

Цитотоксичные катионные пептиды как лиганды рецепторного нуклеолина

А.А. Лушникова¹, А.В. Костарев², Д.А. Понкратова¹, А.В. Онян¹, Е.Г. Глубокова¹, С.М. Андреев³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ломоносовский проспект, 27;

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Александровна Лушникова LAN21@yandex.ru

Введение. Шаперонные белки нуклеолин (NCL, или C23) и нуклеофозмин (NPM, или B23) регулируют ключевые клеточные функции. Для большинства опухолей характерна гиперэкспрессия этих белков, особенно в клеточных ядрах, а рецепторного NCL – также и на поверхности опухолевых клеток. Дифференциальная экспрессия NCL/NPM в опухолевых и нормальных клетках обуславливает избирательную цитотоксичность катионных пептидов – предполагаемых лигандов этих белков.

Цель исследования – анализ взаимодействий между нуклеолином и некоторыми пептидами, обладающими высокой избирательной токсичностью в отношении опухолевых клеток.

Материалы и методы. Путем парного молекулярного докинга с использованием программы Maestro 11 проанализировано взаимодействие 4 ранее охарактеризованных катионных пептидов с димером нуклеолина.

Результаты и заключение. Показано, что эти пептиды могут ассоциировать с молекулами рецепторного нуклеолина за счет стабильных водородных связей, образуя энергетически устойчивые комплексы. В активном центре рецепторного NCL обнаружено не менее 7 аминокислотных сайтов, которые с высокой частотой (43–100 %) связываются с тестированными пептидами. Это указывает на консервативность структуры димерного NCL, стабильное связывание его с пептидными лигандами и возможность синтеза оптимальных по молекулярной структуре катионных пептидов, индуцирующих гибель опухолевых клеток за счет конкурирующего связывания с белками-мишенями.

Ключевые слова: злокачественная опухоль, нуклеолин, катионные пептиды, молекулярный докинг

Для цитирования: Лушникова А.А., Костарев А.В., Понкратова Д.А. и др. Цитотоксичные катионные пептиды как лиганды рецепторного нуклеолина. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):59–64.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-59-64

Cytotoxic cationic peptides as a ligands for receptor nucleolin

A.A. Lushnikova¹, A.V. Kostarev², D.A. Ponkratova¹, A.V. Onyan¹, E.G. Glubokova¹, S.M. Andreev³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 27 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³Immunology Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; 24, Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Chaperone proteins nucleolin (NCL, or C23) and nucleophosmin (NPM, or B23) regulate key cell functions. The most tumors are characterized by over-expression of these proteins, especially in cell nuclei and on the cell surface, as NCL. Differential expression of NCL/NPM in tumor and normal cells is the basis of selective cytotoxicity of cationic peptides – expected ligands for these proteins.

Objective. Analysis of the interactions between nucleolin and some peptides with high nonspecific toxicity for tumor cells.

Materials and methods. The interaction of 4 previously characterized cationic peptides with nucleolin dimer was analyzed by pair molecular docking using Maestro 11 program.

Results and conclusion. It is shown that these peptides can associate with receptor nucleolin molecules, forming energy-stable complexes. In the active centre of NCL molecule were found, at least, 7 positions of amino acids, which bind to the tested peptides at a high frequency (43–100 %). This indicates the conservative structure of dimer NCL, its stable binding to peptide ligands and the possibility of design the optimal structure of cationic peptides that induce tumor cell death due to competing binding to the target proteins.

Key words: malignant tumor, nucleolin, cationic peptide, molecular docking

For citation: Lushnikova A.A., Kostarev A.V., Ponkratova D.A. et al. Cytotoxic cationic peptides as a ligands for receptor nucleolin. Uspexhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(3):59–64.

Введение

Шаперонные белки нуклеолин (NCL, или C23) и нуклеофозмин (NPM, или B23) – мультифункциональные протеины, регулирующие транскрипцию и трансляцию, синтез РНК, сборку хроматина и веретена деления, биогенез рибосом и другие жизненно важные клеточные процессы. Они контролируют клеточную пролиферацию, апоптоз, молекулярный транспорт и сигналинг. Для этих белков характерен высокий уровень экспрессии в быстрорастущих опухолевых клетках, преимущественно в ядрах, а нуклеолина – также и на клеточной поверхности. Представленные на мембране клеток в гликозилированной или фосфорилированной форме молекулы нуклеолина участвуют в интернализации различных лигандов, включая синтетические агенты для противоопухолевой терапии [1, 2].

