

Noi structuri peptidice cu potențiale aplicații în terapia țintită și diagnosticul timpuriu în cancer

THERHOME

Raport științific Etapa 1: Noi structuri peptidice cu proprietăți penetrante și de selecție îmbunătățite și evaluarea proprietăților penetrante ale noilor peptide

În cadrul acestei etape a fost efectuat un studiu de selecție și design ale unor noi structuri peptidice ce pot recunoaște receptori ai celulelor canceroase și s-au evaluat proprietățile penetrante ale acestora în membrane lipidice biomimetice.

A1. Selecția peptidelor *homing* cu specificitate pentru receptori ai celulelor canceroase și construcția noilor molecule peptidice cu structuri penetrante sau antimicrobiene.

Cancerul reprezintă una dintre bolile cu impact semnificativ asupra sănătății, fiind a doua cauză de deces după afecțiunile cardiovasculare. Deși rata de supraviețuire depinde de mai mulți factori, precum tipul de cancer, alegerea tratamentului sau alte boli asociate, apariția metastazelor reprezintă principala cauză de eșec a tratamentului în cancer. Prin urmare, dezvoltarea unor terapii care să acționeze ținut, cu efecte secundare minime, care să identifice celulele tumorale stadii incipiente ale metastazelor reprezintă o condiție esențială pentru progresul medicinei, succesul tratamentului și rate de supraviețuire mai bune.

Peptidele de tip *homing* (HPs) sunt secvențe de aminoacizi care au proprietatea de a recunoaște și lega receptori specifici celulelor normale sau canceroase. În prezent, aceste peptide reprezintă una dintre cele mai convenabile molecule a fi folosite în terapia țintită, întrucât au câteva proprietăți speciale: sunt de dimensiuni mici, sunt stabile, cu imunogenitate scăzută, sinteză și modificare chimică ușoare. Un medicament, pentru a fi eficient, este nevoie, alături de atingerea celulei țintă, să penetreze membrane celulară și să fie eliberat din endozomi în cazul în care intralizarea s-a făcut prin endocitoză. **Peptidele penetrante (CPPs)** sunt secvențe de aminoacizi care au proprietatea de a depăși bariera hidrofobă a membranelor celulare și de a

funcționa ca vectori pentru diverse molecule: indicatori fluorescenți, medicamente, secvențe de ADN, proteine, nanoparticule magnetice sau lipozomi. **Peptidele antimicrobiene (AMPs)** fac parte din sistemul imunitar innascut al organismelor vii, inclusiv al oamenilor, și au rolul de a acționa împotriva agenților patogeni precum bacterii, virusuri sau fungi. Aceste peptide reprezintă alternative de tratament pentru tulpinile rezistente la antibioticele clasice iar unele AMP prezintă chiar activitate anticancer.

Peptidele selectate pentru acest studiu sunt următoarele:

HIV1-TAT (YGRKKRRQRRR) este o **peptidă penetrantă**, izolată așa cum îi spune și numele, din proteina HIV1-TAT (trans-acting activator of transcription) derivată din virusul imunodeficienței umane. O altă peptidă este NKCS (KILRGVSKKIMRTFLRRISKDILTGK), o **peptidă antimicrobiană** derivată din peptida NK-2, izolată din intestinul porcinelor. Aceasta este o peptidă eficientă împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative dar și cu efect asupra unor afecțiuni canceroase de tipul limfom, cancer colorectal, leucemie, neuroblastom¹. NKCS-[15-27] (LRRISKDILTGKK) este o **nouă peptidă antimicrobiană** folosită în studiu și corespunde regiunii 15-27 de la capătul terminal C. Ca **peptidă homing** am ales **RGD** (Arg-Gly-Asp) care recunoaște și leagă receptorii integrină $\alpha_v\beta_3$ și $\alpha_v\beta_5$ supraexpresați în celulele tumorale. Peptida **RGD-TAT** (GRGDSPKYGRKKRRQRRR) este o **structură nouă**, o moleculă chimeră a peptidei *homing* RGD și a peptidei penetrante HIV1-TAT. **Proprietățile fizico-chimice ale peptidelor** (Tabelul 1) au fost verificate folosind ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) și PepCalc (<https://pepcalc.com/>) pentru determinarea masei moleculare, a sarcinii nete la pH 7.0 și a valorii punctului izoelectric, PI. Activitatea hemolitică din punct de vedere teoretic a fost calculată folosind HemoPI (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hemopi/design.php>), valoarea 1 indicând maximul iar 0 minimul activității litice. Gradul de toxicitate al celor patru peptide a fost estimat folosind ToxinPred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/algos.php>).

