



УДК 577.112;577.336

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ ЛИНКЕРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ СТРУКТУР С ИЗБИРАТЕЛЬНЫМ рН-ЗАВИСИМЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ С РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ¹

© 2024 г. А. Ю. Фролова*, #, А. А. Пахомов*, С. М. Деев*, В. И. Мартынов*

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принята к публикации 31.12.2023 г.

Большинство современных методов терапии рака неспецифичны и оказывают побочное вредное воздействие на организм. В настоящее время разрабатываются методы нацеленной терапии рака, в частности с применением адресных пептидов, избирательно связывающихся с раковыми клетками. Цель настоящей работы – изучение перспектив применения пептида рНЛIP, связывающегося с раковыми клетками при пониженном рН, в составе рекомбинантных белково-пептидных конструкций для диагностики и адресной терапии рака. Получены гибридные структуры на основе флуоресцентного белка EGFP и линкерной последовательности, соединяющей флуоресцентный белок с двумя различными вариантами рНЛIP. Изучено влияние различных линкеров на рН-зависимое связывание конструкций с клетками, а также на эффективность синтеза хромофора EGFP в составе гибридной конструкции.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, EGFP, рНЛIP, адресная терапия рака, ацидоз, тераностика

DOI: 10.31857/S0132342324040113, **EDN:** MWPLFG

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при лечении онкологических заболеваний применяются методы лучевой, радиоизотопной, гормональной, иммуно- и химиотерапии. Специфичность этих методов оставляет желать лучшего, и в большинстве случаев их применение оказывает вредное побочное воздействие на весь организм человека. В связи с этим в современной прецизионной медицине делается акцент на препараты, обладающие нацеленным действием на пораженные ткани, в частности пред-

принимаются попытки создания таких адресных препаратов на основе антител и других лигандов к определенным антигенам или рецепторам, гиперэкспрессирующимся на поверхности некоторых раковых клеток. Однако нестабильная экспрессия этих маркеров существенно затрудняет применение данного метода. Также при использовании этих средств часто возникает резистентность за счет клональной селекции, которая затрудняет терапию. Кроме того, обычные клетки экспрессируют те же онкомаркерные белки, что приводит к побочным

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324040113 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ФБ – флуоресцентный белок; EGFP – улучшенный вариант зеленого флуоресцентного белка из *Aequorea victoria*; рНЛIP – пептидный фрагмент бактериородопсина, проявляющий рН-зависимое связывание с мембранными структурами (рН Low Insertion Peptide); рНЛIPwt – природный пептид рНЛIP; рНЛIPvar3 – мутантный укороченный вариант рНЛIP.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-51-11; эл. почта: anastasiya_frolova_box@mail.ru).

эффектам при терапии с помощью антител и других адресных лигандов.

Другой, более универсальный подход основан на различиях в физико-химических свойствах нормальных и опухолевых клеток. Известно, что процесс опухолеобразования может сопровождаться понижением pH во внеклеточном пространстве (pH 6.0–6.7). Недавние исследования [1, 2], в том числе проведенные в нашей лаборатории [3], показали, что один из трансмембранных пептидных фрагментов белка бактериородопсина (pHLIP) демонстрирует pH-зависимое связывание с плазматической мембраной клетки. При значениях pH 7.2–7.4 он преимущественно находится в водной фазе, однако при pH < 7.0 наблюдается встраивание пептида в мембрану. При этом показано, что pHLIP обладает способностью переносить различные низкомолекулярные соединения (< 7 кДа) через мембрану живой клетки в цитоплазму [2]. Для получения таких конструкций обычно используется твердофазный синтез пептида, затем низкомолекулярные соединения конъюгируют с pHLIP химическими методами [4]. Однако способность pHLIP доставлять более высокомолекулярные соединения, в том числе белки, к настоящему времени изучена не столь подробно [5–8].

Ранее нами были получены модельные конструкции в виде конъюгатов пептида pHLIP с белками [3]. Они представляли собой гибридные структуры на основе флуоресцентного белка (ФБ) EGFP и линкерной последовательности, соединяющей ФБ с двумя различными вариантами пептида: с пептидом дикого типа (pHLIPwt) и его укороченным мутантным вариантом Var3 (pHLIPvar3) [9]. Нами было продемонстрировано эффективное pH-зависимое связывание этих конструкций с клетками.

