

*На правах рукописи*

**ГУРЬЯНОВ  
Иван Алексеевич**

**КАТИОННЫЕ  $\alpha$ -СПИРАЛЬНЫЕ ОЛИГОПЕПТИДЫ - НОСИТЕЛИ ДНК**

**Специальность - 02.00.06 - высокомолекулярные соединения**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**



**Санкт-Петербург - 2004**

Работа выполнена в Институте высокомолекулярных соединений  
Российской академии наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор  
Г. П. Власов

Официальные оппоненты:  
доктор химических наук,  
Т. Б. Тенникова

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
Н. И. Колодкин

Ведущая организация:  
Санкт-Петербургский государственный  
университет, химический факультет,  
кафедра высокомолекулярных соединений

Защита диссертации состоится 26 февраля 2004 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.229.01 при Институте высокомолекулярных соединений РАН по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Большой пр. В. О., 31, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института высокомолекулярных соединений РАН.

Автореферат разослан 23 января 2004 года.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат физ.-мат. наук



Н. А. Долотова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последнее время высокомолекулярные соединения получают все большее распространение в новых биомедицинских технологиях, в частности, в генной терапии, одной из главных задач которой является создание носителей ДНК для систематической доставки чужеродных генов в клетки определенного вида. Ряд недостатков вирусных носителей, в частности, возможность сильного иммунного ответа, делает очень важным развитие невирусных методов доставки ДНК в клетку. Перспективными с этой точки зрения могут, быть искусственные макромолекулярные системы, состоящие из синтетических поликатионных носителей и ДНК. При использовании пептидных носителей многообещающим является синтез многофункциональных пептидов (в том числе с дендримерной структурой), которые позволяют сочетать защитные и транспортные функции.

Целью данной работы являлся синтез новых олигомерных соединений, как потенциальных носителей ДНК, на основе катионных олигопептидов с теоретически рассчитанной структурой, в том числе, модифицированных гидрофобными остатками каприновой (декановой) кислоты, что может как усилить их взаимодействие с внешней поверхностью клеточной мембрany, так и способствовать освобождению из эндосом их комплексов с ДНК, а также синтез носителей на основе фрагмента 48-60 белка Tat вируса иммунодефицита человека, по литературным данным обладающего способностью проникать через мембрany клетки и накапливаться в ядре. Звездообразная структура носителей с наличием нескольких таких фрагментов, а также введение лигандов для связывания с рецепторами на поверхности клетки может усилить эти свойства и способствовать более эффективной защите ДНК от ферментативного расщепления и целевой доставке в ядро клетки. Работа предусматривала изучение конформационных характеристик саггезированных носителей и изменения структуры ДНК при взаимодействии ДНК-пептид с помощью метода кругового дихроизма. Образование комплексов носитель-ДНК и защита нуклеиновой кислоты от действия гидролитических ферментов были изучены с помощью гель-электрофореза. Большое внимание в диссертации уделено исследованию способности синтезированных пептидов нарушать целостность

биологических мембран (эритроцитарных и эндосомальных) и влиянию на протекание биохимических реакций в клетке на примере аденилатцилазной системы, что обычно упускается из внимания при создании и исследовании носителей.

Научная новизна- работы заключалась в теоретическом поиске наиболее оптимальных структур ДНК-связывающих пептидов и синтезе новых катионных олигопептидов, гидрофильно-гидрофобный баланс которых варьировался от сильно гидрофобного пептида со структурой, способствующей формированию амфипатической а-спирали, до гидрофильных димеров и звездообразных тетramerов на основе фрагмента HTV-1 Tat (48-60). Изучение свойств синтезированных соединений показало зависимость содержания а-спиральной конформации в структуре пептидов и увеличение размеров их комплекса с ДНК от гидрофобности пептида. Кроме того, было обнаружено, что переход от линейной структуры пептида к звездообразной, а также введение лиганда GRGDS, способного обеспечить специфическое связывание с рецепторами на поверхности клетки, резко меняет структуру пептида и его комплекса с ДНК. Впервые было рассмотрено влияние катионных олигопептидов - носителей ДНК - на протекание биохимических процессов в клетке на примере аденилатцилазной системы и был обнаружен рост базальной активности аденилатцилазы с увеличением гидрофобности пептидов, что можно объяснить усилением их взаимодействия с мембраной клетки. Эти данные подтверждаются также ростом гемолитической активности более гидрофобных пептидов и ярко выраженной способностью амфипатического олигопептида к проникновению через эндосомальную мембрану и их следует принимать во внимание при создании поликатионных носителей ДНК и других биологически активных веществ.

Эти результаты составляют основу выносимых на защиту диссертации положений.

Практическая значимость работы: в результате проведенной работы был синтезирован ряд новых катионных атигопептидов, потенциальных носителей ДНК, и изучены их свойства. Поиск новых компактизующих пептидов, модификация их лигандами, позволяющими осуществлять направленный транспорт к определенным типам клеток и транспорт ДНК в их ядра, а также поиск эндосомолитических

кошактизующих пептидов, которые могут существенно повысить эффективность проникновения чужеродной ДНК в клетку и достигнуть уровня вирусных носителей, избавившись от присущих им недостатков, является одной из главных задач генной терапии. Исследование механизмов проникновения невирусных векторов в клетку, взаимодействия их с клеточными структурами и влияния на биохимические реакции, протекающие в клетке в их присутствии, позволяет определить направление этого поиска. Поэтому проведенная работа является значимой как с научной, так и с практической точки зрения.

Диссертация состоит из 6 разделов: введения, обзора литературы, касающейся данной проблемы, обсуждения результатов проведенной работы, экспериментальной части, выводов и списка литературы, который включает 137 наименований. Работа изложена на 126 страницах и содержит 38 рисунков и 9 таблиц.

