

Н. С. Линькова¹, Б. И. Кузник², В. Х. Хавинсон^{1,3}**ПЕПТИД ALA–GLU–ASP–GLY И ИНТЕРФЕРОН ГАММА:
РОЛЬ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ СТАРЕНИИ**

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3;
e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Читинская государственная медицинская академия, 672000 Чита, ул. Горького, 39-а;
e-mail: macadem@mail.chita.ru; ³ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Возрастное снижение экспрессии интерферона гамма, секретируемого лимфоцитами, является одним из ключевых механизмов развития иммунодефицитных состояний у лиц пожилого возраста. Геропротекторный пептид *Ala–Glu–Asp–Gly*, проникающий в клетку, способствует активации и пролиферации лимфоцитов тимуса при его старении. В промоторном участке гена интерферона гамма обнаружена последовательность нуклеотидов, комплементарная пептиду *Ala–Glu–Asp–Gly*. Таким образом, иммунопротекторное действие данного пептида может быть обусловлено активацией синтеза интерферона гамма в Т-клетках.

Ключевые слова: интерферон гамма, лимфоциты, пептид *Ala–Glu–Asp–Gly*, старение

Возрастная инволюция иммунной системы характеризуется наиболее выраженными изменениями по сравнению с другими органами и обусловлена уменьшением количества Т- и В-лимфоцитов, а также тимических гормонов и цитокинов [7, 21, 22]. При этом синтезируемые тимусом цитокины участвуют в эндокринном контроле иммунной и кровеносной систем, а секретируемые им гормоны во многом обладают свойствами нейропептидов [6, 19, 26].

В настоящее время появился ряд сообщений о том, что с возрастом в крови у людей снижается образование стимулированными митогеном мононуклеарами интерферона гамма (*IFNγ*) — ключевого цитокина, недостаток которого играет одну из центральных ролей в развитии иммунопатологических состояний [16]. Более того, Ф. Саутанот и соавт. показали, что у ночного примата (*Microcebus murinus*) уровень *IFNγ* коррелирует с продолжительностью жизни животных [9]. На основании проведенных экспериментов авторы приходят к сенсационному выводу, что концентрация *IFNγ* в плазме может «предсказывать» срок жизни приматов.

Следует отметить, что уровень цитокинов, в том числе и интерферонов, в крови зависит от ин-

тенсивности иммунного ответа, возникающего под влиянием различных чужеродных и собственных антигенов организма [3, 4, 16, 17]. К старости число антигенов, воздействующих на наш организм, неуклонно возрастает, что должно сказаться и на содержании цитокинов. Следовательно, сниженная в старости реакция со стороны интерферона в ответ на действие антигенов является явно неблагоприятной, способной приводить к развитию патологических состояний и даже летальному исходу.

Интерферон гамма синтезируется, в основном, цитотоксическими (*CD8⁺*), стимулированными антигенами или митогенами, а также натуральными киллерами (*NK*-клетками *CD3⁺CD16⁺* и *CD3⁻CD16⁺*). *IFNγ* представляет собой семейство гликопротеинов с молекулярной массой 16–25 кДа. В ранней фазе инфекционного процесса *IFNγ* практически отсутствует или содержится в незначительной концентрации. Образование *IFNγ* и его секреция наступает лишь после повторной встречи предварительно сенсibilизированных лимфоцитов с антигенами. Этот цитокин не способен непосредственно оказывать влияние на инфекционный агент. Его действие осуществляется, главным образом, через моноциты, макрофаги, *NK*-лимфоциты, которые он очень сильно стимулирует. Кроме того, *IFNγ* усиливает действие *IFNα* и *IFNβ* [5], повышает выработку антител, приводит к образованию и секреции провоспалительных цитокинов, активирует деятельность *NK*-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов [16]. Он также индуцирует экспрессию антигенов *HLA* 1-го и 2-го класса на многих клетках, что способствует развитию иммунного ответа, тем самым *IFNγ* усиливает презентацию антигенов и способствует их распознаванию Т-лимфоцитами.

В отдельных случаях, когда *IFNγ* секретируется на ранних этапах патологического процесса *NK*-клетками, он принимает непосредственное участие

в обеспечении адгезии лимфоцитов к эндотелиальным клеткам в посткапиллярных венах. Этот эффект обусловлен экспрессией адгезивных молекул (ICAM-1), что приводит к повышенной адгезии лимфоцитов, экспрессирующих соответствующий лиганд, представляющий собой интегрин *LFA-1*. *IFN γ* способен резко повышать проницаемость сосудов для макромолекул, а в комплексе с *TNF α* — индуцировать образование и секрецию хемокинов, обеспечивающих хемотаксис лейкоцитов.

