

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ ПОР
В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ МОДУЛЬНЫМИ НАНОТРАНСПОРТЕРАМИ,
СОДЕРЖАЩИМИ ТРАНСЛОКАЦИОННЫЙ ДОМЕН
ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА**

© 2008 г. А. А. Розенкранц, Ю. В. Храмцов, Г. А. Трусов,
член-корреспондент РАН Н. В. Гнучев, А. С. Соболев

Поступило 15.04.2008 г.

В последнее время все большее внимание уделяется разработке нанотранспортеров для направленной доставки противоопухолевых препаратов в раковые клетки. Большинство из этих нанотранспортеров использует процесс рецепторопосредованного эндоцитоза, который позволяет, с одной стороны, добиться клеточной специфичности, путем включения в состав транспортеров лиганда к определенному интернализуемому рецептору, а, с другой стороны, позволяет нанотранспортеру проникнуть в клетку. Нанотранспортер при этом оказывается внутри эндосом, что препятствует его дальнейшему продвижению к месту назначения. Эту проблему можно решить включением в нанотранспортер специального модуля, например, транслокационного домена дифтерийного токсина, который способствует выходу транспортера из этих везикул при слабых кислотных рН. Принято считать, что дифтерийный токсин полностью разворачивает свой каталитический домен при транспорте через мембрану [1, 2]. Химические конструкции, содержащие транслокационный домен (Т) дифтерийного токсина, часто не могут быть легко и обратимо развернуты, например, из-за наличия дисульфидных связей, сохраняя тем не менее способность проходить через мембраны эндосом и достигать места назначения [3, 4]. Механизм такого проникновения представляет значительный интерес при исследовании внутриклеточного транспорта макромолекул, содержащих Т; этот механизм впервые исследован в настоящей работе, и показано, что нанотранспортер может образовывать в липидном бислое поры, существенно превышающие размер модульных нанотранспортеров.

Для работы были наработаны и очищены [3, 4] модульные нанотранспортеры (МН) общей схемы Т-НМР-NLS-LM, где Т – транслокационный домен дифтерийного токсина, эндосомолитический модуль; НМР – гемоглобиноподобный белок *E. coli*, модуль-носитель; NLS – оптимизированный сигнал ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV40, модуль, направляющий транспортер в ядро; LM – лигандный модуль (α -меланоцитстимулирующий гормон, α MSH, или эпидермальный фактор роста, EGF).

Однослойные липосомы из яичного лецитина были приготовлены, как описано ранее [5], в буфере (20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 7.5). Поддерживаемые липидные бислои готовили с помощью слияния везикул на подложке [6]. 100 мкл суспензии липосом (3–5 мкг/мл) наносили на свежерасщепленную слюду и инкубировали 15 мин в жидкостной ячейке при комнатной температуре. Затем образец отмывали свежим буфером с pH 7.5 и проверяли качество бислоя при помощи сканирующего зондового микроскопа с контроллером Nanoscope IIIa (“Veeco Instruments”, США), укомплектованного J-сканером с кантилеверами NP-S с номинальной константой жесткости 0.06 Н/м. Для снятия кривых силы измеряли реальную константу жесткости кантилевера [7]. Эксперименты проводили в контактном режиме и режиме прерывистого контакта (частота колебаний кантилевера ~9 кГц) при комнатной температуре и скорости сканирования 2–4 Гц, с разрешением 512 × 512 точек.

МН вызывает выход кальцеина из липосом, нагруженных этим красителем [4], в двух диапазонах pH. При pH 3–4.5 он может быть связан с действием НМР, который в этом диапазоне проявляет свою мембранную активность [3]. Второй диапазон мембранной активности – 5.5–6.5 – близок к pH эндосом [8] и может быть объяснен активностью Т.

