

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

THERHOME

**Raport științific Etapa 3 - Rolul peptidelor asupra activității proteinelor
din căile mecanosenzitive ale migrației celulare și concluzii finale**

Cuprins:

1. Rezumat executiv al activităților realizate în Etapa 3.....	2
2. Descrierea științifică	3
3. Sumar al progresului.....	11
4. Diseminarea rezultatelor.....	12

1. Rezumat executiv al activităților realizate în Etapa 3: Rolul peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosenzitive ale migrației celulare și concluzii finale

În etapele anterioare 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), atât în vezicule unilamelare gigant (GUVs) care mimează membranele celulare, cât și în membrane lipidice ce mimează endozomii. Rezultatele experimentale obținute au mai arătat și că prezența receptorului integrină purificată din trombocite umane facilitează internalizarea peptidelor și, spre deosebire de peptida TAT, peptida RGD-TAT nu se acumulează pe membrane. De asemenea, am demonstrat că în membranele biomimetice peptida RGD-TAT poate fi utilizată pentru a livra molecule mici, de tipul fluoroforului Dy 647, dar nu pentru molecule mari cum este streptavidina.

Terapia țintită cu peptide este o strategie terapeutică prin care peptidele penetrante și de tip *homing* sunt utilizate pentru a direcționa agenții terapeutici și imagistici către anumiți receptori celulari. În comparație cu metodele clasice de terapie, precum radioterapia sau chimioterapia, terapia țintită are unele avantaje: selectivitate superioară, eficiență crescută, reducerea rezistenței la medicamente și a toxicității.

În cadrul acestei etape am testat afinitatea peptidei RGD-TAT, în forma liniară și ciclică, pentru receptorii integrină și neuropilină. Experimentele au demonstrat că acumularea peptidei RGD-TAT pe bistraturi lipidice cu integrină este considerabil mai mare față de cele fără receptor. De asemenea, acumularea peptidei TAT care nu are domeniul RGD, este redusă comparativ cu RGD-TAT. În prezența receptorului NRP1, acumularea peptidei RGD-TAT pe bistraturi lipidice este mai mare față de absența acestuia. Mai mult, peptida TAT care nu are domeniul RGD, are aceeași acumulare comparativ cu RGD-TAT și similară cu cRGD-TAT, întrucât domeniul RQRRR care se leagă de neuropilină se găsește la capătul C al peptidelor, comun pentru RGD-TAT și TAT.

Obiectivele, respectiv activitățile propuse pentru Etapa 3/2024 a proiectului au fost realizate integral și s-au concretizat prin publicarea unui articol cu factor de impact, iar un al doilea articol a fost trimis spre publicare.

2. Descrierea științifică

Terapia țintită cu peptide este o strategie terapeutică prin care peptidele penetrante și de tip *homing* sunt utilizate pentru a ghida agenții terapeutici către anumiți receptori ai celulelor din organism. În comparație cu metodele clasice de terapie, precum radioterapia sau chimioterapia, terapia țintită are unele avantaje: selectivitate îmbunătățită, eficiență crescută, reducerea rezistenței la medicamente, reducerea toxicității. Peptida selectată pentru acest studiu, **RGD-TAT** este o structură nouă, o moleculă chimeră a peptidei *homing* RGD și a peptidei penetrante HIV1-TAT. Am studiat atât varianta liniară a acestei peptide (TAMRA-GRGDSPKYGRKKRRQRRR) cât și pe cea ciclică (cyclo RGDfK-TAMRA-YGRKKRRQRRR-COOH). Aceste peptide au afinitate pentru receptorii integrină și neuropilină. Integrinele sunt o familie de proteine transmembranare implicate în interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară. Acestea sunt compuse din două subunități, alfa și beta, care formează heterodimeri funcționali. În total, există peste 20 de combinații posibile de subunități alfa și beta, ceea ce conferă o diversitate mare a integrinelor și funcțiilor lor în organism¹. Integrinele sunt implicate într-o varietate de procese fiziologice și patologice, inclusiv în dezvoltarea organismului, în răspunsurile imune, în inflamație, în formarea și metastaza cancerului și în boli autoimune. Neuropilina 1 (NRP1) este o proteină transmembranară implicată în diverse procese biologice, inclusiv dezvoltarea nervoasă, angiogeneză (formarea de noi vase de sânge) și răspunsul imun. Această proteină este exprimată pe suprafața celulelor și are multiple funcții, fiind implicată în interacțiunea cu diverse molecule de semnalizare iar în context patologic este supraexprimată în cancer².

