

УДК 577.1

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕПТИДЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ СТАРЕНИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2015 В.В. Ашапкин^{1*}, Н.С. Линькова^{2,4},
В.Х. Хавинсон^{2,3}, Б.Ф. Ванюшин¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; электронная почта: ashapkin@genebee.msu.ru

² Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии,
197110 Санкт-Петербург; факс: +7(812)230-0049,
электронная почта: linkova@gerontology.ru

³ Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова, 191015 Санкт-Петербург; факс: +7(812)303-5035,
электронная почта: khavinson@gerontology.ru

⁴ Санкт-Петербургский государственный политехнический
университет, 195251 Санкт-Петербург; факс: +7(812)552-6080,
электронная почта: linkova@medfiz.ru

Поступила в редакцию 29.07.14

После доработки 13.09.14

При старении культур клеток поджелудочной железы и бронхиального эпителия человека изменяется уровень экспрессии генов, кодирующих специфические для этих клеток факторы транскрипции и другие функционально важные белки. Пептиды KEDW и AEDL оказывают тканеспецифическое действие на экспрессию генов и синтез белков в культурах клеток поджелудочной железы и бронхиального эпителия, соответственно. В данной работе установлено, что с увеличением возраста культуры и под действием пептидов изменяется профиль метилирования промоторных участков генов *PDX1*, *PAX6*, *NGN3*, *NKX2-1*, *SCGB1A1* и это коррелирует с изменениями в уровне экспрессии этих генов. Устойчивые изменения уровней экспрессии генов могут быть обусловлены изменениями в метилировании промоторных областей. Вместе с тем характер метилирования гена *PAX4* в панкреатических клетках и генов *FOXA1*, *SCGB3A2*, *SFTPA1* в бронхиальных клетках не изменяется с возрастом и при действии пептидов, в то время как уровень их экспрессии изменяется в обоих случаях. Промоторная область гена *FOXA2* в панкреатических клетках содержит небольшое число метилированных CpG-сайтов, степень метилирования которых изменяется с возрастом и при действии пептида KEDW, однако корреляция между этими изменениями и уровнем экспрессии гена не выявлено. В бронхиальных клетках промоторная область гена *FOXA2* полностью неметилирована независимо от возраста культуры, в том числе и при действии пептида AEDL. Изменения в характере метилирования промоторных участков могут быть причиной возрастных и индуцированных пептидами изменений в уровнях экспрессии генов *PDX1*, *PAX6*, *NGN3* в панкреатических клетках и генов *NKX2-1* и *SCGB1A1* в бронхиальных клетках. Экспрессия генов *PAX4*, *FOXA2* в панкреатических клетках и *FOXA1*, *FOXA2*, *SCGB3A2*, *SFTPA1* в бронхиальных, по-видимому, контролируется иными механизмами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: короткие пептиды, метилирование ДНК, транскрипция, дифференцировка клеток, культура панкреатических клеток, культура бронхиальных клеток, факторы дифференцировки.

Ранее установлено, что при старении клеток поджелудочной железы *in vitro* происходит изменение экспрессии ряда генов. Большинство этих генов кодируют белки, играющие существенную роль в дифференцировке панкреатичес-

ких клеток. Добавление пептида KEDW изменяет экспрессию этих генов и синтез соответствующих белков в «молодых», «зрелых» и «старых» культурах клеток [1]. Кроме того, при стрептозотоциновом и аллоксановом сахарном диабете у крыс пептид KEDW снижал уровень глюкозы в крови [2]. У пациентов пожилого возраста с сахарным диабетом 1-го и 2-го типов пептид KEDW снижал уровень глюкозы в крови натощак и при стандартном глюкозотолерантном

Принятые сокращения: ТНТ – точка начала транскрипции, п.н. – пар нуклеотидов, KEDW – пептид H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, AEDL – пептид H-Ala-Glu-Asp-Leu-OH.

* Адресат для корреспонденции.

тесте и уменьшал индекс инсулинорезистентности [3, 4]. При старении клеток бронхиального эпителия *in vitro* происходит снижение уровня экспрессии генов *NKX2-1* и *FOXA1*, кодирующих одноименные факторы транскрипции, а также гена *SCGB3A2*, кодирующего второй секретоглобин семейства 3А [5]. В то же время уровни экспрессии генов *FOXA2* и *SCGB1A1* практически не изменяются. Добавление к бронхиальным клеткам пептида AEDL стимулирует экспрессию генов *NKX2-1* и *SCGB1A1* в «молодых» и «зрелых» культурах клеток и практически не изменяет ее в «старых» культурах. Экспрессия гена *SCGB3A2* под действием пептида повышается только в «зрелых» культурах, гена *FOXA1* — в «зрелых» и «старых» культурах, а гена *FOXA2* — в культурах всех пассажей. Экспрессия генов *MUC4*, *MUC5AC*, *SFTPA1*, кодирующих функционально активные белки бронхиального эпителия, при старении культур прогрессивно уменьшается. Добавление пептида AEDL стимулирует экспрессию *SFTPA1* в культурах всех пассажей, *MUC4* — в «зрелых» и «старых» культурах, *MUC5AC* — только в «молодых» культурах. Кроме того, пептид AEDL стимулирует синтез белков, регулирующих процессы дифференцировки, пролиферации и апоптоза в клетках бронхиального эпителия при их старении. Бронхопротекторные свойства пептида AEDL установлены в моделях острого воспаления легких на животных в результате бактериального повреждения, при хроническом фиброзном воспалительном процессе и сублетальном гипероксическом повреждении легких [6]. Действие пептидов KEDW и AEDL не только избирательно в отношении различных генов, но и тканеспецифично: KEDW действует преимущественно на клетки поджелудочной железы, практически не влияя на клетки бронхиального эпителия, а AEDL — наоборот [6].

Молекулярные механизмы модулирующего действия тетрапептидов на экспрессию генов не выяснены, однако основные закономерности (возрастная и тканевая специфичность, избирательность действия на уровне индивидуальных генов, временные масштабы, включающие множественные клеточные генерации) позволяют предположить, что по своей природе действие пептидов является эпигенетическим. Метилирование цитозинового остатка ДНК является наиболее изученной эпигенетической модификацией генома, играющей существенную роль в устойчивых изменениях активности генов при дифференцировке и старении клеток у млекопитающих [7–12].

В настоящей работе исследовали характер метилирования генов, экспрессия которых мо-

дулируется пептидами KEDW и AEDL, в культурах клеток поджелудочной железы и бронхиального эпителия при их старении, а также возможное влияние тетрапептидов на их метилирование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы культуры эмбриональных клеток поджелудочной железы человека линии MIA PaCa-2 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и эмбриональных клеток бронхиального эпителия человека линии FLECH (Институт гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург).

Исследования проводили с клетками 2-го, 7-го, 14-го пассажей, что соответствовало «молодым», «зрелым» и «старым» культурам в соответствии с рекомендациями Международной ассоциации исследований клеточных культур (США, 2007). Культуры клеток разделяли на экспериментальную и контрольную группы: к первым на каждом пассаже добавляли тетрапептид (KEDW для клеток поджелудочной железы и AEDL для клеток бронхиального эпителия) до конечной концентрации 20 нг/мл, ко вторым — эквивалентный объем физиологического раствора. Клетки поджелудочной железы и бронхиального эпителия культивировали во флаконах площадью 25 см² («JetBiofil», Китай) в 5 мл ростовой среды и в чашках Петри диаметром 3,5 см в 3 мл питательной среды в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (5%-ная CO₂, 37°). Клетки поджелудочной железы культивировали в среде DMEM с добавлением L-глутамина («Билот», Россия), 15%-ной сыворотки плодов коровы SC-BIOL («Билот») и 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина. Бронхиальные эпителиоциты культивировали в среде iMEM с добавлением L-глутамина («Билот»), 10%-ной сыворотки плодов коровы SC-BIOL («Билот») и 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина. Для посева клеток в соотношении 3 : 1 использовали раствор трипсина-версена.

