

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ И ПОГЛОЩЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕПТИДНЫМ ЛИГАНДОМ ЛИПОСОМ КЛЕТКАМИ РС12.

П. Г. ЛОХОВ*, О. М. ИПАТОВА, О. Ю. АБАКУМОВА, Т. А. ЦВЕТКОВА,
В. Н. ПРОЗОРОВСКИЙ.

Институт Биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва, ул.Погодинская,
д.10 факс (095)245-0857

В данной работе исследовали возможность использования пептидного лиганда для специфической адсорбции и эндоцитоза липосом клетками. Синтезированный пептид, соответствующий 139-158 аминокислотам апопротеина Е способен устойчиво связывать липосомы с рецептором, что приводит к рецептор-опосредованному эндоцитозу их клетками РС12.

Ключевые слова: липосомный вектор, пептид, аполипопротеин Е, лиганд-рецепторное взаимодействие, феохромоцитома.

ВВЕДЕНИЕ. Включение лекарственных веществ в липосомы является способом их защиты от периферической биотрансформации, который применяется для увеличения времени их циркуляции в кровотоке и снижения терапевтической дозы [1]. Поскольку липосомы при внутривенном введении преимущественно аккумулируются в печени и селезенке [2], где они подвергаются биодegradации ретикулоэндотелиальной системой (РЭС), то представляет интерес связывание липосом за время их циркуляции в крови [3] с поверхностью клеток тканей-мишеней посредством лиганд-рецепторного взаимодействия, что может внести селективность в доставку транспортируемых ими лекарственных веществ. Ввиду высокой токсичности и широкого спектра побочных проявлений химиотерапевтических средств, представляется наиболее актуальным исследование взаимодействия липосомного вектора с опухолевыми клетками, которые в большинстве случаев имеют высокую экспрессию рецепторов к аполипопротеинам [4,5]. Известно, что ацилированный пептид, включающий в себя центр взаимодействия апопротеина Е с рецептором, способен принимать в липидном окружении конформацию α -спирали и являться лигандом к аполипопротеиновому рецептору [6]. Также показано, что пространственная интеграция пептидов из указанного участка апопротеина Е приводит к эффекту потенцирования их связывания при взаимодействии с рецептором [6,7].

В настоящей работе мы показали, что синтезированный нами пептид, соответствующий 139-158 аминокислотным остаткам человеческого аполипопротеина Е (Ser-His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Gln-Lys-Arg), конъюгированный с пальмитиновой кислотой и встроенный в липидный бислой, способен *in vitro* устойчиво связываться с рецептором клеток феохромоцитомы крысы РС12, что приводит к рецепторно-опосредованному эндоцитозу липосом.

МЕТОДИКА. Синтез пептида. Пептид синтезировали твердофазным методом Меррифилда с использованием Fmoc-защищенных аминокислот

(NovaBiochem, Швейцария) на автоматическом пептидном синтезаторе Peptide Synthesizer 431A (Applied Biosystems, США), используя N-гидроксibenзотриазол/карбодимидный метод активации аминокислот. Процесс синтеза контролировали тестом Кайзера [8].

Анализ пептида. Образец пептида, очищенный методом ВЭЖХ (хроматограф Beckman, США) на колонке Ultropac Column TSK ODS - 120T, 5 мкм, 4,6 x 250 мм (LKB, Швеция), анализировали на белковом секвенаторе Protein Sequencing System (MilliGen/Biosearch, США) методом последовательной пептидной деградации по Эдману.

Конъюгирование пептида с жирной кислотой. Пальмитиновую кислоту (Sigma, США) конъюгировали с использованием активации N-гидроксibenзотриазол / карбодимидного метода с N-концом пептида до снятия его с твердой фазы и депротекции боковых радикалов аминокислотных остатков. Процесс конъюгирования контролировали тестом Кайзера [8].

Анализ и очистка конъюгата. Конъюгат пептида и пальмитиновой кислоты очищали методом ВЭЖХ (Altex Model 324, США) на колонке Ultrasphere - ODS, 5 мкм, (10 мм ID x 15 см) (Altex, США) в градиенте изопропанола от 30 до 100% в течении 1 часа. Элюенты удаляли последовательной обработкой на роторном испарителе и лиофилизацией. Очищенный конъюгат подвергали гидролизу в вакуумированной ампуле 24 часа в 6N HCl при 110°C. Содержание аминокислот определяли на том же хроматографе на колонке Ultrasphere - I.P., 5 мкм, (4,6 мм x 15 см) (Altex, США) с предколоночной модификацией гидролизата фенилизотиоцианатом [9].