Tabel 1: Proprietățile fizico-chimice ale peptidelor

Peptida	Masa moleculară	Sarcina netă la pH 7	PI	Solubilitate în apă	Activitate hemolitică	Toxicitate
TAT	1559.85	+8	12.41	solubil	0.48	nu
NKCS	3058.81	+8	12.17	solubil	0.71	nu
NKCS-[15-27]	1527.87	+4	11.50	solubil	0.59	nu
RGD-TAT	2257.57	+9	12.25	solubil	0.48	nu

¹ Karmakar S, Maity P, Halder A. Charge-Driven Interaction of Antimicrobial Peptide NK-2 with Phospholipid Membranes. ACS Omega. 2017 Dec 31;2(12):8859-8867. doi: 10.1021/acsomega.7b01222.

A2. Sinteza și marcarea fluorescentă a noilor peptide cu fluorofori adecvați

Atât **sinteza** cât și **marcarea fluorescentă** a peptidelor au fost realizate de firma Biosyntan (Berlin, Germany). Marcarea fluorescentă s-a efectuat la capătul C terminal printr-o cisteină adăugată suplimentar cu indicatorul fluorescent Dy647P1 (Dyomics, spectrul de absorbție/emisie în Figura 1) sub formă de maleimidă. Peptidele au fost sintetizate printr-o metodă de sinteze multiple simultane, folosind strategia Fmoc/But pe un instrument SYRO, MultiSynTech GmbH, Germany². Caracterizarea și puritatea peptidelor, $\geq 95\%$, au fost verificate de producător prin spectrometrie de masă MALDI-TOF cu un instrument MALDI Axima Assurance, Shimadzu (Japan) și analiză HPLC cu un instrument Shimadzu LC-8A cu detector SPD-10A. Peptida TAT marcată fluorescent cu TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine) a fost sintetizată și marcată fluorescent de Eurogentec, Belgia.

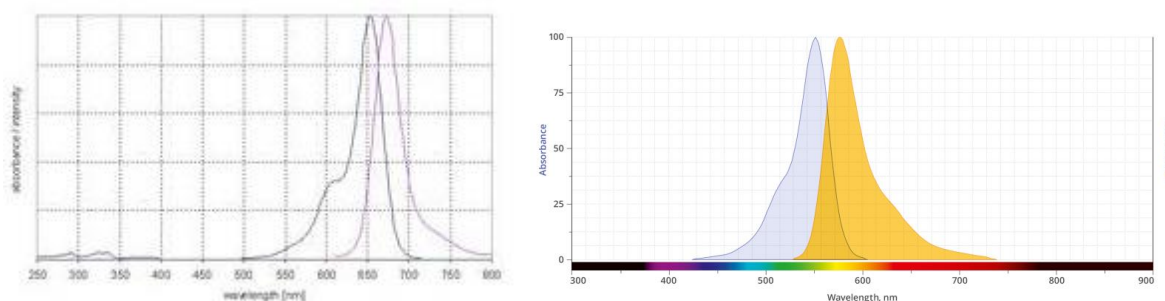


Figura 1: Spectrele de absorbție și emisie ale Dy647P1 (Absorption/emission max: 653 nm / 672 nm) și TAMRA (Absorption/emission max: 552 nm / 578 nm)

A3. Prepararea membranelor model care mimează membranele celulelor normale, canceroase și a endozomilor.