Выделение ДНК из клеток и ее обработку бисульфитом натрия осуществляли с помощью наборов QIAamp DNA Mini Kit и EpiTest Bisulfite Kit («Qiagen», Германия) по прописям, рекомендуемым фирмой-производителем. Праймеры для амплификации участков генов на модифицированной бисульфитом геномной ДНК конструировали с помощью on-line сервиса BiSearch [13, 14]. При этом выбирали участки, соответствующие CpG-островкам (CGI) вблизи точки инициации транскрипции или, в случае отсутствия островков, области, непосредственно предшествующей точке инициации транс-

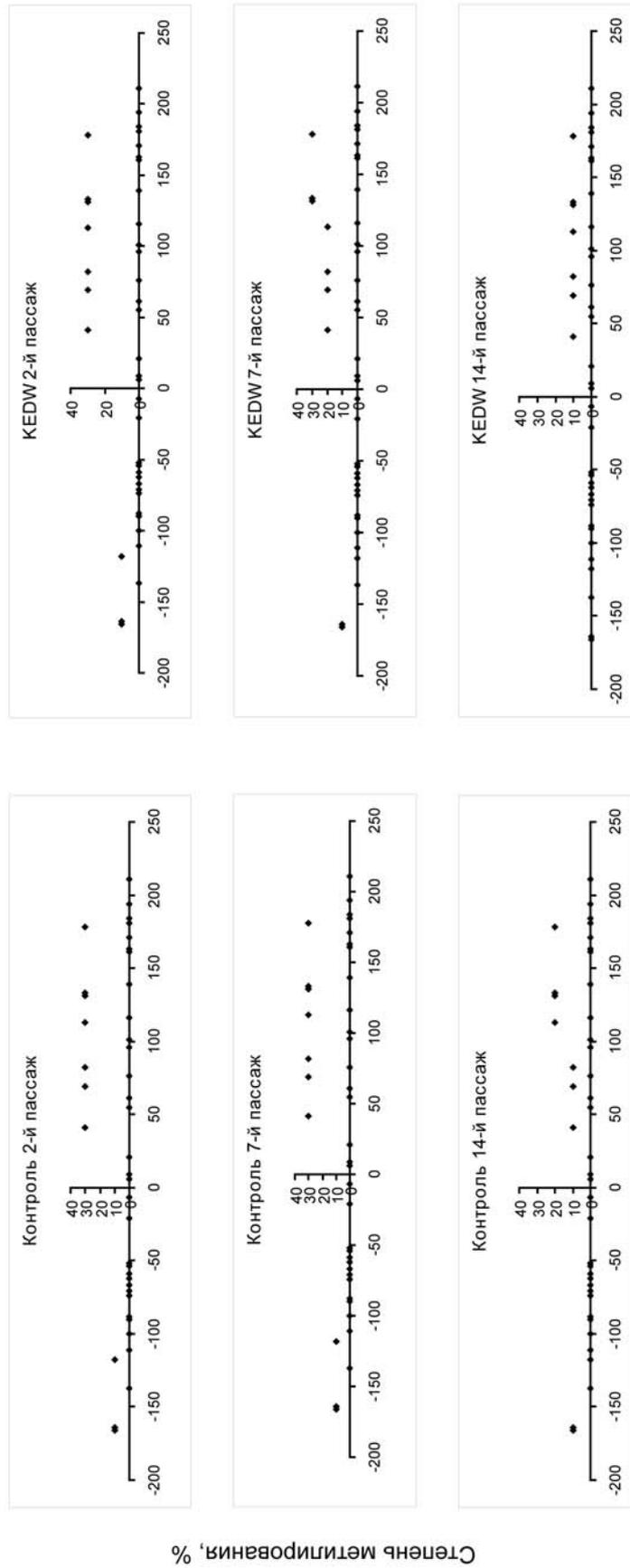
крипции. Амплификацию осуществляли в два этапа со сменой одного из праймеров на более внутренний на втором этапе. В качестве матрицы на втором этапе использовали 2 мкл порции ПЦР-смеси, полученной на первом этапе. ПЦР проводили на приборе ДТ-322 («ДНК-технология», Россия) с помощью набора для амплификации qPCRMix-HS SYBR + ROX («Евроген», Россия). Условия амплификации: 95°—5 мин (денатурация матрицы — активация полимеразы), затем 40 циклов: 95° — 30 с, 52—56° (в зависимости от температуры плавления праймеров) — 30 с, 72° — 45 с, финальная элонгация — 72° — 2 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 2%-ной агарозе, дискретные продукты ожидаемой длины быстро вырезали при длинноволновом УФ свете (310 нм) и ДНК из них экстрагировали и очищали с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen»). Секвенирование полученных фрагментов проводили в ЦКП «Геном» (<http://www.genome-centre.ru/>) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Applied Biosystems», США). Визуализацию результатов секвенирования и их экспорт в формате fasta осуществляли с помощью программы Sequence Scanner (<http://www.applied-biosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html>), а дальнейшую обработку с помощью онлайн-сервиса Meth Tools 2.0 [15]. Степень метилирования индивидуальных частично метилированных сайтов оценивали по соотношению площадей соответствующих пиков цитозина и тимина на четырехцветных электрофореграммах, выдаваемых секвенатором [16, 17]. Среднее арифметическое от трех независимых определений в биологических параллелях округляли до ближайшего числа, кратного десяти.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены паттерны метилирования CpG-островок, ассоциированного с промоторной областью гена *PDX1*, в клетках поджелудочной железы. Этот ген кодирует белковый фактор транскрипции, контролирующий развитие поджелудочной железы на ранних этапах [18]. Ранее выявлено, что в «молодых» и «зрелых» культурах клеток поджелудочной железы уровни экспрессии этого гена одинаковы, а в «старых» — примерно в 1,5 раза выше. Пептид KEDW уменьшает уровень экспрессии этого гена в «молодых» культурах клеток, практически