В настоящей работе получены конструкции, несущие те же функциональные части, но другую линкерную последовательность между доменами, и продемонстрировано влияние различных линкеров на функциональные свойства этих конструкций, в том числе на pH-зависимое связывание с раковыми клетками и на эффективность синтеза хромофора ФБ в составе белково-пептидной конструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и наработка конструкций EGFP/pHLIP. Для более подробного изучения возможности применения pHLIP-технологии для доставки к раковым клеткам высокомолекулярных соединений были получены гибридные конструкции, состоящие из пептидов pHLIP и белкового компонента. Последний был представлен флуоресцентным белком EGFP, выполняющим роль как модельного груза, переносимого при помощи pHLIP, так и флуоресцентной метки, обладающей высокой яркостью (рис. 1). В качестве pH-чувствительной составляющей были выбраны два варианта пептида: природный pHLIPwt и его укороченный мутантный вариант pHLIPvar3. В предыдущей работе [3] конструкции содержали короткий пептидный линкер –GS–, соединяющий белковую часть в виде EGFP с пептидом pHLIP. В настоящей работе в качестве линкера мы использовали удлиненную последовательность аминокислот –IEGRCGS–, которая, с одной стороны, содержит заряженные группы, способствующие большей растворимости в водной среде, а с другой стороны, за счет скомпенсированности в целом заряжены нейтрально. Согласно литературным данным, встраивание pH-чувствительных пептидов происходит с транслокацией их C-конца через

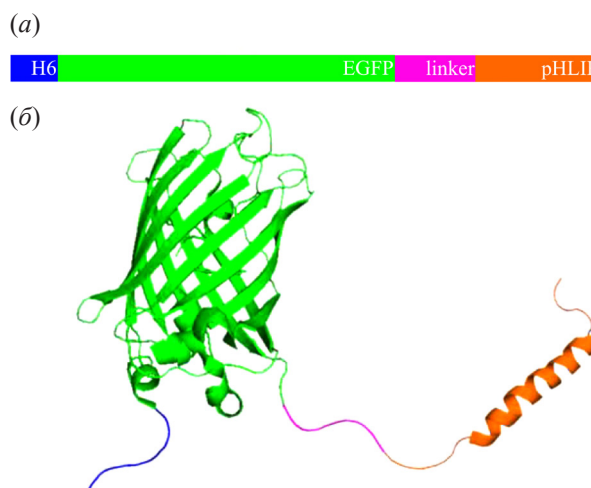


Рис. 1. Упрощенная схема (а) и пространственная модель (б) гибридных конструкций. Гексагистициновая метка обозначена синим цветом, флуоресцентный белок – зеленым, линкер (linker) – лиловым, pHLIP – оранжевым.

мембрану клетки [1], поэтому все гибридные конструкции содержали гексагистициновую метку на своем N-конце. Нарботку полученных конструкций и контрольного EGFP проводили одновременно в бактериальных клетках *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3). Выделение белково-пептидных конструкций выполняли при помощи металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Их чистоту и целостность подтверждали при помощи SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ (рис. S2 в дополнительных материалах).

Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка в конструкциях EGFP/pHLIP. Известно, что синтез хромофора ФБ происходит автокаталитически в присутствии кислорода в качестве окислителя. Один из ключевых факторов эффективности автокатализа – правильная упаковка белка [10]. В этом ключе ФБ – хороший модельный объект для демонстрации возможного влияния pHLIP и линкеров на функциональную активность белка в составе гибридной конструкции.

Мы изучили влияние пептидов pHLIP на синтез хромофора EGFP в составе гибридных структур. Для этого регистрировали спектры поглощения каждой конструкции (рис. 2) и определяли общую концентрацию белково-пептидных конструкций при 280 нм и концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором по поглощению при 488 нм. Степень созревания хромофора определяли отношением значений концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором к общей концентрации. В контрольном белке EGFP степень созревания хромофора составила ~77% (табл. 1). В случае белково-пептидных конструкций, содержащих GS-линкер, хромофор синтези-

