



ПРОНИКНОВЕНИЕ ПЕПТИДА ЛАКТАПИНА В РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. О. А. Чинак^{*,#}, А. С. Фомин^{*}, А. А. Нуштаева^{*}, О. А. Коваль^{*,**}, А. В. Савельева^{*},
Е. В. Кулигина^{*}, В. А. Рихтер^{*}

^{*}Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

^{**}Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск

Поступила в редакцию 31.03.2015 г. Принята к печати 15.10.2015 г.

Лактаптин – белок молока человека с молекулярной массой 8.6 кДа, являющийся фрагментом κ-казеина человека и обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам млекопитающих *in vitro*. RL2 – рекомбинантный аналог лактаптина, индуцирующий апоптоз раковых клеток человека в культуре и подавляющий рост опухоли *in vivo*. Ранее было показано, что RL2 проникает как в раковые, так и немалигнизированные клетки человека и связывается со структурами цитоскелета. При этом RL2 индуцирует апоптотическую гибель раковых клеток и не снижает жизнеспособность нормальных клеток. В работе представлены результаты исследования механизма проникновения рекомбинантного аналога лактаптина в раковые клетки человека с использованием ингибиторов различных путей эндоцитоза методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Показано, что RL2 проникает в клетки частично по пути динаминнезависимого пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами, и частично – путем прямого проникновения через плазматическую мембрану клетки. Анализ первичной структуры и механизма проникновения RL2 в клетку позволяет отнести его к пептидам класса CPP (Cell-penetrating Peptides).

Ключевые слова: лактаптин, противоопухолевые пептиды, эндоцитоз, раковые клетки, проникающие в клетку пептиды, cell-penetrating peptides.

DOI: 10.7868/S0132342316040060

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизма действия биологически активных соединений – необходимый этап при создании новых лекарственных препаратов на их основе. Ключевым звеном функционирования любого фармацевтического препарата является его взаимодействия с клетками-мишенями.

Ранее в нашей лаборатории из молока человека был выделен и идентифицирован пептид, индуцирующий апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в культуре [1, 2]. Обнаруженный пептид получил название лактаптин. Было показано, что лактаптин

является протеолитическим фрагментом каппа-казеина человека с молекулярной массой 8.6 кДа. Для исследования противоопухолевых свойств лактаптина был получен его рекомбинантный аналог RL2, также индуцирующий апоптоз клеток MCF-7 [1, 2]. Было показано, что RL2 эффективно тормозит пролиферацию раковых клеток млекопитающих *in vitro* и подавляет рост опухоли *in vivo* [3, 4].

При исследовании механизма апоптотического действия RL2 обнаружено, что он проникает в цитоплазму как раковых клеток MCF-7, так и немалигнизированных стволовых клеток жировой ткани человека MSC. RL2 связывается с белками цитоскелета α, β-цепями тубулина и α-актинин-1, участвует в регуляции экспрессии белков семейства Bcl-2 и индуцирует апоптотическую гибель раковых клеток по митохондриальному и по рецепторопосредованному пути [4, 5]. Однако механизм проникновения RL2 в клетки оставался невыясненным.

Существует два основных способа взаимодействия веществ с клетками: взаимодействие с компонентами клеточной поверхности или рецепторами

Сокращения: CPP – проникающие в клетку пептиды (Cell-penetrating Peptides); DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндолил; EIPA – этил-изопропил амилорид; FITC – флуоресцеин изотиоцианат; GFP – зеленый флуоресцентный белок; IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium; MβCD – метил-β-циклодекстрин; PE – пропидия йодид; RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium; RL2 – рекомбинантный аналог лактаптина; TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин; ПСА – персульфат аммония.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (383)363-51-89; эл. почта: china-kolga@gmail.com).

