
МЕТОДИКИ

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

В.Х.Хавинсон*, **Н.С.Линькова****, **С.И.Тарновская*****

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ; **Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ; ***Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, РФ; ****Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, РФ

Короткие пептиды представляют собой систему сигнальных молекул, регулирующих функции организма на молекулярно-генетическом, субклеточном, клеточном и тканевом уровне. Один короткий пептид может регулировать экспрессию нескольких десятков генов, однако молекулярный механизм этого процесса остается открытым. Мы полагаем, что короткие пептиды способны проникать через цитоплазматическую и ядерную мембрану клетки и связываться с ДНК. Методом докинга построены пространственные модели ДНК-пептидных комплексов для 19 коротких пептидов. Установлено, что некоторые пептиды имеют одинаковые сайты связывания. Пептиды KE и EDP связываются с ДНК по сайту agat, пептиды KEDW и AED — по сайту acct, а пептиды AEDL и EDL — по сайту ctcc.

Ключевые слова: *короткие пептиды, ДНК-пептидные взаимодействия, молекулярное моделирование*

Короткие пептиды, разработанные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, регулируют экспрессию генов и синтез белков, стимулируют пролиферацию, дифференцировку и подавляют апоптоз клеток, что приводит к восстановлению функций различных органов при патологии и старении. Введение пептидов способствует снижению частоты развития рака и увеличению средней и максимальной продолжительности жизни животных. В большинстве экспериментов выявлена способность пептидов увеличивать физиологический ресурс клеток, тканей и организма до 20-42% [6].

Пептиды KE и AEDG при введении трансгенным мышам подавляют экспрессию гена *HER-2/neu* (рак молочной железы человека) в 2.0-3.6 раза по сравнению с контролем, что сопровождается достоверным уменьшением диаметра опухоли. Добавление пептида AEDG в культуру легочных фибробластов человека индуцирует экспрессию

гена теломеразы, активность теломеразы и способствует удлинению теломер в 2.4 раза [6]. Активация экспрессии гена сопровождается увеличением числа делений клеток на 42.5%, что демонстрирует преодоление предела клеточного деления Хейфлика [6,7].

С помощью ДНК-микрочиповой технологии было исследовано влияние пептидов KE, EW, AEDG, AEDP на экспрессию 15 247 генов сердца и головного мозга мышей. Каждый пептид специфически регулировал экспрессию определенной группы генов. Результаты эксперимента указывают на существующий механизм пептидной регуляции генетической активности [6]. Пептид KE, обладающий иммуномодулирующей активностью, регулировал экспрессию гена *IL2* в лимфоцитах крови [5]. В культурах клеток бронхиального эпителия человека пептид AEDL активировал экспрессию генов дифференцировки бронхиального эпителия *Nkx2.1*, *SCGB1A1*, *SCGB3A2*, *FoxA1*, *FoxA2*, повышал экспрессию генов *MUC4*, *MUC5AC*, *SftpA1*, снижение активности которых коррелирует с развитием хронического бронхита [12].

Адрес для корреспонденции: linkova@gerontology.ru. Линькова Н.С.

Пептид KEDW в культурах клеток поджелудочной железы человека увеличивал экспрессию генов дифференцировки *PDX1*, *NGN3*, *PAX6*, *FOXA2*, *NKX2.2*, *NKX6.1*, *PAX4* и снижал экспрессию генов *MNX1* и *HOXA3*. Пептид EDG регулировал экспрессию мРНК разных генов в модели индуцированной язвы желудка у крыс, снижал синтез мРНК генов, кодирующих белки клеточного метаболизма *SOD*, *TNF α* , *Cox-2* [9].

Нейропротективный пептид EDR повышал уровень энергетического обеспечения мышечной ткани, что коррелировало с увеличением экспрессии генов *PPARA* и *PPARG*, кодирующих белки, увеличивающие окислительную способность скелетных мышц. При этом пептидная регуляция адаптивных возможностей организма сопровождалась повышением экспрессии гена белка теплового шока *HSPA1A* [3].

