

На правах рукописи

АКЕНТЬЕВА Наталья Павловна

**RНАММ-ТАРГЕТ ПЕПТИДЫ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ВЛИЯНИЕ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, АПОПТОЗ И ИНВАЗИВНОСТЬ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Черноголовка – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт проблем химической физики» Российской Академии Наук

Научный консультант:

Топунов Алексей Федорович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха.

Официальные оппоненты:

Посыпанова Галина Ароновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;

Зинченко Валерий Петрович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией внутриклеточной сигнализации,

Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии Наук», Институт биофизики клетки;

Усынин Иван Федорович, доктор биологических наук, и. о. директора Научно-исследовательского Института биохимии, заведующий лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Российской Федерации.

Защита состоится «20» декабря 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.241.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «ФИЦ питания и биотехнологии» Российской Федерации по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» РФ и на сайте: <http://www.ion.ru/>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Шумакова Антонина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы диссертации

Частота возникновения онкологических заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Согласно статистике уровень смертности от онкологических заболеваний также стремительно растет и составит 40% от общего количества смертельных случаев к 2025 году (Акентьева и др., 2019; Ferlay et al., 2012). Несмотря на определенные успехи в лечении раковых заболеваний, основной проблемой в онкологии является отсутствие селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка способов для таргетной терапии раковых заболеваний (Akentieva et al., 2017) является самой актуальной и активно развивающейся областью биомедицины. Таргетная, адресная химиотерапия позволяет избирательно и эффективно локализовать препарат на молекулярных мишенях в клетке (например, на рецепторах), в то же время ограничить его доступ к нормальной клетке и, таким образом, получить максимальный терапевтический эффект и снизить токсичность препарата. На протяжении последних лет использование пептидов, как перспективных терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний, стремительно растет. Терапевтические пептиды завоевывают все большую популярность для применения в медицине в различных аспектах, в том числе, в виде противоопухолевых вакцин, антимикробной терапии, лечении рака или доставки нуклеиновых кислот (Акентьева и др., 2019; Lehrer, 2004; Hancock, 2001; Koczulla et al., 2003; Otvos, 2005; Nicolaou et al., 1999; Xia et al., 2001; Davies, 2003; Lyu, 2018). В ходе исследований было выявлено, что пептиды имеют разную физиологическую активность и различный эффект действия (Акентьева и др., 2019) на опухолевые клетки. Многие природные и синтетические «проапоптотические» пептиды индуцируют ферменты апоптоза и вызывают гибель клеток. Например, катионный антимикробный пептид, выделенный из бразильского тарантула, обладает не только бактериостатическими свойствами, но также проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* (Tanner et al., 2018). Так называемые «клеточно-проникающие пептиды» усиливают эффект химиотерапевтических препаратов, в то же время «мембранно-литические», катионные антимикробные пептиды разрушают мембраны раковых клеток (Veloria et al., 2017; Lindgren et al., 2006; Liang et al., 2005; Brogden, 2005; Mader et al., 2006). Химерные пептиды проявляют противоопухолевую активность и понижают множественную лекарственную устойчивость опухолей (Ukhanova et al., 2017). Существует категория противоопухолевых пептидов (пептиды-антагонисты), которые преимущественно связываются с известным рецептором и модулируют его активность, активируют или блокируют его функции, и тем самым влияют на процессы развития и прогрессии рака (Акентьева и др., 2019; Kritzer et al., 2005; Qvit et al., 2010; Zhang et al., 2012; Thayer, 2011; Borghouts et al., 2005; Platt et al., 2008; Vives et al., 2008). Помимо модуляции функции рецептора такие пептиды могут служить в качестве диагностических и терапевтических средств, а также для доставки различных наночастиц в опухоли и другие пораженные ткани, представляющие мишени рецепторов (Акентьева и др., 2019; Accardo et al., 2014; Ра-

tel et al., 2014). Такие пептиды-антагонисты имеют большие перспективы, потому что их действие нацелено на конкретную молекулярную мишень опухолевых клеток, что приводит к их гибели.

RHAMM/HMMR онкорцептор (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности) является такой молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний (Акентьева и др., 2019). В ряде работ было показано, что повышенное содержание RHAMM рецептора наблюдается в клетках рака молочной и предстательной желез, в клетках рака яичников, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе, и, обычно, повышенный синтез RHAMM рецептора коррелирует с плохим прогнозом (Акентьева и др., 2019; Maxwell et al., 2008; Turley et al., 2012; Tabarkiewicz et al., 2010; Casalegno-Garduno et al., 2011). Поэтому идентификация пептидов, специфично связывающихся с RHAMM рецептором и блокирующих его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для диагностики и лечения злокачественных новообразований (Акентьева и др., 2019).

Диссертационная работа посвящена идентификации и синтезу пептидов-антагонистов, способных специфично связываться с RHAMM онкорцептором на поверхности опухолевых клеток, модулировать активность RHAMM рецептора, блокировать передачу сигналов от гиалуроновой кислоты (ГК) к RHAMM рецептору и тем самым подавлять пролиферацию, жизнеспособность раковых клеток на самой ранней стадии.

RHAMM-таргет пептиды, способные блокировать центр связывания ГК на RHAMM рецепторе, представляют собой новую стратегию в противоопухолевой терапии, направленную на индукцию процессов апоптоза, некроза, ингибирование жизнеспособности и инвазивности опухолевых клеток (Акентьева и др., 2019). До данного научного исследования в литературе отсутствовали работы по изучению диагностического и терапевтического потенциала RHAMM-таргет пептидов, поэтому проведение фундаментальных исследований в этом направлении имеет научно-практическое значение.

Актуальность диссертационной работы определяется тем, что она направлена на поиск и идентификацию пептидов, способных специфично связываться с RHAMM рецептором опухолевых клеток, целенаправленно воздействовать на раковые клетки и регулировать ключевые клеточные процессы, такие как пролиферация, жизнеспособность, апоптоз, некроз, инвазивность и метастазирование раковых клеток.

Цель исследования: идентификация, дизайн RHAMM-таргет пептидов и исследование их терапевтического потенциала для диагностики и лечения злокачественных новообразований.

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Идентифицировать и синтезировать пептиды, специфично связывающиеся с RHAMM рецептором.

1.1. Исследовать специфичность взаимодействия пептидов с рекомбинантным RHAMM-СТ.

1.2. Исследовать специфичность связывания RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором раковых клеток молочной, предстательной желез и с клетками рака яичников.

2. Изучить влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7, инвазивность опухолевых клеток молочной железы.

3. Исследовать влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7, инвазивность опухолевых клеток предстательной железы.

4. Исследовать противоопухолевую активность RНАММ-таргет пептидов с помощью ксенографтов (животная опухолевая модель).

5. Исследовать диагностический потенциал RНАММ-таргет пептидов для визуализации рака яичников.

5.1. Исследовать связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников.

5.2. Исследовать специфичность связывания FITC-VEGEGEEGEEY-пептида с RНАММ на поверхности клеток рака яичников.

Научная новизна

В результате проведенного исследования получены новые и научно-значимые результаты, представляющие интерес для молекулярной диагностики и клеточной терапии онкологических заболеваний. Предложена научная концепция использования RНАММ-таргет пептидов для модуляции активности RНАММ-рецептора и применения RНАММ-таргет пептидов в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации.

Представлена оригинальная нетрадиционная система дизайна пептидомиметиков гиалуроновой кислоты из аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина. Впервые идентифицированы и синтезированы пептиды, представляющие собой фрагменты белка тубулина, специфично связывающиеся с RНАММ рецептором. Введен новый термин RНАММ-таргет пептиды. Разработана новая, эффективная экспериментальная методика получения и выделения рекомбинантного RНАММ-СТ белка методом генной инженерии, позволяющая получить гомогенный белок с высоким выходом, обладающий биологической активностью.

Разработаны новые методики для изучения специфичности связывания RНАММ-таргет пептидов с рекомбинантным RНАММ-СТ.

Предложен новый комплексный, биоинформационный подход для сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белков, пептидов с целью поиска гомологичных структур. Впервые выявлена закономерность между наличием общего фрагмента EEXEEZ в структуре RНАММ-таргет пептидах с их специфичностью и высоким сродством связывания с RНАММ-СТ.

Впервые показано, что пептиды (Akentieva et al., 2017) специфично связываются с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток рака молочной, предстательной желез и рака яичников. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды могут использоваться для адресной визуализации опухолевых клеток.

Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды имеют потенциал для ранней молекулярной диагностики злокачественных новообразований.

Разработана новая научная система использования RНАММ-таргет пептидов, специфичных блокаторов ГК/RНАММ сигнального пути, для клеточной терапии раковых заболеваний с помощью индукции процессов апоптоза, некроза, подавления жизнеспособности, пролиферации и инвазивности опухолевых клеток. Впервые продемонстрирована высокая специфичная цитотоксическая и противоопухолевая активность RНАММ-таргет пептидов *in vitro* и *in vivo*.

Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают апоптотическим потенциалом, индуцируют апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной и предстательной желез. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды повышают активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках молочной и предстательной желез и тем самым индуцируют апоптоз по митохондриальному пути.

Впервые соискателем исследована связь между структурой, размером RНАММ-таргет пептидов и их физиологической активностью в клетках. Доказана закономерность соответствия структуры и функции RНАММ-таргет пептидов.

Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды вызывают морфологические изменения в клетках, нарушают структурную организацию актина и подавляют образование инвадоподий опухолевых клеток молочной и предстательной желез. Впервые методом флуоресцентной конфокальной микроскопии показано, что популяция клеток РМЖ является гетерогенной и состоит из мелких злокачественных, инвазивных клеток и многоядерных неинвазивных клеток старения (*senescence cells*). Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды уменьшают количество клеток старения и, следовательно, обладают сенолитическим потенциалом. Впервые показано, RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом, так как ингибируют инвазивность клеток рака молочной и предстательной желез.

Впервые установлено, что RНАММ-таргет пептиды проявляют противоопухолевую активность *in vivo* (ксенографты, мышьяная опухолевая модель). Впервые исследован диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость исследования основана на том, что впервые получены новые фундаментальные знания о взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором. В результате проведенного исследования создана научная концепция о модуляции активности RНАММ онкорепцептора с помощью пептидов. В работе изложены доказательства о ключевой роли RНАММ рецептора в регуляции важных клеточных процессов, таких как жизнеспособность, пролиферация, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток. Эти данные расширяют фундаментальные знания в области биохимии о физиологической активности пептидов, механизме их действия, регуляции сигнальных путей с помощью пептидов, природных регуляторов клеточного метаболизма. В работе изложены доказательства о взаимосвязи между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ рецептором, доказана роль ключевых аминокислот в пептид-белковых взаимодействиях.

Диссертационная работа имеет фундаментальное значение с перспективой практического применения в биомедицине и в онкологии. Впервые разработана система биоинформационных методов исследования, компьютерных программ для количественного анализа результатов, использованы современные экспериментальные методики, позволившие получить важные результаты. Впервые продемонстрирована гомология между аминокислотной последовательностью ГК-связывающего центра на RНАММ рецепторе и аминокислотной последовательностью тубулин-связывающей области кинезинов, микротрубочек ассоциированных белков. Эти результаты расширяют возможности для разработки новых таргетных пептидов на основе изучения белок-белковых взаимодействий. Методами компьютерного анализа выявлена гомология в аминокислотной последовательности RНАММ-таргет пептидов, доказывающая наличие связей между структурой и функцией пептидов.

Впервые разработан эффективный метод получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка с помощью генной инженерии, позволяющий получить гомогенный белок с высоким выходом. Метод выделения и очистки RНАММ-СТ белка для лечения диабета 2-го типа запатентован (международный патент на изобретение № 12459, Naor et al., 2013). Новые методы идентификации RНАММ-таргет пептидов и анализа их специфичности связывания с RНАММ рецептором являются универсальными и могут быть использованы для исследований других рецепторов и их пептидов-лигандов.

Полученные результаты являются научно-значимыми, так как впервые изучен диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов для лечения онкологических заболеваний. Визуализация опухолевых клеток с помощью флуоресцентно-меченых RНАММ-таргет пептидов позволит создавать молекулярные зонды для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитотоксической, апоптотической, сенолитической и анти-метастатической активностью. Эти результаты служат основанием для разработки нового подхода-таргетной терапии в лечении онкологических заболеваний, с применением RНАММ-таргет пептидов, специфичных блокаторов ГК/RНАММ сигнального пути. Эти данные являются важными, так как RНАММ-таргет пептиды могут использоваться в трансляционной онкологии, в частности, в молекулярной диагностике и клеточной терапии злокачественных новообразований различной локализации.

В результате проведенного исследования представлены рекомендации практического применения RНАММ-таргет пептидов для клеточной терапии рака: индукция апоптоза, некроза, подавление роста и инвазивности опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Перспектива практического использования RНАММ-таргет пептидов основана на их дешевом синтезе и специфичности действия. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для проведения доклинических испытаний.

Материалы и методы, представленные в диссертационной работе, внедрены в научно-исследовательскую работу и образовательный процесс студен-

тов, аспирантов Отдела кинетики химических и биологических процессов Института проблем химической физики РАН.

Положения, выносимые на защиту

1. Синтезированные пептиды являются препаратами направленного действия, специфично связываются с RНАММ рецептором и модулируют его активность.

2. RНАММ-таргет пептиды обладают: цитостатическим эффектом, понижают жизнеспособность, индуцируют апоптоз, некроз опухолевых клеток, повышают активность каспаз-3/7; антиметастатической активностью, ингибируют инвазивность опухолевых клеток молочной и предстательной желез; противоопухолевой активностью *in vivo* (ксенографты, мышинная опухолевая модель).

3. RНАММ-таргет пептиды обладают диагностическим потенциалом для визуализации раковых клеток.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в получении исходных данных, лично участвовал в дизайне и проведении экспериментов на всех этапах исследования. Все результаты, представленные соискателем в диссертации, получены им лично или под его непосредственным руководством, а также в сотрудничестве с коллегами из Лондонского научного центра (г. Лондон, Онтарио, Канада), профессорами Е. Тюрли, Л. Лют и научным сотрудником К. Эсгуэрра (синтез пептидов); и профессором А. Эверс из Вашингтонского университета в г. Сент-Луис (г. Сент-Луис, Миссури, США). Автором предложена научная концепция и план исследования по идентификации RНАММ-таргет пептидов и изучению их диагностического и терапевтического потенциала для лечения онкологических заболеваний. Автор использовал уникальные методики для проведения ключевых экспериментов: биоинформационные подходы, компьютерные программы, масс-спектрометрический метод для идентификации пептидов; разработал метод для получения и очистки рекомбинантного RНАММ-СТ белка, методики анализа конкурентного связывания пептидов с RНАММ-СТ, анализ специфичности связывания пептидов с поверхностью опухолевых клеток; адаптировал методики по влиянию пептидов на жизнеспособность, пролиферацию, апоптоз, некроз, инвазивность опухолевых клеток. Автор лично проводил статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал полученные результаты. Автор лично готовил публикации по выполненной работе, либо принимал участие в их написании. Автореферат и диссертационная работа написаны лично автором. Автор лично участвовал в апробации результатов исследования на симпозиумах, выступал со стендовыми и устными докладами на международных и российских конференциях.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены и доложены на всероссийских и международных конференциях: Annual Research Day, July 15th, 2010, London, Canada; Cancer Care Ontario Research Day, April 8th, 2010, Toronto, Canada; Workshop “Imaging Applications in Prostate cancer”, November 19th, 2010, London, Canada; 50th Annual Meeting ASCB, December 11–15th, 2010, Philadelphia, PA, USA; 2010 ASCB Annual Meeting, Pittsburg, PA, USA; Research & Education Day–2011 University of Western Ontario, June 17th,

2011, London, ON, Canada; 94th Canadian Chemistry Conference, Montreal, QC, June 2011; London Health Research Day, March 20th, 2012, London, Canada; Oncology day, London, May 2012, Canada; Oncology Research and Education Day, June 2012, London, Canada; Oncology Research and Education Day, 2013, London, ON, Canada; Международный междисциплинарный Форум «Moscow Science Week», 8–12 сентября 2014 г., Москва, Россия; XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», 30 марта – 1 апреля 2015 г., Москва, Россия; XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А. Ю. Барышникова, 17–18 марта 2016 г., Москва, Россия; IV Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, 17–19 декабря 2018 г., Москва, Россия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, из них 15 статей в высокорейтинговых международных и отечественных изданиях, цитируемых в Web of Science, Core Collection, Scopus и рекомендованных ВАК РФ, 1 международный патент и 13 публикаций в докладах российских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 639 источников. Работа изложена на 209 страницах компьютерного текста, содержит 10 таблиц и 74 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящён описанию роли пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний. Особое внимание уделено описанию системы ГК/RHAMM, структуре, свойствам и роли RHAMM и ГК в онкогенезе, адресной модуляции RHAMM для лечения раковых заболеваний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали линии клеток: клетки карциномы молочной железы человека (MDA-MB-231), карциномы предстательной железы человека (PC3m-LN4), клетки рака яичников (SKVO3), клетки меланомы кожи (WM1552c), мышинные эмбриональные фибробласты (MEF, LR21). Все клеточные линии были получены из American Type Culture Collection (Manassas, США). Клеточные линии фибробластов RHAMM^(-/-) и RHAMM^(+/+) были получены согласно протоколу (Акентьева и др., 2019; Zhang et al., 1998; Hall et al., 1995).

Пептиды синтезировали с помощью автоматического пептидного синтезатора Apex 396 (AMPS, Австралия) методом стандартного твердофазного пептидного синтеза (Акентьева и др., 2016; Albericio, 2000). Степень чистоты пептидов оценивали на масс-спектрометре Micro API Mass Spectrometer (Waters Corporation, США) и ВЭЖХ.

Очистку рекомбинантного RHAMM-СТ проводили методом аффинной хроматографии (Ruan et al., 2004). Степень чистоты полученного рекомбинант-

ного RНАММ-СТ белка определяли методом 10 % SDS-ПААГ электрофореза согласно протоколу (Laemmli, 1970). Идентификацию RНАММ-СТ проводили с помощью анти-RНАММ антител методом Вестерн-блот анализа согласно протоколу (Towbin et al., 1979).