Ca sistem biomimetic pentru membrana celulară a celulelor normale, canceroase și a endozomilor, am folosit veziculele unilamelare gigant (GUVs) întrucât dimensiunile lor ($\geq 5 \mu\text{m}$) permit observarea microscopică. Lipidele utilizate pentru a genera GUV-uri au fost alese în funcție de compoziția membranei celulare. Lipidele folosite au fost: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolină (POPC) (pentru a mima membrana neutră a celulelor eucariote), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamină (POPE) și 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-

²Chan, W.C.; White, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach; Oxford University Press: Oxford, UK, 2000

fosfoserină (POPS), pentru a mima membrana celulelor canceroase, și colesterol. GUV-urile au fost pregătite prin metoda electroformării descrisă de Angelova et al.³.

Compoziția lipidică a membranelor diferă în funcție de linia celulară, de organele celulare și din acest motiv este necesară alegerea cât mai fidelă a componentelor pentru a mima diverse tipuri de membrane. Fosfatidilcolina (PC) este o fosfolipidă care se găsește în membranele celulelor eucariote, de obicei în stratul extern al membranei. Este o moleculă neutră și în acest studiu a fost folosită pentru a mima membranele celulare normale. Fosfatidiletanolamina (PE) este o altă componentă esențială a membranelor celulare. Este o moleculă zwitterionică, dar spre deosebire de PC care are o structură cilindrică, are o formă conică, cu tendința de a forma structuri lipidice de tipul micelilor inversate. Fosfatidilserina (PS) este o fosfolipidă negativă și se găsește într-o cantitate redusă în celulele normale, de obicei pe stratul intern al membranelor. În schimb, în celulele canceroase, se găsește într-o proporție mai mare în stratul extern. Această fosfolipidă a fost folosită pentru a mima celulele canceroase. Colesterolul (CHOL) este o componentă importantă a membranei, de tipul sterolilor, cu rol în permeabilitatea și stabilitatea celulară. În timp ce în celulele normale colesterolul este vital în menținerea integrității structurale a membranelor și pentru diverse funcții biologice, unele forme de cancer au fost asociate cu cantități ridicate de colesterol prezente în membrane sub formă de insule, faze separate de tip raft (cancer ovarian, de sân, cervical, tiroidian, de prostată sau metastatic)⁴. La concentrații mari de colesterol, fluiditatea membranelor scade și sunt mai puțin permeabile. Endozomii timpurii iau naștere în urma procesului de endocitoză prin invaginări ale membranei plasmactice, prin urmare și compoziția lor lipidică este similară cu a acestora. Maturarea în endozomi tardivi este urmată de o scădere a nivelului de steroli și o creștere a lipidelor încărcate negativ, precum PS. În endozomi, compoziția lipidică se inversează, astfel că lipidele zwitterionice se găsesc în stratul intern și cele negative în stratul extern al membranei. Dacă în celulele normale, pH-ul citoplasmic este în jur de 7, în endozomi variază de la 6.5 pentru endozomii timpurii, la 5.5 pentru endozomii tardivi⁵. De asemenea, în celulele canceroase pH-ul este mai acid decât în celulele normale și are valoarea 6.5.

³Angelova, M.I., Dimitrov, D.S., Liposome electroformation. Faraday Discuss. Chem. Soc. , 1986. 81: p. 303-311

⁴Mayengbam, S.S., et al., *Influence of cholesterol on cancer progression and therapy*. Transl Oncol, 2021. **14**(6): p. 101043

⁵ Scott, C. C., F. Vacca and J. Gruenberg (2014). "Endosome maturation, transport and functions." *Semin Cell Dev Biol***31**: 2-10

A4. Investigarea acumulării și/sau internalizării în membranele model a peptidelor marcate fluorescent.

