

**А. С. Фомин, Д. В. Семенов, Е. В. Кулигина, О. А. Коваль,  
И. Н. Бабкина, Н. В. Тикунова, В. А. Матвеева, Л. Э. Матвеев, В. А. Рихтер**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: fominas@niboch.nsc.ru

## **ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ АНАЛОГИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПЕПТИДА ЛАКТАПИНА \***

Индукция апоптоза раковых клеток белковыми факторами, специфичными к клеткам опухоли, положена в основу создания ряда современных противораковых фармакологических средств. В молоке человека присутствует белок – протеолитический фрагмент к-казеина (лактапин), способный вызывать апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7. Были сконструированы плазмидные векторы, кодирующие рекомбинантные аналоги лактапина, созданы штаммы-продуценты *E. coli* и получены рекомбинантные аналоги этого пептида (RL1, RL2). Проведен анализ действия аналогов на раковые клетки MCF-7, A549, Her-2 и немалигнизированные клетки MSC жировой ткани человека в культуре. Установлено, что инкубация клеток MCF-7, A549, Her-2 в присутствии аналога лактапина RL2 приводит к существенному снижению жизнеспособности клеток (62, 45 и 30 % соответственно). Показано, что RL2 вызывает апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, но не снижает жизнеспособности и не индуцирует апоптоз мезенхимальных стволовых клеток человека. Полученные данные о структуре и действии рекомбинантных аналогов лактапина на клетки позволяют использовать лактапин, а также его аналоги для создания новых средств терапии онкологических заболеваний человека.

*Ключевые слова:* апоптоз, раковые линии клеток, мезенхимальные стволовые клетки, лактапин.

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, является механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток путем элиминации дефектных элементов многоклеточных организмов. Актуальность исследований апоптоза определяется тем, что нарушения регуляции этого процесса связаны с развитием многих заболеваний, в том числе онкологических [1]. Одним из наиболее важных направлений изучения апоптотической гибели клеток человека является поиск и идентификация эндогенных индукторов апоптоза как потенциальных средств терапии онкологических заболеваний.

Известно, что молоко человека содержит ряд проапоптотических белковых факторов, таких как ФНО- $\alpha$ , FasI, TGF- $\beta$ , а также ряд ферментов, потенциально способных индуцировать гибель клеток млекопитающих в культуре [2]. Кроме того установлено, что ряд мажорных белков молока:  $\alpha$ -лактальбумин в комплексе с жирными кислотами [3], лактоферрин [4], а также его протео-

литические фрагменты [5] могут вызывать апоптоз клеток млекопитающих.

При исследовании цитотоксического / апоптотического действия белков молока на клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 мы установили, что в молоке человека присутствует пептид с молекулярной массой 8,6 кДа, подавляющий жизнеспособность и вызывающий апоптотическую гибель этих клеток. Пептид, вызывающий гибель клеток аденокарциномы MCF-7, был выделен из молока с помощью ряда последовательных хроматографических стадий и идентифицирован как протеолитический фрагмент к-казеина человека. Он получил название лактапина [6; 7].

**Целью** исследования являлось получение и выделение рекомбинантных аналогов лактапина, а также изучение их влияния на жизнеспособность клеток человека различного тканевого происхождения в культуре (MCF-7 – клетки аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, Her-2 – эпидермоидной карциномы гортани

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 18 «Комплексные интеграционные проекты» Президиума СО РАН, а также ФЦНТП (гос. контракт № 02.512.11.2257).

и MSC – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани).

### Материал и методы

Для получения рекомбинантных аналогов лактапина использовали векторную плазмиду pGSDI, любезно предоставленную Н. А. Нетесовой и П. А. Белавиным (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клонирование плазмид проводили в клетках *E. coli* штамм XL-Blue. Штаммы-продуценты рекомбинантных аналогов лактапина RL1 и RL2 создавали на основе штамма *E. coli* BL21(DE3). Для амплификации участков ДНК лейкоцитов человека, кодирующих аналоги лактапина, применяли следующие праймеры. Для получения ДНК, кодирующей аналог лактапина RL1:

RPA1196U41 – 5'GCCCAGATCTATGAGACCAGCTATAGCAATTAATAATCCAT;  
IPT1376L67 – 5'GCCCGTCGACTT~~AGT~~  
GATGGTGATGGTGATGTGATCCGCCGATGGT  
AGGGATGATTATTTTATCCTG.

