

УДК 07-411

©Коллектив авторов

ТРАНСПОРТ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДОМЕНЫ БЕЛКОВОЙ ТРАНСДУКЦИИ, ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР В *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**С.В. Саранцева^{1*}, О.И. Большакова¹, С.И. Тимошенко¹, А.А. Колобов²,
М.П. Витек³, А.Л. Шварцман^{1,4}**

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, 188300,
Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, факс: (81371)323-03;
эл. почта: svesar@omrb.pnpi.spb.ru, svesar1@yandex.ru

²ГУ НИИ особо чистых биопрепаратов, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
факс: (812)235-5504

³Отдел неврологии, Медицинский центр Университета Дюка, Дурем, NC 27710, США

⁴ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, 197376, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12; факс: (812) 234 –9489

Феномен белковой трансдукции, представляющий собой интернализацию клетками коротких пептидов, получивших название “доменов белковой трансдукции” (PTD, protein transduction domain) широко используется в разработке новых препаратов для лечения различных заболеваний центральной нервной системы. Вместе с тем перспективы фармакологических исследований значительно ограничены отсутствием простых и адекватных моделей гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В первую очередь, эти модели должны соответствовать двум основным характеристикам: быть пригодны для тестирования большого числа образцов и одновременно воспроизводить физиологические и функциональные характеристики ГЭБ млекопитающих и человека. Основной целью нашей работы явилась оценка способности известных PTD пептидов проникать через ГЭБ *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что PTD-пептид пенетратин, производный белка Antennapedia *Drosophila*, после абдоминальной инъекции способен проходить сквозь ГЭБ *Drosophila* и доставлять в мозг миметик аполипопротеина E, обладающий нейропротекторными свойствами.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, транспорт; *Drosophila melanogaster*, белок Antennapedia, пенетратин, домен белковой трансдукции, миметик аполипопротеина E, биотин.

ВВЕДЕНИЕ. Основной проблемой в терапевтическом лечении заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) является направленная доставка фармакологических препаратов в клетки мозга. Применение многих существующих лекарственных соединений оказывается низкоэффективным вследствие ограниченного транспорта их из кровотока в мозг и возможности поддержания в нем концентраций препаратов, необходимых для достижения терапевтического эффекта. Эти ограничения обусловлены гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), образуемым эндотелиальными клетками сосудов мозга [1]. Непосредственно ГЭБ составляют структурные комплексы плотных контактов между эндотелиальными клетками капилляров мозга. В результате образования этих контактов сосудистая стенка представляет собой сплошную двухслойную липидную мембрану, ограничивающую транспорт как полярных гидрофильных, так и гидрофобных молекул [2-4]. В целом, ГЭБ является основным барьером для доставки в мозг лекарственных препаратов белковой и пептидной природы,

* - адресат для переписки

которые могут оказаться эффективными в лечении многих нейробиологических заболеваний [5, 6]. Тем не менее, существуют как белки, так и пептиды, способные проникать через ГЭБ. Известен транспорт через ГЭБ группы природных пептидов: аргинин-вазопрессина [7], [D-пеницилламин-2,5]-энкефалина [8] и некоторых других пептидов [5]. В ряде случаев транспорт терапевтических молекул в мозг был осуществлен с помощью векторных молекул [9]. Спектр этих векторных соединений включает пептиды, модифицированные белки и моноклональные антитела, которые могут проходить внутрь клетки посредством рецепторного или нереперторного эндоцитоза [10, 11].

Открытие коротких пептидов, способных проникать через плазматическую мембрану клеток, дало новые возможности для внутриклеточного транспорта белков, ДНК и различных лекарственных препаратов [12]. Способность РТД транспортировать биоактивные молекулы внутрь клетки не гарантирует, однако, того что они могут осуществлять подобный транспорт через ГЭБ в мозг. Транспорт препаратов из крови в мозг - значительно более сложный процесс и количество РТД-пептидов, способных транспортировать биомолекулы через ГЭБ, крайне ограничено. В первых экспериментах было показано, что такой способностью обладают следующие РТД-пептиды: фрагмент белка-трансактиватора вируса HIV1, состоящий из 11 аминокислот и получивший название ТАТ, пенетратин (pAntp-43-58), состоящий из 16 аминокислот белка Antennapedia *Drosophila*, и SynB пептиды (SynB1, состоящий из 18 аминокислот, и SynB3, состоящий из 10 аминокислот), которые являются производными природных антимикробных пептидов протегринов [12]. В частности, SynB1 и SynB3 обеспечивали доставку связанного с ними противоопухолевого агента в мозг мышей [13, 14]. SynB1 и SynB3 также транспортировали через ГЭБ бензилпенициллин [15]. Также было показано, что SynB1 и SynB3 переносят в клетки мозга конъюгированный далаггин, вызывая усиление анальгетического эффекта у крыс [6]. Конъюгаты ТАТ-пептида с β -галактозидазой после их внутривенной инъекции были локализованы в мозге и других органах мышей [17]. При прямой инъекции в стриатум или латеральные желудочки мозга крыс пенетратин обнаруживался в клетках мозга, однако при внутривенной инъекции пептид не проходил через ГЭБ [18]. В то же время внутривенная инъекция доксорубина, конъюгированного с D-пенетратином, подтвердила способность пенетратина транспортировать препараты в мозг мышей через ГЭБ [13].