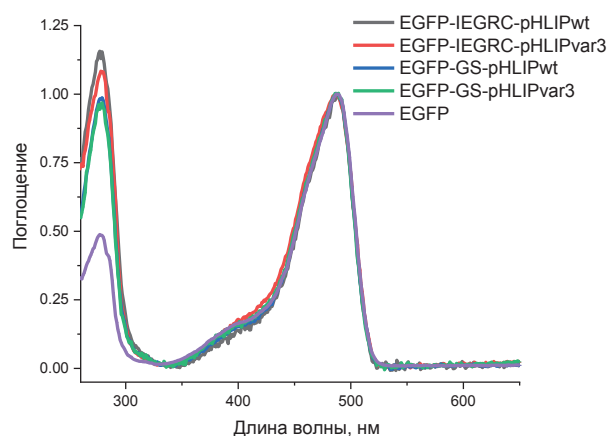


Рис. 2. Нормализованные спектры поглощения конструкций EGFP/pHLIP и EGFP.

ровался примерно на 20% хуже относительно контроля, а в конструкциях с линкером IEGRCGS – примерно на 30%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид pHLIP в составе пептидно-белковых конструкций может влиять на эффективность синтеза хромофора ФБ, причем степень влияния зависит и от природы линкера. Нарушение процесса синтеза хромофора ФБ может быть вызвано как нарушением упаковки белка, так и аллостерическими эффектами.

pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIP с клетками HeLa согласно данным проточной цитофлуориметрии. Для анализа связывания полученных гибридных конструкций с раковыми клетками HeLa при понижении pH использовали метод проточной цитофлуориметрии. Был протестирован диапазон значений pH 5.6–7.4 с шагом 0.2 единицы. В качестве контроля неспецифического связывания использовали свободный EGFP.

Таблица 1. Свойства конструкций EGFP/pHLIP и EGFP

№	Конструкция	ϵ_{280} , М ⁻¹ см ⁻¹	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно EGFP, %	Молекулярный вес, Да
1	EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt	34 380	55	71	32 122
2	EGFP-IEGRCGS-pHLIPvar3	32 890	55	71	31 232
3	EGFP-GS-pHLIPwt	34 380	64	83	31 564
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	32 890	63	81	30 674
5	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429

При нейтральных значениях pH клетки, обработанные EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, сопоставимым с контрольными клетками, обработанными EGFP. Однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$ (рис. 3, табл. 2), при этом связывание конструкции, содержащей линкер IEGRCSG, было в несколько раз эффективнее. Аналогичный результат наблюдался при сравнительном тестировании конструкций EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 и EGFP-GS-pHLIPvar3. В конструкциях, содержащих IEGRCSG-линкер, интенсивность флуоресцентного сигнала клеток оказалась выше. Это свидетельствует об однозначном увеличении эффективности связывания при замене GS-линкера на IEGRCSG в гибридных конструкциях (табл. 2).

Стоит также отметить, что pH-зависимое связывание EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 с раковыми клетками характеризовалось двумя pK_a (наблюдалось два перегиба, табл. 2), при этом основное связывание происходит с $\text{pK}_a \sim 5.9$. Это свидетельствует о возникновении дополнительных pH-зависимых перестроек в этой конструкции, которые стали возможны при введении последовательности IEGRCSG в линкер. Однако несмотря на то, что эффективность связывания конструкции с pHLIPvar3 выросла, она все же остается ниже, чем у EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

Ранее сообщалось, что при доставке низкомолекулярных красителей pHLIPvar3 обладал улучшенными по сравнению с pHLIPwt показателями накопления в опухолях [9]. Однако при тестировании этих пептидов в виде конъюгатов с белковым компонентом *in vitro* наблюдалась обратная ситуа-

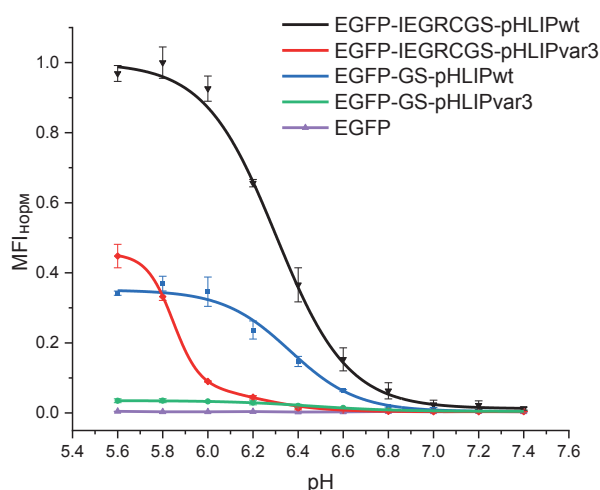


Рис. 3. pH-зависимое связывание с клетками HeLa конструкций EGFP/pHLIPwt и EGFP/pHLIPvar3 с линкерами GS и IEGRCSG при различных значениях pH. Значения медиан интенсивности флуоресценции (MFI) нормированы относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt (наиболее эффективно связывающейся конструкции) с поправкой на степень созревания хромофора.