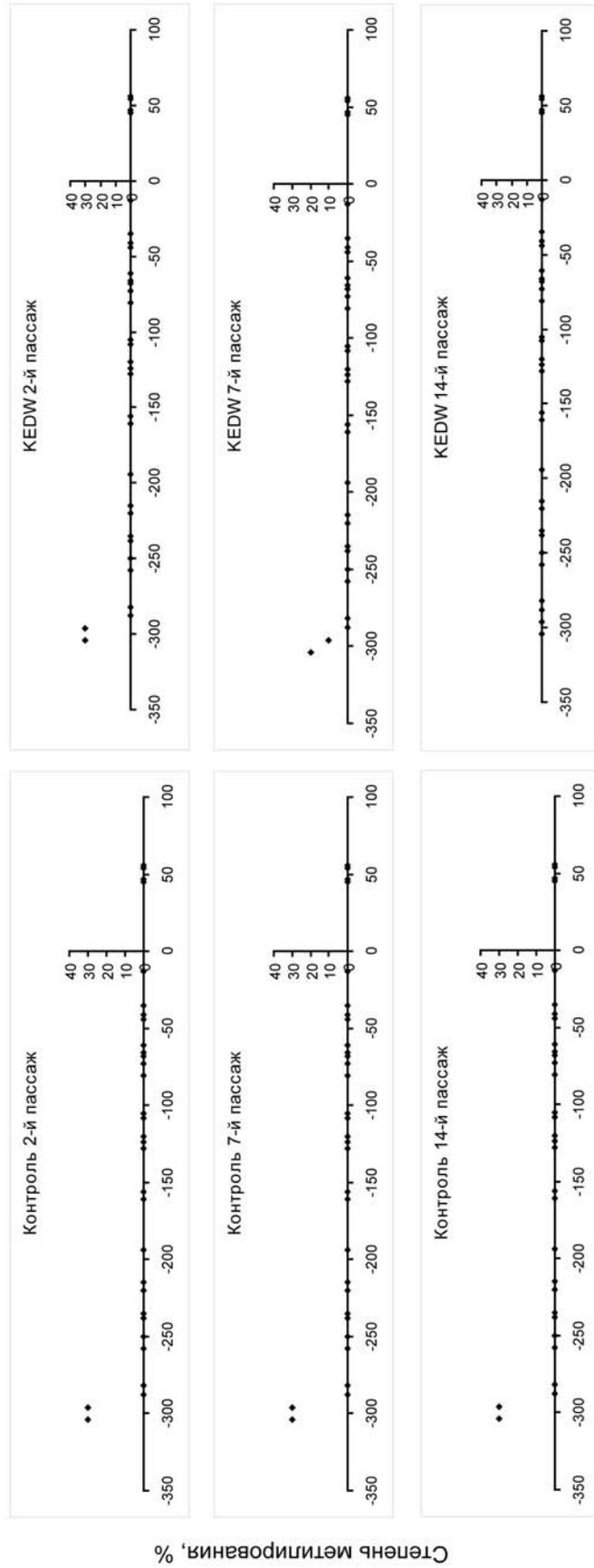
не изменяет его в «зрелых» клетках и стимулирует в «старых» клетках. Как видно на рис. 1, большинство CpG-сайтов промоторного CpG-островка этого гена не метилировано в культурах клеток поджелудочной железы. Однако около десятка CpG-сайтов этой области частично метилированы. Следует отметить, что степень метилирования трех из них, расположенных выше точки начала транскрипции (ТНТ), минимальна (10%), в то время как семь сайтов ниже ТНТ метилированы сильнее (30%). Характер метилирования идентичен в «молодых» и «зрелых» культурах клеток, что согласуется с одинаковыми уровнями экспрессии гена в этих клетках. В «старых» клетках степень метилирования всех сайтов, кроме пары самых верхних, уменьшена: третий сайт (–130 п.н. относительно ТНТ) становится полностью неметилированным, степень метилирования трех самых верхних сайтов, из расположенных ниже ТНТ, уменьшается до 10%, а остальных — до 20%. Таким образом, умеренное повышение уровня экспрессии гена *PDX1* в «старых» культурах клеток коррелирует с небольшим, но заметным уменьшением степени его метилирования. Добавление пептида KEDW к «молодым» культурам клеток не изменяет характера метилирования гена *PDX1*. В «зрелых» культурах клеток пептид KEDW приводит к некоторому уменьшению степени метилирования, а в «старых» культурах клеток — к заметному ее уменьшению (все сайты выше ТНТ становятся полностью неметилированными, а степень метилирования сайтов ниже ТНТ снижается до минимального уровня). В целом это коррелирует с выраженной стимуляцией экспрессии гена в «старых» культурах клеток.

Исследованный нами ген *PAX6* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в созревании β-клеток на поздних стадиях развития поджелудочной железы [19]. Уровень экспрессии этого гена в культурах эмбриональных клеток поджелудочной железы практически не изменяется при старении *in vitro*, но по-разному модулируется пептидом KEDW: уменьшается в «молодых», увеличивается в «зрелых» и заметно возрастает в «старых» культурах клеток. Ассоциированный с промоторной областью гена *PAX6* CpG-островок практически не метилирован в клетках поджелудочной железы (рис. 2). Исключение составляют лишь два частично (на 30%) метилированных CpG-сайта на расстоянии 300 п.н. выше ТНТ. Такой паттерн метилирования обнаружен нами в культурах при их старении и в «молодых» культурах, подвергнутых действию пептида KEDW. В «зрелых» культурах клеток при добавлении пептида KEDW отмечено уменьшение степени метилирования, а в «старых» клет-



Дублиеты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 1. Паттерны метилирования промоторного CpG-островка гена *PDX1* в культурах клеток поджелудочной железы при старении



Дубликаты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 2. Паттерны метилирования промоторного CpG-островка гена *Р4Хб* в культурах клеток поджелудочной железы при старении

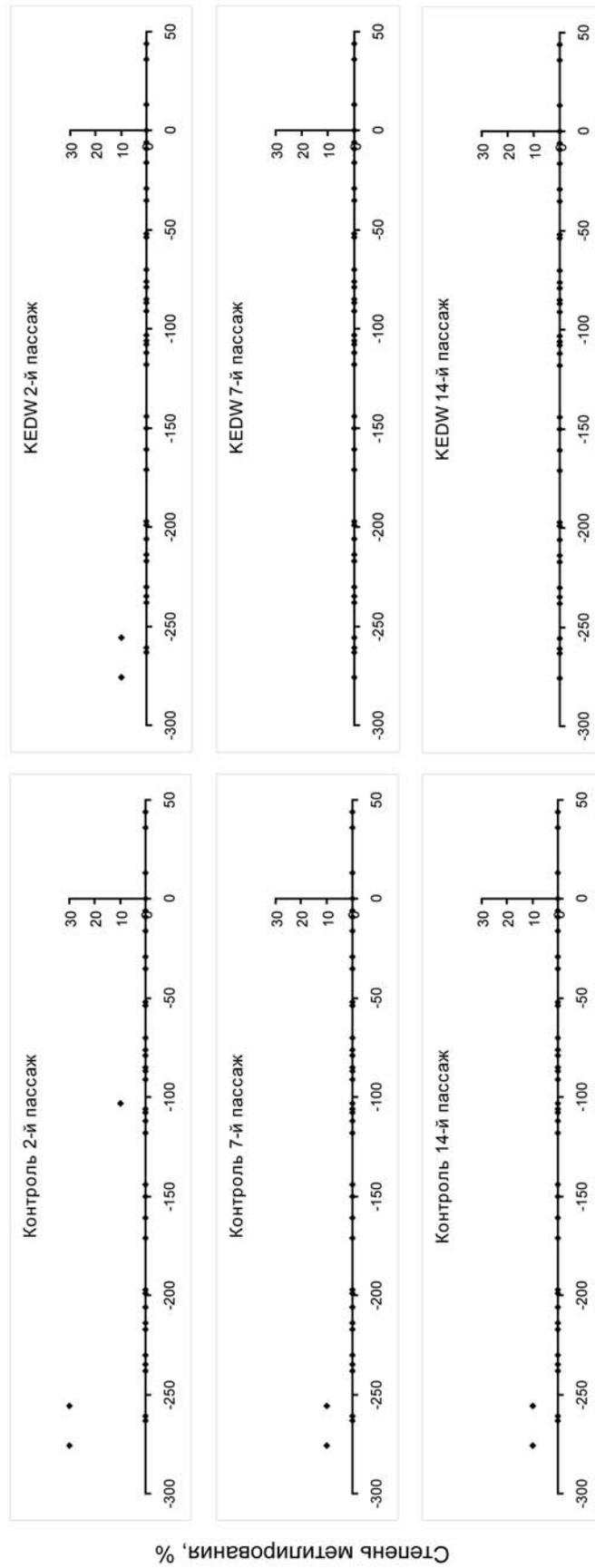
ках все сайты становятся полностью неметилированными. Связана ли различная модуляция уровня экспрессии гена *PAX6* пептидом KEDW в культурах разных пассажей с обнаруженными небольшими различиями в характере его метилирования, неизвестно.