По данным физико-химических методов (УФ-спектроскопия, круговой дихроизм, вискозиметрия), короткие пептиды способны связываться с ДНК в растворе *in vitro* [12]. Этот процесс протекает несколько часов и практически без участия электростатических сил. В результате комплексообразования, которое реализуется в бороздке ДНК с участием азотистых оснований и пептида, наблюдается дестабилизация вторичной структуры макромолекулы. Методом спектрофотометрии в УФ-области спектра обнаружен концентрационно зависимый гиперхромный эффект (увеличение оптической плотности раствора при длине волны 260 нм) в смеси пептидов AEDG, AEDL и двуспиральной ДНК. Гиперхромный эффект свидетельствует о частичном разрушении водородных связей между нуклеотидными парами двойной спирали и о локальном разделении цепей двойной спирали (аллостерическое конформационное изменение). Разделение цепей (плавление) свободной синтетической ДНК происходит при 69.5°C. В системе ДНК с пептидом AEDG плавление спирали произошло при 28°C и характеризовалось снижением показателей энтропии и энтальпии процесса примерно в 2 раза. Ранее было показано, что по своим стерическим и геометрическим характеристикам короткие пептиды могут встраиваться в большую бороздку ДНК и взаимодействовать с азотистыми основаниями макромолекулы [11]. Полярные взаимодействия пептидов с парами оснований в большой бороздке определялись электростатическими взаимодействиями карбоксильных групп пептида с аминогруппами аденина и цитозина, водородными связями протонированных аминогрупп и карбоксильных групп пептида с атомами азота N7 аденина и гуанина [7]. Гидрофобные взаимодействия

в системе определялись боковыми группами пептида и метильной группой тимина. Очевидно, что каждая последовательность пар нуклеотидов в ДНК экспонирует на большую канавку уникальный орнамент функциональных групп, который распознает пептид для связывания [11]. На основании такой комплементарности были определены сайты связывания для пептидов KEDA, AEDG, KEDW, KED, EDR, KE и построены двумерные и трехмерные модели ДНК-пептидных комплексов [10,11,15]. Однако с развитием компьютерных технологий появилась возможность оценить большее число параметров.

Целью данной работы являлось создание моделей ДНК-пептидных взаимодействий методом докинга для 19 коротких пептидов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное моделирование комплексов ДНК с пептидами проводили с использованием программного обеспечения "Molecular Operating Environment 2012" (MOE 2012). Пептиды строили в левовращающей конформации. При построении пространственной структуры молекулы двуцепочечной ДНК учитывали В-форму молекулы со стандартными большой (2.1 нм) и малой (1.1 нм) бороздками. Для оценки энергии взаимодействия и поиска специфического сайта связывания для пептидов использовали стандартный пакет докинга в MOE 2012, силовое поле Amber99 и генетический алгоритм поиска Affinity dG. Использовали "полугибкий" докинг, учитывая конформационную подвижность только пептида, а азотистые основания ДНК были жесткими. Решения докинга ранжировали по величинам оценочной функции. Был выполнен докинг пептидов со всеми комбинациями дуплексов ДНК длиной 4 п.н. Растворитель учитывали в неявном виде как непрерывную протяженную среду вокруг молекулы растворенного вещества, что позволило оценить влияние сольватации с меньшими затратами на вычисление.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сильновыраженные взаимодействия с ДНК образуют пептиды KEDA, KEDW, AEDR, EDR — практически все, содержащие в своем составе полярные положительно заряженные боковые цепи. Слабовыраженные взаимодействия образуют с ДНК дипептиды, по-видимому, из-за небольшой площади контакта (таблица). Так, пептиды KE и EDP связываются с ДНК по сайту *agat* (рис. 1, а). Оба пептида являются иммуномодуляторами. Пептиды

Предполагаемые сайты связывания ДНК с короткими пептидами, разработанными в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии

