, природный лактапин проявляет бóльшую цитотоксическую активность по сравнению с RL2. Мы предполагаем, что это может быть связано с агрегацией RL2 в тельца включения в процессе его биосинтеза в клетках-продуцентах. Вероятно,

дальнейший рефолдинг может в значительной мере влиять на активность белка, полученного в прокариотической системе. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что пептид EL1, являющийся секретлируемой формой RL2 и полученный в эукариотической системе экспрессии, обладает большей цитотоксической активностью по сравнению с RL2 [160].

Тем не менее, согласно проведенным исследованиям, свойства рекомбинантного аналога RL2 оказались наиболее близки к свойствам природного лактапина [133, 134], и RL2 был выбран для дальнейших исследований.

Для получения лактапина белки плазмы молока человека разделяли последовательно ионообменной хроматографией на DEAE-Fractogel, аффинной хроматографией на цибакрон-сефарозе и высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращённо-фазовом сорбенте Protein C4. Для определения аминокислотной последовательности очищенного лактапина его подвергали трипсинолитическому гидролизу. Продукты гидролиза анализировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Было показано, что продукты трипсинолиза лактапина по молекулярной массе совпадают с продуктами гидролиза трипсином фрагмента 66 – 123 а.о. к-казеина человека. Таким образом, было установлено, что лактапин является гидролитическим фрагментом к-казеина и включает фрагмент к-казеина с 24 по 134 а.о. и дополнительную последовательность GSHHHHHH на С-конце, облегчающую процесс хроматографической очистки пептида.

При исследовании механизма действия RL2 на клетки человека с использованием RL2, конъюгированного с родаминовым красителем, было показано, что RL2 проникает как в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, так и в немалигнизированные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани MSC (Рис. 8). При этом цитотоксическое действие пептид оказывал лишь на онкотрансформированные клетки, не влияя на жизнеспособность нормальных.

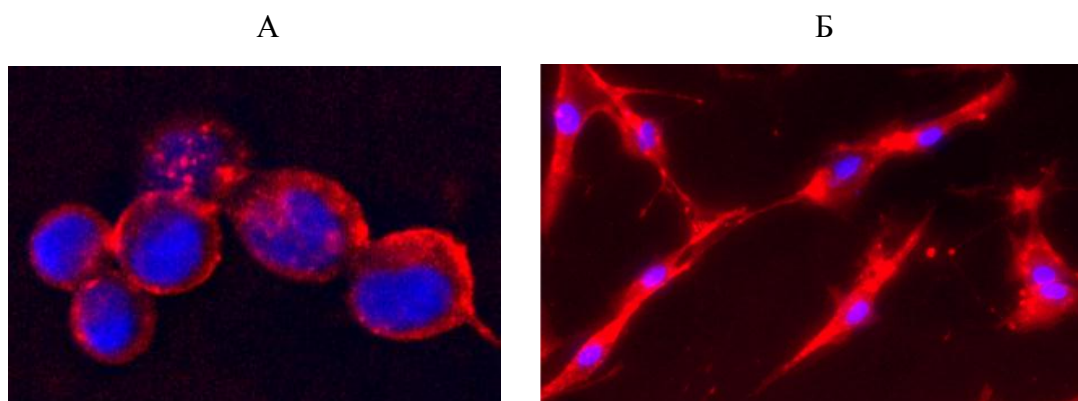


Рис. 8. Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (А) и немалигнизированные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека MSC (Б), инкубированные с родаминовым конъюгатом RL2-Rho (красный). Ядра клеток окрашены DAPI. Флуоресцентная микроскопия.

Механизм проникновения RL2 в клетки оставался неизученным, как и его вторичная структура. При этом первичная структура RL2 и его эффективное проникновение в цитоплазму различных типов клеток позволяли предположить, что RL2 может обладать свойствами CPP.

Таким образом, именно исследованию вторичной структуры RL2 и путей его взаимодействию с клеткой посвящено настоящее исследование.

1.9 Заключение

В 1988 году был открыт TAT – первый пептид, способный эффективно проникать в клетки непосредственно через плазматическую мембрану. Затем появились данные и о других CPP (cell penetrating peptides) – пептидах с подобными свойствами. В 1994 году впервые была показана возможность доставки в клетки с помощью CPP молекул различного размера и состава. Эти открытия стимулировали работы по изучению структуры CPP, механизмов их проникновения в клетки и способов конъюгирования этих пептидов с различными грузами. В настоящее время к CPP относят более 1000 пептидов.

В обзоре литературы рассмотрены особенности первичной и вторичной структуры CPP, механизмы их взаимодействия с клетками эукариот и возможные области применения. Пептиды этого класса отличаются друг от друга по свойствам, однако возможно выделить общие свойства большинства проникающих пептидов: небольшие размеры и положительный общий заряд.

Механизм проникновения СРР в клетки остаётся предметом активных исследований и на сегодняшний день предполагают, что интернализация СРР происходит как по механизму эндоцитоза, так по механизму прямого проникновения, обусловленного физико-химическими свойствами пептидов. Существует несколько моделей, описывающих механизм прямого проникновения пептидов в клетки, – образование инвертированных мицелл, образование пор, встраивание СРР между микродоменами мембраны и адаптивная транслокация СРР через мембрану, но лишь часть этих моделей имеет экспериментальное подтверждение.

Эффективное проникновение СРР в клетки различных линий, а также их способность доставлять внутрь клеток молекулы различной природы (белки, нуклеиновые кислоты, противоопухолевые препараты и т.д.) делают СРР перспективными молекулами для создания систем доставки лекарственных средств и диагностических молекул.

Данная работа посвящена исследованию структуры и механизмов проникновения в клетки пептида RL2, который согласно имеющимся данным, может проявлять свойства СРР.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и оборудование

2.1.1 Реактивы и материалы

В работе использованы следующие реактивы и материалы: Трис, персульфат аммония, хлорид натрия, (Gerbu, Германия), 2-меркаптоэтанол, 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI), гепаринат натрия, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид (МТТ) (Sigma, США), соomassie Brilliant Blue G-250 (Helicon, Москва), ксиленцианол, бромфеноловый синий, бромистый этидий, SDS-ДСН (Sigma, США), TEMED, акриламид, агароза, ЭДТА, N,N'-метиленабисакриламид (ICN, США), набор ДНК с известными молекулярными массами (Биолабмикс, Россия), набор белков с известными молекулярными массами (Thermo Fisher Scientific, США), 2-меркаптоэтанол, эндонуклеаза рестрикции *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific, США), набор для выделения и очистки плазмидной ДНК EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия).

Реактивы для синтеза флуоресцентного меченого белка: ДМСО (Fluka, Швейцария), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид м-4-толуолсульфата, NN'-дициклогексилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, 5(6)-карбокситетраметилпродамин, диэтиловый эфир, ацетонитрил (Криохром, Россия), триэтиламмония ацетат, Sequencing Grade Modified Trypsin – трипсин для масс-спектрометрии (Promega, США).

Реактивы для биосинтеза и очистки RL2, обогащенного тяжёлыми изотопами углерода и азота: триптон, дрожжевой экстракт, агар, фенолметилсульфонилфлуорид (PMSF) ростовая среда для *E. coli* SILEX обогащённая изотопами ¹³C, ¹⁵N (Silantes, Германия), изопропилтиогалактозид (MP Biomedicals, США), ампициллин (Sigma, США).

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства и имели квалификацию «о.с.ч.» или «х.ч.».

Реактивы для культивирования клеток эукариот: культуральные среды Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Leibovitz's L-15 (L-15), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640); эмбриональная бычья сыворотка FBS, раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин) (GIBCO, Life Technologies, Великобритания). GlutaMAX™ (GIBCO, Invitrogen, Франция), раствор Трипсин-EDTA (GIBCO, Invitrogen, США), натрий-фосфатный буфер PBS (Amresco, США).

Реактивы для проточной цитофлуорометрии: метанол (Panreac), ингибиторы эндоцитоза: NaN₃, хлорпромазин, нистатин, цитохалазин Д, ЕРРА, диназор, вортманнин, МβCD (Sigma, США).

Сорбенты для хроматографии: Sephadex G-25 (Danaher, США), Имас-сефароза (Biorad, США), SP-сефароза (Danaher), DEAE Sephadex A-25 (Danaher, США), силикагелевая пластинка Silicagel 60 F254 (MERCCK, США).

2.1.2 Плазмиды

pEGFP-C1 – рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая зеленый флуоресцентный белок EGFP (4731 п.н.) (Takara Bio Europe).

pGSDI/FR2 – рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая рекомбинантный аналог лактапина RL2 (3164 п.н.) (ИХБФМ СО РАН, Россия). (Приложение А, Рис. А.1)

2.1.3 Бактериальные штаммы

Escherichia coli штамм TOP10 (Life Technologies, США);

Escherichia coli штамм BL21(DE3) (New England Biolabs, США).

2.1.4 Буферные смеси и растворы

PBS (стерильный) – фосфатный буфер, pH 7,4, 1,7 мМ КН₂РО₄, 5,2 мМ Na₂НРО₄, 150 мМ NaCl;

Буфер для нанесения проб на полиакриламидный гель – 0.05% ксиленцианол, 0.05% бромфеноловый синий, 50% глицерин;

ТАЕ: 40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, pH 8.4;

Буфер для нанесения проб на агарозный гель: 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерин, бромфеноловый синий (75 мкг/мл), ксиленцианол (75 мкг/мл), pH 6.8;

L-среда - 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl;

L агар - 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, 15 г/л агар;

TSS буфер - 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl, 5 г/л MgSO₄×7H₂O, 10 г/л PEG 6000, 50 мл/л ДМСО;

а/а – антибиотик/антимикотик (10000 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина)

гибридизационный буфер - 15 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, 50 мМ ацетат калия, 1 мМ ацетат магния.

2.1.5 Растворы для хроматографии

Лизис-буфер: 50 мМ Трис-НСl, 50 мМ сахараза, 50 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF;

Раствор 1: 50 мМ ацетат натрия, 2 М мочевины, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 М хлорид натрия, 50 % ацетонитрил;

Раствор 2: 2 М мочевины, 0,3 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0, 10 мМ имидазол, 10 мМ β-меркаптоэтанол;

Раствор 3: 1 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0, 10 мМ β-меркаптоэтанол;

Раствор 4: 0,5 М хлорид натрия, 50 мМ ацетат натрия рН 5,5;

Раствор 5: 2 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0, 0,3 М имидазол, 10 мМ β-меркаптоэтанол;

Раствор 6: 2 М мочевины, 0,3 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0, 10 мМ β-меркаптоэтанол;

Раствор 7: 2 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl рН 7,0;

Раствор 8: 2 М мочевины, 0,45 М хлорид натрия.

2.1.6 Клеточные культуры

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-321 (коллекция клеточных культур ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия», г. Химки, Московская область), аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), аденокарциномы лёгкого человека A549 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) и карциномы кожи человека A431 (Коллекция клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово).

2.1.7 Олигодезоксирибонуклеотиды

мяоРНК U25

GGGUUCCUAUGAUGAGGACCUUUUCACAGACCUGUACUGAGCUCCGUGAGGAUA
AAUAACUCUGAGGAGA

siРНК

смысловая GAACGGCAUCAAGGUGAACTT

антисмысловая GUUCACCUUGAUGCCGUUCTT

2.1.8 Оборудование

Центрифуга с охлаждением 5415 (Eppendorf, Германия), CO₂-инкубатор (Heraeus, Германия), источник тока (ДНК-технология, Россия), хроматографическая станция среднего давления АКТА avant (Danaher, США), спектрофотометр NanoVue Plus (Danaher, США), микроскоп AxioSkope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия), флуоресцентный микроскоп ZOE™ (Bio-Rad, США), система фотонной корреляционной спектроскопии Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), атомный силовой микроскоп Multi-Mode 8 (Bruker, Германия), хроматографическая станция Bio Logic LP (BioRad, США), планшетный фотометр Apollo LB912 (Berthold Technologie, Германия), проточный цитофлуориметр FACS Canto II (BD Biosciences, США), флуоресцентный микроскоп In Cell Analyzer 2000 (Danaher, США), система гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США), флуоресцентный микроскоп ZOE (Bio-Rad, США).

2.2 Методы

2.2.1 Получение штаммов *E.coli* BL21(DE3), продуцирующих RL2

Клетки *E.coli* BL21(DE3) размораживали во льду, 10 мкл клеточной суспензии с оптической плотностью 0,4 при длине волны $\lambda = 600$ нм (OD₆₀₀) помещали в 1 мл питательной среды L и наращивали в шейкер-инкубаторе при 200 об/мин и температуре 37°C в течение 14 - 16 ч (посевная культура). Затем 30 мкл посевной культуры добавляли к 1,5 мл среды L и инкубировали при 200 об/мин и температуре 37°C до OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 о.е. Затем 1 мл культуры переносили в центрифужную микропробирку и центрифугировали при 4000 об/мин, 4°C в течение 10 мин. Супернатант удаляли, полученный осадок аккуратно ресуспендировали в 100 мкл охлажденного TSS буфера, далее вносили 200 нг плазмидной ДНК pGSDI/FR2, кодирующей RL2, аккуратно перемешивали и инкубировали 20 мин на льду. Затем добавляли 900 мкл буфера TSS, 9 мкл 40% глюкозы, помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 25 мин. 25 мкл трансформированной культуры рассеивали шпателем Дригальского на чашку Петри, содержащую L-агар с ампициллином (100 мкг/мл).

2.2.2 Биосинтез рекомбинантного белка RL2, обогащённого тяжёлыми изотопами ¹³C, ¹⁵N

Индивидуальную колонию клеток, трансформированных плазмидой pGSDI/FR2, помещали в L-среду, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 0,5% глюкозы, и инкубировали в шейкер-инкубаторе при 170 об/мин и температуре 37°C в течение 14 - 16 ч. 3 мл бактериальной культуры переносили в колбы вместимостью 750 мл, содержащие

150 мл среды SILEX, обогащённой тяжёлыми изотопами ^{13}C и ^{15}N , с ампициллином и инкубировали в шейкер-инкубаторе при 170 об/мин и 37 °С до достижения оптической плотности культуры $\text{OD}_{600} = 0,7-0,8$ о.е.. Для индукции синтеза целевого белка добавляли ИПТГ до концентрации 0,5 мМ и продолжали культивировать в тех же условиях в течение ночи. Клетки из культуральной среды осаждали центрифугированием при 16000 g 20 мин при 4°С. Полученную биомассу замораживали при -70°С. Для оценки содержания целевого белка аликвоты культуры до и после проведения индукции анализировали методом электрофореза в ПААГ (Приложение А, Рис. А.2).

2.2.3 Получение лизата и клеточного экстракта из биомассы клеток-продуцентов RL2

К 5 г замороженной биомассы *E.coli* BL21(DE3), содержащей RL2, добавляли 40 мл лизис-буфера, перемешивали на магнитной мешалке 30 минут. Затем медленно добавляли полиэтиленимин до 0,5% и продолжали перемешивание в течение 30 минут. Далее суспензию центрифугировали 10 мин при 4°С и 16000 g.

Для получения экстракта надосадочную жидкость декантировали, к полученному осадку добавляли 40 мл раствора 1, содержащего 50 мМ ацетат натрия, 2 мМ мочевины, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 мМ хлорид натрия, 50% ацетонитрил, и перемешивали на магнитной мешалке 30 мин. Далее суспензию центрифугировали 10 мин при 4° С и 16000 g. Полученный экстракт анализировали методом электрофореза в ПААГ и наносили на хроматографическую колонку для очистки целевого белка (Приложение А, Рис. А.3).

2.2.4 Хроматографическая очистка RL2

Разделение белков клеточного экстракта, полученного из лизата клеток-продуцентов *E.coli*, проводили на хроматографической станции среднего давления АКТА avant (Danaher, США), оснащенной спектрофотометрическим детектором поглощения и проточным кондуктометром. Измерение оптической плотности растворов в процессе хроматографии проводили на длинах волн 260 и 280 нм.

Клеточный экстракт наносили на колонку (диаметр колонки 1,5 см, высота сорбента 4 см) с ИМАС-сефарозой, содержащей двухвалентные ионы никеля, уравновешенную буферным раствором 2, содержащим 2 М мочевины, 0,3 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 10 мМ имидазол и 10 мМ β-меркаптоэтанол. Не связавшиеся с сорбентом белки удаляли этим же буфером. Далее для элюции белков клеточного экстракта, связавшихся с сорбентом, колонку промывали буферным раствором 3, содержащим 1 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,0 и 10 мМ β-меркаптоэтанол, затем раствором 4,

содержащим 0,5 М хлорид натрия, 50 мМ ацетат натрия, pH 5,5. RL2 элюировали буферным раствором 5, содержащим 2 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl, pH 7,0, 0,3 М имидазол и 10 мМ β-меркаптоэтанол. Белки, элюированные на каждом этапе хроматографии, анализировали электрофорезом в ПААГ (Приложение А, Рис. А.4).

Фракцию, содержащую целевой пептид RL2, диализовали против воды при 4°C в течение 18 ч при непрерывном перемешивании.

Белковую фракцию, полученную после элюции с ИМАС-сефарозы и содержащую RL2, наносили на колонку с DEAE Sephadex A-25 (диаметр колонки 1 см, высота сорбента 27 см), уравновешенную раствором 6, содержащим 2 М мочевины, 0,3 М хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl pH 7,0 и 10 мМ β-меркаптоэтанол. Не связавшиеся с сорбентом белки элюировали этим же раствором и анализировали электрофорезом в ПААГ (Приложение А, Рис. А.5).

После стадии очистки на DEAE Sephadex A-25 белковую фракцию, содержащую целевой пептид, диализовали при 4°C против воды 18 ч при непрерывном перемешивании. Диализованную фракцию, содержащую RL2, наносили на колонку с катионообменным сорбентом SP Sepharose FF (диаметр колонки 1,5 см, высота сорбента 3 см), уравновешенную раствором 7, содержащим 2 М мочевины и 50 мМ Трис-НСl pH 7,0. RL2 элюировали раствором 8, содержащим 2 М мочевины и 0,45 М хлорида натрия. Фракцию, содержащую RL2, полученную после хроматографической очистки на SP Sepharose FF, диализовали при 4°C против воды в течение 18 ч при непрерывном перемешивании. Для эффективной очистки белка от низкомолекулярных примесей воду для диализа однократно заменяли через 4 часа после начала диализа. Чистоту полученного RL2 анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (Приложение А, Рис. А.6).

2.2.5 Измерение гидродинамического диаметра частиц RL2 и комплексов RL2-pEGFP методом динамического светорассеяния

Для измерения гидродинамического диаметра частиц RL2, готовили раствор RL2 с концентрацией 0,28 мг/мл в буфере, содержащем 25 мМ MES (pH 5,5 – 6,5) или 25 мМ Трис-НСl (pH 7,0 – 8,0).

Для получения комплексов RL2-pEGFP смешивали плазмиду pEGFP с RL2 в 25 мМ буфере MES pH 5,5 до получения комплексов с зарядными соотношениями 5, 7 и 9. Смесь инкубировали 5 мин при 37°C.

Оценку диаметра и ζ-потенциала частиц RL2 и комплексов RL2-pEGFP проводили с помощью системы фотонной корреляционной спектроскопии Zetasizer Nano ZS на длине

волны 623 нм. Гидродинамические диаметры частиц измеряли, используя микрокювету ZEN0040, а для измерения ζ -потенциала использовали кювету DTS1070. Все буферные растворы, используемые в экспериментах, предварительно центрифугировали и стерилизовали фильтрацией (диаметр пор фильтра 0,22 мкм).

Средние значения диаметра и ζ -потенциала частиц рассчитывали как среднее значение по результатам минимум трех измерений. Данные анализировали с помощью программы Zetasizer Software v7.12.

2.2.6 Определение формы частиц RL2 методом атомно-силовой микроскопии

10 мкл суспензии RL2 с концентрацией 2,9 мг/мл наносили на пластинку слюды (1 см × 1 см), инкубировали 30 с, затем пластинку промывали деионизированной водой и высушивали в слабом потоке аргона. Эксперименты проводили на атомном силовом микроскопе Multi-Mode 8 с площадью сканирования 10 мкм × 10 мкм и 1,8 мкм × 1,8 мкм. Изображения получали в полуконтактном режиме в атмосферных условиях с использованием алмазоподобного углеродного кантилевера серии NSG AFM (НТ-МДТ, Зеленоград, Россия) с радиусом кривизны острия 1 – 3 нм. Изображения анализировали с помощью программы NanoScope Analysis (Bruker, Германия). Аналогичную процедуру проводили для 25 мМ буферных растворов MES, цитрата натрия, MOPS, PBS.

2.2.7 Исследование вторичной структуры RL2 методом спектроскопии кругового дихроизма

Для анализа вторичной структуры RL2 в гидрофильном и гидрофобном окружении, RL2 разводили до концентрации 0,25 мг/мл раствором 150 мМ NaCl или 50% трифторэтанола (TFE). Спектры RL2 снимали на длинах волн 185 - 250 нм с интервалом 1 нм, в трех повторах. Анализ образцов был выполнен на спектрополяриметре Jasco 600 (Jasco Instruments, Япония) с использованием кварцевой кюветы с длиной светового пути 0,1 см (Starna).

2.2.8 Синтез родаминового конъюгата RL2-Rho

Синтез RL2, флуоресцентно меченного 5(6) - карбокситетраметилродамином, проводили через стадию образования сукцинимидного эфира 5(6) - карбокситетраметилродамина с промежуточной карбодиимидной активацией карбоксильной группы красителя.

Для синтеза сукцинимидного эфира 5(6) - карбокситетраметилродамина смешивали по 50 мкл растворов 0,3 М TAMRA, 0,5 М HoSu и 1 М ДЦК в ДМСО. Реакционную смесь

инкубировали в темноте при 25°C 19 часов. За ходом реакции следили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинке Silicagel 60 F254 в системе ацетонитрил \ вода \ ТЕАА (7:2:1). Продукт реакции осаждали 7,5 мл диэтилового эфира, центрифугировали 10 минут при 4000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и сушили на воздухе 20 минут. Осадок растворяли в 250 мкл ДМСО.

Для получения 5(6) - карбокситетраметилпроламинового конъюгата RL2 к 3,3 мл RL2 с концентрацией 3 мг/мл, добавляли 250 мкл сукцинимидного эфира 5(6) - карбокситетраметилпроламина и инкубировали 2 часа при 25°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,5 М глицина.

2.2.9 Очистка RL2-Rho методом гель-фильтрации

Для очистки конъюгата RL2-Rho от свободного флуоресцентного красителя, реакцию смесь наносили на хроматографическую колонку с Sephadex G-25, уравновешенную раствором А, содержащим 50 мМ NaCl, 25 мМ NaOAc (pH 4.5). Далее колонку промывали раствором А со скоростью потока 0,75 мл/мин.

За ходом гель-фильтрации следили с помощью проточного фотометра, входящего в комплект хроматографической станции Bio Logic LP. Чистоту полученных белков оценивали методом электрофореза в ПААГ.

2.2.10 Определение концентрации белка в растворе методом Бредфорда

Для построения калибровочной кривой готовили 11 последовательных полуторократных разведений БСА объёмом по 75 мкл с концентрацией белка от 0,5 мг/мл до 5,8 мкг/мл. Разведения конъюгата RL2-Rho проводили аналогичным образом. К каждому образцу добавляли по 75 мкл реактива Бредфорда, инкубировали 10 минут при 25°C и измеряли оптическую плотность растворов с помощью планшетного фотометра Apollo (Berthold, Германия) со светофильтром с максимумом пропускания 595 нм. Концентрацию белка в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой, построенной по оптической плотности растворов БСА с известной концентрацией.

2.2.11 Электрофоретический анализ белков в ПААГ

Электрофоретический анализ белков проводили по методу Лэммли. Препараты белков инкубировали 5 минут при 98°C с буфером для нанесения, содержащим 0,125 М Трис-НСl, pH 6,8, 4% ДСН, 20% глицерин, 1% β-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий, и разделяли в ступенчатом ПААГ. Концентрирующий гель: 165 мМ Трис-НСl, pH 6,8; 5% акриламид; 0,1% N,N'-метилден-бис-акриламид; 0,1% ДСН; 0,04% ПСА.

Разделяющий гель: 0,375 мМ Трис-НСl, рН 8,9; 0,1% ПСА; 13,3% акриламид; 0,27% N,N'-метилден-бис-акриламид; 0,1% ДСН; 28 мМ ТЕМЕД. Электродный буфер: 25 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 250 мМ глицин, 0,1% ДСН.

Электрофорез проводили при напряжении 110 В при концентрировании и 150 В при разделении образцов.

Гель окрашивали Кумасси R-250 20 минут при 60°С и отмывали 30 минут в воде при 90°С. Визуализацию белков в геле проводили с использованием транс-иллюминатора (BioRad Gel Doc XR+, США).

2.2.12 Культуры клеток

Клетки MCF-7 культивировали в среде IMDM с 2 мМ L-глутамином, 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и в присутствии смеси антибиотиков и антимикотика (а/а) 10000 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина. Клетки MDA-MB-231 культивировали в среде L-15, содержащей 10% FBS и а/а. Клетки A431 и A549 культивировали в среде DMEM с 2 мМ L-глутамином, а/а и 10% FBS. Все клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°С.

2.2.13 Анализ проникновения RL2-Rho в клетки аденокарциномы молочной железы человека методом проточной цитофлуориметрии

Анализ проникновения RL2-Rho в клетки проводили методом проточной цитофлуориметрии. Клетки MCF-7 и MDA-MB-231 высевали на 6 луночные планшеты по 10⁵ клеток на лунку и культивировали 24 ч. Среду удаляли из лунок, клетки промывали PBS и добавляли 1 мл среды RPMI, содержащей 5% FBS и а/а. Далее в лунки с клетками добавляли один из ингибиторов эндоцитоза: хлорпромазин (15 мкг/мл), нистатин (37,5 мкг/мл), цитохалазин Д (10 мкг/мл), ЕРРА (3 мкг/мл), диназор (25,8 мкг/мл), вортманнин (0,03 мкг/мл) или МβCD (6,4 мкг/мл), и инкубировали 30 минут, после чего к клеткам добавляли конъюгат RL2-Rho до конечной концентрации 0,2, 10 или 50 мкг/мл и инкубировали 1 час при 37° С. После инкубации клетки отмывали PBS, далее инкубировали при 37°С с 300 мкл 0,5% трипсина для культуральных работ, контролируя процесс открепления клеток с помощью микроскопа. Для инактивации трипсина к клеткам добавляли среду IMDM с 10% FBS. Клетки собирали, центрифугировали 5 мин при 900 об/мин. Супернатант удаляли, клетки промывали физиологическим раствором и центрифугировали 5 минут при 900 об/мин, процедуру повторяли дважды. Далее клетки фиксировали, для чего к 50 мкл клеточной суспензии в PBS добавляли 1 мл метилового спирта, ресуспендировали и инкубировали 15 минут на холоду. После фиксации клетки

центрифугировали 1 минуту при 3000 об/мин, затем удаляли метанол и ресуспендировали клетки в 500 мкл PBS. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с помощью программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Напряжение детектора флуоресцентного излучения устанавливали таким образом, чтобы уровень фоновой флуоресценции клеток, не обработанных RL2-Rho, значительно отличался от флуоресценции клеток, обработанных RL2-Rho. Количество событий в исследуемых образцах было не менее 10000.

По результатам цитофлуориметрического анализа были рассчитаны средние значения интенсивности флуоресценции клеток, обработанных RL2-Rho. Эффективность проникновения RL2 в клетки, обработанные ингибиторами, вычисляли по формуле (1)

$$\bar{U} = \frac{\bar{X}_{RL2+inh} - \bar{X}_{contr}}{\bar{X}_{RL2} - \bar{X}_{contr}} * 100, \% \quad (1)$$

Где \bar{X}_i – среднее значение распределения клеток по флуоресценции; индекс i определяет тип обработки клеток.

RL2 + inh – клетки, обработанные RL2-Rho в присутствии ингибитора эндоцитоза;

contr – контрольные, не обработанные клетки;

RL2 – клетки, обработанные флуоресцентным конъюгатом RL2-Rho.

За 100% принято среднее значение интенсивности флуоресценции клеток, обработанных флуоресцентным конъюгатом (10 или 50 мкг/мл) в отсутствие ингибиторов. За 0% – среднее значение интенсивности флуоресценции не обработанных клеток. Оценку достоверности различий средних значений интенсивностей флуоресценции клеток, инкубированных в присутствии и отсутствие ингибиторов эндоцитоза, проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между средними значениями интенсивности флуоресценции клеток различных экспериментальных групп считали достоверными при $p \leq 0,05$.

2.2.14 Анализ проникновения конъюгата RL2-Rho в клетки человека методом флуоресцентной микроскопии

Для анализа проникновения конъюгата RL2-Rho в клетки человека, клетки MCF-7, MDA-MB-231 и hFF-1 помещали в 96 луночные планшеты по 8000 клеток на лунку и инкубировали 24 часа при 37°C. Затем культуральную среду удаляли из лунок, клетки

промывали физиологическим раствором и добавляли 100 мкл среды RPMI, содержащей 5% FBS и а/а. Далее к клеткам добавляли ингибитор эндоцитоза и инкубировали 30 минут при 37°C, после чего обрабатывали конъюгатом RL2-Rho до конечной концентрации в среде 50 мкг/мл и инкубировали 1 час при 37°C. После инкубации клетки дважды отмывали физиологическим раствором, добавляли по 100 мкл метилового спирта на лунку и инкубировали на холоду 15 минут. Далее фиксированные клетки дважды отмывали PBS и инкубировали с DAPI (конечная концентрация 0,1 мкг/мл) 5 минут в темноте при 25°C. После этого клетки промывали физиологическим раствором и добавляли в каждую лунку по 100 мкл PBS. Анализ образцов проводили с помощью прибора In Cell Analyzer 2000.