Работа выполнена как часть исследований, проводящихся в ИВС РАН по теме "Гидрофильные синтетические и природные полимеры, биологически активные соединения и материалы на их основе".

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на ряде всероссийских и международных конференций: 4<sup>th</sup> International Symposium "Molecular order and Mobility in Polymer Systems" (St Petersburg, June 3-7, 2002), 27<sup>th</sup> European Peptide Symposium (Sorrento, Italy, August 3 - September 6, 2002), 20<sup>th</sup> Conference of European comparative endocrinologists (Bonn, Germany, August 26-30, 2002), 10-я Международная конференция студентов и аспирантов (Казань, 22-24 мая, 2001), 10<sup>th</sup> German-Russian Peptide Symposium (Friedrichroda, Germany, October 2-5, 2003), Российский симпозиум по химии и биологии пептидов (Москва, 17-19 ноября, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 11 тезисов докладов и 2 статьи.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении обоснована актуальность диссертационной работы, определены ее цели, сформулированы научная новизна и практическая значимость.

Глава 2 Обзор литературы содержит литературные данные о структуре белков и олигопептидов, особенностях взаимодействия ДНК с поликатионными пептидами и основных требованиях, предъявляемых к олигопептидам как к носителям ДНК.

### Глава 3 Обсуждение результатов

#### 3.1 Синтез пептидов

Основные направления, по которым развивается поиск носителей ДНК при использовании синтетических пептидов - это создание амфипатических пептидов и липопептидов, модифицированных остатками гидрофобных кислот и стероидов, а также разветвленных структур на основе олигопептидных последовательностей, в том числе дендримерных, для усиления взаимодействия носителя как с ДНК, так и с мембранами, рецепторами и переносчиками макромолекул в клетке.

С учетом литературных данных был синтезирован ряд олигопептидов на основе лизина с постепенным увеличением гидрофобности:

**FP** C(Acm)-Ahx-YKAKKKKKKKWK

**FP1** C(Acm)-[K(C10)]-Ahx-YKAKKKKKKKWK

**FP4** C(Acm)-Ahx-WK[K(C10)]KK[K(C10)]KKK[K(C10)]KYK[K(C10)]KK

где [K(C10)] - Lys( N<sup>ε</sup>-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>CO)-,

Ahx- ε-аминогексановая кислота,

Acm- ацетамидометильная защитная группа остатка цистеина.

В случае пептида **FP4** гидрофобные остатки находятся в положениях *i*/*i+3*(4), что способствует появлению у структуры амфипатического характера - и является дополнительным фактором, способствующим спирализации. При этом образуется один гидрофобный сегмент, который не препятствует взаимодействию с ДНК (рис.1).

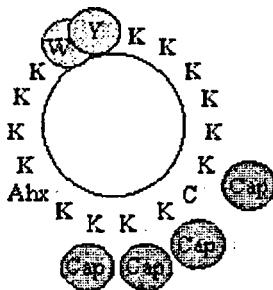


Рис. 1. Распределение гидрофобных остатков пептида **FP4** (проекция на плоскость, перпендикулярную оси  $\alpha$ -спирали) (Edmundson wheel diagram).

С помощью полученных пептидов проследили изменение способности к связыванию ДНК и взаимодействия с мембранами клетки при переходе от катионного пептида (**FP**), не содержащего гидрофобных радикалов, через пептид с одним остатком каприновой кислоты (**FP1**) к пептиду со структурой, способствующей формированию амфипатической  $\alpha$ -спирали с четырьмя гидрофобными фрагментами (**FP4**).

Вторым важным рассмотренным в работе направлением в поиске носителей ДНК является синтез многофункциональных молекул с разветвленной структурой. Построение дендримерной структуры на основе пептидов последовательным наращиванием полипептидной цепи имеет определенные сложности, связанные с синтезом и дальнейшей очисткой полученных высокомолекулярных соединений. Альтернативным путем является синтез с использованием небольших фрагментов, соединяемых далее в одну большую молекулу.

В качестве такого фрагмента был выбран фрагмент 48-60 пептидной последовательности белка Tat вируса иммунодефицита человека (**GRKKRRQRRPPQ**), который представляет собой сигнал ядерной локализации (**NLS**) и обладает способностью к проникновению через мембранны клеток и транспорту в ядро. В данной работе был синтезирован димер на основе лизина, имеющий два фрагмента **HIV-1 Tat (48-60) (N2)**, который был также модифицирован лигандом, содержащим последовательность аргинин-глицин-аспарагиновая кислота

**(GRGDS)** для специфического связывания с поверхностью клетки **(RN2)**. Данные димеры служили основой для синтеза тетрамерной звездообразной структуры **(N4 и RN4)** (рис. 2).

Для синтеза пептидов был использован твердофазный метод. В случае пептидов **FP**, **FP1** и **FP4** в растущую полипептидную цепь вводили предварительно синтезированный  $\alpha$ -трет-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -деканоиллизин. Аналогичным образом твердофазным методом с использованием **BOC/BzI** стратегии были получены димеры на основе **HIV-1 Tat (48-60)**. На месте разветвления в патипептидную цепь вводился ди(трет-бутилоксикарбонил)лизин, что делало возможным удвоение последовательности растущего пептида.