Получение липосом. Препарат фосфолипидов выделенных из сои Nathin SM-100 (Natterman, Германия, состав: 24 % фосфотидилхолина, 1% фосфотидилэтанолamina, 2% фосфатидной кислоты, 2% других фосфолипидов, 1% воды, 70% мальтодекстрана) смешивали в массовом соотношении 150: 1 (по массе) с флуоресцентным N-(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил) димиристоил фосфотидилэтанолamiном (Avanti Polar-Lipids, США) в присутствии хлороформа (10 мл хлороформа на 100 мг фосфолипидов) [10]. Хлороформ отгоняли на роторном испарителе при 60 °C. Униламеллярные липосомы формировали в культуральной среде RPMI-1640 (30 мг фосфолипидов на 1 мл среды RPMI-1640) методом ультразвуковой дезинтеграции. Растворенный в среде RPMI-1640 конъюгат пептида и жирной кислоты постепенно, при перемешивании, добавляли к половине полученных липосом (6 мг конъюгата на 100 мг фосфолипидов). Ко второй половине липосом добавляли эквивалентный объем среды не содержащий конъюгата. Диализ полученных липосом против 100-кратного избытка среды RPMI-1640 проводили дважды по 12 часов.

Культура клеток. Клетки феохромоцитомы крысы PC12 культивировали в 24 луночных планшетах при 37° C в атмосфере 5% CO₂ в среде RPMI-1640(ПанЭко, Россия) содержащей L-глутамин (2 мМ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 50 мкг/мл гентамицина. Через 3 дня после пассирования клетки промывали раствором Эрла и меняли ростовую среду на среду RPMI-1640 с 0,5% ЭТС. Перед опытом клетки промывали раствором Эрла. Подсчет количества клеток осуществляли после их окраски кристалл виолетом [11].

Исследование взаимодействия липосом с рецептором аполипопротеина E. В предварительно охлажденную до 4° C плашку с культурой клеток вносили по 300 мкл на 1 лунку охлажденных до 4° C липосом (в опыте - липосомы со встроенным конъюгатом и в контроле- липосомы не содержащие конъюгат). Инкубацию проводили в течении одного часа при 4°C. По окончании инкубации клеточный монослой промывали 7 раз ледяным раствором Эрла. Затем клетки лизировали раствором Эрла содержащем 3% Тритон X-100 (Bio-Rad, США). Лизаты клеток флуориметрировали при длине волны возбуждения 460 нм и длине волны эмиссии

534 нм [10] на спектрофлуориметре Luminescence Spectrometer LS 50B (Perkin-Elmer, Англия).

Исследование эндоцитоза липосом опухолевыми клетками. Для исследования эндоцитоза липосомы инкубировали с клетками 5 часов при 37° С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Дальнейшую обработку проводили как описано выше. Для удаления липосом, связавшихся специфически и неспецифически с поверхностью клеток использовали раствор Эрла с 2М мочевиной (Serva, Германия). Представленные результаты являются средним значением ± стандартные отклонения из четырех независимых опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Высокая тропность липопротеинов к надпочечникам [12] позволяет предположить наличие у клеток PC12 (опухолевые клетки из нейроэндокринной ткани надпочечников крысы) повышенной экспрессии рецепторов к аполипопротеинам. Для создания липосомного вектора к клеткам с высокой экспрессией этого рецептора мы синтезировали пептид, соответствующий 139 - 158 аминокислотам апопротеина E, способный в липидном окружении принимать необходимую для взаимодействия с рецептором конформацию α -спирали и усиливать специфическое связывание липосом клетками потенцированием при мультилигандном взаимодействии [6,7]. Для повышения экспрессии этих рецепторов клетки помещали в среду с низким содержанием сыворотки [7]. Для исключения конкуренции липосом с аполипопротеином E все опыты проводили в бессывороточной среде. Инкубация липосом с клетками при 4° С в течение 1 часа исключала эндоцитоз [13] и позволила оценить связывание липосом с рецептором. Увеличение в 2,5 раза связавшихся липосом в опыте по сравнению с контролем (неспецифическим связыванием) свидетельствует об имевшей место специфической рецепторно-опосредованной адсорбции липосом клетками (рис. 1, А).