Следует отметить, что приведенные выше эксперименты с транспортом РТД-пептидов через ГЭБ не могут заменить фармакологический скрининг лекарственных препаратов, при котором одновременно тестируется большое количество образцов [19]. С другой стороны, известные на сегодняшний день подходы к скринингу фармакологических препаратов используют модели ГЭБ на клеточных культурах или синтетических мембранах, которые, как правило, неспособны воспроизвести функциональные свойства интактного ГЭБ, что часто приводит к ошибочному предсказанию способности векторов проходить ГЭБ [20]. Поэтому мы использовали *Drosophila* как простую и удобную физиологическую модель для анализа препаратов, способных проникать через ГЭБ. Последние исследования показывают, что структурные и функциональные характеристики ГЭБ *Drosophila* и ГЭБ млекопитающих во многом схожи, и это указывает на возможность использования *Drosophila* в скрининге лекарственных препаратов [21, 22].

В данной работе мы изучили способность пенетратина проникать через ГЭБ *Drosophila* и доставлять в мозг миметик аполипопротеина Е. Миметик апоЕ – пептид, включающий район связывания апоЕ с рецептором плазматической мембраны. Пептид воспроизводит функциональный противо-воспалительный и нейропротекторный эффект полного белка апоЕ [6]. Используя меченые биотином пенетратин и пенетратин, ковалентно связанный с миметиком апо Е, мы показали транспорт пептидов через ГЭБ и их накопление в мозге *Drosophila*.

МЕТОДИКА.

Условия проведения инъекций. Мухи линии *Canton S D. melanogaster* содержались на стандартной дрожжевой среде при 25°C. Все исследуемые пептиды вводили в брюшко пятидневных мух в концентрации 0,11 нМ стеклянными капиллярами диаметром 20-40 мкм. Для разведения пептидов применяли раствор Рингера для насекомых (9 г/л NaCl; 0,42 г/л KCl; 0,25 г/л CaCl₂; 0,2 г/л NaHCO₃).

Синтез пептидов. Пептиды пенетратин (Antp 43-58), Cog133, penetratin-Cog133 (Cog 112) и контрольные пептиды, производные белка Antennapedia - Antp 41-55 и Antp 58-43 (Antp-rev 58-43), содержащие на N-конце биотин-γ-аминобутират, были синтезированы методом твердофазного синтеза пептидов с последовательным наращиванием пептидной цепи на синтезаторе ABI Model 430A. В качестве постоянных защитных групп использовали 2-дихлорбензильную для тирозина, 4-метоксибензильную для цистеина и мезитилеи-2-сульфонильную для аргинина. Трет-бутилоксикарбонильная группировка была использована в качестве временной защиты альфа-аминогрупп. Удаление боковых защитных группировок и отщепление пептида от полимера производилось под действием безводного фтористого водорода в присутствии *m*-крезола. С помощью препаративной обращенно-фазовой хроматографии (хроматограф Gilson, Франция, колонка Prep. Nova-Pak HR C 18, 49×300 мм, 6 мкм) был выделен синтезированный пептидный препарат. Пептид охарактеризован данными аналитической ОФ ВЭЖХ (хроматограф Gilson, колонка DeltaPak C 18 100Å, 3,9×150 мм, 5 мкм, скорость потока 1 мл/мин., элюент 0,1% трифторуксусная кислота, градиент ацетонитрила 20-50%), аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 часа, 110°C; аминокислотный анализатор LKB 4151 Alpha Plus, Швеция) и масс-спектрального анализа (масс-спектрометр Voyager-DE BioSpectrometry Workstation, Per Sepetive Biosystems, США). Чистота полученных пептидов превышала 95%.