2.2.15 Выделение плазмидной ДНК

Для получения плазмиды pEGFP использовали клетки штамма *E.coli* Top10 (Thermo Fisher Scientific, США). Получение компетентных клеток *E.coli* Top10 и их трансформацию плазмидой pEGFP осуществляли согласно методике, описанной в п. 2.2.1. После трансформации клеток *E.coli* проводили селекцию на чашке с L агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина. Отдельную колонию трансформированных клеток выращивали в 100 мл L среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,5% глюкозы, в шейкер-инкубаторе при 170 об/мин и температуре 37°C в течение 14 - 16 ч. Полученную культуру переносили в центрифужные стаканы и центрифугировали при 1000 g, 4°C в течение 10 мин. Из клеточного осадка выделяли плазмидную ДНК с помощью коммерческого набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Качество выделенной ДНК проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.16 Рестрикционный анализ плазмидной ДНК

К 450 нг плазмидной ДНК pEGFP добавлял 15 ед. эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* в объеме реакционной смеси 20 мкл. Реакцию проводили в условиях, рекомендованных производителем (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 0,5% агарозном геле.

2.2.17 Получение комплексов RL2-pEGFP и LF- pEGFP

Для формирования комплексов RL2-pEGFP смешивали по 5 мкл плазмиды pEGFP $2,47 \times 10^{-8}$ М и 5 мкл RL2 с концентрацией $3,03 \times 10^{-5}$ М, $7,07 \times 10^{-5}$ М или $9,09 \times 10^{-5}$ М (соответствующей зарядному соотношению N/P 5, 7 или 9, соответственно), растворённых в 25 мМ MES, pH 5,5. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 37°C.

Зарядное соотношение рассчитывали по следующей формуле (2):

$$N/P = \frac{n(\text{NH}_3^+ \text{ групп в RL2})}{m(\text{PO}_4^- \text{ групп в ДНК})} \times \frac{C_{\text{RL2}}}{C_{\text{ДНК}}}, \quad (2)$$

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

Для формирования комплексов LF-pEGFP смешивали 0,95 мкл липофектамина, 1,48 мкл реагента P3000, 0,4 мкг pEGFP и доводили до 20 мкл 25 мМ MES, pH 5,5.

2.2.18 Анализ связывания RL2 с плазмидной ДНК

Для анализа связывания RL2 с pEGFP проводили электрофорез в агарозном 0,5% геле. К аликвотам комплекса RL2-pEGFP с различными зарядными соотношениями добавляли $\frac{1}{4}$ объема буфера для нанесения ДНК (раздел 2.1.4) и наносили образцы на 0,5% агарозный гель под напряжением 30 В. Разделение проводили при 100 В в буфере TAE. По окончании электрофореза гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали ДНК с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+.

2.2.19 Оценка стабильности комплексов RL2-pEGFP

Для оценки стабильности комплексов RL2-pEGFP в присутствии конкурентного полианиона к сформированным комплексам RL2-pEGFP добавляли раствор гепарина из расчета 12 мкг гепарината натрия на 1 мкг ДНК pEGFP и инкубировали 30 мин при 37°C. Реакционную смесь анализировали электрофорезом в 0,5% агарозном геле.

2.2.20 Анализ проникновения RL2-pEGFP в клетки методом ОТ-ПЦР

Чтобы оценить возможность доставки pEGFP в клетки A431 с помощью RL2, клетки высевали в 24-луночные планшеты по 35000 клеток на лунку, через сутки к клеткам добавляли комплекс RL2-pEGFP, содержащий 10 нг ДНК, инкубировали в течение 3 часов, трижды промывали PBS и выделяли суммарную клеточную РНК фенол-хлороформной экстракцией с использованием реагента Лира (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для этого в лунку добавляли лизирующий раствор Лира и инкубировали 10 минут, затем для осаждения ДНК лизат центрифугировали 15 минут при 4°C при 12000 g. Далее отбирали супернатант, добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали 10 минут и центрифугировали 10 мин, 10000 g при 4°C. Отбирали 400 мкл нижней (водной) фазы, смешивали с 400 мкл изопропанола,

инкубировали 10 минут и центрифугировали 10 минут при 4°C при 12000 g. Супернатант декантировали, осадок ресуспендировали в 1 мл 75% этанола, центрифугировали 10 минут при 4°C при 8000 g, осадок РНК высушивали и растворяли в 30 мкл воды, очищенной от РНКаз. ОТ-ПЦР проводили в реакционной смеси BioMaster RT-PCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия) с EGFP-специфическими праймерами: 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3' и 5'-GGTGCGCTCCTGGACGTAGC-3' (прямой и обратный, соответственно). В качестве матрицы использовали 1 мкг суммарной клеточной РНК на реакцию. ОТ-ПЦР проводили в следующих условиях: инкубация 5 минут при 25°C, 30 минут при 42°C и 4 минуты при 95°C, затем 30 циклов: денатурация – 30 с при 95°C, отжиг – 30 с при 59°C и элонгация – 20 с при 72°C. Продукты ОТ-ПЦР анализировали электрофорезом в 2% агарозном геле.

2.2.21 Анализ функциональной активности проникшего в клетки RL2-pEGFP методом флуоресцентной микроскопии

Чтобы оценить сохранение функциональной активности ДНК после доставки в клетки A431 с помощью RL2, клетки высевали в 24-луночные планшеты по 35000 клеток на лунку в полной среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин и а/а, за 24 ч до эксперимента. После 24 часов инкубации культуральную среду заменяли на DMEM, содержащую 2 mM L-глутамин, а/а и комплексы RL2-pEGFP с различными зарядными соотношениями, с конечной концентрацией pEGFP 1 мкг/мл. После 3 ч инкубации клетки отмывали PBS и инкубировали 24 часа в полной культуральной среде. Количество клеток, экспрессирующих зелёный флуоресцентный белок, определяли с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

В качестве положительного контроля клетки A431 трансформировали плазмидной ДНК в присутствии коммерчески доступного трансфицирующего реагента липофектамин 3000 в тех же условиях.

2.2.22 Получение комплексов RL2-siPHK и LF-siPHK

Для формирования комплексов RL2-siPHK сначала получали siPHK дуплекс. Для этого смысловой и антисмысловой олигорибонуклеотиды (5'-GAACGGCAUCAAGGUGA АСТТ-3' и 5'-GUUCACCUUGAUGCCGUUCTТ-3', соответственно) с концентрацией 1×10^{-5} M смешивали в гибридационном буфере, содержащем 15 mM Нерес-КОН, pH 7,4, 50 mM ацетата калия и 1 mM ацетата магния, инкубировали 3 мин при 90°C и охлаждали до 37°C.

Далее для получения RL2-siРНК смешивали 5 мкл siРНК дуплекса с концентрацией 5×10^{-6} М с 5 мкл RL2 с концентрацией от $4,6 \times 10^{-6}$ М до $3,2 \times 10^{-4}$ М в зависимости от зарядного соотношения комплекса RL2-siРНК (от 0,5 до 35, соответственно). Для получения LF-siРНК смешивали 5 мкл siРНК дуплекса с концентрацией 5×10^{-6} М с 0,42 мкл Lipofectamine 3000. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C.

2.2.23 Анализ связывания RL2 с siРНК

Для анализа связывания RL2 с siРНК проводили электрофоретический анализ комплексов RL2-siРНК в 15% полиакриламидном геле с соотношением акриламид:N,N'-метиленабисакриламид 20:1 в буфере TBE. К комплексам RL2-siРНК с различными зарядными соотношениями добавляли $\frac{1}{4}$ объёма буфера для нанесения и образцы наносили на гель (по 170 нг РНК на дорожку) под напряжением 30 В, электрофорез проводили при 150 В. По окончании электрофореза гель окрашивали водным раствором SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Sigma, США) и визуализировали РНК с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+.

2.2.24 Анализ проникновения комплексов RL2-siРНК в клетки A549 методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии

Клетки A549 высевали в 12-луночные планшеты по 4×10^4 клеток на лунку. Через 24 ч культуральную среду удаляли из лунок, клетки дважды промывали буфером PBS, добавляли 1000 мкл среды Opti-MEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, комплекс плазмидной ДНК pEGFP с трансфицирующим реагентом Lipofectamine 3000 (1 мкг ДНК на лунку) и сформированный комплекс RL2-siРНК (до конечной концентрации siРНК 50 нМ). В качестве препарата сравнения к клеткам вместо комплексов RL2-siРНК добавляли комплекс LF-siРНК (до конечной концентрации 50 нМ siРНК в культуральной среде). Клетки инкубировали 3 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации к клеткам добавляли FBS до 10% и а/а и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Через 48 ч клетки анализировали на флуоресцентном микроскопе ZOE или проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII. Для анализа методом проточной цитофлуориметрии клетки отмывали буфером PBS и инкубировали со 100 мкл 0,5% трипсина, контролируя процесс открепления клеток с помощью микроскопа. Трипсин инактивировали добавлением 500 мкл DMEM с 10% FBS, суспензию клеток переносили в пробирки и центрифугировали 5 мин при 800 об/мин, 4°C. Супернатант удаляли, к клеткам добавляли 1 мл PBS и центрифугировали 5 мин при 800 об/мин, 4°C, процедуру повторяли дважды. Клеточный осадок ресуспендировали в 150 мкл PBS, добавляли на

холоду 150 мкл 10% формальдегида и инкубировали 2 ч. Далее фиксированные клетки осаждали центрифугированием 1 мин при 1000 g, супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 400 мкл PBS. Флуоресценцию клеток детектировали в канале FITC (535 нм). Анализ данных цитофлуориметрии проводили с помощью программного пакета BD FACSDiva software v6.1.3.

2.2.25 Получение комплекса RL2-мяоРНК и LF-мяоРНК

Для образования комплексов RL2-мяоРНК к 6 мкл мяоРНК с концентрацией 20 или 60 нМ добавляли 6 мкл RL2 с различными концентрациями (0,05 – 0,3 мг/мл), MES pH 5,5 до 25 мМ и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Аналог мяоРНК U25 был синтезирован м.н.с. ЛГР ИХБФМ СО РАН Журавлёвым Е.С., как описано ранее [139]. Для образования комплексов LF-мяоРНК смешивали равные объёмы мяоРНК с концентрацией 20 или 60 нМ и 2,78% Lipofectamine 3000, в 25 мМ MES pH 5,5, инкубировали в течение 5 мин при 37°C.

2.2.26 Анализ цитотоксической активности комплексов RL2-мяоРНК методом МТТ теста

Клетки A549 высевали в 96-луночный планшет по 2×10^3 клеток на лунку в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а. Через 24 ч культуральную среду заменяли на 100 мкл DMEM, содержащей 10,5 мкл комплексов RL2-мяоРНК с различными зарядными соотношениями или 10,5 мкл LF-мяоРНК. Через 2 часа добавляли 50 мкл DMEM, содержащей 30% FBS, трёхкратного а/а (30000 ЕД/мл пенициллин 0,3 мг/мл, стрептомицин и 0,75 мкг/мл амфотерицин) и 6 мМ L-глутамин, и продолжали культивировать клетки в течение 48 часов. Далее среду в лунках заменяли на 200 мкл среды RPMI 1640, содержащей 0,25 мг/мл МТТ, и инкубировали 3 часа при 37°C. Затем среду удаляли и добавляли в каждую лунку по 0,15 мл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов МТТ. Оптическую плотность полученных растворов измеряли при длине волны 570 нм с помощью планшетного ридера Apollo LB912. Для расчета жизнеспособности клеток оптическую плотность контрольных клеток принимали за 100%, жизнеспособность экспериментальных клеток рассчитывали, как процент от контроля \pm стандартное отклонение.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Структура RL2

3.1.1 Первичная структура RL2

Рекомбинантный аналог лактапина RL2 содержит фрагмент к-казеина с 23 по 134 а.о., N-концевой остаток метионина и олигогистидиновую последовательность на C-конце, облегчающую процесс хроматографической очистки пептида. Первичная структура RL2 представлена на рисунке 9 [164].

MNQKQPACHE NDERPFYQKT APYVPMYYVP NSYPYYGTNL
YQRRPAIAIN NPYVPRTYYA NPAVVRPHAQ IPQRQYLPNS
HPPTVVRRPN LHPSFIAIPP KKIQDKIIIP TIGGSNNNNH H

Рис. 9. Аминокислотная последовательность RL2. Красным цветом выделены положительно заряженные аминокислотные остатки, зелёным – гидрофобные и алифатические аминокислотные остатки.

Аминокислотная последовательность пептида обогащена положительно заряженными (аргинин, лизин и гистидин) и гидрофобными аминокислотными остатками. Причём ароматические и неполярные аминокислотные остатки образуют гидрофобный кластер в районе 21 - 41 а.о., а положительно заряженные остатки располагаются преимущественно в районах C и N- концов. Такой аминокислотный состав характерен для пептидов CPP (Cell-penetrating Peptides). Предполагают, что наличие преимущественно положительно заряженных аминокислот, чередующихся с гидрофобными аминокислотами и их кластерами, обеспечивает эффективное электростатическое взаимодействие CPP с плазматической мембраной клетки.

Также в структуре RL2 содержится 20 остатков пролина, что составляет 16,5% его последовательности. Пролин является иминокислотой и, в отличие от аминокислот, атом азота в остатке пролина входит в состав вторичного, а не первичного амина, что обуславливает большую жёсткость структуры иминокислот по сравнению с аминокислотами. Пролин может существовать не только в *транс*-, но и в *цис*-конфигурации, поэтому пептиды, обогащенные пролином, могут иметь различные конформационные структуры при одной и той же аминокислотной последовательности. Кроме того, атом азота иминогруппы не может образовывать водородные связи, и, как следствие, препятствует вхождению остатков пролина в состав α -спиралей и β -складок.

Таким образом, наличие большого количества пролиновых остатков в аминокислотной последовательности белков накладывает значительные ограничения на образование элементов вторичной структуры.

В структуре RL2 многие остатки пролина 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.

Таким образом, RL2 - пептид, в структуре которого содержатся преимущественно положительно заряженные аминокислоты, чередующиеся с ароматическими и алифатическими аминокислотами и их кластерами. RL2 обогащён остатками пролина, сближенными в структуре пептида с остатками глутамина. Эти особенности структуры могут обеспечивать специфические пространственные конформации RL2, а также склонность молекул RL2 к агрегации.

3.1.2 Димеризация RL2

Ранее в нашей лаборатории было показано, что N-концевой регион (1 - 43 а.о.) RL2 отвечает за мультимеризацию пептида, поскольку содержит остаток цистеина, за счёт SH-группы которого образуются межмолекулярные S-S мостики, обеспечивающие образование гомодимера RL2 [1]. Согласно данным электрофоретического анализа в отсутствие восстановителей дисульфидных связей, рекомбинантный аналог лактапина RL2 представляет собой смесь димерной и мономерной форм (Рис. 10).

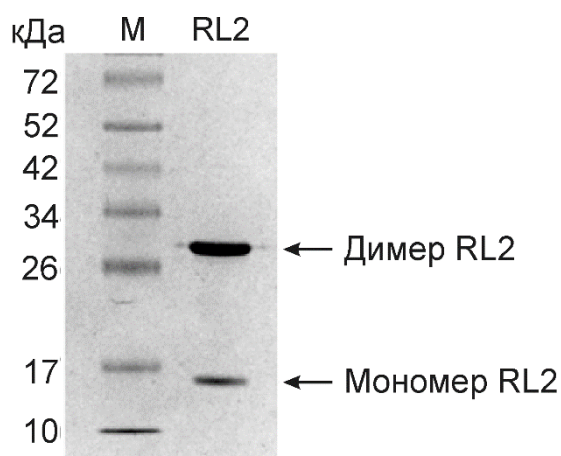


Рис. 10. Электрофоретический анализ RL2 в 13% ПААГ в невосстанавливающих условиях. М – набор белков с известными молекулярными массами.

Было выдвинуто предположение о том, что наличие мономера RL2 может быть связано с образованием аддукта пептида с малой молекулой. Чтобы подтвердить данную гипотезу и удалить молекулу, ковалентно связанную с цистеином, был проведён анализ ^1H спектра образца RL2, обогащённого тяжёлыми изотопами ^{13}C и ^{15}N , в присутствии и отсутствие восстановителя Трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР) методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры ЯМР были сняты и проанализированы сотрудниками НИОХ СО РАН к.х.н., с.н.с. Шернюковым А.В. и м.н.с. Овчеренко С.С (Рис. 11).

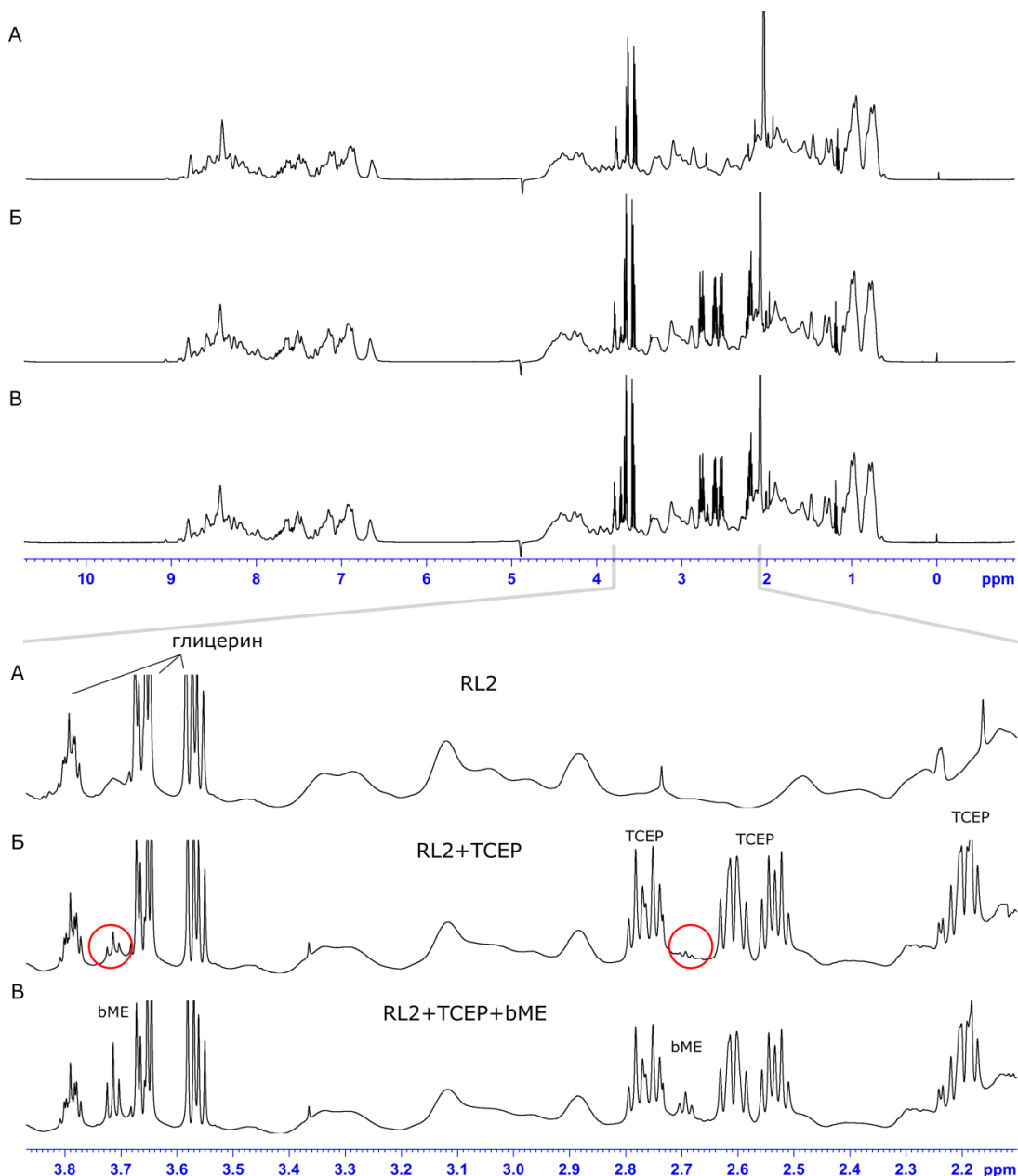


Рис. 11. ^1H ЯМР спектры образца RL2, однородно обогащённого ^{13}C и ^{15}N , в отсутствие восстановителей (А), в присутствии ТСЕР (Б) и в присутствии bME и ТСЕР (В).

По сравнению с контрольным образцом RL2 (Рис. 11, А), в спектре образца, содержащего RL2 с восстановителем ТСЕР (Рис. 11, Б), в диапазоне частот 3,8 - 2,2 ppm, были обнаружены дополнительные пики с малой интенсивностью, не относящиеся непосредственно к ТСЕР. Других дополнительных пиков в спектре обнаружено не было. Мы предположили, что пики, появившиеся в спектре при добавлении ТСЕР, могут соответствовать β -меркаптоэтанола (bME), присоединившемуся к RL2 в процессе выделения RL2 из лизата клеток-продуцентов и хроматографической очистки пептида. Для подтверждения этого предположения был снят спектр этого же образца RL2 с ТСЕР после добавления к нему β -меркаптоэтанола (Рис. 11, В). Относительная интенсивность исследуемых пиков увеличилась, при этом новых пиков обнаружено не было. Таким образом, в препарате RL2 большая часть мономера представляет собой аддукт молекулы RL2 с β -меркаптоэтанолом (bME).

Чтобы оценить вся ли мономерная форма RL2 является аддуктом с β -меркаптоэтанолом (RL2-bME) также был проведен масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF фрагментов трипсинолиза RL2. Были обнаружены все фрагменты RL2, образующиеся при гидролизе трипсином, кроме фрагмента 5 - 20 а.о. Таким образом, участок RL2, содержащий остаток ^8Cys , идентифицировать не удалось, что не позволило оценить долю аддукта RL2-bME в мономерном RL2.

Кроме сигналов от пептида и восстановителей, на спектрах присутствуют сигналы глицерина. Мы предполагаем, что глицерин попал в образец при концентрировании RL2 на концентрирующих системах Amicon, мембраны которых пропитаны глицерином.

Итак, RL2 является смесью гомодимера и мономера RL2. Большая часть мономера представляет собой аддукт RL2 с β -меркаптоэтанолом, который образуется в процессе хроматографической очистки пептида. Вероятно, часть мономера RL2 может представлять собой RL2 со свободной SH группой, но из-за небольшого количества таких молекул обнаружить их не удается.

3.1.3 Вторичная структура RL2

Пространственная структура белков и пептидов сильно зависит от их аминокислотной последовательности, однако знания только первичной структуры белка недостаточно для точного предсказания его пространственной структуры. Более того, важную роль в формировании той или иной пространственной структуры играют условия, в которых находится исследуемый белок.

Для исследования пространственной структуры RL2 были проведены исследования пептида методами спектроскопии кругового дихроизма (КД), ЯМР, динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии.

Чтобы оценить вторичную структуру RL2 и её термодинамическую стабильность в гидрофильном и гидрофобном окружении, спектры КД RL2 были сняты в 150 мМ NaCl и в 50% трифторэтаноле (ТФЭ) в диапазоне температур от 10 до 90° С.

Поскольку RL2 на 16,5% состоит из остатков пролина, логично предположить наличие в его вторичной структуре полипролиновой спирали РРП. Структура РРП достаточно распространенная вторичная структура белков, богатых пролином, она представляет собой вытянутую левозакрученную спираль, которую стабилизируют Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, а не водородные связи. Все остатки пролина, входящие в спираль РРП, находятся в транс-конформации. Типичные спектры КД для спиралей РРП имеют положительный пик с малой молярной эллиптичностью Θ при 228 нм и глубокий пик с отрицательной Θ при 204 нм [73].

Спектры КД RL2 в водном растворе (Рис. 12, А) характеризуются глубоким минимумом при 198 нм, что указывает на полностью или частично неупорядоченную структуру исследуемого пептида. Однако полипролиновые спирали РРП в его структуре отсутствуют или присутствуют в малых количествах, что подтверждается отсутствием в спектре положительного пика при 228 нм и глубокого пика с отрицательной эллиптичностью при 204 нм. Нагревание раствора RL2 до 90° С приводит к уменьшению глубины отрицательного пика при 198 нм, что говорит об уменьшении неструктурированных участков в структуре пептида (Рис 12, А, голубая и сиреневая линии). Более того, этот пик смещается вправо в сторону 206 нм. Также, в районе 222 нм появляется пик с молярной эллиптичностью Θ меньше нуля. В совокупности, появление пиков на 206 и 222 нм указывает на то, что содержание α -спирализованных участков в структуре пептида увеличивается, и структура RL2 становится более упорядоченной. Приобретение более упорядоченной структуры при повышении температуры выглядит контринтуитивным для структурированных белков, однако часто встречается среди неупорядоченных пептидов.

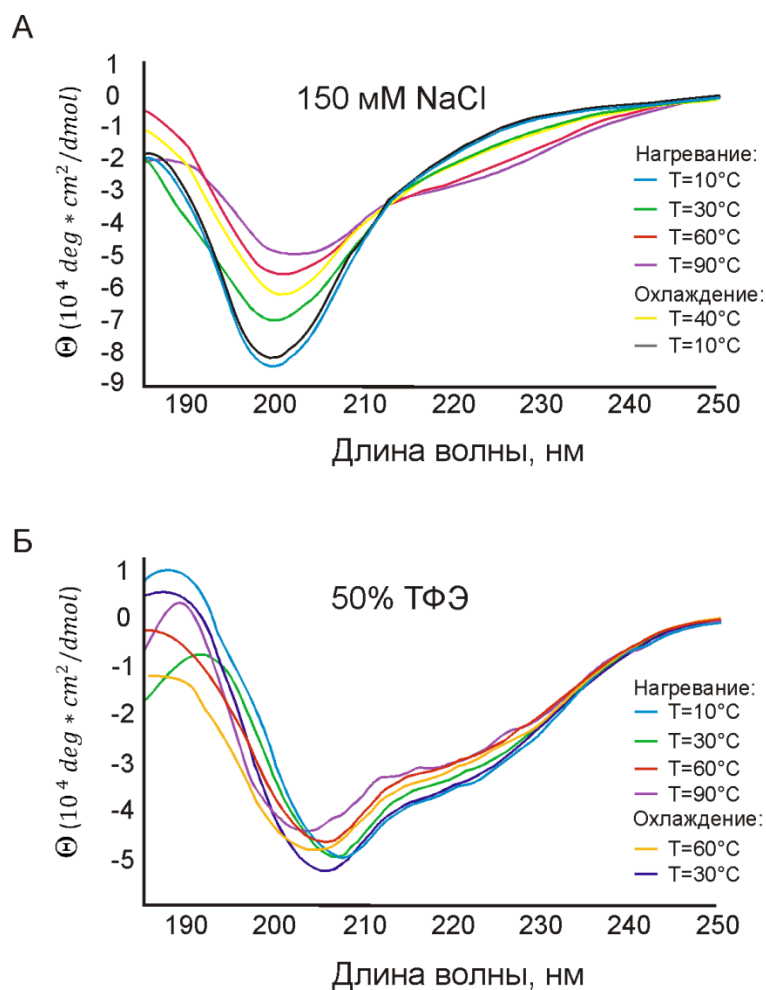


Рис. 12. Спектры кругового дихроизма RL2, полученные при температурной денатурации и ренатурации пептида, в физиологическом растворе (А) и в 50% ТФЭ (Б).

После охлаждения денатурированного RL2 значимых различий в структуре RL2 до и после температурной денатурации не обнаруживается (Рис 12, А, голубая и черная линии). Полученные данные свидетельствуют о том, что RL2 является частично упорядоченным пептидом, способным к обратимой денатурации.

В 50% трифторэтаноле вторичная структура RL2 термодинамически стабильна, то есть практически не изменяется при повышении температуры от 10°C до 90°C (Рис 12, Б, 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 водном растворе происходит увеличение количества α -спирализованных участков. При этом, судя по поглощению при критических длинах волн, структура пептида при 90°C схожа с его структурой в гидрофобном окружении. Изменение структуры RL2 при нагревании до 90°C является обратимым.

Для определения локализации упорядоченного участка RL2 в растворе был проведен расчет специфичного для каждого аминокислотного остатка показателя SSP (secondary structure propensity) [165], который объединяет химические сдвиги ЯМР разных ядер в единый показатель, отражающий ожидаемую вероятность нахождения данного аминокислотного остатка в альфа- или бета- вторичной структуре. Исходные спектры и суммарный спектр, на основе которого рассчитаны величины химических сдвигов, опубликованы и задепонированы в базу данных BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) под номером 27778 [166].

Визуализация данного показателя, приведенная на рисунке 13, показывает, что в целом для всего пептида значения SSP не превышают 0,25 по абсолютной величине. Такие небольшие значения SSP свидетельствуют о том, что RL2 является неупорядоченным пептидом с низкой долей остаточной вторичной структуры. Это означает, что существует целый ансамбль коротко живущих состояний RL2, при этом каждый аминокислотный остаток входит в состав α -спирали или β -складки не более, чем в 25% случаев. Поскольку остаточные элементы вторичной структуры неупорядоченных пептидов очень короткоживущие, эта трактовка эквивалентна тому, что все аминокислотные остатки существуют в виде α -спирализованных или β -складчатых элементов не более 25% времени.