Определение связывания пептидов с RНАММ-СТ проводили методом поверхностного плазмонного резонанса согласно методике (Lofas et al., 1990). Для определения кинетических констант связывания пептидов была использована GWC SPR imager®II система. Константы диссоциации пептидов (K_D) были получены с помощью нелинейной регрессии, соответствующей модели Ленгмюра. Для анализа связывания FITC-пептидов с рекомбинантными RНАММ-СТ и CD44, а также для анализа конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RНАММ-СТ использовали метод ELISA (Esguerra et al., 2015). Флуоресцентное мечение ГК с Alexa Fluor 647, Texas Red и Cy5.5 проводили, как описано (Veiseh et al., 2012, Drummen et al., 2012). Стабильность пептидов в сыворотке крови оценивали в соответствии с протоколом (Esguerra et al., 2015). Аланиновое сканирование пептидов проводили согласно протоколу (Akentieva et al., 2021). Анализ связывания FITC-пептидов с опухолевыми клетками и с RНАММ^(-/-) фибробластами и RНАММ^(+/+) фибробластами проводили, как описано (Esguerra et al., 2015; Rizzardì et al., 2014). Связывание ГК-Cy5.5 и связывание FITC-VEGEGEEGEEY пептида с поверхностью клеток рака яичников проводили согласно протоколу (Akentieva et al., 2017). Анализ связывания FITC-пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE) с клетками РПЖ проводили методом конфокальной микроскопии, как описано (Akentieva et al., 2018). Количественный анализ конфокальных изображений проводили с использованием Image J программы (НИН, США).

Для анализа действия пептидов на жизнеспособность клеток использовали метод AlamarBlue®Cell Viability Assay согласно протоколу (Schreer, 2005). Количественную оценку влияния пептидов на апоптоз/некроз клеток проводили с помощью ELISA^{PLUS} Kit (Roche Diagnostic, США) согласно протоколу производителя (Wyllie et al., 1980). Для количественного измерения активности каспаз-3/7 использовали Caspase-3/7 Colorimetric Assay Kit (GenScript, США), все процедуры проводили согласно протоколу (Thornberry et al., 1997).

Анализ влияния пептидов на инвазивность клеток проводили с помощью метода деградации флуоресцентного желатина, используя QCMTM Gelatin Invadopodia assay (red) Kit (Millipore, США). Все процедуры проводили в соответствии с протоколом производителя (Merbel et al., 2018).

Анализ влияния пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная модель опухолевого роста) проводили согласно протоколу (Animal Use Protocol 2009:060, UWO, Канада) (Akentieva, 2020). В эксперименте использовались иммунодефицитные мыши (NOD CRISPR *Prkdc Il2r* Gamma (NCG) Triple-Immunodeficient Mouse Model) с отсутствием трансплантационного иммунитета.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel, GraphPad Prism, One-Way ANOVA. Все клеточные эксперименты *in vitro* и эксперименты *in vivo* дублировались три раза, и данные представлены как средние от трех повторных экспериментов. Определение

статистически значимых различий для сравнения двух групп проводили, используя Turkey-тест. Звездочка указывает на статистически значимые различия между положительным контролем и всеми остальными типами обработки. Различия считались достоверными при (* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,005$; *** – $p \leq 0,0005$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация, дизайн и синтез пептидов, специфично связывающихся с RНАММ

Предыдущие исследования показали, что ГК-связывающая область RНАММ/HММR находится на С-конце и состоит из двух спиралей, которые содержат ключевые гидрофобные и основные аминокислоты, необходимые для связывания с ГК (Yang et al., 1993; Maxwell et al., 2003; Tolg et al., 2010; Atemiуа et al., 2005). Эти результаты предсказали, что взаимодействие олигосахарида ГК с RНАММ носит в основном ионный характер, с незначительным вкладом от гидрофобных остатков. Ранее было показано, что RНАММ содержит центр связывания с α - и β - субъединицами тубулина и он перекрывается с ГК-связывающей областью RНАММ (Yang et al., 1994; Nogales, 2001). Димеры α - и β -тубулина содержат высоко-консервативную спиральную область и последовательность карбоксильного концевой хвоста (СТТ) с кислыми остатками, мало чем отличающимися по плотности отрицательного заряда от ГК (Nogales, 2001; Chau et al., 1998; Downing et al., 1999). На основании вышесказанного мы предположили, что пептиды с отрицательно заряженными аминокислотами, такими как глутаминовая (Glu) и аспарагиновая (Asp), будут имитировать структуру ГК и синтетические пептиды, полученные из карбоксильных концов α - или β -тубулина, могут быть использованы для специфичного, адресного связывания с RНАММ. Аминокислотная последовательность (aa 718-750), соответствующая ГК-связывающей области RНАММ, впервые использовалась в поисковой программе BLAST для составления списка белков, показывающих гомологию с последовательностью в этой области. Было показано, что области MAPs и кинезинов связываются непосредственно с отрицательно заряженными СТТ концами тубулина, а аминокислотные последовательности СТТ-тубулина могут также связываться с основными аминокислотами RНАММ (Skiniotis et al., 2004; Day et al., 2002). На основании этого анализа была синтезирована библиотека пептидов на основе аминокислотных последовательностей, полученных из карбоксильных концов α - или β -тубулина и были идентифицированы пептиды-лиганды с высоким сродством связывания к RНАММ. Специфичность взаимодействия пептидов-лигандов с RНАММ затем дополнительно определяли с использованием различных методов *in vitro*.

Синтез пептидов

Пептиды, соответствующие СТТ областям аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина, которые состоят из кислых остатков, были синтезированы методом стандартного твердофазного пептидного синтеза в соответствии с протоколом (Albericio, 2000). Большинство последовательностей пептидов были получены из СТТ-последовательности тубулина, но некоторые содержали последовательности α 1a-N12 и β 3a-N12 (Таблица 1).

Таблица 1 – Анализ синтезированных пептидов с использованием ESI-MS и ВЭЖХ

Аминокислотные последовательности	Фрагменты тубулина	Тип	Номер соединения	Теоретический M/Z	Наблюдаемый M/Z	Степень чистоты
DSADGEDEGEY	α Ia (438-449)	CTT	1a	657,7 [M+2H] ²⁺	658,2 [M+2H] ²⁺	98%
VEGEGEEEGEY	α Ia (440-451)	CTT	2a	677,7 [M+2H] ²⁺	677,6 [M+2H] ²⁺	98%
			2b	807,3 [M+2H] ²⁺	807,6 [M+2H] ²⁺	98%
			2c	928,8 [M+2H] ²⁺	927,9 [M+2H] ²⁺	98%
SVEAEAEEGEY	α IIIc (439-450)	CTT	3a	670,8 [M+2H] ²⁺	670,7 [M+2H] ²⁺	97%
			3b	800,3 [M+2H] ²⁺	800,5 [M+2H] ²⁺	98%
			3c	921,8 [M+2H] ²⁺	922,1 [M+2H] ²⁺	98%
IDSYEDEDEGEE	α IVa (437-448)	CTT	4a	714,7 [M+2H] ²⁺	715,2 [M+2H] ²⁺	99%
DSFEEENEGEEF	α VIII (438-449)	CTT	5a	730,3 [M+2H] ²⁺	730,8 [M+2H] ²⁺	97%
LEKDYEEVGVDS	α Ia (428-439)	H12	6a	691,3 [M+2H] ²⁺	691,8 [M+2H] ²⁺	99%
GEFSEARDMAA	α Ia (416-427)	H12	7a	656,3 [M+2H] ²⁺	656,5 [M+2H] ²⁺	98%
FVHWYVGGEMEE	α Ia (404-415)	H12	8a	741,3 [M+2H] ²⁺	741,9 [M+2H] ²⁺	99%
GEFEEEGEDEA	β IIa (434-445)	CTT	9a	684,7 [M+2H] ²⁺	685,2 [M+2H] ²⁺	98%
EEDFGEEAEAEA	β Ia (433-444)	CTT	10a	691,8 [M+2H] ²⁺	691,9 [M+2H] ²⁺	99%
			10b	821,3 [M+2H] ²⁺	821,7 [M+2H] ²⁺	99%
			10c	942,8 [M+2H] ²⁺	943,1 [M+2H] ²⁺	98%
GEFEEAEAEVA	β IV (433-444)	CTT	11a	683,7 [M+2H] ²⁺	684,3 [M+2H] ²⁺	97%
			11b	813,3 [M+2H] ²⁺	813,6 M+2H] ²⁺	97%
			11c	934,8 [M+2H] ²⁺	935,1 M+2H] ²⁺	96%
EAFEDEEEEIDG	β VI (435-446)	CTT	12a	706,8 [M+2H] ²⁺	706,3 [M+2H] ²⁺	99%
			12b	835,3 [M+2H] ²⁺	835,6 M+2H] ²⁺	99%
			12c	956,8 [M+2H] ²⁺	957,1 M+2H] ²⁺	98%
SNMNDLVSEYQQ	β IIIa (413-424)	H12	13a	714,4 [M+2H] ²⁺	713,8 [M+2H] ²⁺	99%
RYQLHPYR	β IIIa(425-432)	H12	13b	725,8 [M+2H] ²⁺	726,9 [M+2H] ²⁺	99%
FTEAESNMNDLV	β IIIa (408-419)	H12	14a	684,8 [M+2H] ²⁺	685,2 [M+2H] ²⁺	99%
			14b	814,4 [M+2H] ²⁺	813,8 [M+2H] ²⁺	98%
			14c	935,8 [M+2H] ²⁺	936,1 [M+2H] ²⁺	97%
RPDYISWGTQEQ	γ I (440-451)	CTT	15a	740,4 [M+2H] ²⁺	740,4 [M+2H] ²⁺	98%
VQQLIDEYHAAT	γ I (428-439)	H12	16a	693,8 [M+2H] ²⁺	693,2 [M+2H] ²⁺	95%
DNPDEMDSREI	γ I (416-427)	H12	17a	711,3 [M+2H] ²⁺	711,4 [M+2H] ²⁺	99%
GEGEEGEE	α Ia (443-450)	CTT	18	670,7 [M+2H] ²⁺	670,6 [M+2H] ²⁺	98%
DFGEEAEE	β Ia (435-442)	CTT	19	690,8 [M+2H] ²⁺	690,9 [M+2H] ²⁺	99%

Флуоресцентно меченые пептиды были получены мечением модифицированного N-конца с помощью флуоресцеина. На основании анализа аминокислотной последовательности изоформ тубулина двадцать пептидов были получены и далее охарактеризованы. Синтезированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрического метода (ESI-MS) и ВЭЖХ (Таблица 1).

Получение и очистка рекомбинантного белка RHAMM-CT

Для идентификации пептидов, обладающих высоким сродством к ГК-связывающему домену RHAMM, мы использовали различные физико-химические методы анализа, такие как SPR, ELISA анализ связывания пептидов с рекомбинантным RHAMM белком *in vitro*. С этой целью получали рекомбинантный RHAMM-CT белок, содержащий ГК-связывающий домен, который находится около карбоксильного конца (CT) и состоит из основных аминокислот, таких как лизин (Lys), аргинин (Arg) или лейцин (Leu). Для анализа специфичности связывания пептидов мы выделяли рекомбинантный белок RHAMM-CT (аа. 706-767, М.м. 7, 2 кДа, pI = 10,1) из *E.coli*, несущей плазмиду pPAL7-RHAMM-CT (Рисунок 1). В качестве источника гена RHAMM-CT была использована библиотека генов *Mus musculus* (house mice).

Фрагмент гена RHAMM, соответствующий последовательности, кодирующей RHAMM-CT (⁷⁰⁶RDSYAQLLGH QNLKQKIKHVVKLKDENSEQLKSEV SKLRSQLVKRRKQNELR LQGELDKLQI⁷⁶⁷) и несущий ГК-связывающий домен, был выделен методом амплификации. Затем RHAMM-CT клонировали в вектор pPAL7 и экспрессировали в штамм *E. coli* BL21(DE3) (Рисунок 1).

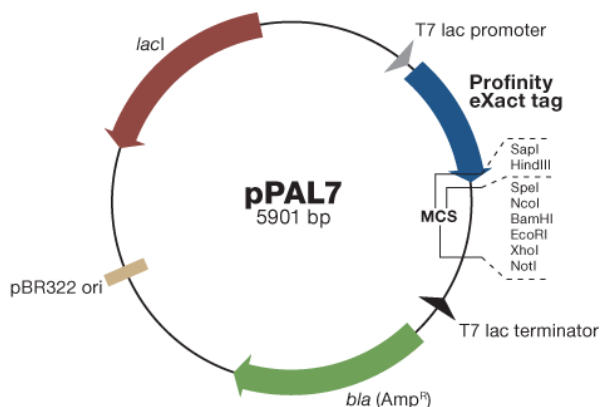


Рисунок 1 – Экспрессионный вектор pPAL7, который использовался для биосинтеза рекомбинантного RHAMM-CT (аа. 706–767, М. масса 7, 2 кДа, pI = 10,1) в штамме-продуценте *E. coli* BL21(DE3). Адаптировано из (Ruan B. et al., 2004).

Из бактериальных клеток *E. coli* получали лизаты и далее очистку рекомбинантного белка RHAMM-CT осуществляли методом аффинной хроматографии с помощью системы очистки Fusion-Tag Profinity eXact™ (BioRad, США). Степень чистоты выделенного белка проверяли методом 10% SDS-ПААГ. Был выделен гомогенный белок RHAMM-CT (чистота более 90 %) с Мол. массой ~

7,2 кДа, соответствующей массе RНАММ-СТ. Вестерн-блот анализ подтвердил наличие RНАММ-СТ.

Анализ связывания пептидов-лигандов с RНАММ-СТ с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Для анализа связывания пептидов с RНАММ, пептиды (10 мкМ) впрыскивали на сенсорные пластины, покрытые с RНАММ-СТ, и идентифицировали пептиды-лиганды, взаимодействующие с RНАММ. Эти пептиды представлены на Рисунке 2.

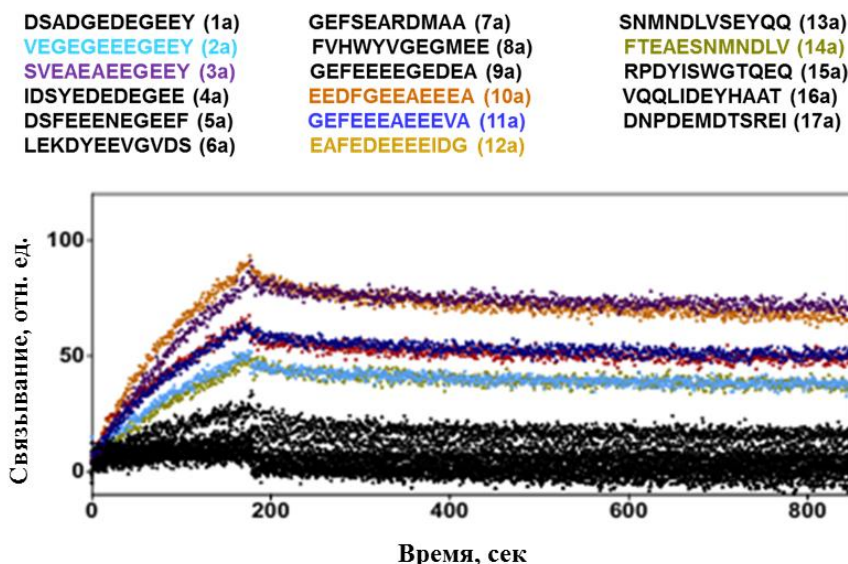


Рисунок 2 – Анализ пептидов-лигандов, связывающихся с RНАММ-СТ. Сенсограммы получены при взаимодействии пептидов (концентрация 10 мкМ) с RНАММ-СТ. В результате были выявлены пептиды (цветные линии, VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEAAA, EAFEDAAAAIDG, FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали высокое сродство к RНАММ-СТ (черные линии представляют собой пептиды с низким сродством).

На следующем этапе нашего исследования, мы использовали также метод поверхностного плазмонного резонанса. Однако в этом эксперименте пептиды модифицировали цистеином и ковалентно иммобилизовали на сенсорной пластине с помощью кросс-сшивающих реагентов EDAC (100 мМ) и сульфо-NHS (25 мМ). Затем различные концентрации RНАММ-СТ (500, 750 и 1000 нМоль) добавляли к пептидам на поверхности сенсорной платины и снимали спектры связывания белка с пептидами (Рисунок 3). Результаты показали, что связывание RНАММ-СТ с пептидами является дозо-зависимым и увеличивается с повышением концентрации белка. Сенсограммы связывания RНАММ-СТ с пептидами соответствовали кинетической модели связывания Ленгмюра 1: 1. Были рассчитаны средние величины констант диссоциации (K_D) для пептидов при различных концентрациях RНАММ-СТ (Таблица 2). Как видно из Таблицы 2, пептиды (VEGEGEEEGEEY, $K_D=24$ нМ), (EEDFGEEAEAAA, $K_D=32$ нМ), и (FTEAESNMNDLV, $K_D=30$ нМ) показали наиболее низкие константы диссо-

циации (в наномолярном диапазоне), что свидетельствует о высоком сродстве связывания этих пептидов с RHAMM-СТ.

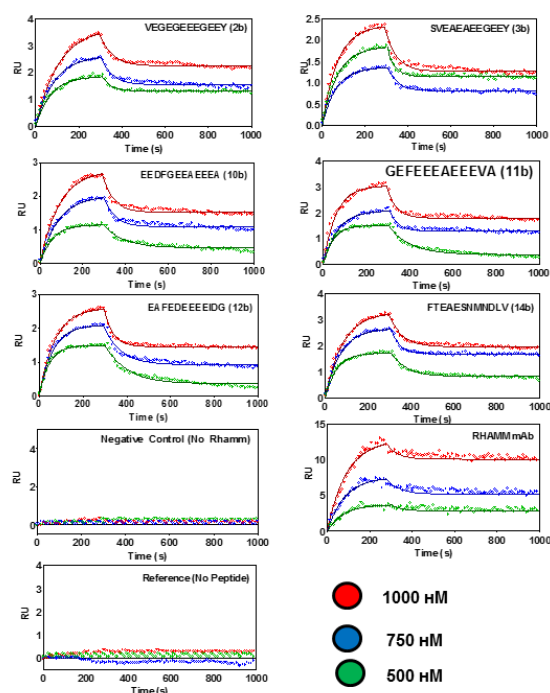


Рисунок 3 – Кинетический профиль пептидов-лигандов, взаимодействующих с RHAMM-СТ. Каждая сенсограмма соответствует ответам трех концентраций RHAMM (●1000 нМ, ●750 нМ и ●500 нМ), взаимодействующих с каждым из иммобилизованных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEEEVA, EAFEDDEEEIDG, FTEAESNMNDLV).