Определение биотинилированных пептидов в мозге дрозофилы. Для определения присутствия биотинилируемых пептидов в мозге, мух помещали в 4% формальдегид ("Sigma", США) через 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 и 48 часов после инъекции и фиксировали в течение суток при температуре 4°C. Далее проводили обезвоживание объектов в этаноле и хлороформе и заливали в парафин. Готовили срезы мозга толщиной 5 мкм. Препараты помещали на 1 час в 0,5% блокирующий раствор ("Sigma") содержащий PBS-0,1% твин-20, промывали дважды в PBS-0,1% твин-20 и затем отмывали дважды в PBS. Для окраски срезы инкубировали 1 час в растворе стрептавидин-щелочной фосфатазы (1:1,500; "Promega", США). Далее на срезы наносили по 100 мкл реактива 1-STEP NBT/BCIP ("Pierce", США) и инкубировали в течении ночи. Препараты окрашивали 30 минут гематоксилином ("Бiovитрум", Санкт-Петербург), обезвоживали, заключали в канадский бальзам и анализировали с помощью световой микроскопии.

Статистический анализ. Относительную плотность окраски срезов вычисляли в программе ImageJ (Version 1.38a for Windows, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Каждая точка представляет среднюю величину из четырех независимых вычислений на каждом срезе. Для каждого пептида в каждой временной точке после инъекции анализировали не менее четырех срезов. Статистическую обработку данных проводили при помощи теста Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Для измерения проницаемости ГЭБ *Drosophila* мы вводили пептиды непосредственно в абдомен, заполненный гемолимфой, омывающей поверхности внутренних органов насекомого, в частности, мозга. При этом мы предполагали, что биотинилированный пептид может обнаруживаться в мозге мух лишь в том случае если он способен пройти через ГЭБ. Чтобы исключить возможность абсорбции или интернализации пептида в тонком слое клеток ГЭБ, определение пептидов было проведено на срезах мозга. Были

ТРАНСПОРТ ПЕПТИДОВ ЧЕРЕЗ ГЭБ У *D. MELANOGASTER*

исследованы пептиды, проходящие через ГЭБ млекопитающих: пенетратин (Antp 43-58) – RQIKIWFQNRRMKWKK [23]; Cog133 - LRVRLASHLRKLRKRL, имеющий трансдуцирующие свойства [6]; и пенетратин-Cog133 (Cog112) - RQIKIWFQNRRMKWKK LRVRLASHLRKLRKRL [24]. В качестве контрольных пептидов, не способных проникать через ГЭБ, были использованы Ant 41-55 - WQRQIKIWFQNRRMK [18] и Antp-rev 58-43 - KKWKMRNQNFWIKIQR.

Как видно на рисунке 1, интенсивность окрашивания коркового слоя мозга, в котором в основном расположены тела нейронов и глиальных клеток (указано стрелками), не меняется после инъекции. Хотя при используемом увеличении трудно определить присутствие биотинилированных пептидов внутри клеток, видимые различия в интенсивности окрашивания в центральных областях нейропилия хорошо заметны между PTD и контрольными пептидами. Максимальная интенсивность окрашивания для пенетратина, Cog133 и Cog112 была отмечена в интервале между 2 и 4 часами после инъекции пептидов. После четырех часов наблюдалось уменьшение интенсивности окраски, вероятно, отражающее деградацию меченых пептидов (рис. 2-4). Контрольные пептиды Ant 41-55 и Antp-rev 58-43 характеризовались слабым окрашиванием в течение всего регистрируемого временного интервала. Для более точного расчета относительного содержания пептида в мозге мух мы провели сканирование различных участков окрашенных срезов мозга с помощью программы ImageJ (рис. 2-4).

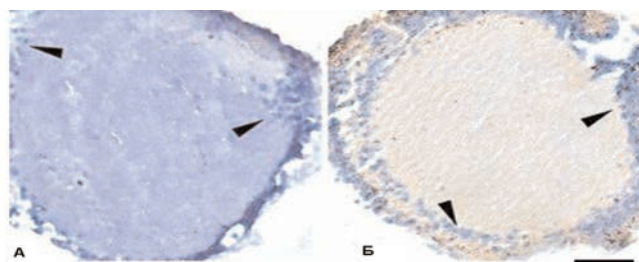


Рисунок 1.

Гистохимический анализ поглощения пенетратина в мозге *Drosophila*.

А - мозг *Drosophila* через 2 часа после инъекции пенетратина, меченого биотином;
Б - мозг *Drosophila* через 2 часа после инъекции раствора Рингера. Масштаб 10 мкм.