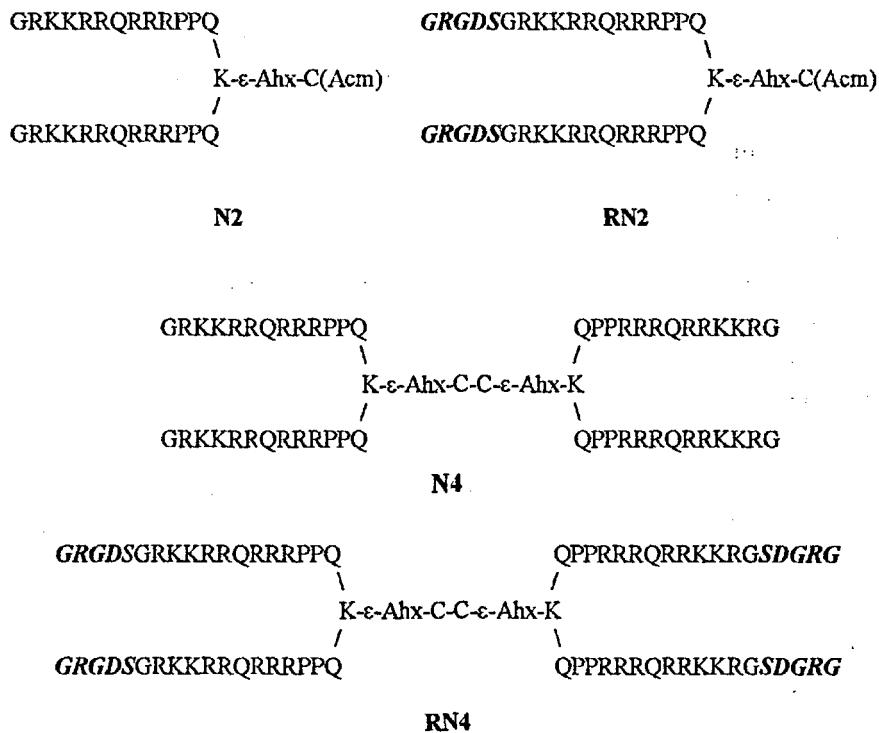


Рис. 2. Пептиды на основе фрагмента HIV-1 Tat (48-60).

Тетрамеры фрагмента **НIV-1 Tat (48-60)** были получены с помощью образования дисульфидной связи между С-концевыми остатками цистеина димеров. Вследствие большого количества побочных продуктов при непосредственном окислении пептидов **N2** и **RN2** с защищенным остатком цистеина действием йода, Лет-группа была предварительно удалена с помощью раствора ацетата двухвалентной ртути. При этом анализ продукта реакции методом обращенно-фазовой ВЭЖХ показал наличие смеси димера со свободной SH-группой с тетramerом, образовавшимся вследствие частичного окисления SH-группы цистеина кислородом воздуха. Полученная смесь димера и тетрамера использовалась для полного окисления раствором йода в уксусной кислоте. Исходные соединения (N2 и RN2) и продукты реакции (N4 и RN4) имели одинаковый аминокислотный состав. Однако, массспектрометрический анализ подтвердил удвоение молекулярной массы полученных соединений.

### 3.2 Изучение вторичной структуры пептидов методом кругового дилюизма.

Для изучения структурных характеристик сконденсированных пептидов был использован метод кругового дилюизма (табл. 1).

Как видно из приведенных данных, введение гидрофобных фрагментов декановой кислоты приводит к резкому увеличению содержания *ss*-спирали даже в водной среде. Максимальное содержание *os*-спирали пептиды имеют в 80%-ном трифтогорэнаноле.

При взаимодействии пептидов с ДНК наблюдаются конформационные изменения ее структуры - при увеличении содержания пептида в системе положительный пик в длинноволновой области (260-290 нм), соответствующий полосе поглощения ДНК, уменьшается по интенсивности и смещается в длинноволновую область (рис. 3-6). Для сравнения были получены спектры кругового дилюизма системы, содержащей ДНК и анионный пептид **JTS-1**. В отличие от остальных пептидов, подобного явления в этом случае не обнаруживается, что говорит о его неспособности к взаимодействию с ДНК. При увеличении концентрации пептида в системе происходит исчезновение полосы поглощения ДНК, свидетельствующее об образовании крупных агрегатов комплекса FP-ДНК, FPI-ДНК и PP4-ДПК и дальнейших изменений в спектрах нуклеиновой кислоты не наблюдается.

Табл. 1. Содержание различных форм вторичной структуры синтезированных пептидов.

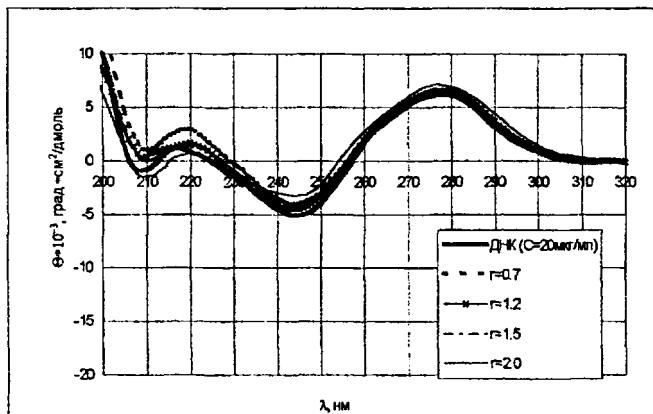
	<b>FP</b> 80% TFE, %	<b>FP</b> 0,01N NaOH, %	<b>FP1</b> 80% TFE, %	<b>FP1</b> 0,01N NaOH, %	<b>FP4</b> 80% TFE, %	<b>FP4</b> 0,01N NaOH, %
$\alpha$ -спираль	24,4 $\pm$ 5,4	6,7 $\pm$ 4,8	70,4 $\pm$ 4,8	25,1 $\pm$ 5,3	63,1 $\pm$ 4,6	27,7 $\pm$ 4,6
$\beta$ -склад. АІ*	16,7	33,1	3,3	18,7	3,6	10,3
$\beta$ -склад. ПА**	5,7	5,3	2,8	6,3	3,3	10,2
$\beta$ -изгиб	17,4	22	12	17,5	14,7	17,9
Неупоряд.	34,7	35,7	13,7	34,2	13,4	35,9
Сумма	99,0	98,7	101,8	101,7	96,6	102,0