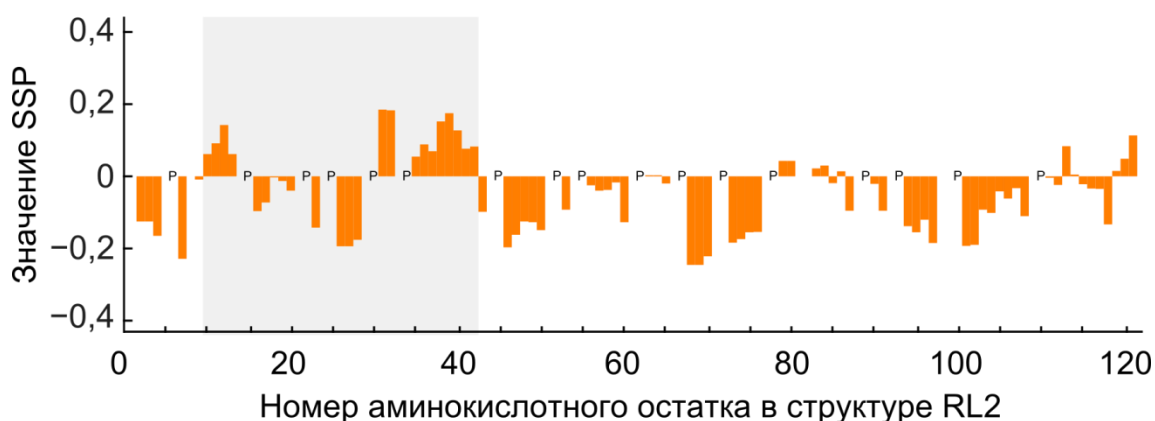


Рис. 13. Значения величин SSP для аминокислотных остатков RL2, рассчитанные из данных спектров ЯМР RL2 (химических сдвигов ядер Ca , $\text{C}\beta$ и Ha каждого аминокислотного остатка, извлеченных после отнесения сигналов в стандартной совокупности белковых спектров тройного резонанса $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$), обогащённого тяжёлыми изотопами ^{13}C и ^{15}N .

В структуре RL2 все аминокислотные остатки с положительным значением SSP располагаются в районе с 10 по 40 а.о. Интересно отметить, что указанный участок пептида входит в область, ответственную за цитотоксическую активность RL2. Известно, что в альфа-спирали каждая $-C=O$ группа i -ой аминокислоты, входящая в остов полипептидной цепи, образует водородную связь с аминогруппой $(i+3)$ -ого аминокислотного остатка, также участвующего в образовании пептидной связи. Таким образом, для образования одного витка α -спирали необходимо 4 аминокислотных остатка. В структуре RL2 фрагментов, где подряд расположено 4 и более остатков, склонных к образованию α -спирали, всего два: 9 - 12 и 35 - 42 а.о.. При этом первый фрагмент имеет длину 4, а второй – 8 а.о.

Таким образом, установлено, что RL2 является неупорядоченным пептидом, способным приобретать или стабилизировать α -спирализованный участок в районе с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о. в гидрофобном окружении и при нагревании в физиологическом растворе.

3.1.4 Гидродинамический диаметр частиц RL2 и их форма

RL2 является рекомбинантным аналогом фрагмента к-казеина человека. Известно, что к-казеин стабилизирует образование мицелл в молоке, предотвращая образование казеинового осадка [167]. Человеческий к-казеин, как и другие казеины, содержит «липкие» последовательности, обогащенные остатками пролина и глутамина, стимулирующие неспецифические белок-белковые взаимодействия, приводящие по некоторым данным к образованию амилоидных фибрилл или сферических частиц [168]. Чтобы оценить размер частиц RL2, был проведён анализ динамического светорассеяния RL2 в буферных растворах с pH 5,5 - 8,0 в присутствии и в отсутствие 150 мМ NaCl.

Метод динамического светорассеяния – это оптический метод, который позволяет анализировать изменение частоты и направления движения света при прохождении через суспензию. На основании этих данных можно рассчитать коэффициент диффузии частиц суспензии и сделать вывод об их гидродинамическом диаметре. При этом частицей считается не только сам пептид, но и оболочка из ионов (буфера и солей) на его поверхности, которая имеет такой же коэффициент диффузии. То есть гидродинамический диаметр зависит от ионной силы и типа буферной системы. Результаты анализа динамического светорассеяния RL2 суммированы в Таблице 3 и на рисунке 14. При этом важно отметить, что соотношение высот распределений частиц с малым и большим диаметрами не отражает соотношение количеств этих, поскольку крупные частицы рассеивают свет значительно сильнее (Рис. 14).

Таблица 3. Зависимость диаметра частиц RL2 от pH и ионной силы.

		pH 5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8
- 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 mM 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

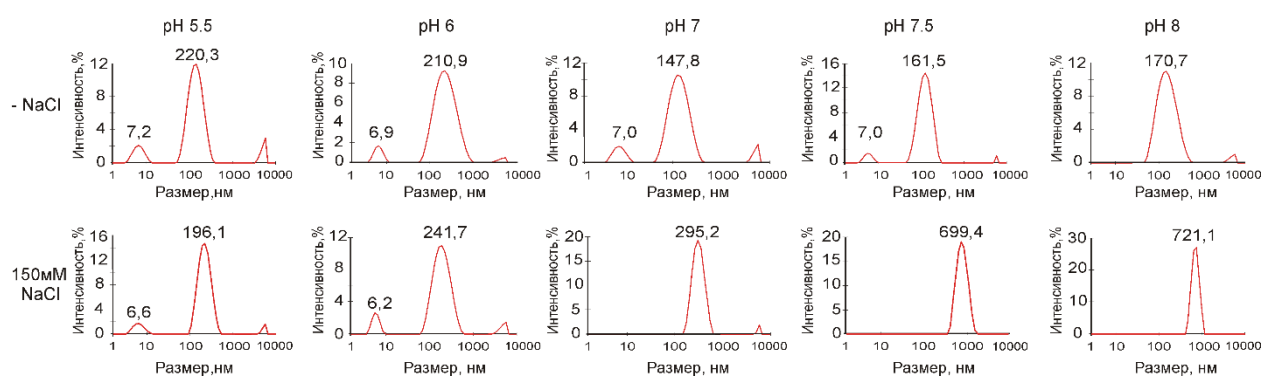


Рис. 14. Гидродинамический диаметр частиц RL2 при различных значениях pH и ионной силы.

Было обнаружено, что распределение частиц RL2 по размерам в отсутствие NaCl имеет высокий индекс полидисперсности ($PDI \geq 0,42$), что означает, что образец RL2 содержит частицы разного размера. При pH 5,5 и 6,0 в суспензии преобладают частицы RL2 с гидродинамическим диаметром около 7 нм, и также обнаруживаются частицы с диаметром около 215 нм (Табл. 3, Рис. 14). При $pH \geq 6,5$ доля частиц RL2 с большим диаметром становится преобладающей. При этом видно, что гидродинамический диаметр частиц RL2 меньшего размера составляет 7 нм как в буфере Трис-HCl, так и в MES. Это указывает на то, что изменение размеров частиц действительно связано с изменением pH, а не с заменой буферной системы.

При добавлении 150 mM NaCl размеры частиц в кислых условиях отличаются незначительно от размеров частиц в отсутствие соли, что также является следствием

изменения структуры самих частиц RL2, а не увеличением вокруг них толщины ионного слоя.

В присутствии 150 мМ NaCl при pH 5,5 и 6,0 распределения диаметров частиц RL2 также имеют пики со средними значениями 7 и 220 нм, однако при $\text{pH} \geq 6,5$ и физиологической ионной силе наблюдается низкая полидисперсность суспензии ($\text{PDI} \leq 0,28$), и частицы с диаметром около 7 нм отсутствуют.

Увеличение pH в присутствии соли приводит к резкому увеличению диаметра частиц от 196 до 721 нм. Кроме того, следует отметить, что во всех вышеперечисленных случаях наблюдалось незначительное количество частиц с диаметром порядка микрометра (диаметр которых не представляется возможным точно оценить с помощью прибора Zetasizer Nano ZS).

Мы полагаем, что частицы диаметром около 7 нм могут быть аддуктами RL2 с β -меркаптоэтанолом (RL2-bME) и мономерами/димерами RL2, тогда как частицы с бóльшим диаметром относятся к олигомеризованному RL2. Чтобы проверить эту гипотезу были исследованы те же ЯМР спектры RL2, обогащённого ^{13}C и ^{15}N , на основе которых был рассчитан показатель SSP. Были обнаружены остатки Cys, связанные с β -меркаптоэтанолом, в отличие от цистина, образующегося при димеризации RL2. Мы предполагаем, что это связано со склонностью димеров RL2 к агрегированию и образованию частиц большего размера, которые не видны в спектре ЯМР. Таким образом, полученные данные говорят в пользу того, что частицы с гидродинамическим диаметром около 7 нм в основном являются аддуктами RL2-bME.

Повышение pH приводит к олигомеризации RL2, что вероятно вызвано уменьшением общего положительного заряда пептида и, как следствие, уменьшением отталкивания между частицами RL2, в связи с чем становятся возможными нековалентные взаимодействия участков RL2, богатых Pro и Gln. Увеличение ионной силы растворителя приводило к олигомеризации RL2 при более низком pH.

Метод динамического светорассеяния позволяет оценить гидродинамический диаметр частиц, при этом, необходимо понимать, являются ли исследуемые частицы сферическими (в таком случае гидродинамический диаметр приближен к реальному диаметру частицы) или имеют удлиненную форму (в таком случае гидродинамический диаметр указывает на максимальную длину частицы).

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет определить размер частицы, а не её гидродинамический диаметр, однако является трудо- и времязатратным. Кроме того, этот метод требует тщательного подбора условий нанесения образца. Например, при

нанесении на пластинку буферных растворов даже после промывки деионизированной водой структуры самого буфера визуализируются на пластинке (Рис. 15).

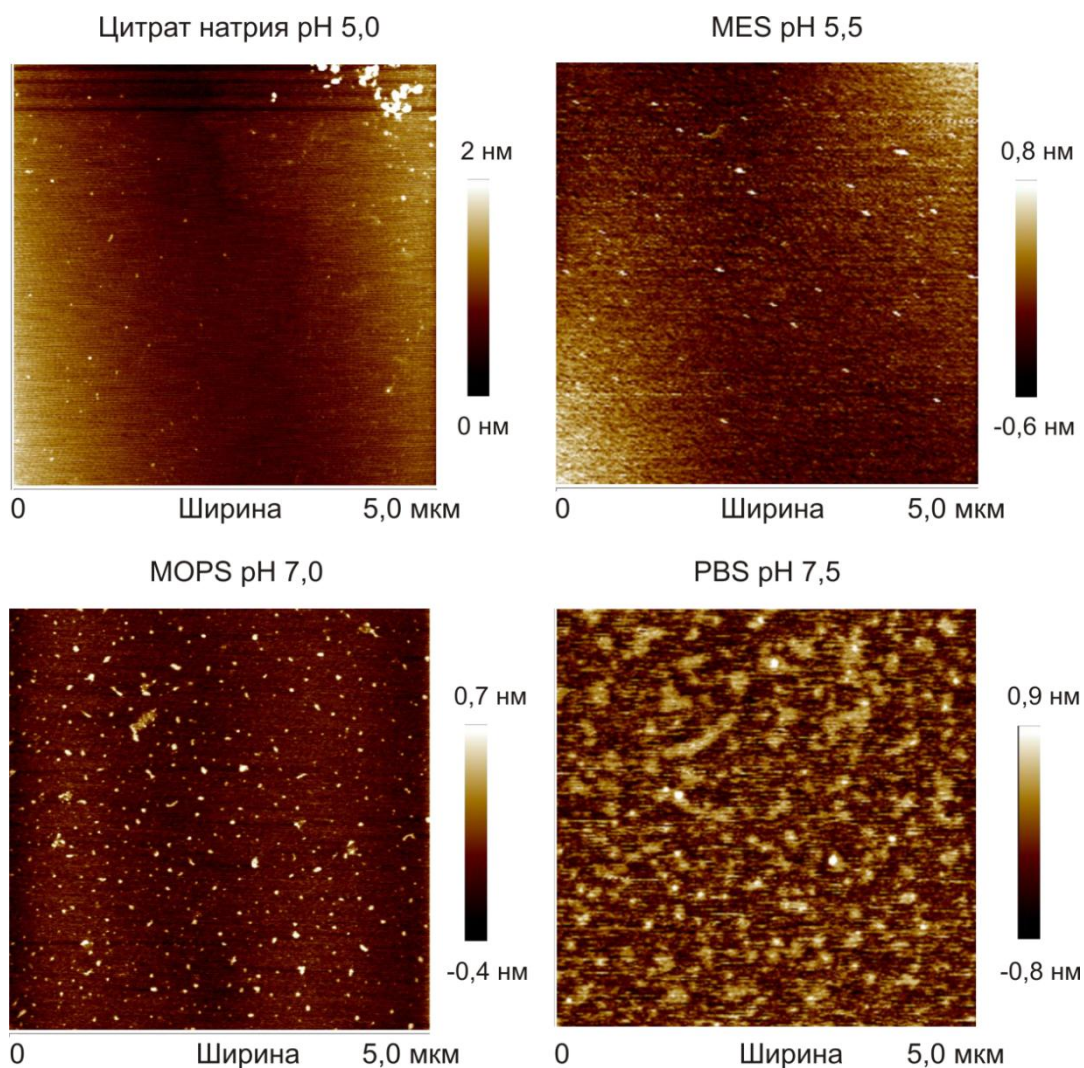


Рис. 15. Определение размера частиц 25 мМ буферных растворов (цитрата натрия, MES, MOPS и PBS) методом атомно-силовой микроскопии.

Таким образом, нам не удалось подобрать такой буферный раствор, частицы которого не связывались бы с пластинкой, и который позволил бы наблюдать на микроскопических рисунках только частицы RL2. Тем не менее, для определения формы частиц RL2 с малым диаметром, мы исследовали образец RL2, растворённый в 25 мМ MES pH 5,5. Исследовать именно эти частицы было интересно, поскольку они имеют постоянный диаметр при разных значениях pH и ионной силы. Частицы RL2 с малым диаметром преобладают при кислых pH, поэтому был выбран буфер MES. Кроме того, наименьшее количество частиц этого буфера связывается с пластинкой (Рис. 16).

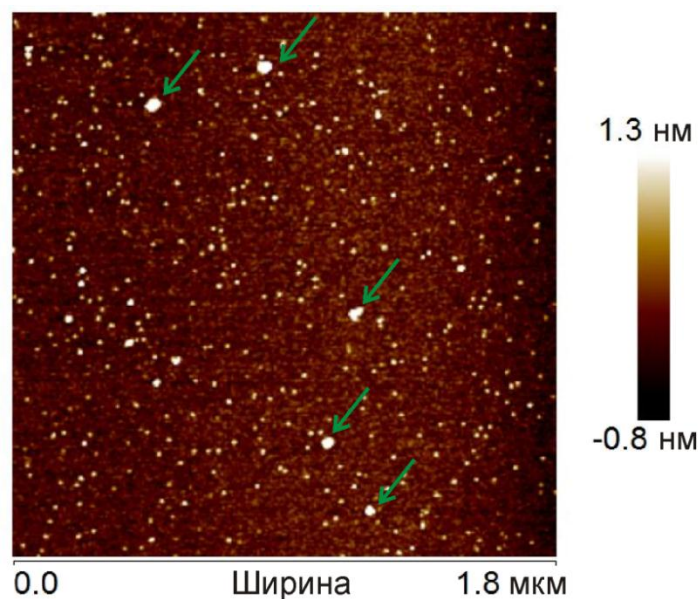


Рис. 16. Определение формы частиц RL2 в 25 мМ MES методом атомно-силовой микроскопии. Стрелками обозначен RL2.

Методом АСМ были выявлены мелкие глобулярные или яйцевидные частицы диаметром около 3 - 8 нм и максимальной высотой 1,5 - 1,9 нм, сходные по размеру с теми, которые наблюдались в образце буферного раствора MES (Рис. 15), а также более крупные частицы с диаметром 10 - 25 нм и максимальной высотой от 3 до 8 нм (Рис. 16), которые не были обнаружены в буферном растворе MES. Предположительно, эти частицы соответствуют RL2. Визуально частицы RL2 имеют форму, приближенную к глобулярной. Точность определения высоты частиц данным методом выше, чем точность определения их ширины, поэтому из этих двух параметров имеет смысл рассматривать именно высоту частиц. Высота наблюдаемых частиц достигает 8 нм, и это значение близко к 7 нм - гидродинамическому диаметру частиц RL2, зарегистрированных методом динамического светорассеяния, которые преобладали при pH 5,5. Частицы больших диаметров зафиксированы не были, в связи с тем, что они редко представлены при данных условиях. Однако полученных данных достаточно, чтобы заключить, что частицы RL2 с малым диаметром близки по форме к сферическим и определение их гидродинамического диаметра методом динамического светорассеяния является обоснованным.

При сравнении размеров частиц RL2, определенных методами АСМ и динамического светорассеяния, видно, что данные различаются. Это обусловлено тем, что методом динамического светорассеяния определяется гидродинамический диаметр частицы с ионной оболочкой, и этот диаметр зависит как от ионной силы, так и от типа

буферной системы. Таким образом, гидродинамический диаметр частиц, измеренный методом динамического светорассеяния, как правило больше, чем диаметр частиц, измеренный с помощью АСМ, поскольку в случае АСМ в процессе пробоподготовки образец отмывается деионизированной водой, и ионная оболочка с поверхности частиц удаляется [169].

Таким образом, препарат RL2 представляет собой смесь мономерных и олигомерных форм сферической или овоидной формы. При этом, в отличие от к-казеина, известного своей склонностью к образованию фибрилл, фибриллы RL2 не были обнаружены. Гидродинамический диаметр олигомерных частиц и их количество в суспензии зависят от pH и ионной силы. При pH 5,5 RL2 существует преимущественно в виде частиц размером около 7 нм, большая часть которых представляет собой RL2-bME, и олигомерного RL2 с гидродинамическим диаметром около 194 нм. При pH и ионной силе, близкими к физиологическим жидкостям, RL2 существует в виде крупных олигомеров с гидродинамическим диаметром до 700 нм.

3.2 Проникновение RL2 в клетки

При исследовании механизма апоптотического действия RL2 обнаружено, что он проникает в цитоплазму как раковых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, так и немалигнизированных стволовых клеток жировой ткани человека MSC [1]. Однако механизм проникновения RL2 в клетки оставался невыясненным.

Для исследования механизма проникновения RL2 в клетки мы использовали методы проточной цитофлуориметрии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

3.2.1 Получение флуоресцентно меченого RL2

Для исследования проникновения RL2 в клетки человека методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии был синтезирован конъюгат RL2 с 5(6)-карбокситетраметилпроламином (RL2-Rho). На 1-ой стадии получения RL2-Rho синтезировали сукцинимидный эфир 5(6)-карбокситетраметилпроламина с промежуточной активацией карбоксильной группы в 5 и/или 6 положении N,N'-дициклогексилкарбодиимидом. Реакцию проводили при комнатной температуре. Полученный сукцинимидный эфир очищали осаждением в избытке диэтилового эфира. Далее раствор сукцинимидного эфира в ДМСО использовали для синтеза конъюгата RL2-Rho. Реакцию проводили в воде с избытком сукцинимидного эфира 5(6)-карбокситетраметилпроламина по отношению к RL2.

На рисунке 17 представлена схема реакции присоединения 5(6)-карбокситетраметилродамина к RL2 по аминогруппам.

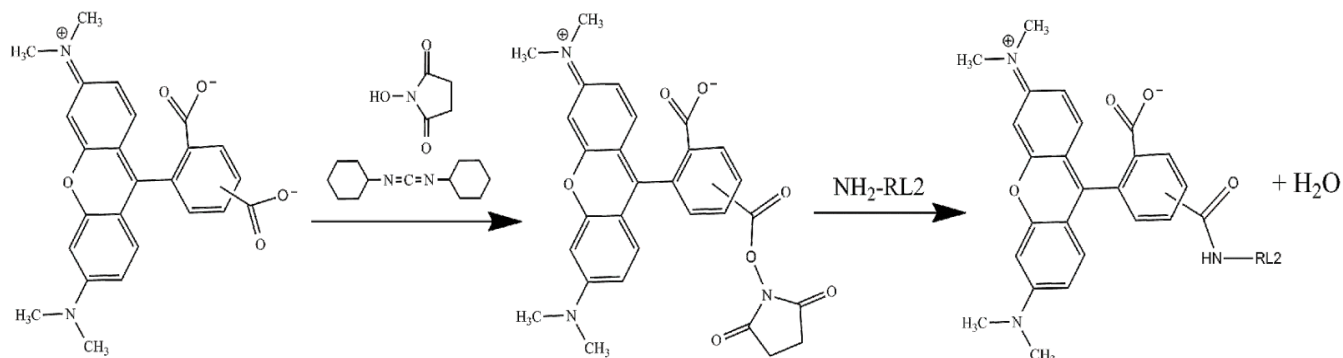


Рис. 17. Схема реакции присоединения 5(6)-карбокситетраметилродамина к RL2.

Очистку RL2-Rho проводили гель-фильтрацией на Sephadex G-25. Хроматографическую фракцию, содержащую высокомолекулярный продукт реакции (RL2-Rho), собирали и анализировали электрофорезом в 15% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Далее детектировали в геле флуоресцентный сигнал, затем окрашивали гель Кумасси R 250 для детекции белков.

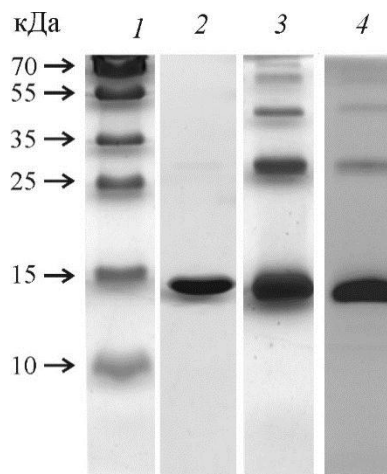


Рис. 18. Электрофоретический анализ RL2 и RL2-Rho в 15% ПААГ; дорожки: 1 – набор белков с известными молекулярными массами; 2 – RL2, окрашенный Кумасси; 3 – RL2-Rho, окрашенный Кумасси; 4 – флуоресцентный сигнал родамина в составе RL2-Rho

Электрофореграмма показала, что анализируемая фракция содержит флуоресцентно меченые белки с различной электрофоретической подвижностью (Рис. 18). Согласно результатам денситометрического анализа в программе Gel Analyser, основным продуктом реакции (60%) является пептид, соответствующий по подвижности

мономерной форме RL2-Rho. Можно предположить, что продукты реакции с молекулярной массой более 25 кДа являются результатом поперечных сшивок молекул RL2 с 5(6)-кабокситетраметилпроламином, этерифицированным гидроксисукцинимидом по двум карбоксильным группам.

Согласно данным, представленным на рисунке 18, хроматографическая фракция, содержащая RL2-Rho, не содержит низкомолекулярных флуоресцентных примесей (Рис. 18, дорожка 4).

Для определения степени включения молекул флуоресцентного красителя в состав RL2-Rho мы провели анализ УФ-спектров поглощения 5(6)-кабокситетраметилпроламина, RL2 и RL2-Rho в диапазоне длин волн 240 – 800 нм. При анализе спектров было установлено, что максимумы поглощения RL2-Rho и RL2 соответствуют длинам волн 565 и 280 нм, соответственно (Рис. 19).

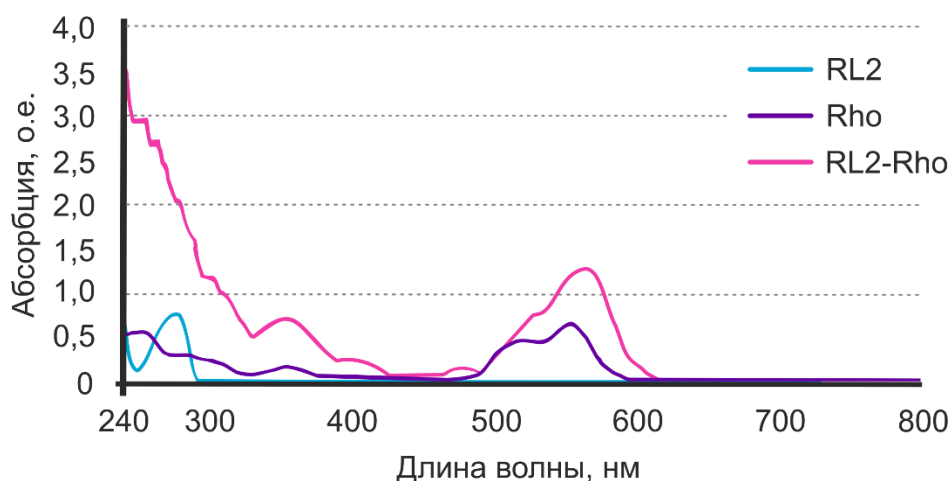


Рис. 19. Спектры поглощения света молекулами RL2 (1 мг/мл), RL2-Rho (1 мг/мл) и 5(6)-кабокситетраметилпроламина (Rho, 10 мкг/мл) в диапазоне длин волн 240 - 800 нм

Оптические плотности растворов RL2, флуоресцентного конъюгата RL2-Rho и красителя (Rho) с известными массовыми концентрациями представлены в таблице 4.

Таблица 4. Оптические плотности растворов RL2 (1 мг/мл), RL2-Rho (1 мг/мл) и 5(6)-кабокситетраметилпроламина (10 мкг/мл) при различных длинах волн.

λ , нм	280	565
RL2	0,81	0,00
RL2-Rho	2,08	1,4
Rho	0,32	0,43

УФ-спектр поглощения RL2-Rho имеет 2 максимума – при 280 и 565 нм. Коэффициент экстинкции RL2 при 565 нм пренебрежимо мал по сравнению с коэффициентом экстинкции флуоресцентного красителя и очевидно, что оптическая плотность RL2-Rho при 565 нм обусловлена поглощением молекулы 5(6)-карбокситетраметилродамина, входящей в состав конъюгата.

Массовую концентрацию белка в составе конъюгата RL2-Rho определяли методом Брэдфорда, а среднее число молекул красителя, содержащихся в его структуре, рассчитывали исходя из оптической плотности красителя при 565 нм по формуле 3.

$$N = \frac{A_{565}^{RL2-Rho} \times Mr^{RL2}}{C_{RL2}} \times \frac{C_{Rho}}{A_{565}^{Rho} \times Mr^{Rho}} = 1,06 \quad (3)$$

где N – число молекул родаминового красителя, связанных с молекулой RL2;

$A_{565}^{RL2-Rho}$ - оптическая плотность RL2-Rho при длине волны 565 нм;

Mr^{RL2} - молярная масса RL2, равная 14139 г/моль;

C_{RL2} - массовая концентрация RL2 (г/л);

C_{Rho} - массовая концентрация Rho (г/л);

A_{565}^{Rho} - оптическая плотность красителя при длине волны 565 нм (о.е.);

Mr^{Rho} - молярная масса Rho, равная 430.45 г/моль.

Полученные данные показали, что эффективность включения флуоресцентного красителя в состав конъюгата RL2-Rho составила 1 моль 5(6)-карбокситетраметилродамина на 1 моль RL2. RL2 содержит 5 остатков лизинов, аминогруппы которых, также как концевая аминогруппа RL2, могут быть конъюгированы с Rho. Можно предположить, что конъюгация происходит только по концевой аминокислоте. При проведении масс-спектрометрического анализа фрагментов гидролиза RL2-Rho трипсином были обнаружены не все фрагменты RL2, образующиеся при гидролизе. Однако было показано, что как минимум фрагмент RL2, содержащий 102 Lys, конъюгирован с красителем. Нельзя исключить, что мечение производным родамина происходит и по другим остаткам лизина, и по концевой аминогруппе. Учитывая, что RL2 является неупорядоченным пептидом, вероятно, большинство перечисленных аминогрупп стерически доступны для мечения. Мы предполагаем, что процесс мечения носит статистический характер, и эффективность мечения равная приблизительно 1 достигается подбором условий синтеза конъюгата, а не его селективностью.

3.2.2 Проникновение *RL2-Rho* в клетки человека

Исследование проникновения и накопления *RL2-Rho* в клетках проводили методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет проводить количественное измерение интенсивности флуоресценции клеток и основан на облучении исследуемых клеток лазером с дальнейшей детекцией их эмиссии.

Чтобы оценить зависимость эффективности проникновения *RL2-Rho* в клетки от концентрации конъюгата в культуральной среде, клетки MCF-7 инкубировали в течение часа с различными концентрациями *RL2-Rho* (0 - 50 мкг/мл), и анализировали распределение клеток по интенсивности флуоресценции. Для оценки вклада *RL2* в способность конъюгата *RL2-Rho* проникать и накапливаться в клетках, был проведен цитофлуориметрический анализ клеток MCF-7, инкубированных с продуктами гидролиза *RL2-Rho* протеиназой К (Рис. 20).

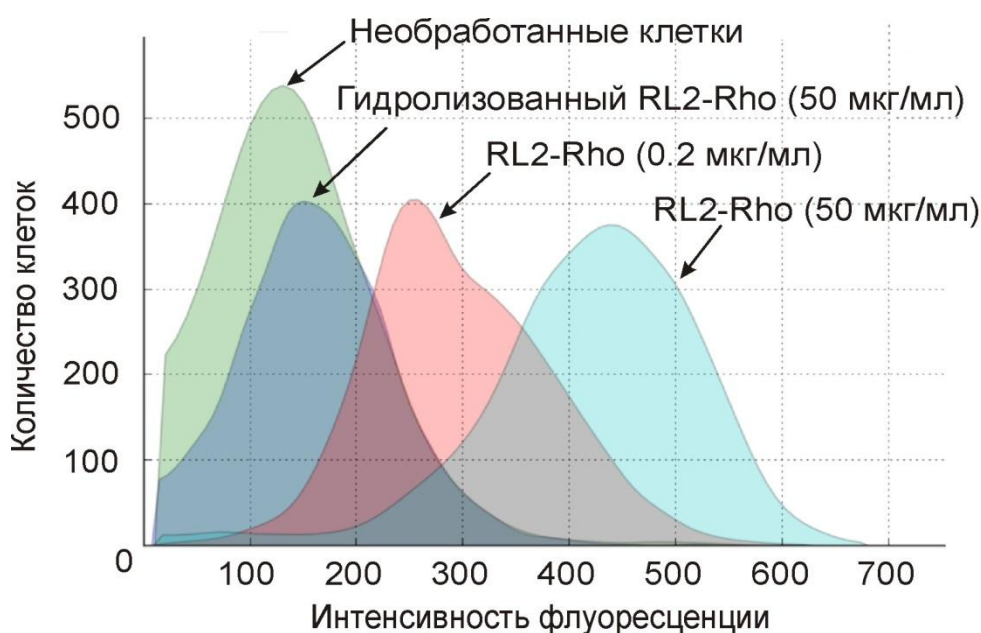


Рис. 20. Диаграмма распределения клеток MCF-7, инкубированных с *RL2-Rho* (0,2 - 50 мкг/мл) или *RL2-Rho*, гидролизированным протеиназой К, по интенсивности флуоресценции.