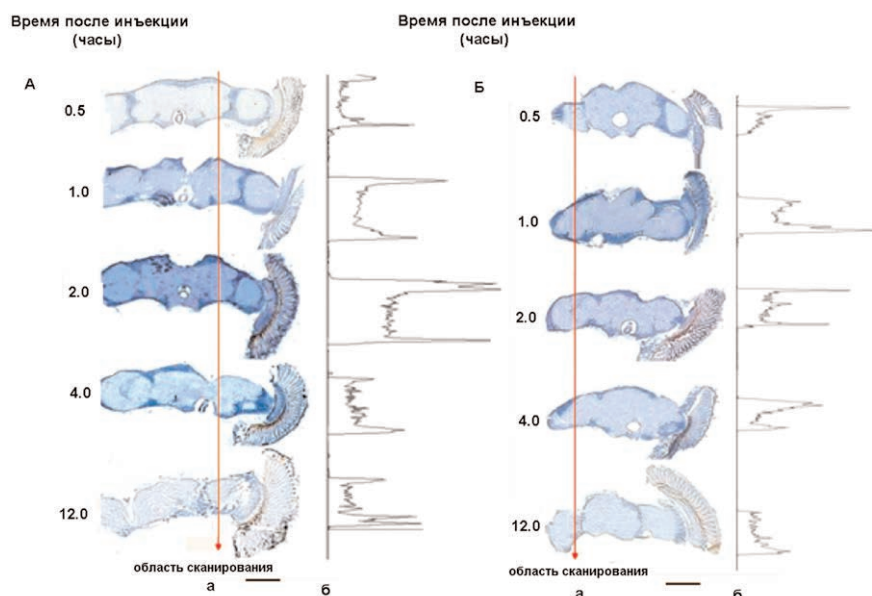


Рисунок 2.

Определение пенетратина и Cog 133 в мозге *Drosophila*. А - пенетратин; Б - Cog133
а) срезы мозга; масштаб 50 мкм б) относительная плотность окраски срезов (ImageJ).

