

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

THERHOME

Raport științific Etapa 2: Studiul proprietăților penetrante și verificarea specificității noilor peptide pentru receptori ai celulelor canceroase

Terapia țintită cu peptide vizează receptorii celulelor canceroase și utilizează peptidele penetrante și de tip *homing* ca vectori pentru livrarea de medicamente. Spre deosebire de metodele clasice de terapie, precum radioterapia sau chimioterapia, terapia țintită nu acționează asupra tuturor celulelor organismului ci în mod foarte selectiv, la nivelul celulelor canceroase. În acest fel, efectele secundare asociate cu terapiile clasice sunt mult diminuate iar eficiența tratamentului mult îmbunătățită.

Peptida selectată pentru acest studiu, **RGD-TAT** (GRGDSPKYGRKKRRQRRR) este o structură nouă, o moleculă chimeră a peptidei *homing* RGD și a peptidei penetrante HIV1-TAT. În etapa anterioară am demonstrat ca peptidele RGD-TAT, la fel ca și TAT pot penetra și induce formarea de pori în membrane care conțin fosfatidiletanolamină (PE) și fosfatidilserină (PS).

1. Influența pH-ului asupra internalizării și procesului de formare de pori.

De cele mai multe ori, când un medicament este internalizat prin endocitoză, se acumulează în endozomi. Pentru a-și exercita activitatea biologică este nevoie să fie eliberat și să-și atingă ținta și nu să fie digerat sau degradat în lizozomi. Prin urmare, peptidele penetrante care formează pori, inclusiv în endozomi și la pH 5,5 sunt eficiente în a asigura eliberarea moleculelor active și pot fi utilizate în sistemele cu eliberare țintită.

Endozomii timpurii se formează din membrana plasmatică în urma procesului de endocitoză iar compoziția lor lipidică este foarte asemănătoare cu a acesteia. Maturarea în endozomi târzii este urmată de o descreștere a concentrației de steroli și creștere a procentului de fosfatidilserine. În endozomi, monostratul intern conține fosfolipide zwitterionice, în timp ce monostratul extern conține lipide negative de tipul PS. De asemenea, spre deosebire de pH-ul

citoplasmatic, pH-ul din endozomi variază între 6,5 și respectiv 5,5 în endozomii târzii¹. Experimentele au vizat eficiența de penetrare a membranei lipidice a peptidei RGD-TAT la pH 5,5 în GUVs ce conțin PC, PE, PS și 10 mol% colesterol pentru a mima endozomii. Similar cu rezultatele observate la pH 7,5, RGD-TAT se acumulează și formează pori în GUVs care conțin 30 mol% PS sau 30 mol% PE. De asemenea am observat eliberarea de fluorofor Alexa Fluor 488, sugerând formarea de pori și la pH scăzut (Figura 1).

