

УДК 577.2

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ GALA3, СПОСОБНЫ ОСУЩЕСТВЛЯТЬ ДОСТАВКУ МОНОБОДИ К KEAP1 В КЛЕТКИ-МИШЕНИ И ИНГИБИРОВАТЬ ОБРАЗОВАНИЕ В КЛЕТКАХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2025 г. Ю. В. Храмцов¹, Е. С. Бунин¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 10.10.2024 г.

После доработки 21.10.2024 г.

Принято к публикации 22.10.2024 г.

В созданном ранее модульном нанотранспортере (МНТ), способном доставлять в цитозоль монободи к Keap1, транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс) был заменен на эндосомолитический пептид GALA3. Установлено, что данная замена более чем вдвое увеличивает время жизни МНТ в крови. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что МНТ с GALA3 интернализуется в клетки AML12 преимущественно за счет связывания с рецептором эпидермального фактора роста, а также способен выходить из эндосом в цитозоль. Используя клеточный анализ теплового сдвига, было показано, что МНТ с GALA3 и МНТ с ДТокс с одинаковой эффективностью способны нарушать образование комплекса Nrf2 с Keap1, что приводило к сходной защите клеток AML12 от действия перекиси водорода. Полученные результаты позволяют не только оптимизировать системное применение МНТ, но и могут послужить основой для создания средств, направленных на лечение болезней, связанных с окислительным стрессом.

Ключевые слова: модульные нанотранспортеры, GALA3, транслокационный домен дифтерийного токсина, время жизни в крови, конфокальная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, клеточный анализ теплового сдвига

DOI: 10.31857/S2686738925010268, **EDN:** svxcds

Одним из ключевых компонентов контроля окислительного баланса в клетке является транскрипционный фактор Nrf2 [1–3]. В нормальных условиях он образует комплекс с белком-ингибитором Keap1, приводящий к его деградации. Однако в условиях окислительного стресса этот комплекс нарушается, что приводит к поступлению Nrf2 в ядро и активации антиоксидантного ответа клетки. Принудительная активация Nrf2-системы может быть способом лечения различных патологий, связанных с окислительным стрессом, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, рак, сахарный диабет, воспаления и интоксикации [4–6]. Кроме того, некоторые лекарства, активирующие Nrf2-систему, имеют также выраженную противовирусную

активность для целого ряда вирусов, включая SARS-CoV-2 [7, 8]. Ранее нами были созданы модульные нанотранспортеры (МНТ), способные в цитозоле клеток-мишеней взаимодействовать с белком-ингибитором Keap1, в перспективе приводя к активации Nrf2-системы [9]. Данные МНТ для выхода из эндосом в цитозоль использовали в качестве эндосомолитического модуля транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс). Ранее было показано, что в случае системного применения других МНТ, содержащих ДТокс, основная их доля оказывалась в печени, из-за чего время жизни МНТ в крови было не высоко [10]. И действительно, на время жизни молекул в крови влияет их способность накапливаться в печени и почках [11], а также поглощаться клетками иммунной системы [12]. Нецелевое накопление молекул и их иммуногенность можно уменьшить за счет присоединения к ним молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) [13, 14]. Так, присоединение ПЭГ к МНТ со стороны эндосомолитического модуля ДТокс заметно увеличивало время жизни МНТ

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: alsobolev@yandex.ru

Время жизни или обратную ей величину константу скорости выведения МНТ из крови, k , получали по соответствующим зависимостям относительной концентрации МНТ_{Дк} или МНТ_{Гк} от времени (рис. 2). Данные зависимости хорошо описывались одноэкспоненциальной функцией ($r^2 = 0.997$, $\text{Chi}^2 = 3.98$ и $r^2 = 0.987$, $\text{Chi}^2 = 6.69$ для МНТ_{Дк} или МНТ_{Гк} соответственно). Полученные k составляли $0.0367 \pm 0.0012 \text{ мин}^{-1}$ (95% доверительный интервал: 0.0337–0.0402) и $0.0139 \pm 0.0006 \text{ мин}^{-1}$ (95% доверительный интервал: 0.0122–0.0156) для МНТ_{Дк} или МНТ_{Гк} соответственно. Характерные времена выведения МНТ из крови, $1/k$, составляют при этом 27.2 ± 0.9 и 72 ± 3 минут для МНТ_{Дк} или МНТ_{Гк} соответственно. Таким образом, замена ДТокс на GALA3 в МНТ приводит к достоверному более чем двукратному увеличению времени жизни МНТ в крови.