Предварительно проведенные нами исследования показали, что при pH 7.5 МН связываются

*Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова*

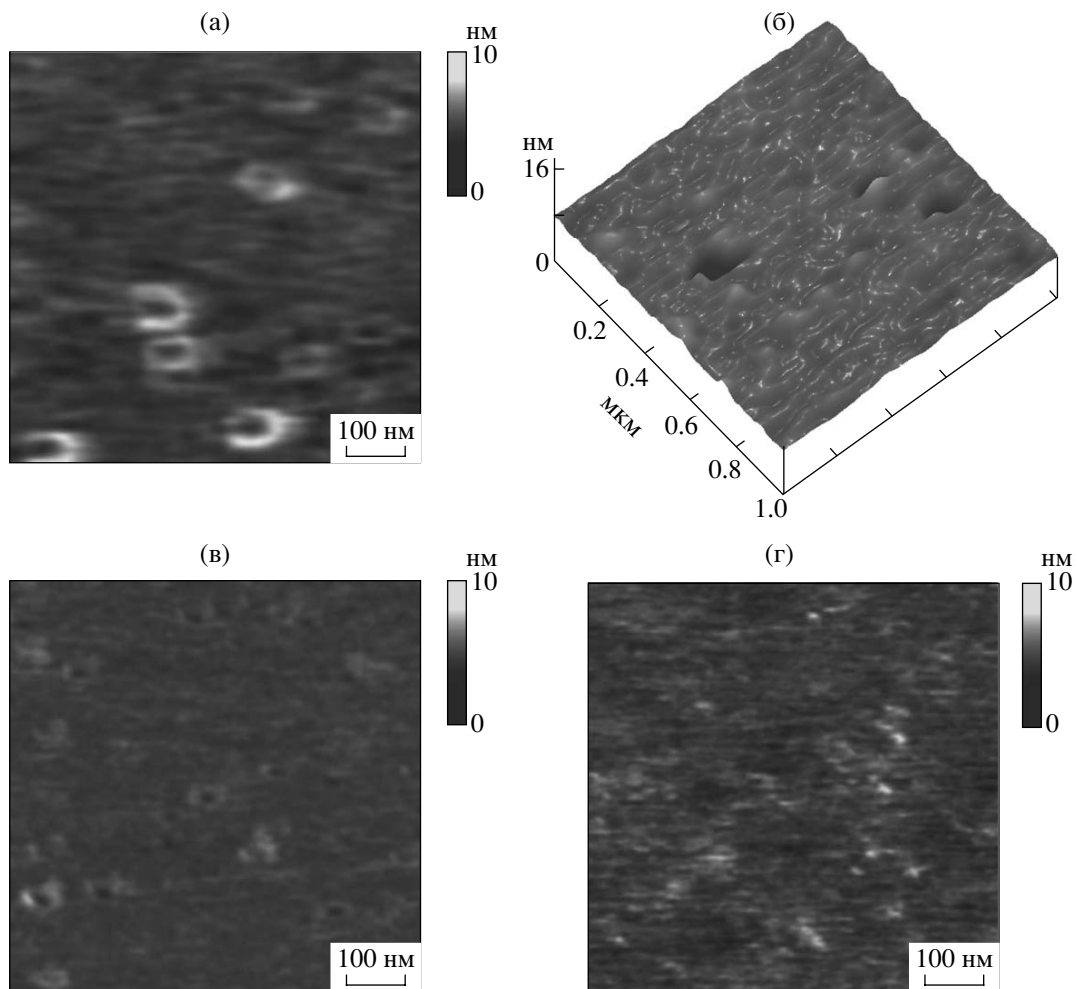


Рис. 1. Действие 5 мМ МН на поддерживаемый липидный бислоем из яичного фосфатидилхолина при pH 5.5. а – Т-НМР-NLS-EGF, режим прерывистого контакта, б – Т-НМР-NLS-EGF, контактный режим, в – НМР-NLS- α MSH, режим прерывистого контакта, г – Т, режим прерывистого контакта.

с липидным бислоем. Причем, согласно данным атомно-силовой микроскопии, в бислое при этом не образуется существенных дефектов. При закислении среды до pH 5.5 через 5–15 мин в содержащем МН липидном бислое образуются кольцевые структуры с характерным диаметром 30–50 нм (рис. 1а), что указывает на склонность МН к олигомеризации в бислое. Через 40–60 мин в поддерживаемых лецитиновых бислоях при pH 5.5 начинают возникать флуктуирующие поры с характерным диаметром от 50 до 200 нм (рис. 1б). Глубина этих пор составляет 35–50 Å, что отвечает толщине данного липидного бислоя. Эти поры были частично окружены валиками.

Интересно отметить, что кольцевые структуры меньшего размера образуются при pH 5.5 и при добавлении к поддерживаемым бислоям неполного МН, лишённого транслокационного домена DT, НМР-NLS- α MSH (рис. 1в). Это наблюдение указывает на то, что за их образование, возможно,

ответствен не Т, а другой модуль, обладающий мембранной активностью – НМР. Сам по себе Т, хотя и может агрегироваться в бислое или на его поверхности (рис. 1г), не вызывает образования кольцевых структур подобного вида и размера.

