

УДК 577.2

## СТАБИЛИЗАЦИЯ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ ПУТЕМ ВСТРАИВАНИЯ В НИХ ГЕМИНА В МОДИФИЦИРОВАННОМ ШТАММЕ-ПРОДУЦЕНТЕ С РЕЦЕПТОРОМ ГЕМА

© 2020 г. Ю. В. Храмцов<sup>1</sup>, А. В. Уласов<sup>1</sup>, А. А. Розенкранц<sup>1,2</sup>, академик РАН Г. П. Георгиев<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН А. С. Соболев<sup>1,2,\*</sup>

Поступило 04.12.2019 г.  
После доработки 04.12.2019 г.  
Принято к публикации 04.12.2019 г.

Обнаружено, что использование нового штамма-производителя *Escherichia coli*, экспрессирующего рецептор гемина ChuA, позволяет получать геминсодержащий модульный нанотранспортер (МНТ) для доставки лекарств в ядра клеток-мишеней. Такой геминсодержащий МНТ приобретает стабилизированную форму, что приводит к увеличению его термостабильности и предотвращает агрегацию этого белка.

**Ключевые слова:** модульные нанотранспортеры, термостабильность, встраивание гема, агрегаты

**DOI:** 10.31857/S2686738920010126

Для адресной доставки лекарственных препаратов ранее нами был разработан ряд модульных нанотранспортеров (МНТ) для доставки лекарств в ядра клеток-мишеней, в которых каждый из модулей выполняет заданную транспортную функцию [1]. Лигандный модуль МНТ необходим для связывания с рецепторами, сверхэкспрессированными на поверхности клеток-мишеней (в данной работе использован лиганд к меланокортиновым рецепторам) [1]. После связывания с рецепторами МНТ попадают в клетки путём рецептор-опосредованного эндоцитоза. Мембранолитический модуль (на основе транслокационного домена дифтерийного токсина), входящий в состав МНТ, позволяет МНТ выйти из эндосом в гиалоплазму, тем самым, избегая деградации в лизосомах [2]. Если необходима доставка в ядро, то в состав МНТ включают сигнал ядерной локализации [1]. Все модули объединяет в единую структуру модуль-носитель – гемоглобиноподобный белок из *E. coli* (НМР) [1].

Разработанные МНТ продемонстрировали свою эффективность как в экспериментах *in vitro* [3–7], так и *in vivo* [5–7]. Однако некоторые варианты МНТ показали склонность к агрегации, что

затрудняет их многократное применение в связи с известной из литературы [8] повышенной иммуногенностью агрегатов по сравнению с мономерными молекулами. Известно, что НМР содержит гидрофобный карман для встраивания гема [9]. Для гемсодержащих белков встраивание гема приводит к заметному увеличению стабильности белков и к уменьшению их склонности к агрегации [10].

Синтез гема в клетках обычно является лимитирующей стадией, что может приводить к неполному встраиванию гема в гемсодержащий белок [11]. Одним из вариантов решения этой проблемы является добавление в среду предшественника гема – 5-аминолевулиновой кислоты [11]. Однако для встраивания гема во все или большинство молекул белка нужно использовать большие количества этого вещества, что приводит к значительному увеличению стоимости наработки белка. Клетки *E. coli* из штамма 0157:H7 способны поглощать гем из среды благодаря имеющемуся у них специальному рецептору ChuA [11]. Другие штаммы *E. coli* тоже приобретают это свойство, если их трансформировать плазмидой, кодирующей этот рецептор [11]. Нами был применен этот способ для получения штамма-производителя МНТ, что привело к увеличению встраивания гема в МНТ. Это, в свою очередь, привело к увеличению стабильности не только отдельного модуля НМР в составе МНТ, но и всей молекулы МНТ.

В качестве источника гена *ChuA* была использована плазида addgene #42539. С помощью

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: sobolev@igb.ac.ru, alsobolev@yandex.ru