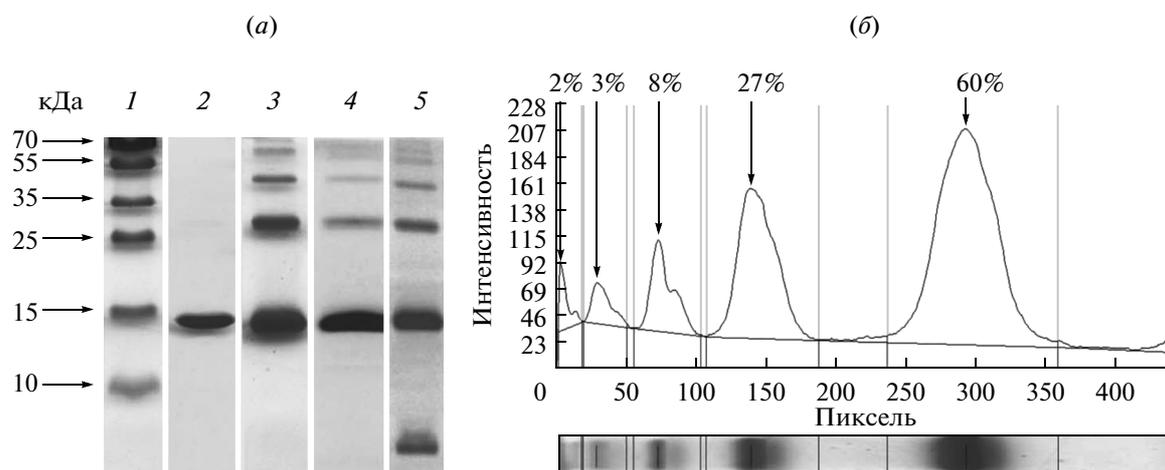


Рис. 1. Электрофоретическое разделение хроматографических фракций, содержащих RL2-Rho. (а) – Электрофореграмма RL2 и RL2-Rho в ПААГ с 0.1% SDS: маркерные белки (1), RL2 (2), белки препарата RL2-Rho, дополнительно очищенного гель-фильтрацией (3, 4), или катионообменной хроматографией на SP-сефарозе (5); дорожки 1–3 – окраска геля кумасси, 4, 5 – детекция флуоресценции белков в геле в УФ-свете; (б) – денситометрический анализ электрофореграммы RL2-Rho (дорожка 3).

на мембране, либо взаимодействие с внутренними компонентами клетки после прямого проникновения веществ через клеточную мембрану.

Известные на сегодняшний день пути проникновения белков и пептидов в клетки эукариот включают эндоцитоз, опосредованный специализированными транспортными структурами, и прямое проникновение через плазматическую мембрану клеток, обеспечиваемое свойствами самих пептидов [6–9].

Анализ влияния ингибиторов различных путей эндоцитоза на эффективность проникновения исследуемых белков или пептидов позволяет предположить механизм проникновения этих молекул в клетку [8–12].

В данной работе был проведен анализ влияния ингибиторов различных путей эндоцитоза на способность флуоресцентно-меченного рекомбинантного аналога лактапина проникать в клетки человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения механизмов проникновения белков в эукариотические клетки часто используют флуоресцентно-меченные аналоги этих белков. Методы проточной цитофлуориметрии, а также флуоресцентной и конфокальной микроскопии позволяют оценить количество проникшего в клетку флуоресцентно-меченного белка и его распределение между клеточными компартментами [10].

Получение конъюгата рекомбинантного аналога лактапина с родамином (RL2-Rho)

Конъюгат RL2 с 5(6)-карбокситетраметилродамином получали через стадию синтеза сукцинимидного эфира 5(6)-карбокситетраметилродамина по методике, описанной ранее [4] и очищали от флуоресцентного красителя методом гель-фильтрации. Дополнительную очистку проводили двумя различными способами – катионообменной хроматографией или гель-фильтрацией, после чего сравнивали эффективность этих способов очистки методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих и восстанавливающих условиях (рис. 1).

Из данных электрофореграммы видно, что белковые продукты синтеза конъюгата RL2-Rho представлены смесью веществ с электрофоретическими подвижностями, соответствующими молекулярным массам 14 (мономер RL2), 28 (димер RL2), 42 кДа (тример RL2), и двумя продуктами с молекулярными массами от 55 до 70 кДа, которые могут являться тетрамером и пентамером RL2. Можно предположить, что белки с молекулярными массами более 14 кДа (рис. 1, дорожки 3 и 4) являются продуктами поперечных сшивок субъединиц мультимерного комплекса RL2 с 5(6)-карбокситетраметилродамином, этерифицированным гидроксисукцинимидом по двум карбоксильным группам. При этом, мономерная форма RL2-Rho, является основным продуктом реакции, и его массовая доля в смеси составляет 60% (рис. 1б). Также, из данных рис. 1 видно, что конъюгат RL2-Rho, дополнительно очищенный катионообменной хроматографией, содержит примеси с $M < 10$ кДа, такие как 5(6)-карбокситетраметилродамин и его сукцинимидный эфир (рис. 1, дорожка 5). В препарате

RL2-Rho, дополнительно очищенном методом гель-фильтрации указанные примеси отсутствуют (рис. 1, дорожка 4).

Из полученных данных следует, что очистка RL2-Rho методом двух последовательных гель-фильтраций приводит к более эффективному удалению низкомолекулярных примесей, чем последовательное применение гель-фильтрации и катионообменной хроматографии.

Таким образом, показано, что очищенный препарат RL2-Rho содержит смесь мультимерных, ковалентно связанных форм RL2-Rho. При этом максимальная массовая доля конъюгата приходится на мономерную форму RL2-Rho.

Взаимодействие конъюгата RL2-Rho с клетками человека

Ранее в нашей лаборатории методом флуоресцентной микроскопии, а также методом “фишинга” в тандеме с масс-спектрометрией было показано, что конъюгат RL2-Rho проникает в цитоплазму клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и немалигнизированных стволовых клеток жировой ткани человека MSC и связывается с тубулином и актинином цитоскелета [4]. При этом механизм проникновения RL2 в клетку остался невыясненным.

В данной работе для исследования возможных путей проникновения рекомбинантного аналога лактаптина в раковые клетки человека мы использовали метод проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Клетки MCF-7 инкубировали с различным количеством RL2-Rho и измеряли распределение клеток по интенсивности флуоресценции. Кроме этого, чтобы оценить вклад белковой части конъюгата RL2-Rho в его способность проникать и накапливаться в клетках, был проведен цитофлуориметрический анализ клеток MCF-7, инкубированных с продуктами гидролиза RL2-Rho протеиназой K. Распределения клеток в различных экспериментальных группах по интенсивности флуоресценции представлены на рис. 2 (см. вклейку).