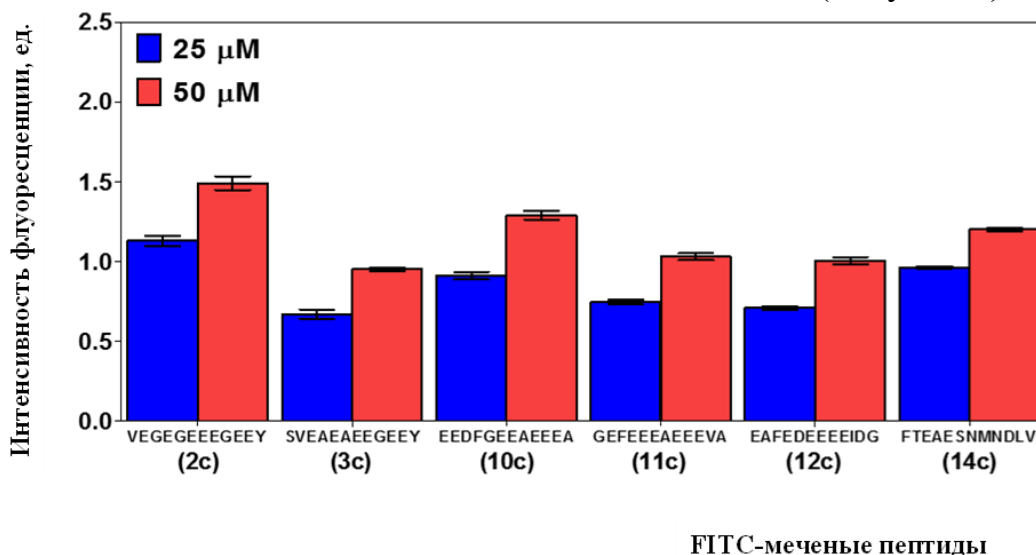
Таблица 2 – Определение величин K_{ON} , K_{OFF} и K_D для пептидов-лигандов

Аминокислотная последовательность	Концентрация нМоль	K_{ON} (нМ сек ⁻¹)	K_{OFF} (сек ⁻¹) (10^{-3})	K_D нМ	Сред. K_D нМ
SVEAEAEEGEEY (3b)	1000	1404	0,502	358,2	331,1±24,5
	750	1594	0,517	324,6	
	500	1620	0,503	310,4	
GEFEEEAEEEEVA (11b)	1000	855	0,102	119,8	130±12,9
	750	1189	0,172	144,7	
	500	1485	0,187	126,0	
VEGEGEEEGEEY (2b)	1000	5046	0,124	24,5	24,2±0,4
	750	9371	0,224	23,8	
	500	9436	0,234	24,4	
EEEAEEEDFGEEA (10b)	1000	5347	0,173	32,4	32,6±1,1
	750	5808	0,196	33,8	
	500	7014	0,222	31,7	
EAFEDDEEEIDG (12b)	1000	1090	0,219	201,4	211,3±8,6
	750	1101	0,237	215,4	
	500	1594	0,346	217,0	
FTEAESNMNDLV (14b)	1000	3202	0,10	31,9	30,2±1,5

	750	4033	0,11	29,0	
	500	4189	0,12	29,6	
RHAMM-антитела	1000	37484	0,22	5,96	5,53±0,4
	750	42913	0,23	5,45	
	500	45172	0,23	5,18	

Анализ связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT

Далее связывание пептидов-лигандов с RHAMM-CT было проанализировано с помощью FITC-меченых пептидов методом ELISA (Рисунок 4).



FITC-меченые пептиды

Рисунок 4 – Анализ связывания FITC-меченых пептидов с RHAMM-CT.

Исследование связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT проводили при концентрации пептидов 25 μM и 50 μM.

Таким образом, результаты показали, что пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA и FTEAESNMNDLV) наиболее эффективно связывались с RHAMM-CT при концентрации 50 μM.

Сравнительный анализ аминокислотной последовательности пептидов

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей шести пептидов, которые связывались с RHAMM-CT, проводили, используя программы Cobalt Multiple Alignment Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) и ClustalX2 (США). Показано, что четыре пептида (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, SVEAEAEEGEEY и GEFEEAEAAA) содержали в своем составе похожий фрагмент **EEHEEZ** (Рисунок 5).

А
 718 L **K** **Q** **K** **I** **K** **H** **V** **V** **K** **L** **K** **D** **E** **N** **S** **Q** **L** **K** **S** **E** **V** **S** **K** **L** **R** **S** **Q** **L** **V** **K** **R** **K** 750

Б

Пептид 2	V	<u>E</u>	G	<u>E</u>	G	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	G	<u>E</u>	<u>E</u>	Y		
Пептид 3	S	V	<u>E</u>	A	<u>E</u>	A	<u>E</u>	<u>E</u>	G	<u>E</u>	<u>E</u>	Y		
Пептид 10		<u>E</u>	<u>E</u>	D	F	G	<u>E</u>	<u>E</u>	A	<u>E</u>	<u>E</u>	E	A	
Пептид 11			G	<u>E</u>	F	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	A	<u>E</u>	<u>E</u>	E	V	A

Рисунок 5 – Аминокислотная последовательность RНАММ-СТ. (А) - аминокислотные остатки, необходимые для связывания с ГК, выделены красным цветом (К – лизин, R – аргинин, H – гистидин). (Б)-аминокислотные последовательности пептидов-лигандов, содержащие похожий фрагмент EEXEEZ. Идентичные последовательности обозначены синим цветом (E – глутаминовая кислота) и подчеркнуты, в то время как полуконсервативные последовательности выделены желтым цветом (G – глицин, A – аспарагиновая кислота, Y – тирозин, E – глутаминовая кислота).

Аминокислотные остатки глутаминовой кислоты (E) этого фрагмента способны связываться с основными остатками (лизин, аргинин, гистидин) RНАММ-СТ за счет ионных взаимодействий. Следует отметить, что некоторые пептиды, представляющие аминокислотные остатки β -субъединицы тубулина (такие как FTEAESNMNDLV и RYQLHPYR), не содержат в своем составе фрагмент EEXEEZ. Однако эти пептиды также продемонстрировали высокое сродство связывания с RНАММ. Это указывает на то, что в связывании пептидов участвуют и другие типы взаимодействий (гидрофобные, водородные, Ван-дер-Ваальсовы).

Чтобы определить аминокислотные остатки, которые имеют решающее значение для взаимодействия пептидов с RНАММ-СТ, мы проводили аланиновое сканирование пептидов EEDFGEEAEEEE, FTEAESNMNDLV и VEGEGEEEGEEY. Затем исследовали связывание пептидов, модифицированных аланином, с RНАММ-СТ. Результаты аланинового сканирования пептида VEGEGEEEGEEY с RНАММ-СТ показаны на Рисунке 6.

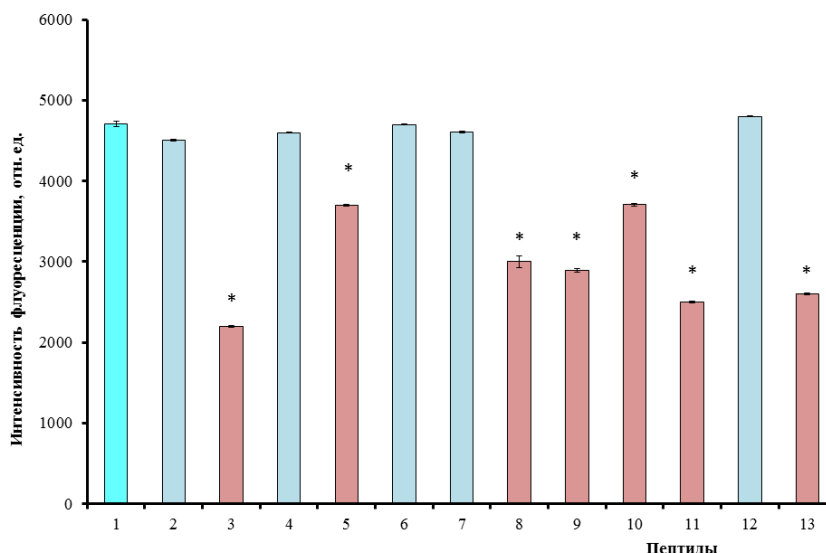


Рисунок 6 – Аланиновое сканирование пептида VEGEGEEEGEEY, связывание с RНАММ-СТ: 1 – VEGEGEEEGEEY (контроль, немодифицированный пептид), 2 – AEGEGEEEGEEY, 3 – VAGEGEEEGEEY, 4 – VEAEGEEEGEEY, 5 – VEGAGEEEGEEY, 6 – VEGEAEEEGEEY, 7 – VEGEGAEEGEEY, 8 – VEGEGEAEGEEY, 9 – VEGEGEEAGEEY, 10 – VEGEGEEEAEEY, 11 – VEGEGEEEGAEY, 12 – VEGEGEEEGEAY, 13 – VEGEGEEEGEEA. Звездочки представляют собой последовательности, в которых Ala заменил ключевую аминокислоту.

Результаты показали, что аминокислоты E (глутаминовая кислота), G (глицин), Y (тирозин) в составе пептида VEGEGEEEGEEY необходимы для связывания с RНАММ-СТ, поскольку их замена на аминокислоту Ala (аланин) приводила к значительному снижению сродства пептидов к белку. Следует отметить, что эти аминокислоты являются частью фрагмента EEXEEZ, что подтверждает его важность для связывания на ГК-центре RНАММ.

Анализ конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RНАММ

Пептиды оценивали на предмет их способности конкурировать с ГК за центр связывания на RНАММ-СТ с использованием метода ELISA (Рисунок 7).

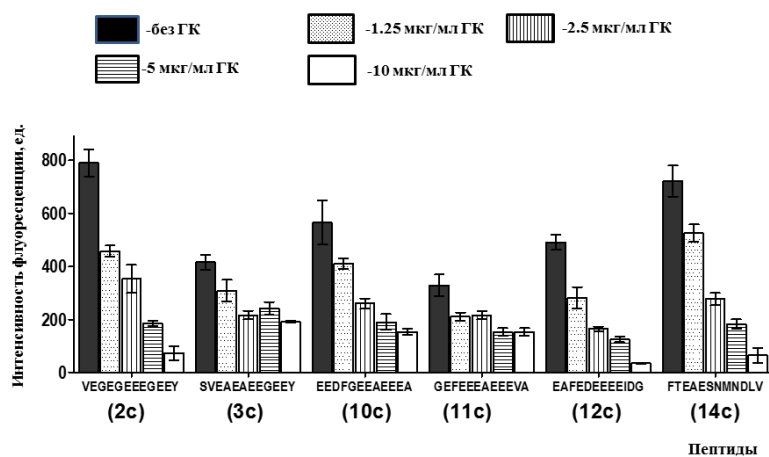


Рисунок 7 – Конкурентное замещение FITC-пептидов гиалуроновой кислотой на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл).

Результаты показали, что возрастающие концентрации ГК (1,25; 2,5; 5 и 10 мкг/мл) замещают FITC-пептиды на ГК-связывающем центре. Это свидетельствует о том, что ГК и пептиды конкурируют за связывание с RHAMM-СТ. Следует отметить, что наиболее эффективно конкурировали с ГК пептиды VEGEGEEEGEEY, EEEAEEDFGEEA и FTEAESNMNDLV. На следующем этапе использовали немеченые пептиды, а ГК метили флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (Рисунок 8). Было обнаружено, что пептиды конкурентно замещали ГК на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ. При этом наиболее эффективно конкурировали с ГК пептиды EEEAEEDFGEEA, GEFEEEAEEVA и FTEAESNMNDLV.

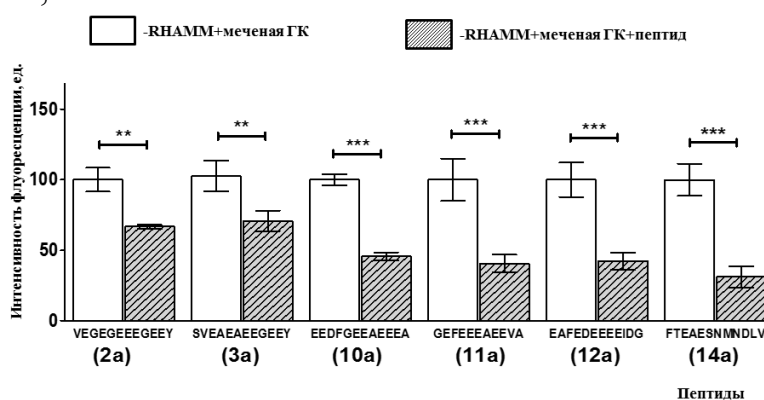


Рисунок 8 – Конкурентное замещение ГК-Alexa Fluor 647 пептидами. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл) и ГК (10 мкг / мл). ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ по отношению к RHAMM-СТ+меченая ГК.

Анализ связывания пептидов с CD44 и RHAMM-СТ

Для оценки способности пептидов также связываться с CD44, было исследовано связывание пептидов с RHAMM-СТ и CD44, используя метод ELISA (Рисунок 9).

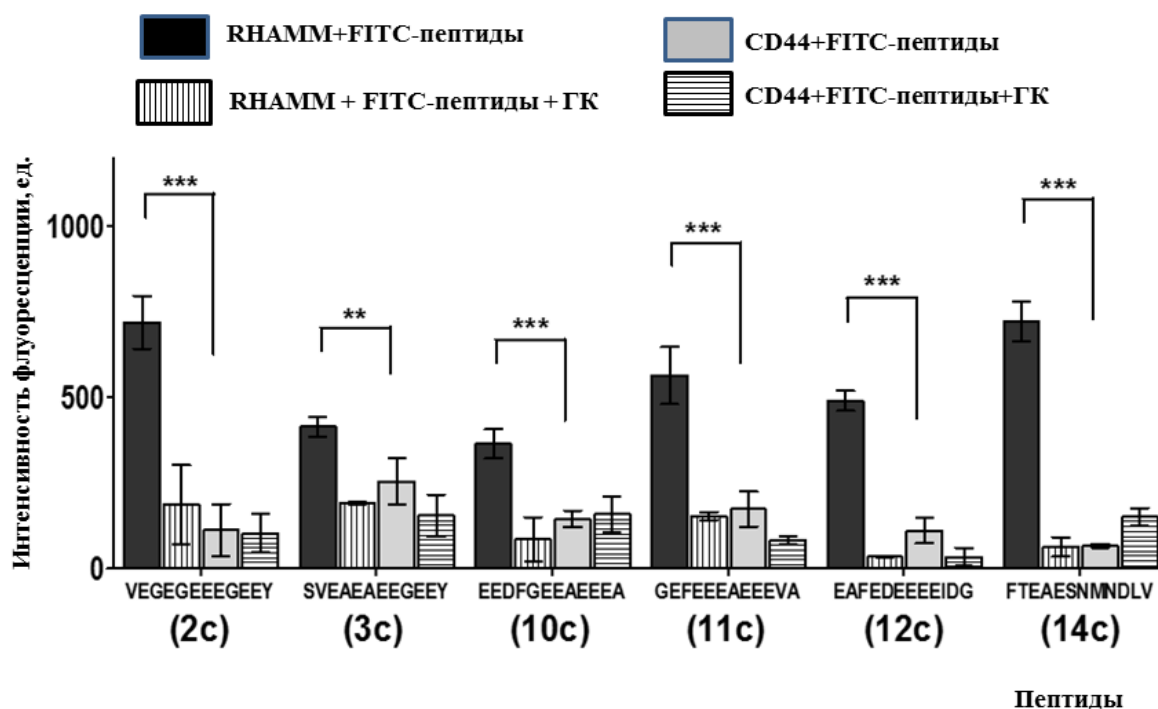


Рисунок 9 – Анализ связывания FITC-пептидов с CD44 или RHAMM-CT. Используемая концентрация пептидов (10 мкг/мл) и ГК (10 мкг/мл). ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ по отношению к RHAMM-CT+FITC-пептиды.

Показано, что FITC-пептиды связывались с RHAMM-CT и конкурировали за центр связывания с ГК. Как видно из Рисунка 9, FITC-пептиды также связывались с CD44, однако, интенсивность связывания была в 6–8 раза ниже, чем для RHAMM-CT. Таким образом, установлено, что связывание пептидов к RHAMM-CT характеризуется большим сродством, чем к CD44.

Анализ стабильности пептидов

Стабильность пептидов в кровотоке и достаточно быстрое выведение их из организма являются необходимым условием для применения пептидов с целью визуализации и терапии рака. Поэтому в следующей части работы исследовали стабильность и период полураспада синтезированных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEEAEEVA, EAFEDDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в сыворотке крови. Пептиды демонстрировали стабильность в сыворотке с приемлемым временем полураспада примерно 2–4 часа (Рисунок 10). Таким образом, выявлено, что пептиды являются достаточно стабильными и имеют приемлемое время полураспада, необходимое для визуализации раковых клеток и воздействия на их метаболизм.

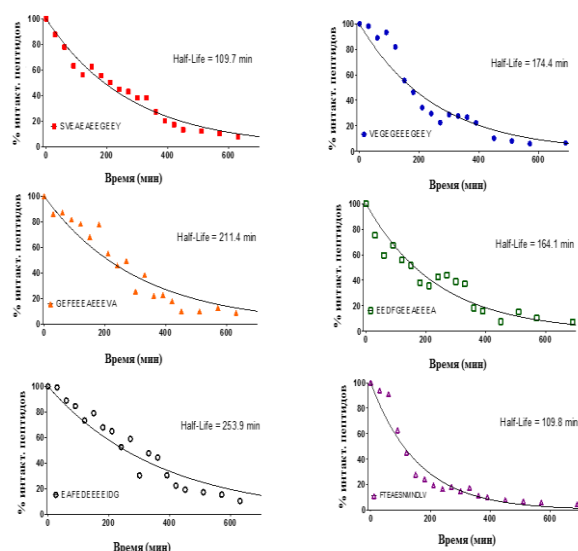


Рисунок 10 – Исследование стабильности пептидов в физиологических условиях в эмбриональной бычьей сыворотке.

Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака молочной железы

Для применения пептидов в качестве тераностиков необходимо показать специфичность взаимодействия пептидов именно с опухолевыми клетками. Поэтому на следующем этапе было изучено связывание пептидов с поверхностью опухолевых и нормальных клеток. Для экспериментов использовали клетки РМЖ (MDA-MB-231) и клетки РПЖ (PC3m-LN4), которые, как известно, сверхэкспрессируют RHAMM, CD44 и ГК (Heldin et al., 2013; Bourguignon et al., 2016; Montgomery et al., 2012). Ранее было показано, что эти клетки также связывают флуоресцентно-меченую ГК (Veiseh et al., 2012; Veiseh et al., 2011). Для этого исследования мы выбрали FITC-пептиды (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали ранее высокое сродство и специфичность связывания к RHAMM (Esguerra et al., 2015). Перед добавлением FITC-пептидов клетки предварительно инкубировали с анти-IgG, анти-CD44 или анти-RHAMM антителами. Клетки, которые не обрабатывали антителами, показали интенсивную флуоресценцию, что указывало на связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток (Рисунок 11, ряд 1-й, сверху). Предварительная инкубация клеток с анти-IgG антителами, которые взаимодействуют с рецептором FcR, не приводила к заметному изменению флуоресценции (Рисунок 11, 2-й ряд сверху). Следует отметить, что клетки, обработанные анти-CD44 антителами (Рисунок 11, ряд 3), показали интенсивную флуоресценцию. Это свидетельствует о том, что блокирование CD44 не влияет на связывание FITC-пептидов с клетками. Как видно на Рисунке 11 (ряд 4-й), значительное снижение флуоресценции наблюдалось только в том случае, когда клетки обрабатывали анти-RHAMM антителами, которые блокировали связывание FITC-пептидов с RHAMM. Таким образом, показано, что FITC-пептиды специфично связывались с RHAMM на поверхности клеток рака молочной железы. Количественный анализ связывания FITC-пептидов клетками MDA-MB-231 представлен на Рисунке 12.