Из данных, представленных на рисунке 20, видно, что интенсивность флуоресценции клеток MCF-7, инкубированных с гидролизированным конъюгатом *RL2-Rho*, практически не отличается от интенсивности флуоресценции необработанных клеток. 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.

Таким образом, методом проточной цитофлуориметрии показано, что RL2-Rho проникает в клетки MCF-7, при этом проникновение конъюгата в клетки обусловлено его белковой частью, а не свойствами флуоресцентного красителя.

3.2.3. Анализ путей эндоцитоза RL2 в раковые клетки человека

Для исследования возможных путей эндоцитоза RL2 мы проводили сравнительный анализ эффективности проникновения RL2-Rho в клетки аденокарциномы молочной железы человека: эстроген-зависимой MCF-7 и эстроген-независимой MDA-MB-231, в присутствии различных ингибиторов эндоцитоза. Мы использовали диназор как ингибитор динаминзависимых путей эндоцитоза, хлорпромазин - как ингибитор клатринзависимого пути, нистатин и метил- β -циклодекстрин (M β CD) – для ингибирования путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, в том числе кавеолинзависимого пути. Цитохалазин D и 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA) применяли для ингибирования макропиноцитоза, а вортманнин (ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ) для блокирования макропиноцитоза и фагоцитоза.

Количественное определение влияния ингибиторов эндоцитоза на эффективность проникновения RL2 в клетки проводили по следующей схеме: клетки инкубировали в присутствии ингибитора эндоцитоза или без него, после чего добавляли RL2-Rho и инкубировали 1 час. Для удаления RL2-Rho с поверхности клеток, клетки инкубировали с трипсином, далее трипсин инактивировали культуральной средой с 10% сывороткой, и анализировали образцы клеток методом проточной цитофлуориметрии. Эффективность проникновения RL2 в клетки, обработанные ингибиторами, вычисляли по формуле (1), как описано в п. 2.2.13.

На рисунке 21 представлены результаты анализа клеток MCF-7 и MDA-MB-231, инкубированных с 10 мкг/мл RL2-Rho в присутствии ингибиторов эндоцитоза. Анализ препаратов клеток проводили не менее чем в трёх независимых экспериментах. Эффективность проникновения RL2-Rho в клетки оценивали, сравнивая интенсивности флуоресценции клеток при обработке различными ингибиторами.

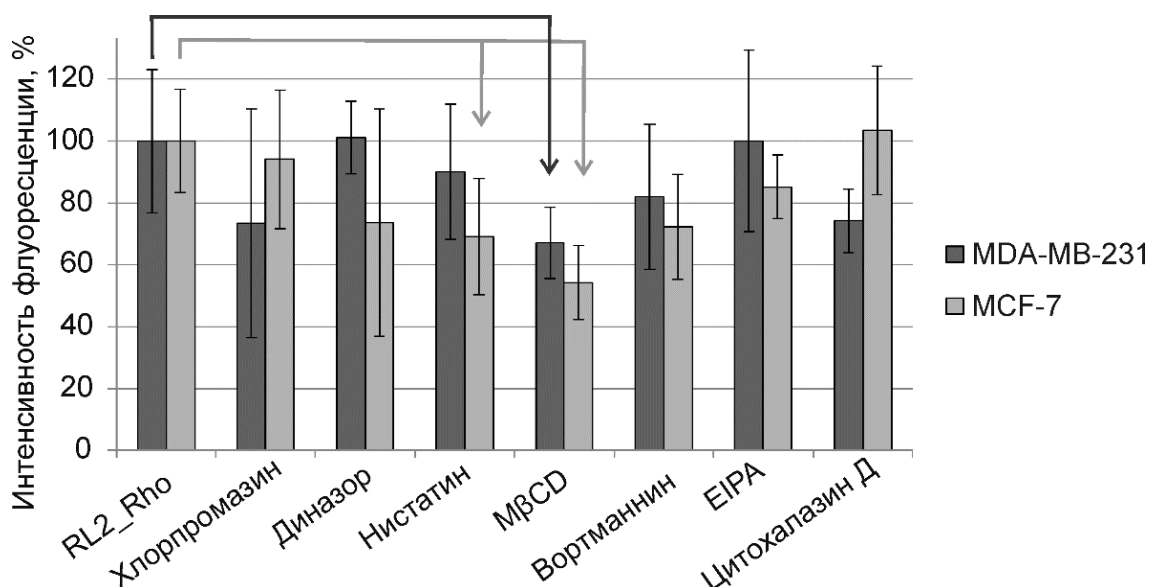


Рис. 21. Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho (10 мкг/мл) в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, инкубированные в среде RPMI, содержащей 5% FBS; стрелками отмечены достоверные изменения интенсивности флуоресценции, $p < 0,05$. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MCF-7 в присутствии нистатина и МβCD составляет 70% и 54%, соответственно, а в клетки MDA-MB-231 в присутствии МβCD - 67%. Другие препараты не оказывали значимого влияния на эффективность проникновения RL2-Rho в клетки обеих линий.

Нистатин и МβCD – ингибиторы пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами, но механизмы действия этих препаратов отличаются: нистатин образует крупные агрегаты с холестерином внутри плазматической мембраны. При накоплении таких агрегатов происходит их экстракция из мембраны. МβCD – циклический гептасахарид с гидрофобной сердцевиной, которая имеет высокое сродство к холестерину. МβCD также образует комплексы с холестерином, однако эти комплексы имеют большую растворимость в липофильных условиях, что позволяет им оставаться в мембране [170]. Нистатин считают селективным ингибитором эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, тогда как для МβCD в высоких концентрациях показано влияние на другие процессы в клетках, например, на сборку цитоскелета и на активацию малых ГТФаз семейства Ras, которые участвуют в различных путях эндоцитоза. Таким образом, кроме эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, МβCD в некоторых случаях также ингибирует клатрин-зависимый пиноцитоз и макропиноцитоз [171,172].

Итак, ингибиторы эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, – МβCD и нистатин, частично ингибируют проникновение RL2-Rho в клетки. Несмотря на то, что МβCD не является селективным ингибитором этого пути, тот факт, что проникновение

флуоресцентного конъюгата RL2 в клетки MCF-7 подавляется обоими ингибиторами, позволяет предположить, что именно этот путь эндоцитоза обеспечивает проникновение RL2-Rho. Снижение эффективности проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231, обработанные нистатином, не является достоверным. Можно предположить, что поскольку метаболизм холестерина в клетках этих линий отличается, в частности, клетки MDA-MB-231 содержат больше липидных капель, более эффективно поглощают липопротеины низкой плотности, а также имеют более высокое отношение эфира холестерина к триацилглицерину по сравнению с клетками MCF-7 [173], для эффективного ингибирования проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231 необходима большая концентрация нистатина. Однако, согласно данным наших экспериментов, двукратное увеличение концентрации этого ингибитора не приводило к достоверному подавлению проникновения RL2-Rho в клетки (данные не представлены).

Эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами, включает как динаминзависимые, так и динаминнезависимые пути [174]. Специфическим ингибитором динаминзависимых путей эндоцитоза (в частности, клатринзависимого и некоторых кавеолинзависимых путей) является диназор. Это неконкурентный ингибитор, подавляющий ГТФазную активность динамина 1 и динамина 2 (но не других малых ГТФаз). При этом, связывание с диназором не мешает самосборке динамина в условиях высокой ионной силы или его взаимодействию с липидами [175]. Поскольку диназор достоверно не снижал эффективность проникновения RL2-Rho в клетки, можно предположить, что один из путей рафт-зависимого пиноцитоза, по которому RL2-Rho проникает в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, является динаминнезависимым.

Из полученных данных следует, что при концентрации RL2-Rho в культуральной среде 10 мкг/мл ни один из исследованных ингибиторов эндоцитоза не приводит к снижению эффективности его проникновения в клетки аденокарциномы молочной железы человека более чем на 46%.

Для исследования зависимости механизма проникновения RL2-Rho в клетки MCF-7 от концентрации конъюгата в культуральной среде, мы проанализировали влияние ранее исследованных ингибиторов на этот процесс при концентрации RL2-Rho в среде 50 мкг/мл (Рис. 22).

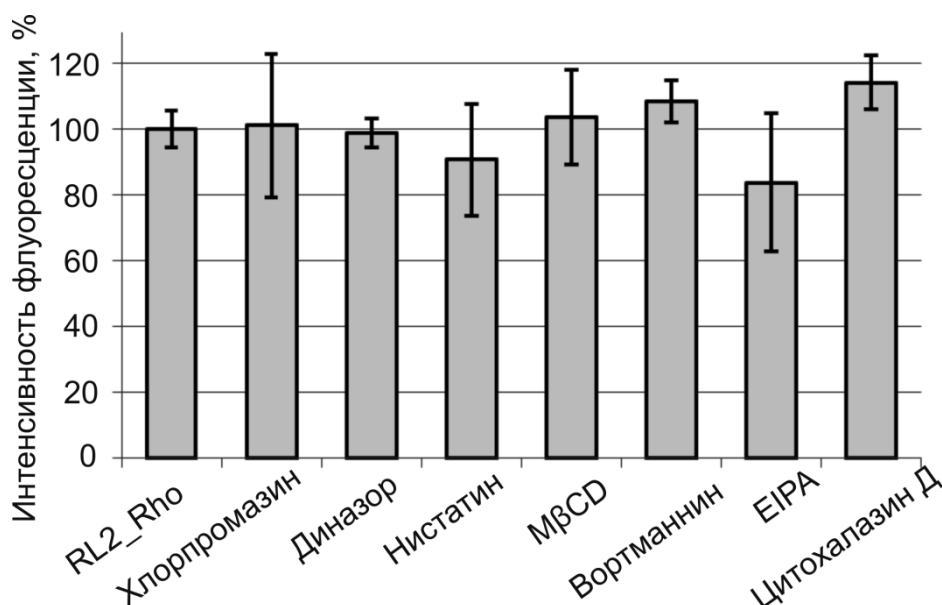


Рис. 22. Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho (50 мкг/мл) в клетки MCF-7, инкубированные в среде RPMI, содержащей 5% FBS. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Из полученных данных следует, что ни один из использованных ингибиторов не оказывал достоверного влияния на проникновение RL2-Rho в клетки MCF-7, если концентрация конъюгата в культуральной среде составляла 50 мкг/мл. Такая же картина наблюдалась и для клеток MDA-MB-231 (данные не представлены). Таким образом, при увеличении концентрации RL2-Rho в культуральной среде с поверхностью клеток взаимодействует большее количество молекул конъюгата, что, вероятно, обеспечивает вовлечение в процесс проникновения RL2-Rho альтернативных путей.

Кроме того, необходимо отметить, что культуральная среда содержит 5% FBS и при добавлении в среду RL2-Rho, RL2 способен образовывать комплексы с отрицательно заряженными молекулами альбумина, что может влиять на эндоцитоз исследуемого пептида.

Чтобы проверить, влияет ли наличие сыворотки в культуральной среде на проникновение RL2, клетки MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали с 10 или 50 мкг/мл RL2-Rho в присутствии и отсутствии FBS (Рис. 23).

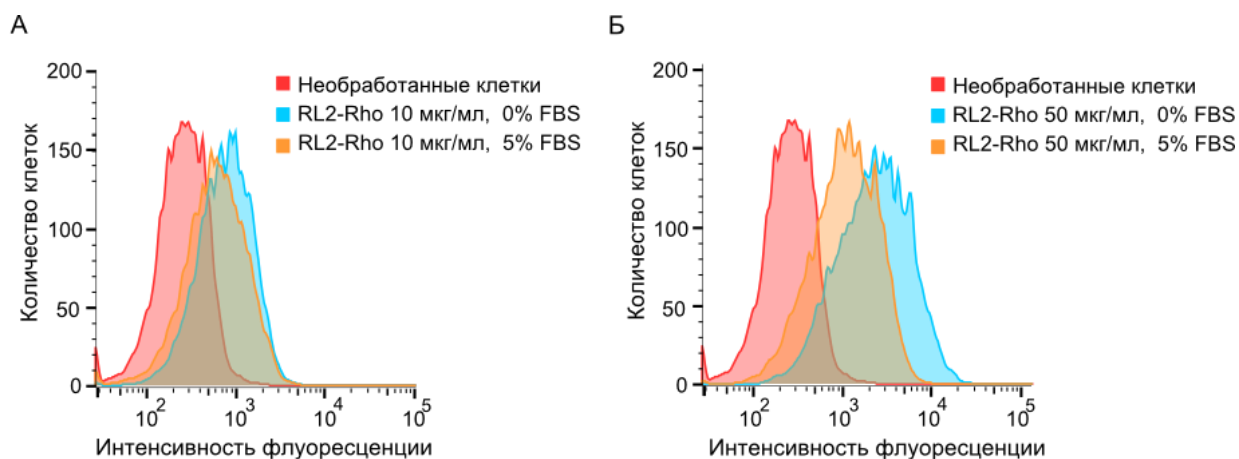


Рис. 23. Проникновение RL2-Rho в клетки MCF-7 в присутствии и отсутствии FBS.

Полученные данные указывают на то, что при обеих концентрациях конъюгата, флуоресценция клеток, инкубированных с RL2-Rho в среде с 5% FBS ниже, по сравнению с клетками, инкубированными в среде без сыворотки.

Таким образом, наличие сыворотки в культуральной среде влияет на эндоцитоз флуоресцентного конъюгата RL2.

Чтобы проверить, влияет ли наличие сыворотки только на эффективность эндоцитоза RL2 или же на то, по какому пути происходит проникновение пептида, было проведено исследование влияния ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho в клетки, культивируемые в среде без сыворотки (Рис. 24).

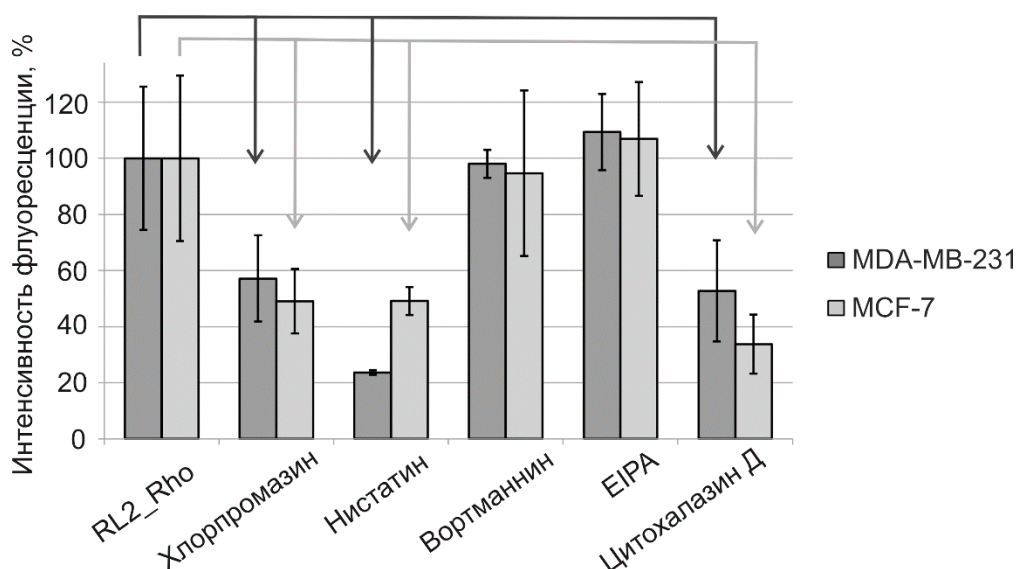


Рис. 24. Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho (10 мкг/мл) в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, инкубированные в бессывороточной среде RPMI; стрелками отмечены достоверные изменения интенсивностей флуоресценции, $p < 0,05$. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Было показано, что в бессывороточных условиях нистатин снижает эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231 и MCF-7 на 76,3% и 50,9%, соответственно, цитохалазин Д на 47,2% и 66,2%, соответственно, а хлорпромазин на 42,8% и 50,9%, соответственно. Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что RL2-Rho способен проникать в клетки различными путями эндоцитоза, в том числе макропиноцитозом, эндоцитозом, опосредованным липидными рафтами и клатринзависимым эндоцитозом. При этом, в присутствии сыворотки RL2-Rho проникает в клетки лишь по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами. Суммируя эти данные, можно сделать вывод о том, что наличие сыворотки в культуральной среде влияют как на эффективность проникновения флуоресцентного конъюгата RL2 в клетки, так и на пути эндоцитоза, которые при этом реализуются. Необходимо отметить, что проникновение RL2-Rho в клетки по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, не зависит от наличия сыворотки в культуральной среде.

Таким образом, в бессывороточных условиях RL2 проникает в клетки по пути пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами, а также макропиноцитоза и клатринзависимого эндоцитоза. В присутствии сыворотки RL2 проникает в клетки аденокарциномы молочной железы по пути динаминнезависимого пиноцитоза,

опосредованного липидными рафтами. При этом ингибирование рафт-зависимого эндоцитоза подавляет проникновение конъюгата в клетку не более, чем на 46%.

3.2.4 Проникновение RL2 в онкотрансформированные клетки человека

Поскольку в присутствии сыворотки все селективные ингибиторы эндоцитоза ингибировали проникновение RL2-Rho в клетки лишь частично, было интересно исследовать влияние азидата натрия – ингибитора всех путей эндоцитоза, на проникновение RL2-Rho в клетки [176,177]. На рисунке 25 представлены результаты цитометрического анализа клеток MCF-7 и MDA-MB-231, культивируемых в присутствии 5% сыворотки и в бессывороточной среде с 10 мкг/мл RL2-Rho и обработанных 1% азидом натрия.

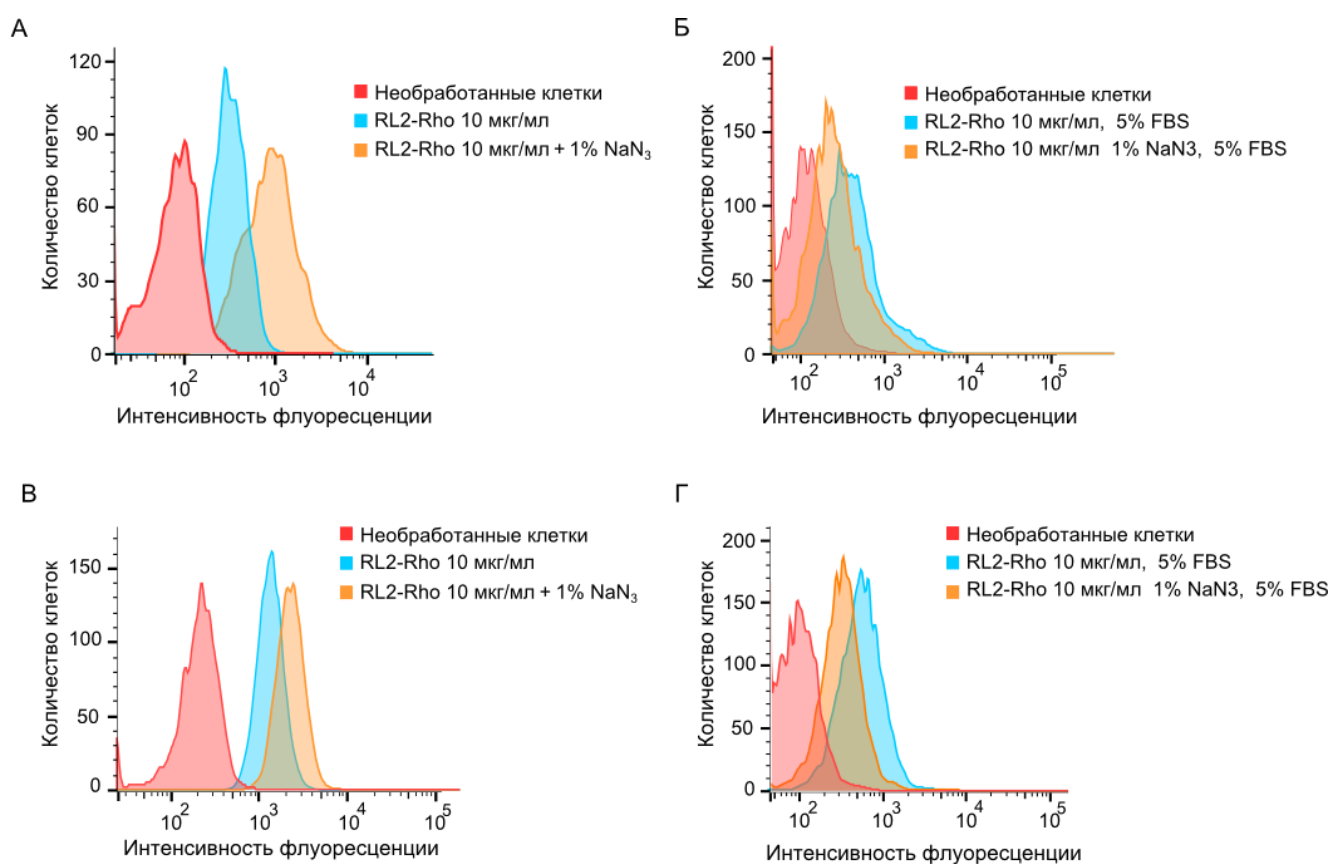


Рис. 25. Распределения клеток MCF-7 (А, Б) и MDA-MB-231 (В, Г), инкубированных с 10 мкг/мл RL2-Rho в присутствии или отсутствии 1% азидата натрия, по интенсивности флуоресценции. Инкубация проводилась в бессывороточной среде RPMI (А, В) или в RPMI, содержащей 5% FBS (Б, Г).

Полученные данные указывают на то, что RL2-Rho проникает в клетки обеих линий как в присутствии, так и в отсутствие азидата натрия. Кроме того, можно видеть, что в присутствии сыворотки (Рис. 25, В, Г), 1% азид натрия лишь частично снижает

эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231 (эффективность проникновения составляет 56%), но достоверно не снижает эффективность его проникновения в клетки MCF-7, тогда как в бессывороточных условиях (Рис. 24, А, В) азид натрия приводит даже к увеличению эффективности проникновения RL2-Rho в клетки. Вероятно, увеличение эффективности проникновения RL2 в присутствии NaN_3 можно объяснить тем, что азид натрия – ингибитор синтеза АТФ – препятствует не только эндоцитозу, но и экзоцитозу RL2. Вероятно, после начала инкубации с азидом натрия в клетке уже есть частично сформированные эндосомы, и процессы эндоцитоза протекают до полного истощения клеточного пула АТФ. Вероятно, некоторое количество RL2-Rho ещё успевает проникнуть в клетку по пути эндоцитоза, но не успевает вывестись из клетки. Таким образом, поскольку NaN_3 является ингибитором не только эндоцитоза, но ингибирует и другие АТФ-зависимые процессы в клетке, нельзя делать вывод о том, что он совсем не снижает эффективность эндоцитоза RL2-Rho в данных условиях, однако, можно сказать, что азид натрия не блокирует проникновение RL2-Rho в клетки полностью.

Поскольку ранее было показано, что эффективность действия ингибиторов эндоцитоза зависит также от концентрации RL2-Rho, далее мы исследовали влияние 1% азид натрия на проникновение флуоресцентного конъюгата с концентрацией 1 мкг/мл в клетки, культивируемые в бессывороточной среде (Рис. 26) и с концентрацией 50 мкг/мл RL2-Rho в клетки, культивируемые в среде с FBS (Рис. 27).

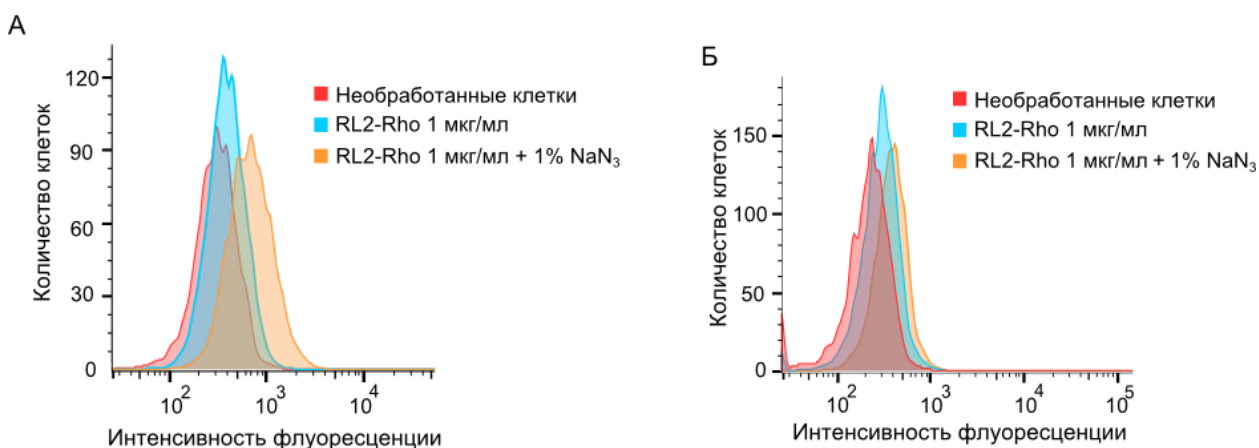


Рис. 26. Распределения по интенсивности флуоресценции клеток MCF-7 (А) и MDA-MB-231 (Б), инкубированных в бессывороточной среде RPMI с 1 мкг/мл RL2-Rho, в присутствии и отсутствие 1% азид натрия.

Данные, представленные на рисунке 26, также указывают на то, что при инкубации клеток обеих линий с низкими концентрациями RL2-Rho в бессывороточной среде, 1% NaN₃ не изменяет интенсивность флуоресценции клеток.

Чтобы оценить влияние 1% NaN₃ на проникновение в клетки высоких концентраций RL2-Rho, клетки MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали в среде, содержащей 5% FBS и 50 мкг/мл RL2-Rho, и исследовали методом флуоресцентной микроскопии (Рис. 27).

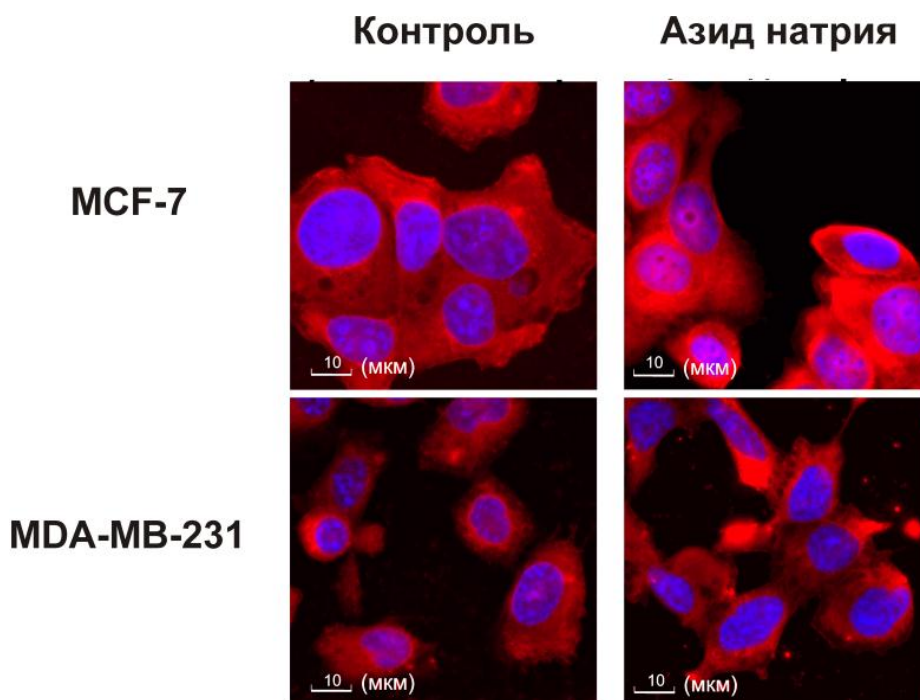


Рис. 27. Проникновение RL2-Rho (50 мкг/мл) в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, культивируемые в среде RPMI, содержащей 5% FBS, в присутствии 1% азид натрия и без него. Флуоресцентная микроскопия. Для визуализации ядер клетки окрашены DAPI.

Согласно данным рисунка 27, азид натрия в этих условиях также не блокирует проникновение флуоресцентного конъюгата RL2 в клетки аденокарциномы молочной железы человека.

Таким образом, ингибитор синтеза АТФ, азид натрия, в исследованных условиях не блокирует проникновение RL2 в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, следовательно, существует механизм проникновения RL2 в клетки, альтернативный эндоцитозу.

Анализ аминокислотного состава, вторичной структуры и способов проникновения RL2 в клетки указывает на сходство RL2 с пептидами класса CPP (Cell-penetrating Peptides). Структура большинства CPP, как и RL2, обогащена положительно заряженными

и гидрофобными аминокислотными остатками, что позволяет таким пептидам взаимодействовать с плазматической мембраной и способствует их поглощению клетками. Большинство CPP, как и RL2, являются неупорядоченными пептидами и способны динамично изменять вторичную структуру, а также локально концентрироваться на клеточной мембране, что обеспечивает их прямое проникновение через мембрану, а также стимулирует эндоцитоз.