Из рис. 2 видно, что средние значения распределений клеток, обработанных конъюгатом RL2-Rho, сдвигаются в сторону больших значений интенсивности флуоресценции (распределения 3 и 4) по сравнению с необработанными клетками. Причем интенсивность флуоресценции клеток, обработанных RL2-Rho, значительно увеличивается при увеличении концентрации конъюгата в культуральной среде. Интенсивность флуоресценции клеток MCF-7, инкубированных с гидролизованным конъюгатом RL2-Rho, практически не отличается от интенсивности флуоресценции необработанных клеток.

Таким образом, показано, что RL2-Rho проникает в клетки MCF-7, и проникновение конъюгата

в клетки обеспечивается его белковой частью, а не свойствами флуоресцентного красителя.

Влияние ингибиторов эндоцитоза на эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MCF-7 и MDA-MB-231

Для исследования путей эндоцитоза RL2-Rho, реализуемых в клетках MCF-7 и MDA-MB-231, мы использовали диназор как ингибитор динаминзависимых путей эндоцитоза, хлорпромазин как ингибитор клатринзависимого пути, нистатин и M β CD для ингибирования путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, в том числе кавеолинзависимого пути эндоцитоза. Цитохалазин D и EIPA использовали как ингибиторы макропиноцитоза, вортманнин – как ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ, а также NaN₃ как ингибитор синтеза АТФ.

Клетки MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали 30 мин в присутствии ингибитора эндоцитоза или без него, после чего вводили RL2-Rho, инкубировали 1 ч и анализировали смесь методом проточной цитофлуориметрии (табл. 1). Для проверки достоверности различий между средними значениями интенсивности флуоресценции клеток в различных экспериментальных группах, инкубированных в присутствии ингибитора эндоцитоза, и клеток, инкубированных в их отсутствие, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и рассчитывали значения достигаемого уровня значимости *p*. Различия между средними значениями интенсивности флуоресценции клеток различных экспериментальных групп считали достоверными при *p* ≤ 0.05.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что средние значения интенсивности флуоресценции \bar{X} клеток MCF-7 и MDA-MB-231, обработанных конъюгатом RL2-Rho (10 мкг/мл), достоверно превышают среднее значение для клеток, инкубированных в отсутствие препарата, что свидетельствует о проникновении RL2-Rho в клетки.

Также из данных табл. 1 видно, что средние значения интенсивности флуоресценции клеток, обработанных RL2-Rho, достоверно выше по сравнению со средними значениями для клеток, инкубированных в присутствии нистатина или M β CD (для клеток MCF-7) и азидата натрия или M β CD – для клеток MDA-MB-231.

По средним значениям интенсивности флуоресценции были рассчитаны относительные средние эффективности проникновения препарата в клетку. Эффективность проникновения препарата \bar{U} вычисляли по формуле:

$$\bar{U} = \frac{(\bar{X}_3 - \bar{X}_1) \times 100}{(\bar{X}_2 - \bar{X}_1)}, \%$$

Таблица 1. Параметры распределения по интенсивности флуоресценции клеток MCF-7 и MDA-MB-231, инкубированных с RL2-Rho в присутствии различных ингибиторов

Препарат	Культура клеток	Среднее значение и стандартное отклонение интенсивности флуоресценции ($\bar{X} \pm \sigma$)	p^*	Интенсивность флуоресценции, %
Необработанные клетки	MCF-7	111.0 ± 22.5		0
	MDA-MB-231	126.1 ± 18.1		0
RL2-Rho	MCF-7	192.1 ± 32.0	1.26 × 10 ⁻⁵	100
	MDA-MB-231	312.4 ± 72.3	3.67 × 10 ⁻⁴	100
Хлорпромазин + RL2-Rho	MCF-7	187.3 ± 41.9	0.36	94
	MDA-MB-231	262.9 ± 97.2	0.18	73
Диназор + RL2-Rho	MCF-7	170.8 ± 62.8	0.18	74
	MDA-MB-231	314.5 ± 36.9	0.20	101
Нистатин + RL2-Rho	MCF-7	167.1 ± 31.3	0.05	70
	MDA-MB-231	293.9 ± 64.5	0.43	90
MβCD + RL2-Rho	MCF-7	155.0 ± 18.6	0.01	54
	MDA-MB-231	251.1 ± 28.8	0.05	67
Вортманнин + RL2-Rho	MCF-7	169.6 ± 28.6	0.22	72
	MDA-MB-231	278.9 ± 65.6	0.18	82
EIPA + RL2-Rho	MCF-7	180.1 ± 18.5	0.26	85
	MDA-MB-231	312.5 ± 91.4	0.30	100
Цитохалазин D + RL2-Rho	MCF-7	194.8 ± 40.4	0.48	103
	MDA-MB-231	264.5 ± 27.1	0.23	74
NaN ₃ + RL2-Rho	MCF-7	179.0 ± 24.2	0.32	84
	MDA-MB-231	230.5 ± 13.4	0.03	56

* Значения p отражают достоверность отличия средних значений интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных в присутствии ингибиторов.

где \bar{X}_i – средние значения распределений клеток по флуоресценции. Индекс i – определяет тип обработки клеток, X_1 – контрольные, не обработанные клетки; X_2 – клетки, обработанные флуоресцентным конъюгатом; X_3 – клетки, обработанные флуоресцентным конъюгатом и ингибитором. За 100% принято среднее значение интенсивности флуоресценции клеток, обработанных флуоресцентным конъюгатом в отсутствие ингибиторов. За 0% принято среднее значение интенсивности флуоресценции контрольных клеток.