Ген *NKX6-1* кодирует фактор транскрипции, участвующий в развитии поджелудочной железы, начиная с ранних эмбриональных стадий [19]. На ранних эмбриональных стадиях этот ген экспрессируется в общих мультипотентных прогениторных клетках поджелудочной железы, а на поздних — только в β -клетках. Максимальный уровень экспрессии этого гена наблюдается в «зрелых» культурах клеток поджелудочной железы, а уровни его экспрессии в «молодых» и «старых» культурах несколько ниже и примерно одинаковы. Пептид KEDW практически не изменяет экспрессию гена *NKX6-1* в «зрелых» культурах, но повышает ее в «молодых» и «старых» культурах клеток до уровней, совпадающих с уровнем экспрессии в «зрелых» клетках. Ассоциированный с промоторной областью гена *NKX6-1* CpG-островок практически неметилирован в культурах клеток поджелудочной железы (рис. 3). Исключение составляют лишь 2–3 слабо метилированных CpG-сайта. В «зрелых» и «старых» культурах клеток степень метилирования этих сайтов существенно ниже, чем в «молодых» клетках. При действии пептида KEDW в «молодых» культурах степень метилирования уменьшается до уровня, соответствующего контрольным «зрелым» и «старым» культурам клеток. В последних добавление пептида KEDW приводит к полному деметилированию промоторного CpG-островка. Таким образом, прямой корреляции между характером метилирования промоторной области гена *NKX6-1* и уровнем его экспрессии не наблюдается. Вероятно, незначительное метилирование единичных CpG-сайтов в этой области не препятствует активной транскрипции гена.

Ген *NGN3* кодирует фактор транскрипции, участвующий в ранних этапах дифференцировки β -клеток поджелудочной железы [19]. Уровень экспрессии этого гена в культурах панкреатических клеток разных пассажей варьирует незначительно. Способность пептида KEDW модулировать экспрессию этого гена зависит от возраста культуры: в «молодых» и «зрелых» культурах пептид вызывает незначительное увеличение экспрессии *NGN3*, а в «старых» — почти трехкратное. Промоторный CpG-островок гена *NGN3* в культурах панкреатических клеток умеренно метилирован. Из трех десятков содержащихся в нем CpG-сайтов большая часть полностью неметилирована. Однако восемь CpG-

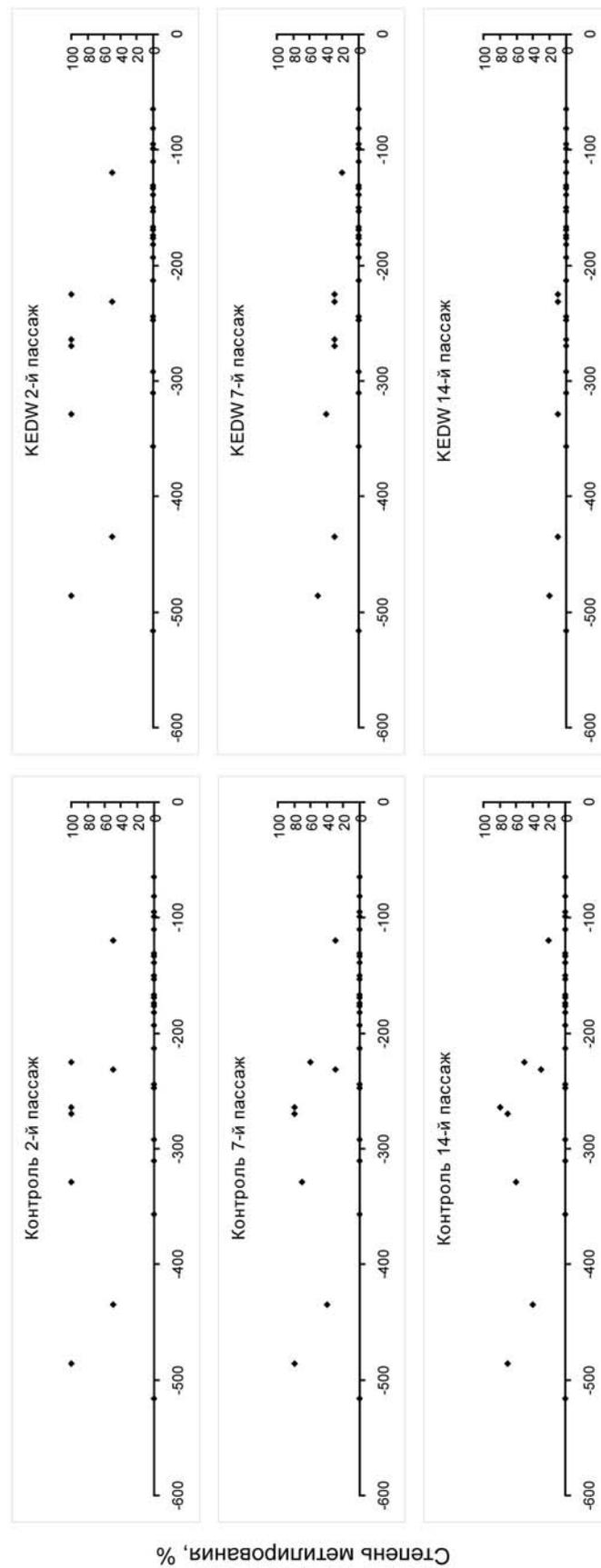
сайтов, разбросанных по всей длине этой области, имеют довольно высокие степени метилирования (от 20 до 100%). При этом степень метилирования большинства упомянутых сайтов в «зрелых» культурах клеток несколько ниже, чем в «молодых», а в «старых» клетках — ниже, чем в «зрелых» (рис. 4). Добавление пептида KEDW в среду не изменяет характера метилирования промотора в «молодых» культурах, уменьшает степень метилирования в «зрелых» и приводит к почти полному деметилированию в «старых» культурах клеток. Вероятно, изменениями в степени метилирования объясняется различное модулирующее действие пептида KEDW на экспрессию гена *NGN3* в культурах клеток разного возраста.

Ген *FOXA2* кодирует фактор транскрипции, участвующий в развитии поджелудочной железы на всех этапах, начиная с клеток дефинитивной эндодермы, и продолжает экспрессироваться в дифференцированных клетках поджелудочной железы [18, 19]. Одной из специфических мишеней *FOXA2* является ген раннего фактора панкреатогенеза *PDX1*. Ген *FOXA2* активно экспрессируется в культурах клеток поджелудочной железы и бронхиального эпителия [1, 5]. В «молодых» и «старых» культурах клеток поджелудочной железы уровни экспрессии гена примерно одинаковы, а в «зрелых» клетках он экспрессируется в 1,8 раза активнее. Пептид KEDW по-разному влияет на экспрессию гена *FOXA2* в культурах 2, 7 и 14 пассажей: в «молодых» и «старых» культурах клеток он умеренно стимулирует ее, а в «зрелых» клетках подавляет. В результате уровни экспрессии гена в культурах разных пассажей в присутствии пептида становятся практически одинаковыми. В гене *FOXA2* присутствует CpG-островок, начинающийся непосредственно перед ТНТ (–195 н.п.) и распространяющийся на большую часть кодирующей области. Большая часть CpG-сайтов этого островка в культурах клеток поджелудочной железы неметилирована, но имеется несколько частично метилированных сайтов (рис. 5). Степень метилирования этих сайтов в «молодых» культурах клеток составляет от 30 до 100%. В «зрелых» культурах она равна 20–60%, а в «старых» — 10–40%. При добавлении пептида KEDW степень метилирования в «молодых» культурах клеток уменьшается до уровней, наблюдаемых в контрольных «зрелых» культурах. Степень метилирования в «зрелых» культурах клеток под действием пептида KEDW не изменяется, а в «старых» клетках происходит практически полное деметилирование. Таким образом, степень метилирования промотора лишь отчасти коррелирует с уровнем экспрессии гена. Можно предполо-