O3.A3. Investigarea rolului peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosenzitive ale migrației celulare.

Migrația celulară este un proces esențial în dezvoltarea organismelor, în vindecarea rănilor, în răspunsul imun al organismului și în multe alte procese fiziologice sau patologice. În contextul unor procese patologice, putem exemplifica metastaza în cancer, unde celulele

¹ Corina Ciobanasu, Julien Pernier, and Christophe LeClainche, *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>

² Corina Ciobanasu, Isabela Dragomir, Aurelia Apetrei, *The penetrating properties of the tumor homing peptide LyP-1 in model lipid membranes*, Journal of Peptide Science, 25(3):e314, 2019, <https://doi.org/10.1002/psc.3145>

canceroase se deplasează de la un organ la altul, formând noi tumori. De obicei, pentru a se deplasa, celulele folosesc pseudopode sau filopose constituite din filamente de actină pentru a se trage înainte, iar altele pot fi ghidate de semnale chimice specifice din mediul lor înconjurător. Adeziunile focale sunt structuri specializate localizate la interfața dintre celulă și matricea extracelulară. Acestea sunt compuse din molecule de aderență celulară, cum ar fi integrinele, și componente ale matricei extracelulare, cum ar fi fibronectina sau colagenul. Adeziunile focale sunt importante pentru ancorarea și stabilizarea celulelor în timpul migrării. În timpul migrației, celulele receptează și răspund la schimbările din jurul lor prin remodelarea matricei extracelulare, transmiterea forței generate de celulă, modificarea dinamicii, și a aderenței la matricea extracelulară. Integrinele din adeziunile focale conectează celula cu matricea extracelulară, permițând celulelor să se atașeze de substrat și să se deplaseze în mod coordonat.

Pentru studiul interacțiunii peptidei RGD-TAT cu integrina, am folosit membrane biomimetice, atât sub forma de lipozomi gigant (GUVs) cât și bistraturi lipidice pe suport.

Protocol experimental pentru determinarea rolului peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosenzitive ale migrației celulare

Echipament: microscop inversat Nikon Ti Eclipse, echipat cu modul de 4 lasere LU4 cu AOTF, TIRF, obiectiv Plan Fluor 40x DIC M N2 și cameră DS-F1. Lasere folosite: 457-514 nm argon ion pentru Alexa Fluor 488, diodă laser cu emisie la 561nm TAMRA (rodamină) și 642 nm diodă laser pentru Dy647P1-M, agitator vortex.

Materiale:

Lipide: 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolocolină (DOPC), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-[(N-(5-amino-1-carboxipentil)iminodiacetic acid) succinil] (sare de nichel) (18:1 DGS-NTA(Ni), Avanti), Proteine: Human Integrin alpha V beta 3 (ITGAV&ITGB3) Heterodimer Protein, His Tag&Tag Free (ACRO Biosystems), Human Neuropilin-1 / NRP1 / CD304 Protein, His Tag (ACRO Biosystems).

Alte materiale: lamele de sticlă (Electron Microscopy Sciences (EMS)) curățate în prealabil, folie adezivă de cupru, inele de cauciuc, acid sulfuric (H₂SO₄), peroxid de hidrogen (H₂O₂) 30%, apă Milli-Q, soluție apoasă de zaharoză și glucoză, AlexaFluor™ 488 C5 Maleimide

Soluție tampon fără MnCl_2

20 mM HEPES pH 7.5, 1mM MgCl_2 , 189 mM glucoză.

Soluție tampon cu MnCl_2

20 mM HEPES pH 7.5, 1mM MgCl_2 , 187 mM glucoză, 2 mM MnCl_2 .

Observație: MnCl_2 este necesară pentru activarea integrinei.