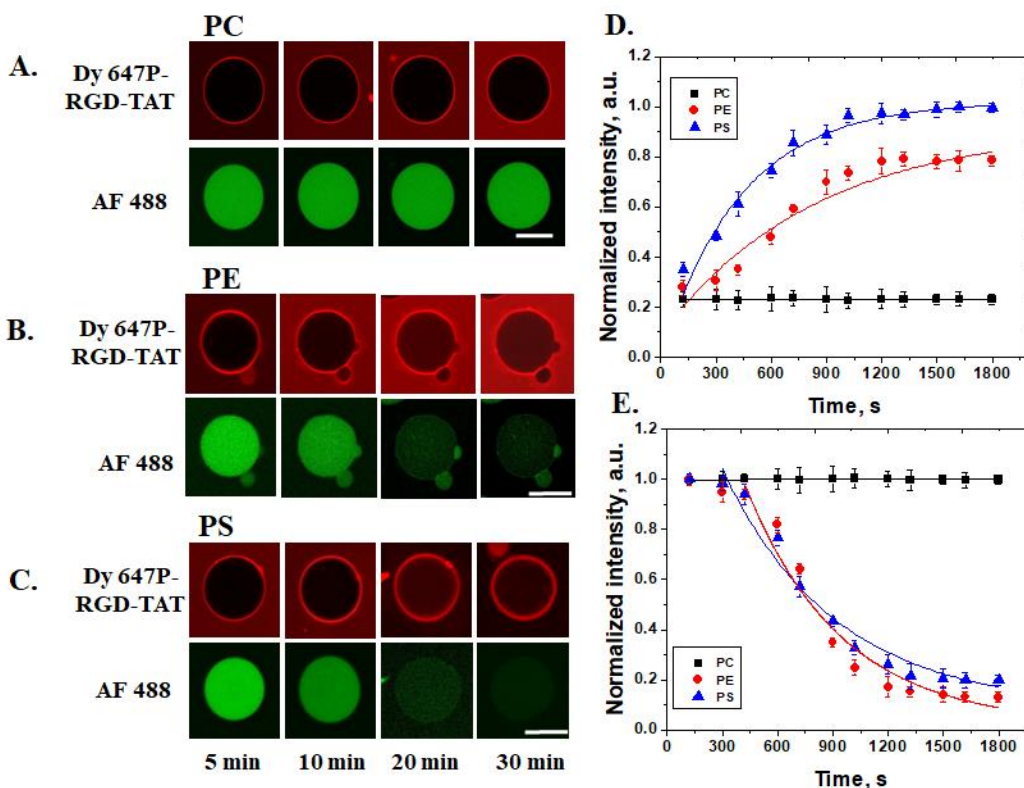


Figura 1: Internalizarea peptidei RGD-TAT marcată cu DY647 și eliberarea fluoroforului Alexa Fluor 488 la pH 5.5. A. Acumularea peptidei pe GUVs ce conțin PC/chol 90/10 mol%. B. Acumularea și internalizarea peptidei respectiv eliberarea Alexa Fluor 488 în membrane PC/PE/chol 60/30/10. C. Acumularea și internalizarea peptidei respectiv eliberarea Alexa Fluor 488 în membrane PC/PS/chol 60/30/10. Graficul din dreapta arată intensitatea fluorescenței peptidei normalizată, măsurată în interiorul GUV (D) și eliberarea fluoroforului (E) pentru PC (■), PE (●) and PS (▲). Scala 20 μm.

În continuare am determinat ratele de internalizare ale peptidei RGD-TAT în membranele ce conțin PE și PS, respectiv ratele de eliberarea ale Alexa Fluor 488 și am observat că sunt ușor mai ridicate comparativ cu pH 7,5 (Tabelul 1).

¹ Scott, C. C., F. Vacca and J. Gruenberg (2014). "Endosome maturation, transport and functions." *Semin Cell Dev Biol* 31: 2-10.

Tabelul 1: Ratele de internalizare a peptidei și eliberare a Alexa Fluor 488 la pH 5,5 și 7,5.

Membrana	RGD- TAT pH 5,5		RGD- TAT pH 7,5	
	K_{int}	K_{eff}	K_{int}	K_{eff}
DOPC/chol	-	-	-	-
DOPC/DOPE/chol	$(1.22 \pm 0.39) \times 10^{-3}$	$(1.08 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	$(1.12 \pm 0.34) \times 10^{-3}$	$(0.76 \pm 0.04) \times 10^{-3}$
DOPC/DOPS/chol	$(2.34 \pm 0.21) \times 10^{-3}$	$(1.15 \pm 0.08) \times 10^{-3}$	$(2.19 \pm 0.36) \times 10^{-3}$	$(1.08 \pm 0.06) \times 10^{-3}$

2. Rolul concentrației în translocarea peptidelor

Alături de alți factori, precum compoziția membranei și concentrația are un rol important în internalizarea peptidei și formarea porilor transmembranari. La concentrații reduse, peptidele penetrante ca TAT sau R9, nu se internalizează. La concentrații mai mari de 1 μM însă, peptidele pot penetra membranele lipidice ce conțin 30 % lipide anionice sau 20 % PE². Următoarele experimente au vizat înțelegerea rolului pe care îl joacă concentrația peptide RGD-TAT în permeabilizarea membrane și internalizare. Astfel, GUVs ce conțin PE sau PS (care mimează celulele canceroase) au fost adăugate în soluții de glucoză ce conțin 1, 2, 5, 10 and 20 μM RGD-TAT. Am observat că internalizarea acestei peptide crește cu concentrația într-un mod similar cu peptida TAT (Figura 2 și Tabelul 2).