Из данных табл. 1 видно, что эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MCF-7 в присутствии нистатина и MβCD составила 70 и 54% соответственно. Эффективность проникновения RL2-Rho в клетки MDA-MB-231, обработанные MβCD и азидом натрия, составила 67 и 56% соответственно. При этом другие ингибиторы не оказали значимого действия на эффективность проникновения RL2-Rho в клетки.

Пиноцитоз – это процесс поглощения клеткой жидкости или растворенных в ней соединений. Пиноцитоз разделяют на макропиноцитоз и рецепторопосредованный пиноцитоз. Проникновение путем макропиноцитоза происходит за счет неспецифического связывания молекул “груза” с веществами, растворенными в плазматической мембране [5]. Рецепторопосредованный пиноцитоз включает в себя клатринзависимый и клатриннезависимый пиноцитоз. Рецепторопосредованный пиноцитоз обеспечивает высоко селективное поглощение молекул, обладающих высоким сродством к рецепторам, сконцентрированным на участках формирования транспортных везикул.

Известно, что MβCD и нистатин препятствуют формированию стабильных липидных рафтов на поверхности плазматической мембраны при динаминзависимых (в т.ч. клатринзависимом) и динаминнезависимых путях эндоцитоза [11].

Диназор является специфическим ингибитором динаминзависимых путей эндоцитоза (в частности, клатринзависимого и некоторых caveолин-зависимых путей). Он является неконкурентным ингибитором, подавляющим ГТФ-азную активность динамина 1 и динамина 2 (но не других малых ГТФ-аз). При этом связывание с диназором не мешает самосборке динамина в условиях высокой ионной силы или прочности его связывания с липидами.

Так как диназор не ингибировал проникновение RL2-Rho, путь пиноцитоза, по которому RL2-Rho проникает в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, является динаминнезависимым. При этом действие ингибиторов данного пути пиноцитоза – M β CD и ни-статина, приводило к снижению эффективности проникновения RL2-Rho в клетки не более чем на 45%. Из полученных данных следует, что основное количество RL2-Rho проникает в клетки по пути, альтернативному эндоцитозу.

Таким образом, показано, что конъюгат RL2-Rho проникает в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 частично по пути динаминнезависимого пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами.

Анализ влияния ингибиторов эндоцитоза на распределение RL2-Rho в клетках человека

Для анализа распределения RL2-Rho в клетках человека MCF-7, MDA-MB-231 в присутствии ингибиторов путей эндоцитоза клетки инкубировали с ингибиторами или без них, после чего добавляли RL2-Rho и продолжали инкубацию в течение часа. Далее клетки фиксировали, окрашивали DAPI и анализировали методом флуоресцентной микроскопии (рис. 3, 4 (см. вклейку)).

Из данных, представленных на рис. 3 и 4, видно, что конъюгат RL2-Rho проникает в раковые клетки MCF-7 и MDA-MB-231, в том числе и инкубированные с различными ингибиторами эндоцитоза. RL2-Rho диффузно распределяется по цитоплазме клеток и позволяет четко видеть плазматическую мембрану. При этом цитоплазма клеток, инкубированных с RL2-Rho, окрашена неравномерно, в ней можно наблюдать точечные более интенсивно окрашенные структуры. Можно предположить, что это эндосомы, с помощью которых конъюгат проникает в клетку по пути эндоцитоза.

Для выявления внутриклеточной локализации конъюгата RL2-Rho использовали клетки MDA-MB-231, трансфицированные коммерчески доступными конструкциями Rab5a-GFP на основе бакуловирусов, экспрессирующими белок Rab5a, слитый с зеленым флуоресцентным белком GFP. Rab5a является малой ГТФ-азой, локализованной в плазматической мембране клатринпокрытых вези-

кул и эндосом, и его флуоресцентно-меченная версия позволяет детектировать подобные структуры в клетке [13]. Конъюгат RL2-Rho добавляли к клеткам, и через 3 ч анализировали его распределение внутри клеток методом флуоресцентной микроскопии. Было обнаружено, что желтый сигнал, принадлежащий конъюгату RL2-Rho, совпадает по местоположению с зеленым сигналом, соответствующим эндосомам (рис. 5 (см. вклейку)).

Таким образом, полученные данные подтверждают локализацию молекул конъюгата в эндосомах. При этом ни один из ингибиторов эндоцитоза не ингибировал проникновение конъюгата в клетки полностью, что свидетельствует о том, что RL2-Rho также способен проникать в клетки по альтернативному механизму, отличному от эндоцитоза. Поиск такого механизма может быть основан на анализе структурных особенностей белка.

В структуре RL2 содержатся преимущественно положительно заряженные аминокислоты аргинин, лизин и гистидин, чередующиеся с ароматическими и алифатическими аминокислотами и их кластерами (табл. 2). Такая структура характерна для пептидов семейства CPP (Cell-penetrating Peptides).