Для получения ДНК, кодирующей аналог лактапина RL2 праймер IPT1376L67 и праймер:

CDCex3U55 – 5'GCCCAGATCTATGAGACCAGAAACAACCAGCATGCCATGAGATGATGAAAGACCA.

Подчеркиванием обозначена дополнительная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность GGS-НННННН, курсивом выделен введенный терминирующий кодон. Дополнительная аминокислотная последовательность, содержащая шесть гистидиновых остатков, была введена в структуру аналогов для проведения в дальнейшем очистки белков с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Используемые в работе дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Для получения фрагментов ДНК, кодирующих аналоги лактапина, проводили ПЦР с использованием набора «XL PCR Kit» («Applied Biosystems», США) по методике производителя. Для лигирования ДНК, кодирующих аналоги лактапина, с плазмидой плазмиду pGSDI переводили в линейную форму гидролизом эндонуклеазами рестрикции *SalI* и *BglIII*. Линейную форму

плазмиды разделяли электрофорезом в 0,8 % агарозном геле и выделяли с помощью набора «QIAquick Gel Extraction» («Qiagen», США). Получение рекомбинантных плазмидных ДНК, трансформацию клеток, анализ и отбор колоний продуцентов *E. coli*, наращивание продуцентов BL21 (RL1) и BL21(RL2), а также лизис бактерий проводили в соответствии с описанными рекомендациями [8].

Разделение белков лизата клеток-продуцентов *E. coli* осуществляли на хроматографической станции низкого давления «BioLogic LP» («Bio-Rad», США), оснащенной спектрофотометрическим детектором поглощения элюата на длине волны 280 нм и проточным кондуктометром.

Для выделения рекомбинантного аналога RL1 лизат клеток *E. coli* BL21(RL1) центрифугировали 30 мин при 10 000 g и температуре 5 °C. Супернатант наносили на Ni-NTA-агарозу («Sigma», США), уравновешенную буфером А, содержащим 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM имидазола, 10 mM β-меркаптоэтанол, 1 mM фенилметилсульфонилфторида («PMSF», «Sigma», США), pH 8,0. Не связавшиеся с сорбентом белки *E. coli* элюировали этим же буфером. Аналог лактапина RL1 элюировали буфером А, содержащим 250 mM имидазола.

Для выделения рекомбинантного аналога RL2 лизат клеток *E. coli* BL21(RL2) центрифугировали и наносили на Ni-NTA-агарозу, как это описано для RL1. Белки *E. coli*, неспецифически сорбирующиеся на Ni-NTA-агарозу, элюировали буфером А, содержащим 50 mM имидазола, проводили частичную (10–15 %) элюцию RL2 и связанную с ним белков *E. coli* буфером, содержащим 250 mM имидазола. RL2 элюировали буфером А, содержащим 6 M гуанидин-HCl. Полученные белковые фракции диализовали против 150 mM NaCl, трис-HCl pH 7,5 (две смены по 18 ч при 5 °C) и хранили до использования при –70 °C.

Определение концентрации белка в препаратах проводили по методу Брэдфорд [9]. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) («Serva», США).

Для анализа действия белковых препаратов на клетки человека использовали клетки аденокарциномы молочной железы челове-

ка линии MCF-7, карциномы легкого человека A549 и эпидермоидной карциномы гортани человека Her-2 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде IMDM с 10 мМ L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека выделяли по описанной методике [10]. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

Для анализа влияния аналогов лактаптина на жизнеспособность клеток человека  $2 \times 10^6$  клеток MCF-7, A549, Her-2 или MSC культивировали в 96-луночном планшете 2 сут. К культуральной среде добавляли рекомбинантные аналоги лактаптина в концентрации 60, 30, 7 или 3 нг/мл, инкубировали 24–72 ч, после чего определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста [11]. Измерение оптической плотности растворов МТТ-формазана проводили на Multiskan RC («ThermoLabs», США).