Ранее мы обнаружили, что ряд низкомолекулярных катионных пептидов, обогащенных аргинином и лизином (R/K), с линейной или дендритной структурой обладает избирательной токсичностью *in vitro* в отношении клеток меланомы кожи человека, рака поджелудочной железы, глиобластомы, рака яичников, доксорубицин-устойчивой опухоли молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и гепатобластомы, светлоклеточного рака почки, множественной миеломы [3]. Эти пептиды малотоксичны для нормальных клеток, устойчивы к биодеградации и представляют интерес для дальнейшего изучения.

На модельных клеточных линиях меланомы mel IS, mel H, mel Ki, рака почки, глиобластомы Glib и некоторых других выявлена дифференциальная гиперэкспрессия NCL/NPM по отношению к морфологически нормальным клеткам [4]. Скрининг коллекции катионных пептидов с помощью МТТ-теста позволил охарактеризовать 7 пептидов с высокой избирательной цитотоксичностью. Показано, что флуоресцентно меченный цианином пептид Су5-NC811 проникает в клетки и колокализуется в ядре вместе с молекулами нуклеолина и нуклеофозмина, что указывает на участие в его транспорте белков NCL и NPM [5]. Однако механизм связывания рецепторного нуклеолина с ка-

тионными пептидами остается невыясненным. Анализ взаимодействия некоторых катионных пептидов с их предполагаемой мишенью – рецепторным нуклеолином – возможен с помощью молекулярного докинга (стыковки), позволяющего выявить сайты взаимодействия лигандов с белком-мишенью и получить оптимальную пространственную структуру комплекса пептид – нуклеолин, а также определить тип межмолекулярного связывания для дизайна катионных пептидов, перспективных в плане малотоксичной молекулярно направленной противоопухолевой терапии.

Материалы и методы

В качестве предполагаемых лигандов молекул рецепторного NCL отобраны 4 катионных пептида, характеристики которых приведены в табл. 1.

В качестве эталонного белка-мишени выбрана кристаллическая структура нуклеолина, полученная путем магнитно-резонансной спектроскопии, включающая 1 цепь, 102 аминокислотных остатка (PDB, Protein Data Bank 2FC8), с учетом димеризации рецепторного нуклеолина. Моделирование межмолекулярных взаимодействий выполнено с помощью программы Maestro 11 [6]. Предварительная подготовка заключалась в протонировании (pH 7,0) белка и однократной минимизации структуры по силовому полю OPLS3 во избежание деформации трехмерной структуры белка. Поскольку сайты связывания между молекулами пептида и нуклеолина пока не картированы, для выбора области связывания использовали докинг-бокс максимального объема с ребром, равным 36Å, захватывающий весь белок. Сетку потенциалов с использованием максимальных значений оценочной функции (glide score) вычисляли для всей молекулы белка. В молекуле каждого из 4 тестируемых пептидов были выделены фрагменты, обогащенные зараженными аминокислотами. В результате для каждого предварительно протонированного (pH 7,0) лиганда получено по 4 пространственных конформера с 4 конфигурациями (позами), для которых просчитаны значения оценочной функции.

Таблица 1. Основные свойства тестируемых катионных пептидов

Table 1. Main characteristics of the tested cationic peptides

Номер Number	Название и формула катионного пептида Name and formula of the cationic peptide	Молекулярная масса, Да/заряд Molecular mass, Da/charge	Эффективная концентрация, мкг/мл Effective concentration, µg/mL	Процент выживших клеток в разных линиях, МТТ-тест vs контроль (100 %), C = 1 мкг/мл Percent of survived cells in various lines, MTT assay vs control (100 %), C = 1 µg/mL
1	NC-811/(R) ₈ (K) ₄ (K)2KAC-NH ₂	2338/16+	≥0,75	8–10
2	NC-810/Palm-CKRRRRRRRRRR	2307/12+	≥0,25	12–23
3	NC-783/KRRGGGKLLKLLKLLKLLK	2505/9+	≥0,25	8–12
4	AM-2/Mir-KRPARPAR-NH ₂	1391/4+	≥0,50	6–9

Для молекулярного докинга использовали описанную ранее процедуру поиска в молекуле белка сайтов связывания для тестируемых лигандов [7, 8]. Сайты связывания лигандов с нуклеолином и последующее позиционирование лиганда выполняли с учетом максимального значения оценочной функции. При моделировании процесса докинга вычисляются попарные энергии взаимодействия в сайтах связывания мишени и лиганда [9]. Анализировали средние частоты связывания аминокислот в активном центре рецепторного нуклеолина с лигандами и энергию связей (ккал/моль).