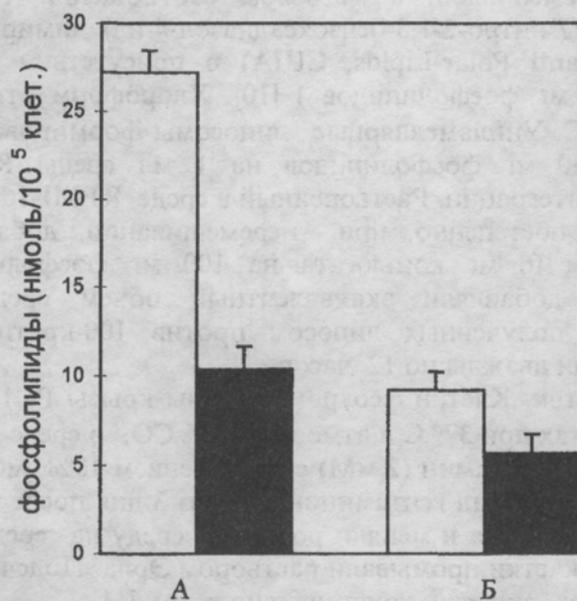


Рисунок 1.

Исследование взаимодействия липосом с клетками PC12. А - связывание липосом клетками; Б - эндоцитоз липосом клетками; 1 - липосомы со встроенным лигандом; 2 - липосомы, не содержащие лиганда.

Проведение инкубации липосом с клетками в течение 5 часов [13] с последующей обработкой 2М мочевиной, позволило оценить уровень эндоцитоза опытных и контрольных липосом (рис. 1, Б). Результаты эндоцитоза в опыте и контроле равны $9,20 \pm 1,08$ и $5,69 \pm 1,08$ нмоль фосфолипидов, соответственно. По разнице между этими данными можно оценить степень рецепторно-опосредованного

эндоцитоза, который соответствует 3,51 нмоль фосфолипидов на 10^5 клеток за 5 часов. Данные, полученные в контроле, соответствуют неспецифическому поглощению липосом и представляют, как показано в опытах *in vivo*, значимые величины, кроме РЭС печени и селезенки, только у опухолевых клеток [2]. Исходя из представленных результатов можно предположить наличие *in vivo* селективного поглощения полученных нами лиганд-модифицированных липосом клетками с повышенной экспрессией рецепторов к аполипопротеину Е (паренхиматозными клетками надпочечников, печени [12] и в значительной степени опухолевыми клетками [4,5]) и снижения их неспецифического поглощения и биодegradации РЭС (макрофагами печени и селезенки).

ЛИТЕРАТУРА.

1. Gregoriadis G. (1995). Trends in Biotechnology, **13**, 527-537.
2. Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A. et al. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88** (24), 11460-11464.
3. Harvie P., Desormeaux A., Bergeron M.C., Tremblay M., Beauchamp D., Poulin L., Bergeron M.G. (1996). Antimicrob. Agents Chemother., **Jan 40**(1), 225-229.
4. Lombardi P., Norata G., Maggi F.M., Cinti G., Franco P., Nicolini A., Catapano A.L. (1989). Biochim. Biophys. Acta, **1003**(3), 301-306.
5. Vitols S., Gahrton G., Ost A., Peterson C. (1984). Blood, **63**(5), 1186-1193.
6. Mims M.P., Darnule A.T., Tovar R.W., Pownall H.J., Sparrow D.A., Sparrow J.T., Via D.P., Smith L.S. (1994). J. Biol. Chem., **269**(32), 20539-20547.
7. Dyer C.A., Curtiss L.K. (1991). J. Biol. Chem., **266**(34), 22803-22806.
8. Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. (1970). Anal. Biochem., **34**, 595-598.
9. Heinrikson R. L., Meredith S. C. (1984). Anal. Biochem., **136**, 65-74.
10. Filion M.C., Phillips N.C. (1997). Biochim. Biophys. Acta, **1329**, 345-356.
11. Medvedev A. E., Fuchs B. B., Rakhmilevich A. L. (1990). Biomedical Science, **1**, 261-266.
12. Панин Л.Е., Часовских М.И., Поляков Л.М. (1991). Бюл. exper. биол. и мед., **1**, 31-33.
13. Vertut-Doi A., Ishiwata H., Miyajima K. (1996). Biochim. Biophys. Acta, **1278**(1), 19-28.

Поступила 26. 11. 98 г.

STUDY OF SPECIFIC BINDING AND UPTAKE OF LIGAND(PEPTIDE)-COATED LIPOSOMES BY CELLS PC12 CELLS.

P.G. LOKHOV, O.M. IPATOVA, O.YU. ABAKUMOVA, T.A. TSVETKOVA, V.N. PROZOROVSKII.

Institute of Biomedical Chemistry RAMS. 119832, Moscow, Pogodinskay st. 10.
fax (095)2450857

Possible employment of cell-specific peptide for the specific adsorption and uptake by cells. It was shown, that apoprotein E 139-158 peptide increases liposomal binding followed by receptor-mediated endocytosis by cells PC12.

Key words: liposomal vector, peptide, apolipoprotein E, ligand-receptor interaction, pheochromocytoma.