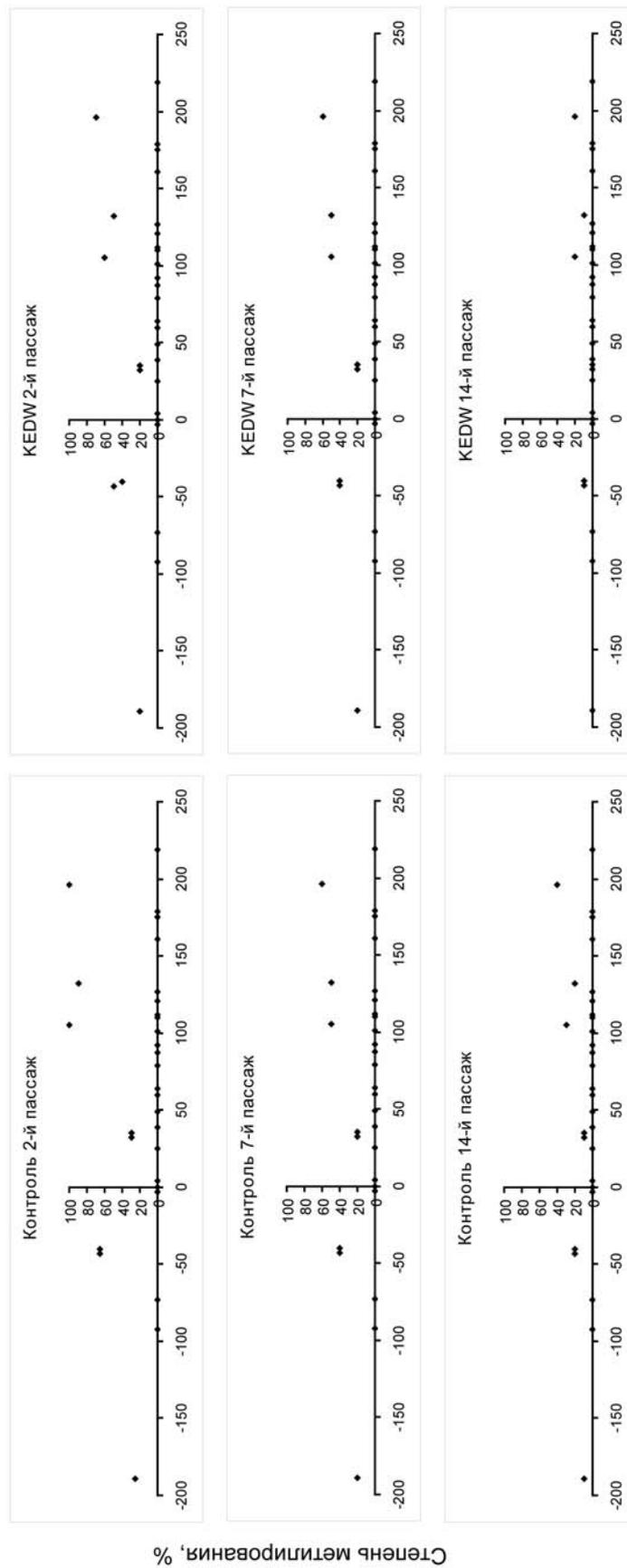
Дублиты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 3. Паттерны метилирования промоторного CpG-островка гена НКХ6-1 в культурах клеток поджелудочной железы при старении



Дублиеты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 4. Паттерны метилирования промоторного CpG-островка гена *NGN3* в культурах клеток поджелудочной железы при старении



Дублиты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 5. Паттерны метилирования 5'-концевого CpG-островка гена *FOXJ2* в культурах клеток поджелудочной железы при старении

жить, что метилирование 5'-концевого CpG-островка либо не влияет на экспрессию гена *FOXA2*, либо контролирует ее наряду с какими-то другими факторами.

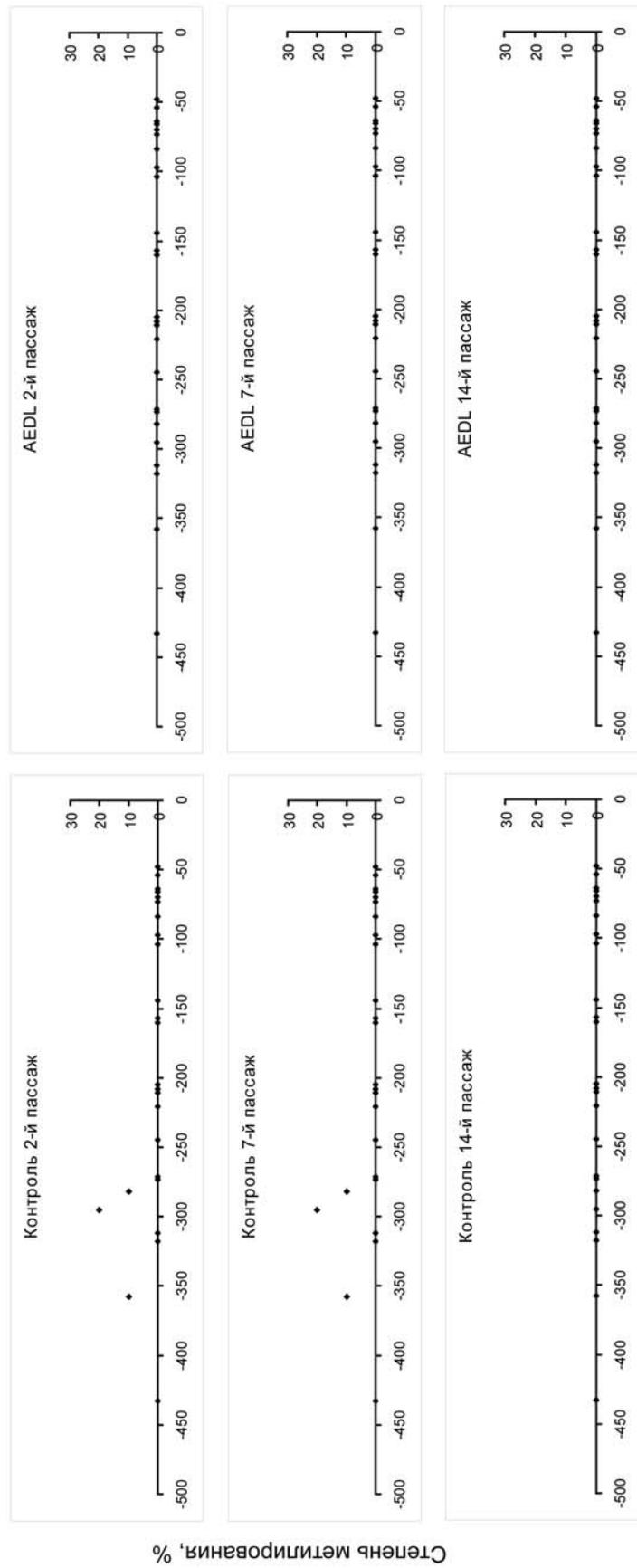
Известно, что фактор транскрипции FoxA2 играет существенную роль в ранних этапах эмбрионального развития легких. Этот белок в комбинации с другим фактором транскрипции Nkx2-1 является самым ранним специфическим маркером клеток легочной линии [20]. В культурах клеток бронхиального эпителия уровень экспрессии гена *FOXA2* изменяется при старении: в «молодых» культурах клеток он минимален, а в «зрелых» и «старых» примерно в три раза выше. При добавлении пептида AEDL уровень экспрессии этого гена в «молодых» культурах клеток возрастает более чем в 10 раз, в то время как в «зрелых» и «старых» культурах наблюдается гораздо более умеренная стимуляция (в 2–3 раза). Тем не менее в культурах всех пассажей 5'-концевой CpG-островок гена *FOXA2* полностью неметилирован в контроле и при действии пептида AEDL. Очевидно, в клетках бронхиального эпителия возрастная и пептидная модуляция экспрессии этого гена достигается какими-то другими механизмами, а не метилированием ДНК.

