

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

на правах рукописи

Ковальчук Сергей Игоревич

Формирование неселективных пептид-липидных пор как
модель процесса белковой трансдукции с помощью
поликатионных аналогов грамицидина А

Специальность: 02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени

Кандидата химических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении РАН Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Научный руководитель

Академик РАН

Иванов Вадим Тихонович

Официальные оппоненты:

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных полимеров и полимерных материалов кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Барсуков Леонид Иванович

кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела «Учебно-научный центр» ИБХ РАН

Ведущая организация

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «20» октября 2010 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Учреждении РАН Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН

Автореферат разослан « ____ » _____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников



Актуальность проблемы

В последние годы становится всё более актуальной задача доставки ключевых биомолекул (пептиды, белки, нуклеиновые кислоты) в цитоплазму эукариотических клеток. Однако, в то время как технология доставки нуклеиновых кислот разрабатывалась в течение десятилетий, что к сегодняшнему дню привело к появлению множества высокоэффективных подходов и препаратов для трансфекции эукариотических клеток, методология доставки белков (белковой трансдукции) находится на значительно более низком уровне развития.

Одним из наиболее привлекательных с точки зрения простоты и эффективности подходов является использование низкомолекулярных, в частности пептидных векторов, способных обратимо сорбироваться на поверхности белков за счёт лабильных нековалентных связей (гидрофобные, электростатические и т.д.) с образованием комплексов, которые бы при попадании в клетку разрушались, освобождая при этом нативную молекулу транспортируемого соединения.

Несмотря на очевидную перспективность применения, на данный момент описано всего две группы пептидов, способных подобным образом транспортировать белки. К первой группе относится катионный амфипатичный пептид рер-1 и его аналоги. К второй – сконструированные в нашей лаборатории аналоги природного антибиотика грамицидина А, несущие дополнительную гидрофильную последовательность, обогащённую катионными аминокислотами. Существенным фактором, ограничивающим дальнейшее развитие данного подхода является отсутствие общепринятых представлений о механизме проникновения в клетки пептид-белковых комплексов.

Цель работы

Целью представленной работы является исследование механизма процесса белковой трансдукции, опосредованной катионными грамицидиновыми аналогами (КГА). Согласно литературным данным, процесс транслокации нековалентных

пептид-белковых комплексов является энергетически независимым, т.е. проходит через взаимодействие комплексов непосредственно с липидами мембран. В связи с этим, изучение механизма транспорта включало детальное исследование взаимодействия КГА с модельными мембранными системами и с транспортируемыми белками как в растворе, так и в присутствии липосом. Кроме того, на серии направленно модифицированных пептидов в культуре эукариотических клеток HeLa была изучена трансдукция модельного белка β -галактозидазы и прослежена корреляция транспортной активности с поведением тех же пептидов в искусственных мембранных системах. С этой целью, наряду с некоторыми ранее описанными КГА, нами были получены новые производные, отличающиеся по таким признакам как длина и состав катионного и гидрофобного доменов и их относительная локализация в последовательности пептида.

Научная новизна и практическая значимость работы

Полученные в результате работы данные позволили существенно продвинуться в понимании физико-химических механизмов, лежащих в основе взаимодействия КГА с мембранами, а также пептид-опосредованной трансдукции белков. Обнаруженная нами в ряду аналогов полная корреляция между эффективностью внутриклеточной доставки белков и каналообразовательной активностью КГА на искусственных мембранных системах позволяет рассматривать формирование пептид-липидных пор как необходимое условие и существенный этап процесса транслокации нековалентных пептид-белковых комплексов.

Полученные результаты планируется использовать как для оптимизации существующих пептидных векторов, так и для дизайна новых пептидов, обладающих трансдукционной активностью, с целью расширения возможностей применения метода доставки макромолекул в составе нековалентных комплексов с переносчиками.

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены на 2-ом международном симпозиуме по мембрано-активным пептидам, Лиссабон, Португалия, 2007, 20-ом международном американском пептидном симпозиуме, Монреаль, Канада, 2007, 4-ом Российском симпозиуме «Белки и Пептиды», Казань, Россия, 2009 и 3-ем международном симпозиуме по внутриклеточной доставке терапевтических агентов, Монпелье, Франция, 2009. По материалам работы вышли 5 статей в рецензируемых журналах.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 189 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, результаты, материалы и методы, выводы и список цитируемой литературы, включающий 226 ссылок. В работе содержится 51 рисунок и 8 таблиц.

Содержание работы

Синтез пептидов

В рамках данной работы, наряду с некоторыми ранее описанными пептидами (P1C, P5C, P10C, N1C, P1N [1]), были также синтезированы и изучены несколько серий новых КГА (таблица 1). Помимо аналогов грамицидина А, были синтезированы пептиды магайнин-2 и мелиттин для контроля методов исследования на искусственных липидных системах.

Таблица 1. Пептиды, синтезированные и изученные в данной работе

Название	Последовательность
P1C	<i>form</i> – VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D W – <i>eta</i> – <i>suc</i> – PGRRRRSQS
катионный домен	PGRRRRSQS
N1C	<i>Ac</i> -VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβAGSGEEEEESQS

P10C	<i>Ac</i> -VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβAGSGPKKKRKVC
P5C	<i>Ac</i> -VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβAGSGPKKKRKVG
PK4C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβAGSGKKKKC
P1N	CPKKKRKVGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PK4GN	GKKKKGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PK4N	CKKKKGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PK6N	CKKKKKKGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PK8N	CKKKKKKKKGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PK10N	CKKKKKKKKKKGSGVGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D WβA
PS2C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D GSGPKKKRKVC
PS3C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WGSgpKKKRKVC
PS4C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D GSGPKKKRKVC
PS5C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WGSgpKKKRKVC
PS6C	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D WL _D GSGPKKKRKVC
P1leC	VGAL _D AV _D VV _D WL _D WL _D IL _D IβAGSGKKKKC
магаинин-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

* В последовательности пептидов буквой _D обозначаются D-аминокислоты (например, L_D), *form* – формил, *Ac* – ацетил, *eta* – этаноламин, *suc* – сукцинил.

Для упрощения понимания описанных результатов в названии пептидов зашифрована некоторая информация относительно их аминокислотной последовательности. Первая буква (P или N) обозначает заряд гидрофобной последовательности (Positive - положительный или Negative - отрицательный, соответственно). Последняя буква (N или C) соответствует локализации катионного домена на N- или C-конце гидрофобного грамицидинового домена. Информация между первой и последней буквами либо просто соответствует условному порядковому номеру пептида, либо несёт некоторую дополнительную информацию: пептиды PS2C ÷ PS6C имеют укороченный грамицидиновый домен (буква S обозначает *shorted* – укороченный); пептиды PK4C и PK4N ÷ PK10N имеют различную длину

катионной части, обозначение Kx соответствует количеству (x) остатков Lys в гидрофильном домене; в пептиде PHeC ряд остатков Tgr в грамицидиновом домене замещён на He; пептид PK4GN в катионном домене имеет 4 остатка Lys и остаток Cys, замещённый на Gly.