№	Название пептида	Структура пептида	Сайт связывания пептида с ДНК	Сила связывания пептида с ДНК
1	Вилон	KE	agat*	+
2	Эпиталон	AEDG	aatg	++
3	Простамакс	KEDP	attc	++
4	Ливаген	KEDA	tcct	+++
5	Кортаген	AEDP	aacc	++
6	Карталакс	AED	acct*	+
7	Пинеалон	EDR	ttcc	+++
8	Хонлутен	EDG	tttt	+
9	Оваген	EDL	ctcc*	++
10	Кристаген	EDP	agat*	++
11	Везуген	KED	gccg	+
12	Везилют	ED	attt	+
13	Панкраген	KEDW	acct*	+++
14	Кардиоген	AEDR	agtc	+++
15	Тестаген	KEDG	caac	++
16	Бронхоген	AEDL	ctcc*	++
17	Нормофтал	K(gamma)E	act*	+
18	Тимоген	EW	aacg	+
19	AD7	DS (mod)	aata	+

Примечание. + — слабовыраженные взаимодействия, значение изменения энтальпии ($dH=-3$ ккал/моль); ++ — выраженные взаимодействия ($dH=-4-4.5$ ккал/моль); +++ — сильновыраженные взаимодействия ($dH=-5-6$ ккал/моль). *Общие сайты связывания для пептидов.

образуют водородные связи с N7 и N6 аденина и фосфатным остовом ДНК. Однако EDP образует еще одну водородную связь с азотистым основанием — с N4 цитозина. В связи с этим энергия образования комплекса EDP-agat выше, чем комплекса KE-agat.

Пептиды KEDW и AED связываются с ДНК по сайту acct (рис. 1, б). Площадь контакта KEDW больше, чем AED, за счет больших боковых цепей лизина и триптофана. Таким образом пептид может полностью закрывать собой большую бороздку ДНК, не давая другим молекулам с ней связаться. KEDW в 3 раза сильнее связывается с сайтом acct, чем пептид AED (таблица). Оба пептида взаимодействуют с N4 цитозина и N6 аденина. Однако KEDW также связывается с N7 аденина и образует сеть водородных и ион-ионных взаимодействий с фосфатным остовом ДНК.

Пептиды AEDL и EDL связываются с ДНК по сайту ctcc (рис. 1, в). Энергии образования комплекса у них одинаковые (таблица). Оба пептида связываются с N4 цитозина и N6 аденина и выступают в качестве акцепторов протонов, не взаимодействуют с фосфатным остовом ДНК,

т.к. имеют сильный отрицательный заряд. Вероятно, данные молекулярного моделирования могут указывать на то, что пептиды AEDL и AED обладают схожим механизмом действия, однако это требует экспериментального подтверждения.

Приведенные нами данные о влиянии коротких пептидов на экспрессию генов хорошо согласуются с результатами других исследователей. Так, пептид селанк (PGP), обладающий ноотропным и противовирусным действием, регулирует экспрессию мРНК гена *Bdnf* в мозге крыс. Кроме того, пептид PGP регулирует экспрессию мРНК 15 из 84 изученных генов в селезенке крыс, вовлеченных в процессы воспаления и кодирующих хемокины и цитокины [13,14]. Введение пептида дельта-сна (WAGGDASGE) крысам разного возраста приводит к увеличению экспрессии гена СОД (*Sod1*) и гена глутатионпероксидазы 1 (*Gpx1*) в мозге и ядродержащих клетках крови, экспрессия которых снижается при физиологическом старении организма [2]. Пептид семакс (MENFPGP), модифицированный фрагмент адренкортикотропного гормона, вызывает снижение индуцированной стрессом экспрессии гена

c-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса у предрасположенных к эмоциональному стрессу крыс [4]. Кроме того, пептид МЕНFPGP в экспериментах на животных активирует экспрессию генов нейротрофических факторов NGN и BDNF [14]. До настоящего времени не удалось обнаружить рецепторное связывание семакса с цитоплазматическими мембранами нейронов и глияльных клеток мозга крыс и целыми нейронами. Предположительно, семакс способен связываться с мембранами нервных клеток, причем это связывание специфично и обратимо; рецепторы, с которыми может связываться семакс, очень малочисленны и встречаются только в отдельных участках мозга [1].

