

Изучение динамики интернализации рецептора HER2 при помощи рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG

Научный руководитель – Шилова Ольга Николаевна

Кузичкина Евгения Олеговна

Студент (магистр)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, Россия

E-mail: kuzichkinazhenya@mail.ru

Ранее в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН на основе фототоксичного флавопротеида miniSOG были получены адресные генетически кодируемые белковые фотосенсибилизаторы 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG, оказывающие специфическое цитотоксическое действие на HER2-положительные клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 за счет генерации активных форм кислорода при их облучении синим светом. При этом для эффективной работы противоопухолевого агента важна не только селективная доставка, но и динамика внутриклеточных перемещений, влияющая на эффективность и механизм токсичности. Как DARPIn-miniSOG, так и 4D5scFv-miniSOG способствуют лиганд-индуцированной интернализации HER2, играющей центральную роль в подавлении сигнализации путем нацеливания рецепторов на лизосомальную деградацию или, в некоторых случаях, на стимулирование диссоциации лиганда. В ходе работы были получены и очищены белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG. С помощью проточной цитофлуометрии было продемонстрировано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG высокоспецифично связываются с рецептором HER2 на поверхности клеток SK-BR-3. Было показано, что после обработки клеток белками DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG при +37С происходит рецепторопосредованная интернализация комплекса рецептор-белок, одновременное снижение их флуоресценции позволяет использовать модуль miniSOG для изучения динамики интернализации нацеливающих модулей DARPIn и 4D5. Показано, что DARPIn-miniSOG интернализуется быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, в связи с чем 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность, дольше задерживаясь на мембране клетки. Были выдвинуты гипотезы о том, что падение флуоресценции и цитотоксичности miniSOG в процессе интернализации может быть связано с изменением pH среды, с воздействием на белки специфических протеаз при попадании комплекса рецептор-белок в эндосомы и лизосомы или с процессом восстановления флавинового кофактора. Результаты показали, что падение флуоресценции белков не зависит от pH в пределах значений, достижимых внутри клетки, и от воздействия на белки эндосомальных протеаз и восстановления кофактора. В качестве модельной молекулы, способной поглощать флуоресценцию miniSOG *in vitro* был протестирован химический краситель трипановый синий, он способствовал полному гашению флуоресцентного сигнала DARPIn-miniSOG. Нативными перехватчиками излучения miniSOG внутри клетки могут выступать цитохромы, в том числе цитохром *c*. Было показано, что в присутствии цитохрома как ФМН, так и DARPIn-miniSOG происходит падение флуоресценции в 2 раза, при этом DARPIn, конъюгированный с FITC, стандартным флуоресцентным красителем, не показал такого результата. Таким образом, было показано, что модуль miniSOG теряет свои флуоресцентные свойства в основном за счет поглощения его флуоресценции хромофорами клетки. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10321.