Все перечисленные в таблице 1 пептиды были синтезированы твёрдофазным методом в автоматическом варианте путём наращивания цепи с С-конца на модифицированных полистирольных смолах. Аминокислоты присоединяли к пептидил-полимеру через образование бензо-триазолового эфира в присутствии диизопропилкарбодиимида. Защита боковых функциональных групп аминокислотных остатков была выбрана с расчётом на конечное деблокирование трифторуксусной кислотой. Для временной защиты α -NH₂-групп использовали флуоренилметоксикарбонильную группу.

После деблокирования и отщепления от полимера пептиды выделяли методом ОФ-ВЭЖХ и характеризовали методами ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии. В среднем выходы пептидов (относительно исходной концентрации активных групп на полимере) составляли 5-10% для аналогов грамицидина А при содержании целевого компонента в смеси от 80 до 95% и ~20% для магаинина-2 и мелиттина при чистоте >95%.

Для стандартизации экспериментальных условий все цистеин-содержащие пептиды использовали в димерной форме (если в явном виде не указано иного).

Взаимодействие катионных грамицидиновых аналогов с искусственными мембранными системами

Исследование селективности пептид-индуцированной мембранной проводимости

Ранее на БЛМ для димерной формы цистеин-содержащих КГА была показана индукция неселективной проводимости ионов [1]. Данный эффект, по сути, являлся отправной точкой для настоящей работы, в которой было проведено

подробное исследование индукции КГА неселективной проводимости мембран и её взаимосвязи с белковым транспортом.

В настоящей работе вопрос селективности проводимости мембран в присутствии КГА был изучен на липосомах, содержащих потенциал-зависимый флуоресцентный краситель сафранин О, в условиях трансмембранного градиента концентрации КСl. Данная система позволяет наблюдать появление ион-селективных каналов через повышение уровня флуоресценции красителя при формировании трансмембранного диффузного потенциала, что приводит к повышению общей флуоресценции эмульсии липосом.

Изучение в данной системе катионных грамицидиновых аналогов на примере пептида P1C показало, что при низких концентрациях в мембранах присутствуют грамицидин-подобные K^+ -селективные каналы, в то время как при повышении концентрации выше 1 мкМ происходит сброс ранее сформированного потенциала (рис. 1). Таким образом, было доказано, что появление в мембране дефектов с высокой неизбирательной ионной проводимостью (впоследствии охарактеризованных как «неселективные поры») носило концентрационно-зависимый характер. Характерно, что анионный аналог N1C вне зависимости от концентрации был способен образовывать только классические K^+ -селективные грамицидиновые каналы (данные не показаны).

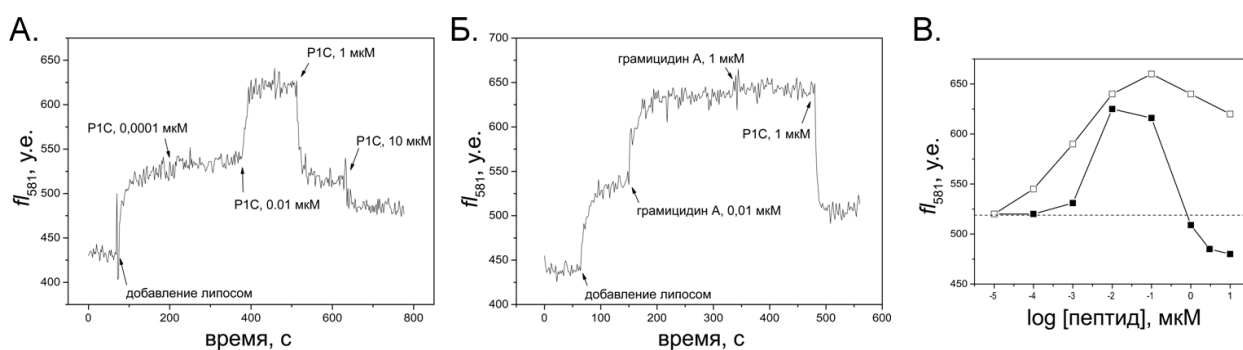


Рис. 1 Формирование трансмембранного потенциала на липосомах при добавлении пептидов. **А.** Зависимость трансмембранного потенциала от концентрации пептида P1C. **Б.** Сброс трансмембранного потенциала, преформированного добавлением грамицидина А, высокой концентрацией пептида P1C. **В.** Зависимость трансмембранного потенциала на липосомах от концентрации пептидов грамицидина А (□) и P1C (■). Трансмембранный градиент

концентрации KCl обеспечивался помещением липосом, содержащих раствор 200 мМ KCl, в безкальциевую среду. Флуоресценцию сафранина O измеряли при $\lambda = 581$ нм.

Исследование проводимости одиночных КГА-индуцированных мембранных дефектов (пор)

Для выяснения способа индукции КГА неселективного ионного транспорта была изучена флуктуация тока на плоских бислоиных липидных мембранах. Измерения проводили на пептидах РК4N и РК4С, сочетающих в себе все основные черты КГА, однако в силу структурных особенностей не способных к формированию основной проводящей формы грамицидиновых каналов – спиральных димеров. Подобный выбор объектов для анализа был обусловлен задачей дальнейшего целенаправленного изучения неселективной проводимости, в то время как наличие фоновой катионной грамицидиновой проводимости в ряде случаев существенно усложняет экспериментальную работу.

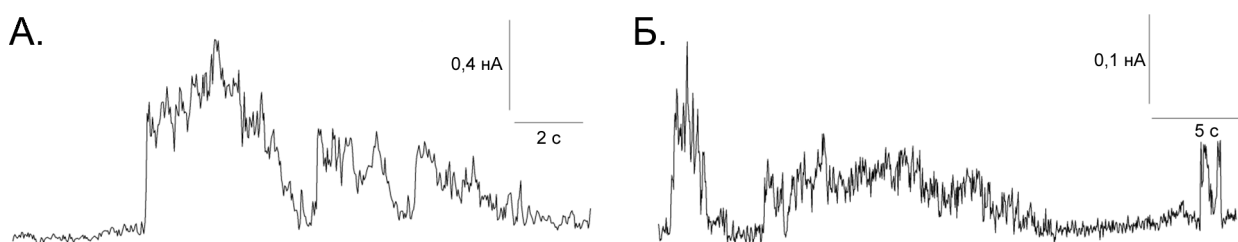


Рис. 2 Флуктуации тока, появляющиеся при одностороннем добавлении 0.27 мкМ пептидов РК4С (А) и РК4N (Б) на плоской БЛМ, сформированной из дифитаноил-фосфатидил холина в гексадекане. Буфер 10 мМ TRIS, 10 мМ MES, 1 М KCl, pH 7. $U=80$ мВ.