Замена эндосомолитического модуля могла повлиять на способность МНТ_Г выполнять свои функции. Чтобы показать, что МНТ_Г способен интернализироваться в клетки-мишени и выходить из эндосом, использовали метод конфокальной микроскопии. После 1 ч инкубации 150 нМ МНТ_Г, меченного АТТО647, с клетками AML12, основная его доля наблюдалась в цитоплазме. Чтобы доказать, что МНТ_Г проникает в клетки рецептор-опосредованным эндоцитозом, был поставлен контрольный эксперимент, в котором клетки AML12 инкубировали 1 ч с 150 нМ МНТ_Г-АТТО647 и избытком (1 мкМ) эпидермального фактора роста (ЭФР). Средняя интенсивность флуоресценции МНТ_Г-АТТО647 (за вычетом автофлуоресценции) в присутствии избытка ЭФР (1.4 ± 0.4 усл.ед.) оказалась вчетверо меньше ($p < 0.01$ по критерию Колмогорова-Смирнова), чем в его отсутствие (5.6 ± 2.1 усл. д.). Этот результат позволяет заключить, что МНТ_Г интернализуется в клетки преимущественно за счет связывания с рецептором ЭФР.

Прокраска эндосом/лизосом флуоресцентным красителем LysoTracker Green показала, что с ними колокализуется только $12 \pm 6\%$ МНТ_Г-АТТО647. Иными словами, основная доля МНТ_Г на 1 ч вышла из эндосом. Ранее нами было показано, что за счет взаимодействия монободи в составе МНТ_Д с Keap1, заметная доля данных МНТ находилась в области митохондрий [9]. Прокраска митохондрий флуоресцентным красителем MitoTracker Green позволила установить, что в среднем с митохондриями колокализуется $31 \pm 6\%$ МНТ_Г-АТТО647, поступившего в клетки. Напротив, для МНТ_{Гк}, который не содержит монободи к Keap1, эта доля заметно ниже и составляет $14 \pm 6\%$. Таким образом, МНТ_Г способен не только интернализироваться в клетки за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, но и выходить из эндосом в цитозоль, где сохраняет способность взаимодействовать с белком Keap1.

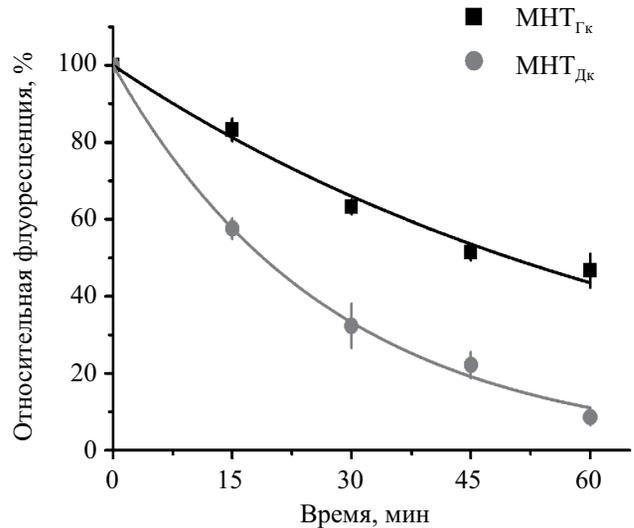


Рис. 2. Оценка временной зависимости концентрации МНТ_{Дк}-AF488 и МНТ_{Гк}-AF488 в крови мышей BALB/c по интенсивности флуоресценции AF488. За 100% принята флуоресценция МНТ_{Дк}-AF488 и МНТ_{Гк}-AF488 сразу после внутривенного введения. Указаны средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 4-5$).