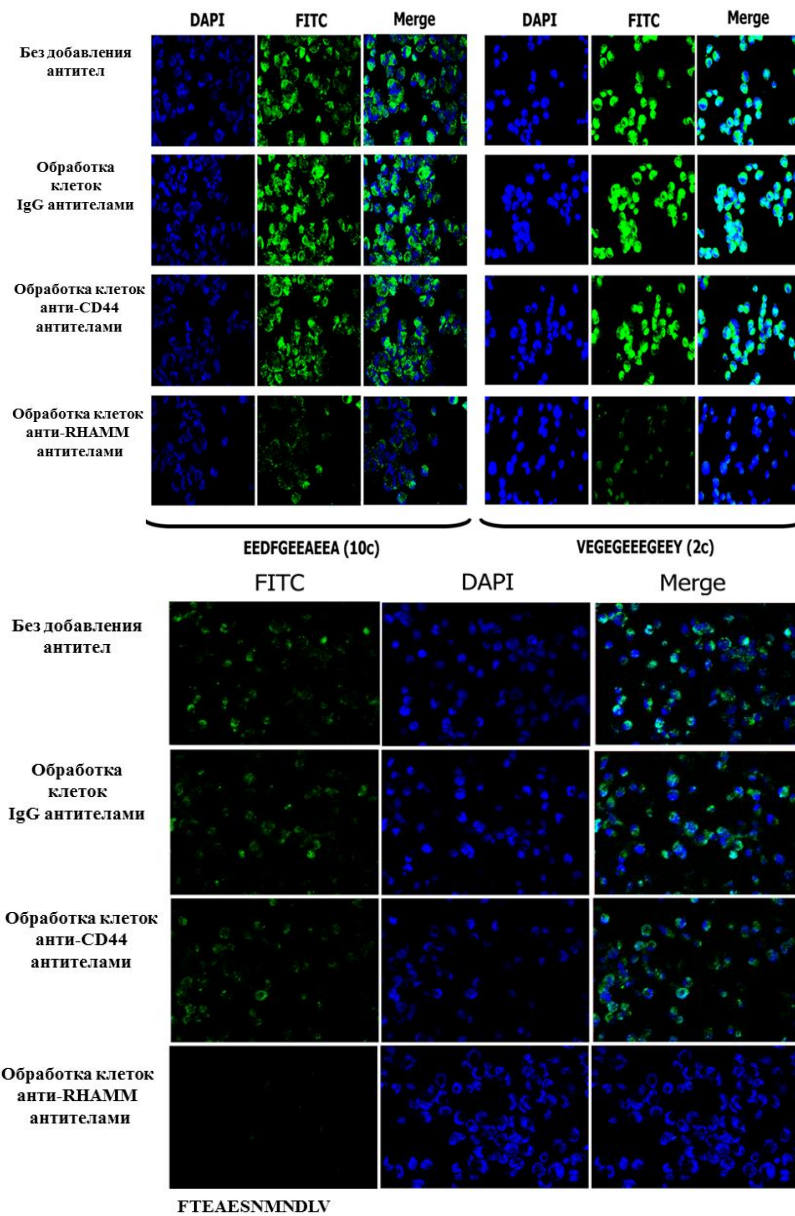


Рисунок 11 – Визуализация связывания FITC-пептидов (EEDFGEEAEEEA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) с клетками рака молочной железы. Ядра окрашены синим цветом (DAPI), а FITC-пептиды окрашены зеленым цветом (FITC).

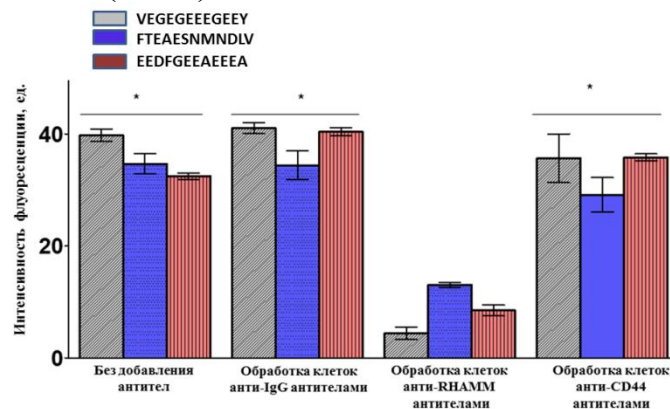


Рисунок 12 – Количественная оценка связывания FITC-пептидов с клетками MDA-MB-231. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, обработанным анти-

RHAMM антителами. На следующем этапе работы было изучено связывание FITC-пептидов с клетками РПЖ (PC3m-LN4) (Рисунок 13).

Заметное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось, когда RHAMM блокировали на поверхности клеток анти-RHAMM антителами, что свидетельствует о связывании пептида с рецептором. Клетки, предварительно обработанные с анти-IgG или анти-CD44 антителами, не показали значительного снижения сигнала флуоресценции. Количественный анализ связывания FITC-пептидов с клетками PC3m-LN4 представлен на Рисунке 14.

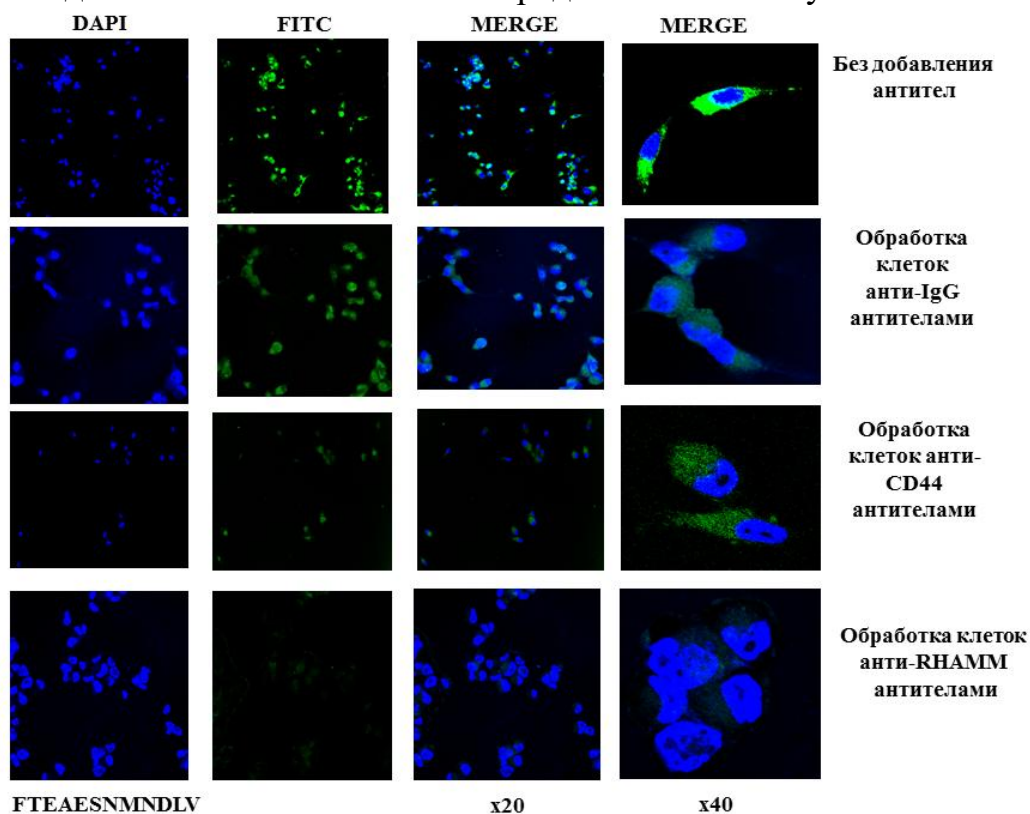


Рисунок 13 – Визуализация связывания FITC-пептида (FTEAESNMNDLV) с клетками рака предстательной железы с помощью конфокальной микроскопии. Для окрашивания ядер клеток был использован DAPI (синий цвет), а FITC-пептид окрашен зеленым цветом (FITC).

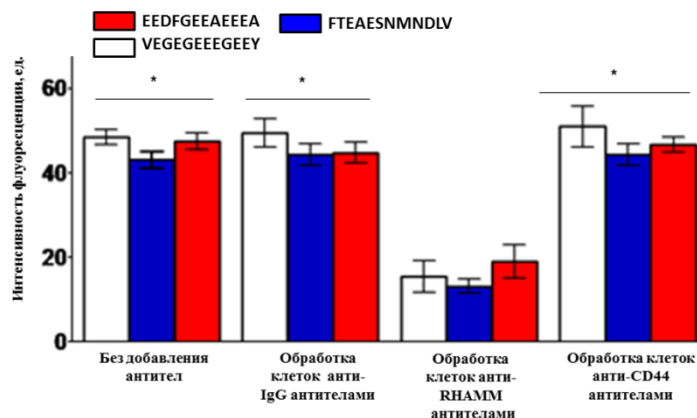


Рисунок 14 – Количественная оценка связывания FITC-пептидов с PC3m-LN4 клетками. Статистически значимые различия помечены * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, обработанным анти-RHAMM антителами.

Таким образом, установлено, что FITC-пептид селективно связывался с RНАММ рецептором на поверхности клеток РПЖ.

Исследование связывания RНАММ-таргет пептидов с фибробластами RНАММ^(-/-) и фибробластами, трансфицированными с RНАММ^(+/+)

Чтобы проверить, связываются ли пептиды именно с RНАММ, было изучено взаимодействие FITC-пептидов с нокаут фибробластами RНАММ^(-/-), в которых отсутствует этот рецептор, а также с фибробластами, трансфицированными с RНАММ^(+/+). Для этого RНАММ^(-/-) фибробласты инкубировали с FITC-пептидами и затем анализировали методом конфокальной микроскопии (Рисунок 15). Было обнаружено, что в фибробластах RНАММ^(-/-) не наблюдалось FITC-флуоресценции. Однако, добавление FITC-пептидов к фибробластам, трансфицированных с RНАММ^(+/+), продемонстрировало появление интенсивной флуоресценция (Рисунок 16). Следовательно, FITC-пептиды связываются именно с RНАММ.

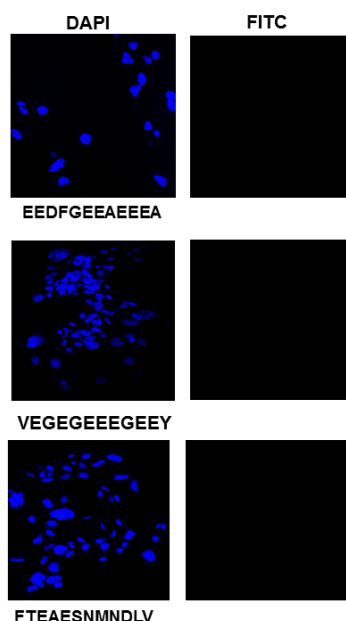


Рисунок 15 – Визуализация FITC-пептидов в RНАММ^(-/-) клетках.

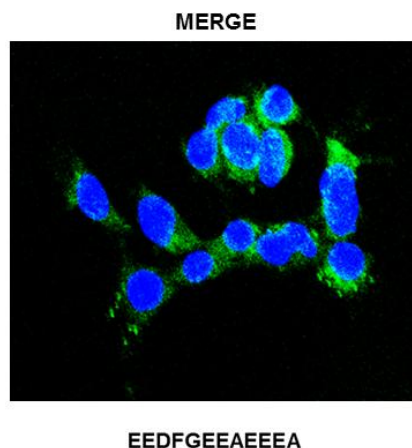


Рисунок 16 – Визуализация FITC-пептида EEDFGEEAEEEE в RНАММ^(+/+) клетках.

На основании полученных данных, мы ввели новый термин, назвали эти пептиды RНАММ-таргет пептидами и использовали это название в последующих экспериментах. Результаты свидетельствуют о том, что RНАММ-таргет пептиды могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток с целью ранней молекулярной диагностики онкологических заболеваний. На следующем этапе работы мы исследовали терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов, а именно, влияние пептидов на выживаемость, пролиферацию, апоптоз/некроз и инвазивность опухолевых клеток РМЖ и РПЖ.

Влияние RНАММ-таргет пептидов на выживаемость и пролиферацию клеток рака молочной железы

Был изучен эффект RНАММ-таргет пептидов на выживаемость клеток РМЖ. Результаты показали, что инкубация с пептидами в течение 48 час подавляла выживаемость клеток MDA-MB-231 на 50% (Рисунок 17). Установлено, что пептиды также подавляли пролиферацию клеток MDA-MB-231 в 2 раза.

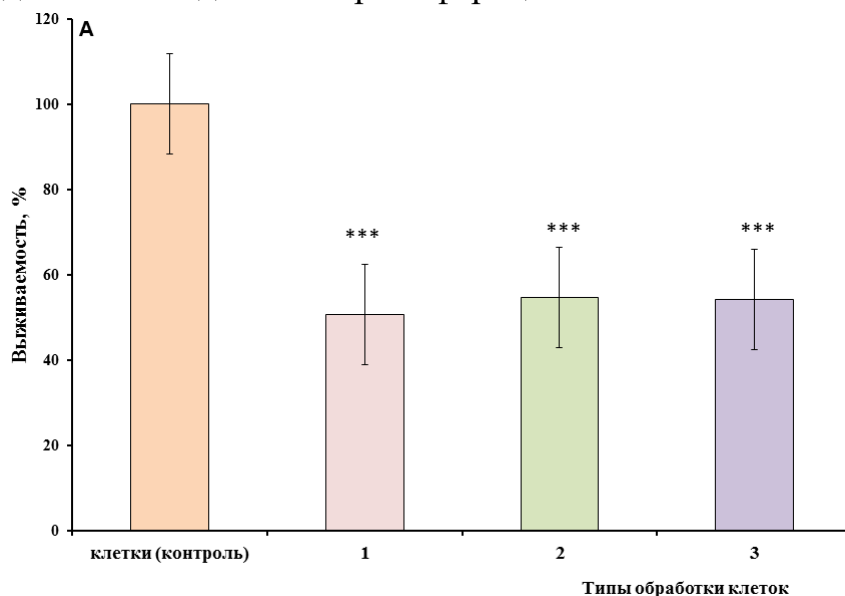


Рисунок 17 – Эффект RНАММ-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEEА (1), VEGEGEEEGEEY(2) и FTEAESNMNDLV(3) на выживаемость MDA-MB-231 клеток. * $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без добавления пептидов.

Показано, что низкие концентрации RНАММ-таргет пептидов (10 мкг/мл , $2 \times 10^{-7} \text{ М}$), значительно подавляли выживаемость и пролиферацию клеток рака молочной железы, что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной железы

На следующем этапе работы мы изучали тип гибели клеток MDA-MB-231 под действием пептидов. Было обнаружено, что RНАММ-таргет пептиды ($2 \times 10^{-7} \text{ М}$) индуцировали апоптоз в MDA-MB-231 клетках в 4-5 раз (Рисунок 18).

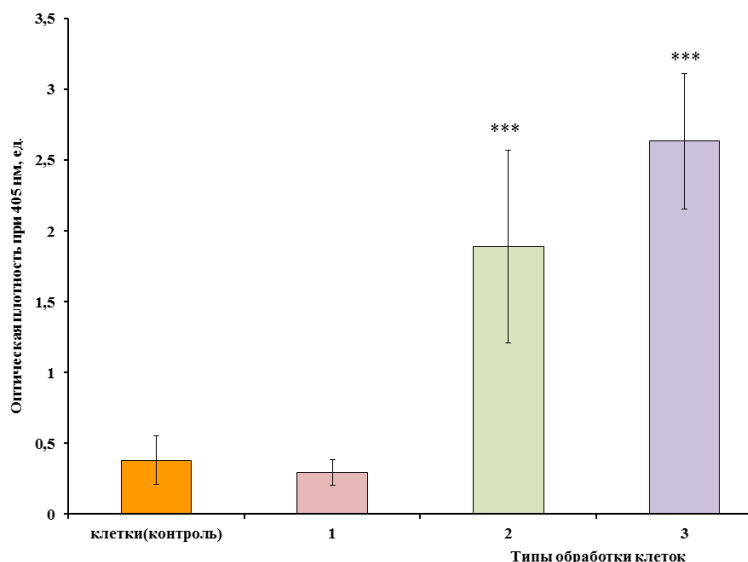


Рисунок 18 – Индукция апоптоза в MDA-MB-231 клетках посредством RНАММ-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEEA (1), VEGEGEEEGEEY (2), FTEAESNMNDLV (3). *** $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.

Далее было изучено влияние RНАММ-таргет пептидов на некроз MDA-MB-231 клеток. Установлено, что два пептида увеличивали некротическую гибель MDA-MB-231 клеток в 4 раза (Рисунок 19).

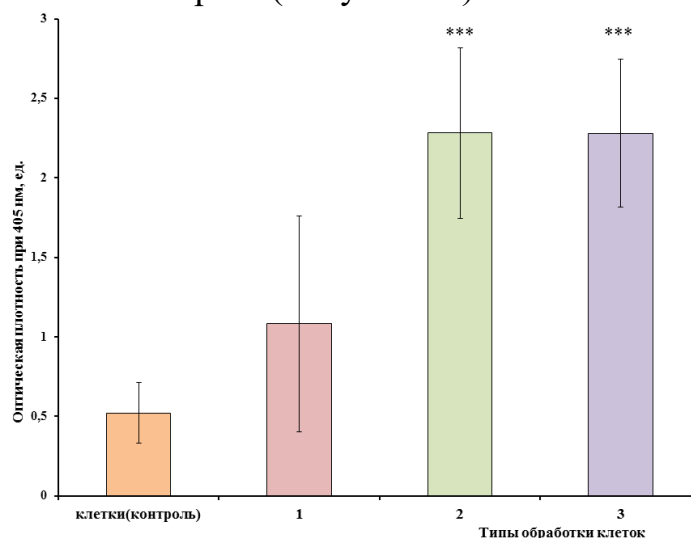


Рисунок 19 – Индукция некроза в MDA-MB-231 клетках посредством RНАММ-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEEA (1), VEGEGEEEGEEY (2), FTEAESNMNDLV (3). *** $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Было изучено влияние RНАММ-таргет пептидов на активность каспаз-3/7, отвечающих за митохондриальный путь апоптоза. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась на 30 % в MDA-MB-231 клетках по сравнению с контрольными клетками, необработанными пептидами (Рисунок 20).