Полученные данные свидетельствовали об отсутствии взаимосвязи между индукцией неселективной проводимости и какого-либо рода дестабилизирующей мембрану активности для данных КГА. Наблюдаемый характер флуктуаций трансмембранного тока (рис. 2) указывал на формирование в присутствии пептидов крупных пор неизвестной структуры, появление которых, как и на липосомах, носило концентрационно-зависимый характер. При этом обнаруженные неселективные поры обладали очень высоким уровнем проводимости (от 1 до 10 нСм), в сотни раз превышавшим проводимость грамицидин-подобных каналов, образуемых КГА в аналогичных условиях в низких концентрациях (16 пСм [1]).

Структура КГА

В рамках задачи исследования детальной структуры неселективных пор, в первую очередь, было проверено, оказывает ли какое-нибудь принципиальное влияние на вторичную структуру пептидов включение дополнительной гидрофильной последовательности. Сопоставление спектров КД мембрана-ассоциированного пептида P10C со спектрами немодифицированного грамицидина показало, что добавление катионного домена не вносит существенных изменений в конформационное равновесие КГА. Другими словами, появление неселективных пор не было связано с образованием пептидами какого-либо нового типа вторичной структуры, отличного от ранее описанных одиночных и двойных спиралей грамицидина. Из литературных данных известно, что никакие грамицидиновые структуры не способны проводить что-либо крупнее ионов аммония, что, наряду с чрезвычайно высоким уровнем проводимости неселективных пор, указывало на их олигомерный характер. Т.е. формирование высокопроводящих структур было основано на локальном взаимодействии в мембране нескольких молекул КГА.

Исследование природы неселективных пор

Описано несколько механизмов нарушения пептидами проницаемости мембран при их локальной олигомеризации. Для конкретизации данного процесса у КГА нами были исследованы сопряжённость порообразования с индукцией пептидами трансбислойной диффузии липидов. Кроме того, была изучена временная зависимость мембранной активности пептидов.

Сравнение утечки красителя из липосом и флип-флопа, индуцированных КГА

Для выяснения возможности участия липидов мембран в формировании неселективных пор была исследована корреляция концентрационных зависимостей (от мольного соотношения липид/пептид – л/п) флип-флопа и утечки содержимого липосом.

Изучение процесса флип-флопа проводили с помощью синтезированного нами флуоресцентно-меченного липида 1-лауроил-2-(1-пиренбутироил)-sn-глицеро-3-

фосфатидилхолина (руРС). Выбор данного соединения из предложенных на сегодняшний день подходов к изучению флип-флопа и затраты на его целенаправленный синтез (не относившийся к основной задаче представленной работы) были оправданы высокой информативностью пиренил-липидов по сравнению с другими метками, в то время как использование в качестве основы короткоцепочечного липида позволяло быстро и эффективно формировать асимметрично-меченные липосомы. Перераспределение молекул пиренил-меченного липида между слоями мембран в процессе флип-флопа приводит к снижению концентрации метки в исходно содержащем её слое липидов и изменениям спектра флуоресценции эмульсии липосом, количественно пропорциональных уровню флип-флопа. Для оценки 100%-ого уровня флип-флопа были использованы спектры флуоресценции асимметрично-меченных липосом после 40 мин инкубации при 80°C.

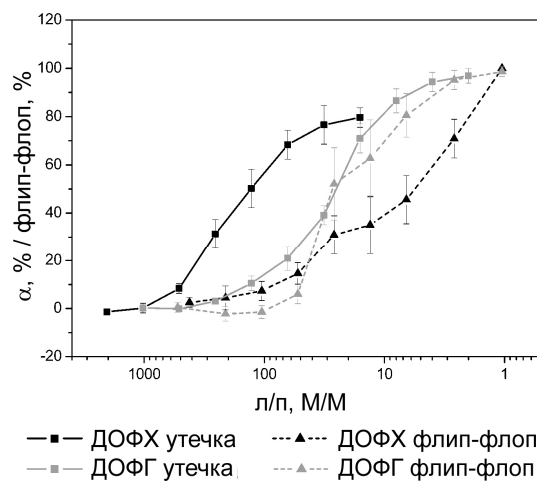


Рис. 3 Утечка КФ и флип-флоп, индуцированные пептидом РК4N на липосомах, сформированных из цвиттерионных липидов (ДОФХ – диолеилфосфатидилхолин) и анионных липидов (ДОФГ – диолеилфосфатидилглицерол).

Способность КГА индуцировать неселективную мембранную проводимость была исследована на липосомах, нагруженных карбоксифлуоресцеином (КФ) в концентрации самотушения. В данной системе нарушение мембранного барьера приводило к разбавлению красителя при его попадании в омывающий липосомы буфер и росту суммарной флуоресценции эмульсии. Для измерения 100%-ого уровня утечки красителя флуоресценцию измеряли после разрушения липосом детергентом Triton X100.

В целом, на основании влияния пептидов на вышеописанные системы (индукция пептидом РК4N флип-флопа, его сопряжённость с процессом утечки красителя из липосом, зависимость активности от заряда поверхности липосом (рис. 3)) в качестве механизма индукции КГА неселективной проводимости мембран следует

принять образование тороидальных пептид-липидных пор, в состав стенок которых помимо пептидов также входят полярные головки липидов.

Интересными результатами, требующими более подробного дальнейшего изучения, являлись пониженная порообразовательная активность катионных пептидов на анионных липосомах по сравнению с цвиттерионными, а также отличия в структуре пор на липосомах разного заряда, проявлявшиеся в селективности флип-флопа (аналогичные особенности характерны для тороидальных пор, образуемых широко известным катионным амфипатичным пептидным токсином мелиттином).

Временная зависимость мембранной активности КГА

Помимо изучения структуры формируемых КГА пор, для понимания механизма процесса индукции неселективной проводимости необходимо было выяснить движущие силы процесса порообразования, а именно, являются ли проводящие структуры результатом спорадической случайной агрегации молекул пептида при их диффузии в мембране (при этом частота появления каналов должна быть пропорциональна соотношению пептид/липид в мембране) или имеет место временное нарушение структуры мембран в процессе транслокации пептида, исчезающее после полного перераспределения молекул КГА между слоями мембраны.

Для этого нами было изучено количество доступного для восстановления дитионитом натрия (SDT) флуоресцентного красителя нитробензоксадиазола (NBD) в составе меченых липидов через разные промежутки времени инкубации симметрично-меченных липосом с пептидами. Данный подход предполагает измерение суммы эффектов, включающей затекание дитионита внутрь липосом через пептид-липидные поры и флип-флоп.