Таким образом, в современной литературе имеются подтверждения того, что короткие пептиды способны регулировать экспрессию генов. Дискуссионным остается вопрос о том, каким образом происходит эта регуляция: проникают ли короткие пептиды через цитоплазматическую и ядерную мембрану, а затем связываются с ДНК, или они связываются с рецепторами (внутриклеточными или на мембранах клеток) и активируют внутриклеточные сигнальные каскады, результатом которых является изменение экспрессии генов.

Ранее нами показано, что FITC-меченные ди-, три- и тетрапептиды проникают в цитоплазму, ядро и ядрышко клеток линии HeLa [8]. Известно, что ядро эукариотических клеток имеет систему нуклеопор, образованных белковыми комплексами — нуклеопоринами. Внутренний диаметр нуклеопор составляет около 50 нм. Следовательно, они проницаемы для свободно диффундирующих низкомолекулярных веществ с молекулярной массой до 3500 Д. Таким образом, короткие пептиды по своим физико-химическим характеристикам (заряд, размер, гидрофобность) могут проникать через цитоплазматическую и ядерную мембрану клетки и взаимодействовать с ДНК.

Основываясь на данных о влиянии пептидов на экспрессию генов и синтез белков и результатах молекулярного моделирования (таблица), мы составили схему пептидной регуляции экспрессии генов (рис. 2). Короткие пептиды, проникая в клетку, связываются с комплементарными