Etapele protocolului:

1. Lamelele de sticlă se curăță în prealabil cu soluție piranha, un amestec de acid sulfuric (H_2SO_4) 3 părți și o parte peroxid de hidrogen (H_2O_2) 30%, apoi se usucă cu un curent de N_2 . Lamelele sunt folosite imediat, pentru a evita orice contaminare.
2. SLB: Pentru bistratul lipidic (*supported lipid bilayer*, SLB), se prepară o soluție de *small unilamellar vesicles* (SUVs) din 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolină (DOPC) cu 10 % DGS-NTA(Ni). Pentru aceasta, se dizolvă lipidele în cloroform, se evaporă solventul și se rehidratează în soluție HEPES. Se agită această soluție energic pe vortex timp de 10 minute pentru obținerea soluției de SUVs. Se diluează soluția la 1mM pentru o depunere omogenă a filmului lipidic. Se depune această soluție pe lamelele pasivate, se spală de câteva ori cu soluție HEPES pentru îndepărtarea excesului de SUVs.

Observație: Suprafața trebuie păstrată sub soluția apoasă pentru a evita distrugerea bistratului lipidic.

3. Se incubează bistratul lipidic cu integrină- His Tag sau neuropilină 1- His Tag pentru 30 minute la 4 °C.
4. Se spală bistratul lipidic pentru a îndepărtarea impurităților nespecifice și a proteinei nelegate de DGS-NTA(Ni).
5. Se adaugă peptida RGD-TAT la concentrația 0,5 nM și se observă la microscop după 30 de minute.

Aceste experimente au urmărit studiul efectului peptidei RGD-TAT asupra integrinei (ITG), un receptor din adeziunile focale. Am utilizat integrina $\alpha_v\beta_3$ care este supraexpimată în

cancer (ex. melanoma, cancer de sân sau de ovare)³, iar pentru activarea acestora am folosit $MnCl_2$ (Figura 1). Imobilizarea integrinei pe membrana lipidică s-a realizat prin tehnica Ni(NTA)-His Tag între lipida DGS-NTA(Ni) și integrina conjugată cu 6 histidine. În figura 2 este exemplificată această tehnică. Ioni de nichel de pe matrice interacționează cu grupările de histidină de pe proteina His-Tag, formând o legătură specifică. După incubare, suprafața se spală pentru a îndepărta impuritățile nespecifice și proteina nelegată.

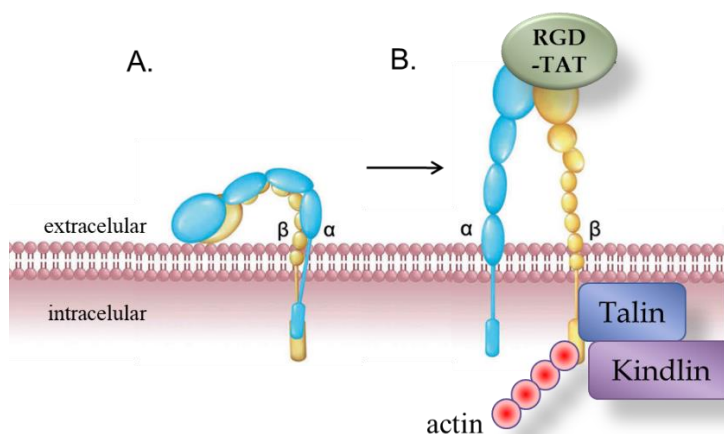


Figura 1: Schema activării integrinei. A. În stare inactivă, subunitățile α și β sunt apropiate și orientate spre membrană; B. În stare activată, integrina se poate lega de domeniul RGD.

Experimentele de microscopie la nivel de singură moleculă au demonstrat că în prezența integrinei, acumularea peptidei RGD-TAT pe suprafață este considerabil mai mare față de absența acesteia (Figura 3.B-D). De asemenea, acumularea peptidei TAT care nu are domeniul RGD, este redusă comparativ cu RGD-TAT (Figura 3.A.). Intensitatea fluorescenței corespunzătoare peptidei liniare TGD-TAT pe suprafața incubată cu integrină este mai redusă decât în cazul peptidei ciclice, sugerând o interacțiune mai puternică a acesteia din urmă cu integrina. Această observație este confirmată și de alte studii. Folosind studii de dinamică moleculară (MD) s-a constatat că afinitatea de legare de integrină $\alpha\beta_3$ a peptidei ciclice RGD a