Исходя из полученных на пептидах PK4C и PK4N результатах, индукция неселективной проводимости была связана с двумя независимыми процессами. Было обнаружено, что количество доступного для восстановления красителя было заметно выше в случае добавления восстановителя вместе с пептидом, при этом в даль-

нейшем уровне активности выходил на плато (рис. 4). Т.е. при встраивании пептида в мембрану частота образования каналов (или их размеры) были выше, чем последующий стабильный уровень активности. Мы предположили, что данный эффект может быть связан с агрегацией пептида в растворе и с участием в индукции КГА неселективной проводимости, наряду с тороидальными порами, процесса, подобного «тонущему рафту», при первоначальном связывании пептидов с внешней поверхностью липосом.

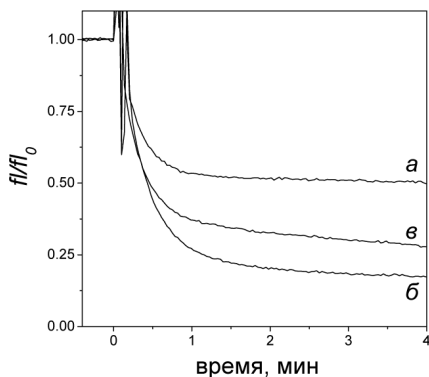


Рис. 4 Временная зависимость активности пептида PK4N на липосомах, приготовленных из смеси ДОФХ/1% NBD-олеоил-ФХ. Представлены кинетики гашения флуоресценции симметрично меченных липосом (а) при добавлении SDT, (б) при одновременном добавлении к липосомам SDT и пептида, (в) при добавлении SDT через 15 мин после добавления пептида. Соотношение пептид/липид = 1/256 моль/моль.

Агрегация КГА в растворе

Для реализации подобного механизма необходимо, чтобы с мембраной взаимодействовали не отдельные молекулы пептида, а крупные пептидные агрегаты. В целях проверки данной гипотезы, а также в рамках последующего изучения процесса комплексообразования с белками мы исследовали уровень агрегированности КГА (на примере пептида PK4N) в растворе. В качестве метода изучения нами была использована, как и при изучении связывания пептидов с белками в следующем разделе, флуоресцентная корреляционная спектроскопия. Данный подход основан на статистической обработке флуктуаций сигнала флуоресценции от микроскопического объема внутри образца в условиях регистрации сигнала от малого числа молекул. Последующее автокоррелирование временного сигнала интенсивности флуоресценции позволяет получить информацию о коэффициенте диффузии и концентрации флуоресцирующих частиц.

Как и ожидалось исходя из высокой гидрофобности и жёсткой структурированности грамицидинового домена, пептиды в растворе существовали в виде крупных конгломератов, размер которых мог составлять десятки нм (рис. 5), что подтвер-

ждало предложенную выше гипотезу о возможности реализации механизма «тонущего рафта» при связывании пептидов с мембранами.

Таким образом, весь процесс индукции КГА неselectивной проводимости мембран можно описать следующим образом: пептидные агрегаты, сорбируясь на мембране, приводят к кратковременному появлению сверхвысокопроводящих дефектов (по структуре, скорее всего, также представляющих собой пептид-липидные комплексы), после чего происходит равномерное распределение молекул пептида по всему объёму мембраны и периодически спонтанно появляются тороидальные поры.

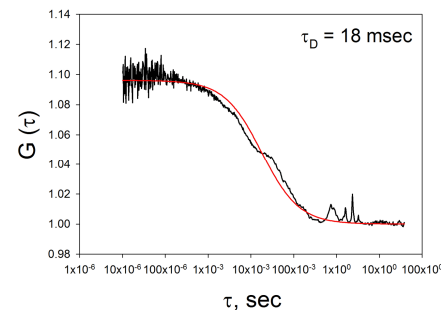


Рис. 5 Автокорреляционная функция родамин-меченного пептида РК4N. Наблюдаемое время диффузии $\tau_D = 18$ мсек сопоставимо с таковым 0,1 мкм липосом.

Формирование нековалентных комплексов с белками

Помимо изучения свойств пептидов-переносчиков, понимание процесса трансдукции невозможно без детального исследования их взаимодействия с белками, и в случае образования между ними комплексов – их взаимодействия с мембранами.

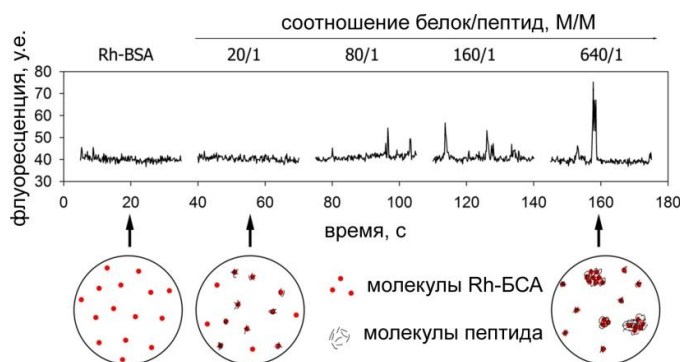


Рис. 6 Формирование нековалентных пептид-белковых комплексов.

Вверху. Флуктуации флуоресценции при разных соотношениях пептид/белок.

Внизу. Схематическое изображение соответствующих пептид-белковых агрегатов.

Взаимодействие КГА с белками изучали на примере пептида РК4N и родамин-меченного бычьего сывороточного альбумина (Rh-БСА) методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. В результате исследования был обнаружен постепенный рост размеров комплексов с увеличением соотношения концентраций пептида и белка в растворе, т.е. стехиометрия комплексов изменялась в

соответствии с соотношением пептид/белок. Данный результат проиллюстрирован на рис. 6, где в верхней части приведены записи флуктуаций флуоресценции для разного соотношения пептид/белок. Начиная с соотношения 80/1 в фокусе измерения наблюдается появление пиков с высокой амплитудой и большим временем диффузии, связанное с формированием крупных ярко флуоресцирующих частиц в результате пептид-белковой агрегации (рис. 6 внизу).

Взаимодействие пептид-белковых комплексов с искусственными мембранами

В рамках настоящей работы мембранную активность КГА в присутствии белков оценивали по утечке флуоресцентного красителя из липосом на примере пептида РК4N и БСА. Был показан ингибирующий эффект связывания белков с пептидами на мембранную активность последних. В то же время добавление даже очень большого количества белка не могло полностью подавить порообразовательную активность пептидов, что говорит о возможной мембранной активности комплексов.

При этом необходимо отметить, что полученные результаты носят предварительный характер и их однозначная интерпретация является весьма спорной (в частности, «мембранная активность комплексов» может являться результатом активности молекул пептида, десорбировавшихся с белка и оставшихся в мембране в процессе транслокации). В целом они могут рассматриваться как начало нового цикла исследований взаимодействия с модельными липидными системами нековалентных пептид-белковых комплексов.