В то же время, исследованиями, проведенными в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии при участии и под руководством В. Х. Хавинсона [8, 11–15], установлено, что короткие пептиды, синтезированные и сконструированные на основе результатов изучения аминокислотного состава комплекса полипептидов, выделенных из разных органов, способны модулировать течение иммунных реакций, а также значительно увеличивать продолжительность жизни экспериментальных животных [12, 15]. Одним из таких соединений является короткий пептид эпителион, имеющий структуру *Ala–Glu–Asp–Gly* [8].

Короткие, проникающие в клетку пептиды (cell penetrating peptides, CPPs) природного и синтетического происхождения участвуют в активации пролиферации и дифференциации клеток, осуществляемой факторами транскрипции. CPPs представляют собой группу, состоящую не более чем из 20 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 4 кДа [10]. В физиологических условиях CPPs являются многозарядными ионами. Они обладают способностью нековалентно связываться с нуклеиновыми кислотами, аминокислотами, пептидами и транспортировать их к месту назначения внутрь клетки, например к хроматину в ядре [10, 25]. К группе CPPs могут относиться как природные (*R-PTD₄*, *bt-NLS*, *Lig1-PBD-F*, *F(Ahx)-TAT*), так и короткие синтетические пептиды, например *Ala–Glu–Asp–Gly*, созданные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Механизм проникновения высокогидрофильных CPPs в клетку и в геном остается неясным, а имеющиеся гипотезы — прямого проникновения через мембраны, эндоцитоза, мицеллярной интернализации — остаются предметом дискуссии [24]. В любом случае, обращает на себя внимание тот факт, что гидрофильные короткие пептиды, в отличие от стероидных гормонов, могут связываться с гидрофильными группами фосфолипидов на внешней стороне цитоплазматической

мембраны, группироваться и входить в клетку, используя механизм, близкий к пиноцитозу [11, 24].

Отличием мембраны ядра является развитая система транспортных пор, образованных белковыми комплексами — нуклеопоринами, которые контролируют транспорт нуклеопротеиновых комплексов в ядро и из ядра. Внутренний диаметр нуклеопор составляет 42 нм, а внешний — 50 нм. Следовательно, они проницаемы для диффундирующих молекул с молекулярной массой до 5 кДа. При этом размеры рассматриваемого пептида *Ala–Glu–Asp–Gly* составляют около 1,3÷1,4 нм в длину и около 0,6÷1 нм в ширину (рис. 1), их молекулярные массы равны 0,27 и 0,38 кДа, соответственно. Таким образом, пептиды *Lys–Glu* и *Ala–Glu–Asp–Gly* по своим стерическим характеристикам способны проникать в ядро и через нуклеопоры, что констатировалось в работе [11]. Там же было экспериментально показано, что FITC-меченый короткий пептид *Ala–Glu–*

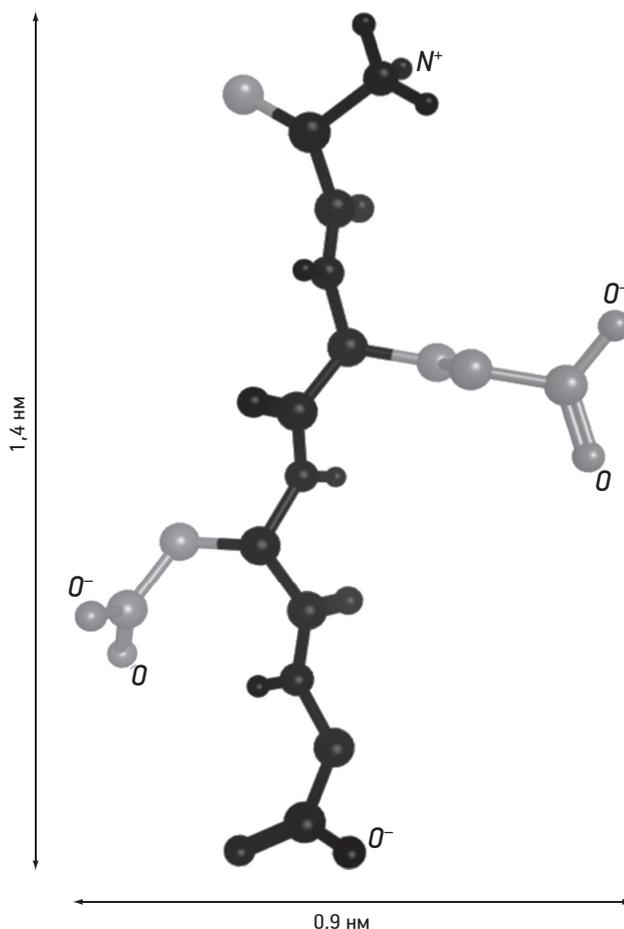


Рис. 1. Конформация пептида *Ala–Glu–Asp–Gly* с оптимальной энергией минимизации. Темно-серым выделены атомы углерода (C), светло-серым — атомы кислорода (O), а черным — атомы азота (N)