Отличительной особенностью пептидов CPP является способность с высокой эффективностью проникать через плазматическую мембрану эукариотических клеток не только по механизму эндоцитоза, но и по пути прямого проникновения [12, 14–16]. В настоящее время известны десятки как природных, так и синтетических представителей семейства CPP [9, 13] (табл. 2). Общей особенностью структуры пептидов, относящихся к CPP, является наличие большого количества положительно заряженных аминокислотных остатков, таких как аргинин (R), лизин (K) и, в меньшей степени, гистидин (H). Положительно заряженные аминокислотные остатки CPP или их кластеры за счет электростатических взаимодействий связываются с отрицательно заряженными молекулами фосфолипидов и протеогликанов, входящих в состав плазматической мембраны, в результате чего запускаются механизмы интернализации данных пептидов в клетку. Кроме положительно заряженных аминокислотных остатков в структуре большинства CPP содержатся кластеры ароматических и алифатических аминокислот, обладающих гидрофобными свойствами, что увеличивает сродство данных пептидов к липидному бислою плазматической мембраны клетки. Также важной особенностью CPP, обеспечивающей их прямое проникновение через клеточную мембрану, является полиморфизм вторичной структуры или способность динамично изменять вторичную структуру в зависимости от свойств окружающей среды [14, 17, 18]. При этом пока не существует способов точно предсказать способность пептида

Таблица 2. Аминокислотные последовательности RL2 и пептидов класса CPP. Серым цветом отмечены положительно заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки

Пептид	Аминокислотная последовательность
Penetratin	R RQ I K I W F Q N R R M K W K K
Tat peptide	G R K K R R Q R R R P P Q
pVEC	L L I I L R R R I R K Q A H A H S K
Trans-portan	G W T L N S A G Y L L G K I N L K A L A A L A K K I L
MPG	G A L F L G F L G A A G S T M G A W S Q P K K K R K V
Pep-1	K E T W W E T W W T E W S Q P K K K R K V
Polyarginines	(R) _n ; 6 < n < 12
MAP	K L A L K L A L K A L K A A L K L A
R6W3	R R W W R R W R R
B1	M W F K R E Q G R G A V H R G G A H P G R A G R R R R K R P Q V Q R V R R G R G R C H L R Q A D - P V H L H H R Q A A R A L A H P R D H P D L R R A V L Q P L P R P H E A A R L L Q V R H A R R L R P G A H H L L Q G R R Q L Q D P R R G E V R G R H P G E P H R A E G H R L Q G G R Q H P G A Q A G V Q L Q P Q R L Y H G R Q A E E R H Q G E L Q D P P Q H R G R Q R A A H R P L P A E H P H R R R P R A A A R Q P L P E H P V R P E Q R P Q R E A R S H G P A G V R D R R R D H S R H G R G L N L E
RL2	M N O K Q P A C H E N D E R P F Y Q K T A A P Y V P M Y Y V P N S Y P Y Y G T N L Y Q R R P A I A I N N P Y V P R - T Y Y A N P A V V R P H A Q I P Q R Q Y V P N S H P P T V V R R P N L H P S F I A I P P K K I Q D K I I I P T I G G S H H H H H H

к прямому проникновению через плазматическую мембрану по его первичной структуре.

Из данных табл. 2 видно, что пептиды класса CPP, как правило, небольшие, с $M < 3$ кДа. Однако недавно открыт новый белок B1 с молекулярной массой 28.3 кДа, способный не только эффективно проникать в клетки эукариот, но и доставлять связанные с ним другие молекулы в цитоплазму клетки. Было показано, что механизм проникновения данного белка в клетки характерен для CPP [18]. Указанный пример говорит в пользу того, что размер RL2 не является препятствием для отнесения его к классу CPP и позволяет предположить, что в последовательности лактапина содержится пептид или несколько пептидов, обладающих свойствами CPP.

Таким образом, учитывая неспособность ингибиторов эндоцитоза полностью подавлять процесс интернализации RL2-Rho в раковые клетки человека, а также сходство его структуры со структурой CPP, можно заключить, что одним из возможных путей проникновения RL2 в раковые клетки является прямое проникновение через плазматическую мембрану.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом проточной цитофлуориметрии с использованием ингибиторов различных путей эндоцитоза показано, что конъюгат RL2-Rho проникает в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 частично по пути динаминнезависимого пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами. Действие ингибиторов данного пути пиноцитоза MβCD и нистатина приводит к снижению эффективности проникновения RL2-Rho в клетки не более чем на 45%.

Методом флуоресцентной микроскопии показано, что RL2-Rho проникает в клетки MCF-7 и MDA-MB-231 и распределяется в цитоплазме. При этом инкубация клеток с ингибиторами различных путей эндоцитоза лишь частично ингибирует проникновение RL2-Rho в клетки. Таким образом, RL2-Rho проникает в клетки также по пути, альтернативному эндоцитозу.

Анализ первичной структуры RL2 позволяет предположить, что RL2 обладает свойствами CPP

и способен к интернализации по пути прямого проникновения через плазматическую мембрану.