Для количественного анализа числа апоптотических телец в культуре клеток MCF-7 последние культивировали в 24-луночном планшете 2 сут. ( $2 \times 10^5$  клеток на лунку). К культуральной среде добавляли рекомбинантные аналоги лактаптина до конечной концентрации 14 мкг/мл. Клетки инкубировали 24, 48 либо 72 ч. После инкубации клетки, открепившиеся от подложки, собирали с культуральной средой, центрифугировали 15 мин при 500 g, среду удаляли, а клетки суспендировали в буфере ВАР, содержащем 30 мМ HEPES-NaOH pH 7,5, 3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 140 мМ NaCl, 100 мкг/мл пропидий йодида, 1 мкл/мл клеточной суспензии раствора FITC-меченого аннексина V («BD Biosciences», США). Прикрепленные клетки снимали с подложки с помощью трипсин-ЭДТА-буфера по стандартной методике, осаждали центрифугированием 15 мин при 500 g и суспендировали в ВАР. Открепившиеся и прикрепленные клетки анализировали отдельно на проточном цитофлуориметре BD FACSAria с использованием системы светофильтров ВР 585/42 (PI) и ВР 530/30 (FITC) Центра коллективного пользования проточной цитофлуориметрии СО РАН.

## Результаты исследования и обсуждение

Нами получены рекомбинантные аналоги лактаптина и проведен сравнительный анализ влияния этих аналогов на жизнеспособность раковых и мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре.

Для конструирования рекомбинантных аналогов осуществлен анализ аминокислотных последовательностей лактаптина и к-казеина человека (GenBank gi1245482). Были подобраны последовательности фрагментов к-казеина, позволяющие получить клетки-продуценты *E. coli*, экспрессирующие с высокой эффективностью рекомбинантные аналоги лактаптина (рис. 1). Были сконструированы плазмидные ДНК pGSDI, кодирующие аналоги, и получены штаммы продуценты *E. coli* BL21(RL1) и BL21(RL2).

Рекомбинантные аналоги лактаптина выделяли из лизатов продуцентов *E. coli* аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе. Для очистки аналогов от неспецифически сорбирующихся на Ni-NTA-агарозу белков *E. coli* проводили предварительную элюцию буфером, содержащим 50 мМ имидазола (рис. 2), что позволяло получить белковые препараты с содержанием рекомбинантных аналогов более 95 % (рис. 3, дорожки 5, 6).

При подборе условий выделения аналогов из лизатов клеток-продуцентов установлено, что при концентрации имидазола 250 мМ в элюенте происходит полная десорбция аналога RL1 с Ni-NTA-агарозы (данные не иллюстрированы). После нанесения на Ni-NTA-агарозу лизата *E. coli* – продуцентов аналога RL2, элюция буфером, содержащим 250 мМ имидазола, приводила к десорбции только примерно 10–15 % аналога RL2 (см. рис. 2). Количественной элюции аналога RL2 удавалось достичь только с использованием хаотропных агентов (6 М гуанидин-HCl). Принимая во внимание тот факт, что оба аналога содержат идентичные С-концевые 6-His-последовательности, обеспечивающие высокий аффинитет к Ni-хелатным сорбентам, можно предположить, что повышенное сродство аналога RL2 обусловлено сочетанием низкой растворимости этого белка в буфере с физиологической ионной силой, а также

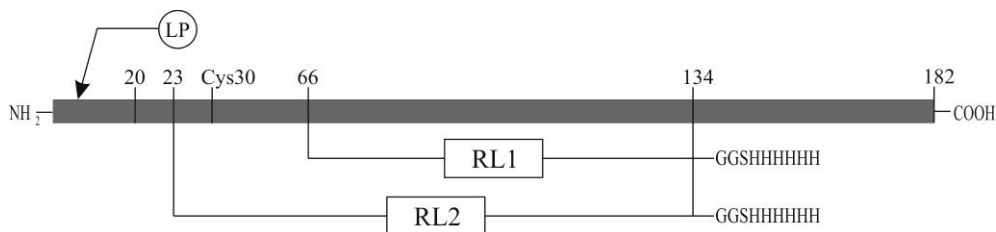


Рис. 1. Схема первичных структур гено-инженерных аналогов лактапина.

Серым цветом обозначена последовательность (182 аминокислотных остатка) к-казеина человека; выделением указаны фрагменты, соответствующие гено-инженерным аналогам RL1 и RL2. Молекулярные массы рекомбинантных фрагментов RL1 и RL2 с учетом последовательностей GGSHHHHHHH составили 8,9 и 14 кДа соответственно. LP – последовательность лидерного пептида к-казеина