Ранее нами был предложен подход, позволяющий с помощью клеточного анализа теплового сдвига (CETSA) по кривой плавления для Nrf2 определить долю свободного Nrf2 в клетке при физиологических температурах (37°C) [18]. Зависимости данной доли от времени инкубации МНТ_Д или МНТ_Г с клетками хорошо совпадают (рис. 3). Это говорит о том, что МНТ_Д и МНТ_Г с одинаковой эффективностью могут вытеснять Nrf2 из комплекса с Keap1. Nrf2 постоянно нарабатывается в клетке, образует комплекс с Keap1 и подвергается протеолизу. Нарушение его связывания с Keap1 будет приводить к возрастанию доли свободного Nrf2 в цитоплазме, поступлению его в ядро и активации генов, отвечающих за защиту клеток от окислительного стресса [17].

Окислительный стресс можно промоделировать, добавляя к клеткам перекись водорода [19]. В присутствии АФК поступающий в клетку нефлуоресцирующий cDCFH-DA превращается во флуоресцентное производное cDCF [19]. Используя этот реактив, было проведено сравнение способностей МНТ_Г и МНТ_Д защищать клетки AML12 от действия перекиси водорода. Зависимости флуоресценции клеток от времени между добавлением МНТ и измерением флуоресценции представлены на рисунке 4. На каждое изученное время, кроме 1 ч, по критерию Манна–Уитни достоверных различий между флуоресценциями клеток, к которым были добавлены МНТ_Г или МНТ_Д, не наблюдалось. По критерию Краскала–Уоллиса достоверное ($p <$

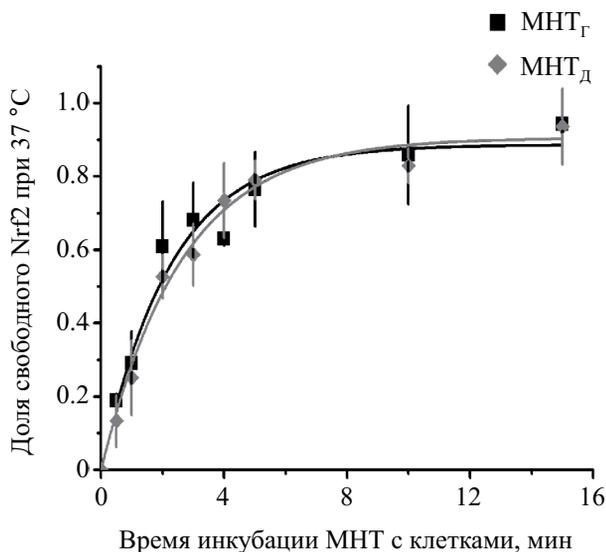


Рис. 3. Зависимость доли свободного Nrf2 при физиологических температурах (37°C) от времени инкубации 500 нМ MNT_G или MNT_D с клетками AML12. Данные представлены как средние значения \pm среднеквадратичное отклонение.

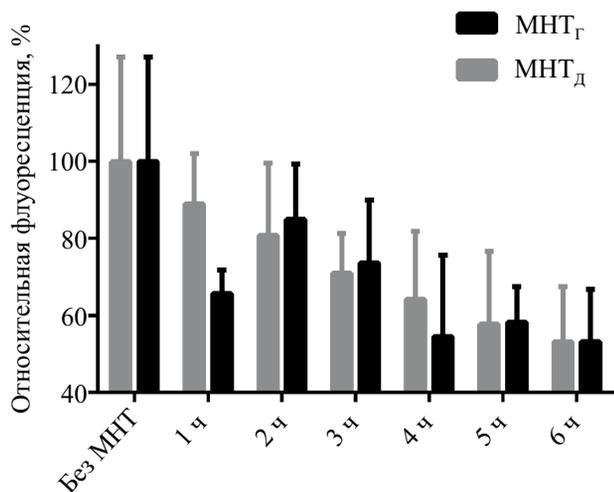


Рис. 4. Эффект предварительной инкубации клеток AML12 с 500 нМ MNT_G или MNT_D в течение 5 минут на флуоресценцию cDCF, вызванную добавлением к клеткам 10 мкМ перекиси водорода в течение 15 минут. Указано время между добавлением MNT и измерением флуоресценции. Данные представлены как средние значения \pm среднеквадратичное отклонение.

0.01) уменьшение флуоресценции cDCF наблюдали начиная с четырех часов между добавлением MNT_G и регистрацией флуоресценции (рис. 4). Таким образом, MNT_G или MNT_D с одинаковой

эффективностью способны защищать клетки-мишени от действия перекиси водорода.