³ Fangfang Liu, Qiong Wu, Zigang Dong, Kangdong Liu, *Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities*, Pharmacology & Therapeutics, Volume 247, 2023, 108458, ISSN 0163-7258, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108458>.

fost mai ridicată decât în cazul peptidei liniare⁴. De asemenea, constanta de disociere pentru forma liniară a peptidei RGD este mai mică ($K_d = 12.2 \text{ nM}$) decât pentru cea ciclică ($K_d = 2.1 \mu\text{M}$)⁵.

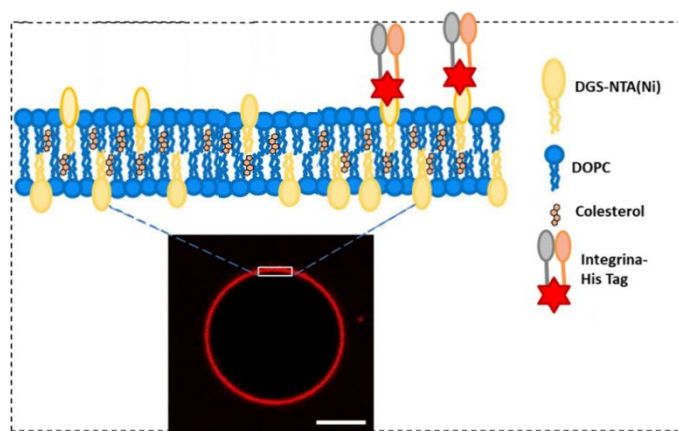


Figura 2: Imobilizarea integrinei în bistratul lipidic compus din DOPC, DGS-NTA (Ni) și colesterol. Integrina, cu șase histidine, se va atașa de DGS-NTA (Ni) în membrana GUV. Scala: 10 μm .

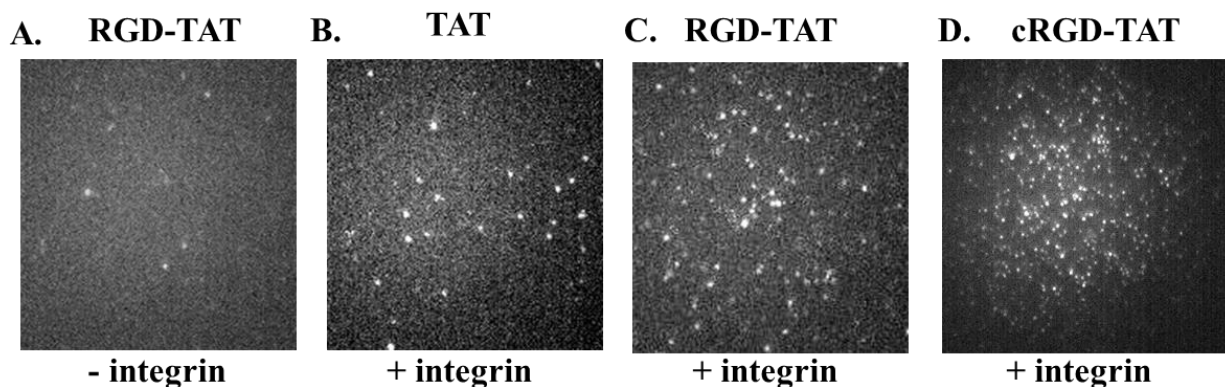


Figura 3: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu integrina prin microscopie la nivel de singură moleculă. A. Bistraturi lipidice cu RGD-TAT fără receptor. B. Peptida TAT în prezența integrinei. C. Bistraturi lipidice cu integrină și peptida liniară RGD-TAT. D. Bistraturi lipidice cu integrină și peptida ciclică RGD-TAT. Suprafața are $(62.5 \mu\text{m})^2$.