ция: конструкции с pHLIPwt демонстрировали более эффективное связывание при понижении pH в сравнении с pHLIPvar3 при использовании одного и того же линкера [3]. Полученные в этой работе данные также подтверждают эту закономерность.

pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa по данным флуоресцентной микроскопии. При помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии были протестированы конструкции, которые продемонстрировали наиболее эффективное pH-зависимое связывание и оптимальные pK_a в цитофлуориметрическом исследовании – EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt. Эти конструкции инкубиро-

Таблица 2. Эффективность pH-зависимого связывания белково-пептидных конструкций с клетками HeLa

№	Конструкция	pK_a	Относительное количество белка, связавшегося с клетками*
1	EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt	6.30 ± 0.01	1
2	EGFP-GS-pHLIPwt	6.36 ± 0.03	0.35
3	EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3	6.22 ± 0.33 , 5.85 ± 0.03	0.46
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	6.46 ± 0.02	0.035

* Количество белка, связавшегося с клетками, оценивали по значению F_a – кислотной базовой линии (см. раздел “Эксперим. часть”) относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

вали с клетками HeLa при pH 6.2 и 7.4, проводили отмывку при помощи PBS, фиксировали клетки 4%-ным раствором формалина и окрашивали ядра меткой Hoechst 33342.

Согласно полученным данным, обе конструкции связывались с мембранами клеток при pH 6.2, однако уровень зеленого флуоресцентного сигнала был выше в случае обработки клеток EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt (рис. 4). При pH 7.4 ни одна из рекомбинантных конструкций не связывалась с мембранами клеток. На контрольных клетках, обработанных EGFP аналогичным образом при pH 6.2 и 7.4, в обоих случаях не наблюдалось свя-

зывания (рис. S3 в дополнительных материалах). Эти результаты подтверждают данные по pH-зависимому связыванию конструкций, полученные методом проточной цитофлуориметрии.

Следует отдельно отметить, что согласно литературным данным, все полученные ранее конструкции pHLIP с низкомолекулярными соединениями, липосомами и с наночастицами обладали также побочным неспецифическим связыванием с мембранами клеток при физиологических значениях pH [9, 10]. Однако полученные нами гибридные белково-пептидные конструкции как в данной работе, так и в более ранних исследова-