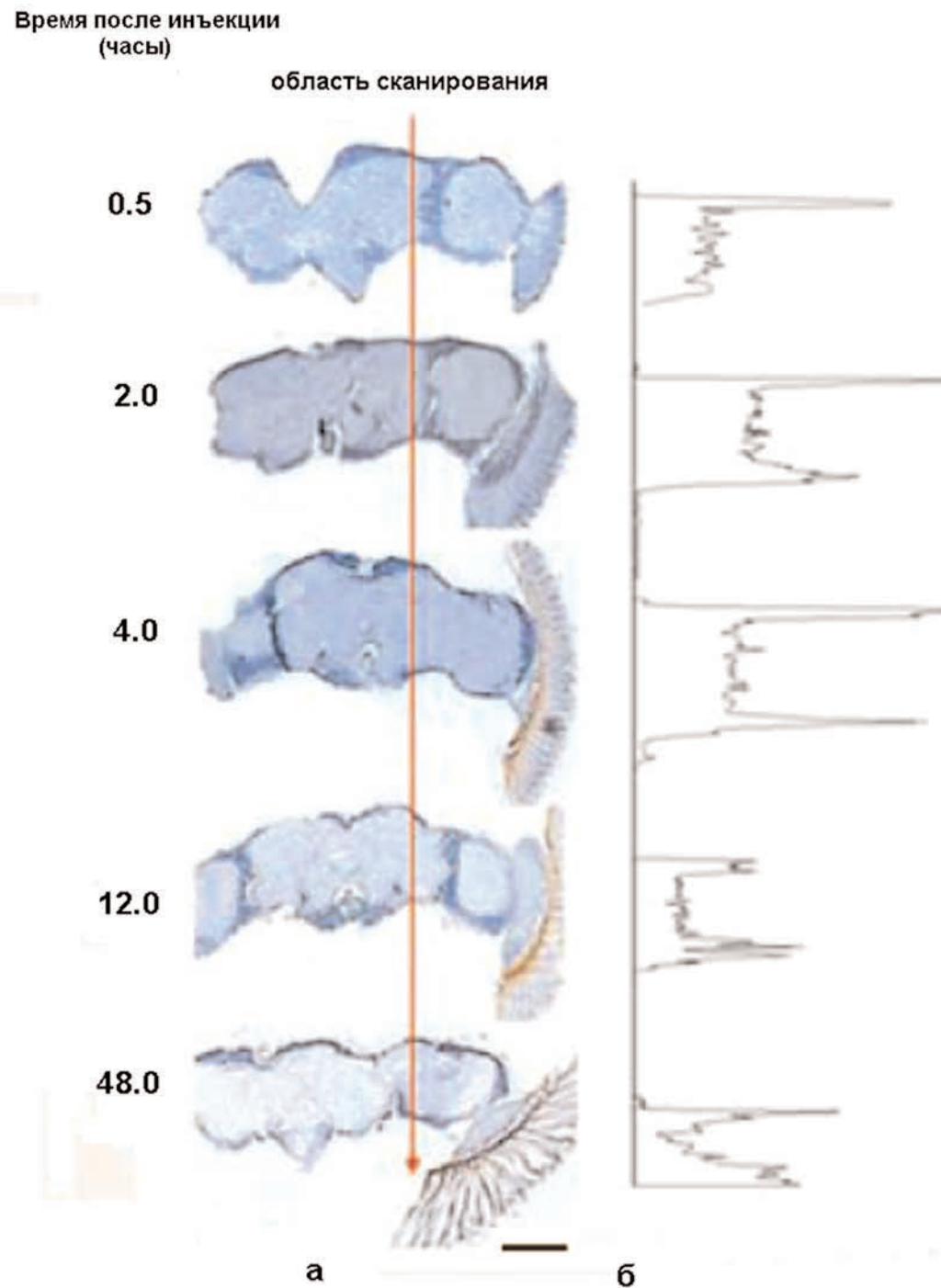


Рисунок 3.
Определение Cog112 в мозге *Drosophila*. а) срезы мозга; масштаб 50 мкм б) относительная плотность окраски срезов (ImageJ).

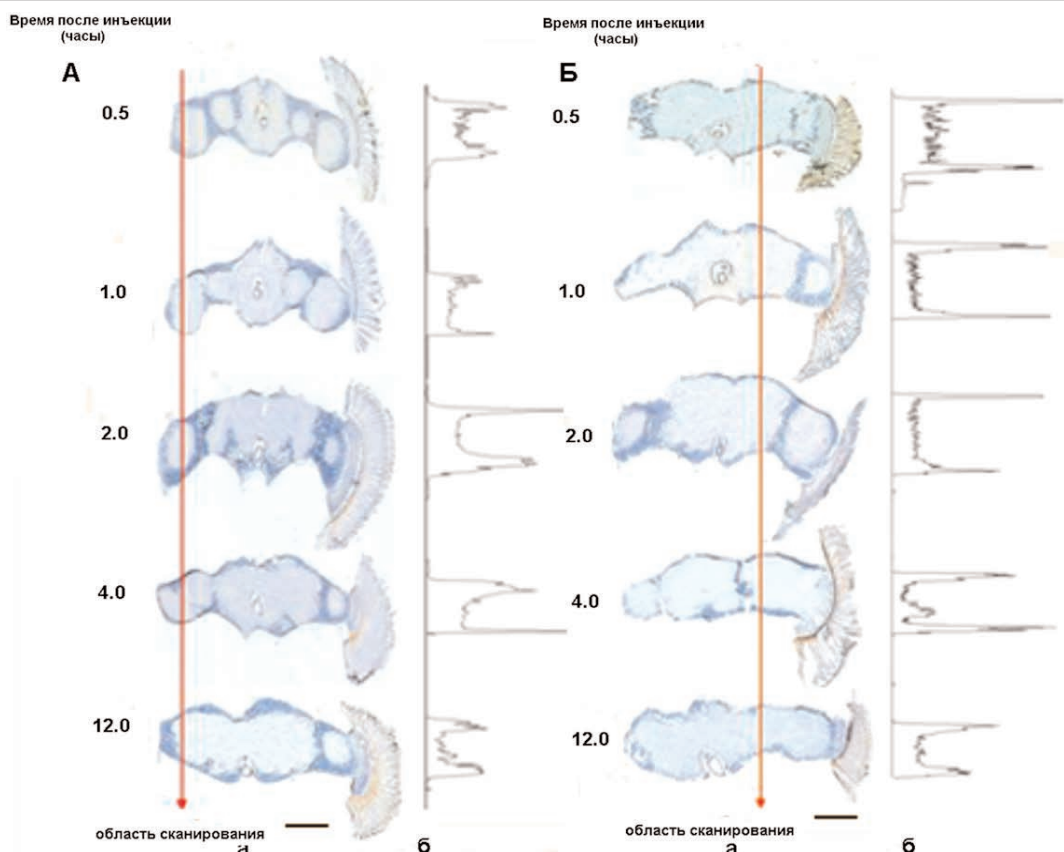


Рисунок 4.

Определение Ant 41-55 и Ant-rev в мозге *Drosophila* А - Ant 41-55; Б - Ant-rev
а) срезы мозга; масштаб 50 мкм б) относительная плотность окраски срезов (ImageJ).