Корреляция порообразующей и трансдукционной активности в ряду направленно модифицированных КГА

Необходимо отметить, что обнаружение у КГА способности формировать пептид-липидные поры само по себе вовсе не означает участие данного процесса в переносе белков. В связи с отсутствием достоверных методов для прямого иссле-

дования физико-химических основ процесса одновременного взаимодействия между пептидами, белками и липидами мембран, поиск взаимосвязи осуществляли косвенным путем через изучение зависимости структура-функция в ряду большой группы КГА по двум показателям: **порообразовательной активности на искусственных мембранных системах и эффективности пептид-опосредованного белкового переноса**. Вывод о наличии взаимосвязи между данными процессами делали на основании анализа корреляции влияния модификаций пептидов на два вышеуказанных варианта активности. Для оценки уровня порообразовательной активности использовали индукцию утечки красителя из липосом. Транспортную активность оценивали по трансдукции клеток HeLa β -галактозидазой. В качестве меры эффективности переноса рассматривали скорость разрушения субстрата о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида при его добавлении к клеточным лизатам. Данный субстрат разлагается с образованием окрашенного продукта, концентрация которого может быть оценена спектрофотометрически (т.е. оценивалась условная активность фермента (в у.е.) по поглощению клеточных лизатов, проинкубированных с субстратом).

Изученные аналоги по характеру модификаций можно разделить на несколько рядов: по возможности формирования димерной формы, по относительной локализации катионного и гидрофобного доменов, по составу и длине катионного и гидрофобного доменов. Также необходимо отметить, что в случае варьирования длины гидрофильного или гидрофобного доменов заранее предполагались слабые количественные изменения уровней активности, в связи с чем данные модификации рассматривались на больших сериях аналогов.

Уровень димеризации пептидов

Впервые индукция неселективной проводимости мембран была обнаружена при ковалентной димеризации цистеин-содержащих КГА в окислительных условиях. Детальный анализ влияния димеризации на проводимость мембран и уровень трансдукционной активности в присутствии КГА проводили в восстановительных условиях и на парах пептидов P10C – P5C и PK4N – PK4GN, в которых пептиды

P5C и PK4GN содержали остаток Gly вместо Cys на соответствующей позиции. Как видно из рис. 7, для проявления пептидами обоих вариантов активности димеризация носила индуцирующий, но не обязательный характер.

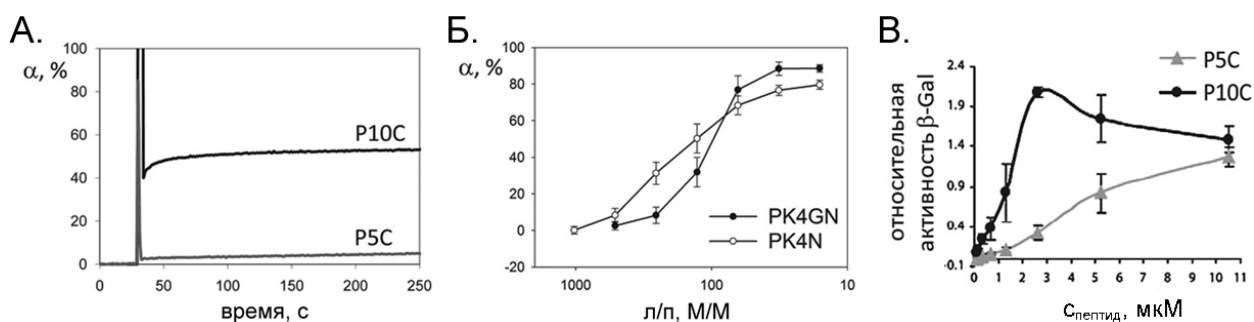


Рис. 7 Влияние перехода мономер-димер на мембранную (А и Б) и трансдукционную (В) активности КГА. А. Кинетика утечки КФ из липосом. Пептиды P10C и P5C. л/п = 256. В. Концентрационные зависимости уровня утечки КФ из липосом под действием пептидов PK4N и PK4GN. Липосомы приготовлены из ДОФХ. С. (из [1]) Трансдукция β-галактозидазы в клетки HeLa пептидами P10C и P5C.

Относительная локализация катионного и гидрофобного доменов

Из литературных данных известно, что локализация каких-либо модификаций на С или N-конце молекулы грамицидина, в связи с несимметричным распределением в ней аминокислот, может приводить к совершенно различному поведению полученных пептидов в мембранах. При рассмотрении пар КГА, идентичных по аминокислотному составу, но отличающихся по взаимному расположению доменов (ранее описанная пара P10C – P1N и новые аналоги PK4C – PK4N), было показано, что данный параметр не оказывает сколько-нибудь существенного влияния ни на мембранную, ни на трансдукционную активности (рис. 8).

Отсутствие влияния взаиморасположения доменов, с нашей точки зрения, является одним из наиболее значимых свидетельств в пользу общности механизмов порообразования и белкового транспорта. Если во всех остальных случаях предполагаемые изменения уровня активности внутри серий пептидов носят количественный характер и могут быть интерпретированы с разных точек зрения и этапов взаимодействия пептидов с белками или мембранами, то в случае данной моди-

фикации речь идёт о принципиальных моментах механизма реализации пептидами потенциала активности на искусственных мембранных системах и на клетках.

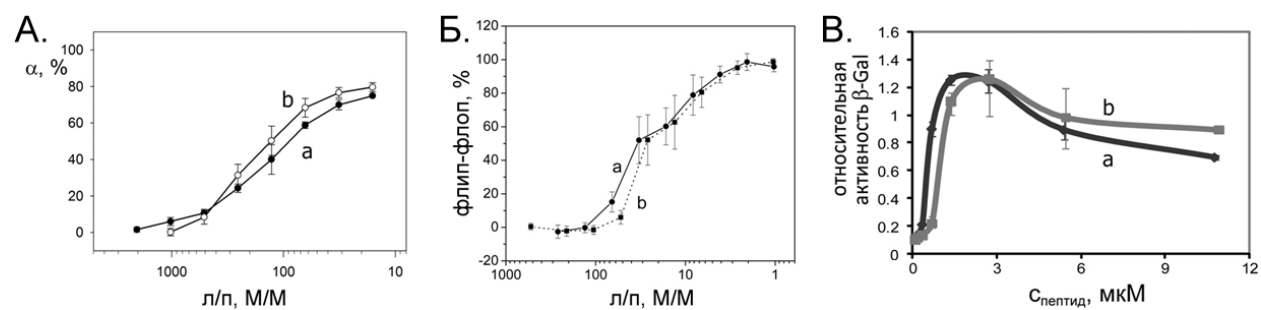


Рис. 8 Влияние взаимного расположения гидрофильного и гидрофобного доменов на активность КГА. (а) пептиды с С-концевым катионным доменом (P10C, PK4C). (b) пептиды с N-концевым катионным доменом (PIN, PK4N). **А.** Утечка КФ из липосом, приготовленных из ДОФХ. Пептиды PK4C (а) и PK4N (b). **Б.** Флип-флоп на липосомах, приготовленных из DOPG. Пептиды PK4C (а) и PK4N (b). **В.** (из [1]) Трансдукция β-галактозидазы в клетки HeLa пептидами P10C (а) и PIN (b).