Результаты и обсуждение

Анализ попарного связывания нуклеолина (белок-мишень) с катионными пептидами (лиганды) показал, что большинство пептидных фрагментов связывается с активным центром нуклеолина со значениями оценочной функции $>6,50$ по модулю. Водородные связи между аминокислотами в составе нуклеоина и пептидного лиганда формируются не случайным образом. В 5 позициях аминокислот активного центра NCL средняя частота формирования водородных связей превысила 70 %, аспарагиновая кислота в позиции 87 связывалась со всеми фрагментами пептидов – тестируемых лигандов NCL (табл. 2). Отметим, что аргинин и лизин, представленные в составе всех тестируемых пептидов в виде повторов, также взаимодействуют с активным центром нуклеолина.

Для подтверждения этого наблюдения аминокислоты, с которыми пептидные лиганды связывались наиболее часто, использовали для процедуры Induced fit-докинга [10].

Программа произвольно изменяла подвижность и пространственную ориентацию лидерных аминокислот, докинг-бокс с ребром 26Å был центрирован на

Таблица 2. Средние частоты образования водородных связей между пептидными лигандами-лидерами и активным центром нуклеолина
Table 2. Mean frequencies of hydrogen bond formation between leader peptide ligands and nucleolin active site

Аминокислота в молекуле нуклеолина, позиция Amino acid in nucleolin molecule, position	Частота связей с лигандом, % Frequency of ligand binding, %
GLU29	71
ARG43	71
THR46	43
ASP60	71
ASP87	100
ALA89	29
LYS90	71
PRO91	29

конкретную область с анализируемой аминокислотой. Однако оценочные функции при Induced fit-докинге оказались близки к модульным значениям, полученным в режиме докинга, за исключением NC-810-1_1 с преобладанием аргинина/R (рис. 1).

Эти данные свидетельствуют об относительной стабильности структуры сайтов связывания белок – лиганд в активном центре нуклеолина, что отражает консервативную структуру NCL в целом. Действительно, нуклеолин – один из наиболее функционально важных для клетки белков – эволюционно консервативен. По-видимому, указанные аминокислоты играют ключевую роль во взаимодействии лигандов с димером нуклеолина путем образования стабильных водородных связей, и эти аминокислотные остатки можно