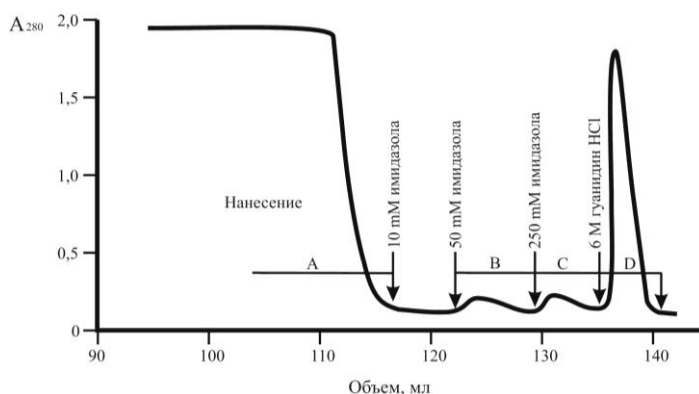


Рис. 2. Выделение аналога лактапина (RL2) аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе.

Фракции белков: А – не взаимодействующих с сорбентом; В – элюируемых 50 мМ имидазола; С – элюируемых 250 мМ имидазола; D – элюируемых 6 М гуанидин-НСl

способностью белка к образованию олигомерных форм.

Анализ белковых препаратов рекомбинантных аналогов лактапина SDS электрофорезом в ПААГ показал, что RL1 представлен одним полипептидом с молекулярной массой 8,9 кДа (см. рис. 3, дорожка 6), что соответствует теоретической расчетной массе 8,9 кДа.

Препараты аналога RL2 в отсутствие восстановителей дисульфидных связей содержали две формы белка с массами 14 и 28 кДа в соотношении примерно 30 : 70 % соответственно (см. рис. 3, дорожка 7). В восстанавливающих условиях (1 % β-меркаптоэтанола) происходила полная диссоциация формы с массой 28 кДа с образованием формы с массой 14 кДа (см. рис. 3, дорожка 5). Эти данные демонстрируют, что аналог RL2 продуцируется клетками *E. coli* в форме ковалентного гомодимера, субъединицы которого образуют межмолекулярные дисульфидные связи. Аминокислотная последовательность RL2 содержит только один остаток цистеина, соответствующий Cys30 к-казеина человека (см.

рис. 1). Следовательно, именно этот остаток участвует в образовании межмолекулярной S-S связи гомодимера RL2.

Известно, что α-, β- и κ-казеины молока человека образуют прочные нековалентные комплексы (мицеллы), гидрофобное ядро которых формируется N-концевым доменом молекул κ-казеина. Диссоциация мицелл происходит в присутствии высоких концентраций хаотропных агентов (6–8 М мочевины или гуанидин-НСl) [12]. В связи с тем, что RL2 представляет собой фрагмент N-концевого домена κ-казеина, ответственного за образование казеиновых мицелл, можно предположить, что как мономеры RL2, так и ковалентные гомодимеры могут образовывать мультисубъединичные комплексы высокого порядка, подобно формированию гидрофобного ядра казеиновых мицелл. Принимая во внимание тот факт, что аналог лактапина RL1 не проявляет тенденции к олигомеризации в условиях аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, а также не содержит остатков цистеина и последовательности 23–66 N-концевого домена κ-казеина, можно заключить, что

именно эта часть RL2 (и к-казеина человека) важна для формирования прочных межмолекулярных комплексов и способствует образованию межсубъединичных S-S связей в посттрансляционном процессинге белка.

Для того чтобы сравнить действие аналогов лактапина RL1 и RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, их инкубировали в присутствии различных концентраций белков RL1 и RL2 и оценивали жизнеспособность с помощью МТТ-теста. Обнаружено, что короткий аналог лактапина RL1 вызывал слабое подавление жизнеспособности MCF-7, в то время как инкубация MCF-7 в присутствии 30–60 нг/мл RL2 приводила к существенному снижению их жизнеспособности (7–10 и 62 % соответственно; рис. 4). Снижение жизнеспособности под действием RL2 сопровождалось морфологическими изменениями MCF-7, характерными для апоптоза клеток в культуре: откреплением от пластиковой подложки, конденсацией цитоплазмы и ядер и появлением вторичных некротических клеток, окрашиваемых трипановым синим. Эти данные позволяют заключить, что фрагмент к-казеина 23–66, который входит в состав RL2, важен не только для формирования мультимерных форм белка, но и для проявления апоптотического действия этого белка на клетки MCF-7.

Так как рекомбинантный аналог RL1 не оказывал существенного влияния на жизнеспособность клеток MCF-7, в дальнейших экспериментах мы использовали только аналог RL2.