	<b>N2</b> 80% TFE, %	<b>N2</b> 0,01N NaOH, %	<b>N2</b> Вода, %	<b>RN2</b> 80% TFE, %	<b>RN2</b> 0,01N NaOH, %	<b>RN2</b> Вода, %
$\alpha$ -спираль	55,8 $\pm$ 6,6	4,6 $\pm$ 6,4	3,9 $\pm$ 6,2	21,8 $\pm$ 6,4	7,1 $\pm$ 6,4	10,6 $\pm$ 6,2
$\beta$ -склад. АІ*	4,2	38,3	24,2	9,6	32,5	30,7
$\beta$ -склад. ПА**	5,1	5,2	2,4	4,9	5,3	4,8
$\beta$ -изгиб	11,8	21,2	35,8	32,6	20,4	25,8
Неупоряд.	19,1	34,9	41,2	31,3	34,8	30,7
Сумма	95,9	104,2	107,4	100,2	100,3	102,5

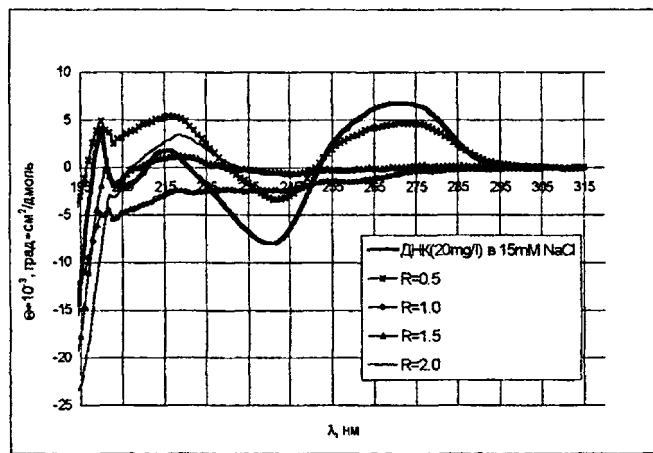
	<b>N4</b> 80% TFE, %	<b>N4</b> 0,01N NaOH, %	<b>N4</b> Вода, %	<b>RN4</b> 80% TFE, %	<b>RN4</b> 0,01N NaOH, %	<b>RN4</b> Вода, %
$\alpha$ -спираль	6,0 $\pm$ 6,4	5,2 $\pm$ 6,4	4,9 $\pm$ 6,2	13,2 $\pm$ 6,4	10,1 $\pm$ 6,5	14,1 $\pm$ 6,2
$\beta$ -склад. АІ*	32,8	35,9	29,7	17,6	34,5	25,8
$\beta$ -склад. ПА**	5,2	5,2	3,2	5,1	5,9	5,0
$\beta$ -изгиб	23,1	21,7	28,5	30,8	17,7	26,6
Неупоряд.	35,1	34,9	38,6	35,3	35,3	29,7
Сумма	102,1	103,0	104,9	102,0	103,4	101,1

\*антипаралльная

\*\*паралльная

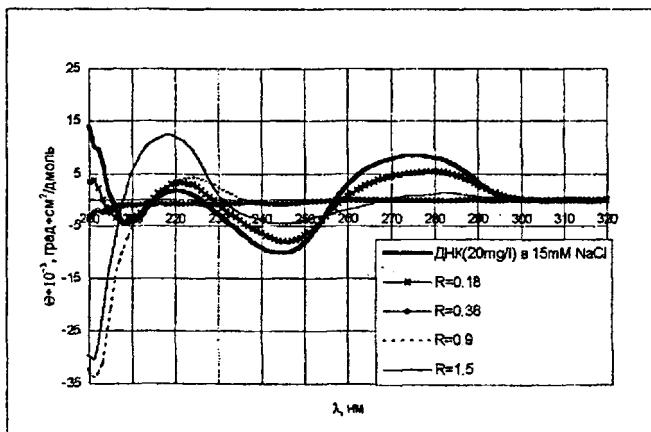


A

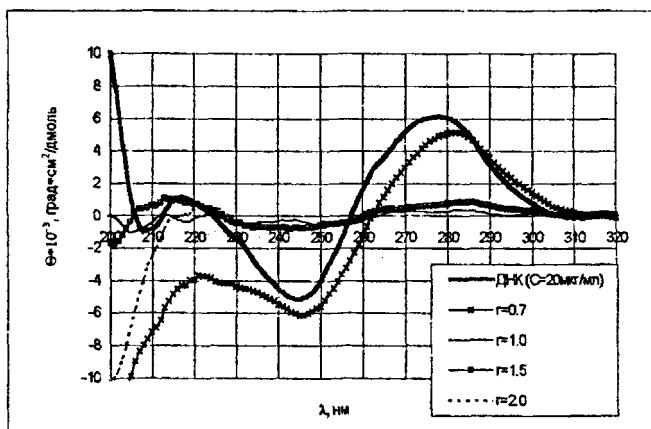


B

Рис. 3. Спектры кругового дихроизма комплексов JTS-1/ДНК (А) и FP/ДНК (В)



A



B

Рис. 4. Спектры кругового диахроизма комплексов FP1/ДНК (А) и FP4/ДНК (В)