Анализ распределения интенсивности окраски на денситограммах показал, что каждый пептид проникает в мозг мух с различной эффективностью. Максимальное поглощение было отмечено для Cog133 (рис. 5). В то же время, Cog112, оказался наименее чувствительным к деградации в мозге, чем другие исследованные пептиды. Здесь нельзя исключить, что стабилизация пептидов обусловлена присоединением РТД, последнее может оказаться крайне важным обстоятельством при разработке методов доставки лекарственных препаратов в мозг посредством РТД.

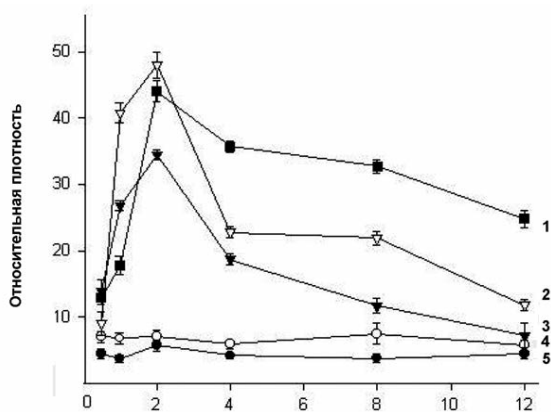


Рисунок 5.

Динамика накопления тестируемых пептидов в мозге *Drosophila*.
1 - Cog112; 2 - Cog133 ; 3 – пепегратин; 4 - Ant-rev; 5 - Ant 41-55.
Каждая точка представляет среднюю величину из четырёх независимых вычислений на каждом срезе. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ. На сегодняшний день имеется лишь несколько работ на модельных системах, в которых был продемонстрирован эффект использования PTD для доставки терапевтических белков и пептидов.

Так, при внутривенной инъекции белка GDNF или внутрибрюшинном введении белка Bcl-x, конъюгированных с PTD пептидом TAT, наблюдалось эффективное снижение степени повреждения мозга у мышей через 30-40 минут после очаговой ишемии [25, 26]. Конъюгаты миметика apoE (COG133) с пенетратинном - COG112 - усиливали *in vitro* и *in vivo* противовоспалительный эффект COG133 на модели рассеянного склероза у мышей [24]. Wu и др. показали, что конъюгаты тирозингидролазы с TAT проникают через ГЭБ у крыс и обнаруживаются в стриатуме и среднем мозге, достигая максимума через 5-8 часов после внутривенной инъекции. Поскольку тирозингидроксилаза катализирует превращение L-тирозина в DOPA и индуцирует локальную продукцию дофамина в стриатуме, эти эксперименты представляют новую стратегию генной терапии болезни Паркинсона [27]. Ограниченное число таких исследований, вероятно, обусловлено как трудностями в оценке эффективности тестируемых препаратов, так и их способностью проходить через ГЭБ. Существующие сегодня методы анализа проницаемости ГЭБ и эффективности терапевтического действия препаратов, основанные на использовании клеточных культур, не могут считаться адекватными ввиду сложности моделирования в них заболеваний ЦНС. С другой стороны, разработанные на грызунах и приматах модели нейробиологических заболеваний часто имеют серьезные ограничения для одновременного испытания большого числа структурных вариантов лекарственных препаратов. Поэтому использование адекватных и удобных моделей скрининга и векторов для транспорта через ГЭБ, имеет решающее значение во всем процессе разработки фармакологического препарата. Использование *Drosophila melanogaster*, на наш взгляд, поможет избежать указанных выше трудностей. Надо отметить, что одним из преимуществ *Drosophila*, как модельного организма, является то, что она в последнее время широко используется для изучения различных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона и др. [28]. К тому же мухи имеют короткий жизненный цикл, маленький размер, легко размножаются и естественно представляют удобную модель для тестирования различных лекарственных препаратов.

Значительно больше вопросов возникает при сравнении ГЭБ млекопитающих и *Drosophila*. У млекопитающих свойства ГЭБ обусловлены специальными эндотелиальными клетками, которые выстилают стенки кровеносных сосудов мозга. Ультраструктурные исследования показали, что эти эндотелиальные клетки соединены друг с другом по типу плотных контактов с высоким электрическим сопротивлением и строго избирательно ограничивают проникновение молекул из крови в мозг [4]. У *Drosophila* свойства ГЭБ определены клетками перинейриума и глиальными клетками, которые образуют между собой перегородчатые контакты, благодаря которым регулируется транспорт ионов и молекул внутрь мозга [21, 29]. Плотные контакты млекопитающих и перегородчатые контакты *Drosophila*, как полагают, различаются по своей морфологии, и поэтому долгое время *Drosophila* совершенно игнорировалась как модельная система для анализа ГЭБ млекопитающих. Однако недавняя идентификация гомологичных белков в плотных контактах млекопитающих и перегородчатых контактах насекомых привела к пересмотру этой точки зрения [30, 31]. Более того, большинство из этих белков имеют похожие функциональные характеристики [22, 32]. Например, белок клаудин, который регулирует клеточную проницаемость как в плотных контактах млекопитающих, так и в перегородчатых контактах насекомых [31].