В результате проведенного анализа влияния рекомбинантного аналога лактапина RL2 на жизнеспособность клеток карциномы легкого A549 и клеток карциномы гортани человека Нер-2 мы установили, что жизнеспособность клеток A549 на 3 сут. инкубации с аналогом RL2 снижалась на 45 % (см. рис. 4), а клеток Нер-2 – на 30 %. Снижение жизнеспособности клеток A549 и Нер-2 не сопровождалось морфологическими изменениями, характерными для апоптоза, и не происходило фрагментации ядерной ДНК этих клеток даже при длительной инкубации (5 сут.) с RL2-аналогом (данные не иллюстрированы). Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека MSC при инкубации с RL2 не отличалась от жизнеспособности контрольных клеток (см. рис. 4).

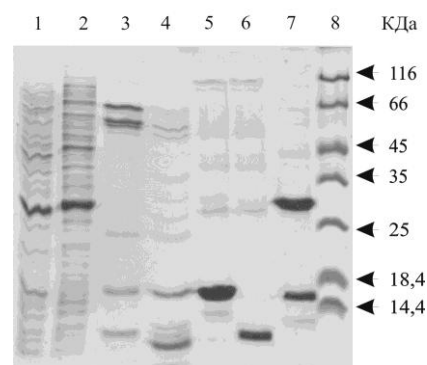


Рис. 3. Электрофоретический анализ белковых препаратов в 12 % ПААГ в присутствии SDS. Дорожки: 1 – белки лизата клеток *E. coli*; 2 – белки, не взаимодействующие с Ni-NTA-агарозой; 3–4 – белки, элюируемые 50 мМ и 250 мМ имидазола соответственно; 5 и 7 – белки, элюируемые 6 М гуанидин-HCl (в присутствии 1 % β-меркаптоэтанола и в невосстанавливающих условиях соответственно); 6 – рекомбинантный аналог лактапина RL1; 8 – маркеры молекулярной массы белков «Fermentas» (Латвия)

Таким образом, нами показано, что чувствительность клеток к токсическому действию аналога лактапина RL2 убывает в ряду MCF-7 ≥ A549 > Нер-2 >> MSC. При этом снижение жизнеспособности происходило только у раковых линий клеток, а немалигнизированные стволовые клетки человека оказались практически не чувствительны к действию этого белка.

В настоящее время наиболее доказательные методы выявления апоптотических клеток в культуре основаны на дифференциальном окрашивании ранних апоптотических телец флуоресцентно меченным белком аннексин V, который аффинно связывается с полярной частью фосфатидилсерина на поверхности клеток. При этом апоптотические клетки остаются не проницаемыми для пропидий йодида, используемого в паре с аннексином V для выявления некротических либо вторичных некротических клеток [13].

Для подтверждения апоптотического характера гибели клеток MCF-7 под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2 мы инкубировали клетки с аналогом и анализировали клеточные субпопуляции проточной цитофлуориметрией в присутствии FITC меченного аннексина V и пропидий-йодида. Установлено, что открепленные клетки по интенсивности окраски FITC меченным аннексином V / пропидий йодидом образуют три субпопуляции (рис. 5): G1 – слабо окрашенные живые

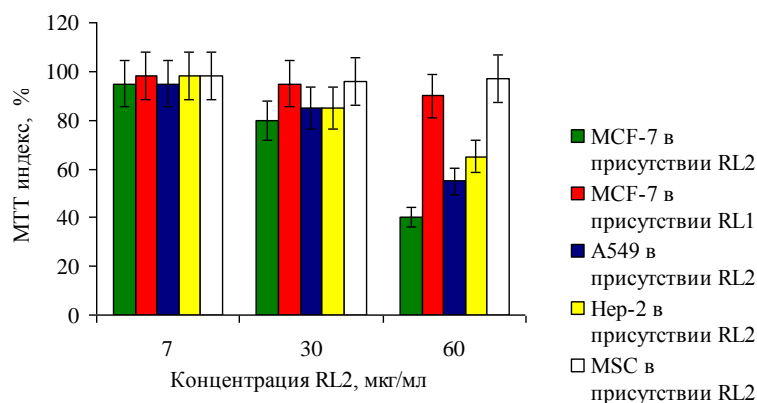


Рис. 4. Анализ жизнеспособности клеток MCF-7, A549, Hep-2 и мезенхимальных стволовых клеток (MSC), инкубированных в полной культуральной среде в присутствии рекомбинантных аналогов лактапина в разных концентрациях.