Analizând ratele de internalizare, am obținut valorile K_d pentru peptidele RGD-TAT în GUVs cu lipide PS și respectiv PE, de 13.32 μM și 6.32 μM (Figura 3). Aceste rezultate sugerează că interacțiunea peptidei RGD-TAT cu lipida PE este mai puternică decât cu lipida PS.

Tabelul 2: Ratele de internalizare ale peptidelor RGD-TAT la concentrații diferite în GUVs cu DOPE și DOPS

	K_{int}, s^{-1}	K_{int}, s^{-1}	K_{int}, s^{-1}	K_{int}, s^{-1}	K_{int}, s^{-1}
Concentration	1 μM	2 μM	5 μM	10 μM	20 μM
DOPE 30%	$(0.24 \pm 0.03) \times 10^{-3}$	$(0.53 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	$(1.24 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	$(1.26 \pm 0.12) \times 10^{-3}$	$(1.80 \pm 0.15) \times 10^{-3}$
DOPS 30%	$(1.42 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(1.71 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	$(2.09 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	$(2.82 \pm 0.03) \times 10^{-3}$	$(3.75 \pm 0.01) \times 10^{-3}$

² C. Ciobanasu, U. Kubitscheck, *Cell penetrating peptides targeting and distorting biological membranes*, Vol. 7, Wiley-VCH, Weinheim, 2020, p.441-470

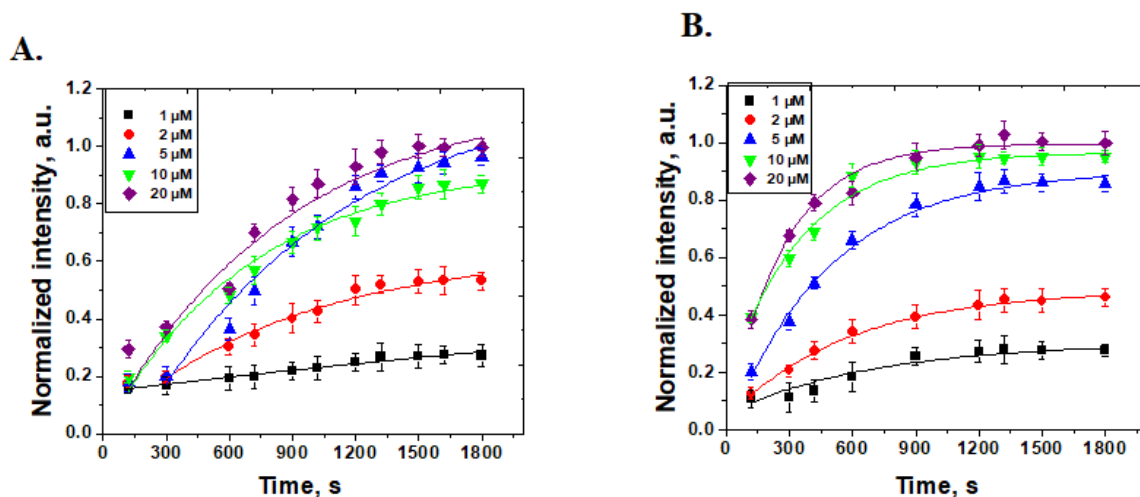


Figura 2: Intensitatea fluorescenței normalizată corespunzătoare internalizării peptidei RGD-TAT în GUVs ce conțin DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% (A), și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% (B) la concentrațiile indicate de peptide. Error bars indică devierea standard din două experimente independente fiecare cu 10-15 GUVs.