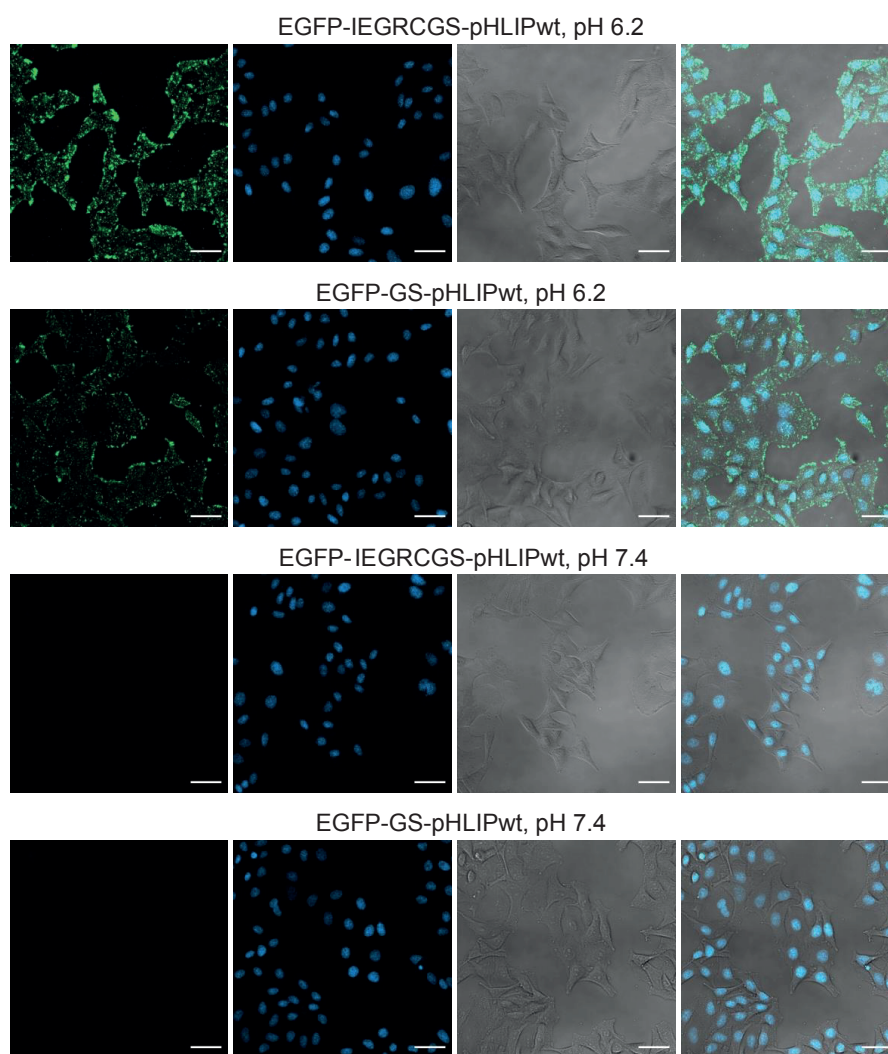


Рис. 4. pH-зависимое связывание EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Слева направо: изображения в зеленом (EGFP, возбуждение 488 нм, излучение 500–550 нм) и синем (Hoechst 33258, возбуждение 405 нм, излучение 420–470 нм) каналах флуоресценции, проходящем свете и их наложение. Масштабный отрезок 20 мкм.

ниях [3, 8] демонстрировали селективное рН-зависимое связывание и практически полное отсутствие взаимодействия с мембраной клеток при нейтральных значениях рН. По-видимому, это обусловлено присутствием гидрофильного ФБ, который обеспечивает высокую водорастворимость полученных конструкций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн и синтез рекомбинантных гибридных конструкций EGFP-рНLIP. Были получены гены, кодирующие последовательность зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и пептидов рНLIP в одной рамке считывания. Для этого использовали полимеразную цепную реакцию с геном EGFP в качестве матрицы и серией прямых и обратных праймеров, кодирующих дополнительные последовательности на 3'-концах. кДНК клонировали по сайтам BamHI и HindIII модифицированного вектора экспрессии рЕТ-24а, несущего между сайтами NdeI и BamHI гексагистидиновую последовательность. Последовательности кДНК для всех полученных генов были проверены путем секвенирования. Полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности гибридных конструкций EGFP-IEGRCGS-рНLIPwt и EGFP-IEGRCGS-рНLIPvar3 представлены на рис. S1 в дополнительных материалах.

Наработка белков в *E. coli* и их выделение. Для получения гибридных белково-пептидных конструкций в достаточных количествах клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой рЕТ-24, содержащей интересующий ген, и выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением канамицина (25 мг/мл) при 37°C при перемешивании со скоростью 250 об/мин до достижения оптической плотности 0.6–0.8 при 600 нм. После этого добавляли IPTG (0.4 мМ) и выращивали клетки в течение 4 ч при 37°C, а затем дополнительно инкубировали в течение ночи при 18°C. Затем суспензию клеток осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин при 4°C. Полученные осадки хранили при –20°C. Для выделения целевых конструкций клетки размораживали, ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, рН 8.0) и затем разрушали при помощи

ультразвукового дезинтегратора Sonopulse HD 3100 (Bandeline, Германия). Клеточный лизат осаждали центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин при 4°C. После этого супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Qiagen, Нидерланды), предварительно уравновешенной промывочным буфером. После нанесения колонку промывали 5-кратным объемом промывочного буфера и элюировали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, рН 8.0. Выделенные конструкции переводили в PBS с использованием гель-фильтрационных колонок Micro Bio-Spin™ 6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), заполненных Bio-Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Чистоту и целостность гибридных конструкций подтверждали при помощи SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ, выполненного по стандартному протоколу.