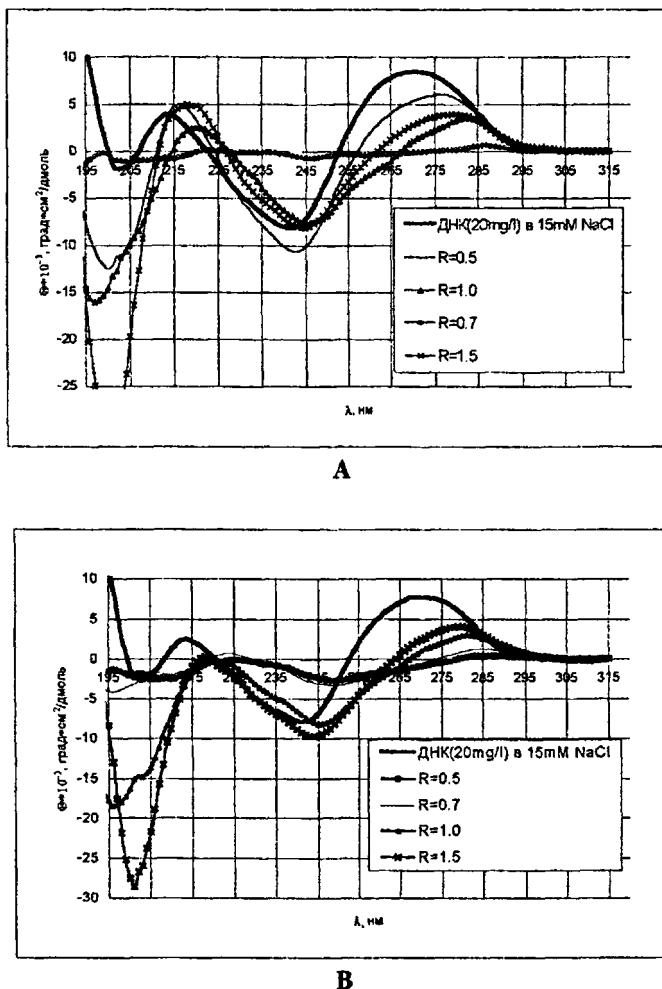
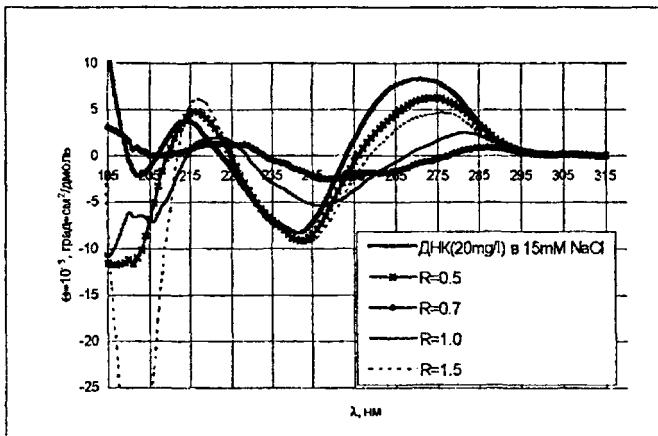
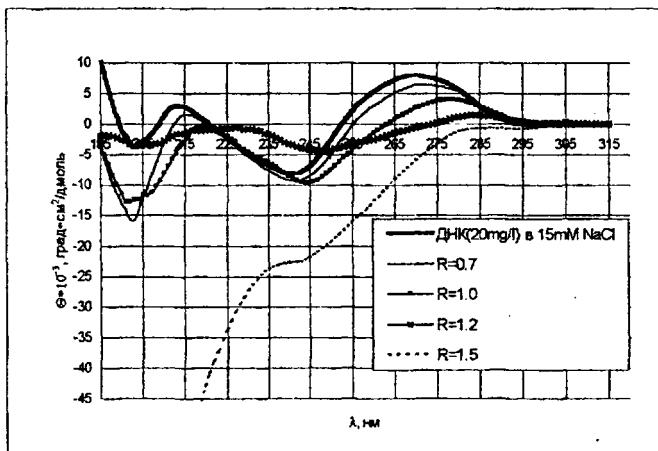


Рис. 5. Спектры кругового диахроизма комплексов  $\text{N}_2/\text{ДНК}$  (А) и  $\text{RN}_2/\text{ДНК}$  (В)



A



B

Рис. 6. Спектры кругового диахроизма комплексов N4/ДНК (А) и RN4/ДНК (Б)

Содержание  $\alpha$ -спирали в случае пептидов на основе фрагмента HIV-1 Tat (48-60) значительно только в случае N2 - около 50% - в основном все пептиды имеют  $\beta$ -складчатую структуру с довольно высокой неупорядоченностью. Введение в пептид N2 небольшого фрагмента из 5 аминокислот (GRGDS) (пептид RN2) приводит к значительному уменьшению содержания  $\alpha$ -спиралей в его структуре, а сдавливание молекул вызывает появление  $\beta$ -структуры. Сдавливание же молекулы пептида RN2 на пространственную организацию влияет не так сильно, как у N2.

После полной нейтрализации заряда ДНК пептидами N2 и RN2 и образования крупных агрегатов комплекса, при дальнейшем увеличении содержания пептида в системе, в отличие от пептидов FP, FP1 и FP4, происходит частичное возвращение полосы поглощения ДНК в первоначальное положение, что может свидетельствовать о диссоциации первоначально образовавшихся крупных агрегатов. В случае, же тетрамеров N4 и RN4 исчезновения полосы поглощения ДНК и образования крупных агрегатов комплексов вообще не наблюдается, однако, по данным спектров КД, они имеют различную структуру. Из полученных данных можно сделать вывод, что введение даже небольшого фрагмента из 5 аминокислот (GRGDS), обеспечивающего специфическое связывание с поверхностью клетки, резко меняет как структуру пептида, так И' структуру его комплекса с ДНК, что может существенно влиять на проникновение ДНК в клетку и ее дальнейшую экспрессию.

### 3.3 Исследование структуры и размеров комплексов синтезированных пептидов с ДНК методом электронной микроскопии.

Более полная информация о форме и размерах этих комплексов пептидов с ДНК была получена с помощью метода - просвечивающей электронной микроскопии. Размеры комплексов варьировали в широких пределах - от 15-30 нм до 50-100 нм, что совпадает с диапазоном размеров комплексов с литературными данными по использованию других компактизующих соединений (например, полилиизина). Пептиды, модифицированные гидрофобными фрагментами, образуют с ДНК довольно большие комплексы, с агрегированной структурой, что может являться препятствием для проникновения их в клетку. По мере уменьшения количества гидрофобных остатков размеры частиц также уменьшаются. Наиболее мелкие

структуры образует тетрамерный пептид **RN4**. При этом обнаруживаются как отдельные частицы комплекса, так и их агрегаты.