Для исследования способности одних и тех же пептидов пересекать ГЭБ *Drosophila* и млекопитающих мы выбрали пенетратин, Cog133 и пенетратин-Cog133 (Cog112). Как отмечено ранее, и пенетратин, и Cog133 проходят через ГЭБ у мышей [6, 13], а соединение Cog133 с пенетратинном значительно увеличивает

противовоспалительную активность миметика апоЕ *in vitro* и улучшает его терапевтический эффект *in vivo* на модели рассеянного склероза у мышей [24]. Хотя точный механизм, лежащий в основе этого эффекта, в настоящее время неизвестен, можно предположить, что это происходит именно благодаря большей эффективности прохождения пептида через ГЭБ, о чем ранее сообщалось и для других лекарственных препаратов, к которым были присоединены РТД [16]. Наши эксперименты ясно показали, что инъектированные в брюшко пенетратин, Cog133 и Cog112 могут проникать через ГЭБ дрозофилы и накапливаться в ЦНС. Интересно, что стабильность соединения Cog112 в мозге *Drosophila* значительно выше, чем стабильность одиночных - пенетратина и Cog133. Наиболее вероятно, что этот эффект может частично объяснять усиление терапевтического эффекта Cog112 [24]. Функциональные сходства ГЭБ млекопитающих и ГЭБ дрозофилы подтверждает эксперимент с пептидом, который не пересекает ГЭБ. Пептид Ant 41-55, который не проходит через ГЭБ крыс [18], в наших экспериментах не проходил и в мозг *Drosophila*. Такой же эффект наблюдался и при использовании другого контрольного пептида Ant 58-43.

Таким образом, можно предположить, что транспорт различных пептидов в мозг через ГЭБ одинаков для грызунов и для *Drosophila*. И в этом плане *Drosophila* представляется одним из очень удобных модельных организмов в разработке новых лекарственных препаратов для лечения заболеваний ЦНС.

Работа поддержана грантами Российского Фонда фундаментальных Исследований (№ 07-04-00128 и № 06-04-49571), грантом Президиума РАН в рамках программы “Фундаментальные науки - медицине”, грантами Национального Института Здоровья (США) R44NS048689 и R44AG020473.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pardridge W.M. (2005) NeuroRx, **2**, 3–14.
2. Reese T.S., Karnovsky M.J. (1967) J. Cell Biol., **34**, 207–217.
3. Huber J.D., Egleton R.D., Davis T.P. (2001) Trends Neurosci., **24**, 719–725.
4. Ballabh P., Braun A., Nedergard M. (2004) Neurobiol. Dis., **16**, 1–13.
5. Egleton R.D., Davis T.P. (2005) NeuroRx, **2**, 44–53.
6. Laskowitz D.T., Fillit H., Yeung N., Toku K., Vitek M.P. (2006) Acta Neurol. Scand., **S185**, 15–20.
7. Zlokovic B.V., Hyman S., McComb J.G., Lipovac M.N., Tang G., Davson H. (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1025**, 191–198.
8. Thomas S.A., Abbruscato T.J., Hruby V.J., Davis T.P. (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther., **280**, 1235–1240.
9. Schermann J.M. (2002) Vascular Pharmacol., **38**, 349–354.
10. Temsamani J., Rousselle C., Rees A.R., Scherrmann J.M. (2001) Expert Opin. Biol. Ther., **1**, 773–782.
11. Kuelto L.A., Middaugh C.R. (2003) J. Pharm. Sci., **92**, 1754–1772.
12. Dietz G.P., Bahr M. (2004) Mol. Cell. Neurosci., **27**, 85–131.
13. Rousselle C., Clair P., Lefauconnier J.M., Kaczorek M., Scherrmann J.M., Temsamani J. (2000) Mol. Pharmacol., **57**, 679–686.
14. Rousselle C., Smirnova M., Clair P., Lefauconnier J., Chavanieu A., Calas B., Scherrmann J., Temsamani J. (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther., **296**, 124–131.
15. Rousselle C., Clair P., Temsamani J., Scherrmann J.M. (2002) J. Drug Target., **10**, 309–315.
16. Rousselle C., Clair P., Smirnova M., Kolesnikov Y., Pasternak G.W., Gac-Breton S., Rees A.R., Scherrmann J., Temsamani J. (2003) J. Pharmacol. Exp. Ther., **36**, 371–376.
17. Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. (1999) Science, **285**, 1569–1572.