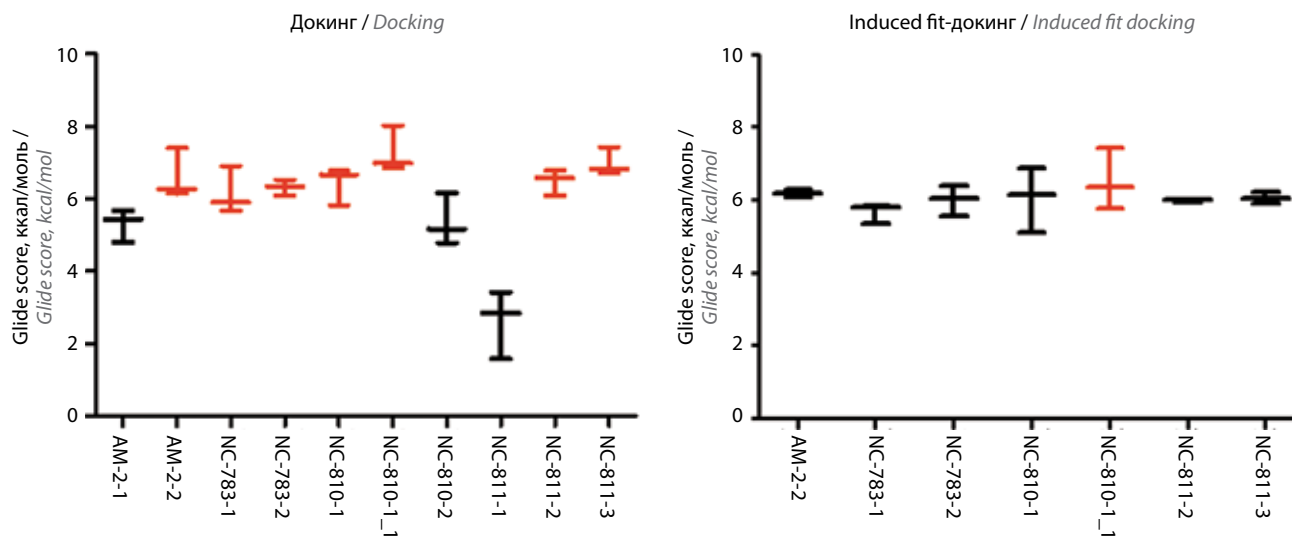


Рис. 1. Результаты докинга и Induced fit-докинга с фрагментами 4 катионных пептидов (ось абсцисс). Указаны модули средних значений функции (ось ординат). Красным выделены лиганды с максимальными значениями оценочной функции (glide score)

Fig. 1. Docking and Induced Fit docking results for 4 fragments of cationic peptides (X axis). Modules of mean function values are indicated (Y axis). Ligands with maximal glide scores are shown in red