За 100 % принята жизнеспособность клеток, инкубированных в отсутствие аналогов. Приведены результаты трех независимых экспериментов

клетки (вдоль главной диагонали); G2 – окрашиваемые аннексином V – апоптотические клетки; G3 – интенсивно окрашиваемые пропидий йодидом – вторичные некротические клетки. Неоткрепленные клетки при разных временах инкубации клеток с RL2 представлены в основном живыми клетками (G1) с небольшим вкладом вторичных некротических (G3 до 7%) и, в пределах ошибки 10%, апоптотическими (G2). Необходимо подчеркнуть, что появление субпопуляции MCF-7 G2 (окрашиваемых аннексином V, но не окрашиваемых PI) непосредственно доказывает индукцию апоптотической гибели клеток аденокарциномы MCF-7 рекомбинантным аналогом лактапина RL2.

Относительное количество клеток аденокарциномы MCF-7, погибающих по механизму апоптоза под действием RL2, увеличивается с 53 (24 ч) до 60% (48 ч), а затем уменьшается до 55% (72 ч) (см. рис. 5, субпопуляция G2). При этом происходит увеличение субпопуляции некротических клеток G3 от 17 (24 ч) до 23% (72 ч) на фоне небольшого снижения вклада жизнеспособных клеток с 15 до 13%. Эти данные показывают, что прирост числа некротических клеток происходит благодаря убыли апоптотических. Следовательно, некротические клетки являются вторичными некротическими, т. е. результатом апоптотической гибели. Таким образом, в исследуемых образцах общее число клеток, погибающих и погибших по механизму апоптоза, пред-

ставлено суммой клеток субпопуляций G2 и G3.

Известно, что клетки MCF-7 несут делецию 47 п. н. в III экзоне гена каспазы 3. Результатом делеции является продукция «дефектной» мРНК каспазы 3 со сдвигом рамки считывания и с «преждевременным» терминирующим кодоном. Поэтому в клетках MCF-7 отсутствует ключевой фермент апоптотического каскада – каспаза 3. Отсутствие каспазы 3 в клетках приводит к тому, что апоптоз под действием ФНО-α с активацией инициаторной каспазы 8 характеризуется низким уровнем активации ДНКазы DFF40 / CAD и не сопровождается олигонуклеосомной фрагментацией ядерной ДНК [14]. Тем не менее ближайший структурный и функциональный гомолог каспазы 3 каспаза 7 может частично компенсировать отсутствие каспазы 3 при апоптозе, инициируемом митохондриальными факторами. Так, например, предложен механизм апоптотической гибели MCF-7 под действием жирных кислот, которая инициируется диссипацией трансмембранного потенциала митохондрий, сопровождается масштабной активацией каспазы 9, что приводит к активации каспазы 7, которая, в свою очередь, активирует DFF40/CAD-подобную ДНКазу и инициирует олигонуклеосомную фрагментацию ДНК [15].

Для оценки вклада экзекьюторных каспаз в процесс гибели клеток MCF-7 под действием RL2 мы провели анализ ДНК клеток на разных стадиях их гибели. Установле-