⁴ Li N, Qiu S, Fang Y, Wu J, Li Q. *Comparison of Linear vs. Cyclic RGD Pentapeptide Interactions with Integrin $\alpha v \beta 3$ by Molecular Dynamics Simulations*. Biology (Basel). 2021 Jul 20;10(7):688. doi: 10.3390/biology10070688

⁵ Urquiza, M., Benavides-Rubio, D. & Jimenez-Camacho, S. *Structural analysis of peptide binding to integrins for cancer detection and treatment*. Biophys Rev **15**, 699–708 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01084-3>

De asemenea, experimentele de microscopie confocală au confirmat interacțiunea dintre peptida RGD-TAT în forma liniară sau ciclică cu receptorul integrină (ITG) (Figura 4). În interiorul GUVs se găsește fluoroforul Alexa Fluor 488, pentru verificarea integrității membranei. Integrina $\alpha_v\beta_3$ a fost imobilizată în membrana GUVs prin metoda descrisă anterior și prezentată în figura 2, tehnica Ni(NTA)-His Tag. În GUVs compuse din DOPC și colesterol, fără integrină, se observă că peptida RGD-TAT nu interacționează cu membrana (Figura 4, stânga). În schimb, atunci când în membrană este prezent și receptorul integrină, se observă atât acumularea peptidei pe suprafața GUVs cât și formarea clusterilor de ITG, care reprezintă în celule fundația pentru complexe focale din care vor evolua adeziunile focale.

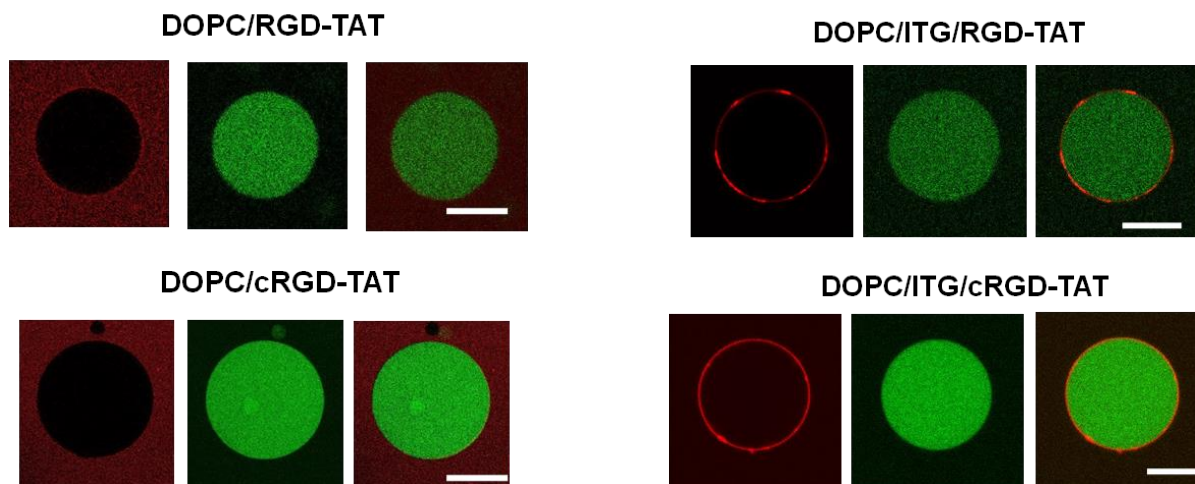


Figura 4: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu integrina prin microscopie confocală. În absența ITG (integrinei), RGD-TAT nu se acumulează (stânga) pe membrane. Când ITG este prezentă (dreapta), RGD-TAT se acumulează și formează clusteri de integrină. *Scale bar 20 μ m.*

Următoarele experimente au vizat studiul interacțiunii peptidei RGD-TAT cu un alt receptor, neuropilina 1 (NRP1). La fel ca și în cazul integrinei, experimentele de microscopie la nivel de singură moleculă au demonstrat că în prezența NRP1, acumularea peptidei RGD-TAT pe suprafață este mai mare față de absența receptorului (Figura 5.B-D). De asemenea, acumularea peptidei TAT care nu are domeniul RGD, are aceeași intensitate comparativ cu RGD-TAT și similară cu cRGD-TAT (Figura 5.A.). Această observație nu este surprinzătoare, întrucât domeniul RQRRR care se leagă de neuropilină se găsește la capătul C al peptidei și nu în capătul terminal N unde se află gruparea RGD.