Таким образом, полученные экспериментальные данные в совокупности с анализом первичной структуры рекомбинантного аналога лактаптина RL2 позволяют заключить, что RL2 обладает свойствами СРР и проникает в клетку по пути динаминнезависимого пиноцитоза, опосредованного липидными рафтами и, вероятно, по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 5(6)-карбокситетраметилпродамин *N*-гидроксисукцинимид, *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, ацетонитрил, уксусная кислота и протениназа К (Sigma, США) DMSO (Ameresco, США); хлорид натрия, (Gerbu, Германия), мочевины (Ameresco, США). RL2 получали, как описано в работе [20]. Для хроматографической очистки на станции BioLogic LP (BioRad) применяли сорбенты: SP-сефарозу (GE Healthcare, Швеция), Sephadex G-25 (Pharmacia, Швеция).

Для электрофореза использовали акриламид 2K Standard Grade (Медиген, Россия), бромфеноловый синий, глицин для электрофореза (AppliChem), 2-меркаптоэтанол, краситель Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma, США), SDS (Sigma, США), *N,N'*-метилен-бис-акриламид (ICN, США), персульфат аммония (Gerbu, Германия), ТЕМЕД, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (Хеликон, Россия), маркеры молекулярной массы белков (Fermentas, Латвия). Клетки аденокарциномы молочной железы человека линий MDA-MB-321 (ЗАО "Исследовательский Институт Химического Разнообразия", г. Химки, Московская область) и MCF-7 (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург).

Культуральные среды: IMDM, L-15, RPMI (Life Technologies, США); трипсин для культуральных работ (Life Technologies, США), L-глутамин (ICN, США), гентамицин (Минск, Белоруссия), сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (Биолот, Санкт-Петербург).

Для оценки влияния ингибиторов эндоцитоза на эффективность проникновения RL2-Rho в клетки использовали NaN_3 , хлорпромазин, нистатин, цитохалазин D, EIPA, диназор, вортманнин, M β CD (Sigma, США).

Для внутриклеточной экспрессии Rab5a-GFP использовали конструкции CellLight Reagent BacMam 2.0 (Molecular Probes) (США) на основе бакуловирусов.

Синтез родаминового конъюгата рекомбинантного аналога лактаптина RL2-Rho осуществляли

через стадию образования сукцинимидного эфира 5(6)-карбокситетраметилпродамина с промежуточной карбодиимидной активацией карбоксильной группы красителя по ранее разработанной методике [4].

Сукцинимидный эфир 5(6)-карбокситетраметилпродамина. Реакционную смесь, содержащую по 50 мкл растворов 0.3 М 5(6)-карбокситетраметилпродамина, 0.5 М *N*-гидроксисукцинимид и 1 М *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид в DMSO, инкубировали в темноте при 25°C 19 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ на пластинке Silicagel 60 F254 в системе ацетонитрил – вода – триэтиламин, 7 : 2 : 1. Продукт реакции осаждали 7.5 мл диэтилового эфира, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и сушили на воздухе 10 мин. Осадок растворяли в 250 мкл DMSO.

Для получения 5(6)-карбокситетраметилпродаминового конъюгата RL2 к 3.3 мл водного раствора 10 мг RL2, добавляли 250 мкл сукцинимидного эфира 5(6)-карбокситетраметилпродамина в DMSO и инкубировали 2 ч при 25°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл водного раствора глицина (500 мМ).

Очистку конъюгата RL2-Rho осуществляли методом хроматографии в две стадии. На первой стадии проводили гель-фильтрацию продуктов синтеза RL2-Rho. В хроматографическую колонку вносили 3 мл Sephadex G-25, после его равномерного осаждения колонку промывали раствором А, содержащим 50 мМ NaCl, 25 мМ NaOAc (pH 4.5). Наносили реакционную смесь, и промывали колонку раствором А со скоростью 0.75 мл/мин.

На второй стадии фракцию, полученную гель-фильтрацией на Sephadex G-25, разделяли пополам и очищали параллельно повторной гель-фильтрацией на Sephadex G-25 по методике, описанной выше, или катионообменной хроматографией на SP-сефарозе.

При катионообменной хроматографии в хроматографическую колонку вносили 3 мл SP-сефарозы, после ее равномерного осаждения промывали раствором А, содержащим 50 мМ NaCl, 25 мМ NaOAc (pH 4.5), далее на колонку наносили реакционную смесь, промывали раствором А, затем раствором, содержащим 1 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl (pH 8.8). RL2-Rho элюировали раствором, содержащим 0.5 М NaCl, 20 мМ NaOAc (pH 4.5), 4 М мочевины, со скоростью потока 0.75 мл/мин. Собранную фракцию диализовали 24 ч против воды.

Характеризация конъюгата RL2-Rho. Электрофоретический анализ белков и их конъюгатов проводили по методу Лэммли. Препараты инкубировали 7 мин при 98°C с буфером для нанесе-

ния, содержащим 0.125 М Трис-НСI, рН 6.8, 4% SDS, 20% глицерин, 1% β-меркаптоэтанол, 0.02% бромфеноловый синий, и фракционировали в ступенчатом ПААГ. Концентрирующий гель: 165 мМ Трис-НСI (рН 6.8); 3.2% ПААГ; 0.1% SDS; 0.04% ПСА. Разделяющий гель: 0.375 мМ Трис-НСI (рН 8.8); 0.09% ПСА; 10% ПААГ; 0.1% SDS; 28 мМ TEMED. Электродный буфер: 25 мМ Трис-НСI (рН 8.8), 250 мМ глицин, 0.1% SDS.