Определение концентрации гибридных конструкций при помощи спектрофотометрии. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США). Общие концентрации гибридных конструкций определяли по поглощению при 280 нм, а концентрации конструкций со зрелым хромофором – при 488 нм. Расчеты коэффициентов экстинкции при 280 нм (табл. 1) проводили на основе аминокислотной последовательности при помощи программного обеспечения SnapGene (GSL Biotech LLC, США). Коэффициент экстинкции EGFP со зрелым хромофором при 488 нм принимали равным $55\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [11].

Культивирование клеток. Клетки карциномы шейки матки человека HeLa выращивали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., США) до 10%, L-глутамина до 2 мМ (ПанЭко, Россия), 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Клетки культивировали во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO₂. Среду обновляли каждые 2–3 дня.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки HeLa выращивали в культуральных флаконах T-25 до конфлюэнтности ~90% (~2 млн клеток на флакон). Затем среду удаляли, добавляли 1 мл раствора

Версена и инкубировали клетки при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. После 10 мин инкубации клетки ресуспендировали до получения гомогенной суспензии и центрифугировали 3 мин при 125 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 600 мкл PBS с добавлением FBS до 10%. Образцы для исследования готовили при помощи смешивания 3 мкл полученной клеточной суспензии с 97 мкл буферного раствора желаемого pH (диапазон значений pH 5.6–7.4 с шагом 0.2 единицы), содержащего 50 mM фосфата, 100 mM NaCl, 10% FBS и гибридный или контрольный белок в концентрации 1 мкМ. Полученную смесь инкубировали 15 мин при 37°C, затем клетки осаждали центрифугированием 30 с при 1000 g, супернатант удаляли, добавляли 100 мкл PBS и проводили анализ методом проточной цитофлуориметрии с использованием Novocyte 3000 VYB (ACEA Biosciences, США). Обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения NovoExpress 1.3 (ACEA Biosciences Inc., США). Количество клеток было подобрано так, что после тестирования образца получалось ~20 000 событий. Сначала отбирали события по параметрам FSC-A/SSC-A, а затем по FSC-A/FSC-H, получали гистограммы интенсивности флуоресценции клеток. Для регистрации флуоресценции использовали канал BL1 (лазер возбуждения 488 нм, эмиссионный фильтр 530/30 нм). Для оценки эффективности связывания гибридных белково-пептидных конструкций с клетками использовали отношение значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI) к эффективности созревания хромофора EGFP. Для каждой белково-пептидной конструкции анализ проводили в трех повторах. Полученные зависимости MFI от pH аппроксимировали с помощью программы Origin 2021 (OriginLab, США) функцией

$$(F_b + F_a \times 10^{m(pK_a - pH)}) / (1 + 10^{m(pK_a - pH)}) \quad (1)$$

или

$$F_b + (F_a - F_b) [p / (1 + 10^{m1(pK_{a1} - pH)}) + (1 - p) / (1 + 10^{m2(pK_{a2} - pH)})], \quad (2)$$

где F_a – кислотная базовая линия, F_b – щелочная базовая линия, p – вклад компоненты с большим влиянием, m – наклон перехода, pK_a – середина кривой.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки HeLa высевали в 96-луночный планшет в количестве 10⁴ клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды и выращивали в течение ночи. Затем среду удаляли и добавляли EGFP/pHLIPwt или EGFP в концентрации 2 мкМ в 100 мкл фосфатного буфера с pH 6.2 или 7.4 (50 mM фосфата, 100 mM NaCl и 10% FBS). Клетки инкубировали при 37°C в течение 15 мин, дважды промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в PBS в течение 10 мин. Затем клетки снова промывали PBS и перед микроскопией добавляли флуоресцентную метку Hoechst 33258 (Lumiprobe, Россия) до концентрации 20 нМ для окрашивания ядер. Визуализацию осуществляли при помощи конфокальной системы Zeiss LSM 980 (ZEISS Microscopy, Германия) с использованием объектива 10×. Все изображения были получены при одинаковых условиях съемки и обработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере белково-пептидных конструкций, состоящих из EGFP и двух вариантов pH-чувствительного пептида (pHLIPwt и pHLIPvar3), было показано влияние линкерной последовательности на функциональные свойства этих конструкций. Полученные конструкции содержали два вида линкеров: IEGRCGS (EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt и EGFP-IEGRCGS-pHLIPvar3) и GS (EGFP-GS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPvar3), который был использован в нашей предыдущей работе [3]. Было установлено, что конструкции с линкером IEGRCGS более эффективно pH-зависимо связываются с клетками HeLa. Также было показано, что слияние EGFP с пептидами pHLIP в некоторой мере влияет на созревание хромофора этого ФБ. Кроме того, было продемонстрировано, что белково-пептидные конструкции, несущие pHLIPwt, более эффективно связываются с мембранами клеток при понижении pH, по сравнению с аналогичными конструкциями с pHLIPvar3.