Модификации катионного домена

Влияние состава катионного домена. Первоначально трансдукционная активность была показана для пептидов, содержащих в качестве катионного домена сигнал ядерной локализации обезьяньего вируса SV-40. На основании полученных в данной работе результатов (рис. 7, 8, 9), а также анализа ранее опубликованных данных [1], можно утверждать, что ни порообразовательная, ни транспортная активности не зависели от наличия какой-либо специфической последовательности в гидрофильном домене. Определяющим фактором для проявления пептидами обоих видов активности являлось содержание в нём основных аминокислот.

Длина катионного домена. Ранее было показано, что как порообразовательной, так и трансдукционной активностями обладают только положительно заряженные пептиды. Влияние на уровни активности величины заряда катионного домена было изучено на серии аналогов PK4N, PK6N, PK8N и PK10N с зарядом гидрофильного домена от +4 до +10. Как видно из рис. 9, и мембранная, и трансдукци-

онная активности изменялись пропорционально содержанию основных аминокислот.

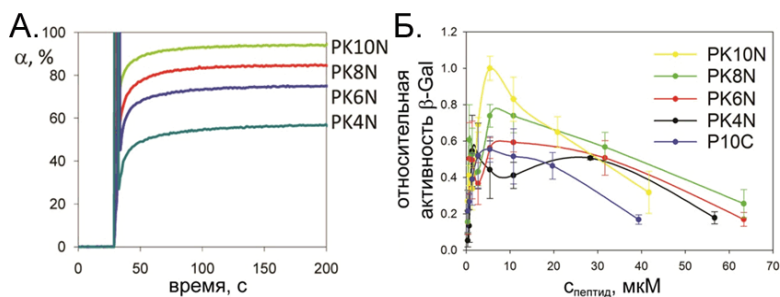


Рис. 9 Влияние длины катионного домена на активность КГА.

А. Утечка КΦ из липосом, приготовленных из ДОФХ. $l/n = 200$.

Б. Трансдукция β-галактозидазы в клетки HeLa.

Модификации гидрофобного домена

Длина гидрофобного домена. При введении в пептиды-транспортёры грамицидиновой последовательности мы предполагали возможность появления каких-либо новых свойств по сравнению с рер-1 благодаря большей длине гидрофобной части формируемых пептидами структур и их достаточности для пересечения гидрофобного слоя мембран. С целью изучения влияния на активность пептидов длины гидрофобного домена были синтезированы пептиды PS2C ÷ PS6C, которые имели в своём составе грамицидиновую последовательность, укороченную с С-конца (т.е. со стороны, содержащей остатки триптофана). Как видно из рис. 10, это приводило к снижению активности в обеих тестовых системах, при этом примечательным фактом является практически полное исчезновение активности у пептида PS4C, укороченного всего на 3 аминокислоты Trp – D-Val – Trp.

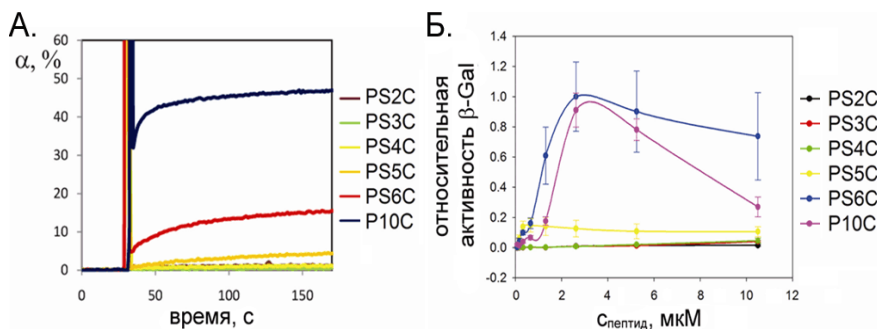


Рис. 10 Влияние длины гидрофобного домена.

А. Утечка КΦ из липосом, приготовленных из ДОФХ. $l/n = 200$.

Б. Трансдукция β-галактозидазы в клетки HeLa.

Таким образом, аналогично процессу порообразования, необходимым условием для проявления пептидами транспортной активности оказалась достаточная для перекрытия толщины мембраны длина пептидной спирали, что, очевидно, указывает на сходство механизмов данных процессов.

Замена остатков триптофана. Укорочение КГА по грамицидиновому домену, помимо снижения общей гидрофобности пептидов и длины гидрофобных спиралей, также приводило к уменьшению содержания в пептиде остатков Трп. В то же время, ранее в литературе встречались указания на возможную ключевую роль остатков Трп при взаимодействии с белками пептида *per-1*. Для проверки гипотезы о связи процесса переноса белков с длиной гидрофобного домена был синтезирован пептид РПеС, который вместо 2 концевых Трп содержал остатки Пе и по содержанию Трп соответствовал пептиду PS4С. Как видно из рис. 11, данный аналог сохранял как мембранную, так и трансдукционную активности практически на уровне исходного триптофан-содержащего пептида, в то время как его укороченный прообраз по содержанию Трп PS4С был практически неактивен в обеих тестовых системах (рис. 10). Т.е. исчезновение трансдукционной активности при укорачивании гидрофобного домена пептидов не было связано с уменьшением содержания в пептидах остатков Трп.

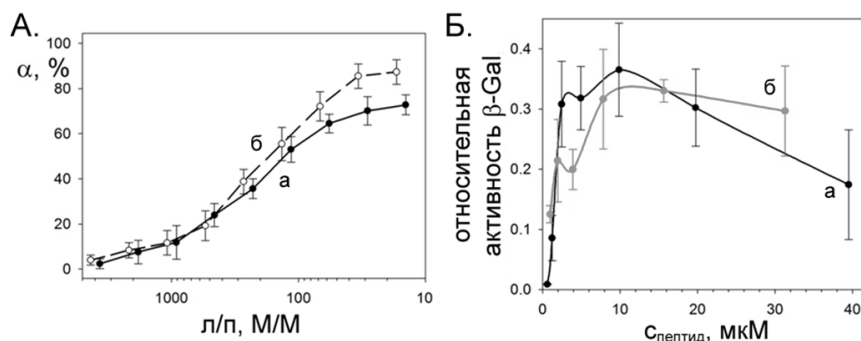


Рис. 11 Влияние замены остатков Трп на Пе. Пептиды PK4C (а) и PPeC (б). А. Утечка КФ из липосом, приготовленных из ДОФХ. Б. Трансдукция β-галактозидазы в клетки HeLa.