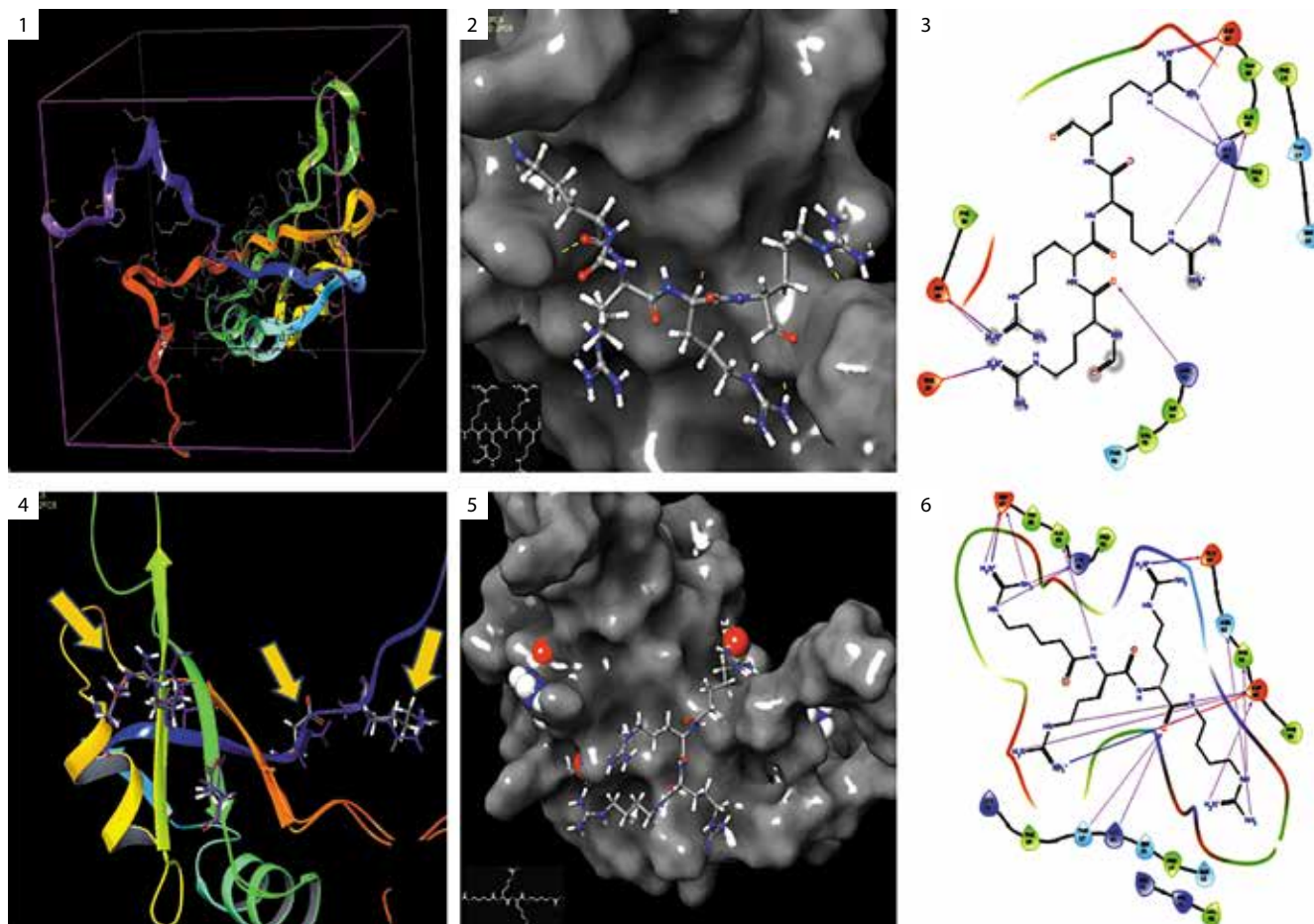


Рис. 2. Молекулярный докинг фрагментов пептида NC-810 и белка нуклеолина: 1 – подготовленная трехмерная структура нуклеолина 2FC8 (протонирование, минимизация) в докинг-боксе с ребром 36Å; 2 – позиционированный фрагмент пептида NC-810_1, оценочная функция 6,79 ккал/моль; 3 – схема взаимодействия лиганда с сайтами связывания NCL (п. 2); фиолетовым отмечены водородные связи; 4 – белок с подвижными аминокислотами (Induced fit): видны спиральные вторичные структуры белка; фиолетовым отмечены позиции аминокислот в исходной структуре нуклеолина, желтыми стрелками показан сдвиг аминокислот; 5 – Induced fit-докинг фрагмента пептида NC-810_1_16, оценочная функция 7,43 ккал/моль; красным выделены подвижные аминокислоты; 6 – схема взаимодействия лиганда с сайтами NCL (п. 5); фиолетовым отмечены водородные связи

Fig. 2. Molecular docking of NC-810 peptide fragments and nucleolin: 1 – prepared 3D structure of nucleolin 2FC8 (protonation, minimization) in a docking box with 36Å edge; 2 – positioned fragment of peptide NC-810_1, glide score 6.79 kcal/mol; 3 – ligand interaction scheme for NCL binding sites (n. 2); hydrogen bonds are shown in violet; 4 – protein with mobile amino acids (Induced Fit): spiral secondary protein structure is visible; amino acid positions in the initial nucleolin structure are shown in violet, yellow arrows indicate shifts of amino acids; 5 – Induced Fit docking of peptide NC-810_1_16 fragment, glide score 7.43 kcal/mol; mobile amino acids are shown in red; 6 – ligand interaction with NCL sites (n. 5); hydrogen bonds are shown in violet

считать неспецифичными сайтами связывания с высокими значениями оценочной функции.

Взаимодействие катионных пептидов с активным центром нуклеолина моделировали путем молекулярного докинга пептидных фрагментов и сайтов связывания, локализованных программой в активном центре белка (рис. 2). Аналогичным образом проанализированы закономерности связывания рецепторного нуклеолина с 3 другими катионными пептидами – AM-2, NC-783 и NC-811 (рис. 3).

В последнее время рецепторный нуклеолин, гиперэкспрессированный на поверхности опухолевых клеток, рассматривают в качестве удобной мишени для получения трехмерного изображения опухолей неинвазивным методом с использованием флуоресцентно меченных лигандов NCL или конструкций с мечены-

ми антителами к NCL, например псевдопептидов. Эти конструкции используются также для прицельной доставки в опухолевые клетки терапевтических препаратов [11, 12]. Некоторые катионные пептиды, индуцирующие апоптоз опухолевых клеток в концентрации порядка 0,5 мкл/мл, представляют не меньший интерес как потенциальные малотоксичные таргетные препараты широкого спектра действия. С помощью молекулярного докинга нам удалось показать, что в основе такой активности пептидов с R/K-обогащенной структурой молекулы лежит связывание их с активным центром рецепторного нуклеолина, что создает предпосылки для активного транспорта пептида в опухолевые клетки и быстрое накопление его в ядре с последующим апоптозом [5]. При этом в формировании сайтов связывания участвует определенный набор