Итак, замена эндосомолитического модуля в MNT с DTокс на GALA3, с одной стороны, вдвое увеличивает время жизни данного MNT в крови, а с другой стороны, не влияет на эффективность поступления MNT в цитозоль клеток-мишеней. Согласно существующим представлениям [20] увеличение времени жизни молекулы в крови будет приводить к большему накоплению этой молекулы в нужном органе или ткани. Таким образом, заменой DTокс на GALA3 в MNT можно достичь улучшения поступления MNT в нужную ткань при системном применении данного MNT. Полученные результаты могут послужить основой для создания средств, направленных на лечение болезней, прямо или косвенно связанных с окислительным стрессом, включая вирусные заболевания, такие как COVID-19.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-14-00170).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены биоэтической комиссией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия (идентификатор одобрения: № 11 от 15 марта 2021 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., et al. // *Acta Mol. Cell Res.* 2018. V. 1865(5). P. 721–733.
2. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2014. V. 39(4). P. 199–218.
3. Yamamoto M., Kensler T.W., Motohashi H. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98(3). P. 1169–1203.

4. Robledinos-Anton N., Fernandez-Gines R., Manda G., et al. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. 9372182.
5. Ngo V., Duennwald M.L. // *Antioxidants.* (Basel). 2022. V. 11(12).
6. Taguchi K., Kensler T.W. // *Arch. Pharm. Res.* 2020. V. 43(3). P. 337–349.
7. Patra U., Mukhopadhyay U., Sarkar R., et al. // *Antivir. Res.* 2019. V. 161. P. 53–62.
8. Oलगниєr D., Farahani E., Thyrsled J., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. 4938.
9. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., et al. // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. 2687.
10. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. V. 478. P. 55–57.
11. Aloia T.A., Fahy B.N. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2010. V. 10. P. 521–527.
12. Nikitin N.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., et al. // *Nat. Biomed. Eng.* 2020. V. 4(7). P. 717–731.
13. An Q., Lei Y., Jia N., et al. // *Biomol. Eng.* 2007. V. 24. P. 643–649.
14. Pfister D., Morbidelli M. // *J. Contr. Release.* 2014. V. 180. P. 134–149.
15. Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2014. V. 79(9). P. 928–946.
16. Li C., Cao X.W., Zhao J., et al. // *J. Membr. Biol.* 2020. V. 253(2). P. 139–152.
17. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., et al. // *Pharmaceutics.* 2024. V. 16. 1345.
18. Khrantsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., et al. // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. 324.
19. Murphy M.P., Bayir H., Belousov V., et al. // *Nat. Metab.* 2022. V. 4(6). P. 651–662.
20. Thurber G.M., Dane W.K. // *J. Theor. Biol.* 2012. V. 314. P. 57–68.

GALA3-CONTAINING MODULAR NANOTRANSPORTERS ARE CAPABLE OF DELIVERING KEAP1 MONOBODY TO TARGET CELLS AND INHIBITING THE FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE CELLS

Y. V. Khrantsov¹, E. S. Bunin¹, A. V. Ulasov¹, T. N. Lupanova¹,

Corresponding Member of the RAS G. P. Georgiev¹, Academician of the RAS A. S. Sobolev^{1, 2, *}

¹*Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

*e-mail: alsobolev@yandex.ru

In the previously created modular nanotransporter (MNT) capable of delivering a monobody to Keap1 into the cytosol, the translocation domain of diphtheria toxin (DTox) was replaced by the endosomolytic peptide GALA3. It was found that this substitution more than doubles the lifetime of MNT in the blood. Using confocal microscopy, it was shown that MNT with GALA3 was internalized into AML12 cells mainly due to binding to the epidermal growth factor receptor, and is also able to exit from endosomes into the cytosol. Using cellular thermal shift assay, it was shown that MNT with GALA3 and MNT with DTox are equally effective in disrupting the formation of the Nrf2 complex with Keap1, which led to similar protection of AML12 cells from the action of hydrogen peroxide. The obtained results allow not only to optimize the systemic use of MNT, but can also serve as a basis for creating agents aimed at treating diseases associated with oxidative stress.

Keywords: modular nanotransporters, GALA3, diphtheria toxin translocation domain, blood lifetime, confocal microscopy, flow cytometry, cellular thermal shift assay