18. Bolton S.J., Jones D.N., Darker J.G., Eggleston D.S., Hunter A.J., Walsh F.S. (2000) Eur. J. Neurosci., **12**, 2847–2855.
19. Su Y., Sinko P.J. (2006) Expert Opin. Drug Deliv., **3**, 419–435.
20. Reichel A. (2006) Current Drug Metabol., **7**, 183–203.
21. Schwabe T., Bainton R.J., Fetter R.D., Heberlein U. Gaul U. (2005) Cell, **123**, 133–144.
22. Daneman R., Barres B.A. (2005) Cell, **123**, 9–12.
23. Derossit D., Joliott M.H., Chassaingl G., Prochiantztn M. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 10444–10450.
24. Li F-Q, Sempowski G.D., McKenna S.E., Laskowitz D.T., Colton C.A., Vitek M.P. (2006) J. Pharmacol. Exp. Ther., **318**, 956–965.
25. Cao G., Pei W., Ge H., Liang Q., Luo Y., Sharp F.R., Lu A., Ran R., Graham S.H., Chen J. (2002) J. Neurosci., **22**, 5423–5431.
26. Kilic U., Kilic E., Dietz G.P., Bahr M. (2003) Stroke, **34**, 1304–1310.
27. Wu S.P., Fu A.L., Wang Y.X., Yu L.P., Jia P.Y., Li Q.J., Guo Z.S., Man J. (2006) Biochem Biophys. Res. Commun., **346**, 1–6.
28. Bonini N.M., Fortini M.E. (2003) Annu. Rev. Neurosci., **26**, 627–56
29. Carlson S.D., Hilgers S.L., Juang J.L. (1997) J. Neurocytol., **26**, 377–388.
30. Genova J.L., Fehon R.G. (2003) J. Cell Biol., **161**, 979–989.
31. Wu V.M., Schulte J., Hirschi A., Tepass U., Beitel G.J. (2004) J. Cell Biol., **164**, 313–323.
32. Faivre-Sarrailh C., Banerjee S., Li J., Hortsch M., Laval M., Bhat M.A. (2004) Development, **131**, 4931–4942.

Поступила: 10. 12. 2007.

PROTEIN TRANSDUCTION DOMAIN PEPTIDE MEDIATES DELIVERY TO THE BRAIN VIA THE BLOOD–BRAIN BARRIER IN *DROSOPHILA*

S.V. Sarantseva¹, O.I. Bolshakova¹, S.I. Timoshenko¹, A.A. Kolobov², M.P. Vitek³, A.L. Schwarzman^{1,4}

¹Petersburg Institute of Nuclear Physics of Russian Academy of Sciences, Leningrad district, Gatchina, 188300 Russia; fax: (81371)323-03, e-mail: svesar@omrb.pnpi.spb.ru

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, ul. Pudozhskaya 7, Saint-Petersburg, 197110 Russia; fax: (812)235-5504

³Division of Neurology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 2771, USA

⁴Institute for Experimental Medicine of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Acad. Pavlova 12, Saint-Petersburg, 197376 Russia; fax: (812) 234 -9489

Protein transduction domain (PTD)-peptides greatly facilitate the delivery of high molecular weight macromolecules across the blood-brain barrier (BBB). This BBB-transport function is highly desirable and helps to enable the development of new therapeutics for treatment of brain disorders. However, the drug discovery process is limited by the generation of a simple and reliable BBB model that is amenable to testing of large number of samples and simultaneously, reproduces the physiological and functional characteristics of the human BBB. To address these challenges, we have studied whether the PTD-peptide penetratin, derived from a *Drosophila* Antennapedia homeodomain protein, is capable of crossing the BBB in *Drosophila* while carrying a cargo into the fly brain. An initial in vivo experiment in *Drosophila* showed that abdominal injection of biotin-tagged penetratin permeated the BBB. The same effect was observed for biotin-tagged penetratin fused with apoE mimetic peptide with demonstrated anti-inflammatory and neuroprotective activities.

Key words: blood-brain barrier; transport; *Drosophila melanogaster*; Antennapedia Homeodomain; penetratin; protein transduction domain; apolipoprotein E mimetic peptides; biotin.