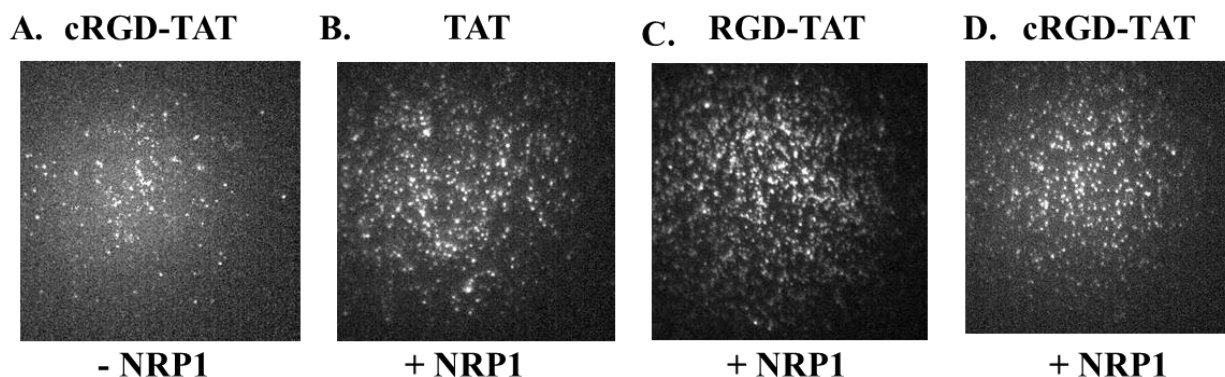


Figura 5: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu neuropilina 1 (NRP1) prin microscopie la nivel de singură moleculă. A. Bistraturi lipidice cu cRGD-TAT fără receptor. B. Peptida TAT în prezența NRP1. C. Bistraturi lipidice cu NRP1 și peptida liniară RGD-TAT. D. Bistraturi lipidice cu NRP1 și peptida ciclică RGD-TAT. Suprafața are $(62.5 \mu\text{m})^2$.

În continuare, experimentele de microscopie confocală au arătat interacțiunea dintre peptida RGD-TAT (forma liniară sau ciclică) cu receptorul NRP1 (Figura 5). NRP1 a fost imobilizată în membrana GUVs, la fel ca în cazul ITG, prin metoda prezentată în figura 2, tehnica Ni(NTA)-His Tag. În GUVs compuse din DOPC și colesterol, fără integrină, se observă că peptida RGD-TAT nu interacționează cu membrana (Figura 4, stânga). În schimb, atunci când în membrană este prezent și receptorul NRP1, se observă atât acumularea peptidei pe suprafața GUVs, sugerând interacțiunea dintre cele două.

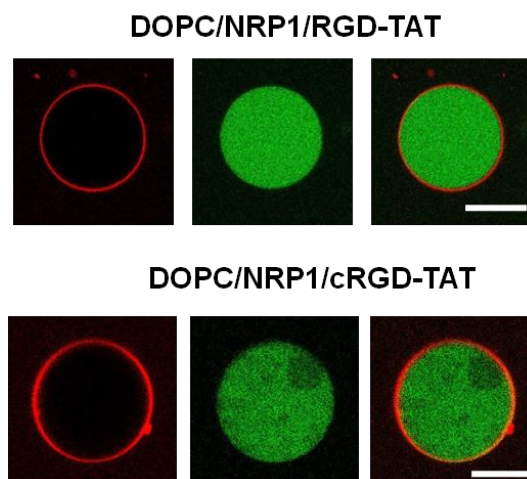


Figura 6: Interacțiunea peptidei RGD-TAT cu neuropilina 1 prin microscopie confocală. În prezența NRP1, RGD-TAT se acumulează pe membrane. Scale bar $20 \mu\text{m}$.

Am reușit astfel să demonstrăm că peptidele RGD-TAT au afinitate pentru receptorii integrină $\alpha v \beta_3$ și neuropilina 1 (NRP1).

O4.A1. Coroborarea rezultatelor obținute pentru activitatea peptidelor în vederea optimizării structurilor peptidice sau proiectării unor noi molecule eficiente, cu proprietăți penetrante îmbunătățite și specificitate ridicată pentru receptorii celulelor canceroase.