### 3.4 Исследование комплексообразования и защиты ДНК от иуклеазного расщепления методом гель-электрофореза.

Поликатионные пептиды при образовании комплекса нейтрализуют отрицательный заряд ДНК, что сопровождается изменением ее электрофоретической подвижности (рис. 7).

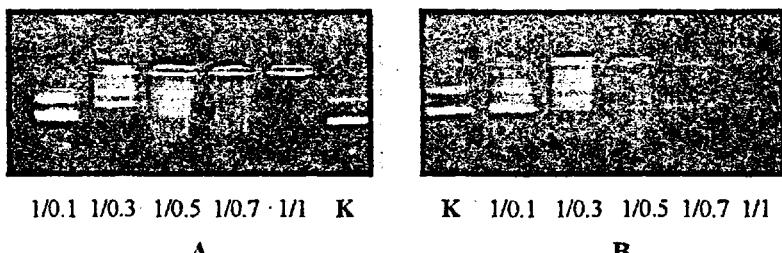


Рис. 7. Гель-ретардация комплексов ДНК/FP (А) и ДНК/FP1 (В) при различном зарядовом соотношении (К - нативная ДНК).

Полная задержка ДНК в случае пептида **FP4** наблюдается при зарядовом соотношении ДНК/носитель 1/1 и выше, а пептиды **FP** и **FP1** связывают ДНК уже в соотношении 1/0,7. Следует отметить, что при увеличении концентрации **FP1** свечение комплексов в лунках уменьшается, что, видимо, означает увеличение их гаотности. При этом образующиеся комплексы ДНК-пептид становятся непроницаемыми для бромистого этидия, штгеркатирующего красителя, который использовался для обнаружения ДНК. Комpleксы же с **FP** и **FP4**, как и в случае пептидов на основе фрагмента HIV-1 Tat (48-60), в достаточной степени «рыхлые» для его проникновения, и затухания флуоресценции комплекса не происходит.

При изучении устойчивости комплексов плазмидной ДНК с пептидами к ферментативному гидролизу было обнаружено, что ее полная защита от действия ДНКазы I происходит при более высоком содержании пептидов в комплексе, чем необходимо для полной компактизации ДНК. Однако для разветвленных пептидов

N4 и RN4 эффективная защита наблюдается при том же соотношении, что и полная задержка плазмида в геле.

Таким образом, исследование комплексообразования и защиты ДНК от нуклеазного расщепления методом гель-электрофореза подтверждает данные, полученные методами кругового дихроизма и электронной микроскопии об особой структуре комплексов пептидов с разветвленной структурой по сравнению с линейными пептидами. Тем не менее, все пептиды обнаруживают способность к компактизации и защите нуклеиновой кислоты от ферментативного гидролиза при довольно низком соотношении пептид/ДНК и могут являться носителями ДНК для ее доставки в клетку.

### 3.5 Исследование гемолитической активности пептидов.

Важным этапом работы являлось исследование взаимодействия полученных соединений с мембранами. В качестве модельных были выбраны мембранны эритроцитов, которые широко используются для изучения белково-липидных взаимодействий. Для сравнения при изучении гемолитической активности полученных пептидов использовался порообразующий пептид JTS-1, добавление которого в комплекс носителя с ДНК способствует освобождению комплекса из эндосом.

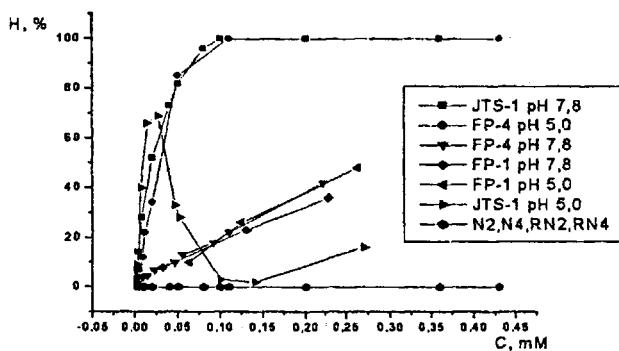


Рис. 8. Гемолитическая активность пептидов.

Как видно из приведенных данных (рис. 8), гемолитическая активность находится в зависимости от гидрофобности пептидов и pH среды. С увеличением гидрофобности гемолитическая активность возрастает: **FP4 ≈ JTS-1 > FP1 > FP ≈ N2, N4, RN2, RN4**. При этом было обнаружено, что пептид **FP** и пептиды на основе фрагмента HTV-1 Tat (48-60) на мембранные эритроцитов влияния не оказывают, а пептид **FP1** вызывает их агглютинацию (склеивание), что, вероятно, обусловлено возможностью встраивания в мембрану за счет гидрофобного фрагмента и нейтрализацией суммарного отрицательного заряда ее внешней поверхности. Максимальную гемолитическую активность показали пептиды **FP4** и **JTS-1**. Однако такое действие проявляется при разных pH среды (pH 5,0 для **FP4** и pH 7,8 для **JTS-1**). Таким образом, в данном случае способность пептидов к взаимодействию с мембраной зависит в большей степени не от спиральности (в кислой среде пептиды, модифицированные остатками декановой кислоты, практически не спирализованы), а от отсутствия их агрегации.

Таким образом, можно предполагать, что по способности проникновения через мембранные клетки пептиды и их комплексы с ДНК располагаются таким же образом: **FP ≈ N2, N4, RN2, RN4 < FP1 < FP4**, то есть по увеличению гидрофобности и спирализации.