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

Гель окрашивали Кумасси G-250 20 мин при 90°C и отмывали 40 мин воде при 90°C. Флуоресценцию RL2-Rho в геле визуализировали в УФ-свете с использованием транс-иллюминатора (BioRad universal hood II).

Электрофореграммы количественно анализировали с использованием программы Gel Analyser 2010.

Гидролиз конъюгата RL2-Rho проводили при помощи сериновой протеазы широкого спектра – протеинкиназы К. Раствор, содержащий RL2-Rho (500 мкг/мл), протеиназу К (5 мкг/мл), 20 мМ Трис-НСI (рН 7.5), инкубировали до полного гидролиза 90 мин при 50°C. Глубину гидролиза отслеживали при помощи электрофоретического анализа в ПААГ.

Культуры клеток. Для анализа действия белковых препаратов на клетки человека MCF-7 культивировали в среде IMDM, содержащей 10 мМ L-глутамин, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки MDA-MB-231 культивировали в среде L-15 с стрептомицином (0.1 мг/мл) и амфотерицином (0.25 мкг/мл) в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ взаимодействия RL2-Rho и RL2-Rho, гидролизованного протеиназой К, с клетками методом проточной цитофлуориметрии. Клетки MCF-7 и MDA-MB-231 культивировали в 6-луночных планшетах с начальной плотностью 10⁵ клеток/луночку в течение 24 ч. Культуральную среду удаляли из лунок, клетки промывали физиологическим раствором, и добавляли среду RPMI, содержащую 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина. Далее в лунки добавляли ингибитор эндоцитоза (диназор, хлорпромазин, нистатин, MβCD, цитохалазин D, EIPA, вортманнин, или NaN₃) и инкубировали 30 мин, после чего клетки обрабатывали препаратом RL2-Rho (0.2 или 10 мкг/мл) или

гидролизированным RL2-Rho (50 мкг/мл) и продолжали инкубацию в течение 1 ч при 37°C. После инкубации клетки отмывали физиологическим раствором, далее инкубировали при 37°C с 300 мкл 0.5% трипсина для культуральных работ, контролируя процесс открепления клеток с помощью микроскопа. Для инактивации трипсина к клеткам добавляли среду IMDM, содержащую 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 900 g. Супернатант удаляли, клетки промывали физиологическим раствором и центрифугировали в тех же условиях, процедуру повторяли дважды. Далее клетки фиксировали в растворе, содержащем 90% метанола, на холоду в течение 15 мин. После фиксации клетки промывали физиологическим раствором и добавляли к ним PBS. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II.

Напряжение детекторов флуоресцентного излучения (в каналах PE и FITC) устанавливали таким образом, чтобы уровень фоновой флуоресценции клеток, не обработанных RL2-Rho, максимально отличался от флуоресценции обработанных RL2-Rho-клеток. В результате подбора параметров было установлено напряжение на ФЭУ в канале PE – 363 В, в канале FITC – 430 В. Кроме того, были подобраны напряжения на ФЭУ в каналах FSC (220 В) и SSC (300 В), детектирующих количество событий в исследуемом образце.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе “Microsoft EXCEL”.

Анализ взаимодействия RL2-Rho с клетками методом флуоресцентной микроскопии

Клетки MCF-7 и MDA-MB-231 культивировали в 96-луночных планшетах с начальной плотностью 8000 кл./луночку в течение 24 ч. Культуральную среду удаляли из лунок, клетки промывали физиологическим раствором, добавляли среду RPMI, содержащую 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина. После чего к клеткам добавляли один из ингибиторов эндоцитоза (диназор, хлорпромазин, нистатин, MβCD, цитохалазин D, EIPA, вортманнин, или NaN₃) и инкубировали 30 мин при 37°C, затем обрабатывали раствором препарата RL2-Rho в воде (50 мкг/мл) и продолжали инкубацию в течение 1 ч при 37°C. После инкубации клетки дважды отмывали физиологическим раствором и фиксировали в растворе, содержащем 90% метанола, на холоду в течение 15 мин. После фиксации клетки промывали фи-

зиологическим раствором и окрашивали 300 нМ раствором DAPI в течение 5 мин в темноте при 25°C, промывали физиологическим раствором и добавляли в каждую лунку по 100 мкл PBS. До проведения анализа клетки хранили в холодильной камере при +4°C.

Образцы анализировали с помощью прибора In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, США). Сигнал RL2-Rho детектировали в канале Су3 с характеристиками $\lambda_{\text{ex}} = 521\text{--}565$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 541\text{--}669$ нм; характеристики RL2-Rho $\lambda_{\text{ex}} = 543$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 572$ нм.

Для выявления внутриклеточной локализации конъюгата RL2-Rho клетки MDA-MB-231 высаживали на предметные стекла для культивирования (Becton Dickinson) в плотности 2×10^3 клеток/см² и культивировали 24 ч в стандартных условиях; после чего к клеткам добавляли бакуловирусные конструкции CellLight Reagent BacMam 2.0 (Molecular Probes) в количестве 3×10^6 частиц/лунку и продолжали культивирование. Через 20 ч к клеткам добавляли конъюгат RL2-Rho до концентрации 0.01 мг/мл и инкубировали 3 ч, после чего клетки промывали дважды раствором PBS и фиксировали метанолом 10 мин при 4°C. Фиксированные клетки дважды промывали раствором PBS, и добавляли 300 нМ раствор DAPI в PBS, выдерживали 5 мин, после чего дважды промывали раствором PBS, покрывали клетки каплей 50% глицерина и покровным стеклом.