Investigarea acumulării și/sau internalizării în membranele model a peptidelor marcate fluorescent s-au efectuat cu ajutorul microscopiei de fluorescență, o tehnică de analiză de înaltă precizie. Microscopia confocală de scanare utilizată în studiile noastre, față de microscopia clasică de fluorescență are o serie de avantaje: posibilitatea de a observa proba într-un anumit plan focal de o grosime determinată cu rezoluție superioară, eliminarea informației de deasupra și dedesubtul planului focal pentru o rezoluție superioară, posibilitatea de a înregistra imagini succesive pe axa Z și reconstituirea lor în imagini 3D. Microscopul confocal inversat Nikon Ti-E a fost utilizat pentru a urmări interacțiunea peptidelor cu sistemele lipidice biomimetice de tipul lipozomilor gigant (GUVs).

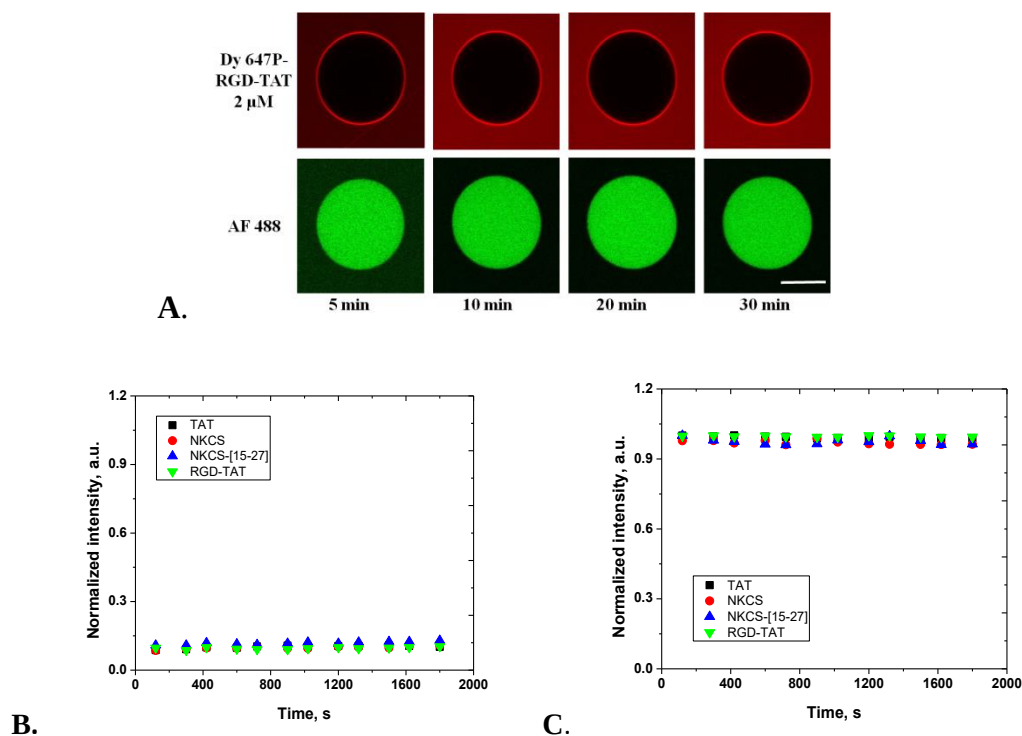


Figura 3: Interacțiunea peptidelor cu GUVs neutre (POPC/CHOL 80/20 mol%). Internalizarea peptidelor RGD-TAT (A). Graficele arată că internalizarea peptidei RGD-TAT (B) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (C) nu se realizează în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μ m.

Rezultatele experimentale obținute au arătat că peptidele, distribuite uniform în mediul de analiză, se acumulează pe membrane, le penetrează și formează pori în funcție de structura acestora sau componența lipidică a membranelor. Experimentele inițiale au vizat studiul proprietăților penetrante ale peptidelor în membrane care mimează celulele normale, la pH 7.5. În **membrane neutre** compuse din **POPC și colesterol**, cele patru peptide nu s-au internalizat iar în cazul peptidelor TAT și RGD-TAT s-a observat și o ușoară acumulare pe membrane (Figura 3).