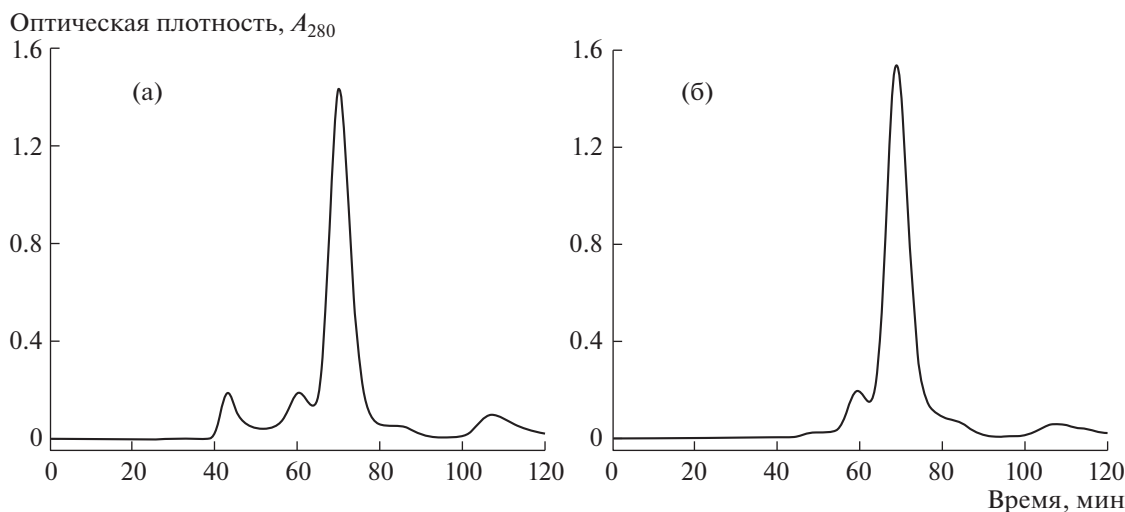


Рис. 1. Хроматограммы белков МНТ (а) и МНТ-гемин (б), полученные на колонке для гель-фильтрации Superdex 200.

стандартных молекулярно-биологических методов получен штамм BL21(DE3) с индуцибельной экспрессией *ChuA*, который трансформирован плазмидой, кодирующей МНТ с лигандом к меланокортиновым рецепторам [12]. К клеткам *E. coli*, экспрессирующим гены *ChuA* и МНТ, перед индукцией добавляли гемин в концентрациях 6.3; 8 или 24 мкМ. Гемин (“Fluka”, “Sigma-Aldrich”) растворяли в 100 мМ NaOH и добавляли к среде с клетками. Индукцию экспрессии МНТ и *ChuA* проводили 200 мкМ IPTG в течение 20 ч. Модульные нанотранспортеры выделяли и затем очищали аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе, как описано ранее [2, 3]. Очистку МНТ до мономерной фракции проводили гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 (“GE Healthcare Life Sciences”).

Для изучения термостабильности белков аликвоты МНТ инкубировали в термостате Bio TDB-100 (“bioSan”) в течение 30 мин при заданной температуре, после чего проводили электрофорез в нативных условиях. Далее определяли суммарные интенсивности полос за вычетом фона, отвечающие мономерному МНТ, и, зная интенсивность полосы мономерного МНТ при низких температурах, определяли процент агрегатов МНТ, образующихся при нагревании. Полный эксперимент по изучению термостабильности белков был проведен трижды.

Известно, что коэффициент мольной экстинкции для гемсодержащего НМР составляет  $88600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 405 нм [9]. С учётом того, что при этой длине волны он определяется поглощением гема, по известной концентрации МНТ и коэффициенту мольной экстинкции был рассчитан процент встраивания гемина в МНТ, который увеличивался по мере увеличения концентрации гемина в среде с клетками. Так, при увеличении

этой концентрации в ряду 0; 6.3; 8 и 24 мкМ он возрастает в ряду 7.7; 23.9; 37.5 и 74.7%. Таким образом, изменением концентрации гемина в среде с клетками можно регулировать эффективность встраивания гемина в МНТ.

На хроматограмме гельфильтрации МНТ наблюдается пик на 40–47 мин, отвечающий образованию крупных (больше 600 кД) агрегатов (рис. 1а). При встраивании в МНТ гемина (к клеткам добавлено 24 мкМ гемина) этот пик пропадает (рис. 1б), а остаются только пики, соответствующие мономерам белка (рис. 1б, пик на 62–78 мин) и незначительному количеству димерных форм (рис. 1б, пик на 55–62 мин). Таким образом, встраивание гемина в НМР приводит к уменьшению склонности к агрегации всей молекулы МНТ, что свидетельствует о том, что модуль-носитель вносит основной вклад в склонность МНТ к агрегации.

Известно, что встраивание гемина в гемсодержащие белки приводит к увеличению химической стабильности и термостабильности этих белков [13]: температура, при которой наблюдается денатурация белка, может возрастать больше чем на  $10^\circ\text{C}$  [13]. Денатурация белка приводит к его агрегации, поэтому, изучая зависимость доли агрегатов от температуры, можно определить, при каких температурах происходит денатурация белка.