Не было обнаружено образования крупных флуктуирующих пор при pH 5.5 как для МН, лишённых Т (рис. 1в), так и для отдельного Т, который вызывает только нарушение однородности поверхности бислоя через 40–60 мин после добавления (рис. 1г). Таким образом, можно заключить, что возникновение флуктуирующих пор обусловлено действием двух мембраноактивных доменов Т и НМР. Диаметр этих пор (50–200 нм) существенно превышает размеры МН, благодаря чему не связавшиеся с бислоем молекулы МН могут, по-видимому, выходить из эндосом и достигать места своего назначения.

С помощью биоспецифической атомно-силовой микроскопии было показано, что наблюдае-

мые на бислое возвышенности, которые образуют кольцевые структуры и часто видны рядом с флуктуирующими порами, образованы молекулами МН. Для этого зонд кантилевера был модифицирован аффинно очищенными кроличьими антителами к МН [9] и были получены кривые силы для взаимодействий этого зонда с липидным бислоем и с МН на липидном бислое. Кривые силы представляют собой зависимости отклонения кантилевера (зная константу его жесткости, можно рассчитать силу взаимодействия) от расстояния между зондом и образцом. В качестве контроля изучены взаимодействия между зондом, модифицированным неспецифическими антителами (анти- β -галактозидаза), и МН на липидном бислое. Оказалось, что средняя сила специфического взаимодействия МН–антитело составляет 192 ± 23 пН, что характерно для специфических взаимодействий антиген–антитело [10].

Известно, что при сканировании зондом, модифицированным антителами (или антигеном), на подложке в режиме прерывистого контакта из-за взаимодействий антиген–антитело наблюдается увеличение кажущейся высоты сканируемых объектов на 1–2 нм [11]. При сканировании немодифицированным зондом лецитиновых бислоев, содержащих МН, при рН 5.5 было показано наличие трех типов частиц со средними высотами 1.1, 2.2 и 4.4 нм. Три типа частиц наблюдаются и при сканировании в режиме прерывистого контакта зондом, модифицированным антителами к МН. Но при этом их кажущиеся высоты достоверно больше на 1–2 нм: 2.0 ($p < 0.001$), 4.3 ($p < 0.05$) и 7 нм. Следовательно, все эти частицы образованы молекулами МН и, судя по их средней высоте, представляют собой молекулы МН, встроенные в бислою, адсорбированные на поверхности бислоя и образующие агрегаты на поверхности бислоя.

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что МН, содержащие Т, могут при закислении среды до рН 5.5 образовывать в бислоях поры, окаймленные МН. Эти поры достаточны для выхода МН через них; образование таких пор не характерно как для МН, не содержащих Т, так и для Т отдельно и, скорее всего, они являются результатом совместного мембраноактивного действия модуля Т и НМР – гемоглобиноподобного белка *E. coli*.

Данная работа поддержана грантами РФФИ 06–04–49273, CRDF (США) № RUB–02–2663–MO–05 и NWO (Нидерланды) № 047.017.025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oh K.J., Senzel L., Collier R.J., Finkelstein A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 15. P. 8467–8470.
2. Ratts R., Zeng H., Berg E.A. et al. // J. Cell Biol. 2003. V. 160. № 7. P. 1139–1150.
3. Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V. et al. // FASEB J. 2003. V. 17. № 9. P. 1121–1123.
4. Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V. et al. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 21. P. 10534–10540.
5. Szoka F. Jr., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 9. P. 4194–4198.
6. Puntheeranurak T., Stroh C., Zhu R. et al. // Ultramicroscopy. 2005. V. 105. № 1/4. P. 115–124.
7. Tortonese M., Kirk M. // Proc. SPIE. 1997. V. 3009. P. 53–60.
8. Ceresa B.P., Schmid S.L. // Curr. Opin. Cell Biol. 2000. V. 12. № 2. P. 204–210.
9. Roes S., Mumm F., Seydel U., Gutschmann T. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 5. P. 2757–2763.
10. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 8. P. 3477–3481.
11. Raab A., Han W., Badt D. et al. // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. № 9. P. 901–905.