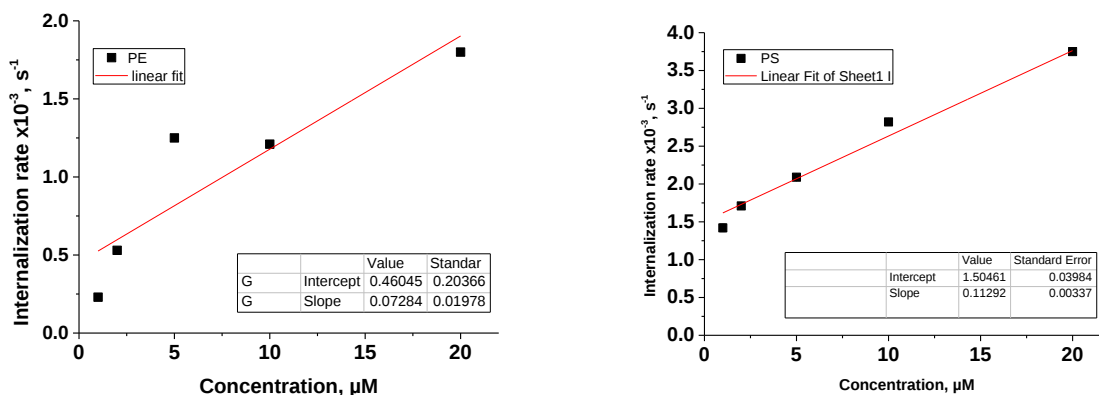


Figura 3: Valorile ratelor de internalizare vs concentrație pentru membranele cu DOPE (stânga) și DOPS (dreapta)

3. Rolul acumulării peptidelor pe membrană în internalizarea acestora

Acumularea peptidelor pe membrana lipidică reprezintă primul pas în activitatea de permeabilizare a acestora și internalizarea peptidelor. Un studiu comparativ între peptidele RGD-TAT și TAT poate oferi indicații despre eficiența primei peptide. Astfel, am analizat intensitatea fluorescenței peptidelor pe membrane după 30 minute de incubare, la aceeași intensitate la laserului.

Am evaluat intensitatea cu Fiji Image J și am observat o acumulare mai intensă a peptidei RGD-TAT pe membranele PC și PE decât a peptide TAT (Figura 4). In membranele anionice PS, efectul a fost invers. Acest effect se poate datora numărului mai mare de grupări guanidinium ale aminoacidului arginină care este essential pentru internalizare. Peptidele cu un conținut mare de arginine interacționează preferential cu lipida anionică PS iar grupările guanidinium formează punți de hydrogen bidentate cu grupările fosfat. Ca urmare, peptide RGD-TAT se internalizează mai rapid decât TAT.