În membranele care conțin **POPE** în schimb, am observat internalizarea celor patru peptide. Eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 a fost observată pentru peptidele TAT, NKCS și RGD-TAT dar nu și pentru NKCS-[15-27], sugerând că doar primele trei peptide pot genera pori în astfel de membrane (Figura 4).

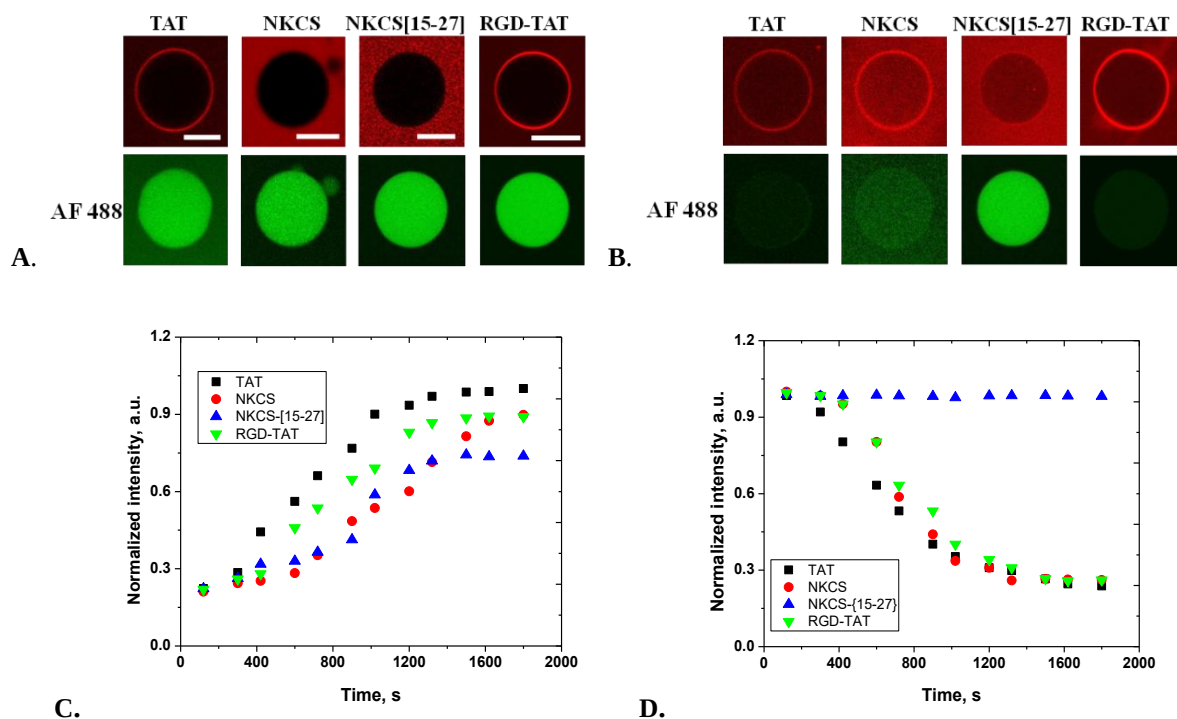


Figura 4: Interacțiunea peptidelor cu liposome neutre (POPC/POPE/CHOL 50/30/20 mol%). Internalizarea peptidelor și eliberarea AF 488 la (A) 5 min și (B) 30 min. Graficele arată internalizarea peptidelor (C) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (D) în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μm.

In GUVs anionice care conțin **POPS** efectele peptidelor asupra membranelor au fost similare cu POPE, dar suplimentar, s-a observat și o acumulare mai puternică a celor patru peptide pe membrane, cel mai probabil datorită interacțiunilor electrostatice (Figura 5).

