

АЗУРИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЙ НОСИТЕЛЬ НА ОСНОВЕ *E. COLI* NISSLE 1917 ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Тихомиров А. Д.¹, Диб Н.¹, Отинов Г. Д.¹, Мохаммад И.¹

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Кошель Е. И.¹

¹Университет ИТМО

tihomirov.alexey.d@mail.ru

Введение

Азурин — это окислительно-восстановительный бактериальный белок, обладающий селективной противоопухолевой активностью за счет стабилизации p53 и подавления онкогенных сигналов. Мы сконструировали модифицированный штамм *E. coli* Nissle 1917 для экспрессии и секреции азурина под контролем промоторов lacUV5 и P_vhb с сигнальным пептидом relB. Будущая работа направлена на изучение синергетических эффектов совместной доставки азурина с дополнительными проапоптотическими белками.

Основная часть

Колоректальный рак (КРР) является одной из ведущих причин смертности от рака. Эффективность стандартной химиотерапии ограничена ее системной токсичностью [1]. Терапия на основе белков предлагает альтернативный подход с более высокой специфичностью и меньшими побочными эффектами [2], но их клиническому применению препятствуют нестабильность и проблемы с доставкой, особенно при пероральном применении [2, 3]. Многообещающей стратегией является использование генетически модифицированных бактерий для доставки противоопухолевых белков непосредственно в область опухоли. Пробиотический штамм *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) может избирательно колонизировать опухоли толстой кишки при пероральном приеме [4]. Клинические исследования показали, что EcN накапливается в опухолевой ткани толстой кишки значительно больше, чем в здоровой ткани [1, 4]. Штамм EcN не обладает факторами вирулентности и быстро выводится из здоровых органов благодаря ЛПС, чувствительным к сыворотке крови, поэтому штамм непатогенен и в высшей степени безопасен [5]. Эти свойства делают EcN привлекательной платформой для целенаправленной микробной терапии колоректального рака.

Азурин – это медьсодержащий белок (~ 14 кДа), выделенный из *Pseudomonas aeruginosa*, который считается мощным противоопухолевым средством. Он избирательно проникает в раковые клетки и индуцирует их апоптоз. Азурин продемонстрировал цитотоксичность в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, включая меланому, рак молочной железы, легких, яичников и колоректальный рак [6]. Азурин взаимодействует с ключевыми механизмами подавления опухоли, например, он образует комплекс с белком p53, предотвращая убиквитинзависимую деградацию этого опухолевого супрессора. Кроме того, азурин ингибирует ангиогенез, блокируя передачу сигнала через VEGFR2 [7]. Сочетание этих эффектов приводит к ингибированию роста и регрессии опухоли, демонстрируя цитотоксическое действие азурина.

В этой работе мы разработали модифицированный штамм *E. coli* Nissle 1917, который продуцирует и выделяет азурин для таргетной терапии КРР. Мы сконструировали плазмиду, несущую ген зрелого азурина под контролем двух типов промоторов: (1) lacUV5 (с Lac оператором) для индуцированной экспрессии и (2) P_vhb (промотор из гена гемоглобина *Vitreoscilla*) для активности в гипоксических условиях,

типичных для микроокружения опухоли. Чтобы обеспечить секрецию целевого белка вне бактериальной клетки, его N-концевая область была соединена с сигнальным пептидом *relB*, который направляет азурин в периплазму, а затем за пределы клетки. Мы проверили экспрессию азурина в штамме *E. coli* BL21 (DE3) при 37°C (используя экспрессионную плазмиду на основе *pET303*), при этом наблюдали высокий уровень синтеза белка. Позже мы модифицировали *EcN* полученной плазмидой и подтвердили присутствие азурина в бактериальном осадке и супернатанте методом вестерн-блоттинга. Мы также смогли проверить герметичность промотора в системе: без индукции IPTG никаких признаков белка обнаружено не было. В настоящее время проводятся эксперименты по оценке эффективности секреции азурина сконструированным *EcN* штаммом и его цитотоксического действия на культуры клеток колоректального рака (HCT116, Caco-2).

Кроме того, мы планируем исследовать синергетические противораковые стратегии с помощью комбинированной доставки азурина с другими проапоптотическими белками. К таким белкам относится *MakA*, бактериальный цитотоксин из холерного вибриона, который избирательно убивает клетки колоректального рака путем дестабилизации лизосом и подавления сигнального пути β -катенина [8]. Мы предполагаем, что комбинированная доставка азурина с таким проапоптотическим фактором усилит гибель опухолевых клеток, одновременно воздействуя на различные механизмы апоптоза.

Выводы

Локальная доставка азурина с использованием *E. coli* Nissle 1917 позволит целенаправленно уничтожать опухолевые клетки в кишечнике с минимальными системными побочными эффектами. Наш подход может открыть новые возможности для разработки безопасных и эффективных биотерапевтических стратегий для лечения КРР.

Литература

1. Gurbatri, C.R., Radford, G.A., Vrbanac, L. et al. Engineering tumor-colonizing *E. coli* Nissle 1917 for detection and treatment of colorectal neoplasia. *Nat Commun* 15, 646 (2024).
2. Leader B., Baca Q. J., Golan D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008. Vol. 7. P. 21–39.
3. Masloh S. et al. Challenges and opportunities in the oral delivery of recombinant biologics // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15. P. 1415.
4. Deeb, N., Otinov, G.D., Mohamed, A. et al. *E. Coli* Nissle 1917 Based Carrier for DNA Delivery into Colorectal Carcinoma Cells. *Russ J Bioorg Chem* 50, 459–466 (2024).
5. Alizadeh S, Esmaili A, Omidi Y. Anti-cancer properties of *Escherichia coli* Nissle 1917 against HT-29 colon cancer cells through regulation of Bax/Bcl-xL and AKT/PTEN signaling pathways. *Iran J Basic Med Sci*. 2020 Jul;23(7):886-893.
6. Huang, F., Shu, Q., Qin, Z. et al. Anticancer Actions of Azurin and Its Derived Peptide p28. *Protein J* 39, 182–189 (2020).
7. Hu J. et al. Structural basis of bacterial effector protein azurin targeting tumor suppressor p53 and inhibiting its ubiquitination // *Communications Biology*. 2023. Vol. 6. P. 59.
8. Toh E. et al. Bacterial protein *MakA* causes suppression of tumour cell proliferation via inhibition of PIP5K1 α /Akt signaling // *Cell Death & Disease*. 2022. Vol. 13. P. 1024.