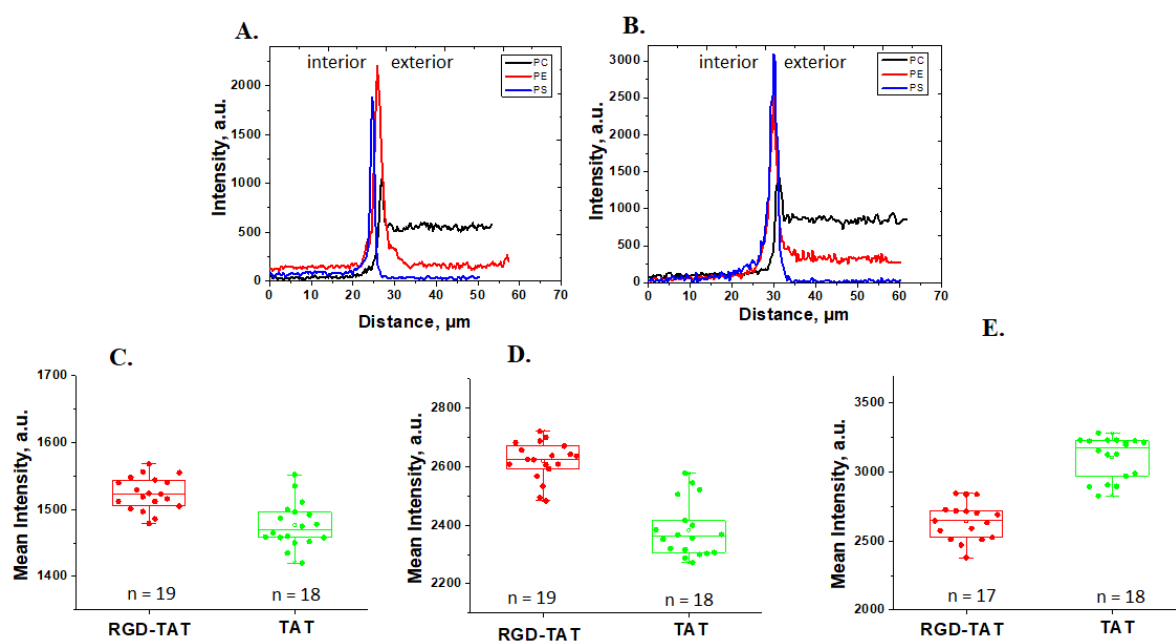


Figura 4. Intensitatea fluorescenței peptide în GUVs. Profilul fluorescenței din centrul GUV spre exterior, după 30 min (A) pentru RGD-TAT și (B) pentru TAT. Acumularea peptidelor RGD-TAT și TAT pe membrane ce conțin DOPC/chol 80/20 mol% (C), DOPC/DOPE/Chol50/30/20 mol% (D) and DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% (E).

4. Rolul moleculelor tip „cargu” in translocarea peptidelor.

Aceste experimente au urmărit înțelegerea rolului pe care peptidele RGD-TAT îl joacă în internalizarea moleculelor de tip „cargu”. Pentru aceasta, am folosit peptida RGD-TAT conjugată cu biotină. Molecula de tip cargu utilizată a fost streptavidina marcată fluorescent cu Alexa Fluor

546. Cele trei tipuri de membrane, DOPC/Chol 80/20 mol%, DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% au fost incubate cu 2 μ M Biotin-RGD-TAT și Streptavidin-AF546. S-a observat o ușoară acumulare pe membranele cu PC/Chol 80/20 mol%. În GUVs cu 30% PE sau PS, complexul peptidă-cargo se acumulează pe membrane, fără internalizare (Figura 5). Putem concluziona că peptida RGD-TAT poate fi folosită pentru a livra molecule mici, de tipul fluoroforului Dy 647, dar nu pentru molecule mari cum este streptavidina.