Ген *NKX2-1* кодирует фактор транскрипции, участвующий в ранних этапах формирования зачатка легких [20]. Как и поджелудочная железа, легкие образуются из эндодермальных клеток первичной кишечной трубки: при этом селекция развития по легочному пути определяется комбинацией факторов Nkx2-1 и FoxA2, а селекция панкреатического – комбинацией факторов Pdx1 и FoxA2. Уровни экспрессии гена *NKX2-1* в культурах клеток бронхиального эпителия при старении различаются незначительно, а добавление пептида AEDL стимулирует экспрессию этого гена в «молодых» и «зрелых» культурах клеток и практически не влияет на нее в «старых». В промоторной области гена *NKX2-1* имеется CpG-островок, большая часть сайтов которого полностью неметилирована в клетках бронхиального эпителия (рис. 6). Исключение составляют лишь три CpG-сайта в области между –275 и –370 относительно ТНТ, на 10–20% метилированные в «молодых» и «зрелых» культурах клеток. В «старых» культурах клеток CpG-островок полностью неметилирован. Под действием пептида AEDL CpG-островок становится полностью неметилированным в «молодых» и «зрелых» культурах клеток. Таким образом, характер метилирования промотора коррелирует с уровнем экспрессии гена *NKX2-1*.

Ген *FOXA1* кодирует фактор транскрипции, контролирующей терминальную дифференци-

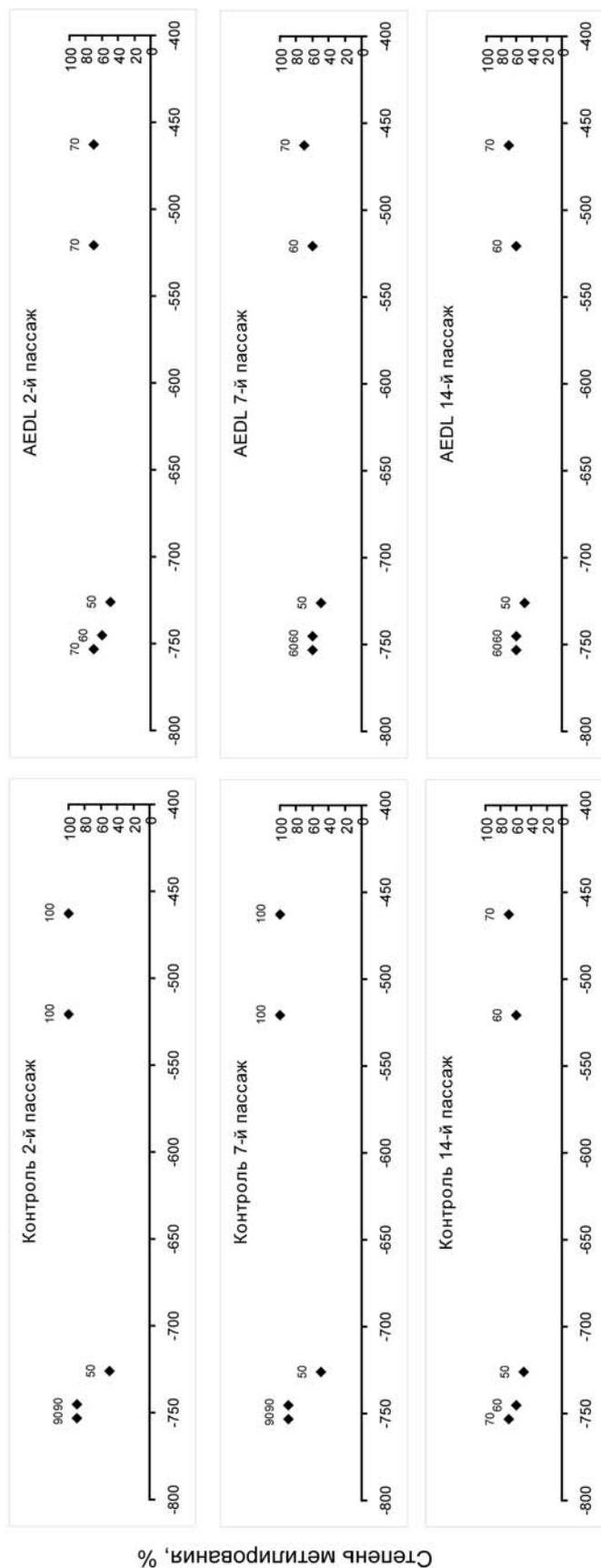
ровку альвеолярных клеток и экспрессию легочных секретоглобинов и других функционально важных белков [20]. В культурах клеток бронхиального эпителия с увеличением числа пассажей уровень экспрессии этого гена уменьшается, а добавление пептида AEDL не влияет на его экспрессию в «молодых» культурах клеток и умеренно стимулирует ее в «зрелых» и «старых». Таким образом, пептид замедляет возрастное снижение уровня экспрессии гена *FOXA1*. Этот ген имеет ассоциированный с промоторной областью CpG-островок, полностью неметилированный во всех исследованных клетках бронхиального эпителия. Следовательно, возрастная и пептидная модуляция экспрессии гена *FOXA1* в клетках бронхиального эпителия не связана с изменениями в характере его метилирования.

Некоторые из исследованных в работе генов не содержат CpG-островков в области промотора (*PAX4*, *SCGB1A1*, *SCGB3A2*, *SFTPA1*). Единичные CpG-сайты, присутствующие в этих генах в области, непосредственно предшествующей ТНТ, могут быть метилированными (*PAX4*, *SCGB1A1*) или неметилированными (*SCGB3A2*, *SFTPA1*). В большинстве случаев их участие в возрастной или пептидной модуляции экспрессии маловероятно, поскольку характер метилирования промоторных областей этих генов одинаков во всех исследованных нами клетках. Исключением можно считать ген *SCGB1A1*. Уровень экспрессии этого гена в культурах клеток бронхиального эпителия не зависит от пассажа и по-разному модулируется пептидом AEDL. В «молодых» культурах клеток при добавлении пептида AEDL наблюдается значительная (в три раза) стимуляция экспрессии, в «зрелых» – менее выраженная (в 1,5 раза) стимуляция, а в «старых» клетках уровень экспрессии гена практически не изменяется. Ген *SCGB1A1* не содержит CpG-островков в промоторной области, а степень метилирования имеющихся в ней единичных CpG-сайтов в клетках бронхиального эпителия довольно высока (рис. 7). При этом степень метилирования CpG-сайтов в «молодых» и «зрелых» культурах клеток одинакова. В «старых» культурах клеток она несколько меньше. При добавлении пептида AEDL степень метилирования промотора в «молодых» и «зрелых» культурах клеток уменьшается до значений, соответствующих «старым» культурам контрольной группы, а в «старых» клетках не изменяется. В целом эффекты пептида на степень метилирования промоторных CpG-сайтов гена *SCGB1A1* коррелируют с его способностью модулировать экспрессию гена в культурах клеток при их старении.