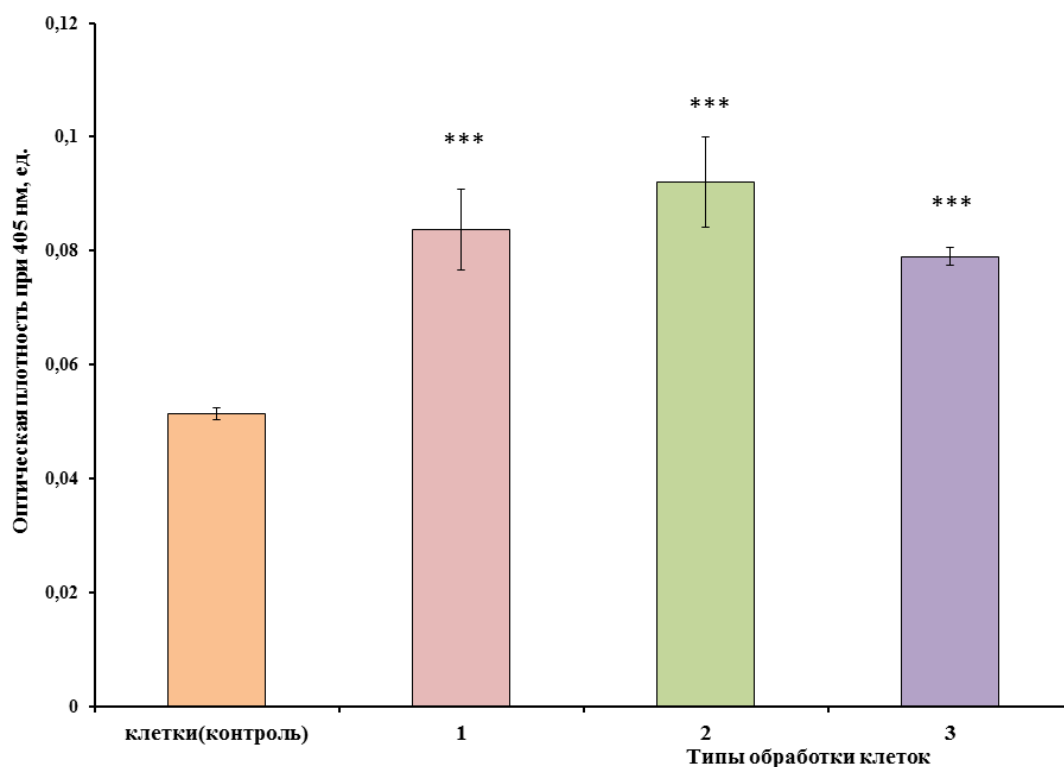


Рисунок 20 – Эффект RНАММ-таргет пептидов: EEDFGEEAEEEEA (1), VEGEGEEEGEEY (2), FTEAESNMNDLV (3) на активность каспаз-3/7 в MDA-MB-231 клетках. *** $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.

На следующем этапе было изучено влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз в нормальных клетках (MEF). Выявлено, что RНАММ-таргет пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Мы также исследовали влияние пептидов на нокаут фибробласты RНАММ^(-/-), в которых отсутствует RНАММ. Было установлено, что все три пептида практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз RНАММ^(-/-) клеток. Таким образом, показано, что эффект RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз является специфичным для опухолевых клеток и RНАММ опосредованным. Следовательно, можно предположить, что RНАММ-таргет пептиды могут быть использованы в качестве препаратов для адресной терапии рака.

Влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы

Процессы инвазивности опухолевых клеток и образование метастазов являются основными проблемами при лечении онкологических заболеваний. Поэтому на следующем этапе мы исследовали антиметастатический потенциал пептидов на клеточном уровне. Было установлено, что инвазивность клеток MDA-MB-231 возрастала во времени и достигала максимальной величины через 40 час (уровень деградации желатина составляет ~90 %) (Рисунок 21).

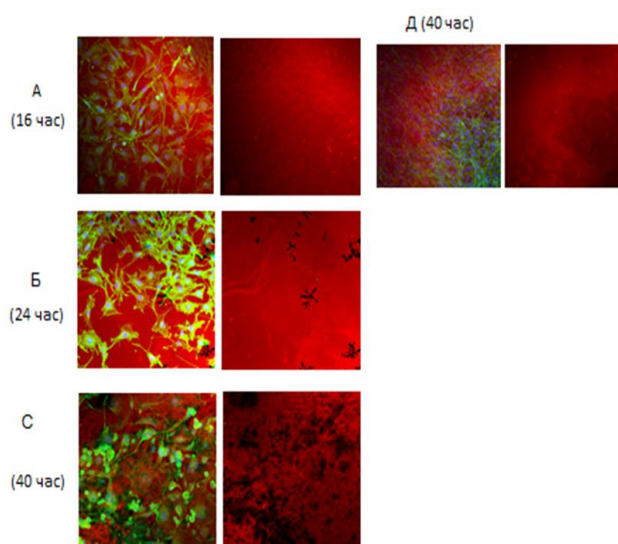


Рисунок 21 – Анализ инвазивности MDA-MB-231 клеток во времени: А – через 16 час, Б – через 24 час, С – через 40 час, Д – инвазивность MEF фибробластов (контроль) через 40 час. Увеличение $\times 20$.

Далее нами было исследовано влияние RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РМЖ. Результаты показали, что пептид EEDFGEEAEEEE ингибировал инвазивность клеток на 77%, а пептид VEGEGEEEGEEY подавлял инвазивность на 70% (Рисунок 22, Рисунок 23).

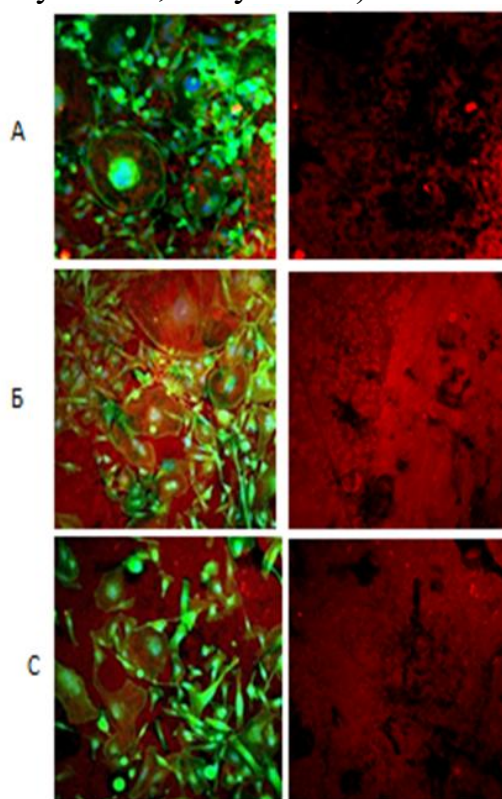


Рисунок 22 – Эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток линии MDA-MB-231: А – клетки, необработанные пептидами (контроль), Б – клетки, обработанные пептидом EEDFGEEAEEEE, С – клетки, обработанные пептидом VEGEGEEEGEEY. Увеличение $\times 20$.

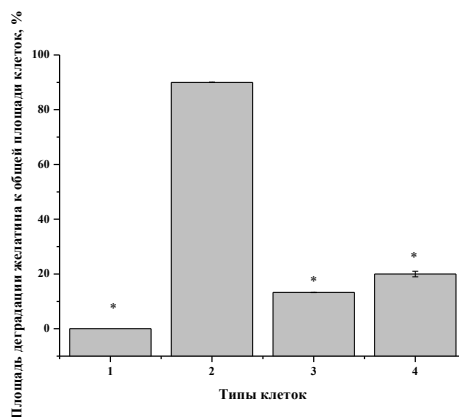


Рисунок 23 – Количественный анализ деградации желатина различными типами клеток, с помощью ImageJ программы: 1 – MEF фибробласты, 2 – клетки MDA-MB-231, 3 – клетки MDA-MB-231 + пептид EEDFGEEAEEEA; 4 – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEGEEY. Различия являются статистически значимыми при $*p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Таким образом, показано, что RHAMM-таргет пептиды ингибируют инвазивность опухолевых клеток РМЖ. Следовательно, RHAMM-таргет пептиды обладают антиметастатическим потенциалом.

Анализ гетерогенности популяции MDA-MB-231 клеток в процессе развития инвазивности

Известно, что опухоли являются гетерогенными и содержат несколько субпопуляций, что, вероятно, обеспечивает выживание и дает преимущества для роста первичных опухолей и образования метастазов (Akentieva et al. 2016; Kim, 2012; Marusyk et al., 2012). Несмотря на достижения в оценке генотипической и фенотипической гетерогенности опухолей, анализ субпопуляций опухолевых клеток в процессе инвазивности методом флуоресцентной микроскопии в литературе отсутствует. Поэтому была проанализирована популяция опухолевых клеток (MDA-MB-231) в процессе развития инвазивности с помощью конфокальной микроскопии (Akentieva et al., 2016). Было обнаружено, что в процессе развития инвазивности отмечается увеличенная и четко выраженная концентрация актина на концах инвадоподий, площадь деградации желатина возрастает, что свидетельствует об образовании большого количества инвадоподий (Рисунок 24, А, Б, С). Кроме того, наблюдается появление гигантских (senescence cells, клетки старения) клеток в популяции, что коррелирует с началом интенсивной инвазивности (Рисунок 21, Б, С; Рисунок 22, А, Б, С; Рисунок 24, Б, С). Эти гигантские клетки имели другую морфологию, а именно, большой размер (они были приблизительно в 10 раз больше по сравнению с обычными клетками) и у них отсутствовали длинные инвадоподии.

В этих клетках наблюдалась упорядоченная структурная организация актина, актиновые филаменты имели форму прямых и толстых пучков. Кроме того, эти гигантские (senescence cells) клетки имели либо крупное ядро, либо наблюдалась многоядерность, количество ядер варьировало от 2 до 6 в клетке (ядра были сгруппированы вместе). Из литературы известно, что наличие би- и

многоядерных клеток объясняется нарушением экспрессии мембранного белка супервиллина, который взаимодействует с RHAMM рецептором, координирует актин и двигательные функции микротрубочек в течение клеточного цикла и таким образом влияет на подвижность клеток, ERK-сигналинг, цитокинез и матриксную инвазивность (Smith et al., 2010). Поскольку появление подобных гигантских клеток старения коррелировало с началом интенсивной инвазивности, можно предположить, что процесс инвазивности сопровождается нарушением в цитокинезе клеток и часть клеток претерпевает морфологические изменения. На конфокальных изображениях видно, что гигантские клетки находятся в окружении мелких клеток и связаны с ними. Следует отметить, что именно клетки мелкого размера являются инвазивными и наиболее интенсивно деградируют желатиновый матрикс. Эти мелкие клетки имеют типичную злокачественную, поляризованную клеточную морфологию, эллиптическую форму, длинные взаимосвязанные инвадоподии, интенсивную концентрацию актина на концах инвадоподий, позволяющую им проникать внутрь матрикса.

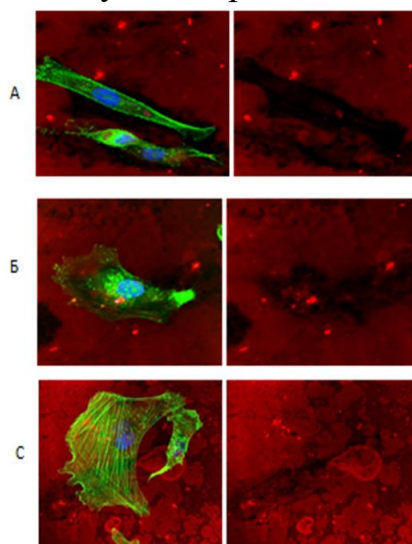


Рисунок 24 – Клетки MDA-MB-231, необработанные пептидами, при увеличении $\times 60$. А – клетки с высокой концентрацией актина в цитоплазме и по краям клетки, Б – концентрированная локализация актина на концах инвадоподий, С – гигантская клетка (senescence cell) с упорядоченной организацией актиновых филаментов, рядом – мелкая инвазивная клетка с длинной инвадоподией и концентрированной локализацией актина.

Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RHAMM-таргет пептидами

На следующем этапе мы исследовали влияние пептидов на морфологию клеток MDA-MB-231 (Akentieva et al., 2016). Нами показано, что обработка клеток RHAMM-таргет пептидами приводила к значительным изменениям в структурной организации актина в клетках. На конфокальных изображениях видно, что после инкубации клеток с пептидом EEDFGEEAEEEE также наблюдалось два типа клеток, а именно, гигантские (senescence cells, клетки старения) и мелкие клетки (Рисунок 22, Б, С; Рисунок 25, А, Б, С). Однако в данном случае в гигантских клетках (senescence cells) наблюдалась полная дезорганизация актина (Рисунок 25, А). Выявлено, что RHAMM-таргет пептиды индуцировали

образование коротких актиновых филаментов, актиновые фибриллы располагались хаотично в цитоплазме, актин не накапливался на концах клетки, происходило нарушение целостности цитоплазматической мембраны клетки (Рисунок 25, А, Б).

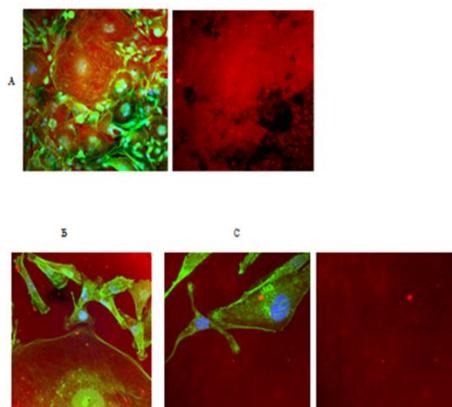


Рисунок 25 – Морфологические изменения актина в MDA-MB-231 клетках, обработанных пептидом EEDFGEEAEEEE. А – гигантская (senescence cell) биядерная клетка с дезорганизацией актина, хаотичным расположением коротких актиновых филаментов, Б – гигантская клетка с нарушенной целостностью лидирующего края клетки, С – мелкие инвазивные клетки с диффузной локализацией актина, нечетко выраженными инвадоподиями, незначительно деградирующие желатин. Увеличение $\times 60$.

Количественный анализ числа гигантских клеток, показал, что клетки, необработанные пептидами, содержали большое количество гигантских клеток старения (~ 13 клеток на область изображения) (Рисунок 26, 1). Однако клетки, обработанные RНАММ-таргет пептидами, демонстрировали меньшее количество гигантских клеток (~ 3 – 5 клеток на область изображения, Рисунок 26, 2, 3).

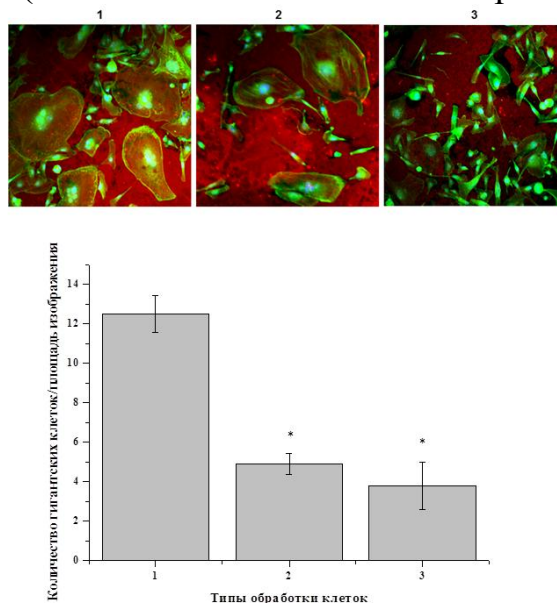


Рисунок 26 – Конфокальные изображения и количественный анализ гигантских клеток в популяции клеточной линии MDA-MB-231: 1 – клетки MDA-MB-231 без добавления пептидов; 2 – клетки MDA-MB-231 + пептид

EEDFGEEAEEEE; 3 – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEGEEY. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Эти данные указывают на то, что гигантские клетки (senescence cells) могут быть вовлечены в процесс развития инвазивности, а обработка клеток RНАММ-таргет пептидами препятствует их появлению. Возможно, что блокирование RНАММ с помощью пептидов нарушает его взаимодействие с мембранным белком супервиллином и приводит к уменьшению количества клеток старения, дезорганизации актина и снижению инвазивности (Smith et al., 2010). Таким образом, RНАММ-таргет пептиды обладают также сенолитическим потенциалом (senolytic drugs, анти-возрастной). Было обнаружено также, что инкубация клеток с RНАММ-таргет пептидами также приводит к различным морфологическим изменениям в мелких клетках, характеризующихся высокой инвазивностью. После обработки пептидами эти мелкие клетки имели меньшее количество инвадоподий, пучки актиновых филаментов становились тонкими и короткими, наблюдалась диффузная локализация актина в цитоплазме клетки, клетки незначительно деградировали желатин (Рисунок 22, Б, С; Рисунок 26).

Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что блокирование RНАММ с помощью RНАММ-таргет пептидов приводит к ингибированию инвазивности клеток РМЖ и уменьшению клеток старения. Следовательно, RНАММ-таргет пептиды обладают антиметастатическим и сенолитическим потенциалом.

Исследование влияния RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность и пролиферацию клеток рака предстательной железы

На следующем этапе было изучено влияние RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4), для которых также характерна повышенная экспрессия RНАММ. Результаты показали, что пептиды (EEDFGEEAEEEE и VEGEGEEEGEEY, 10 мкг/мл) ингибировали жизнеспособность клеток рака предстательной железы на ~ 90% (Рисунок 27). Было также установлено, что пептиды подавляли пролиферацию клеток в 4-5 раз.

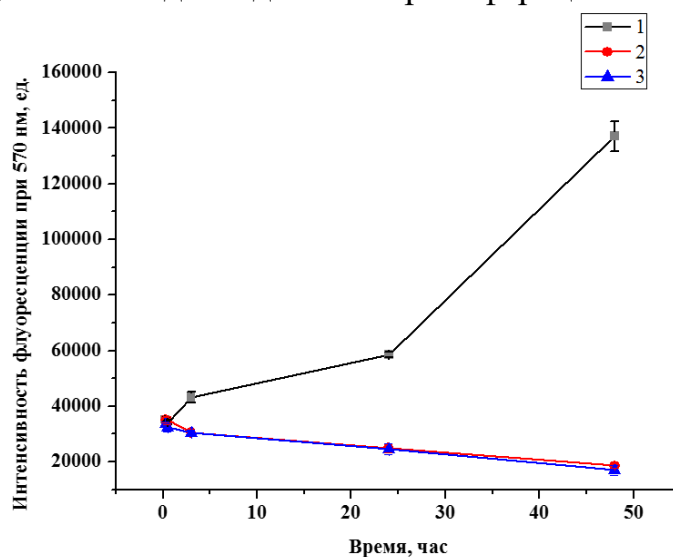


Рисунок 27 – Эффект RНАММ-таргет пептидов на жизнеспособность клеток рака простаты (PC3m-LN4) во времени: 1 – клетки PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4+пептид EEDFGEEAEEEE; 3 – PC3m-LN4+пептид VEGEGEEEGEEY.

Влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеток РПЖ

Следующей задачей было изучение влияния пептидов на апоптоз и некроз клеток РПЖ. Выявлено, что RНАММ-таргет пептиды (2×10^{-7} М) индуцировали апоптоз в РС3m-LN4 клетках в 2 раза (Таблица 3).

Таблица 3 – Эффект RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеток РС3m-LN4, фибробластов и фибробластов RНАММ^(-/)

Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
РС3m-LN4	2,113	2,104
РС3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEEEE	3,440*	0,545*
РС3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY	3,661*	0,655*
Фибробласты	0,644	2,429
Фибробласты + пептид EEDFGEEAEEEE	0,644	2,211
Фибробласты + пептид VEGEGEEEGEEY	0,645	2,259
Фибробласты RНАММ ^(-/)	0,217	0,927
Фибробласты RНАММ ^(-/) + пептид EEDFGEEAEEEE	0,199	0,829
Фибробласты RНАММ ^(-/) + пептид VEGEGEEEGEEY	0,209	0,765

Примечание. * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами

Было показано, что пептиды ингибировали некротическую гибель клеток РПЖ в 4 раза (Таблица 3). Это свидетельствует о другом механизме действия пептидов на клетки РПЖ, чем на клетки РМЖ. Было выявлено, что RНАММ-таргет пептиды увеличивали активность каспаз-3/7 в 2 раза в клетках РПЖ. Было изучено влияние RНАММ-таргет пептидов на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и фибробластов RНАММ^(-/). Результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды не оказывали эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток, а также не влияли на апоптоз и некроз фибробластов RНАММ^(-/) (Таблица 3). Следовательно, RНАММ-таргет пептиды целенаправленно действуют на клетки РПЖ. Эти данные позволяют предположить, что RНАММ-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для терапии РПЖ.

Изучение связывания пептидов (FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE) с клетками РПЖ

В эксперименте использовали 8-мерные пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE), которые представляют собой укороченные версии 12-мерных пептидов (VEGEGEEEGEEY и EEDFGEEAEEEE). Следует отметить, что эти пептиды содержат в своем составе консервативный фрагмент EEXEEZ. Однако

более короткая аминокислотная последовательность позволяет сделать процесс их синтеза более дешевым. Поэтому было интересно исследовать, сохраняют ли эти пептиды свои свойства. Было изучено связывание этих FITC-пептидов с клетками PC3m-LN4. Результаты показали, что FITC-пептиды связываются клетками, однако, связывание FITC-GEGEEGEE пептида было немного сильнее, чем FITC-DFGEEAEE (Рисунок 28, а, ряд 1, 2). Было обнаружено, что только предварительная инкубация клеток с анти-RHAMM антителами с последующим добавлением пептидов приводила к полному отсутствию флуоресценции (Рисунок 28, г). Эти результаты свидетельствуют о том, что FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE пептиды связываются именно с RHAMM рецептором на поверхности клеток рака предстательной железы.

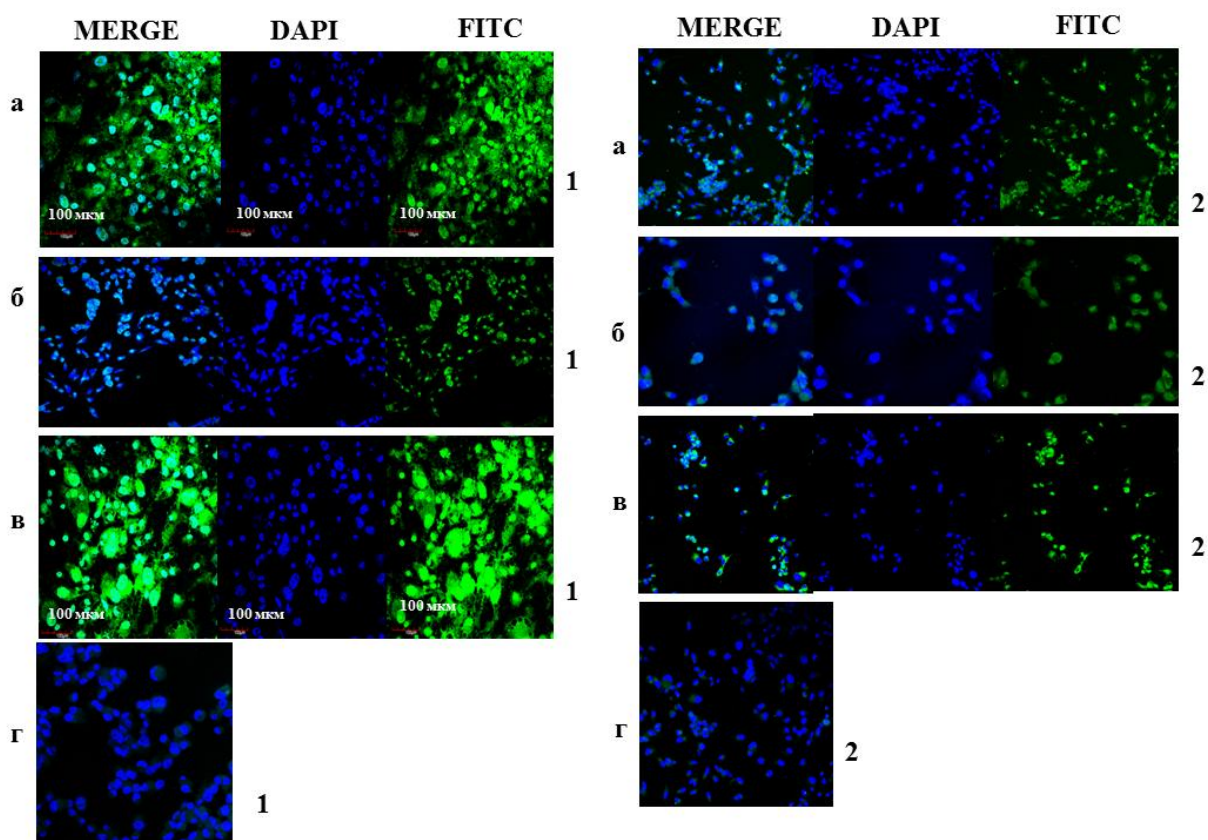


Рисунок 28 - Связывание FITC-GEGEEGEE (1) и FITC-DFGEEAEE (2) пептидов с клетками РПЖ: а – клетки PC3m-LN4, обработанные FITC-пептидами; б – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-FcR-антителами; в – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-CD44-антителами; г – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-RHAMM-антителами.

Количественный анализ связывания FITC-GEGEEGEE или FITC-DFGEEAEE пептидов с клетками РПЖ представлен на Рисунке 29.

Выявлено, что короткие пептиды, содержащие в своем составе фрагмент EEXEEZ, сохраняют способность специфично связываться с RHAMM, и это подтверждает важную роль этого фрагмента.

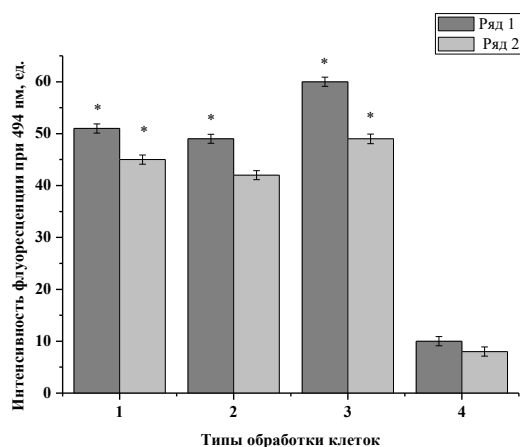


Рисунок 29 – Количественный анализ связывания FITC-GEGEEGEE (ряд 1) и FITC-DFGEEAEE (ряд 2) пептидов с PC3m-LN4 клетками: 1 – клетки PC3m-LN4; 2 – клетки PC3m-LN4+ анти-IgG антитела; 3 – клетки PC3m-LN4+анти-CD44 антитела; 4 – клетки PC3m-LN4+анти-RHAMM антитела. Различия считались достоверными при (* – $p < 0,05$).

Сравнительный анализ инвазивности клеток рака предстательной железы, мышинных эмбриональных фибробластов и клеток меланомы кожи

Мы проводили сравнительный анализ инвазивности раковых клеток предстательной железы (PC3m-LN4), мышинных эмбриональных фибробластов (MEF) и клеток меланомы кожи (WM1552c). Было выявлено, что PC3m-LN4 клетки интенсивно деградировали Су3-флуоресцентно-меченый желатин, в то же время MEF и клетки меланомы кожи практически совсем не деградировали желатин (Рисунок 30, а, ряд 1).

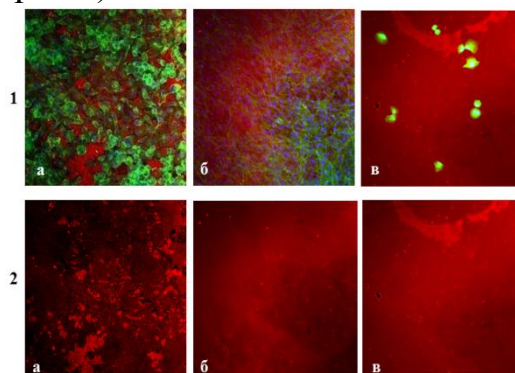


Рисунок 30–Анализ инвазивности клеток РПЖ, фибробластов и клеток кожной меланомы. Конфокальные изображения клеток (1) и деградации желатина (2): а) PC3m-LN4 клетки; б) MEF клетки; в) WM1552c клетки. Желатин окрашен красителем Су3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение $\times 20$.

Количественный анализ показал, что PC3m-LN4 клетки деградировали желатин на 95% через 40 часов, в то же время фибробласты деградировали желатин на 1%, а клетки меланомы на 0,8%.

Эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ

Далее нами был изучен эффект RНАММ-таргет пептидов на инвазивность клеток РПЖ. Результаты показали, что пептиды GEGEEGEE и DFGEEAEE ингибировали инвазивность на ~90% (Рисунок 31, б, в, ряд 1, 2; Рисунок 32, 2, 3).

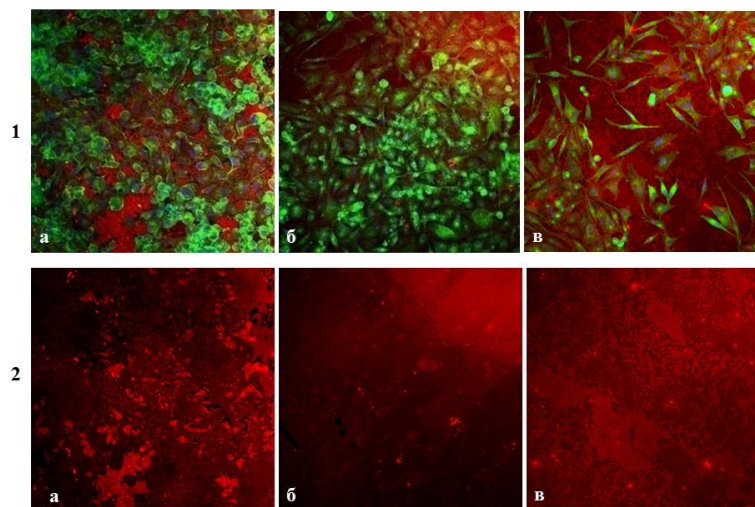


Рисунок 31 – Эффект пептидов на инвазивность клеток PC3m-LN4. Конфокальные изображения клеток (1) и деградации желатина (2): а) PC3m-LN4 без добавления пептидов; б) PC3m-LN4, обработанные GEGEEGEE пептидом; в) PC3m-LN4, обработанные DFGEEAEE пептидом. Желатин окрашен красителем Су3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение $\times 20$.

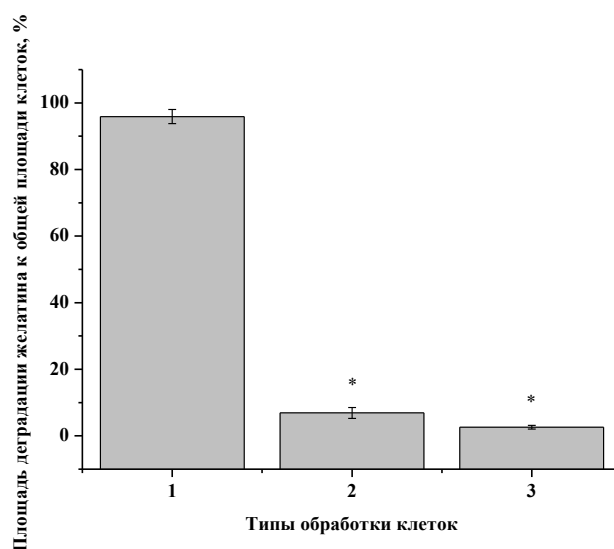


Рисунок 32 - Количественный анализ деградации желатина PC3m-LN4 клетками с помощью ImageJ программы: 1 – клетки без обработки пептидами, 2 – клетки, предварительно обработанные пептидом GEGEEGEE, 3 – клетки, предварительно обработанные пептидом DFGEEAEE. * $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам без обработки пептидами.

Таким образом, RНАММ-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для блокирования процессов инвазивности и метастазирования РПЖ.

Визуализация клеток рака яичников с помощью пептида VEGEGEEEGEEY

В настоящее время разработка неинвазивных методов диагностики рака яичников на самой ранней стадии является весьма актуальной. Для того, чтобы неинвазивная визуализация опухолевых клеток *in vivo* стала осуществимой, необходима разработка правильно сконструированных зондов для визуализации. Задачей данного исследования было изучение возможности использования VEGEGEEEGEEY-пептида в качестве визуализирующего зонда для диагностики рака яичников.

Связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников

Ранее было показано, что содержание ГК и RНАММ повышено при раке яичников и коррелирует с прогрессией и метастазированием опухоли (Xu et al., 2013). Однако в литературе отсутствуют данные о взаимодействии ГК с клетками рака яичников. Поэтому в данной работе вначале было исследовано связывание ГК-Су5.5 (220 кДа) с поверхностью клеток рака яичников (SKVO3), которые характеризуются повышенной экспрессией RНАММ. Показано, что ГК-Су5.5 эффективно связывалась с поверхностью клеток рака яичников (Рисунок 33, а-г; Рисунок 34 (1)).

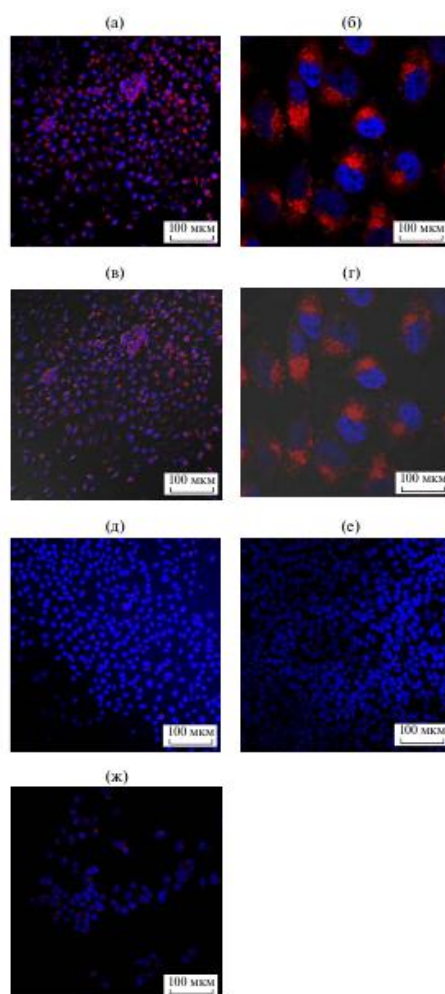


Рисунок 33 - Связывание ГК-Су5.5 с RНАММ на поверхности клеток рака яичников: **а** – клетки SKVO3, обработанные ГК-Су5.5; **б** – изображение **а** при

увеличении $\times 40$; **в** – 3-мерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Cy5.5; **г** – 3-мерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Cy5.5 при увеличении $\times 40$; **д** – клетки, предварительно обработанные анти-RHAMM-Ab; **е** – клетки, предварительно обработанные немеченой ГК; **ж** – клетки, предварительно обработанные VEGEGEEEGEEY-пептидом.

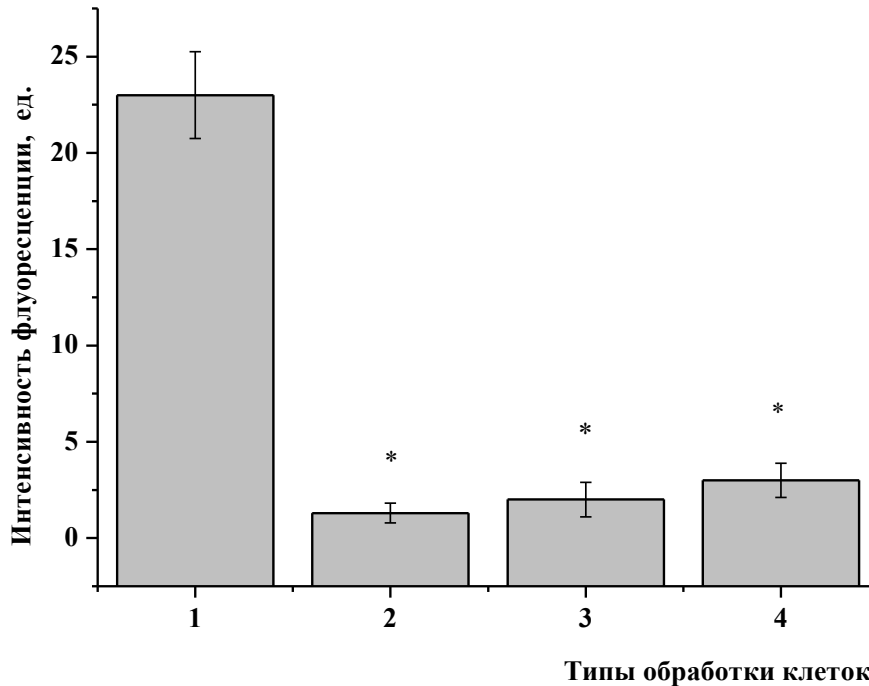


Рисунок 34 – Количественный анализ связывания ГК-Cy5.5 с поверхностью клеток рака яичников. **1** – ГК-Cy5.5, **2** – ГК-Cy5.5 + анти-RHAMM-антитела, **3** – ГК-Cy5.5 + ГК, **4** – ГК-Cy5.5 + VEGEGEEEGEEY-пептид. Различия считали статистически значимыми при * $p \leq 0,05$.