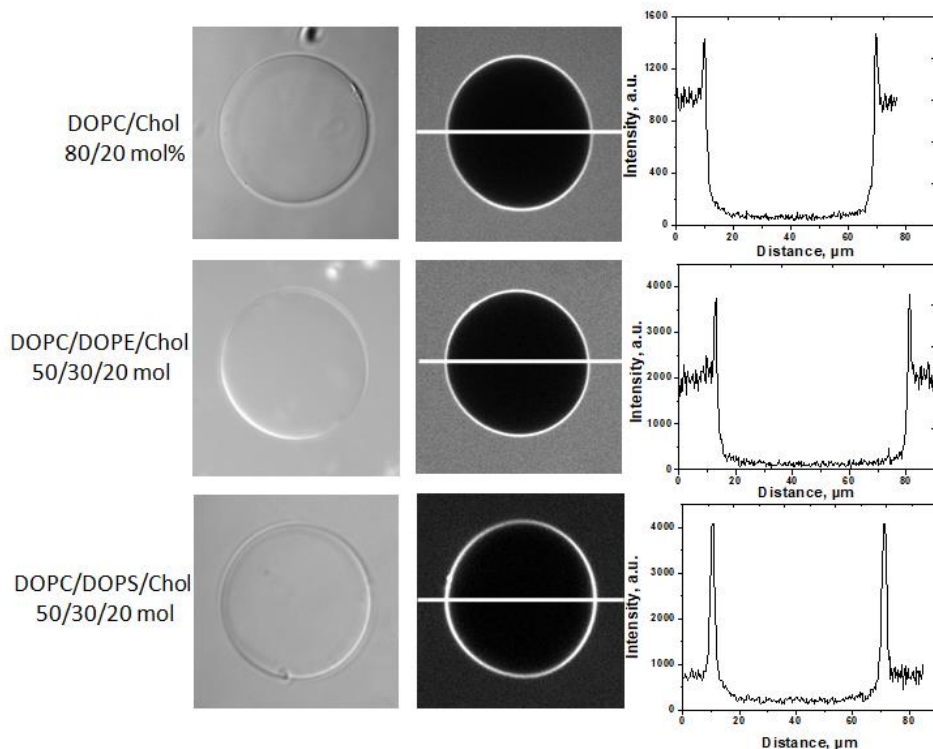


Figura 5: Acumularea complexului Biotin-RGD-TAT- streptavidin-AF546 (peptidă-cargo) în GUVs ce conțin DOPC/Chol 80/20 mol%, DOPC/DOPE/Chol 50/30/20 mol% și DOPC/DOPS/Chol 50/30/20 mol% după 30 min. În stânga se observă membranele vizualizate cu DIC (Differential Interference Contrast). Complexul nu se internalizează în GUVs, doar se acumulează pe membrana. În dreapta se poate observa intensitatea fluorescenței complexului Biotin-RGD-TAT-streptavidin-AF546 de-a lungul liniei mediane din imaginea din stanga.

5. Reconstituirea receptorilor celulelor canceroase în proteoliposomi și fuzionarea cu membranele biomimetice.

Integrina a fost obținută din trombocite umane în 1% Triton X-100 de către colaboratorii de la Institute for Integrative Biology of the Cell (IB4C), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif-sur-Yvette, France. După purificare, integrina a fost marcată fluorescent cu Alexa Fluor 488 sau Alexa Fluor 546 urmând protocolul de la ThermoFisher. Concentrația a fost

determinată din absorbanta la 280 nm folosind coeficientul de extincție de $238.515 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Absorbanța înregistrată la 554 nm a fost utilizată pentru a determina concentrația pentru Alexa Fluor 546 cu coeficientul de extincție de $112.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, iar cea de la 493 nm a fost folosită pentru a afla concentrația Alexa Fluor 488, folosind coeficientul de extincție de $73.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Integrina a fost păstrată la -80°C într-o soluție tampon ce conține 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, and 0.01% NaN_3 . Soluția stoc de integrină marcată fluorescent cu Alexa Fluor 546 folosită în experimentele noastre are concentrația 11.2 mg/mL, cu o rată de marcarea fluorescentă de 173 %. Integrina a fost reconstituită în lipozomi după o procedură dezvoltată de³. Amestecul proteină-lipidă a fost incubat la 37°C sub agitare și apoi păstrat la 4°C peste noapte. Triton X-100 a fost îndepărtat iar proteolipozomii au fost extrudați 20 de ori pe o membrană cu pori de 100 nm cu un miniextruder pentru a obține o soluție omogenă în dimensiuni de *small unilamellar vesicles* (SUVs). Soluția de SUVs a fost păstrată la 4°C timp de 2 săptămâni sau la -20°C până la 2 luni.