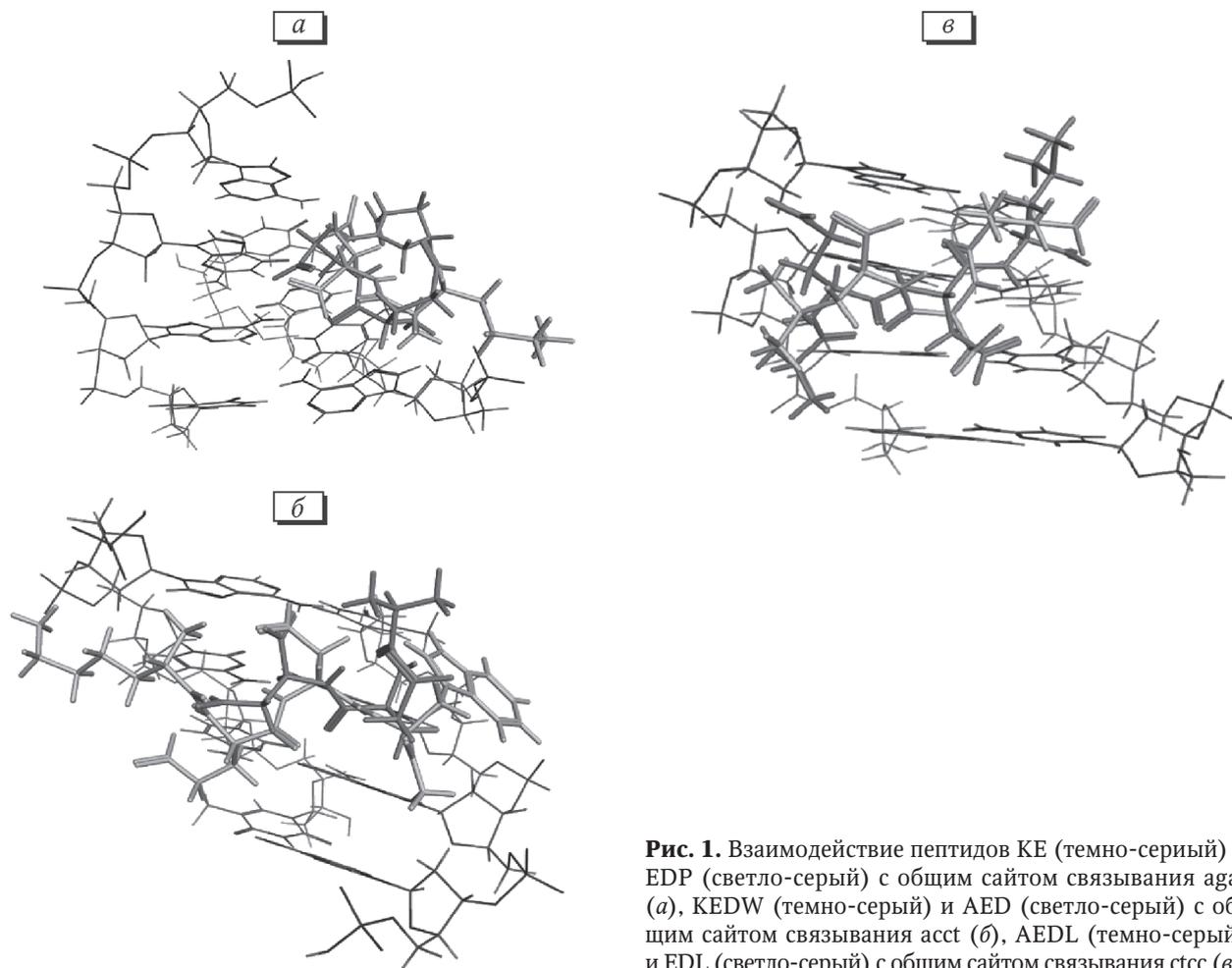


Рис. 1. Взаимодействие пептидов KE (темно-серый) и EDP (светло-серый) с общим сайтом связывания *agat* (а), KEDW (темно-серый) и AED (светло-серый) с общим сайтом связывания *acct* (б), AEDL (темно-серый) и EDL (светло-серый) с общим сайтом связывания *ctcc* (в).

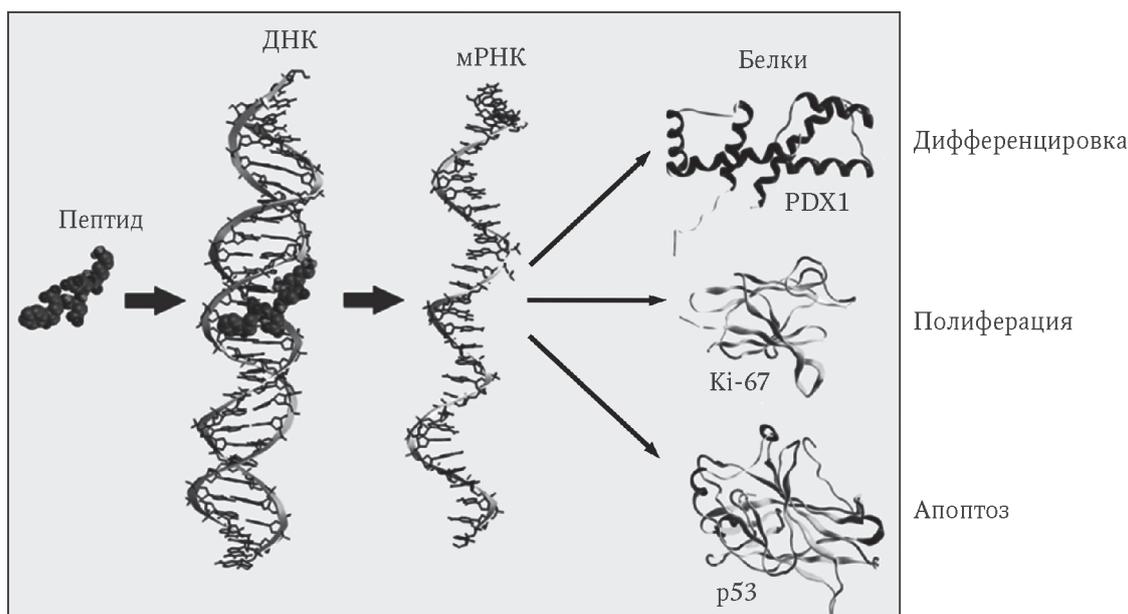


Рис. 2. Предполагаемый механизм пептидной регуляции экспрессии генов и синтеза белков в клетке.