При исследовании прямого проникновения CPP через плазматическую мембрану, обычно оценивают возможность пептида проникать в клетки при низких температурах, поскольку низкая температура замедляет большинство метаболических процессов и ингибирует эндоцитоз [178,179]. Мы провели эксперимент, аналогичный предыдущим, и инкубировали предварительно охлаждённые до +4° С клетки с конъюгатом RL2-Rho (10 мкг/мл) в течение 45 минут в бессывороточной среде RPMI (Рис. 28).

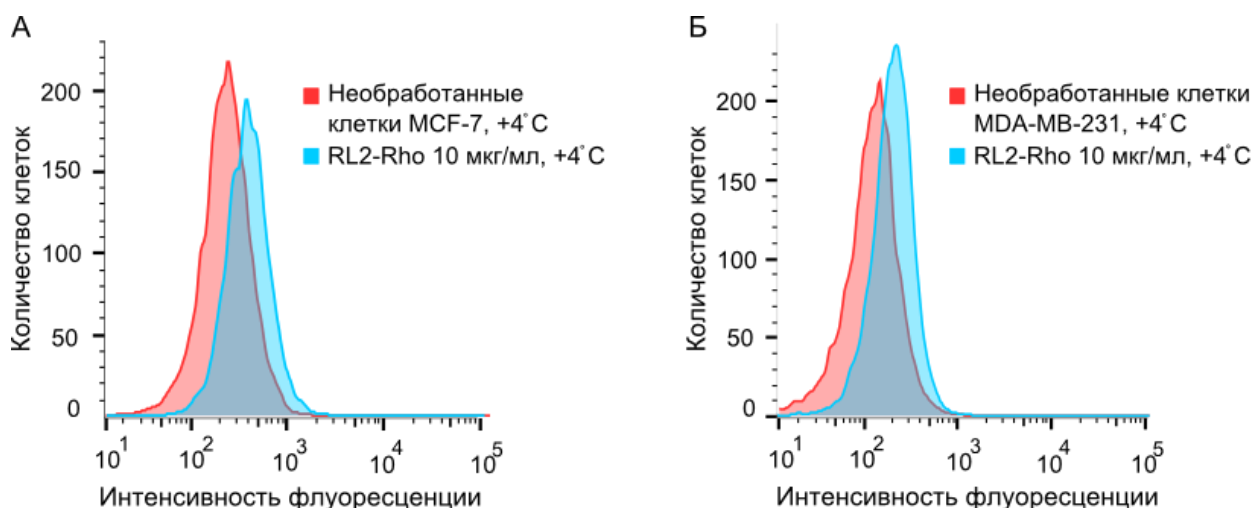


Рис. 28. Распределение по интенсивности флуоресценции клеток MCF-7 (А) и MDA-MB-231 (Б), инкубированных с 10 мкг/мл RL2-Rho при 4° С.

Цитофлуориметрический анализ показал, что интенсивность флуоресценции клеток, обработанных конъюгатом RL2-Rho, выше, чем интенсивность флуоресценции контрольных клеток. Что говорит о том, что флуоресцентный конъюгат RL2 проникает в клетки даже при 4° С.

Таким образом, подавление эндоцитоза клеток химическим (азид натрия) и физическим (снижение температуры) способом не приводит к полному ингибированию проникновения RL2-Rho в клетки и, соответственно позволяет сделать заключение о способности RL2 проникать в клетки как по пути эндоцитоза, так и прямым проникновением через плазматическую мембрану.

Совокупность полученных данных позволяет отнести RL2 к классу CPP и указывает на то, что механизм проникновения RL2 в клетки, альтернативный эндоцитозу, – это прямое проникновение через плазматическую мембрану, характерное для CPP.

3.3 Доставка нуклеиновых кислот в клетки с помощью RL2

В настоящее время генная терапия является быстроразвивающейся областью наномедицины, поскольку технологии, позволяющие корректировать экспрессию генов человека, в перспективе могут лечь в основу лечения многих заболеваний, для которых на сегодня не существует методов коррекции [4]. Для осуществления генной терапии необходимо доставить в клетки НК, несущую целевой ген или корректирующую функцию этого гена. Например, введение плазмиды, несущей ген IL-27, мышам с трансплантированной опухолью простаты человека приводило к подавлению роста опухоли [146]. Также одним из методов генной терапии является доставка в клетки интерферирующих РНК, подавляющих экспрессию определённого гена. Так, siРНК, мишенью которой является ген фактора роста эндотелия сосудов, в комплексе с липидными доставляющими агентами (липофектами или липидолом) значительно снижает прогрессию карциномы лёгкого VX2, трансплантированной кроликам [180]. Особую актуальность проблема доставки РНК в клетки приобрела в последние годы в связи с разработкой РНК-вакцин [181–183]. Однако, в свободном виде нуклеиновые кислоты (НК) не способны эффективно проникать через плазматическую мембрану клетки, сохраняя свою биологическую активность. В течение последних двадцати лет активно разрабатываются системы доставки, предотвращающие ферментативную деградацию НК эндогенными нуклеазами и обеспечивающие преодоление биологических барьеров [184]. Внутриклеточная доставка НК может осуществляться с помощью липидных транспортных везикул, наночастиц различного состава, а также пептидных носителей [141, 142]. Среди пептидных носителей наиболее перспективными являются короткие амфипатические и катионные CPP, способные доставлять НК в клетки без потери их функциональной активности [8, 143 - 145].

Поскольку RL2 обладает свойствами CPP, было интересно исследовать его способность доставлять в клетки биологически активные НК разной длины и состава: плазмидную ДНК, siРНК и цитотоксическую некодирующую мРНК.

3.3.1 Доставка плазмидной ДНК в клетки с помощью RL2

Способность RL2 доставлять в клетки длинные нуклеиновые кислоты исследовали, используя в качестве «карга» плазмидную ДНК pEGFP, несущую гены зеленого

флуоресцентного белка и устойчивости к антибиотику канамицину. Плазмида pEGFP была наработана в бактериальных клетках *E.coli*, выделена с помощью коммерчески доступного набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) и охарактеризована методом рестрикционного анализа. На электрофореграмме видно, что исходная плазмида pEGFP представлена несколькими формами с различной подвижностью (Рис. 29, дорожка 2).

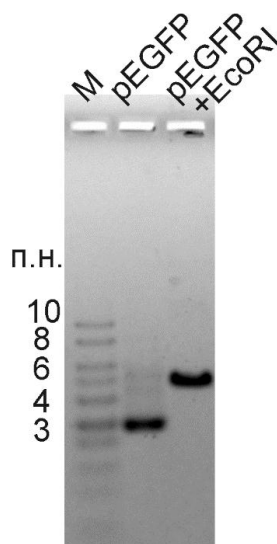


Рис. 29. Электрофоретическое разделение в 0,5% агарозном геле продуктов рестрикции плазмидной ДНК pEGFP эндонуклеазой *EcoRI*. Дорожки: М – набор ДНК с известными молекулярными массами, pEGFP – плазмидная ДНК, pEGFP + *EcoRI* – плазмидная ДНК, обработанная эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*

В результате инкубации плазмиды pEGFP (4700 п.н.), содержащей единственный сайт рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*, и внесения двуцепочечного разрыва, все формы плазмиды приобретают одинаковую подвижность, соответствующую подвижности линейной формы.

Полученные данные позволяют заключить, что исходный препарат содержал плазмиду в линейной, кольцевой и суперскрученной (более подвижные) формах, тогда как гидролиз эндонуклеазой рестрикции приводит к переходу этих форм плазмидной ДНК в линейную. Кроме того, в гидролизованном препарате не наблюдается фрагментов, длина которых отличается от линейной формы плазмиды, что свидетельствует об отсутствии в полученном препарате плазмидной ДНК примесей фрагментов геномной ДНК *E.coli*.

3.3.1.1 Анализ формирования комплекса RL2 с pEGFP

Получение нековалентных комплексов RL2-pEGFP проводили, смешивая RL2 с плазмидой в соответствии с рассчитанным зарядным соотношением N/P. Соотношение рассчитывали по формуле 2 (глава 2.2.17).

Расчет N/P проводили исходя из предположения, что аминогруппы и иминогруппы боковых радикалов основных аминокислотных остатков (лизина, аргинина, гистидина) RL2 полностью протонированы в условиях формирования комплекса и несут положительный заряд, а фосфаты сахарофосфатного остова плазмидной ДНК депротонированы и заряжены отрицательно.

Анализ связывания RL2 с pEGFP при образовании комплексов был проведен методом ретардации в агарозном геле.

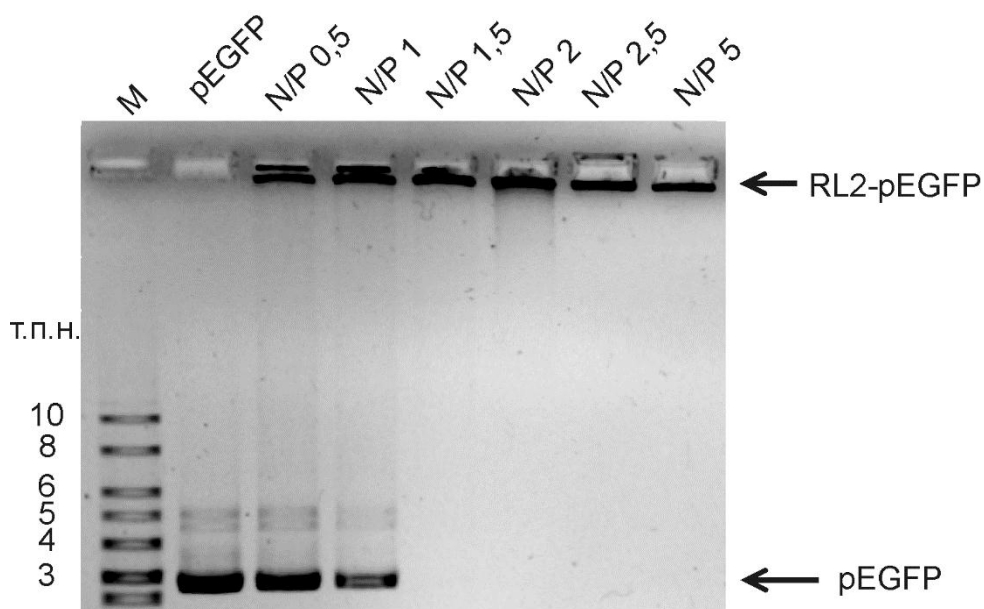


Рис. 30. Электрофоретический анализ комплексов RL2-pEGFP в 0,5% агарозном геле. Дорожки: М – набор ДНК с известными молекулярными массами, pEGFP – плазмидная ДНК; N/P 0,5 - N/P 5 - комплексы RL2-pEGFP с зарядными соотношениями от 0,5 до 5.

Электрофоретический анализ комплексов RL2-pEGFP с различными зарядными соотношениями выявил продукт реакции с низкой подвижностью, что указывает на связывание ДНК с RL2 (Рис. 30, дорожки N/P 0,5 - N/P 5).

При зарядных соотношениях 0,5 и 1 кроме продукта с низкой подвижностью в геле детектируются продукты, электрофоретическая подвижность которых совпадает с

подвижностью свободной плазмиды. Это означает, что в этих образцах присутствует плазмидная ДНК, не вовлечённая в комплексы. Таким образом, при смешивании RL2 с рEGFP образуются комплексы больших размеров, нековалентное связывание всех молекул плазмиды с RL2 происходит при $N/P \geq 1,5$.

3.3.1.2 Анализ стабильности комплекса RL2-рEGFP в присутствии гепарина

При доставке биологически активных молекул важно обеспечить стабильность доставляемых молекул во внеклеточной среде. При проникновении в клетку молекулы взаимодействуют с внеклеточным матриксом ещё до того, как достигнут плазматической мембраны. Внеклеточный матрикс представляет собой достаточно плотную и разветвлённую сеть протеогликанов, в составе которых широко представлены остатки гепарина [8, 74, 146]. Гепарин является сильным полианионом и может конкурентно связываться с RL2, высвобождая плазмиду из комплексов RL2-рEGFP. Таким образом, гепарин является подходящей молекулой для моделирования условий внеклеточного матрикса.

Для оценки стабильности комплексов RL2-рEGFP к предварительно сформированным комплексам добавляли натриевую соль гепарина (2,4 ед./мкг ДНК) и анализировали наличие свободной ДНК методом электрофореза в агарозном геле (Рис. 31).

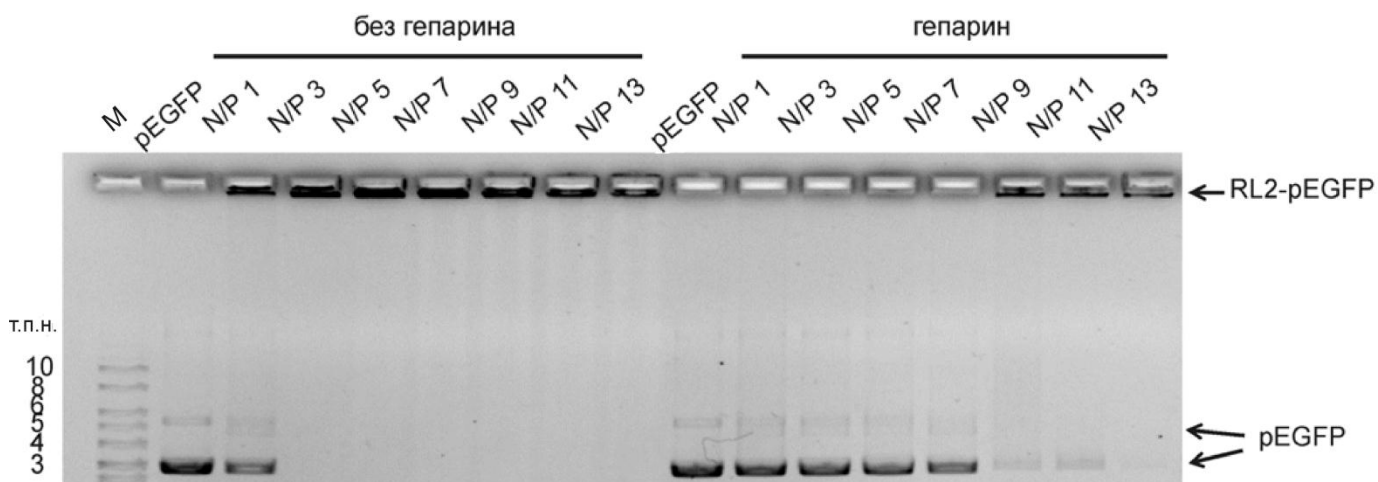


Рис. 31. Электрофоретический анализ комплексов RL2-рEGFP в 0,5% агарозном геле в присутствии гепарина и без него. Дорожки: М – набор ДНК с известными молекулярными массами, рEGFP – плазмидная ДНК; N/P 1 - N/P 13 - комплексы RL2-рEGFP с зарядными соотношениями от 1 до 13.

Из данных рисунка 31 видно, что при добавлении гепарина к комплексам с N/P меньше 7 продукт с низкой подвижностью, соответствующий комплексу RL2-pEGFP, не визуализируется, при этом появляются НК, соответствующие по электрофоретической подвижности свободной плазмидной ДНК. Чем меньше зарядное соотношение комплекса RL2-pEGFP, тем больше плазмиды высвобождается из комплекса при инкубации с гепарином. При значениях N/P от 1 до 3 практически вся плазмида находится в свободном состоянии, в то время как комплексы с высоким отношением N/P (> 7) оказались более устойчивыми к воздействию гепарина. Таким образом, можно сделать вывод о том, что комплексы с $N/P \leq 3$ не стабильны во внеклеточном пространстве и RL2 не способен доставлять плазмиду в клетки в таких условиях. Далее мы будем исследовать комплексы с $N/P \geq 5$.

3.3.1.3 Анализ физико-химических свойств комплекса RL2-pEGFP

Для оценки размеров комплексов RL2-pEGFP и их поверхностного заряда были измерены гидродинамический диаметр и ζ -потенциал комплексов методами динамического и электрофоретического светорассеяния, соответственно (рис 32).

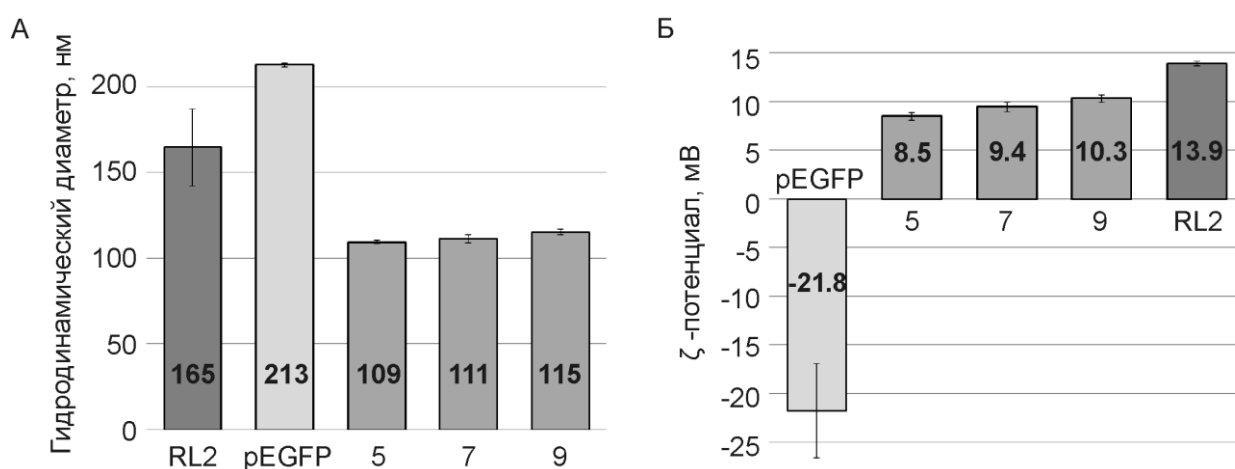


Рис. 32. Гидродинамический диаметр (А) и ζ -потенциал (Б) комплексов RL2-pEGFP с зарядными соотношениями N/P 5 - 9. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Из данных гистограммы (Рис. 32, А) видно, что гидродинамические диаметры комплексов изменяются незначительно при увеличении количества RL2 в комплексе (изменение N/P от 5 до 9) и составляют 109 - 115 нм, что меньше, чем размеры молекул

RL2 и pEGFP (165 и 213 нм, соответственно) в тех же условиях. Таким образом, при образовании комплекса происходит компактизация обоих компонентов (RL2 и pEGFP).

Важно отметить, что размер исследованных комплексов составляет около 100-150 нм, что соответствует среднему размеру нековалентных комплексов CPP с доставляемыми молекулами [81, 187, 188]. Согласно литературным данным, частицы размером около 100 нм и меньше наиболее быстро и эффективно проникают в клетки, используя клатрин- и кавеолинзависимые пути эндоцитоза [189, 190]. Таким образом, частицы RL2-pEGFP имеют размер, позволяющий эффективно проникать в клетки посредством эндоцитоза.

Известно, что подбор условий является важным для создания нековалентных комплексов и определяет не только их размер, но также и биологическую активность доставляемых НК, как показано, на примере CPP PepFect14 при доставке различных типов НК [4]. Образование комплексов RL2-pEGFP при выбранных условиях (25 мМ буфере MES pH 5,5 в течение 5 мин при 37°C) приводит к образованию однородных по размеру наночастиц, и с ростом зарядного отношения размер образовавшихся наночастиц практически не изменяется.

На рисунке 32, Б можно видеть, что плазида pEGFP имеет отрицательный ζ -потенциал, это означает, что её поверхностный заряд отрицателен, в то время как RL2 заряжен положительно. Измерение ζ -потенциала комплексов показало, что поверхностный заряд RL2-pEGFP в диапазоне N/P от 5 до 9 положителен. Также с ростом соотношения N/P ζ -потенциал комплексов увеличивается, приближаясь к значению RL2. Мы полагаем, что такое увеличение ζ -потенциала обусловлено увеличением количества катионных групп молекул RL2, экспонированных на поверхность комплексов.

Таким образом, при формировании комплексов RL2-pEGFP с N/P от 5 до 9 молекулы RL2 и pEGFP компактизуются, и гидродинамический диаметр комплексов составляет 109 - 115 нм. При увеличении зарядного соотношения увеличивается представленность молекул RL2 на поверхности комплексов.

3.3.1.4 Анализ проникновения RL2-pEGFP в клетки

Доставку pEGFP в клетки с помощью RL2 изучали на клетках карциномы кожи A431. Для этого клетки инкубировали в течение 3 ч с плазмидной ДНК pEGFP, комплексами RL2-pEGFP с зарядными соотношениями 5, 7 и 9 (N/P 5 – N/P 9), а также с комплексом плазмидной ДНК с Lipofectamine 3000 (LF-pEGFP). Чтобы оценить сохранение функциональной активности ДНК после проникновения в клетки, из трансформированных клеток A431 получали препарат суммарной РНК, проводили ОТ-

ПЦР с EGFP-специфическими праймерами и анализировали результаты реакции электрофорезом (Рис. 33)

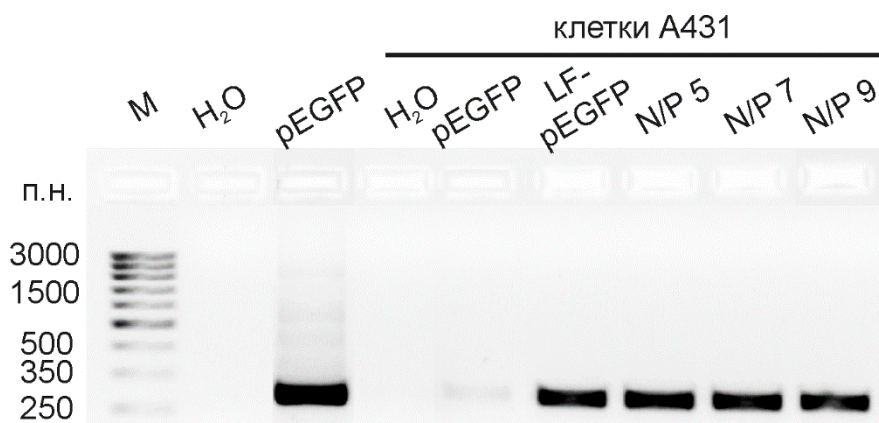


Рис. 33. Анализ экспрессии гена *egfp* в клетках A431. Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР с праймерами специфичными к гену *egfp* суммарной РНК клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP. Дорожки: М - набор ДНК с известными молекулярными массами; H₂O – реакционная смесь, не содержащая клеток и ДНК; pEGFP – продукт ОТ-ПЦР плазмиды pEGFP; продукты ОТ-ПЦР суммарной РНК клеток A431: H₂O – клетки без плазмиды; pEGFP – клетки, инкубированные с добавлением плазмиды; LF-pEGFP – клетки, обработанные комплексом LF-pEGFP; N/P 5 – N/P 9 – клетки, обработанные комплексами RL2-pEGFP с зарядными соотношениями 5, 7 и 9. Электрофорез в 2% агарозном геле.

Полученные данные показывают, что специфические продукты реакции не обнаруживаются при ОТ-ПЦР реакционной смеси без матричной ДНК *egfp* (рис 33, дорожка H₂O) и при ОТ-ПЦР РНК контрольных клеток (рис 33, H₂O, клетки A431). При инкубации клеток с плазмидой pEGFP в отсутствие трансфицирующего агента обнаружены лишь следовые количества целевого ПЦР продукта (рис 33, дорожка pEGFP, клетки A431). В клетках, обработанных комплексами RL2-pEGFP (дорожки N/P 5, N/P 7, N/P 9, клетки A431) или LF-pEGFP (LF-pEGFP, клетки A431), обнаруживаются ПЦР продукты, подвижность которых соответствует электрофоретической подвижности плазмиды pEGFP.

Таким образом, плазмидная ДНК в отсутствие трансфицирующих агентов не способна эффективно проникать в клетки A431, сохраняя свою функциональную активность, тогда как RL2 обеспечивает доставку плазмидной ДНК внутрь клеток и эффективно диссоциирует из комплексов RL2-pEGFP с N/P от 5 до 9, обеспечивая возможность транскрипции репортерного гена.

Для сравнения эффективности проникновения в клетки комплексов RL2-pEGFP мы анализировали уровень репортерного белка EGFP в клетках A549 и A431, инкубированных с комплексами RL2-pEGFP с различными зарядными соотношениями (N/P = 5 – 9), методом флуоресцентной микроскопии (Рис. 34). В качестве положительного контроля клетки трансформировали плазмидной ДНК в присутствии Lipofectamine 3000. Уровень репортерного белка EGFP оценивали через 24 часа после начала инкубации клеток с препаратами, что не превышает время полураспада белка EGFP, равное 48 часам [87].

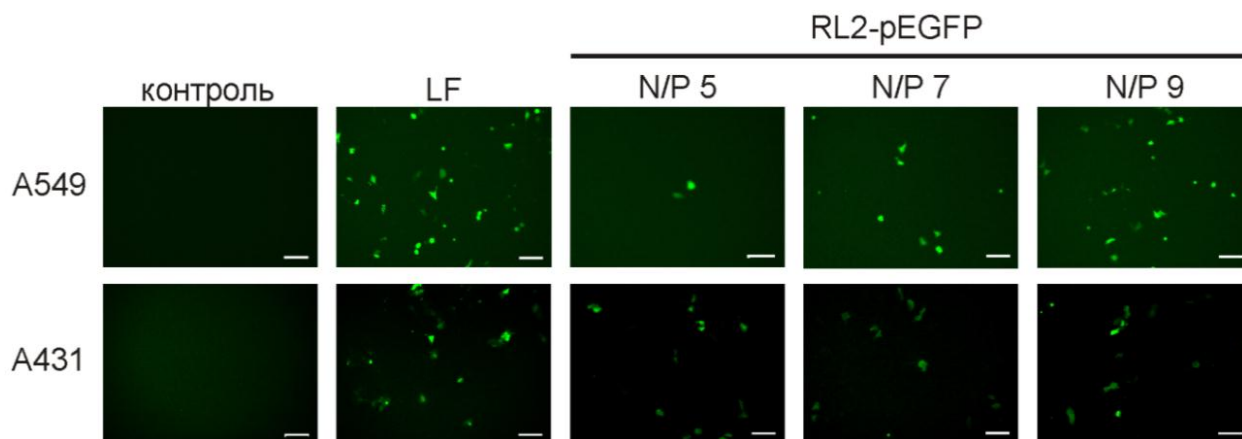


Рис. 34. Уровень белка EGFP в клетках A549 и A431. Контроль - трансфекция клеток плазмидой pEGFP; LF - трансфекция клеток комплексом LF-pEGFP; N/P 5, N/P 7, N/P 9 – трансфекция клеток комплексами RL2-pEGFP с N/P = 5 – 9. Размер бара 100 мкм.

Поскольку рекомбинантный аналог лактапина является цитотоксическим пептидом, для обработки клеток были выбраны комплексы RL2-pEGFP с зарядным соотношением не более 9, так, чтобы итоговая концентрация RL2 в культуральной среде была заведомо ниже IC_{50} для клеток A549 ($IC_{50} = 0,39$ мг/мл) [87].

Согласно полученным результатам видно, что в клетках, инкубированных с плазмидой без трансфицирующего агента, флуоресцентный сигнал отсутствует. Это подтверждает заключение о том, что плазмидная ДНК сама по себе не способна эффективно проникать в клетки, сохраняя свою функциональную активность (Рис. 34, контроль). В клетках, обработанных комплексами pEGFP с Lipofectamine 3000, наблюдается эффективная экспрессия гена *egfp* и синтез зеленого флуоресцентного белка (Рис. 34, LF). В клетках, инкубированных с комплексами RL2-pEGFP, также происходит синтез репортерного белка, что говорит о том, что комплекс RL2-pEGFP проникает в клетки, плазида высвобождается из комплекса и, сохраняет свою функциональную активность. При этом, для клеток A549 увеличение содержания RL2 в комплексах

приводит к увеличению количества клеток, экспрессирующих EGFP. При $N/P = 9$ количество флуоресцирующих клеток A549 сопоставимо с количеством клеток, экспрессирующих EGFP, при трансфекции плазмидой с Lipofectamin 3000.

Мы предполагаем, что более эффективная трансформация клеток комплексами с бóльшим N/P связана с более высоким поверхностным зарядом комплексов (Рис. 32, Б) и, как следствие, бóльшим электростатическим взаимодействием комплексов с плазматической мембраной клеток, что приводит к увеличению эффективности проникновения комплексов в клетку.

С другой стороны, более эффективная трансформация клеток комплексами с высокими зарядными соотношениями может быть связана с большей устойчивостью таких комплексов в культуральной среде или более ранним выходом плазмиды из эндосом в цитоплазму, что приводит к меньшей потере функциональной активности плазмидной ДНК внутри поздних эндосом и лизосом.

Интересно, что в клетках A431 не было отмечено достоверного изменения доли трансфицированных клеток при повышении зарядного соотношения комплексов в диапазоне N/P от 5 до 9.

Таким образом, RL2 обеспечивает интернализацию плазмидной ДНК pEGFP в клетки в составе нековалентных комплексов RL2-pEGFP. При этом плазмидная ДНК сохраняет свою функциональную активность, о чём свидетельствует транскрипция мРНК EGFP и синтез репортёрного флуоресцентного белка EGFP. При увеличении количества RL2 в комплексе количество клеток A549, экспрессирующих флуоресцентный белок, возрастает. Однако при трансфекции RL2-pEGFP с $N/P \leq 9$, количество клеток, экспрессирующих EGFP меньше, чем при трансфекции комплексами LF-pEGFP.

3.3.2 Доставка siРНК в клетки с помощью RL2

Некодирующие РНК — это РНК, с которых не транслируются белки. К некодирующим РНК относятся антисмысловые, малые ядерные, малые ядрышковые, малые интерферирующие и другие типы РНК. Такие РНК участвуют в регуляции экспрессии генов и чаще всего имеют малый размер.