Клетки анализировали на флуоресцентном микроскопе (Axioscop 2 PLUS, Carl Zeiss, GmbH) с помощью программного пакета Axiovision 3.1. Для анализа препаратов, несущих флуоресцентные метки, использовали фильтры фирмы Zeiss: для регистрации сигнала Rab5a-GFP – фильтр № 10 (488010-9901-000) с характеристиками возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{--}490$ нм и испускания $\lambda_{\text{em}} = 515\text{--}565$ нм; для регистрации сигнала RL2-Rho использовали фильтр № 20 (488020-9901-000) с характеристиками $\lambda_{\text{ex}} = 534\text{--}558$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 575\text{--}640$ нм. Характеристики Rab5a-GFP: $\lambda_{\text{ex}} = 488$, $\lambda_{\text{em}} = 510$, характеристики RL2-Rho $\lambda_{\text{ex}} = 543$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 572$ нм.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01-313 и ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” соглашение № 14.607.21.0063 от 23 сентября 2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Некупелая В.В., Семенов Д.В., Потепенко М.О., Кулигина Е.В., Кум Ю.Я., Романова И.В., Рихтер В.А.* // Докл. АН. 2008. Т. 419. С. 268–271.
2. *Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A.* // Protein J. 2010. V. 29. P. 174–180.
3. *Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I., Semenov D.V., Potapenko M.O., Kuligina E.V., Nikolin V.P., Nikitenko E.V., Richter V.A.* // Biochimie. 2012. V. 94(12). P. 2467–2474.
4. *Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A.* // PLoS One. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0093921
5. *Фомин А.С., Коваль О.А., Семенов Д.В., Потепенко М.О., Кулигина Е.В., Кум Ю.Я., Рихтер В.А.* // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. С. 92–98. [Fomin A.S., Koval O.A., Semenov D.V., Potapenko M. O., Kuligina, V. A., Kit Yu. Ya., Richter V. A. // Russ. J. Bioorganic Chem. 2012. V. 38. P. 77–82.]
6. *Doherty G.J., McMahon H.T.* // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 857–902.
7. *Chao T., Raines R.T.* // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 8374–8382.
8. *Choi Y.S., David A.E.* // Curr. Pharm. Biotechnol. 2014. V. 15. P. 192–199.
9. *Stanzl E.G., Trantow B.M., Vargas J.R., Wender P.A.* // Acc. Chem. Res. 2013. V. 46. P. 2944–2954.
10. *Madani F., Lindberg S., Lange U., Futaki S., Gröslund A.* // J. Biophys. 2011. doi: 10.1155/414729
11. *Ivanov A.I.* // Methods Mol. Biol. 2008. V. 440. P. 15–33.
12. *Bechara C., Sagan S.* // FEBS Letters. 2013. V. 587. P. 1693–1702.
13. *Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K.* // Cell. 1992. V. 70. P. 715–728.
14. *Pisa D.M., Chassaing G., Swiecicki J.M.* // Biochemistry. 2015. V. 54. P. 194–207.
15. *Almeida P. F.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1838. P. 2216–2227.
16. *Regberg J., Eriksson J.N., Langel U.* // Front Biosci. (Elite Ed). 2013. V. 5. P. 509–516.
17. *Zou L.L., Ma J.L., Wang T., Yang T.B., Liu C.B.* // Curr. Neuropharmacol. 2013. V. 11. P. 197–208.
18. *Eiriksdottir E., Konate K., Langel U., Divita G., Deshayes S.* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1798. P. 1119–1128.
19. *Simeon R.L., Chamoun A.M., McMillin T., Chen Z.* // ACS Chem. Biol. 2013. V. 8. P. 2678–2687.
20. *Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A.* // The Protein Journal. 2010. V. 29. P. 174–180.

Entry of Peptide Lactaptin into Human Cancer Cells

O. A. Chinak^{*,#}, A. S. Fomin^{*}, A. A. Nushtaeva^{*}, O. A. Koval^{*,**},
A. V. Savelyeva^{*}, E. V. Kuligina^{*}, V. A. Richter^{*}

[#]Phone: +7 (383)363-51-89; e-mail: chinakolga@gmail.com

^{*}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Novosibirsk, 630090 Russia

^{**}Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk

Lactaptin is a 8.6 kDa fragment of κ -casein isolated from human milk. Lactaptin was shown to have cytotoxic activity on mammalian cancer cells *in vitro*. RL2 is a recombinant analogue of lactaptin, that not only enters the human cancer and normal cells and binds with cytoskeleton but also induces apoptosis in human cancer cell lines and suppresses tumor growth *in vivo*. Inducing apoptosis in cancer cells, lactaptin doesn't degrade viability of normal cells. RL2 entering pathways into human cancer cells were investigate with inhibitors of different endocytosis pathways by flow cytometry and fluorescence microscopy. Our research has shown that RL2 enters into cell partly by dinamin-independent pinocytosis and partly by direct penetration through plasma membrane. The analysis of RL2 primary structure and entry mechanism demonstrates that RL2 is related to CPP (Cell-penetrating Peptide).

Keywords: lactaptin, anticancer peptides, endocytosis, cancer cells, CPP