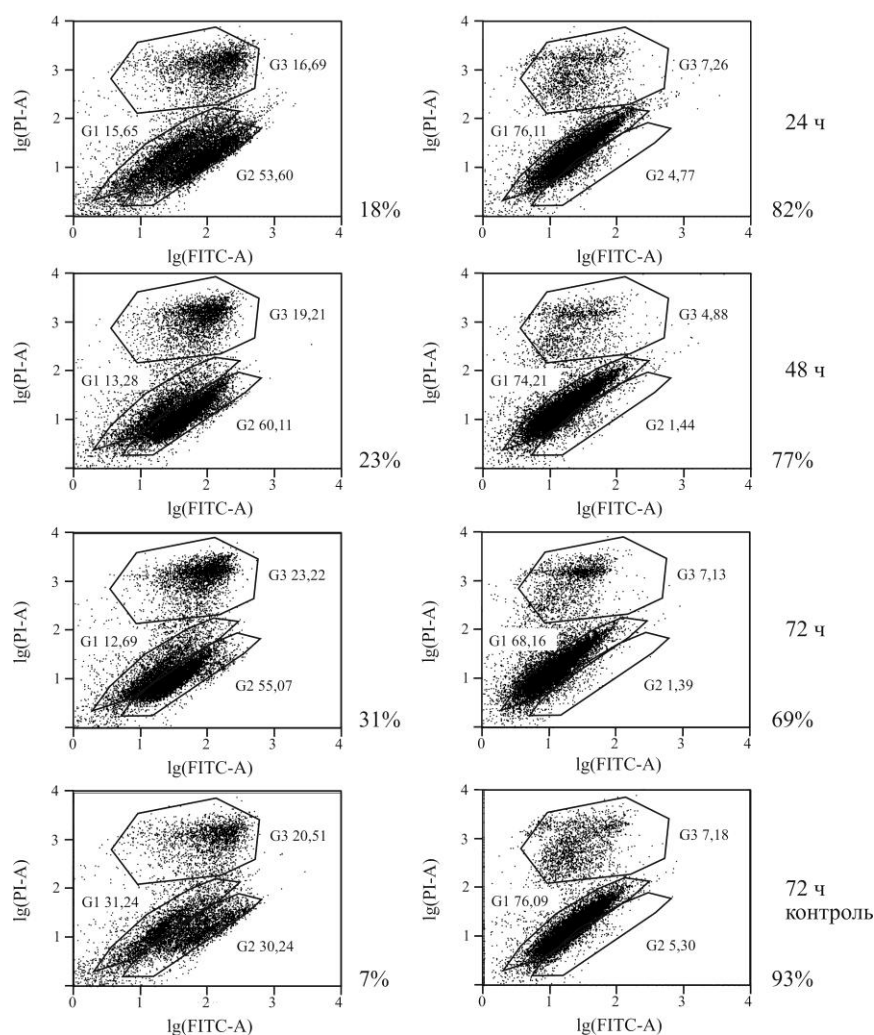


Рис. 5. Гистограммы распределения клеток MCF-7 по интенсивности окраски FITC меченным аннексином V (по оси X) и пропидий йодидом (по оси Y).

Клетки инкубировали с рекомбинантным аналогом лактапина RL2 (24, 48, 72 ч) и без аналога (72 ч, контроль), после чего прикрепившиеся (монослой) и открепленные клетки окрашивали FITC-аннексином V / PI и анализировали проточной цитометрией; G1, G2, G3 – субпопуляции клеток. Границы субпопуляций указаны линиями. Справа от гистограмм приведено относительное количество клеток во фракциях

но, что при инкубации клеток в течение 3 сут. в присутствии аналога лактапина RL2 не происходило фрагментации ядерной ДНК. Олигонуклеосомная фрагментация ДНК на глубину 10–20 % выявлена лишь при длительной (5 сут.) инкубации клеток с фактором (данные не иллюстрированы). Следовательно, можно заключить, что апоптоз раковых клеток MCF-7, индуцируемый RL2, характеризуется низким уровнем активации ДНКазы DFF40 / CAD, что непосредственно указывает на низкий уровень активации каспазы 7.

Полученные данные также позволяют предположить, что апоптоз MCF-7 под действием лактапина и его аналогов – это

процесс, в котором митохондриальные факторы (каспаза 9) играют лишь второстепенную роль, а индукция процесса, по-видимому, происходит по рецептор-опосредованному механизму. Косвенно это предположение подтверждается данными о различной чувствительности раковых эпителиоцитов к действию аналога лактапина, которая убывает в ряду MCF-7, A549, Hep-2 и может быть объяснена скорее различиями в уровне экспрессии клеточных рецепторов, чем различиями в экспрессии или эффективности активации митохондриальных факторов.

Тот факт, что в отличие от раковых клеток человека, погибающих (MCF-7) или

снижающих жизнеспособность (A549, Hep-2) под действием аналога лактапина немалигнизированные мезенхимальные клетки человека резистентны к действию RL2, позволяет заключить, что структура идентифицированного нами пептида представляет собой перспективную основу для создания нового селективного к раковым клеткам и низкотоксичного по отношению к немалигнизированным клеткам средства терапии онкологических заболеваний человека.

### Выводы

1. Получены клетки *E. coli* – продуценты рекомбинантных аналогов пептида – лактапина, протеолитического фрагмента к-казеина, присутствующего в молоке человека и способного вызывать апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7.

2. Установлено, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 представлен гомодимером, в котором мономеры образуют Cys30-Cys30 S-S дисульфидную связь.

3. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает апоптотическую гибель клеток аденокарциномы человека MCF-7 и снижает жизнеспособность раковых эпителиоцитов легкого A549 и гортани Hep-2 в культуре.