Существует ряд практических задач, для решения которых необходимы инструменты эффективной внутриклеточной доставки малых некодирующих РНК. Например, доставка в клетки малых интерферирующих РНК (siРНК) позволяет осуществлять супрессию генов на посттранскрипционном уровне. Таким образом, специфический эффект воздействия siРНК на клетки можно детектировать, оценивая инактивацию мРНК-мишени.

Для анализа возможности доставки нуклеиновых кислот небольшого размера в клетки с помощью RL2, клетки A549, экспрессирующие EGFP, инкубировали с комплексами RL2 с описанной в литературе анти-EGFP siРНК, которая нацелена на область гена *egfp* [87], и анализировали уменьшение интенсивности флуоресценции клеток.

3.3.2.1. Анализ формирования комплекса RL2 с siРНК

Для анализа эффективности формирования нековалентных комплексов RL2 с siРНК были сформированы комплексы RL2-siРНК с зарядными соотношениями от 1 до 10, рассчитанными по формуле (2). Полученные комплексы были проанализированы методом ретардации в полиакриламидном геле (Рис. 35).

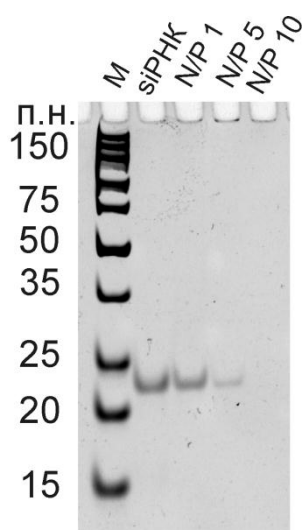


Рис. 35. Электрофоретический анализ комплексов RL2-siРНК с различными зарядными соотношениями в 20% ПААГ. М – набор РНК с известными молекулярными массами; siРНК – свободная siРНК; N/P 1 – N/P 10 – комплексы RL2-siРНК с зарядными соотношениями от 1 до 10.

Согласно данным рисунка 35, эффективное образование комплексов RL2-siРНК происходит при зарядном соотношении $N/P \geq 10$ (Рис. 35, дорожка N/P 10). При меньших зарядных соотношениях комплексов на электрофореграмме визуализируется нуклеиновая кислота, соответствующая по подвижности свободной siРНК (Рис. 35, дорожки N/P 1, N/P 5, siРНК, соответственно).

3.3.2.2 Анализ проникновения комплексов RL2-siPHK в клетки

Для оценки эффективности доставки siPHK внутрь клетки в составе комплекса RL2-siPHK и сохранения её функциональной активности проводили одновременную трансфекцию клеток A549 комплексами RL2-siPHK и плазмидой pEGFP, предварительно инкубированной с Lipofectamine 3000 (LF-pEGFP). Через 2 суток инкубации клетки анализировали методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии (Рис. 36, 37).

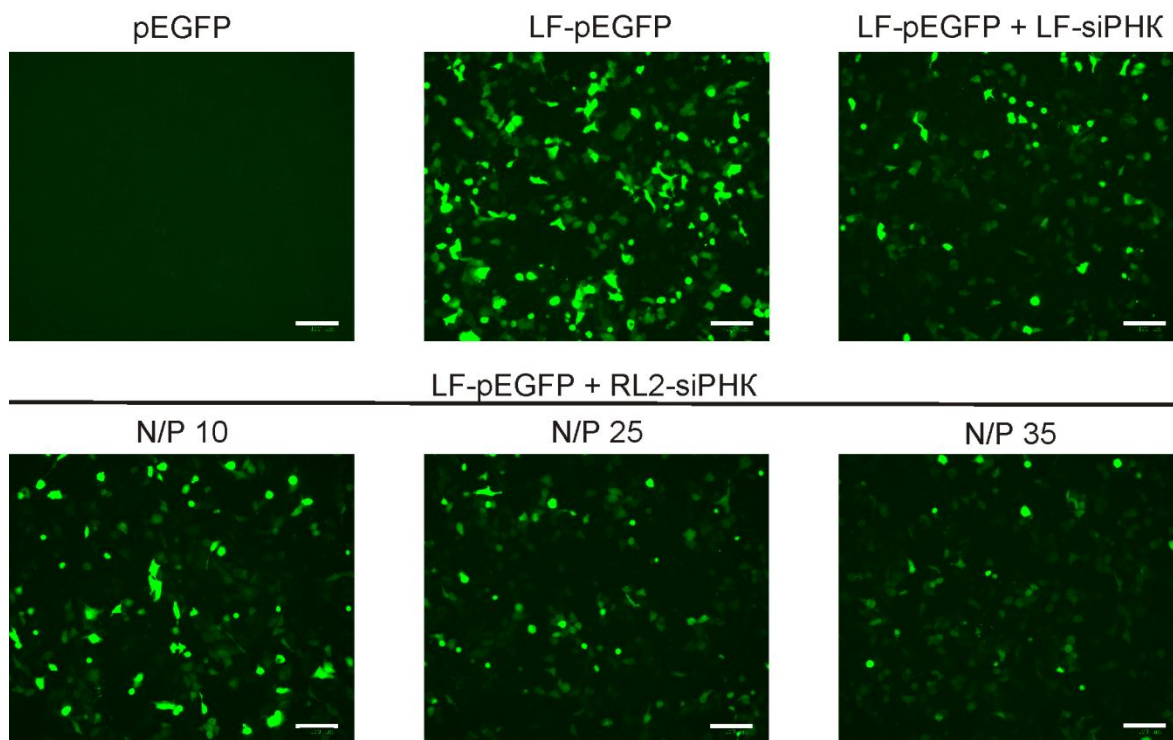


Рис. 36. Подавление экспрессии белка EGFP в клетках A549 при одновременной трансфекции клеток комплексами LF-pEGFP и RL2-siPHK. Репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии; размер бара 100 мкм.

При анализе интенсивности флуоресценции трансфицированных клеток было показано, что в клетках, обработанных плазмидой pEGFP, синтез EGFP не происходит, в то время как в клетках, обработанных комплексом LF-pEGFP, наблюдается активный синтез флуоресцентного белка (Рис. 36).

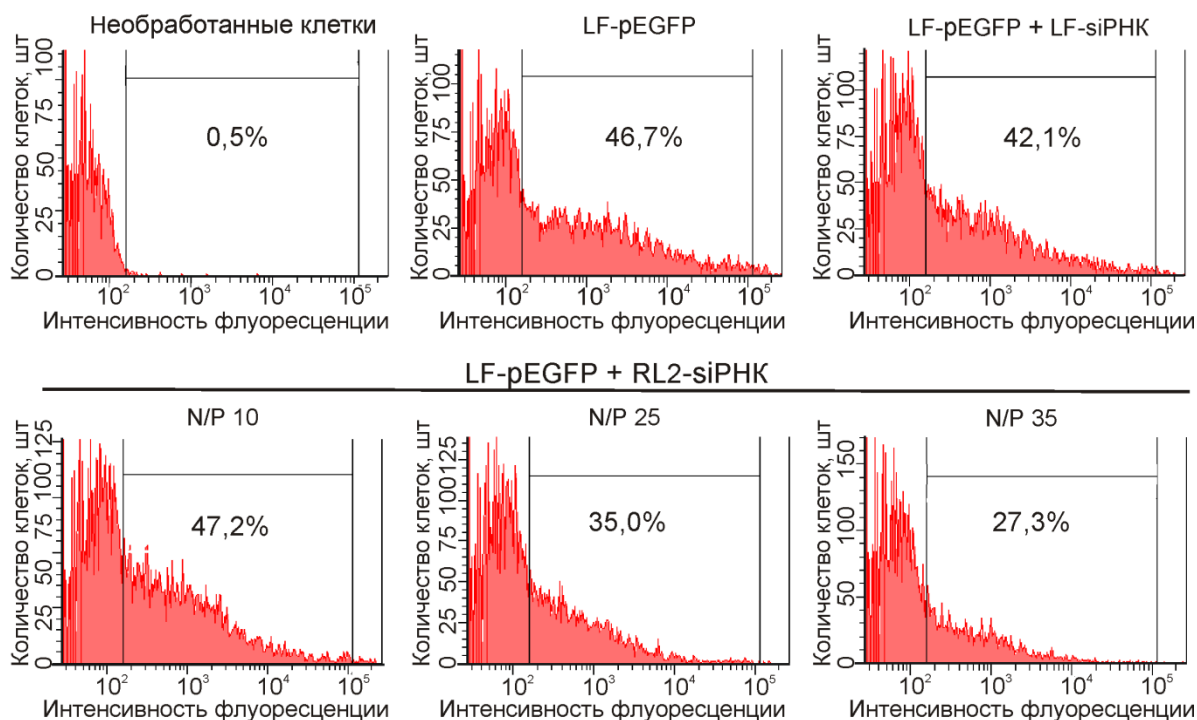
Также по данным рисунка 36 видно, что одновременная инкубация клеток с LF-pEGFP и комплексами RL2-siPHK (LF-pEGFP + RL2-siPHK) или LF-siPHK (LF-pEGFP + LF-siPHK) приводит к уменьшению флуоресцентного сигнала в клетках, что непосредственно указывает на сохранение функциональной активности siPHK,

доставляемой этими агентами, а также эффективного высвобождения доставляемой siРНК из комплексов. Необходимо также отметить, что согласно данным рисунка 36, чем больше значение зарядного соотношения комплексов RL2-siРНК, тем активнее подавляется трансляция флуоресцентного белка в трансфицируемых клетках.

Можно предположить, что при совместной инкубации клеток с LF-pEGFP и RL2-siРНК, комплексы могут взаимодействовать и наблюдаемый эффект может быть обеспечен РНК, проникшей в клетку с помощью LF. Однако поскольку трансляция флуоресцентного белка в клетках, обработанных LF-pEGFP и LF-siРНК, подавляется меньше, чем при обработке клеток комплексами LF-pEGFP и RL2-siРНК с $N/P \geq 25$, мы предполагаем, что проникновение siРНК обеспечивается аналогом лактапина, а не LF. (Рис. 36). При этом, количество RL2 во всех исследованных комплексах не достигало значения IC50 (при $N/P = 35$ концентрация RL2 в среде составляла 45 мкг/мл).

Для количественной оценки эффективности РНК интерференции, обусловленной siРНК, доставляемой в клетки с помощью RL2, был проведён цитофлуориметрический анализ клеток, инкубированных одновременно с комплексами LF-pEGFP и RL2-siРНК по схеме, описанной выше. Эффективность экспрессии гена *egfp* оценивали как долю трансфицированных клеток, интенсивность флуоресценции которых превышала уровень аутофлуоресценции клеток, не обработанных плазмидой. Также оценивали распределение клеток по интенсивности флуоресценции. Подавление гена-мишени оценивали как в клетках, инкубированных с RL2-siРНК, так и в клетках, обработанных LF-siРНК (Рис. 37).

А



Б

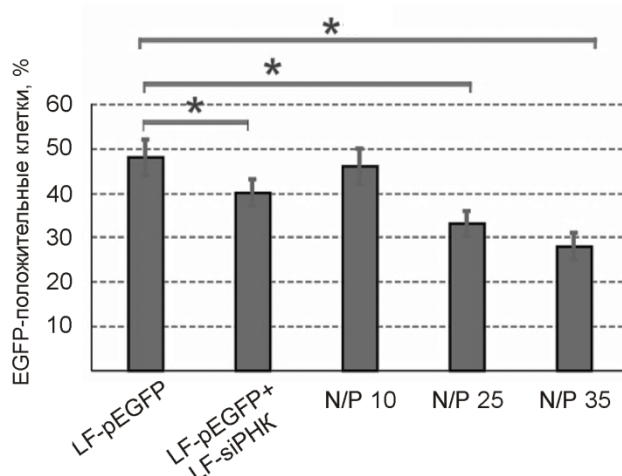


Рис. 37. (А) Цитофлуориметрический анализ распределения клеток A549, трансфицированных комплексами LF-pEGFP и RL2-siPHK, по интенсивности флуоресценции; LF – Lipofectamine 3000, N/P – зарядное соотношение комплексов. В каждом образце анализировали 10000 клеток (Б). Оценка количества EGFP-положительных клеток. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$ (Б).

Цитофлуориметрический анализ трансфицированных клеток подтвердил данные, полученные методом флуоресцентной микроскопии, и показал, что количество флуоресцирующих клеток обратно пропорционально зарядному соотношению комплексов

RL2-siРНК, которыми они обработаны (Рис. 37, А). При зарядном соотношении комплексов больше 25 эффективность подавления гена-мишени достоверно выше, чем при обработке клеток siРНК в комплексе с Lipofectamine 3000. Доля клеток, экспрессирующих EGFP после инкубации с комплексом RL2-siРНК с зарядным соотношением N/P = 35, составляет лишь 27,3%, что на 19,4% ниже по сравнению с популяцией контрольных клеток, не обработанных siРНК (Рис. 37 А, Б). Кроме того, можно видеть, что форма распределения клеток по интенсивности флуоресценции также меняется: уменьшается не только количество клеток, экспрессирующих EGFP, но также среднее значение распределения сдвигается в сторону меньшей интенсивности флуоресценции (Рис. 37, А), это означает, что в клетках снижается уровень флуоресцентного белка.

Поскольку при обработке клеток одновременно комплексами LF-pEGFP и RL2-siРНК наблюдается РНК интерференция, для которой необходимо связывание свободных siРНК дуплексов с РНК-белковым комплексом RISC, можно сделать вывод о том, что при доставке в клетку siРНК эффективно высвобождается из комплекса RL2-siРНК.

Таким образом, на примере плазмидной ДНК и siРНК мы показали, что двуцепочечные нуклеиновые кислоты в составе комплексов с RL2 эффективно доставляются в клетки, при этом, чем больше зарядное соотношение комплексов, тем эффективнее доставка НК. Поскольку проникновение плазмидной ДНК pEGFP и siРНК в клетки оценивали по экспрессии белка EGFP и подавлению флуоресцентного сигнала, соответственно, то можно сделать вывод о сохранении функциональной активности siРНК, доставляемых в клетку в составе комплексов с RL2.

На основании полученных данных можно предположить, что RL2-опосредованный транспорт нуклеиновых кислот эффективен как в случае доставки большой плазмидной ДНК, так и малой siРНК. Эффективность транспорта зависит от количества RL2 в комплексе. Обработка клеток комплексом RL2-siРНК с $N/P \geq 25$ приводит к более эффективному подавлению гена-мишени по сравнению с комплексом LF- siРНК.

Вероятно, с увеличением количества RL2 в комплексах стабильность НК в культуральной среде увеличивается, происходит более эффективное взаимодействие комплексов с плазматической мембраной и их проникновение в клетки.

3.3.3 Доставка цитотоксической РНК в клетки с помощью RL2

Известно, что некодирующие РНК вовлечены в различные клеточные процессы, например, такие, как модуляция экспрессии генов и гибель раковых клеток [147 - 149]. Одной из разновидностей малых некодирующих РНК являются малые ядрышковые РНК, участвующие в модификациях рибосомных РНК, тРНК и малых ядерных РНК. Ранее было показано, что аналог некодирующей малой ядрышковой РНК U25 (мяоРНК U25) снижает жизнеспособность раковых клеток человека различного гистогенеза *in vitro*. Цитотоксичность этой некодирующей РНК частично обусловлена активацией генов интерферонового ответа [198].

Чтобы оценить возможность доставки короткой одноцепочечной РНК с помощью RL2, мы изучили проникновение комплекса RL2-мяоРНК U25 в клетки человека. Поскольку специфическим действием мяоРНК U25 на клетки является цитотоксическая активность, для исследования диссоциации некодирующей РНК U25 из комплекса внутри клетки и оценки её функциональной активности был проведён анализ жизнеспособности клеток, обработанных свободной мяоРНК или мяоРНК в комплексе с RL2 или LF. При формировании комплексов RL2-мяоРНК конечная концентрация RL2 в культуральной среде не превышала 0,15 мг/мл.

Из данных рисунка 38 видно, что жизнеспособность клеток, обработанных свободным RL2 (0,15 мг/мл) и липофектаминол (0,15% об / об), составляют 90,5 и 96,4%, соответственно. Инкубация клеток A549 с мяоРНК в концентрации до 30 нМ не приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток, что говорит о том, что мяоРНК U25 не способна эффективно проникать в клетки с сохранением своей функциональной активности. При этом добавление к клеткам мяоРНК в комплексе с LF или RL2 приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток A549. Комплексы RL2-мяоРНК с конечной концентрацией мяоРНК в среде 10 и 30 нМ снижают МТТ-индекс клеток на 34,7 и 39,7%, соответственно.

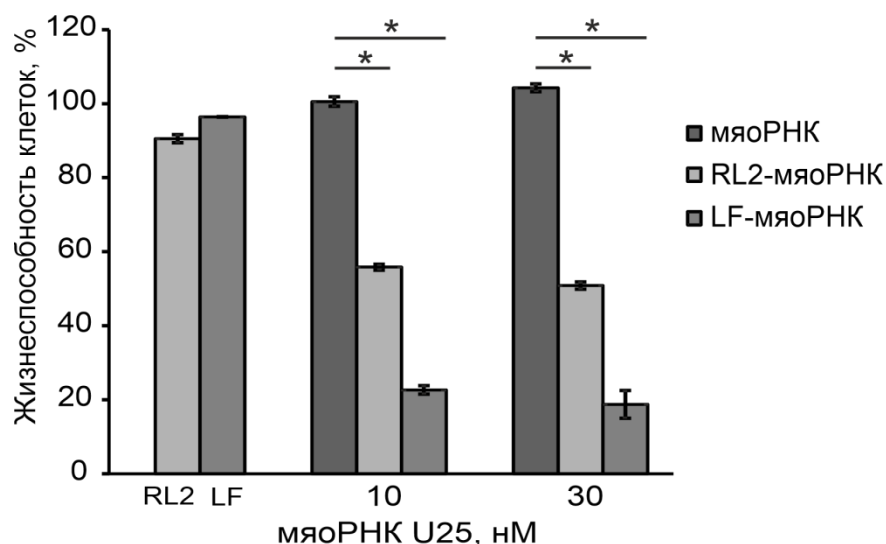


Рис. 38. Жизнеспособность клеток A549, обработанных свободной мяоРНК, RL2, LF и комплексами мяоРНК с RL2 и LF, с различными концентрациями мяоРНК; LF – Lipofectamine 3000. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$.

Наибольшее снижение МТТ-индекса наблюдается при обработке клеток комплексами LF-мяоРНК, при этом при трансфекции клеток комплексами, содержащими 10 и 30 нМ мяоРНК, наблюдали снижение жизнеспособности клеток на 73,7 и 77,6%, соответственно, по сравнению с клетками, обработанными свободным липофектаминам. Такое увеличение цитотоксической активности комплексов мяоРНК с трансфицирующими агентами по сравнению с цитотоксической активностью мяоРНК и трансфицирующих агентов по отдельности свидетельствует о том, что цитотоксическая активность комплексов обусловлена не свойствами доставщиков, а свойствами цитотоксической мяоРНК.

Было обнаружено достоверное снижение жизнеспособности клеток, инкубированных с LF-мяоРНК по сравнению с клетками, обработанными RL2-мяоРНК. Поскольку сами по себе RL2 и липофектамин не оказывают значительного цитотоксического действия, мы предполагаем, что различие в цитотоксичности этих комплексов может быть связано с разницей в эффективности доставки РНК в клетку, эффективностью её диссоциации из комплексов, а также с различной устойчивостью мяоРНК в культуральной среде и внутри клетки.

Анализ данных МТТ-теста также показал, что жизнеспособность клеток достоверно не отличается при повышении концентрации РНК U25 с 10 до 30 нМ как в свободном виде, так и в составе комплекса с липофектаминам. Эти данные позволили предположить,

что уже при концентрации мяоРНК U25 10 нМ происходит насыщение связывания мяоРНК с её молекулярными мишенями внутри клетки.

Поскольку жизнеспособность клеток, обработанных мяоРНК в концентрациях 10 нМ и 30 нМ, отличается незначительно, а цитотоксический эффект мяоРНК в комплексе с RL2 и липофектамином достоверно отличается, было интересно исследовать влияние изменения концентрации RL2 в свободном виде и в комплексе с мяоРНК на жизнеспособность клеток (Рис. 39).

Из данных рисунка 39 видно, что RL2 в концентрации до 0,15 мг/мл снижает жизнеспособность клеток A549 не более, чем на 10%. При инкубации клеток со свободным RL2 или с комплексами RL2-мяоРНК, жизнеспособность клеток достоверно не отличается при концентрациях RL2 меньше 0,05 мг/мл. При этом, комплексы RL2-мяоРНК с концентрацией RL2 более 0,085 мг/мл значительно снижают жизнеспособность клеток по сравнению со свободным RL2.

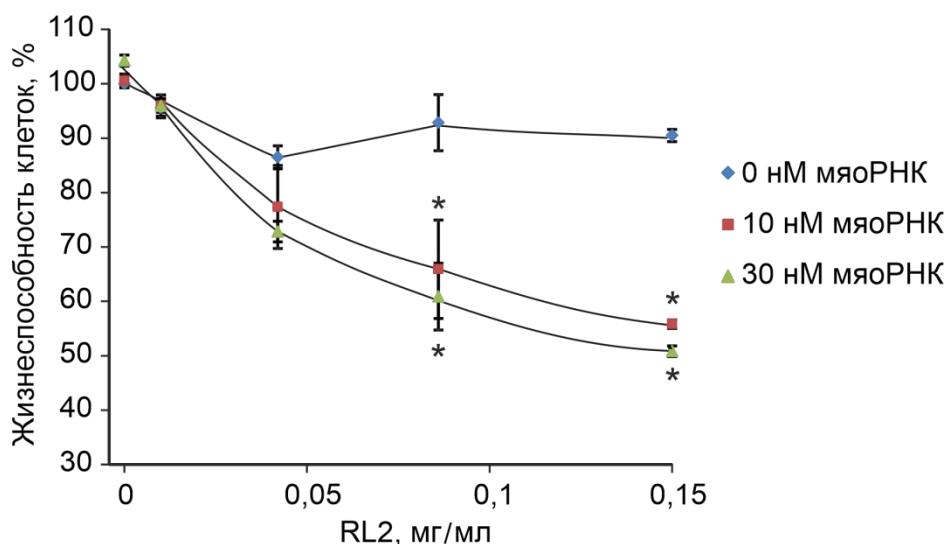


Рис. 39 График зависимости жизнеспособности клеток A549 от концентрации RL2, мяоРНК или комплексов RL2-мяоРНК. Представлены репрезентативные данные для трех независимых повторов. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению с RL2 в той же концентрации.

Таким образом, согласно полученным данным, RL2 в концентрации до 0,15 мг/мл не оказывает влияния на жизнеспособность клеток A549, при этом цитотоксичность комплексов RL2-мяоРНК возрастает при увеличении количества RL2 в комплексе (Рис. 39). При конечной концентрации RL2 0,15 мг/мл инкубация клеток с комплексами RL2-мяоРНК приводит к снижению жизнеспособности клеток A549 на 40%. Полученный результат согласуется с результатами ранее проведенных исследований комплексов RL2 с

другими НК, где было показано, что увеличение количества RL2 в комплексах увеличивает эффективность доставки нуклеиновых кислот в клетку, и при этом доставляемые НК сохраняют свою функциональную активность.

На рисунке 40 приведены данные о цитотоксической активности комплексов LF-мяоРНК и RL2-мяоРНК, содержащих 30 нМ мяоРНК, в зависимости от зарядного соотношения. Поскольку мяоРНК является цитотоксической, её концентрация (как в составе комплексов RL2-мяоРНК, так и в свободном виде) в культуральной среде была не выше 30 нМ, что ниже, чем концентрация НК в комплексах RL2-pEGFP и RL2-siРНК. Это позволило использовать для инкубации с клетками комплексы RL2-мяоРНК с высокими зарядными соотношениями (Рис. 40).

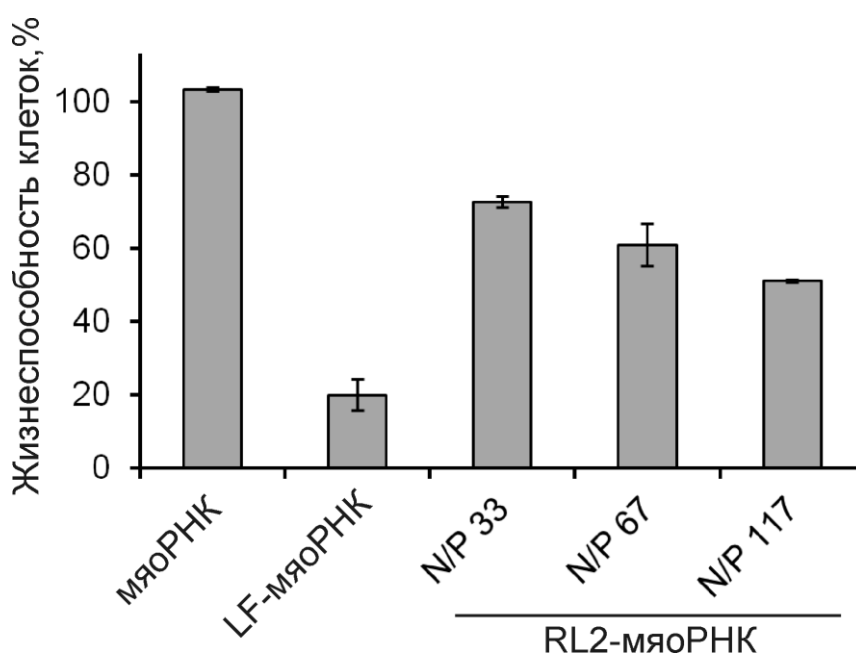


Рис. 40. Жизнеспособность клеток A549, обработанных комплексами LF-мяоРНК и RL2-мяоРНК (зарядные соотношения N/P 33, N/P 67 и N/P 117). Концентрация мяоРНК в комплексах 30 нМ.

При концентрации мяоРНК в комплексе равной 30 нМ зарядные соотношения комплексов достигали 117. Согласно данным рисунка 40, с ростом зарядного соотношения цитотоксичность комплексов RL2-мяоРНК возрастает, при этом комплексы RL2-мяоРНК даже при N/P 117 снижают жизнеспособность клеток меньше, чем комплекс LF-мяоРНК. При концентрации мяоРНК в комплексе равной 10 нМ N/P комплексов были ещё выше и достигали 328, однако и при таких значениях комплексы LF-мяоРНК обладали большей цитотоксической активностью (данные не представлены). Таким образом, RL2 менее

эффективно, чем LF доставляет цитотоксическую мяоРНК U25 в клетки даже при N/P 328. Можно предположить, что эффективность доставки коротких одноцепочечных РНК в комплексе с RL2, помимо зарядного соотношения, определяется и другими факторами, требующими дополнительного изучения.

Мы предполагаем, что низкая цитотоксическая активность комплекса RL2-мяоРНК по сравнению с LF-мяоРНК может быть обусловлена четырьмя причинами: низкой сохранностью РНК в составе комплекса с RL2 в культуральной среде, низкой эффективностью доставки в клетки, низкой эффективностью высвобождения мяоРНК из комплекса или быстрой деградацией РНК в составе комплекса в лизосомах.

Как было показано ранее на примере образования комплекса RL2 с плазмидной ДНК, с ростом зарядного соотношения стабильность комплекса RL2-pEGFP увеличивалась вследствие уменьшения количества экспонированных на поверхность комплекса фрагментов НК. При условии эффективного связывания RL2 с мяоРНК такую же зависимость стабильности комплекса от N/P можно предположить и для RL2-мяоРНК. Чтобы оценить эффективность связывания мяоРНК U25 с RL2, мы провели анализ связывания RL2 с мяоРНК методом ретардации в ПААГ (Рис. 41).

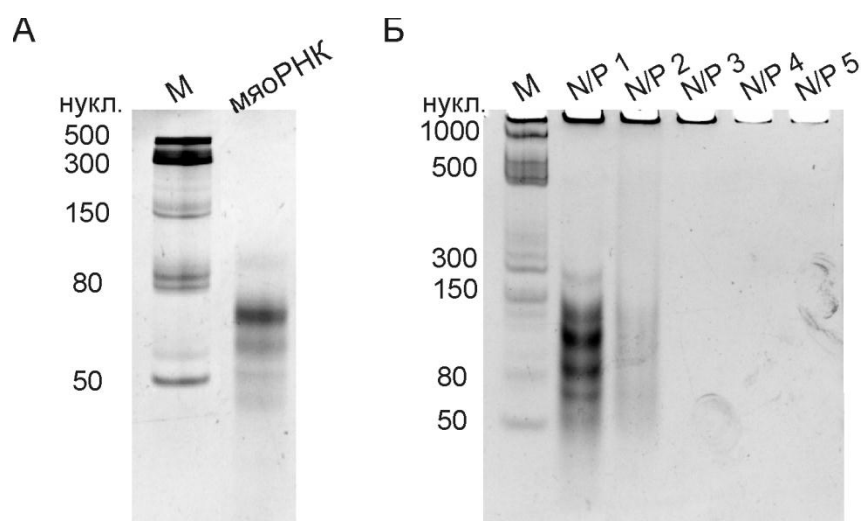


Рис. 41. Электрофоретический анализ мяоРНК в денатурирующем 11% ПААГ (А) и анализ комплексов RL2-мяоРНК в 8% неденатурирующем ПААГ (Б); М – набор РНК с известными молекулярными массами; N/P 1 – N/P 5 – комплексы RL2-мяоРНК с зарядными соотношениями от 1 до 5.

Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях выявил несколько фрагментов РНК с различной подвижностью, что говорит о том, что мяоРНК U25 представляет собой смесь полноразмерной РНК длиной 70 нуклеотидов (основная часть) и продуктов ее частичной деградации (Рис. 41 А).