сайтами в промоторных зонах генов ДНК, в результате чего синтезируются соответствующие мРНК и запускается процесс трансляции. Таким образом пептиды регулируют экспрессию генов и синтез белков, определяющих важнейшие этапы жизнедеятельности клетки — пролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

Таким образом, специфические (комплементарные) пептид-ДНК взаимодействия могут эпигенетически контролировать генетические функции клетки, и, вероятно, этот механизм играл важную роль уже на самых ранних этапах зарождения жизни и дальнейшей эволюции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток // Молекулярная биология. 1999. Т. 33. № 1. С. 120-126.
2. Кутилин Д.С., Бондаренко Т.И., Корниенко И.В., Михалева И.И. Влияние пептида дельта-сна на экспрессию генов антиоксидантных ферментов в мозге и крови крыс при физиологическом старении организма // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 157, № 5. С. 634-637.
3. Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы // Успехи геронтол. 2013. Т. 26, № 4. С. 671-678.
4. Умрюхин П.Е., Коплик Е.В., Гривенников И.А., Мясоходов Н.Ф., Судаков К.В. Экспрессия гена c-Fos в мозге у крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу в условиях внутрибрюшинного введения аналога АКГГ(4-10) — семакса // Журн. высш. нервн. деят. 2001. Т. 51. № 2. С. 220-227.
5. Anisimov S.V., Bokheler K.R., Khavinson V.Kh., Anisimov V.N. Studies of the effects of Vilon and Epithalon on gene expression in mouse heart using DNA-microarray technology // Bull. Exp. Biol. Med. 2002. Vol. 133, N 3. P. 293-299.
6. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
7. Chen X.W., Jeong J.C. Sequence-based prediction of protein interaction sites with an integrative method // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, N 5. P. 585-591.
8. Fedoreyeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and in vitro specific interaction of the peptides with deoxyribonucleotides and DNA // Biochemistry (Mosc). 2011. Vol. 76, N 11. P. 1210-1219.
9. Khavinson V.Kh., Lin'kova N.S., Dudkov A.V., Polyakova V.O., Kvetnoi I.M. Peptidergic regulation of expression of genes encoding antioxidant and anti-inflammatory proteins // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. Vol. 152, N 5. P. 615-618.
10. Khavinson V.Kh., Lin'kova N.S., Tarnovskaya S.I., Umnov R.S., Elashkina E.V., Durnova A.O. Short peptides stimulate serotonin expression in cells of brain cortex // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, N 1. P. 77-80.
11. Khavinson V.Kh., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S., Pronyayeva V.E., Shataeva L.K., Yakutseni P.P. Short cell-penetrating peptides: a model of interactions with gene promoter sites // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. Vol. 154, N 3. P. 403-410.
12. Khavinson V.Kh., Tandler S.M., Vanyushin B.F., Kasyanenko N.A., Kvetnoy I.M., Linkova N.S., Ashapkin V.V.,

- Polyakova V.O., Basharina V.S., Bernadotte A.* Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium // *Lung*. 2014. Vol. 192, N 5. P. 781-791.
13. *Kolomin T., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N.* Expression of inflammation-related genes in mouse spleen under tuftsin analog Selank // *Regul. Pept.* 2011. Vol. 170, N 1-3. P. 18-23.
14. *Shadrina M., Kolomin T., Agapova T., Agniullin Y., Shram S., Slominsky P., Lymborska S., Myasoedov N.* Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action // *J. Mol. Neurosci.* 2010. Vol. 41, N 1. P. 30-35.
15. *Tarnovskaya S.I., Yakutseni P.P., Khavinson V.Kh.* Study of interactions between DNA and tetrapeptides using methods of molecular mechanics // *Bull. Exp. Biol. Med* 2014. Vol. 156, N 5. P. 689-693.

Получено 10.06.15