### 3.6 Исследование эндосомолитических свойств пептидов **FP1** и **FP4**.

Для исследования эндосомолитических свойств пептидов **FP1** и **FP4** был проведен ряд экспериментов *in vitro* по доставке плазмидной ДНК комплексами ДНК/носитель как в присутствии хлорокина, так и без него. Это соединение широко используется для изучения механизма проникновения комплексов в цитоплазму клетки и его действие заключается в основном в нарушении процесса закисления эндосом и тем самым в препятствии действию гидролитических ферментов. Обработка клеток хлорокином позволяет более полно проявиться собственным эндосомолитическим свойствам носителя. Добавление в систему хлорокина обнаруживает резкое отличие пептида **FP4** от пептида **FP1**. Было показано, что присутствие хлорокина увеличивает эффективность трансфекции комплексом ДШС/FP1 с  $0,08 \pm 0,02\%$  до  $5,15 \pm 0,31\%$ . На эффективность проникновения в клетку комплекса ДНК/PP4 хлорокин, напротив, действия почти не оказал (рис. 9).

На основании полученных результатов можно предположить наличие у амфипатического пептида **FP4** собственных эндосомолитических свойств, которые выражены значительно более ярко, по сравнению с пептидом **FP1**, что согласуется с результатами экспериментов по гемолизу эритроцитов.

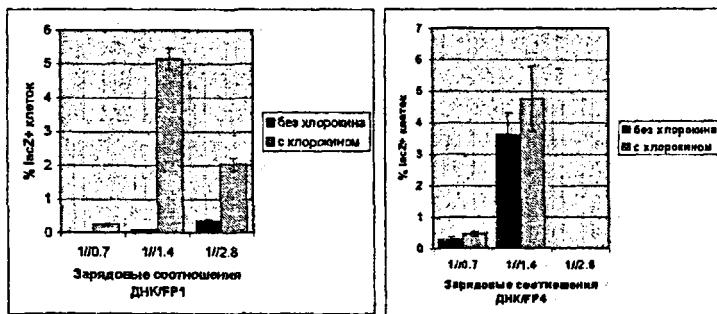


Рис. 9. Оценка - эффективности трансфекции клеток HeLa в зависимости от зарядовых соотношений комплексов ДНК/FP1 и ДНК/PP4 в присутствии и отсутствии хлорокина.

### 3.7 Взаимодействие пептидов с аденилатциклазной системой клетки.

При синтезе носителей ДНК и изучении процесса проникновения невирусных векторов в клетку основное внимание уделяется, в основном, лишь увеличению эффективности проникновения ДНК в клетку и подбору условий для ее максимальной экспрессии. Однако открытым остается вопрос о побочных действиях катионных носителей на В1гутриклеточные структуры и биохимические процессы, происходящие в клетке.

В данной работе было исследовано влияние синтезированных катионных пептидов на базальную активность фермента аденилатциклазы, то есть количество, циклического аденоzinмонофосфата, вырабатывающегося в клетках в отсутствие внешнего воздействия (рис. 10).

При введении в систему пептидов **FP**, **FP1** и **FP4** базальная активность аденилатциклазы заметно повышается, проходя через максимум, что связано,

вероятно, с повышением общей концентрации циклического аденоzinмонофосфата в системе и торможением его синтеза. В отличие от этого, пептиды на основе фрагмента HIV-1 Tat (48-60) практически никакого эффекта на базальную активность аденилаткиназы не оказывают, несмотря на увеличение содержания катионных аминокислот и общего положительного заряда.

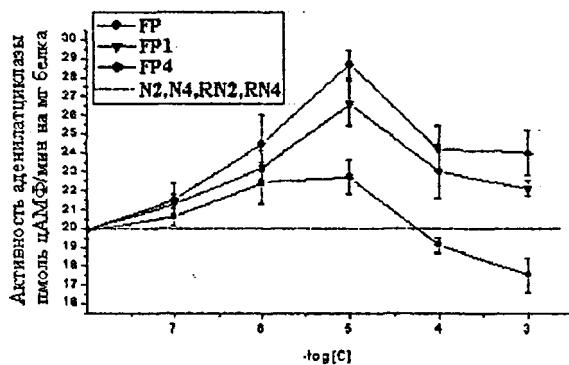


Рис. 10. Влияние синтезированных катионных олигопептидов на базальную активность аденилаткиназы.

Таким образом, увеличение активности пептидов в данном тесте происходит одновременно с увеличением их гидрофобности и спиральности (N2, N4, RN2, RN4<FP<FP1<FP4).

Полученные данные могут объяснить появление в ряде случаев токсичности подобного рода носителей при увеличении содержания их в комплексе с ДНК, что, вероятно, является одной из причин гибели клеток. Эти результаты следует учитывать при выборе структуры поликатиона и дальнейшей работе по созданию невирусных носителей чужеродных генов и терапевтических средств на их основе.

Глава 4 Экспериментальная часть содержит характеристики исходных реагентов, методики синтеза и исследования полученных соединений.