Связывание ГК-Cy5.5 блокировалось анти-RHAMM-антителами, избытком немеченой ГК и немеченым VEGEGEEEGEEY-пептидом (Рисунок 33, **д-ж**; Рисунок 34 (2, 3, 4)). Количественный анализ связывания ГК-Cy5.5 представлен на Рисунке 34.

Таким образом, эти данные указывают на то, что ГК-Cy5.5 специфично связывается с RHAMM.

Связывание VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников

С целью возможности использования пептида для визуализации клеток рака яичников, было исследовано связывание FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников SKVO3. Показано, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид эффективно связывался с поверхностью клеток рака яичников (Рисунок 35, **а**). Однако, пептид не связывался с нормальными клетками (MEF) и с фибробластами RHAMM^(-/-) (Рисунок 35, **б, е**). В то же время пептид интенсивно связывался с фибробластами, трансфицированными с RHAMM^(+/+) (Рисунок 35, **ж**). Предварительная обработка клеток SKVO3 с анти-

RHAMM-антителами блокировала связывание пептида FITC-VEGEGEEEGEEY с клетками (Рисунок 35, в). Это свидетельствует о селективном связывании FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников. Количественный анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток SKOV3 представлен на Рисунке 36.

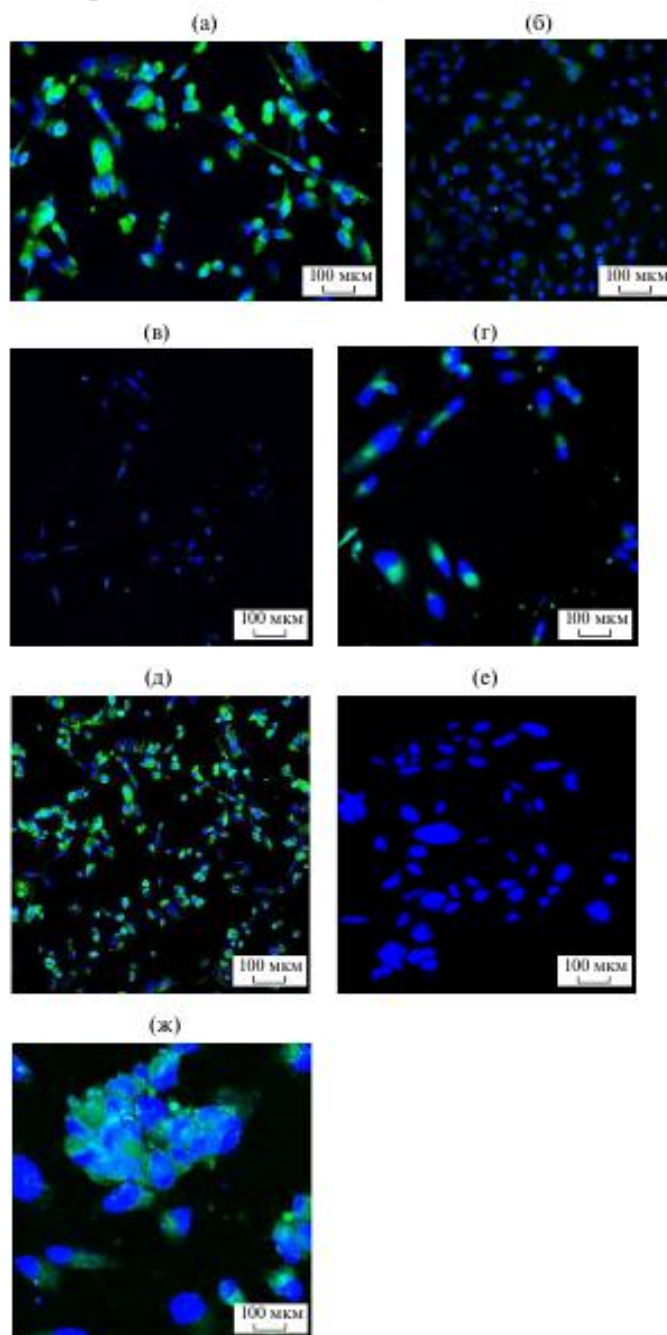


Рисунок 35 – Связывание FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с RHAMM в клетках рака яичников: **а** – клетки SKOV3, обработанные FITC-пептидом; **б** – эмбриональные фибробласты мыши, обработанные FITC-пептидом; **в** – клетки SKOV3, предварительно обработанные анти-RHAMM-Ab; **г** – клетки SKOV3, предварительно обработанные IgG-Ab; **д** – клетки SKOV3, предварительно обработанные анти-CD44-Ab; **е** – фибробласты RHAMM^(-/-), обработанные FITC-пептидом; **ж** – фибробласты RHAMM^(+/+), обработанные FITC-пептидом.

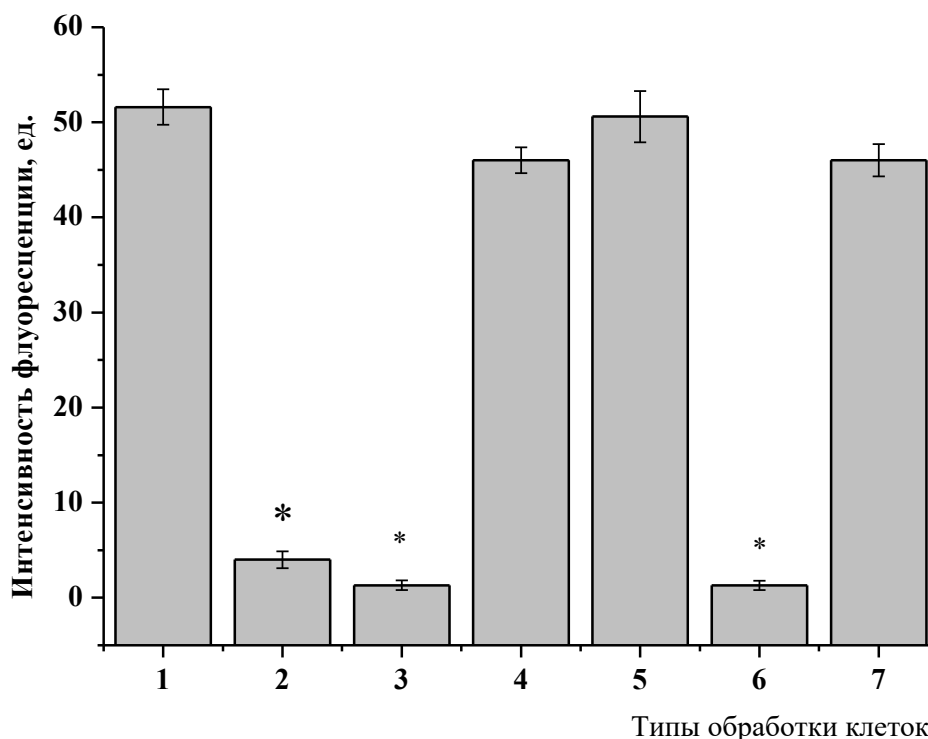


Рисунок 36 – Количественный анализ связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с поверхностью клеток SKOV3. **1** – SKOV3 + FITC-пептид, **2** – FITC-пептид + клетки MEF, **3** – SKOV3 + FITC-пептид + анти-RHAMM-Ab, **4** – SKOV3 + FITC-пептид + IgG-Ab, **5** – SKOV3 + FITC-пептид + CD44-Ab, **6** – FITC-пептид + фибробласты RHAMM^(-/-), **7** – FITC-пептид + фибробласты RHAMM^(+/+). Различия считали статистически значимыми при * $p \leq 0,05$.

Таким образом, полученные результаты указывают на специфичность связывания FITC-VEGEGEEEGEEY пептида с RHAMM и позволяют сделать вывод, что этот пептид можно использовать в качестве молекулярного зонда для ранней диагностики рака яичников.

Исследование влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток РПЖ

Целью следующего раздела работы было изучение эффекта пептида RYQLHPYR, который не содержит в своем составе общий для других пептидов фрагмент EEXEEZ. Мы попытались выяснить, сохраняет ли пептид с такой аминокислотной последовательностью свои функции в клетке. Результаты показали, что пептид (2×10^{-7} M) ингибировал жизнеспособность клеток РПЖ на ~80%, однако, не влиял на жизнеспособность фибробластов мыши (Рисунок 37).

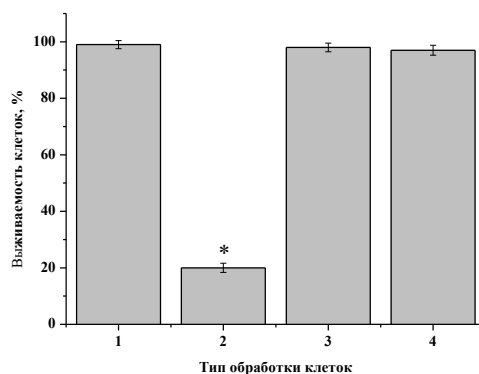


Рисунок 37 – Эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток: **1** – клетки предстательной железы (PC3m-LN4), **2** – клетки PC3m-LN4+пептид; **3** – фибробласты; **4** – фибробласты + пептид. Различия считали статистически значимыми при * $p \leq 0,05$.

Таким образом, результаты показали, что RYQLHPYR-пептид при низких концентрациях обладает цитотоксическим действием на клетки РПЖ за счет модуляции RHAMM рецептора.

Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы

Анализ типа гибели клеток PC3m-LN4 под действием пептида RYQLHPYR проводили методом ELISA, как описано в «Методах исследования». Показано, что клетки, обработанные пептидом, продемонстрировали высокий уровень апоптоза, а именно, пептид увеличивал апоптоз в 10 раз и стимулировал некроз клеток в 2,5 раза (Таблица 4). Кроме того, обнаружено, что пептид увеличивал активность каспаз-3/7 в 2 раза в PC3m-LN4 клетках. Однако пептид не влиял на уровень апоптоза и некроза в фибробластах и в нокаут фибробластах RHAMM^(-/-). Следовательно, пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RHAMM рецептор.

Таблица 4 – Эффект пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4, фибробластов и фибробластов RHAMM^(-/-) клеток

Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
PC3m-LN4	0,257	0,114
PC3m-LN4 + пептид	2,213*	0,277*
Фибробласты	0,621	2,324
Фибробласты + пептид	0,656	2,231
Фибробласты RHAMM ^(-/-)	0,423	2,269
Фибробласты RHAMM ^(-/-) + пептид	0,690	1,710

Примечание: различия являются статистически значимыми при * – $p \leq 0,05$

Исследование влияния пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ

На Рисунке 38, а-ж, представлены изображения клеток РС3m-LN4 без обработки пептидом.

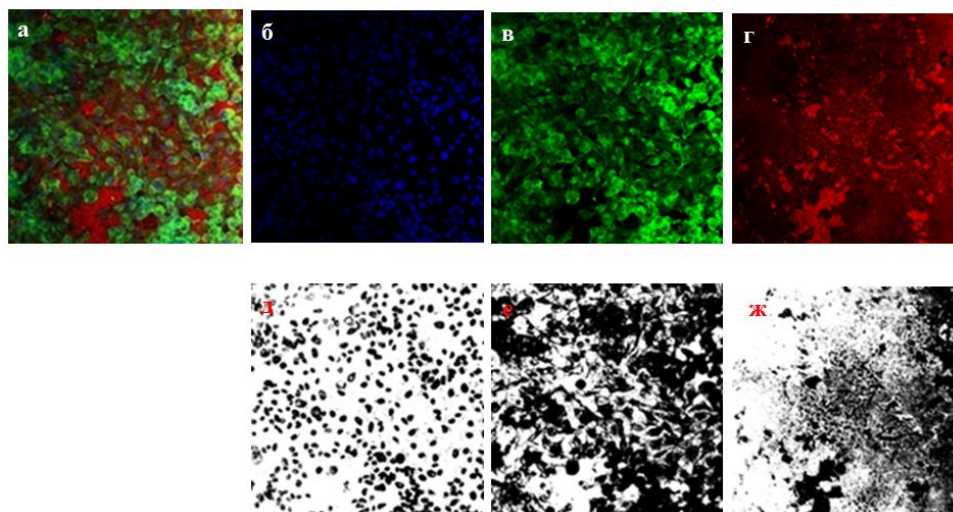


Рисунок 38 – Анализ инвазивности клеток РС3m-LN4. Конфокальные изображения клеток (**а**), ядер (**б**), актина (**в**) и деградации желатина (**г**). Желатин окрашен красителем СуЗ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: **д** – число клеток, **е** – площадь клеток (черный цвет), **ж** – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение $\times 20$.

Показано, что инвазивные клетки РС3m-LN4 значительно деградировали желатин (до 90%) (Рисунок 38, а, г; Рисунок 40). Выявлено, что под действием пептида наблюдается подавление инвазивности клеток на 99,86% (Рисунок 39, а, г; Рисунок 40).

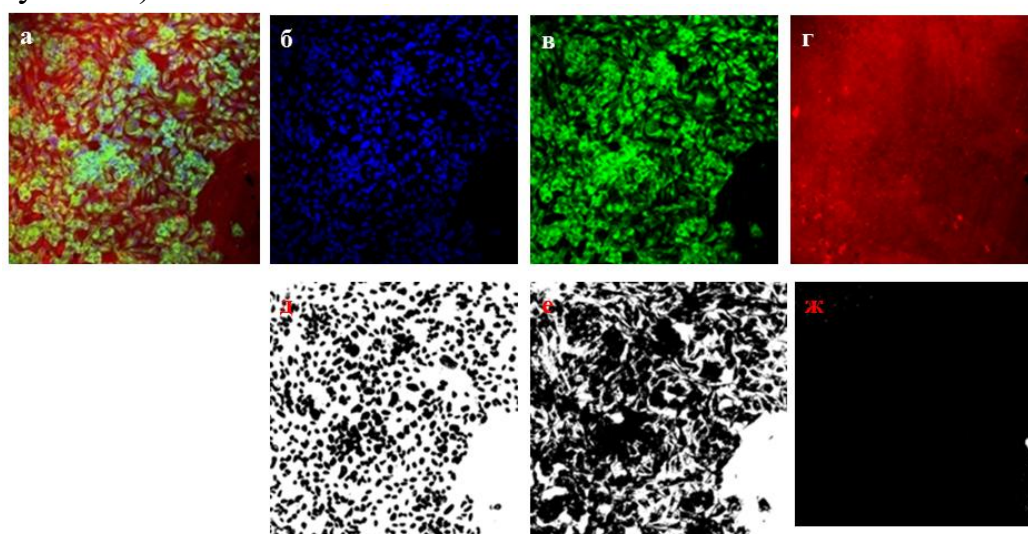


Рисунок 39 – Эффект пептида RYQLHPYR на инвазивность опухолевых клеток. Конфокальные изображения клеток (**а**), ядер (**б**), актина (**в**) и деградации желатина (**г**): РС3m-LN4 клетки, обработанные пептидом. Желатин окра-

шен красителем СуЗ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: **д** – число клеток, **е** – площадь клеток (черный цвет), **ж** – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение $\times 20$.

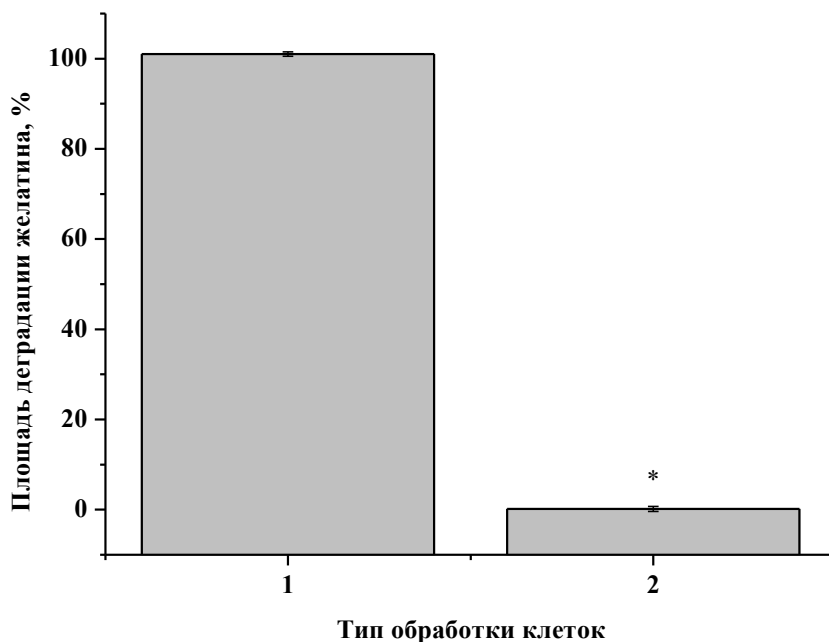


Рисунок 40 – Количественный анализ деградации желатина клетками РС3m-LN4 (1) и клетками, обработанными пептидом RYQLHPYR (2), с помощью ImageJ программы. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидом.

Таким образом, эти результаты указывают на то, что пептид RYQLHPYR обладает антиметастатическим действием.

Влияние RHAMM-таргет пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная опухолевая модель)

В следующей части работы нами был исследован эффект RHAMM-таргет пептидов на рост опухолей у ксенографтов (иммунодефицитные мыши). Клетки РПЖ (РС3m-LN4, концентрация клеток 2×10^7 /мл), обрабатывали пептидами (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR, конечная концентрация 40 мкг/мл) и вводили подкожно в подмышечную впадину 5-недельных мышей в асептических условиях. В течение 35 дней анализировали рост опухолей пальпацией и измеряли их размер. На 35-й день эксперимента животных умерщвляли, опухоли вырезали и взвешивали. Было обнаружено, что средний вес опухолей был 0,226 г в контрольной группе и 0,091 г в экспериментальной группе (пептид GEGEEGEE), что указывает на 58% ингибирования роста опухолей пептидом (Таблица 5). Мыши, инокулированные клетками, предварительно инкубированными с пептидом DFGEEAEE, имели вес опухолей равный 0,0825 г, что указы-

вает на 63,5% ингибирования роста опухолей пептидом (Таблица 5). Вес опухолей в группе мышей, обработанных пептидом RYQLHPYR, был значительно меньше, чем в других группах и составил 0,0123 г, что указывает на ингибирование роста опухолей на 94,6%. (Таблица 5).