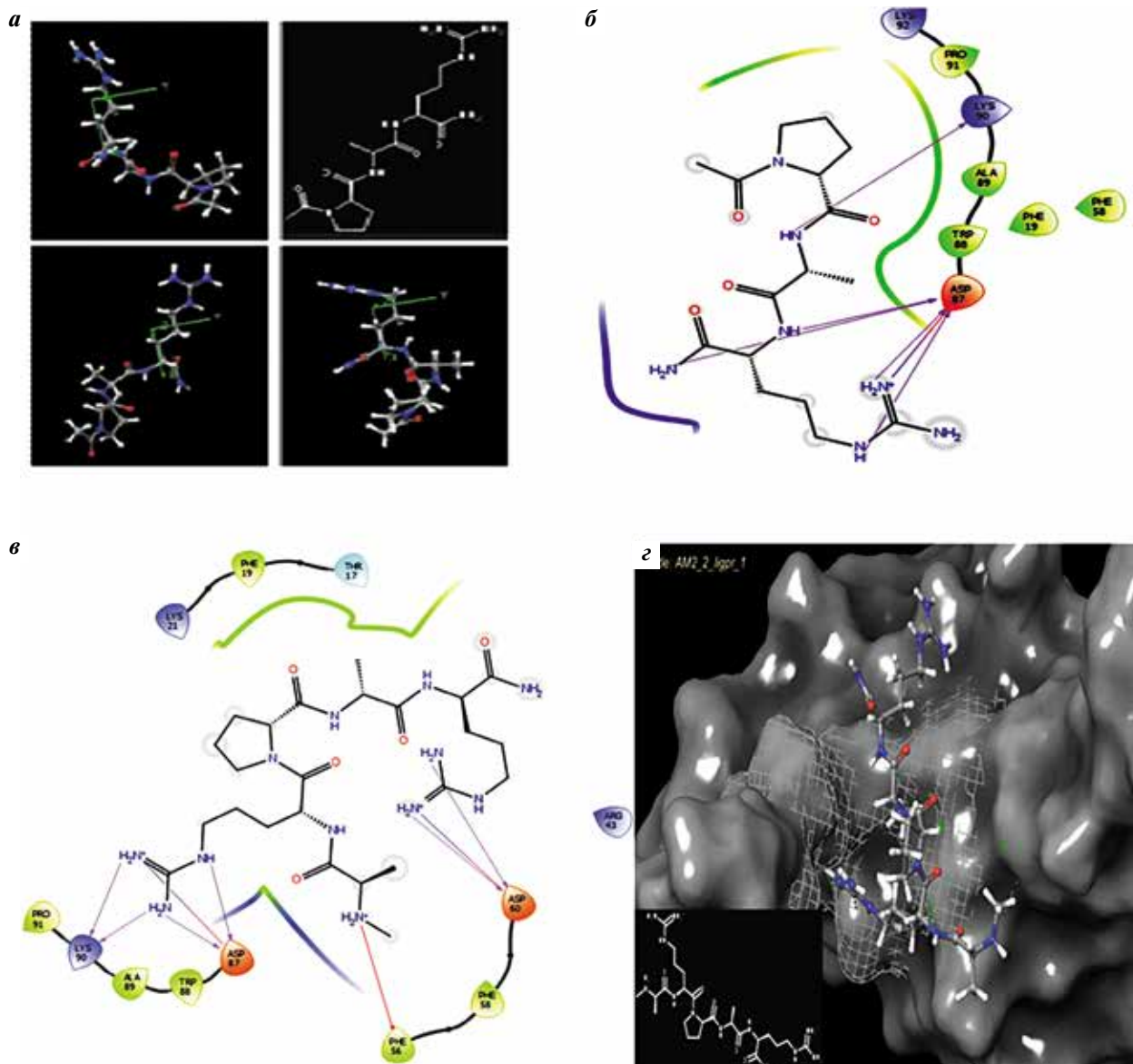


Рис. 3. Изомеризация фрагментов пептида AM-2 (а) и результаты моделирования их взаимодействия с активным центром NCL. Показаны наиболее стабильные сайты связывания — Asp87, Lys90 (б) и Phe56, Asp60, Asp87, Lys90 (в) в домене димера NCL и оптимальная ориентация кластера AM-2 (врезка внизу) в координатной сетке (г)

Fig. 3. AM-2 peptide fragment isomerization (a) and modeling results for their interaction with NCL active site. The most stable binding sites: Asp87, Lys90 (b) and Phe56, Asp60, Asp87, Lys90 (c) in NCL dimer domain and optimal orientation of AM-2 cluster (lower panel) in the coordinate grid (d) are shown

аминокислот со стабильной позицией и высокими значениями оценочной функции.