4. Определено, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 не влияет на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, что позволяет использовать лактапин, а также его аналоги для создания новых средств терапии больных с онкологическими заболеваниями.

### Список литературы

1. Reed J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer // *Cancer Cell*. 2003. Vol. 3. P. 17–22.
2. Buescher E. S., McWilliams-Koepfen P. Soluble tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in human colostrum and milk bind to TNF-alpha and neutralize TNF-alpha bioactivity // *Pediatr. Res*. 1998. Vol. 44, № 1. P. 37–42.
3. Svensson M., Sabharwal H., Hakanaaon A., Mossberg A., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C., Linse S. Molecular characteri-

zation of  $\alpha$ -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells // *J. Biol. Chem*. 1999. Vol. 274, № 10. P. 6388–6396.

4. Kanyshkova T. G., Babina S. E., Semenov D. V., Isaeva N., Vlassov A. V., Neustroev K. N., Kul'minskaya A. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin // *Eur. J. Biochem*. 2003. Vol. 270, № 16. P. 3353–3361.

5. Roy M. K., Kuwabara Y., Hara K., Watanabe Y., Tamai Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells // *J. Dairy Sci*. 2002. Vol. 85, № 9. P. 2065–2074.

6. Некипелая В. В., Семенов Д. В., Потапенко М. О., Кулигина Е. В., Кум Ю. Я., Романова И. В., Рухтер В. А. Лактапин – белок человеческого молока, индуцирующий апоптоз клеток аденокарциномы MCF-7 // Докл. Академии Наук. 2008. Т. 419, № 2. С. 268–271.

7. Власов В. В., Рухтер В. А., Семенов Д. В., Некипелая В. В., Кулигина Е. В., Потапенко М. О. Пептид, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам человека // Патент РФ № 2317304. 2008. Бюл. № 5.

8. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning a laboratory manual*. N. Y., 2001. Vol. 3.

9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

10. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies // *Tissue Eng*. 2001. Vol. 7. P. 211–228.

11. Mosmann T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65. P. 55–63.

12. Slattery C. W., Sood S. M., Chang P. Hydrophobic interactions in human casein micelle formation: beta-casein aggregation // *J. Dairy Res*. 1989. Vol. 56, № 3. P. 427–433.

13. Elmor S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathol*. 2007. Vol. 35. P. 495–516.

14. Janicke R. U., Sprengart M. L., Wati M. R., Porter A. G. Caspase 3 is required for DNA fragmentation and morphological changes as-



sociated with apoptosis // J. Biol. Chem. 1998 Vol. 273. P. 9357–9360.

15. *Semenov D. V., Aronov P. A., Kuligina E. V., Potapenko M. O., Richter V. A.* Oligonucleosome DNA fragmentation of caspase 3

deficient MCF-7 cells in palmitate-induced apoptosis // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2004. Vol. 23. P. 831–836.

*Материал поступил в редколлегию 10.06.2009*

**A. S. Fomin, D. V. Semenov, E. V. Kuligina, O. A. Koval,  
I. N. Babkina, N. V. Tikunova, V. A. Matveeva, L. E. Matveev, V. A. Richter**

### **Genetically Engineered Analogs of Potentially Anti-Tumor Peptide – Lactaptin**

The induction of apoptosis of cancer cells by peptides specific to tumor is the perspective basis for the design of new antitumor pharmacological agents. Previously we have shown that human milk contains the peptide – photolytic fragment of  $\kappa$ -casein (lactaptin) that is capable to inducing the apoptotic death of human mammary adenocarcinoma cells MCF-7. In the present work we have designed plasmids, coding recombinant analogs of lactaptin, developed E. coli producer strains and obtained recombinant analogs of this protein (RL1, RL2). The influence of lactaptin recombinant analogs on viability of MCF-7, A549, Hep-2 cancer cells and MSC of human adipose tissue also has been determined. It was shown that viability of MCF-7, A549 and Hep-2 cells was significantly reduced (by 62, 45 and 30 % respectively after 3 days of incubation) during the incubation in the presence of RL2-analog. It was also shown that RL2 analog induced the apoptotic death of MCF-7 cells, but didn't decrease the viability and didn't induce the apoptosis of MSC cells. Our data point out that lactaptin and its analogs structure could be used as basis for design of new anticancer therapeutic drugs.

*Keywords:* apoptosis, cultures of tumor cells, human mesenchymal stem cells, lactaptin.