Встраивание гемина в модуль-носитель молекулы МНТ (НМР) приводит к существенному увеличению температуры, при которой наблюдается денатурация МНТ (рис. 2). Так, встраивание гемина приводит к увеличению температуры, при которой образуется 50% агрегатов, на  $10^\circ\text{C}$  (рис. 2). Таким образом, встраивание гемина увеличивает не только стабильность НМР, но и всей молекулы МНТ.

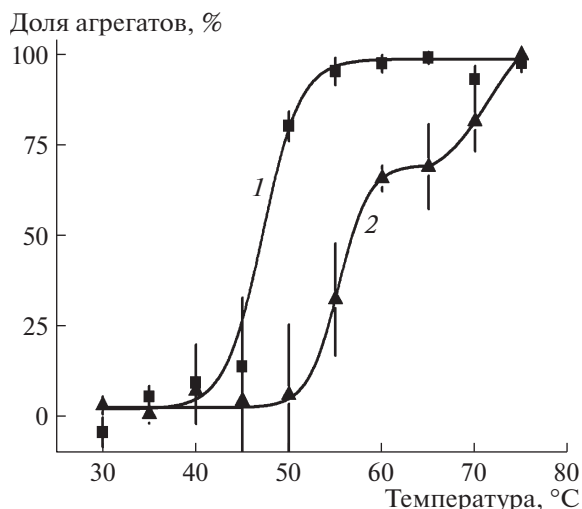


Рис. 2. Зависимости доли белковых агрегатов от температуры для МНТ (1) и МНТ с гемом (2). Показаны средноквадратичные ошибки измерений ( $\pm SE$ ,  $n = 3$ ).

Ещё одним важным следствием получения препаратов МНТ с повышенной термостабильностью является возможность использования более широкого круга комплексонов при присоединении эмиттеров электронов Оже к МНТ при создании средств лечения онкологических заболеваний и сокращение времени получения меченных этими эмиттерами препаратов.

В результате проведенной работы в новом штамме-продуценте был получен модульный нанотранспортер, в который была встроена молекула гема. При встраивании гема термостабильность МНТ повышается на 10 °C и исчезают агрегаты МНТ.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 17–14–01304).

## STABILIZATION OF MODULAR NANOTRANSPORTERS BY EMBEDDING HEMIN IN THEM IN A NEW STRAIN WITH HEME RECEPTOR EXPRESSION

Yu. V. Khramtsov<sup>a</sup>, A. V. Ulasov<sup>a</sup>, A. A. Rosenkranz<sup>a,b</sup>, Academician of the RAS G. P. Georgiev<sup>a</sup>, and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup> Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

#e-mail: sobolev@igb.ac.ru, alsobolev@yandex.ru

It was found that the use of a new strain-producer *Escherichia coli*, expressing the heme receptor ChuA, allows obtaining a hemin-containing modular nanotransporter (MNT) for drug delivery into the nuclei of target cells. The hemin-containing MNT becomes stabilized that leads to increasing in its thermal stability and prevents aggregation of this protein.

**Keywords:** modular nanotransporters, thermal stability, heme embedding, aggregates

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sobolev A.S. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 952. doi: 2018 <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00952.eCollection>
2. Khramtsov Y.V., Rokitskaya Y.V., Rosenkranz A.A., et al. // *J. Control. Rel.* 2008. T. 128. № 3. С. 241–247.
3. Slastnikova T.A., Koumariyanou E., Rosenkranz A.A. u др. // *EJNMMI Res.* 2012. V. 2. № 59. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-59>
4. Koumariyanou E., Slastnikova T.A., Pruszynski M., et al. // *Nucl. Med. Biol.* 2014. V. 41. № 6. P. 441–449.
5. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Morozova N.B., et al. // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 395–410.
6. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al. // *Drug. Des. Devel. Ther.* 2017. V. 11. P. 1315–1334.
7. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Karmakova T.A., et al. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 1331. doi: eCollection 2018 <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01331>
8. Ratanji K.D., Derrick J.P., Dearman R.J., Kimber I. // *J. Immunotoxicol.* 2014. V. 11. № 2. P. 99–109.
9. Helmick R.A., Fletcher A.E., Gardner A.M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 5. P. 1837–1843.
10. Hargrove M.S., Olson J.S. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 11 310–11 318.
11. Varnado C.L., Goodwin D.C. // *Protein Express. Purif.* 2004. V. 35. P. 76–83.
12. Храмов Ю.В., Уласов А.В., Розенкранц А.А. и др. // *ДАН.* 2018. Т. 478. С. 720–722.
13. Landfried D.A., Vuletich D.A., Pond M.P., et al. // *Gene.* 2007. V. 398. P. 12–18.