## Глава 5 Выводы.

1. С учетом литературных данных и теоретических расчетов, синтезирован ряд новых катионных олигопептидов, носителей ДНК, гидрофилью-гидрофобный баланс которых варьировался от сильно гидрофобного пептида (FP4) со структурой, способствующей формированию амфипатической а-спирали, до гидрофильных димеров и тетramerов звездообразной структуры на основе фрагмента 48-60 белка Tat вируса иммунодефицита человека
2. Синтез димерной и тетрамерной форм фрагмента 48-60 белка Tat вируса иммунодефицита человека был проведен по оригинальной методике, позволившей получить эти пептиды с высокой степенью чистоты.
3. При изучении с помощью гель-электрофореза (метод ретардации) комплексов пептидов с ДНК было показано, что все синтезированные пептиды способны как к связыванию и компактизации ДНК, так и к ее эффективной защите от ферментативного гидролиза.
4. Изучение вторичной структуры синтезированных пептидов методом кругового дилюциона показало увеличение а-спиральности при возрастании их гидрофобности. Переход от димерной к тетрамерной форме пептидов, фрагментов белка вируса иммунодефицита человека, а также введение лиганда GRGDS военным кругового дилюциона резко меняет структуру пептида и его комплекса с ДНК.
5. С помощью метода электронной микроскопии было показано, что увеличение гидрофобности пептидов приводит к увеличению размеров комплекса пептида с ДНК.
6. Показано, что более гидрофобные пептиды обладают способностью разрушать биологические мембрany.
7. Впервые на примере адешлатцилазной системы было рассмотрено влияние катионных атигопептидов - носителей ДНК - на протекание биохимических процессов в клетке. Был обнаружен рост базальной активности аденилатцилазы с увеличением гидрофобности пептидов. В то же время гидрофильные, катионные пептиды аденилатцилазную систему не активируют. Эти данные следует принимать во внимание при создании новых поликатиогаших носителей ДНК и других биологически активных веществ.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. I. Guryanov, E. Vlasova, V. Korolicov, G. Vlasov, A. Kiselcv, E. Lesina, V. Baranov, E. Avdeeva, E. Chihirgina, V. Varob'ev. Synthesis of amphipatic a-helical peptides with different contents and disposition of lipophilic fragments and their interaction with DNA and membranes of erythrocytes. 4<sup>th</sup> International Symposium "Molecular order and Mobility in Polymer Systems" Si Petersburg, June 3-7,2002, P. 182
2. I. Guryanov, V. Korol'kov, G. Vlasov, A. Kiselev, E. Lesina, V. Baranov E. Avdeeva, E. Chihirgina, V. Vorob'ev. Synthesis of amphipatic a-helical peptides modified with hydrophobic fragments and their interaction with DNA and erythrocytes. Proc. of 27<sup>th</sup> European Peptide Symposium., Sorrento, Italy, August 31- September 6,2002, P. 764
3. Shpakov A. O., Korol'kov V. I., Guryanov I. A., Plesneva S. A., Kuznetsova L. A., Vlasova E. N., Vlasov G. P. The regulatory influence of the cationic helical peptides on the functional activity of the protein kinase A in the tissues of rat and mollusc. Proc. of 20\* Conference of European comparative endocrinologists, Bonn, Germany, August 26-30,2002, P. 111
4. И. А. Гурьянов, А. В. Киселев, В. И. Корольков, В. С. Баранов, Г. П. Власов. Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений. 10 Международная конференция студентов и аспирантов. Казань, 22-24 мая, 2001
5. A. Kiselev, E. Lesina, L Guryanov, A. Baranov, V. Korol'kov, G. Vlasov, V. Baranov. Development of a new non-viral peptide vehicle for DNA delivery. 9 Annual meeting of ESGT, Turkey, Antalya, November 2-4,2001, P. 87
6. Г. П. Власов, И. А. Гурьянов, И. И. Тарабенко, Н. В. Баянова, Г. А. Панкова, В. И. Воробьев, Е. В. Авдеева, Е. В. Чихиржина. Синтез и изучение образования комплексов ДНК стаггетическими невирусными носителями. Цитология. 2003. Т. 45. №9. С. 857
7. Шпаков А О., Гурьянов И. А., Власова Е. ИЛ, Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н., Власов Г. П. Разобщение функционального сопряжения рецепторов и ГТФ-связывающих белков катионными пептидами, содержащими гидрофобные радикаты. Цитология. 2003. Т. 45. №9. С. 948-949

8. Шпаков А. О., Корольков В. И., Гурьянов И. А., Власова Е. Н., Плеснева С. А., Кузнецова Л.А, Власов Г.П., Перцева М.Н. Регуляция синтетическими спиралеобразующими пептидами с различным распределением заряженных аминокислот и гидрофобных радикалов функциональной активности протеинкиназы А в мозге и скелетных мышцах крыс. Психофармакология и биологическая наркология. 2002. Т. 2. №3-4. С. 469
9. Shpakov A., Guryanov L, Korol'kov V. The involvement of helical cationic peptides with hydrophobic ClO-radicals in receptor-G protein interaction. The FEBS Journal. 2003.V.270. Suppl. 1.P.51
10. G. Vlasov, I. Guryanov, G. Pankova, L Tarasenko, N. Bajanova, O. Charenko, A. Zhukov, V. Baranov, A Kiselev, E. Lesina, V. Vorob'ev, E. Avdeeva, E. Chihirdghina. Synthesis and comparative study of carriers for DNA targeted delivery. 10<sup>th</sup> German-Russian Peptide Symposium. Germany, Friedrichroda. October 2-5,2003.
11. Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Власова Е. Н., Корольков В. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. Ингибирование сюггетическими катионными пептидами стимулирующего влияния гормонов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы. Доклады Академии наук. 2003. Т. 389. №1. С. 127-130
12. Шпаков А. О., Гурьянов И. А, Воробьев В. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Чубей Н. М., Перцева М. Н., Власов Г. П. Разобщающее влияние катионных пептидов, содержащих гидрофобные радикалы, на функциональное сопряжение рецепторов серпантинного типа с ПФ-связывающими белками. Цитология. 2004. Т. 46. №3. С. 268-276
13. Гурьянов И. А., Лесина Е. А., Киселев А. В., Авдеева Е. В., Шпаков А. О., Власов Г. П., Баранов В. С, Воробьев В. И. Синтез новых олигопептидов звездообразной структуры на основе HTV-1 Tat (48-60) и возможность их использования для доставки ДНК в клетки. Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. Москва. 2003. Тезисы стеновых сообщений. С. 18

Бесплатно

Д - 2381

РНБ Русский фонд

2004-4  
19958

Автореферат отпечатан в ИВС РАН. Ризография.

Тираж 100 экз.