6. Determinarea selectivității noilor peptide pentru receptorii celulelor canceroase

Dezvoltarea sistemelor de transport cu eliberare țintită necesită folosirea unor molecule cu specificitate pentru anumiți receptori. În acest caz, am folosit noua peptidă RGD-TAT pentru a determina selectivitatea pentru receptorul integrină reconstituit în membrane lipidice biomimetice. Integrina a fost marcată fluorescent cu Alexa Fluor 546 sau Alexa Fluor 488 iar prezența acesteia în membrană a fost vizualizată prin microscopie confocală. Pentru efectuarea experimentelor ce urmăresc a pune în evidență co-localizarea peptidei și a integrinei, am folosit soluție tampon cu MnCl_2 pentru activarea integrinei (Figura 6) iar ca membrane biomimetice, bistraturi lipidice pe suport. Acestea au fost generate prin fuzionarea proteolipizomilor depozitați pe o lamelă de sticlă proaspăt curățată pentru a îndepărta eventualele contaminări. Ca urmare a interacțiunilor electrostatice ale capetelor lipidice și suprafața de sticlă hidrofilă, protolipozomii se atașează de suprafață sub formă de bistraturi în decurs de câteva minute. Lipozomii care nu au fuzionat au fost spălați cu soluție tampon HEPES-glucoză. În acest caz, membrana lipidică a fost marcată fluorescent cu DOPE-TAMRA, iar integrina cu Alexa Fluor 488. Peptida marcată cu Dy 647P a

³ Erb, E. M., K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller and J. Engel (1997) "Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding." *Biochemistry* 36(24): 7395-7402.)

fost adăugată la o concentrație foarte redusă, de 1 nM, pentru a fi posibilă observarea clusterurilor individuali de integrină, respectiv a peptidei RGD-TAT (Figura 6).

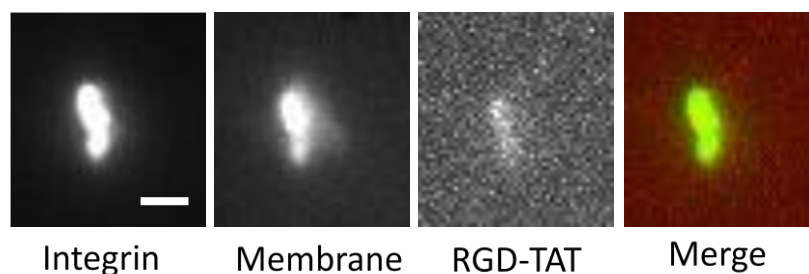


Figura 6: Co-localizarea peptidei RGD-TAT și a integrinei. Receptorul integrină este marcat fluorescent cu Alexa Fluor 488, membrana lipidică cu DOPE-TAMRA iar peptidea cu Dy 647P. Scala 2 μm .