Таким образом, в данной работе показано, что получение pH-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов pHLIP с сохранением их первоначальных функциональных свойств – нетривиальная задача, поскольку на эффективность pH-зависимого связывания может влиять тип

используемого линкера. Кроме того, в результате получения таких белково-пептидных конструкций могут нарушаться функциональные свойства белковой компоненты, о чем свидетельствует изменение эффективности синтеза хромофора ФБ.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00036).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reshetnyak Y.K., Andreev O.A., Lehnert U., Engelman D.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 6460–6465.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601463103>
2. *Svoronos A.A., Bahal R., Pereira M.C. Barrera F.N., Deacon J.C., Bosenberg M., DiMaio D., Glazer P.M., Engelman D.M.* // Mol. Pharm. 2020. V. 17. P. 461–471.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00883>
3. *Frolova A.Yu., Pakhomov A.A., Kakuev D.L., Sungurova A.S., Deyev S.M., Martynov V.I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2022. V. 612. P. 141–146.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.112>
4. *Adochite R.-C., Moshnikova A., Golijanin J., Andreev O.A., Katenka N.V., Reshetnyak Y.K.* // Mol. Imaging Biol. 2016. V. 18. P. 686–696.
<https://doi.org/10.1007/s11307-016-0949-6>
5. *Reshetnyak Y.K., Moshnikova A., Andreev O.A., Engelman D.M.* // Front Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 335.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00335>
6. *Dharmaratne N.U., Kaplan A.R., Glazer P.M.* // Cells. 2021. V. 10. P. 10030541.
<https://doi.org/10.3390/cells10030541>
7. *Liu Y.-C., Wang Z.-X., Pan J.-Y., Wang L.-Q., Dai X.-Y., Wu K.-F., Ye X.-W., Xu X.-L.* // Molecules. 2023. V. 28. P. 2175.
<https://doi.org/10.3390/molecules28052175>
8. *Frolova A.Yu., Pakhomov A.A., Kakuev D.L., Sungurova A.S., Dremina A.A., Mamontova E.D., Deyev S.M., Martynov V.I.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2023. V. 249. P. 112803.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2023.112803>
9. *Weerakkody D., Moshnikova A., Thakur M.S., Moshnikova V., Daniels J., Engelman D.M., Andreev O.A., Reshetnyak Y.K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 5834–5839.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1303708110>
10. *Pakhomov A.A., Frolova A.Yu., Tabakmakher V.M., Chugunov A.O., Efremov R.G., Martynov V.I.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2020. V. 206. P. 111853.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111853>
11. *McRae S.R., Brown C.L., Bushell G.L.* // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.12.030>

The Influence of Peptide Linkers on Functional Properties of Hybrid Structures with the Selective pH-Dependent Binding to Cancer Cells

A. Yu. Frolova*^{*,#}, A. A. Pakhomov*, S. M. Deyev*, and V. I. Martynov*

[#] Phone: +7 (495) 336-51-11; e-mail: anastasiya_frolova_box@mail.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Most of the modern cancer therapies are non-specific and have adverse side effects on the body. Nowadays, targeted cancer therapies are being developed, in particular using targeting peptides that selectively bind to cancer cells. The aim of the present work is to explore the prospects of using a peptide pHLIP that binds to cancer cells at decreased pH values, as a part of recombinant protein-peptide construct for cancer diagnosis and targeted therapy. Hybrid structures based on the fluorescent protein EGFP and a linker sequence connecting fluorescent protein to two different pHLIP variants were obtained. The effect of different linkers on the pH-dependent binding of the constructs to cells, as well as on the efficiency of EGFP chromophore synthesis within the hybrid construct was investigated.

Keywords: fluorescent protein, EGFP, pHLIP, targeted cancer therapy, acidosis, theranostics