Таблица 5 – Ингибирование роста опухолей у мышинных ксенографтов под действием RНАММ-таргет пептидов

Препарат	Путь введения	Доза, мг/кг	Вес опухолей, г	Ингибирование роста опухолей, %	T/C, %
Контрольная группа	подкожно	2,5	0,226	0,0	0,0
GEGEEGEE	подкожно	2,5	0,091*	59,8	40,2
DFGEEAEE	подкожно	2,5	0,0825*	63,5	36,5
RYQLHPYR	подкожно	2,5	0,0123*	94,6	5,4

Примечание. Различия являются статистически значимыми * $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольными опухолями (без обработки пептидом)

Таким образом, результаты показали, что RНАММ-таргет пептиды обладают противоопухолевой активностью *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы и синтезированы RНАММ-таргет пептиды, соответствующие СТТ- и H12-областям аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина.

2. Разработан высокоэффективный метод получения рекомбинантного RНАММ-СТ белка, позволяющий получить гомогенный белок с высоким выходом (степень чистоты более 90%, выход 50 мг/л культуры *E.coli*).

3. Впервые установлено, что RНАММ-таргет пептиды специфично связываются с рекомбинантным RНАММ-СТ на ГК-связывающем центре. Вычислены константы диссоциации пептидов (VEGEGEEEGEEY, $K_D = 24$ нМ), (EEDFGEEAEEEA, $K_D = 32$ нМ), (FTEAESNMNDLV, $K_D = 30$ нМ), свидетельствующие о высоком сродстве их связывания с RНАММ рецептором.

4. Выявлена взаимосвязь между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ рецептором. Установлено, что аминокислотный фрагмент EEXEEZ в составе RНАММ-таргет пептидов является необходимым для связывания с RНАММ. Доказана роль ключевых аминокислот E (глутаминовая кислота), G (глицин), Y (тирозин) в связывании с RНАММ, поскольку их замена на аминокислоту Ala (аланин) приводит к значительному снижению сродства пептидов к RНАММ.

5. Продемонстрирована стабильность RНАММ-таргет пептидов в сыворотке крови и приемлемое время полураспада (2-4 часа), что указывает на возможность применения пептидов для визуализации опухолевых клеток и терапии рака.

6. Получен комплекс биохимических данных, свидетельствующих о целенаправленном взаимодействии RНАММ-таргет пептидов с раковыми клетками. Выявлено, что пептиды специфично связываются с RНАММ рецептором на поверхности опухолевых клеток молочной, предстательной желез и рака яичников; однако пептиды не связываются с нормальными клетками [MEF и фибробластами RНАММ^(-/)]. Благодаря специфичной природе взаимодействия пептидов с RНАММ рецептором, RНАММ-таргет пептиды могут использоваться в молекулярной диагностике онкологических заболеваний на ранней стадии.

7. Впервые получены экспериментальные данные о терапевтическом потенциале RНАММ-таргет пептидов. Показано, что RНАММ-таргет пептиды обладают цитостатической, апоптотической и антиметастатической активностью по отношению к опухолевым клеткам молочной железы: ингибируют жизнеспособность, пролиферацию клеток на 50% ($p < 0,05$); индуцируют апоптоз и некроз в 4-5 раз ($p < 0,05$); стимулируют активность каспаз-3/7 на 30% ($p < 0,05$); подавляют инвазивность раковых клеток на ~80% ($p < 0,05$); однако не влияют на апоптоз и некроз нормальных клеток (MEF) и клеток RНАММ^(-/). Выявлено, что RНАММ-таргет пептиды действуют адресно на раковые клетки и их эффект проявляется при низких концентрациях (10 мкг/мл, 2×10^{-7} М), что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

8. Обнаружено, что популяция раковых клеток молочной железы является гетерогенной и состоит из двух типов клеток: крупных, многоядерных, неинвазивных (клетки старения) и мелких, инвазивных клеток. Установлено, что RНАММ-таргет пептиды индуцируют стресс актиновых волокон, подавляют образование инвадоподий и уменьшают количество клеток старения в 4 раза ($p < 0,05$), что свидетельствует об их сенолитическом потенциале.

9. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды специфично воздействуют на раковые клетки предстательной железы, понижают жизнеспособность, пролиферацию клеток на ~90% ($p < 0,05$); индуцируют апоптоз и активность каспаз-3/7 в 2 раза ($p < 0,05$); подавляют инвазивность клеток на ~90% ($p < 0,05$), но при этом не влияют на апоптоз нормальных клеток и фибробластов RНАММ^(-/). Продемонстрировано, что 8-мерные пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) сохраняют свойства 12-мерных пептидов: специфично связываются с раковыми клетками, подавляют инвазивность клеток на ~90% ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о возможности использования RНАММ-таргет пептидов в клеточной терапии рака предстательной железы.

10. Установлено впервые, что пептид RYQLHPYR специфично связывается с RНАММ на поверхности клеток рака предстательной железы, понижает жизнеспособность клеток на ~80% ($p < 0,05$); подавляет инвазивность на 99% ($p < 0,05$); повышает активность каспаз-3/7 в 2 раза ($p < 0,05$); индуцирует апоптоз в 10 раз и некроз в 2 раза ($p < 0,05$); однако не влияет на апоптоз и некроз нормальных и нокаут фибробластов. Следовательно, пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RНАММ рецептор.

11. Впервые в условиях *in vitro* установлено, что ГК-Cy5.5 и FITC-VEGEGEEEGEEY пептид специфично связываются с RНАММ на поверхности клеток рака яичников, при этом пептид не взаимодействует с нокаут фибробластами RНАММ^(-/-); однако интенсивно связывается с фибробластами, трансфицированными с RНАММ^(+/+). Эта селективность взаимодействия пептида с раковыми клетками указывает на то, что FITC-VEGEGEEEGEEY пептид можно использовать в качестве неинвазивного зонда для ранней молекулярной диагностики рака яичников.

12. Впервые показано, что RНАММ-таргет пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) проявляют противоопухолевую активность *in vivo*, подавляя рост опухолей мышинных ксенографтов на 58%, 63,5% и 94,6% ($p < 0,05$), соответственно. Полученный комплекс данных свидетельствует о том, что RНАММ-таргет пептиды, благодаря своей стабильности и способности специфично связываться с опухолевыми клетками, подавлять их жизнеспособность, пролиферацию, инвазивность, имеют потенциал для использования в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о том, что RНАММ-таргет пептиды могут применяться для специфичной маркировки и визуализации опухолевых клеток с целью ранней диагностики онкологических заболеваний (рака молочной и предстательной желез, рака яичников) в трансляционной медицине. В данной работе впервые исследован диагностический и терапевтический потенциал RНАММ-таргет пептидов. Полученные результаты являются научно-значимыми и открывают новое направление для клеточной терапии онкологических заболеваний с помощью пептидов-антагонистов, адресно направленных на опухолевые клетки. Вместе с тем, необходимы дальнейшие исследования о молекулярном механизме действия RНАММ-таргет пептидов, блокирующих сигнальный путь ГК/RНАММ. Кроме того, необходимо более детальное изучение гигантских клеток (*senescence cells*), понимание их роли в процессах инвазивности. Для практического использования RНАММ-таргет пептидов в трансляционной онкологии необходимы дальнейшие исследования с проведением доклинических испытаний. Таким образом, начатая нами тема исследования имеет перспективу дальнейшей разработки. Следует подчеркнуть, что в настоящее время изучение молекулярных механизмов взаимодействия RНАММ-таргет пептидов с RНАММ рецептором для диагностических, прогностических и терапевтических целей является одним из приоритетных направлений биомедицины.

Список работ Акентьевой Н.П., опубликованных по теме диссертации Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и зарубежных журналах

1. Akentieva, N. P. RНАММ-Target Peptides as Molecular Imaging Probes for the Imaging of RНАММ-Expressing Cancer Cells / N. P. Akentieva, A. F. Topunov // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 2–24.

2. Akentieva, N. P. RHAMM-target Peptides Inhibit Proliferation and Viability of Cancer Cells / *N. P. Akentieva, A. F. Topunov // Biointerface Research in Applied Chemistry.* – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 12252–12266.

3. Акентьева, Н. П. Изучение противоопухолевой активности синтетического пептида RYQLHPYR на клетках рака предстательной железы / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Российский биотерапевтический журнал.* – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 40–50.

4. Акентьева, Н. П. Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEGEEY / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Биологические мембраны.* – 2018. – Т. 35, № 2. – С. 131–142.

5. Akentieva, N. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells / *N. Akentieva // Eurobiotechnology Journal.* – 2017. – Vol. 1, №2. – P. 138–148.

6. Акентьева, Н. П. Ингибирование инвазивности раковых клеток под действием синтетических пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE) / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Биологические мембраны.* – 2017. – Т. 34, №1. – С. 19–31.

7. Акентьева, Н. П. RHAMM (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности)-таргет пептиды индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Вопросы онкологии.* – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 512–518.

8. Акентьева, Н. П. ингибирующий эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов // Вопросы онкологии.* – 2016. – Т. 62, № 6. – С. 831–837.

9. Акентьева, Н. П. Эффект RHAMM селективных пептидов на выживаемость клеток рака молочной железы / *Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов, А. И. Котельников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2015. – Т. 159, № 5. – С. 618–621.

10. Esguerra, K. V. Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR) / *K. V. Esguerra, C. Tolg, N. Akentieva, M. Price, C. F. Cho, J. D. Lewis, J. B. McCarthy, E. A. Turley, L. G. Luyt // Integrative Biology.* – 2015. – Vol. 7, № 12. – P. 1547–1560.

11. Rizzardi, A. E. Elevated Hyaluronan and Hyaluronan-Mediated Motility Receptor Are Associated With Biochemical Failure in Patients With Intermediate-Grade Prostate Tumors / *A. E. Rizzardi, R. I. Vogel, J. S. Koopmeiners, C. L. Forster, L. O. Marston, N. K. Rosener, N. Akentieva, M. A. Price, G. J. Metzger, C. A. Warlick, J. C. Henriksen, E. A. Turley, J. B. McCarthy, S. C. Schmechel // Cancer.* – 2014. – Vol. 120, № 12. – P. 1800–1809.

12. Veiseh, M. Imaging of Homeostatic, Neoplastic, and Injured Tissues by HA-Based Probes / *M. Veiseh, D. Breadner, J. N. Ma, N. Akentieva, R. C. Savani, R. Harrison, D. Mikilus, L. Collis, S. Gustafson, T. Y. Lee // Biomacromolecules.* – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 12–22.

13. Tolg, C. A RHAMM Mimetic Peptide Blocks Hyaluronan Signaling and Reduces Inflammation and Fibrogenesis in Excisional Skin Wounds / *C. Tolg, S. R. Hamilton, E. Zalinska, L. McCulloch, R. Amin, N. Akentieva, F. Winnik, R. Savani,*

D. J. Bagli, L. G. Luyt // *American Journal of Pathology*. – 2012. – Vol. 181, № 4. – P. 1250–1270.

14. Chen, Z. W. A neurosteroid analogue photolabeling reagent labels the colchicine-binding site on tubulin: A mass spectrometric analysis / Z. W. Chen, L. H. Chen, N. Akentieva, C. F. Lichti, R. Darbandi, R. Hastings, D. F. Covey, D. E. Reichert, R. R. Townsend, A. S. Evers // *Electrophoresis*. – 2012. – Vol. 33, № 4. – P. 666–674.

15. Bordet, T. Identification and Characterization of TRO19622 (4-Cholesten-3-one, Oxime), a novel compound for the treatment Amyotrophic Lateral Sclerosis./ T. Bordet, B. Buisson, M. Michaud, E. Steidl, N. Akentieva, A. Evers, C. Massaad, M. Schumacher, M. A. Ostuni, J.-J. Lacapère, P. Galea, C. Drouot, D. Maux, C. E., Henderson, R. Pruss // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2007. – Vol. 322, № 2. – P. 709–720.

Патенты

1. Naor, D. RHAMM-derived peptide for treatment of diabetes / D. Naor, N. P. Akentieva, E. Turley. – International Patent № 12459. June 2013. 40 Yissum Research Development company of the Hebrew University of Jerusalem, Israel. United States Provisional Patent Application No. 62/560,790 «Rhamm-derived peptide for treatment of diabetes» – Ref: 2513453 SL/nb.

Статьи в других изданиях и материалы конференций

1. Akentieva, N. P. Antitumor Effects of RHAMM-Target Peptides on Prostate Tumor Xenografts in Nude Mice / N. P. Akentieva // *Chinese Journal of Surgical Oncology*. – 2020. – Vol.1, № 1. – P. 1–6.

2. Akentieva, N. P. The discovery of hyaluronan peptide mimics as selective ligands for RHAMM in ovarian cancer / N. P. Akentieva, K. N. Esguerra, C. Ward, C. Tolg, J. Ma, M. Veiseh, J. Zhang, J. Koropatnick, M. J. Bissell, T. Shepherd, J. McCarthy, J. Lewis, L. Luyt, E. Turley // Poster session presented at: 50th Annual Meeting American Society of Cell Biology, Philadelphia, PA, USA. – URL: www.ascb.org/meetings. – 2010. – Author index: 2253/B651. – P. 191.

3. Akentieva, N. P. The discovery of hyaluronan peptide mimics as selective ligands for RHAMM in ovarian cancer / N. P. Akentieva, K. V. N. Esguerra, C. Ward, C. Tolg, M. Veiseh, J. Zhang, J. Koropatnick, M. J. Bissell, T. Shepherd, J. McCarthy, J. Lewis, L. G. Luyt, E. Turley // Poster session presented at: 2010 ASCB Annual Meeting, Pittsburg, PA, USA. – Abstracts published: *Mol. Biol. Cell*. – 2010. – № 21. – P. 4299.

4. Akentieva, N. Design and characterization of peptide ligands that target Rhamm/HMMR in tumour cells / N. Akentieva, K. V. N. Esguerra, C. Ward, C. Tolg, J. Ma, M. Veiseh, J. Zhang, J. Koropatnick, M. J. Bissell, T. Shepherd, J. McCarthy, J. Lewis, E. Turley, L. G. Luyt // Poster session presented at: CIHR – strategic training program in cancer research & technology transfer (CARTT) and the Department of Oncology – Research & Education Day – 2011, University of WESTERN ONTARIO, London, ON, Canada. – June 17th, 2011. – P. 17.

5. Akentieva, N. P. Design of hyaluronan peptide mimics as molecular imaging probes that target breast cancer cells / N. P. Akentieva, K. V. Esguerra, C. Toelg, J. Ma, D. Breadner, M. Veisen, J. Zhang, J. Koropatnick, M. J. Bissell, T. Lee, E.

Turley, L. Luyt // Cancer Care Ontario Research Day. Oral Presentation. Toronto, Canada. – April 8th 2010. – P. 15.

6. Esguerra, K. V. N. Tubulin-derived peptides as ligands for RHAMM/HMMR expressing cancer cells / K. V. N. Esguerra, N. P. Akentieva, C. Ward, T. G. Shepherd, E. A. Turley; L. G. Luyt // 94th Canadian Chemistry Conference. Oral Presentation. Montreal, QC, Canada. – June 2011. – P. 8.

7. Akentieva, N. P. Characterization of hyaluronic-mimetic peptides, targeting Rhamm/HMMR, as anti-cancer agents / N. P. Akentieva, K. V. N. Esguerra, C. Tolg, T. Pat, J. Koropatnick, J. McCarthy, J. Lewis, L. G. Luyt, E. I. Turley // Poster session presented at: London Health Research Day. London, ON, Canada. – March 20th, 2012. – P. 12.

8. Akentieva, N. Characterization of hyaluronic-mimetic peptides, targeting Rhamm/HMMR, as anti-cancer agents / N. Akentieva, K. V. N. Esguerra, C. Tolg, T. Pat, J. Koropatnick, J. McCarthy, J. Lewis, L. G. Luyt, E. I. Turley // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. – June 2012. – P. 6.

9. Esarik, A. Molecular imaging of highly invasive breast cancer subsets using novel peptide mimetics / A. Esarik, K. V. N. Esguerra, N. Akentieva, E. A. Turley, L. G. Luyt // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. – 2012. – P. 7.

10. Esarik, A. Tubulin-derived Peptides as Molecular Imaging Probes for Aggressive Breast Cancer Tumours / A. Esarik, K. V. N. Esguerra, N. Akentieva, E. A. Turley, L. G. Luyt // 96th Canadian Chemistry Conference. Oral Presentation. Quebec city, Canada. – 2013. – P. 11.

11. Esarik, A. Hyaluronan Peptide Mimetics for the Imaging of RHAMM-Expressing Carcinomas / A. Esarik, K. V. N. Esguerra, N. Akentieva, J. Ma, P. Telmer, E. A. Turley; L. G. Luyt // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. – 2013. – P. 6.

12. Акентьева, Н. П. Изучение противоопухолевой активности RHAMM-таргет пептидов *in vitro* / Н. П. Акентьева // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 58.

13. Акентьева, Н. П. Дизайн и характеристика RHAMM-специфичных пептидов как перспективных биомаркеров для диагностики и терапии раковых заболеваний / Н. П. Акентьева, А. И. Котельников // Международный междисциплинарный Форум Moscow Science Week. – Устный секционный доклад. Москва, Россия. – 8–12 сентября 2014 г. – С. 2.

14. Акентьева, Н. П. Характеристика RHAMM специфичных пептидов, как перспективных кандидатов для таргетной терапии рака молочной железы / Н. П. Акентьева, А. И. Котельников // Международный междисциплинарный Форум Moscow Science Week. – Стендовый доклад. Москва, Россия. – 8–12 сентября 2014 г. – С. 4.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГК – гиалуроновая кислота (*от англ.* Hyaluronic acid)
- РМЖ – рак молочной железы
- РПЖ – рак предстательной железы
- Су5.5 – флуоресцентный краситель, цианин 5 (*от англ.* Cyanine 5)
- ELISA – иммуноферментный анализ (*от англ.* Enzyme-linked immunosorbent assay)
- ESI-MS – электро-спрей ионизационная масс-спектрометрия (*от англ.* Electrospray ionization mass spectrometry).
- FcR – иммуноглобулин-подобный рецептор (*от англ.* Fragment crystallizable region)
- FITC – флуоресцеин изотиоцианат (*от англ.* Fluorescein isothiocyanate)
- MAP – белки, ассоциированные с микротрубочками (*от англ.* Microtubules associated proteins).
- MEF – мышинные эмбриональные фибробласты (*от англ.* Mouse Embryonic Fibroblasts)
- RHAMM/HMMR – рецептор гиалуронан опосредованной подвижности (*от англ.* Receptor for hyaluronan mediated motility/Hyaluronan-mediated motility receptor)
- SPR – поверхностный плазмонный резонанс (*от англ.* Surface plasmon resonance)