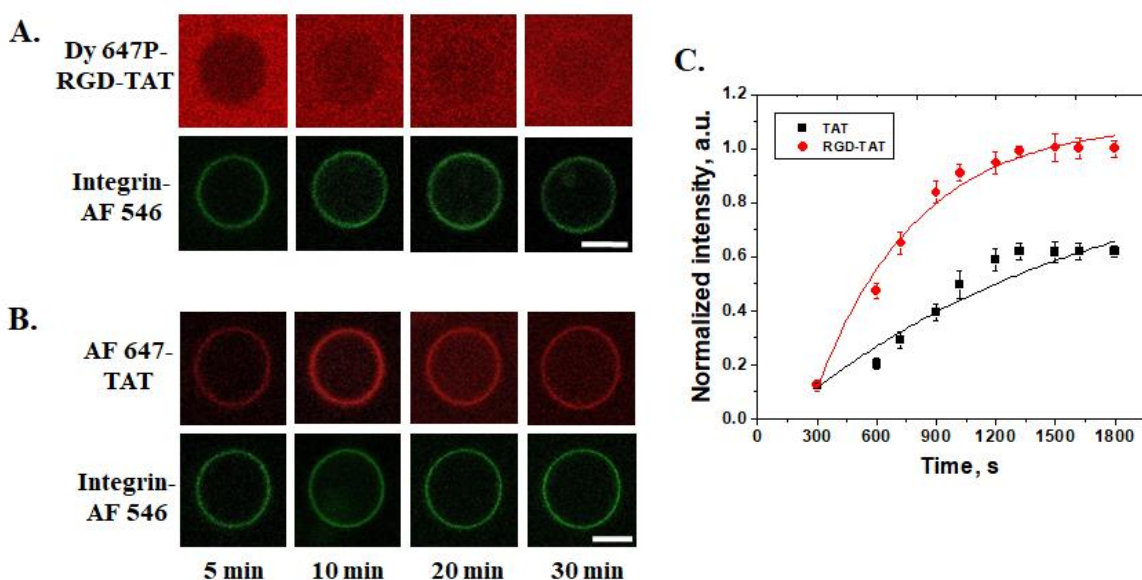


Figura 7: Internalizarea peptidei RGD-TAT în integrin-GUVs. A. Internalizarea peptidei RGD-TAT în GUVs marcate fluorescent cu Alexa Fluor 546. B. Internalizarea peptidei TAT în GUVs. C. Intensitatea fluorescenței peptidelor măsurată în interiorul GUVs pentru determinarea eficienței internalizării.

Următorul experiment a urmărit determinarea rolului integrinei în internalizarea peptidei. Am adăugat $2\mu\text{M}$ de RGD-TAT respectiv TAT peste integrin-GUVs și am observat că internalizarea peptide RGD-TAT este mult mai rapidă, cu o valoare a ratei de internalizare de $(1.98 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ comparativ cu $(0.65 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pentru peptide TAT. De asemenea, am

observat că peptida RGD-TAT nu se acumulează pe membrane cu integrină, spre deosebire de TAT sau de membranele fără integrină (Figura 7).

Obiectivele, respectiv activitățile propuse pentru Etapa 2/2023 a proiectului au fost realizate integral.

Diseminarea rezultatelor:

Articole științifice:

În această etapă au fost publicate un număr de 3 articole cu factor de impact, dintre care 2 situate în zona roșie (Q1) și 1 situat în zona galbenă (Q2).

1. **Corina Ciobanasu**, Julien Pernier, and Christophe Le Clainche, *Integrin Facilitates the Internalization of TAT Peptide Conjugated to RGD Motif in Model Lipid Membranes*, CHEMBIOCHEM 2023, e202300642, <https://doi.org/10.1002/cbic.202300642>, **Q2**

2. **Mereuta, Loredana; Asandei, Alina;** Schiopu, Irina; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, *Synthetic Receptor Based on a Peptide Antibiotic-Functionalized Chimera for Hybridization-Based Polynucleotide Detection*, ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES 2023, 15 (27), 33159-33168, DOI:10.1021/acsami.3c06086, **Q1**

3. **Mereuta, Loredana; Asandei, Alina;** Andricioaei, Ioan; Park, Jonggwan; Park, Yoonkyung; Luchian, Tudor, *Considerable slowdown of short DNA fragment translocation across a protein nanopore using pH-induced generation of enthalpic traps inside the permeation pathway*, NANOSCALE 2023, 15(36), 14754-14763. DOI: 10.1039/d3nr03344a, **Q1**

Conferințe:

Rezultatele obținute în cadrul acestei etape au fost prezentate la 3 conferințe internaționale și la seminariile organizate de Clausius-Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Bonn, Bonn, Germania unde directorul de proiect a fost cercetător invitat:

1. **Corina Ciobanasu**, *Kinetic studies of membrane-active peptides by confocal microscopy*, Focus on Microscopy 2023, 02-06 aprilie 2023, Porto, Portugalia

2. **Corina Ciobanasu**, *Internalization of RGD-TAT peptide in integrin containig model membranes*, 47th FEBS Congress – ‘Together in bioscience for a better future’, 07-12 iulie 2023, Tours, Franta

3. **Ioana Cezara Bucataru, Alina Asandei, Loredana Mereuta**, Tudor Luchian, *Salt effects on the translocation dynamics of polycationic peptide nucleic acids through a protein nanopore*, DPG Spring Meeting of the Atomic, Molecular, Quantum Optics and Photonics Section (SAMOP), 5-10 Martie 2023, Hannover, Germany

Director Proiect,
CS II Dr. Ciobanasu Vasilica Corina