Таким образом, на всех вышеперечисленных сериях КГА была выявлена полная корреляция между порообразовательной активностью на искусственных мембранных системах и транспортной активностью на эукариотических клетках, что указывало на близость физико-химических механизмов, лежащих в их основе.

Сравнение механизмов трансдукционной активности *per-1* и КГА

Таким образом, в результате представленных в работе исследований обнаружено формирование неселективных пептид-липидных пор пептидами, способными образовывать с белками нековалентные комплексы и транспортировать их внутрь клеток. Кроме того, найдены косвенные доказательства (на основе влияния на

активность пептидов модификаций аминокислотной последовательности) взаимосвязи физико-химических основ процессов трансдукции и формирования неселективных пептид-липидных пор. В этом отношении КГА существенно отличаются от ранее описанного белкового переносчика рер-1, для которого в работах Энрикса и Кастаньо не было обнаружено каких-либо каналоподобных образований в мембране.

В представленной работе в качестве механизма индукции пептидами неселективной проводимости мембран предложено два связанных процесса: спорадическое формирование тороидальных пор при диффузном распределении молекул пептида в мембране и формирование дефектов (скорее всего, также пептид-липидной природы) при связывании с мембранами пептидных агрегатов.

КГА принципиально не отличаются от рер-1 по аминокислотному составу: обе группы пептидов имеют 2 домена, гидрофильный катионный и гидрофобный, обогащённый остатками триптофана. В то же время, данные пептиды сильно различаются по вторичной структуре: рер-1, согласно литературным данным, имеет достаточно лабильную структуру, содержащую элементы как неупорядоченной конформации, так и α -спирали и β -структуры, в результате чего молекулы рер-1 в растворе агрегированы достаточно слабо, тогда как молекулы КГА как в растворе, так и в липидном окружении содержат элементы жёстких упорядоченных гидрофобных грамицидиновых спиралей. Это обстоятельство приводит к формированию КГА в водной среде крупных агрегатов, что позволяет пептиду в месте встраивания в мембрану достигать локальной концентрации, достаточной для порообразования, тогда как рер-1 встраивается в мембрану более равномерно, что снижает возможность локального массового дисбаланса.

Помимо уровня агрегации, включение в состав КГА грамицидиновой последовательности приводит к сильному увеличению длины гидрофобной области молекулы по сравнению с рер-1. Длина гидрофобной α -спирали рер-1 составляет максимум 19,5 Å, т.е. он просто физически не способен пересечь гидрофобный

слой мембраны ($\sim 40 \text{ \AA}$). При этом КГА, благодаря особенностям грамицидинового домена, способны формировать спиральные димеры и двойные спирали, длины которых вполне достаточно для перекрывания гидрофобного слоя мембраны (при этом уменьшение этой длины приводит к резкому падению порообразовательной активности). Т.е., по-видимому, особенностью, определяющей возможность формирования неселективных пор КГА и их отсутствие у рер-1, является наличие в составе КГА грамицидинового домена.

Рассмотрим теперь более подробно процесс белковой трансдукции. Если предполагать, что для проникновения белков через мембрану необходимо формирование некоторого аналога олигомерных пептид-липидных пор или локальный массовый дисбаланс, должен существовать механизм, способствующий агрегации пептидов на мембране в месте проникновения. Очевидно, что при условии формирования пептид-белковых комплексов подобными центрами агрегации пептида могут являться сами молекулы белка, что и обеспечит наличие достаточного для формирования неселективной поры количества молекул пептида в месте проникновения. В то же время, в этом случае становится очевидным, что для проявления трансдукционной активности пептиду не обязательно иметь мембранную активность самому по себе, т.к. если последняя обеспечивается склонностью пептида к самоагрегации, то для транспортной активности достаточным условием может являться сорбция пептида на поверхности белка. Вероятно, данная ситуация и реализуется в случае пептида рер-1.

Примерная схема механизма трансдукции нековалентными пептидными векторами приведена на рис. 12. Схема построена на основе механизма, ранее предложенного для рер-1, с дополнениями и уточнениями, полученными в результате данной работы.

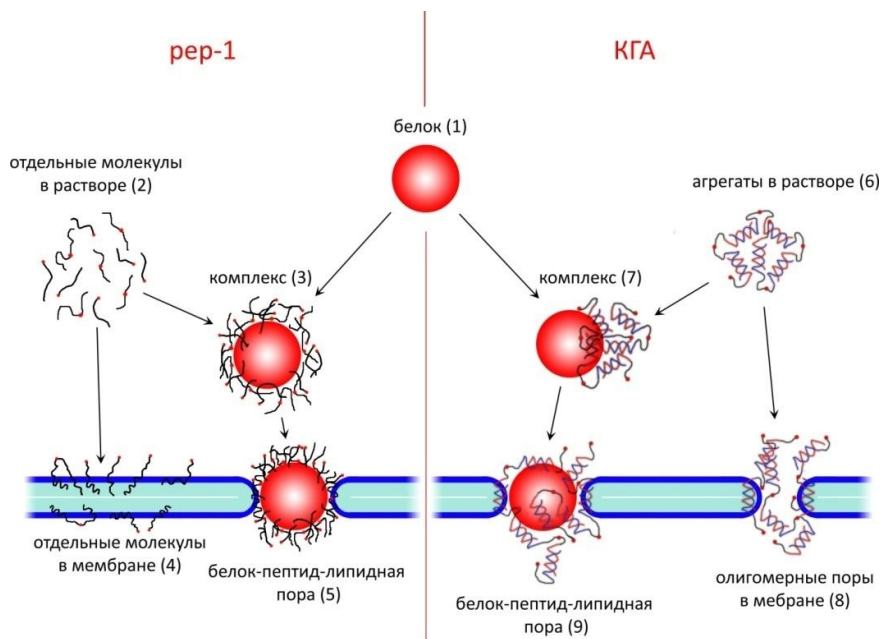


Рис. 12. Механизм активности нековалентных пептидов-переносчиков.

Слева. Активность *per-1*.
Справа. Активность КГА. Маленькими красными кружками на пептидах обозначены SH-группы или S-S мостики при их ковалентной димеризации.

Описание в тексте.