Из данных рисунка 41, Б видно, что с увеличением зарядного соотношения комплексов RL2-мяоРНК уменьшается количество свободной мяоРНК, что указывает на связывание РНК с RL2. Уже при $N/P \geq 3$ происходит полное связывание рибонуклеиновой кислоты. Таким образом, эффективность связывания RL2 с мяоРНК и с рEGFP сопоставимы, то есть можно предположить, что комплексы RL2-мяоРНК при исследованных N/P (более 33) достаточно стабильны. Поэтому, вероятно, низкая цитотоксическая активность RL2-мяоРНК определяется не стабильностью комплекса в среде, а другими факторами. Полученные данные позволяют заключить, что RL2 доставляет мяоРНК в клетки менее эффективно по сравнению с LF.

Таким образом, согласно полученным в работе результатам RL2 может быть отнесен к пептидам класса CPP. Его способность обеспечивать доставку в клетки НК различной природы, длины и состава была установлена на примере доставки двуцепочечной плазмидной ДНК, двуцепочечной siРНК и синтетического аналога одноцепочечной мяоРНК. RL2 способен доставлять в клетки все перечисленные НК, однако лишь в случае siРНК доставка в комплексе с RL2 была эффективнее, чем в комплексе с коммерчески доступным реагентом Lipofectamine (LF).

Доставка нуклеиновых кислот в клетки является критически важной задачей современных биотехнологических исследований. В последние годы необходимость разработки инструментов эффективной доставки НК и их аналогов в клетки неуклонно возрастает, поскольку такие инструменты необходимы для развития генной терапии и создания новых вакцинных препаратов. Доставка в клетки функционально активных ДНК и РНК обеспечит введения новых генов в клетки, возможность регулировать активность генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, что, в свою очередь, позволит лечить генетические и онкологические заболевания, а также подавлять воспалительные процессы, предупреждать возможные инфекционные заболевания путём предварительной вакцинации [199–202]. Попытки создания мРНК вакцин предпринимались уже давно, однако толчком к стремительной разработке такого типа вакцин послужило одобрение к применению управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) двух

вакцин на основе мРНК в период пандемии Covid'19, которые представляют собой РНК, доставляемые липидными наночастицами.

Несмотря на успех разработанной технологии, доставка НК с использованием других систем, включая CPP, по-прежнему не теряет своей актуальности. [191]. Таким образом, исследованный в настоящей работе пептид RL2 может рассматриваться в качестве одного из средств доставки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

RL2 является рекомбинантным аналогом лактапина — фрагмента к-казеина молока человека, индуцирующего апоптотическую гибель опухолевых клеток человека в культуре. RL2 обогащён положительно заряженными и гидрофобными аминокислотами, а также остатками пролина. Ранее было показано, что RL2 проникает в цитоплазму как онкотрансформированных, так и здоровых клеток, индуцируя апоптотическую гибель лишь раковых клеток и не снижая жизнеспособность нормальных. Аминокислотный состав RL2 и его способность эффективно проникать в цитоплазму клеток различных типов делают его похожим на пептиды CPP, однако для отнесения RL2 к CPP этих данных было недостаточно.

В данной работе проведено исследование вторичной структуры RL2, механизма его проникновения в клетки, а также его способности доставлять в клетки различные нуклеиновые кислоты. Показано, что вторичная структура RL2 является лишь частично упорядоченной, согласно расчёту химического сдвига, каждый конкретный аминокислотный остаток входит в состав α -спирали или β -складки не более, чем в 25% молекул RL2. В гидрофобном окружении, а также в физиологическом растворе при повышении температуры в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о. образуется или стабилизируется α -спираль.

Исследование механизма проникновения RL2 в клетки человека показало, что эффективность и способ проникновения зависят от концентрации RL2, а также от наличия сыворотки в культуральной среде. В частности, при концентрации RL2 в культуральной среде 50 мкг/мл не удалось определить конкретный путь эндоцитоза, реализуемый при проникновении RL2 в клетку. Для более низкой концентрации (10 мкг/мл) показано, что в бессывороточной среде RL2 способен проникать в клетки макропиноцитозом, эндоцитозом, опосредованным липидными рафтами, а также клатринзависимым эндоцитозом, тогда как в присутствии сыворотки проникновение происходит по механизму динамин-независимого пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами. При этом, эндоцитоз является не единственным способом проникновения RL2 в опухолевые клетки.

Полученные данные об особенностях структуры RL2 и механизма его проникновения в клетки также указывают на его сходство с CPP, т.к. большинство CPP являются неупорядоченными пептидами, но способны приобретать элементы вторичной структуры при взаимодействии с клеточной мембраной, а также способны проникать в клетки как по пути эндоцитоза, так и прямым проникновением через мембрану.

Другим немаловажным свойством CPP является способность доставлять связанные с ними молекулы внутрь клеток-мишеней. Способность RL2 доставлять биологически активные молекулы в клетки человека исследовали с использованием нуклеиновых кислот различной природы, состава и размера (плазмидная ДНК, мРНК и siРНК). Установлено, что все исследованные НК эффективно проникают в клетки человека в виде комплексов с RL2, сохраняя свою функциональную активность. При этом эффективность доставки дцНК в клетки возрастает с увеличением зарядного соотношения комплексов RL2-НК.

Таким образом, по совокупности свойств рекомбинантный аналог лактапина RL2 может быть отнесен к пептидам CPP (Cell-Penetrating Peptides) и может являться средством доставки в клетки биологически активных молекул, сохраняя их функциональную активность.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что RL2 представляет собой гомодимер, стабилизированный межмолекулярными дисульфидными связями. При добавлении β -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 α -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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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 κ -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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V. et al. Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human cells // *Protein J.* – 2010. – V. 29. – № 3. – P. 174–180. – doi: 10.1007/s10930-010-9237-5.
2. Kauffman W.B., Fuselier T., He J., et al. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides // *Trends Biochem. Sci.* – 2015. – V. 40. – № 12. – P. 749–764. – doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.004.
3. Xie J., Shen Z., Anraku Y. et al. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies // *Biomaterials.* – 2019. – V. 224. – P. e119491. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119491.
4. Biswas A., Maloverjan M., Padari K. et al. Choosing an optimal solvent is crucial for obtaining cell-penetrating peptide nanoparticles with desired properties and high activity in nucleic acid delivery // *Pharmaceutics.* – 2023. – V. 15. – № 2. – P. e396. – doi: 10.3390/pharmaceutics15020396.
5. Lombardo D., Kiselev M.A., Caccamo M.T. Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine // *J. Nanomater.* – 2019. – V. 2019. – doi: 2019/3702518.
6. Pei D. How do biomolecules cross the cell membrane? // *Acc. Chem. Res.* – 2022. – V. 55. – № 3. – P. 309–318. – doi:10.1021/acs.accounts.1c00560.
7. Svirina A., Terterov I. Electrostatic effects in saturation of membrane binding of cationic cell-penetrating peptide // *Eur. Biophys. J.* – 2021. – V. 50. – P. 15–23. – doi: 10.1007/s00249-020-01476-3.
8. Rehmani S., Dixon J.E. Oral delivery of anti-diabetes therapeutics using cell penetrating and transcytosing peptide strategies // *Peptides.* – 2018. – V. 100. – P. 24–35. – doi: 10.1016/j.peptides.2017.12.014.
9. Sánchez-Navarro M., Teixidó M., Giralt E. Jumping hurdles: peptides able to overcome biological barriers // *Acc. Chem. Res.* – 2017. – V. 50. – № 8. – P. 1847–1854. – doi: 10.1021/7b00204.
10. Kerkis I., Hayashi M.F., Silva A.B. et al. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake // *Biomed Res. Int.* – 2014. – V. 2014. – doi: 10.1155/2014/675985.
11. Wang S., Li C., Qian M., et al. Glioma targeted delivery systems // *Brain Targeted Drug Delivery System.* – 2019. – P. 289–320.

12. Khan M.M., Filipczak N., Torchilin V.P. Cell penetrating peptides: a versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer // *J. Control. Release.* – 2021. – V. 330. – P. 1220–1228. – doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.028.
13. Kardani K., Bolhassani A. Cppsite 2.0: an available database of experimentally validated cell-penetrating peptides predicting their secondary and tertiary structures // *J. Mol. Biol.* – 2021. – V. 433. – № 11. – P. e166703. – doi: 10.1016/j.jmb.2020.11.002.
14. Sajid M.I., Moazzam M., Stueber R. et al. Applications of amphipathic and cationic cyclic cell-penetrating peptides: Significant therapeutic delivery tool // *Peptides.* – 2021. – V. 141. – P. e170542. – doi: 10.1016/j.peptides.2021.170542.
15. Frankel A.D., Pabo C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus // *Cell.* – 1988. – V. 55. – № 6. – P. 1189–1193. – doi: 10.1016/0092-8674(88)90263-2.
16. Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G. et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 14. – P. 10444–10450.
17. Green I., Christison R., Voyce C.J. et al. Protein transduction domains: are they delivering? // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2003. – V. 24. – № 5. – P. 213–215. – doi: 10.1016/S0165-6147(03)00076-2.
18. Takeuchi T., Futaki S. Current understanding of direct translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides and its internalization mechanisms // *Chem. Pharm. Bull.* – 2016. – V. 64. – № 10. – P. 1431–1437. – doi: 10.1248/cpb.c16-00505.
19. Futaki S., Nakase I., Takeuchi T. et al. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – V. 35. – № 4. – P. 784–787. – doi: 10.1042/BST0350784.
20. Watkins C.L., Schmaljohann D., Futaki S. et al. Low concentration thresholds of plasma membranes for rapid energy-independent translocation of a cell-penetrating peptide // *Biochem. J.* – 2009. – V. 420. – № 2. – P. 179–189. – doi:10.1042/BJ20090042.
21. Fawell S. Seery J., Daikh Y. et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – V. 91. – № 2. – P. 664–668. – doi: 10.1073/pnas.91.2.664.
22. Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akban A. et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse // *Science.* – 1999. – V. 285. – № 5433. – P. 1569–1572. – doi: 10.1126/science.285.5433.1569.

23. Zhang Y., Pardridge W.M. Delivery of β -galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – V. 313. – № 3. – P. 1075–1081. – doi: 10.1124/jpet.104.082974.
24. Pardridge W.M. A historical review of brain drug delivery // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 14. – № 6. – P. e1283. – doi: 10.3390/pharmaceutics14061283.
25. Pan Z.Z., Wang H.Y., Zhang M. et al. Nuclear-targeting TAT-PEG-ASP 8-doxorubicin polymeric nanoassembly to overcome drug-resistant colon cancer // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2016. – V. 37. – № 8. – P. 1110–1120. – doi: 10.1038/aps.2016.48.
26. Song Q., Chuan X., Chen B. et al. A smart tumor targeting peptide–drug conjugate, pHLIP-SS-DOX: synthesis and cellular uptake on MCF-7 and MCF-7/Adr cells // *Drug Deliv.* – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 1734–1746. – doi: 10.3109/10717544.2015.1028601.
27. Szabó I., Orbán E., Schlosser G. et al. Cell-penetrating conjugates of pentaglutamylated methotrexate as potential anticancer drugs against resistant tumor cells // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – V. 115. – P. 361–368. – doi: 10.1016/j.ejmech.2016.03.034.
28. Di Pisa M., Chassaing G., Swiecicki J.M. Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: Biophysical studies using artificial membrane bilayers // *Biochemistry.* – 2015. – V. 54. – № 2. – P. 194–207. – doi: 10.1021/bi501392n.
29. Kosuge M., Takeuchi T., Nakase I. et al. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – V. 19. – № 3. – P. 656–664. – doi: 10.1021/bc700289w.
30. Illien F., Rodriguez N., Amoura M. et al. Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: Optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification // *Sci. Rep. Nature* – 2016. – V. 6. – P. e36938. – doi: 10.1038/srep36938.
31. Medina S.H., Miller S.E., Keim A.I. et al. An intrinsically disordered peptide facilitates non-endosomal cell entry // *Angew. Chemie.* – 2016. – V. 55. – № 10. – P. 3369–3372. – doi: 10.1002/anie.201510518.
32. Erazo-Oliveras A., Najjar K., Truong D. et al. The Late Endosome and Its Lipid BMP Act as Gateways for Efficient Cytosolic Access of the Delivery Agent dfTAT and Its Macromolecular Cargos // *Cell Chem. Biol.* – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 598–607. – doi: 10.1016/j.chembiol.2016.03.016.
33. Gao S., Simon M.J., Hue C.D. et al. An unusual cell penetrating peptide identified using a plasmid display-based functional selection platform // *ACS Chem Biol.* – 2012. – V. 6. – № 5. – P. 484–491. – doi: 10.1021/cb100423u.

34. Gao C., Mao S., Ditzel H.J. et al. A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library // *Bioorganic Med. Chem.* – 2002. – V. 10. – № 12. – P. 4057–4065.
35. Cruz J., Mihailescu M., Wiedman G. et al. A membrane-translocating peptide penetrates into bilayers without significant bilayer perturbations // *Biophys. J. Biophysical Society* – 2013. – V. 104. – № 11. – P. 2419–2428. – doi: 10.1016/j.bpj.2013.04.043.
36. Oliveira-Mendes B.R., Horta C.R., Carmo A.O. et al. CPP-Ts: a new intracellular calcium channel modulator and a promising tool for drug delivery in cancer cells // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – P. e14739. – doi:10.1038/s41598-018-33133-3.
38. Morris M.C., Deshayes S., Heitz F. et al. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics // *Biol. Cell.* – 2008. – V. 100. – № 4. – P. – 201–217. – doi: 10.1042/BC20070116.
39. Johansson H.J., El-Andaloussi S., Holm T. et al. Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein // *Mol. Ther. The American Society of Gene Therapy* – 2008. – V. 16. – № 1. – P. 115–123. – doi: 10.1038/sj.mt.6300346.
40. Xue G., Liu Z., Wang L. et al. The role of basic residues in the fragmentation process of the lysine rich cell-penetrating peptide TP10 // *J. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 50 – P. 220–227. – doi 10.1002/jms.3524.
41. Eiríksdóttir E., Konate K., Langel U. et al. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2010. – V. 1798. – № 6. – P. 1119–1128. – doi: 10.1016/j.bbamem.2010.03.005.
42. Silva S. et al. A Second Life for MAP, a Model Amphipathic Peptide // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 15. P. 1–13.
43. Oehlke J., Scheller A., Wiesner B. et al. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1998. – V. 1414. – № 1. – P. 127–139. – doi: 10.1016/s0005-2736(98)00161-8.
44. Patel S.G., Sayers E.J., He L. et al. Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green florescent protein in different cell lines // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. e 6298. – doi: 10.1038/s41598-019-42456-8.
45. Rádis-Baptista G., Kerkis A., Prieto-Silva A.R. et al. Membrane-translocating peptides and toxins: From nature to bedside // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2008. – V. 19 – № 2. – P. 211–225. – doi: 10.1590/S0103-50532008000200004.

46. Lundberg P., El-Andaloussi S., Sutlu T. et al. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides // *FASEB J.* – 2007. – V. 21. – № 11. – P. 2664–2671. – doi: 10.1096/fj.06-6502com.
47. Medina S.H., Schneider J.P. Cancer cell surface induced peptide folding allows intracellular translocation of drug // *J. Control. Release.* – 2015. – V. – 209. – P. 317–326. – doi: 10.1016/j.jconrel.2015.05.267.
48. Ullah I., Chung K., Beloor J. et al. Trileucine residues in a ligand-CPP-based siRNA delivery platform improve endosomal escape of siRNA // *J. Drug Target.* – 2017. – V. 25. – № 4. – P. 320–329. – doi: 10.1080/1061186X.2016.1258566.
49. Ezzat K., EL Andaloussi S., Zaghloul E.M. et al. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 12. – P. 5284–5298. – doi: 10.1093/nar/gkr072.
50. Löfgren K., Wahlstrom A., Lundberg P. et al. Antiprion properties of prion protein-derived cell-penetrating peptides // *FASEB J.* – 2008. – V. 22. – № 7. – P. 2177–2184. – doi: 10.1096/fj.07-099549.
51. Del’Guidice T., Lepetit-Stoffaes J.P., Bordeleau L.J. et al. Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – № 4. – P. e0195558. – doi: 10.1371/journal.pone.0195558.
52. Guidotti G., Brambilla L., Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2017. – V. 38. – № 4. – P. 406–424. – doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003.
53. Gronewold A., Horn M., Neundorf I. Design and biological characterization of novel cell-penetrating peptides preferentially targeting cell nuclei and subnuclear regions // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2018. – V. 14. – P. 1378–1388. – doi:10.3762/bjoc.14.116.
54. Horn M., Neundorf I. Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. –P. e16279. – doi:10.1038/s41598-018-34684-1.
55. Kang Y.C., Son M., Kang S. et al. Cell-penetrating artificial mitochondria-targeting peptide-conjugated metallothionein 1A alleviates mitochondrial damage in Parkinson’s disease models // *Exp. Mol. Med.* – 2018. – V. 50. – № 105. –P. 1–13. – doi: 10.1038/s12276-018-0124-z.
56. Kalafatovic D., Giralt E. Cell-penetrating peptides: design strategies beyond primary structure and amphipathicity // *Molecules.* – 2017. – V. 22. – № 11. – P. e1929 – doi: 10.3390/molecules22111929.

57. Ryser, Hugues J.-P. Hancock R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture // *Science*. – 1965. – V. 150. – № 3695. – P. 501–503. – doi: 10.1126/science.150.3695.501.
58. Åmand H.L., Fant K., Nordén B. et al. Stimulated endocytosis in penetratin uptake: Effect of arginine and lysine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 371. – № 4. – P. 621–625.
59. Hao M., Zhang L., Chen P. Membrane internalization mechanisms and design strategies of arginine-rich cell-penetrating peptides // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – № 16. – P. e9038. – doi: 10.3390/ijms23169038.
- Academic
60. Vazdar M., Heyda J., Mason P.E. et al. Arginine “magic”: guanidinium like-charge ion pairing from aqueous salts to cell penetrating peptides // *Acc. Chem. Res.* – 2018. – V. 51. – № 6. – P. 1455–1464.
61. Saar K., Lindgren M., Hansen M. et al. Cell-penetrating peptides: A comparative membrane toxicity study // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 345. – № 1. – P. 55–65. – doi: 10.1016/j.ab.2005.07.033.
62. Moulay G., Leborgne C., Mason A.J. et al. Histidine-rich designer peptides of the LAH4 family promote cell delivery of a multitude of cargo // *J. Pept. Sci.* – 2017. – V. 23. – № 4. – P. 320–328. – doi: 10.1002/psc.2955.
63. Lee H.J., Huanget Y.W., Chiou S.H. al. Polyhistidine facilitates direct membrane translocation of cell-penetrating peptides into cells // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. e 9398. – doi: 10.1038/s41598-019-45830-8.
64. Salonen L.M., Ellermann M., Diederich F. Aromatic rings in chemical and biological recognition: Energetics and structures // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2011. – V. 50. – № 21. – P. 4808–4842. – doi: 10.1002/anie.201007560.
65. Bechara C., Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? // *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies* – 2013. – V. 587. – № 12. – P. 1693–1702. – doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.031.
66. Lönn P., Kacsinta A.D., Cui X.S. et al. Enhancing endosomal escape for intracellular delivery of macromolecular biologic therapeutics // *Sci. Rep. Nature.* – 2016. – V. 6. – P. e32301. – doi: 10.1038/srep32301.
67. McErlean E.M., McCrudden C.M., McBride J.W. et al. Rational design and characterisation of an amphipathic cell penetrating peptide for non-viral gene delivery // *Int. J. Pharm.* – 2021. – V. 596. – P. e120223. – doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120223.

68. Bhunia D., Mondal P., Das G. et al. Spatial position regulates power of tryptophan: Discovery of a major-groove-specific nuclear-localizing, cell-penetrating tetrapeptide // *J. Am. Chem. Soc.* – 2018. – V. 140 – № 5. – P. 1697–1714. – doi: 10.1021/jacs.7b10254.
69. Moghal M.R., Islam Z., Hossain F. et al. Role of membrane potential on entry of cell-penetrating peptide Transportan 10 into single vesicles // *Biophys. J. Biophysical Society* – 2019. – V. 118. – № 1. – P. 57–69. – doi: 10.1016/j.bpj.2019.11.012.
70. Borrelli A., Tornesello A.L., Tornesello M.L. et al. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – № 2. – P. e295. – doi: 10.3390/molecules23020295.
71. Morris M.C., Depollier J., Mery J. et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. – 2001. – V. 19. – № 12. – P. 1173–1176. – doi: 10.1038/nbt1201-1173.
72. Nicastro G., Franzoni L., Chiara C. et al. Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – № 9. – P. 1969–1979. – doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03563.x.
73. Zhang A., Guo Y. High stability of the polyproline II helix in polypeptide bottlebrushes // *Chem. - A Eur. J.* – 2008. – V. 14. – № 29. – P. 8939–8946. – doi: 10.1002/chem.200801191.
74. Adzhubei A.A., Sternberg M.J.E., Makarov A.A. Polyproline-II helix in proteins: Structure and function // *J. Mol. Biol.* – 2013. – V. 425. – № 12. – P. 2100–2132. – doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.018.
75. Lanni C., Masi M., Racchi M. et al. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways // *Mol. Psychiatry.* – 2021. – V. 26. – № 1. – P. 280–295. – doi: 10.1038/s41380-020-0760-2.
76. Schütz M., Thomas M., Wangen C. et al. The peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 interacts with three early regulatory proteins of human cytomegalovirus // *Virus Res.* – 2020. – V. 285. – P. e198023. – doi: 10.1016/j.virusres.2020.198023.
77. Wang L., Zhou Y., Chen D. et al. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 and Alzheimer's disease // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – P. e355. – doi: 10.3389/fcell.2020.00355.
78. Pujals S., Giralt E. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – V. 60. – № 4. – P. 473–484. – doi: 10.1016/j.addr.2007.09.012.
79. Derossi D., Calvet S., Trembleau A. et al. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent // *J. Biol. Chem.* 1996. – V. 271. – № 30. – P. 18188–18193. – doi: 10.1074/jbc.271.30.18188.

80. Komin A., Bogorad M.I., Lin R. et al. A peptide for transcellular cargo delivery: structure-function relationship and mechanism of action // *J. Control. Release.* – 2020. – V. 324. – P. 633–643. – doi: 10.1016/j.jconrel.2020.05.030
81. Konate K., Josse E., Tasic M. et al. WRAP-based nanoparticles for siRNA delivery: a SAR study and a comparison with lipid-based transfection reagents // *J. Nanobiotechnology. BioMed Central.* – 2021. – V. 19. – № 1. – P. e236. – doi: 10.1186/s12951-021-00972-8.
82. Stewart K.M., Horton K.L., Kelley S.O. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine // *Org. Biomol. Chem.* – 2008. – V. 6. – № 13. – P. 2242–2255. – doi: 10.1039/b719950c.
83. Yao C., Kang Z., Yu B. et al. All-factor analysis and correlations on the transmembrane process for arginine-rich cell-penetrating peptides // *Langmuir.* – 2019. – V. 35. – № 28. – P. 9286–9296. – doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01169.
84. Hayashi M.A.F., Nascimento F.D., Kerkis A. et al. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization // *Toxicol.* – 2008. – V. 52. – № 3. – P. 508–517. – doi: 10.1016/j.toxicol.2008.06.029.
85. Zahid M., Phillips B.E., Albers S.M. et al. Identification of a cardiac specific protein transduction domain by in Vivo biopanning using a M13 phage peptide display library in mice // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – № 8. – P.e12252. – doi: 10.1371/journal.pone.0012252.
86. Åmand H.L., Rydberg H.A., Fornander L.H. et al. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2012. – V. 1818. – № 11. – P. 2669–2678. – doi: 10.1016/j.bbamem.2012.06.006.
87. Takechi-Haraya Y., Aki K., Tohyama Y. et al. Glycosaminoglycan binding and non-endocytic membrane translocation of cell-permeable octaarginine monitored by real-time in-cell NMR spectroscopy // *Pharmaceuticals.* – 2017. – V. 10. – № 2. – P. e42. – doi: 10.3390/ph10020042.
88. Kawaguchi Y., Takeuch T., Kuwata K. et al. Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides // *Bioconjug. Chem.* – 2016. – V. 27. – № 4. – P. 1119–1130. – doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00082.
89. Chen L., Zhang Q., Yuan X. et al. How charge distribution influences the function of membrane-active peptides: Lytic or cell-penetrating? // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2017. – V. 83. – P. 71–75. – doi: 10.1016/j.biocel.2016.12.011.
90. LeCher J.C., Nowak S.J., McMurry J.L. Breaking in and busting out: Cell-penetrating peptides and the endosomal escape problem // *Biomol. Concepts.* – 2017. – V. 8. – № 3–4. – P. 131–141. – doi: 10.1515/bmc-2017-0023.

91. Tu Y., Zhao L., Billadeau D.D. et al. Endosome-to-tgn trafficking: organelle-vesicle and organelle-organelle interactions // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – P. e163. – doi: 10.3389/fcell.2020.00163.
92. Duchardt F., a Fotin-Mleczek M., Schwarz H. et al. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides // *Traffic.* – 2007. – V. 8. – № 7. – P. 848–866. – doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00572.x.
93. Santiwarangkool S., Akita H., Nakatani T. et al. PEGylation of the GALA Peptide Enhances the Lung-Targeting Activity of Nanocarriers That Contain Encapsulated siRNA // *J. Pharm. Sci.* – 2017. – V. 106 – № 9. – P. 2420–2427. – doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.075.
94. Jonker C.T., Heus C., Faber L. et al. An adapted protocol to overcome endosomal damage caused by polyethylenimine (PEI) mediated transfections. // *Matters.* – 2017. – P. 1–8 – doi: 10.19185/matters.201711000012.
95. Khaikhah N., Namvar A., Bolhassani A. Application of cell penetrating peptides as a promising drug carrier to combat viral infections // *Mol. Biotechnol.* – 2023. – V. 31. – P. e0123456789. – doi: 10.1007/s12033-023-00679-1.
96. Lo S.L., Wang S. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection // *Biomaterials.* – 2008. – V. 29. – № 15. – P. 2408–2414. – doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.031.
97. Iwasaki T., Tokuda Y., Kotake A. et al. Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides // *J. Control. Release.* – 2015. – V. 210. – P. 115–124. – doi: 10.1016/j.jconrel.2015.05.268.
98. Xie J., Bi Y., Zhang H. et al. Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: from preclinical research to clinical application // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11. – P. 697. – doi: 10.3389/fphar.2020.00697.
99. Batenburg A.M., Bougis P.E., Rochat H. et al. Penetration of a cardiotoxin into cardiolipin model membranes and its implications on lipid organization // *Biochemistry.* 1985. – V. 24. – № 25. – P. 7101–7110. – doi: 10.1021/bi00346a013.
100. Berlose J.P., Convert O., Derossi D. et al. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments // *Eur. J. Biochem.* 1996. – V. 242. – № 2. – P. 372–386. – doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0372r.x.
101. Herce H.D., Garcia A.E., Litt J. et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides // *Biophys. J.* – 2009. – V. 97. – № 7. – P. 1917–1925. – doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.066.

102. Almeida P.F., Pokorny A. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics // *Bone*. – 2009. – V. 48. – № 34. – P. 8083–8093. – doi:10.1021/bi900914g.
103. Palm-Apergi C., Lorents A., Padari K. et al. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 1. – P. 214–223. – doi: 10.1096/fj.08-110254.
104. Trabulo S., Cardoso A.L., Mano M. et al. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems // *Pharmaceuticals*. – 2010. – V. 3. – № 4. – P. 961–993. – doi: 10.3390/ph3040961.
105. Verdurmen W.P.R., Thanos M., Ruttekolk I.R. et al. Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: Implications for uptake // *J. Control. Release*. – 2010. – V. 147. – № 2. – P. 171–179. – doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.030.
106. Mukundan V., Maksoudian C., Vogel M.C. et al. Cytotoxicity of prion protein-derived cell-penetrating peptides is modulated by pH but independent of amyloid formation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2017. – V. 613. – P. 31–42. – doi: 10.1016/j.abb.2016.11.001.
107. Rádis-Baptista G. Cell-penetrating peptides derived from animal venoms and toxins // *Toxins*. – 2021. – V. 13. – № 2. – P. e147. – doi: 10.3390/toxins13020147.
108. Gonçalves R., Vargas L.S., Lara M.V.S. et al. Intrahippocampal infusion of crostamine isolated from *Crotalus durissus terrificus* alters plasma and brain biochemical parameters // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2014. – V. 11. – P. 11438–11449. – doi: 10.3390/ijerph111111438.
109. Vedadghavami A., Zhang C., Bajpayee A. Overcoming negatively charged tissue barriers: drug delivery using cationic peptides and proteins // *Physiol. Behav.* – 2020. – V. 176. – № 3. – P. 139–148. – doi: 10.1016/j.nantod.2020.100898.
110. Chellaiah M.A., Soga N., Swanson S. et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – № 16. – P. 11993–12002. – doi: 10.1074/jbc.275.16.11993.
111. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y. et al. Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – V. 153. – № 6. – P. 1143–1152. – doi: 10.1038/sj.bjp.0707678.
112. Grau M., Walker P.R., Derouazi M. Mechanistic insights into the efficacy of cell penetrating peptide-based cancer vaccines // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. – V. 75. – № 16. – P. 2887–2896. – doi: 10.1007/s00018-018-2785-0.