Дублиты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п. н.

Рис. 6. Паттерны метилирования промоторного CpG-островка гена *MX2-1* в культурах клеток бронхиального эпителия при старении



Дублиеты CpG, координаты относительно точки начала транскрипции, п.н.

Рис. 7. Паттерны метилирования промоторной области гена *SCGB1A1* в культурах клеток бронхиального эпителия при старении. Цифрами возле экспериментальных точек указаны степени метилирования соответствующих им CpG-сайтов

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследованных в работе генов имеет CpG-островки, ассоциированные с областью промотора и ТНТ. Известно, что в геноме человека и других млекопитающих промоторные CpG-островки ассоциированы в первую очередь с генами, кодирующими белки «домашнего хозяйства» и факторы транскрипции, участвующие в контроле развития органов и тканей [21–24]. В большинстве случаев такие островки практически не метилированы, а их метилирование служит способом фиксации устойчиво репрессированного состояния генов. Таким способом репрессируются гены плюрипотентности в соматических клетках, гены инактивированной X-хромосомы, репрессированные аллели подвергающихся импринтингу генов. Все исследованные гены активно экспрессируются в изучаемых клетках, поэтому незначительная степень метилирования их промоторных CpG-островков вполне ожидаема. Частичное метилирование отдельных CpG-сайтов в этих островках, очевидно, следует рассматривать как свидетельство эпигенетической неоднородности изучаемых культур клеток. Можно предположить, что старение клеток в культуре сопровождается определенными эпигенетическими изменениями, происходящими в клетках каждой культуры не синхронно. Таким образом, в каждый момент времени в культуре присутствуют эпигенетически различные клетки, находящиеся на разных этапах старения. Вероятно также, что сами эпигенетические изменения, с которыми сопряжено старение клеток в культуре, не являются строго запрограммированными во времени, то есть происходят в разных клетках не одновременно и в разной очередности. Эпигенетическая неоднородность клеточных культур может объяснять не только частичное метилирование определенных сайтов ДНК, но и различия между культурами в уровнях экспрессии индивидуальных генов. Известно, что полное метилирование всех CpG-сайтов в CpG-островках приводит к формированию труднодоступной для факторов транскрипции «закрытой» структуры хроматина [21–24]. В исследованных генах этого не происходит, во-первых, потому что большая часть CpG-сайтов остается неметилированной и, во-вторых, уровень экспрессии генов изменяется количественно, но во всех случаях остается достаточно высоким. Могут ли относительно небольшие изменения в характере метилирования отдельных CpG-сайтов быть причиной наблюдаемых изменений в уровнях экспрессии соответствующих генов? Следует полагать, что это вполне воз-

можно и даже вероятно, по крайней мере, для некоторых из исследованных нами генов. Показано, что даже метилирование одиночных CpG-сайтов в промоторных областях генов может сказываться на их способности связываться со специфическими факторами транскрипции, причем это касается как генов с промоторными CpG-островками, так и генов не имеющих их [25–27]. Следует отметить, что метилирование области промотора не всегда сопряжено с уменьшением его активности. Чаще всего такое метилирование действительно препятствует инициации транскрипции, подавляя связывание участвующих в ней белковых факторов. Однако, существуют примеры положительного влияния метилирования промоторной области на транскрипцию [25, 27]. Метилирование может как подавлять, так и стимулировать связывание белков, регулирующих транскрипцию, и эффекты самого связывания зависят от особенностей функциональной активности белков. Метилирование промотора может быть элементом как негативного, так и позитивного контроля экспрессии генов. Вероятно, наблюдаемые изменения в уровнях экспрессии генов в культурах панкреатических и бронхиальных клеток при старении обусловлены локальными эпигенетическими изменениями.

Являются ли эффекты пептидов эпигенетическими по своей природе – вопрос более сложный. С одной стороны, для некоторых генов (*PDX1*, *PAX6*, *NGN3*, *NKX2-1*, *SCGB1A1*) повышение уровня экспрессии под действием пептида коррелирует с уменьшением степени метилирования определенных промоторных сайтов. С другой стороны, для других генов такой корреляции не наблюдается. Наиболее очевидно это для генов, характер метилирования которых не изменяется при клеточном старении и при действии пептидов (*PAX4* в панкреатических клетках, *FOXA1*, *SCGB3A2* и *SFTPA1* в бронхиальных). Метилирование гена *FOXA2* в панкреатических клетках лишь отчасти коррелирует с уровнем экспрессии, тогда как в бронхиальных клетках он вообще неметилирован. По-видимому, модулирующее действие пептидов на экспрессию генов в исследованных клетках достигается несколькими механизмами, одним из которых могут быть изменения в метилировании ДНК. Следует отметить, что многие из изученных генов служат непосредственными мишенями для белковых факторов, кодируемых другими генами (например, ген *PDX1* является специфической мишенью транскрипционного фактора FoxA2, ген *NGN3* – мишенью Pdx1 и т.д.). Следовательно, многие наблюдаемые нами эффекты могут носить вторичный характер.

Таким образом, короткие биологически активные пептиды являются существенными тканеспецифическими модуляторами экспрессии генов и во многих случаях модуляторами метилирования ДНК. Это означает, что короткие пептиды могут служить эффективными эпигенетическими регуляторными сигнальными молекулами, влияющими на функционирование генов и клеточную дифференцировку. Молекулярные механизмы регуляторного действия коротких пептидов изучены недостаточно. Тем не менее, имеются сведения о том, что пептиды могут сайт-специфично взаимодействовать с ДНК, распознавая при этом статус ее метилиро-