Активность КГА. КГА ввиду высокой гидрофобности и оформленной вторичной структуры (для упрощения схемы все молекулы КГА представлены в виде двойных спиралей) уже в растворе находится в агрегированном состоянии (6). Кроме того, агрегация может стимулироваться ковалентной димеризацией пептида через образование S-S связей. При взаимодействии подобных агрегатов с мембраной, а также при диффузном распределении пептида происходит формирование пептид-липидных олигомерных пор (8). Формирование комплекса пептидного агрегата с молекулой белка (7) обеспечивает высокую концентрацию пептида в потенциальной точке проникновения белка через мембрану и, соответственно, возможность формирования белок-пептид-липидного комплекса (9), по структуре сходного с неселективными порами (8).

Активность *per-1*. Пептид *per-1* в отсутствие белка представлен в виде мономеров или ковалентных димеров в различной конформации, слабоагрегированных в растворе (2) и не агрегированных в мембране (4). Появление белковой глобулы стимулирует агрегацию пептида через сорбцию на её поверхности (3), что приводит к повышению локальной концентрации пептида в месте взаимодействия комплекса с мембраной и формированию белок-пептид-липидной каналоподобной структуры (5). Необходимо отметить, что представленное на рис. 12 образование

белок-пептид-липидной поры для рер-1 (5) пока ещё не подтверждено экспериментально и изображено по аналогии с таковым для КГА.

Выводы:

1. Синтезированы 5 ранее описанных и 12 новых химерных пептидов, включающих гидрофобный домен на основе последовательности грамицидина А, модифицированный с N или C-конца гидрофильной катионной или анионной последовательностью.
2. На примере нескольких типичных представителей исследовано взаимодействие амфипатичных грамицидиновых аналогов с искусственными мембранными системами. Наряду с ранее показанной для подобных пептидов способностью формировать грамицидин-подобные катион-селективные каналы, при высоких концентрациях пептидов обнаружена индукция неселективной проводимости мембран.
3. На основании участия молекул липидов и ряда других признаков в качестве механизма индукции неселективной проводимости предложено формирование катионными производными грамицидина А структурных аналогов тороидальных пептид-липидных пор. Кроме того, в качестве дополнительного механизма предложена индукция каналообразования по аналогии с процессом т.н. «тонущего рафта» при взаимодействии с мембранами пептидных агрегатов.
4. Методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии подтверждено ранее описанное образование нековалентных комплексов с белками. Обнаружен постепенный рост размеров комплексов с увеличением соотношения концентраций пептида и белка в растворе, т.е. стехиометрия комплексов изменялась при изменении соотношения пептид/белок.
5. В ряду 16 катионных производных грамицидина А выявлена высокая степень корреляции между порообразованием и транспортной активностью, свидетельствующая о близости физико-химических механизмов этих двух процессов.
6. Предложен механизм белковой трансдукции, основанный на экстраполяции мембранной активности пептидов на взаимодействие с липидными бислоями

пептид-белковых комплексов. В предложенной системе в качестве определяющего момента процесса переноса предполагается формирование пептид-белковых комплексов в растворе как механизм, обеспечивающий повышенную и достаточную для формирования каналоподобного образования концентрацию пептидов в месте взаимодействия комплекса с мембраной.

Цитируемая литература

[1] Стоилова ТБ, Синтез и свойства химерных мембрано-активных пептидов на основе грамицидина А, автореф. дис. канд. биол. наук, ИБХ РАН - М., 2008- 23 стр.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Antonenko YN, Stoilova TB, **Kovalchuk SI**, Egorova NS, Pashkovskaya AA, Sobko AA, Kotova EA, Sychev SV, Surovoy AY, Large unselective pore in lipid bilayer membrane formed by positively charged peptides containing a sequence of gramicidin A, FEBS Lett. 2005, 579 (23), 5247-5252.
2. Antonenko YN, Stoilova TB, **Kovalchuk SI**, Egorova NS, Pashkovskaya AA, Sobko AA, Kotova EA, Surovoy AY, Redox-regulated ion channel activity of a cysteine-containing gramicidin A analogue, Biochim Biophys Acta. 2006, 1758 (4), 493-498.
3. Стоилова ТБ, Дуцева ЕА, Пашковская АА, Сычев СВ, **Ковальчук СИ**, Собко АА, Егорова НС, Котова ЕА, Антоненко ЮН, Суровой АЮ, Иванов ВТ, Различные типы ионных каналов, индуцированные в липидных мембранах производными грамицидина А, несущими на С-конце катионную последовательность, Биоорг. химия 2007, 33 (5), 511-519
4. Stoilova TB, **Kovalchuk SI**, Egorova NS, Surovoy AY, Ivanov VT, Gramicidin A-based peptide vector for intracellular protein delivery, Biochim Biophys Acta. 2008, 1778 (10), 2026-2031.
5. **Kovalchuk SI**, Kotova EA, Stoilova TB, Sychev SV, Egorova NS, Surovoy AY, Antonenko YN, Ivanov VT, Positively charged gramicidin A based peptides form

two types of membrane channels, *Adv Exp Med Biol*, The proceedings of the 20th American Peptide Symposium 2007, (Valle S, Escher E, Lubell WD, Eds.), 2009, 611, 565-566.

6. Собко АА, **Ковальчук СИ**, Котова ЕА, Антоненко ЮН, Индукция флип-флопа липидов колицином Е1 – признак образования белково-липидных пор в мембранах липосом, *Биохимия*, 2010, 75 (6), 819-826.

Тезисы докладов

1. Stoilova TB, **Kovalchuk SI**, Egorova NS, Antonenko YN, Surovoy AY, Ivanov VT, Cationic motif linked to gramicidin A induced protein delivery into cells, Abstract book of the 2nd workshop on Biophysics of Membrane-active peptides, Lisbon, Portugal, 2007, 113.
2. Петрова АС, Толчева ЕВ, **Ковальчук СИ**, Стоилова ТБ, Егорова НС, Иванов ВТ, Внутриклеточная доставка белковых молекул с помощью поликатионных аналогов грамицидина А, Тезисы докладов 4-ого Российский симпозиум "Белки и пептиды", Казань, 2009, 70.
3. **Ковальчук СИ**, Толчева ЕВ, Петрова АС, Егорова НС, Стоилова ТБ, Антоненко ЮН, Суровой АЮ, Иванов ВТ, Каналоформерная активность как возможный механизм внутриклеточной дотавки белков нековалентными пептидными векторами на основе поликатионных аналогов грамицидина А, Тезисы докладов 4-ого Российского симпозиума "Белки и пептиды", Казань, 2009, 202.
4. **Kovalchuk SI**, Tolcheva EV, Petrova AS, Egorova NS, Stoilova TB, Kotova EA, Antonenko YN, Surovoy AY, Ivanov VT, Channel-forming activity as a possible pathway of intracellular protein delivery mediated by noncovalent peptide vectors based on polycationic gramicidin A analogues, Abstracts of the 3rd International Symposium "Intracellular Delivery of Theuraputic Molecules: from bench to bedside", Montpellier, France, 2009, 60.