113. Zhang J.F., Xiong H.L., Cao J.L. et al. A cell-penetrating whole molecule antibody targeting intracellular HBx suppresses hepatitis B virus via TRIM21-dependent pathway // *Theranostics*. – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 549–562. – doi: 10.7150/thno.20047.
114. Jafari S., Dizaj S.M., Adibkia K. Cell-penetrating peptides and their analogues as novel nanocarriers for drug delivery // *BioImpacts*. – 2015. – V. 5. – № 2. – P. 103–111. – doi: 10.15171/bi.2015.10.
115. Yang J., Luo Y., Shibu M.A. et al. Cell-penetrating Peptides: Efficient Vectors for Vaccine Delivery // *Curr. Drug Deliv.* – 2019. – V. 16. – № 5. – P. 430–443. – doi: 10.2174/1567201816666190123120915.
116. Rádis-Baptista G., Campelo I.S., Morlighem J.E. et al. Cell-penetrating peptides (CPPs): From delivery of nucleic acids and antigens to transduction of engineered nucleases for application in transgenesis // *J. Biotechnol.* – 2017. – V. 252. – P. 15–26. – doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.002.
117. Bae H.D., Lee J., Jin X.H., et al. Potential of translationally controlled tumor protein-derived protein transduction domains as antigen carriers for nasal vaccine delivery // *Mol. Pharm.* – 2016. – V. 13 – № 9. – P. 3196–3205. – doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00408.
118. Belnoue E., Berardino-Besson W., Gaertner H. et al. Enhancing antitumor immune responses by optimized combinations of cell-penetrating peptide-based vaccines and adjuvants // *Mol. Ther. American Society of Gene & Cell Therapy* – 2016. – V. 24 – № 9. – P. 1675–1685. – doi: 10.1038/mt.2016.134.
119. Mohammadi M., Dehghani P., Mohseninia A. et al. Incorporation of the Tat cell-penetrating peptide into nanofibers improves the respective antitumor immune response // *J. Cell. Physiol.* – 2021. – V. 236. – № 2. – P. 1401–1417. – doi: 10.1002/jcp.29946.
120. Sadeghian I., Heidari R., Sadeghian S. et al. Potential of cell-penetrating peptides (CPPs) in delivery of antiviral therapeutics and vaccines // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2022. – V. – 169. – P. e106094. – doi: 10.1016/j.ejps.2021.106094.
121. Yokoo H., Oba M., Uchida S. Cell-penetrating peptides: emerging tools for mRNA delivery // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 14. – № 1. – P. e78. – doi: 10.3390/pharmaceutics14010078.
122. Kardani K., Bolhassani A., Agi E. et al. B1 protein: a novel cell penetrating protein for in vitro and in vivo delivery of HIV-1 multi-epitope DNA constructs // *Biotechnol. Lett.* – 2020. – V. 42. – № 10. – P. 1847–1863. – doi: 10.1007/s10529-020-02918-w.
123. Alizadeh S., Irani S., Bolhassani A. et al. Simultaneous use of natural adjuvants and cell penetrating peptides improves HCV NS3 antigen-specific immune responses // *Immunol. Lett.* – 2019. – V. 212. – P. 70–80. – doi: 10.1016/j.imlet.2019.06.011.

124. Järver P., Mäger I., Langel Ü. In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2010. – V. 31. – № 11. – P. 528–535. – doi: 10.1016/j.tips.2010.07.006.
125. Oba M., Ito Y., Umeno T. et al. Plasmid DNA delivery using cell-penetrating peptide foldamers composed of Arg-Arg-Aib repeating sequences // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2019. – V. 5. – № 11. – P. 5660–5668. – doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01451.
126. Habault J., Poyet J.L. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies // *Molecules.* – 2019. – V. 24. – № 11. – P. e927. – doi: 10.3390/molecules24050927.
127. Zahid M., Robbins P.D. Cell-type specific penetrating peptides: therapeutic promises and challenges // *Molecules.* – 2015. – V. 20. – № 7. – P. 13055–13070. – doi: 10.3390/molecules200713055.
128. Gan L., Wu L., Wood J.A. et al. A cell-penetrating peptide enhances delivery and efficacy of phosphorodiamidate morpholino oligomers in mdx mice // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2022. – V. 30. – P. 17–27. – doi: 10.1016/j.omtn.2022.08.019.
129. Klein A.F., Varela M.A., Arandel L. et al. Peptide-conjugated oligonucleotides evoke long-lasting myotonic dystrophy correction in patient-derived cells and mice // *J. Clin. Invest.* – 2019. – V. 129. – № 11. – P. 4739–4744. – doi: 10.1172/JCI128205.
130. De Serres-Bérard T., Benichou S.A., Jauvin D. et al. Recent progress and challenges in the development of antisense therapies for myotonic dystrophy type 1 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – № 21. – P. e13359. – doi: 10.3390/ijms232113359.
131. Wu H., Zhang K., Zhang Z. et al. Cell-penetrating peptide: A powerful delivery tool for DNA-free crop genome editing // *Plant Sci.* – 2022. – V. 324. – P. 111436. – doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111436.
132. Díaz-Perlas C., Sanchez- Navarro M., Oller-Salvia B. et al. Phage display as a tool to discover blood–brain barrier (BBB)-shuttle peptides: panning against a human BBB cellular model // *Biopolymers.* – 2017. – V. 108. – № 1. – P. e22928. – doi: 10.1002/bip.22928.
133. Tang B., Zaro J.L., Shen Y. et al. Acid-sensitive hybrid polymeric micelles containing a reversibly activatable cell-penetrating peptide for tumor-specific cytoplasm targeting // *J. Control. Release.* – 2018. – V. 279. – P. 147–156. – doi: 10.1016/j.jconrel.2018.04.016.
134. Fu H., Shi K., H G. et al. Tumor-targeted paclitaxel delivery and enhanced penetration using TAT-decorated liposomes comprising redox-responsive poly(ethylene glycol) // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 104. – № 3. – P. 1160–1173. – doi: 10.1002/jps.24291.
135. Wang F., Wang Y., Zhang X. et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery // *J. Control. Release.* – 2014. – V. 174. – P. 126–136. – doi: 10.1016/j.jconrel.2013.11.020.

136. Weinstein R., Savariar E.N., Felsen C.N. et al. In vivo targeting of hydrogen peroxide by activatable cell-penetrating peptides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 3. – P. 874–877. – doi: 10.1021/ja411547j.
137. Bian J., Popovic Z.B., Benezam C. et al. Effect of cell-based intercellular delivery of transcription factor GATA4 on ischemic cardiomyopathy // *Circ. Res.* – 2007. – V. 100 – № 11. – P. 1626–1633. – doi: 10.1161/01.res.0000269778.75877.68.
138. Inoue G., Toyohara D., Mori T. et al. Critical side chain effects of cell-penetrating peptides for transporting oligo peptide nucleic acids in bacteria // *ACS Appl. Bio Mater.* – 2021. – V. 4. – P. 3462–3468. – doi: 10.1021/acsabm.1c00023.
139. Barkowsky G., Abt C., Pöhner I. et al. Antimicrobial activity of peptide-coupled antisense peptide nucleic acids in *Streptococcus pneumoniae* // *Microbiol. Spectr.* American Society for Microbiology. – 2022. – V. 10. – № 6. – P. 1–14. – doi: 10.1128/spectrum.00497-22.
140. Barkowsky G., Lemster A.L., Pappesch R. et al. Influence of different cell-penetrating peptides on the antimicrobial efficiency of PNAs in *Streptococcus pyogenes* // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2019. – V. 18.– P. 444–454. – doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.010.
141. da Silva K.E., Ribeiro S.M., Rossato L. et al. Antisense peptide nucleic acid inhibits the growth of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain // *Res. Microbiol. Institut Pasteur.* – 2021. – V. 172. – № 4–5. – P. e103837. – doi: 10.1016/j.resmic.2021.103837.
142. Yokoi Y., Kawabuchi Y., Zulmajdi A.A. et al. Cell-penetrating peptide–peptide nucleic acid conjugates as a tool for protein functional elucidation in the native bacterium // *Molecules.* – 2022. – V. 27. – № 24. – P. e 8944 – doi: 10.3390/ molecules27248944.
143. Cerrato C.P., Künnapuu K., Langel Ü. Cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2017. – V. 14. – № 2. – P. 245–255. – doi: 10.1080/17425247.2016.1213237.
144. Marchel M., Madej-Pilarczyk A., Tyminska A. et al. Echocardiographic features of cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy // *Cardiol. Res. Pract.* – 2021. – V. 2021. – P.8812044 doi: 10.1155/2021/8812044.
145. Ramirez-Martinez A., Zhang Y., Chen K. et al. The nuclear envelope protein Net39 is essential for muscle nuclear integrity and chromatin organization // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – P. e690. – doi: 10.1038/s41467-021-20987-x.
146. Zolochovska O., Xia X., Williams J. et al. Sonoporation delivery of interleukin-27 gene therapy efficiently reduces prostate tumor cell growth in vivo // *Hum. Gene Ther.* – 2011. – V. 22. – № 12. – P. 1537–1550. – doi: 10.1089/hum.2011.076.

147. Zhang W., Feng C., Jiang H. Novel target for treating Alzheimer's Diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy // *Ageing Res. Rev.* – 2021. – V. 65. – № 77. – P. e101207. – doi: 10.1016/j.arr.2020.101207.
148. Klimpel A., Neundorff I. Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria // *J. Control. Release.* – 2018. – V. 291. – P. 147–156. – doi: 10.1016/j.jconrel.2018.10.029.
149. De Figueiredo I.R., Freire J.M., Flores L. et al. Cell-penetrating peptides: a tool for effective delivery in gene-targeted therapies // *IUBMB Life.* – 2014. – V. 66. – № 3. – P. 182–194. – doi: 10.1002/iub.1257.
150. Cerrato C.P., Pirisinu M., Vlachos, E.N. et al. Novel cell-penetrating peptide targeting mitochondria // *FASEB J.* – 2015. – V. 29. – № 11. – P. 4589–4599. – doi: 10.1096/fj.14-269225.
151. Law B., Quinti L., Choi Y. et al. A mitochondrial targeted fusion peptide exhibits remarkable cytotoxicity // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – V. 5. – № 8. – P. 1944–1949. – doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0509.
152. Bonam S.R., Wang F., Muller S. Lysosomes as a therapeutic target // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2019. – V. 18. – P. 923–948. – doi: 10.1038/s41573-019-0036-1.
153. Sakhrani N.M., Padh H. Organelle targeting: third level of drug targeting // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2013. – V. 7. – P. 585–599. – doi: 10.2147/dddt.S45614.
154. Solomon M., Muro S. Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2017. – V. 118. – P. 109–134. – doi:10.1016/j.addr.2017.05.004.
155. Manthe R.L., Rappaport J.A., Long Y. et al. δ -Tocopherol Effect on endocytosis and its combination with enzyme replacement therapy for lysosomal disorders: A New Type of Drug Interaction? // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2019. – V. 370. – № 3. – P. 823–833. – doi: 10.1124/jpet.119.257345.
156. Staecker H., Jokovic G., Karpishchenko S. et al. Efficacy and safety of AM-111 in the treatment of acute unilateral sudden deafness—A double-blind, randomized, placebo-controlled phase 3 study // *Otol. Neurotol.* – 2019. – V. 40. – № 5. – P. 584–594. – doi: 10.1097/mao.00000000000022294.
157. Chiquet C., Aptel F., Creuzot-Garcher C. et al. Postoperative ocular inflammation: a single subconjunctival injection of XG-102 compared to dexamethasone drops in a randomized trial // *Am. J. Ophthalmol.* – 2017. – V. 174. – P. 76–84. – doi: 10.1016/j.ajo.2016.10.012.

158. Некипелая В.В., Семёнов Д.В., Потапенко М.О. и др. Лактаптин - белок человеческого молока, индуцирующий апоптоз клеток аденокарциномы MCF-7 // Доклады Академии Наук. – 2008. – Т. 419. – № 2. – С. 268–271.
159. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S. et al. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e93921. – doi: 10.1371/journal.pone.0093921.
160. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А. и др. Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – №7. – С. 764-769. – doi: 10.18699/VJ17.292.
161. Фомин А.С., Семёнов Д.В., Кулигина Е.В. и др. Генно-инженерные аналоги потенциального противоопухолевого пептида лактаптина // Вестник НГУ. – 2010. – Т. 8. – № 1. – С. 17–25.
162. Stepanov G., Zhuravlev E., Shender V. et al. Nucleotide modifications decrease innate immune response induced by synthetic analogs of snRNAs and snoRNAs // Genes. – 2018. – V. 9. – № 11. – P. e531. – doi: 10.3390/genes9110531.
163. Kurrikoff K., Vunk B., Langel Ü. Status update in the use of cell-penetrating peptides for the delivery of macromolecular therapeutics // Expert Opin. Biol. Ther. – 2021. – V. 21. – № 3. – P. 361–370. – doi: 10.1080/14712598.2021.1823368.
164. Власов В.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В., и др. Пептид, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам человека // Патент РФ № 2317304. (20.02.2008).
165. Marsh J.A., Singh V.K., Jia Z. et al. Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between α - and γ -synuclein: Implications for fibrillation // Protein Sci. – 2006. – V. 15. – № 12. – P. 2795–2804. – doi: 10.1110/ps.062465306.
166. Chinak O.A. et al. Structural and aggregation features of a human κ -Casein fragment with antitumor and cell-penetrating properties // Molecules. – 2019. – V. – 24. – № 16. – P. e2919. – doi:10.3390/molecules24162919.
167. Gelli R., Ridi F., Baglioni P. The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body // Adv. Colloid Interface Sci. – 2019. – V. 269. – P. 219–235. – doi: 10.1016/j.cis.2019.04.011.
168. Carver J.A., Ecroyd H., Truscott R.W. et al. Proteostasis and the regulation of intra- and extracellular protein aggregation by ATP-independent molecular chaperones: lens α -Crystallins and milk caseins // Acc. Chem. Res. – 2018. – V. 51. – № 3. – P. 745–752. – doi: 10.1021/acs.accounts.7b00250.

169. Zanetti-Ramos B.G., Fritzen-Garcia M.B., Creczynski-Pasa T.B. et al. Characterization of polymeric particles with electron microscopy, dynamic light scattering, and atomic force microscopy // *Part. Sci. Technol.* – 2010. – V. 28. – № 5. – P. 472–484. – doi: 10.1080/02726351.2010.504133.
170. Kilsdonk E.C., Yancey P.G., Stoudt G.W. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins // *J. Biol. Chem.* 1995. – V. 270. – № 29. – P. 17250–17256. – doi: 10.1074/jbc.270.29.17250.
171. Pike L.J., Miller J.M. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover // *J. Biol. Chem. ASBMB.* – 1998. – V. 273. – № 35. – P. 22298–22304. – doi: 10.1074/jbc.273.35.22298.
172. Lu H., Sun T.X., Bouley R. et al. Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)-independent plasma membrane accumulation of AQP2 // *Am. J. Physiol.* – 2004. – V. 286. – № 2 55-2. – P. 233–243. – doi: 10.1152/ajprenal.00179.2003.
173. Antalis C.J., Arnold T., Rasool T. et al. High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – V. 122. – № 3. – P. 661–670. – doi: 10.1007/s10549-009-0594-8.
174. Madani F., Lindberg S., Langel U. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides // *J. Biophys.* – 2011. – V. 2011. – P. e414729. – doi: 10.1155/2011/414729.
175. Macia E., Ehrlich M., Massol R. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin // *Dev. Cell.* – 2006. – V. 10. – № 6. – P. 839–850. – doi: 10.1016/j.devcel.2006.04.002.
176. Oh J.H., Chong S.E., Nam S. et al. Multimeric amphipathic α -helical sequences for rapid and efficient intracellular protein transport at nanomolar concentrations // *Adv. Sci.* – 2018. – V. 5. – № 8. – P.1800240. – doi: 10.1002/advs.201800240.
177. Richard J.P., Melikov K., Brooks H. et al. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 15. – P. 15300–15306. – doi: 10.1074/jbc.M401604200.
178. Gómez-Elías M.D., Fissore R.A., Cuasnicú P.S. et al. Compensatory endocytosis occurs after cortical granule exocytosis in mouse eggs // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – V. 235. – № 5. – P. 4351–4360. – doi: 10.1002/jcp.29311.
179. Pushpanathan M., Rajendhran J., Jayashree S. et al. Direct cell penetration of the antifungal peptide, MMGP1, in *Candida albicans* // *J. Pept. Sci.* – 2012. – V. 18. – № 11. – P. 657–660. – doi: 10.1002/psc.244560.
180. Zou Y., Guo C.G., Yang Z.G. et al. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits growth of VX2 cells and VX2 tumor model of

- hepatocellular carcinoma in rabbit by transarterial embolization-mediated siRNA delivery // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2016. – V. 10. – P. 1243–1255. – doi: 10.2147/DDDT.S94122.
181. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – V. 383. – № 27. – P. 2603–2615. – doi: 10.1056/NEJMoa2034577.
182. Fortner A., Schumacher D. First COVID-19 Vaccines receiving the us FDA and ema emergency use authorization // *Discoveries.* – 2021. – V. 9. – № 1. – P. e122. – doi: 10.15190/d.2021.1.
183. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B. et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – V. 384. – № 5. – P. 403–416. – doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
184. Zhang M.M., Bahal R., Rasmussen T.P. et al. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies // *Biochem. Pharmacol.* – 2021. – V. 189 – P. e114432. – doi: 10.1016/j.bcp.2021.114432.
185. Rathnayake P.M., Gunathunge B.M., Wimalasiri P.N. et al. Trends in the binding of cell penetrating peptides to siRNA: a molecular docking study // *J. Biophys.* – 2017. – V. 2017. – P. e1059216. – doi: 10.1155/2017/1059216.
186. Zorko M., Langel Ü. Cell-penetrating peptides: Mechanism and kinetics of cargo delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2005. – V. 57. – № 4. – P. 529–545. – doi: 10.1016/j.addr.2004.10.010.
187. Urello M., Hsu W.H., Christie R.J. Peptides as a material platform for gene delivery: Emerging concepts and converging technologies // *Acta Biomater.* – 2020. – V. 117. – P. 40–59. – doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.027.
188. Morris M.C., Vidal P., Chaloin L. et al. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* 1997. – V. 25. – № 14. – P. 2730–2736. – doi: 10.1093/nar/25.14.2730.
189. McErlean E.M., Ziminska M., McCrudden C.M. et al. Rational design and characterisation of a linear cell penetrating peptide for non-viral gene delivery // *J. Control. Release.* – 2021. – V. 330. – P. 1288–1299. – doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.037.
190. Galvan A.M., Chorba J.S. Cell-associated heparin-like molecules modulate the ability of LDL to regulate PCSK9 uptake // *J. Lipid Res.* – 2019. – V. 60. – P. 71–84. – doi: 10.1194/jlr.M087189.
191. Kim Y., Kim H., Kim E.H. et al. The Potential of cell-penetrating peptides for mrna delivery to cancer cells // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 14. – № 6. – P. e1271. – doi: 10.3390/pharmaceutics14061271.

192. Porosk L., Langel Ü. Approaches for evaluation of novel CPP-based cargo delivery systems // *Front. Pharmacol.* – 2022. – V. 13. – P. e1056467. – doi: 10.3389/fphar.2022.1056467.
193. Sajid M.I., Mandal D., El-Sayed N.S. et al. Oleyl conjugated histidine-arginine cell-penetrating peptides as promising agents for siRNA delivery // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 14. – № 4. – P. e881. – doi: 10.3390/pharmaceutics14040881.
194. Mazumdar S., Chitkara D., Mittal A. Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2021. – V. 11. – № 4. – P. 903–924. – doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.019.
195. Saaoud F., Drummer C., Shao Y. et al. Circular RNAs are a novel type of non-coding RNAs in ROS regulation, cardiovascular metabolic inflammations and cancers // *Pharmacol. Ther.* – 2021. – V. 220. – P. e107715. – doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107715.
196. Hu C., Wang S., Liu L. Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 1 alleviates the progression of epilepsy by regulating the miR-181a/BCL-2 axis in vitro // *Life Sci.* – 2021. – V. 267. – P. e118935. – doi: 10.1016/j.lfs.2020.118935.
197. Stepanov G.A., Filippova J.A., Nushtaeva A.A. et al. Artificial analogues of circulating box C/D RNAs induce strong innate immune response and microRNA activation in human adenocarcinoma cells. *Circulatin.* – 2016. – V. 924 – P. 121–125. – doi: 10.1007/978-3-319-42044-8_24.
198. Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V. et al. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents // *BMC Cancer.* *BMC Cancer* – 2018. – V. 18. –P. e728. – doi: 10.1186/s12885-018-4635-8.
199. Yang S.C., Alalaiwe A., Lin Z.C. et al. Anti-inflammatory microRNAs for treating inflammatory skin diseases // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12. – № 8. – P. e1072. – doi: 10.3390/biom12081072.
200. Diao Y., Wang G., Zhu B. et al. Loading of "cocktail siRNAs" into extracellular vesicles via TAT-DRBD peptide for the treatment of castration-resistant prostate cancer // *Cancer Biol. Ther.* – 2022. – V. 23. – № 1. – P. 163–172. – doi: 10.1080/15384047.2021.2024040.
201. Bidram M., Zhao Y., Shebardina N.G. et al. mRNA-based cancer vaccines: a therapeutic strategy for the treatment of melanoma patients // *Vaccines.* – 2021. – V. 9. – № 10. – P. e1060. – doi: 10.3390/vaccines9101060.

202. Sadiq I.Z., Muhammad A., Mada S.B. et al. Biotherapeutic effect of cell-penetrating peptides against microbial agents: a review // *Tissue Barriers*. – 2022. – V. 10. – № 3. – P. ee1995285. – doi: 10.1080/21688370.2021.1995285.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

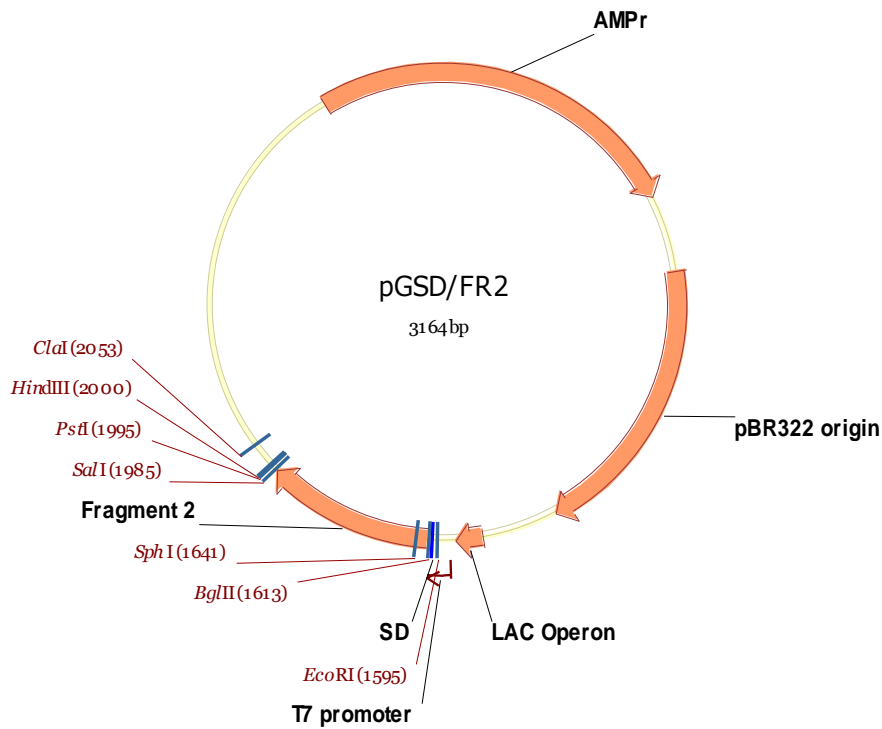


Рис. А.1. Карта рекомбинантной плазмиды pGSD/FR2, содержащей последовательность ДНК, кодирующую рекомбинантный аналог лактапина RL2.

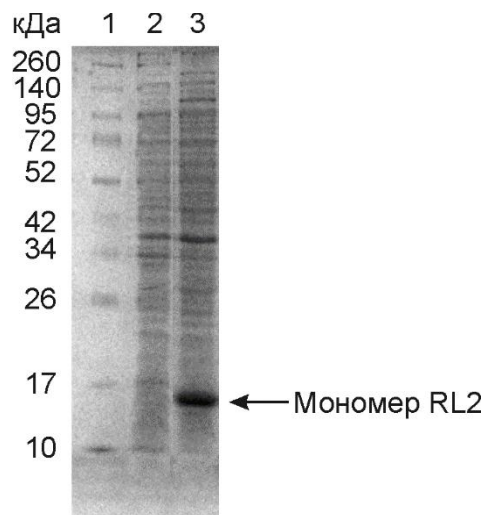


Рис. А.2. Индукция синтеза RL2 в клетках *E.coli*. 1 – набор белков с известными молекулярными массами, 2 – белки клеток-продуцентов до индукции синтеза RL2, 3 – белки клеток-продуцентов после индукции синтеза RL2. Электрофорез в 12% ПААГ.

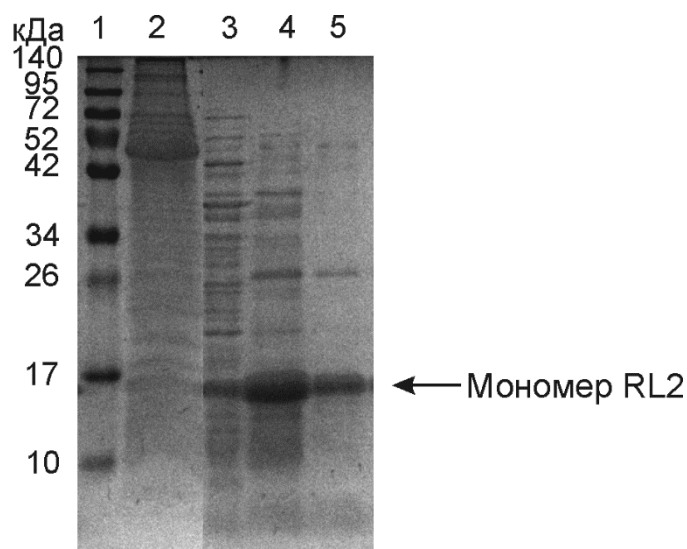


Рис. А.3. Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белков лизата клеток-продуцентов RL2 и фракций, полученных при экстракции из него RL2. 1 – набор белков с известными молекулярными массами; 2 – белки лизата клеток-продуцентов RL2; 3 – белки клеточного лизата, осажденные полиэтиленимином; 4 – белки клеточного экстракта, полученного при растворении белков клеточного лизата, осажденных полиэтиленимином, раствором 1, содержащим 50% ацетонитрила.

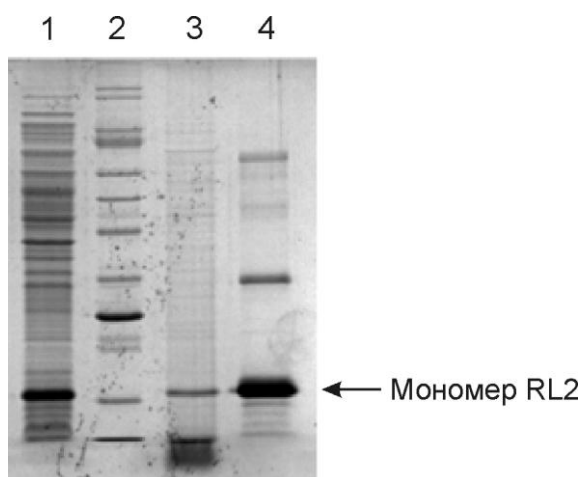


Рис. А.4. Электрофоретический анализ в 12% ПААГ белков клеточного экстракта и фракций, полученных при их разделении аффинной хроматографией на ИМАС-сефарозе. 1 – белки клеточного экстракта; 2 – белки, не связавшиеся с сорбентом и элюированные раствором 2; 3 – белки, элюированные раствором 3, содержащим 1 М хлорид натрия; 4 – белки, элюированные раствором 5, содержащим 0,3 М имидазол.

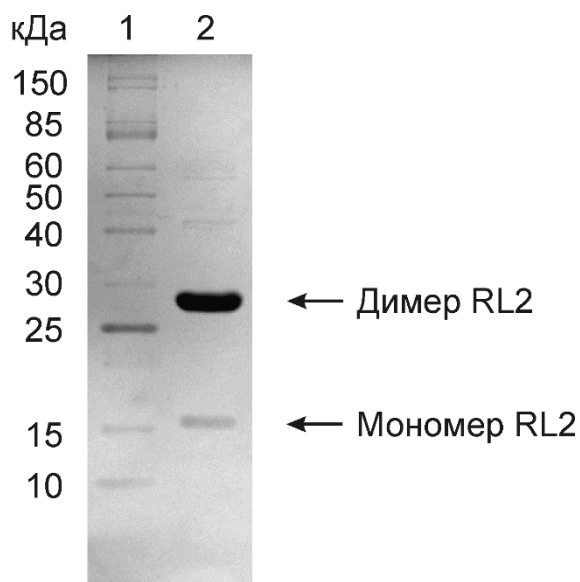


Рис. А.5. Электрофоретический анализ в 13% ПААГ белков, элюированных раствором 5 (Рис. А.4, дорожка 4) с ИМАС-сефарозы и не связавшихся с DEAE Sephadex А-25. 1 – набор белков с известными молекулярными массами; 2 – белки, не связавшиеся с сорбентом.

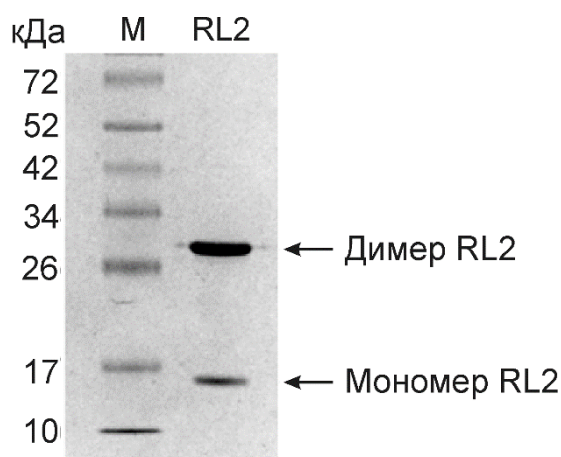


Рис. А.6. Электрофоретический анализ в 13% ПААГ в невосстанавливающих условиях пептида RL2 после очистки на SP-сефарозе. 1 – набор белков с известными молекулярными массами; 2 – RL2, элюированный раствором 8, содержащим 0,45 М хлорида натрия.