вания [28]. На этом основании предложена гипотеза о том, что пептиды, взаимодействуя (связываясь) с метилируемыми промоторными сайтами ДНК, могут препятствовать действию ДНК-метилтрансфераз, оставляя эти сайты неметилированными, что является в большинстве случаев обязательным для экспрессии генов. Это – один из возможных механизмов регуляции транскрипции пептидами [29]. Полученные в этой работе сведения о том, что короткие пептиды могут снижать уровень метилирования промоторов, укладываются в рамки выдвинутой гипотезы о механизмах регуляции транскрипции короткими пептидами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хавинсон В.Х., Дурнова А.О., Полякова В.О., Толибова Г.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М., Кветная Т.В., Тарновская С.И. (2013) Влияние панкреатина на дифференцировку клеток поджелудочной железы при их старении, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **154**, 498–501.
2. Хавинсон В.Х., Гаппаров М.М.-Г., Шаранова Н.Э., Васильев А.В., Рыжак Г.А. (2010) Исследование биологической активности эндогенного тетрапептида LYS-GLU-ASP-TRP-NH₂, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **149**, 327–329.
3. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б., Антонюк-Щеглова И.А. (2011) Пептидный геропротектор из эпифиза замедляет ускоренное старение пожилых людей: результаты 15-летнего наблюдения, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **151**, 343–347.
4. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б., Антонюк-Щеглова И.А., Бондаренко Е.В. (2011) Перспективы применения панкреатина для коррекции метаболических нарушений у людей пожилого возраста, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **151**, 436–438.
5. Khavinson, V.Kh., Tendler, S.M., Vanyushin, B.F., Kasyanenko, N.A., Kvetnoy, I.M., Linkova, N.S., Ashapkin, V.V., Polyakova, V.O., Basharina, V.S., and Bernadotte, A. (2014) Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium, *Lung*, **192**, 781–791.
6. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О., Хейфец О.В., Тарновская С.И., Кветной И.М. (2012) Пептиды тканеспецифически стимулируют дифференцировку клеток при их старении, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **1**, 34–37.
7. Pogribny, I.P., and Vanyushin, B.F. (2010) Age-related genomic hypomethylation, in *Epigenetics of Aging*, (Tollefsbol, T.O., ed.), Springer Science+Business Media, N.Y., pp. 11–27.
8. Schumacher, A. (2011) Aging epigenetics, in *Handbook of Epigenetics. The New Molecular and Medical Genetics* (Tollefsbol, T.O., ed.), Elsevier Inc., Amsterdam, pp. 405–422.
9. Bell, J.T., Tsai, P.-C., Yang, T.-P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Mangino, M., Zhai, G., Zhang, F., Valdes, A., Shin, S.Y., Dempster, E.L., Murray, R.M., Grundberg, E., Hedman, A.K., Nica, A., Small, K.S., Dermitzakis, E.T., McCarthy, M.I., Mill, J., Spector, T.D., and Deloukas, P. (2012) Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population, *PLoS Genet*, **8**, e1002629, DOI.10.1371/journal.pgen.1002629.
10. Day, K., Waite, L.L., Thalacker-Mercer, A., West, A., Bamman, M.M., Brooks, J.D., Myers, R.M., and Absher, D. (2013) Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape, *Genome Biol.*, **14**, R102.
11. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., and Zhang, K. (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Mol. Cell*, **49**, 359–367.
12. Florath, I., Butterbach, K., Mueller, H., Bewerunge-Hudler, M., and Brenner, H. (2014) Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites, *Hum. Mol. Gen.*, **23**, 1186–1201.
13. Tusnady, G.E., Simon, I., Varadi, A., and Aranyi, T. (2005) BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite treated genomes, *Nucl. Acids Res.*, **33**, e9.
14. Aranyi, T., Varadi, A., Simon, I., and Tusnady, G.E. (2006) The BiSearch web server, *BMC Bioinformatics*, **7**, 431.
15. Grunau, C., Schattevoy, R., Mache, N., and Rosenthal, A. (2000) MethTools – a toolbox to visualize and analyze DNA methylation data, *Nucl. Acids Res.*, **28**, 1053–1058.
16. Lewin, J., Schmitt, A.O., Adorjan, P., Hildmann, T., and Piepenbrock, C. (2004) Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates, *BMC Bioinformatics*, **20**, 3005–3012.
17. Rakan, V.K., Hildmann, T., Novik, K.L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A.V., Andrews, T.D., Howe, K.L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I.G., Berlin, K., and Beck, S. (2004) DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the human epigenome project, *PLoS Biol.*, **2**, e405.
18. Arda, H.E., Benitez, C.M., and Kim, S.K. (2013) Gene regulatory networks governing pancreas development, *Dev. Cell*, **25**, 5–13.
19. Conrad, E., Stein, R., and Hunter, C.S. (2014) Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development, *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**, 407–414.
20. Maeda, Y., Dave, V., and Whitsett, J.A. (2007) Transcriptional control of lung morphogenesis, *Physiol. Rev.*, **87**, 219–244.
21. Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009) CpG islands – ‘A rough guide’, *FEBS Letters*, **583**, 1713–1720.
22. Deaton, A.M., and Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription, *Genes Dev.*, **25**, 1010–1022.

23. Jones, P.A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nature Rev. Genet.*, **13**, 484–492.
24. Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development, *Nature Rev. Genet.*, **14**, 204–220.
25. Huntriss, J., Lorenzi, R., Purewal, A., and Monk, M. (1997) A methylation-dependent DNA-binding activity recognising the methylated promoter region of the mouse *Xist* gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 730–738.
26. Han, H., Cortez, C.C., Yang, X., Nichols, P.W., Jones, P.A., and Liang, G. (2011) DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter, *Hum. Mol. Gen.*, **20**, 4299–4310.
27. Gustems, M., Woellmer, A., Rothbauer, U., Eck, S.H., Wieland, T., Lutter, D., and Hammerschmidt, W. (2014) c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs, *Nucl. Acids Res.*, **42**, 3059–3072.
28. Федореева Л.И., Киреев И.И., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. (2011) Проникновение коротких флуоресцентно-меченых пептидов в ядро в клетках HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибоолигонуклеотидами и ДНК *in vitro*, *Биохимия*, **76**, 1505–1516.
29. Хавинсон В.Х., Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф. (2011) Короткие пептиды модулируют действие эукариотических эндонуклеаз из проростков пшеницы, *Доклады РАН*, **437**, 124–127.

EPIGENETIC MECHANISMS OF PEPTIDERGIC REGULATION OF GENE EXPRESSION UPON HUMAN CELL AGING

V. V. Ashapkin^{1*}, N. S. Linkova^{2,4},
V. Kh. Khavinson^{2,3}, B. F. Vanyushin¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-3181, E-mail: ashapkin@genebee.msu.ru

² Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology,
St.-Petersburg 197110, Russia; fax: +7(812)230-0049,
E-mail: linkova@gerontology.ru

³ I. I. Mechnikov North-West State Medical University,
St.-Petersburg 191015, Russia; fax: +7(812)303-5035,
E-mail: khavinson@gerontology.ru

⁴ Saint-Petersburg State Polytechnical University, St.-Petersburg 195251,
Russia; fax: +7(812)552-6080, E-mail: linkova@medfiz.ru

Received July 29, 2014

Revision received September 13, 2014

Expression levels of genes encoding specific transcription factors and other functionally important proteins vary during aging of pancreatic and bronchial epithelium cell cultures. The peptides KEDW and AEDL tissue-specifically affect gene expression in pancreatic and bronchial cell cultures, respectively. It is established in this work that the DNA methylation patterns of the *PDX1*, *PAX6*, *NGN3*, *NKX2-1*, and *SCGB1A1* gene promoter regions change upon aging in pancreatic and bronchial cell cultures in correlation with variations in their expression levels. Thus, stable changes in gene expression upon aging of cell cultures could be caused by changes in their promoter methylation patterns. The methylation patterns of the *PAX4* gene in pancreatic cells as well as those of the *FOXA1*, *SCGB3A2*, and *SFTPA1* genes in bronchial cells do not change upon aging and are unaffected by peptides, whereas their expression levels change in both cases. The promoter region of the *FOXA2* gene in pancreatic cells contains a small number of methylated CpG sites, their methylation levels being affected by cell culture aging and KEDW, though without any correlation with gene expression levels. The promoter region of the *FOXA2* gene is completely unmethylated in bronchial cells irrespective of cell culture age and AEDL action. Changes in promoter methylation may be the cause of age- and peptide-induced variations in expression levels of the *PDX1*, *PAX6*, and *NGN3* genes in pancreatic cells and *NKX2-1* and *SCGB1A1* genes in bronchial cells. Expression of the *PAX4* and *FOXA2* genes in pancreatic cells and *FOXA1*, *FOXA2*, *SCGB3A2*, and *SFTPA1* genes in bronchial cells seems to be controlled by some other mechanisms.

Key words: short peptides, DNA methylation, transcription, cell differentiation, pancreatic cell culture, bronchial cell culture, differentiation factors