Concluzii finale asupra optimizării structurilor peptidice investigate în scopul obținerii unor noi molecule eficiente, cu proprietăți penetrante îmbunătățite și specificitate ridicată pentru receptorii celulelor canceroase.

Experimentele realizate pentru implementarea acestui proiect au demonstrat ca peptida penetrantă *homing* RGD-TAT, la fel ca și TAT poate penetra și induce formarea de pori în membrane care conțin fosfatidiletanolamină (PE) și fosfatidilserină (PS), atât la pH 7,5 cât și 5,5. De asemenea, această peptidă are afinitate ridicată pentru receptorul integrină, o proteină transmembranară care face parte din adeziunile focale ale celulei. Mai mult, prin capătul C-terminal, peptida se poate lega și de receptorul neuropilină 1 (NRP1). Aceste rezultate confirmă faptul că peptida RGD-TAT are potențial pentru a fi utilizată pentru diverse aplicații în terapie țintită, în livrarea de medicamente sau agenți imagistici. În continuare, experimentele care au urmărit studiul efectului peptidei RGD-TAT asupra polimerizării actinei au arătat că această peptidă nu prezintă nici un efect. Pentru obținerea unui efect inhibitor, peptida ar trebui conjugată fie cu o proteină cu activitate *capping*, fie cu domeniul LLKKTET (*actin binding motif*)⁶ pentru a putea fi utilizată pentru alte aplicații cum ar fi identificarea și blocarea migrației celulelor tumorale în stadii incipiente ale metastazelor.

Obiectivele, respectiv activitățile propuse pentru Etapa 3/2024 a proiectului au fost realizate integral și s-au concretizat prin publicarea unui articol cu factor de impact ISI și a încă unui articol trimis spre publicare.

⁶ Cheng-han Yu, Jaslyn Bee Khuan Law, Mona Suryana, and Michael P. Sheetz, *Early integrin binding to Arg-Gly-Asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation*, PNAS, 2011, 108 (51) 20585-20590

3. Sumar al progresului

Obiectivele, respectiv activitățile propuse pentru Etapa 3/2023 a proiectului au fost realizate integral, după cum urmează:

O3.A3. Investigarea rolului peptidelor asupra activității proteinelor din căile mecanosenzitive ale migrației celulare.

În această activitate am reușit să demonstrăm că peptida RGD-TAT, în ambele forme, liniară și ciclică, prezintă afinitate pentru receptorii integrină și neuropilină.

De asemenea, afinitatea peptidei ciclice RGD-TAT pentru integrină este mai ridicată decât a celei liniare. Pentru receptorul neuropilină în schimb, capacitatea de legare a peptidei RGD-TAT este similară pentru cele două forme.

O4.A1. Coroborarea rezultatelor obținute pentru activitatea peptidelor în vederea optimizării structurilor peptidice sau proiectării unor noi molecule eficiente, cu proprietăți penetrante îmbunătățite și specificitate ridicată pentru receptorii celulelor canceroase.

În cadrul acestei activități am evidențiat proprietățile necesare structurii peptidice propuse astfel încât să fie optimizată pentru a putea fi utilizată în diverse aplicații precum în terapia țintită de livrare a medicamentelor sau agenților imagistici sau chiar identificarea și blocarea migrației celulelor tumorale în stadii incipiente ale metastazelor.

Diseminarea rezultatelor:

Articole științifice:

În această etapă a fost publicat un articol cu factor de impact situate în zona galbenă (Q2), și un al doilea a fost trimis spre publicare.

1. Irina Schiopu, Isabela Dragomir and **Alina Asandei**, *Single molecule technique unveils the role of electrostatic interactions in ssDNA–gp32 molecular complex stability*, RSC advances 14 (8), 5449-5460, 2024, DOI: 10.1039/D3RA07746B , **Q2**
2. **Cezara Bucataru** and **Corina Ciobanasu**, *Antimicrobial Peptides: Opportunities and Challenges in Overcoming Resistance*, in evaluare la jurnalul Microbiological Research. **Q1**

30.04 2024

Director Proiect,
CS II Dr. Ciobanasu Vasilica Corina