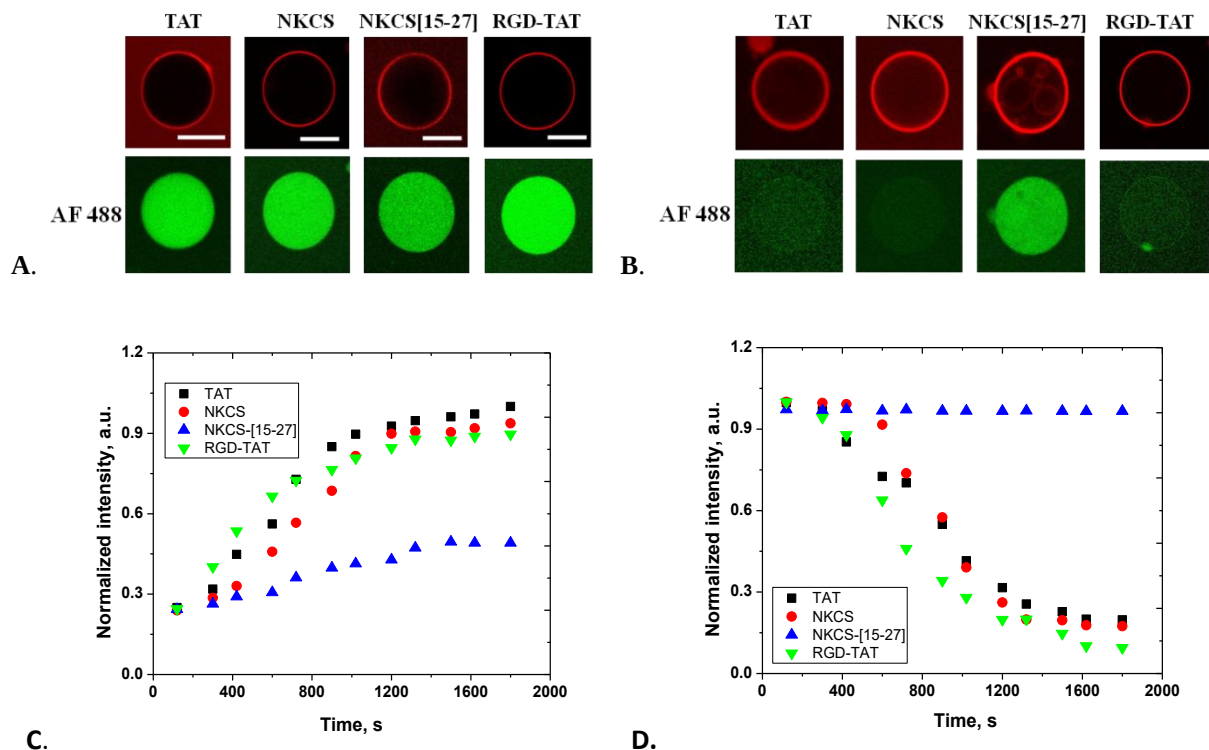


Figura 5: Interacțiunea peptidelor cu GUVs anionice (POPC/POPS/CHOL 50/30/20 mol%). Internalizarea peptidelor și eliberarea AF 488 la (A) 5 min și (B) 30 min. Graficele arată internalizarea peptidelor (C) și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 (D) în aceste membrane: ■. TAT; ●. NKCS; ▲. NKCS-15-27; ▼. RGD-TAT. Scala 20 μ m.

Am reușit astfel să demonstrăm că peptidele RGD-TAT, la fel ca și TAT sau NKCS, pot induce formarea de pori în membrane care conțin PE și PS, urmând ca în etapele următoare să testăm proprietățile penetrante ale peptidelor în membrane ce mimează endozomii și respectiv celule canceroase. Obiectivele propuse pentru Etapa 1/ 2022 a proiectului au fost realizate integral.

Diseminarea rezultatelor:

Bucataru, I.C.; Dragomir, I.; **Asandei, A.;** Pantazica, A.-M.; Ghionescu, A.; Branza-Nichita, N.; Park, Y.; Luchian, T. , *Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis.* **Biosensors** 2022, 12, 596.
<https://doi.org/10.3390/bios12080596>

Ciobanasu, C., *Confocal Laser Scanning Microscopy and Model Membranes to Study Translocation Mechanisms of Membrane Active Peptides.* **Pharmaceutics** 2022, 14, 1699.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081699>

Director Proiect,
CS III Dr. Ciobanasu Vasilica Corina