Заключение

Тестированные с помощью молекулярного докинга катионные пептиды можно рассматривать как лиганды NCL, а высокоэкспрессированный на поверхности

опухолевых клеток рецепторный нуклеолин — как их мишень. На основании максимальных значений оценочной функции для сайтов связывания стабильного активного центра NCL возможно моделирование оптимальных по структуре пептидных лигандов с избирательной цитотоксичностью в отношении опухолей, для которых характерен высокий профиль экспрессии нуклеолина.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Fujiki H., Watanabe T., Suganuma M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140(7):689–99. DOI: 10.1007/s00432-014-1587-5. PMID: 24469254.
2. Koutsoumpa M., Papadimitriou E. Cell-surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent Part Anticancer Drug Discov* 2018;9(2):137–52. PMID: 24251811.
3. Lushnikova A., Ponkratova D., Andreev S. et al. A possibility for therapy of metastatic cutaneous melanoma with cationic peptides. *Eur J Cancer* 2017;72(SI): 127–28.
4. Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Rudakova A.A. et al. The mechanisms of antitumor toxicity in a number of cationic peptides. *Modern Science* 2017;11:124–6.
5. Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Morozova L.F., Andreev S.M. Induction of apoptosis in cutaneous melanoma cells by cationic peptides. *Int Sci J* 2017;7–2(61):75–9.
6. Dang W., Muto Y., Inoue Y. et al. RCSB PDB TI Solution structure of the RRM_1 domain of NCL protein. *FAUCRDT* 2005;12(12). Available at: <http://www.rcsb.org/structure/2FC8>.
7. Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins* 2004;57(2):225–42. DOI: 10.1002/prot.20149. PMID: 15340911.
8. Site Map User Manual. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2009.
9. Glide User Manual. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2015.
10. Induced Fit Docking. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2009.
11. Du X., Li Y., Xia Y.L. et al. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):144–78. DOI: 10.3390/ijms17020144. PMID: 26821017.
12. Balça-Silva J., do Carmo A., Tão H. et al. Nucleolin is expressed in patient-derived samples and glioblastoma cells, enabling improved intracellular drug delivery and cytotoxicity. *Exp Cell Res* 2018;370(1): 68–77. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.06.005. PMID: 29902537.

Вклад авторов

А.А. Лушникова: дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 А.В. Костарев: биоинформационный анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
 Д.А. Понкратова: получение данных и их анализ;
 А.В. Онян, Е.Г. Глубокова, С.М. Андреев: получение данных для анализа.

Authors' contributions

A.A. Lushnikova: research design, analysis of the obtained data, article writing;
 A.V. Kostarev: bioinformation analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
 D.A. Ponkratova: obtaining data and analysis;
 A.V. Onyan, E.G. Glubokova, S.M. Andreev: obtaining data and analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.А. Лушникова/A.A. Lushnikova: <https://orcid.org/0000-0002-7838-1005>
 А.В. Костарев/A.V. Kostarev: <https://orcid.org/0000-0001-8040-5929>
 Д.А. Понкратова/D.A. Ponkratova: <https://orcid.org/0000-0002-1624-7556>
 А.В. Онян/A.V. Onyan: <https://orcid.org/0000-0003-0217-2685>
 Е.Г. Глубокова/E.G. Glubokova: <https://orcid.org/0000-0002-1206-287X>
 С.М. Андреев/S.M. Andreev: <https://orcid.org/0000-0001-8297-579X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено с поддержкой по бюджетному финансированию (№ проекта ГЗ 144112440122).

Financing. The study was performed with state financial support (project No 144112440122).

Статья поступила: 26.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 26.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.