Возможные сайты связывания эпиталона в промоторных участках гена *IFN γ*

мРНК	Последовательность (5'→3')
<i>IFNγ</i> (NM_000619.2)	1 cacattgttc tgatcatctg aagatcagct attagaagag aaagatcagct taagtc cctt 61 gg acctgac agcttgatc aagaactact gatttca act ctttgg cctt aattctctcg 121 gaaacg

Примечание. Полу жирным шрифтом отмечены предполагаемые участки связывания пептидов с генами. Промоторные части генов взяты из базы данных GenBank (NCBI), цифрами обозначены порядковые номера нуклеотидов в гене, в скобках указан номер последовательности в базе данных GenBank [2]

Asp–Gly действительно проникает в цитоплазму, ядро и ядрышко клеток *HeLa* [11]. Механизм проникновения пептида *Ala–Glu–Asp–Gly* в ядро может быть аналогичен тому, который описан для природных СРРs [23], однако не исключена возможность, что пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* может транспортироваться в ядро более крупными природными СРРs.

С помощью микрочиповой технологии установлено, что пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* регулирует экспрессию генов, функционально относящихся к разным клеточным системам, в том числе и цитокина *IL-2* [12]. В опытах на мышах было изучено действие эпиталона в дозах 50 пг/мл, 5, 50 и 100 нг/мл на экспрессию гена *IL-2* в лимфоцитах селезенки *in vitro*. Было показано, что пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* стимулирует синтез матричной РНК белка *IL-2* в лимфоцитах, причем выраженность действия зависит от концентрации и продолжительности применения препарата [12]. Максимальную экспрессию гена *IL-2* наблюдали в течение 5 ч после воздействия пептида в двух наименьших концентрациях, тогда как при увеличении содержания и временного интервала до 20 ч эффект снижался. Следовательно, пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* обладает селективным свойством по отношению к сайтам связывания на промоторных участках генов. Предполагается, что аминокислотные остатки природных СРРs образуют сеть водородных связей с функциональными группами в большой канавке двойной спирали ДНК. Вероятно, СРРs *Ala–Glu–Asp–Gly* обладает таким же влиянием, что может обуславливать его иммунопротекторные свойства.

Следует заметить, что *IL-2* является стимулятором синтеза *IFN γ* цитотоксическими лимфоцитами и НК-клетками. Более того, НК-клетки начинают особенно интенсивно продуцировать *IFN γ* лишь после взаимодействия с раковыми или зараженными вирусами клетками, и этот эффект усиливается *IL-12*. Между тем, как показали исследования ряда авторов [1, 2], концентрация *IL-2* и *IL-12* у пожилых людей значительно падает.

Отсюда невольно возникает предположение, что уменьшение концентрации *IFN γ* в старости, с одной стороны, может быть обусловлено снижением синтеза *IL-2*. Пептид *Ala–Glu–Asp–Gly*, нормализуя содержание *IL-2*, неминуемо должен приводить к увеличению в крови уровня *IFN γ* [18]. Однако не исключено, что и сам *IFN γ* способен взаимодействовать с сайтом связывания ДНК в промоторе соответствующего гена.

Для подтверждения высказанной гипотезы мы определили локализацию комплементарных пептиду *Ala–Glu–Asp–Gly* сайтов связывания в промоторном участке гена *IFN γ* (таблица, рис. 2). Наши исследования показали, что в промоторных зонах найдены последовательности *ATTTTC*, *ATTTG*, *GTTTG* и *CTTTC*. Отсюда невольно напрашивается вывод, что пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* связывается с генами *IFN γ* в регуляторной области и активирует экспрессию гена или выступает в качестве кофактора в процессе транскрипции ДНК.

Таким образом, проведенные исследования показали, что найденные последовательности генов *IFN γ* содержат фрагмент ДНК *ATTTTC* — потенциальный сайт связывания с *Ala–Glu–Asp–Gly*. Домены факторов транскрипции, взаимодействующих с ДНК, обладают α -спиральной структурой. При образовании белковой молекулой вторичной структуры α -спирали, один виток спирали приходится на 3,61 остатка, то есть тетрапептид является минимальным фрагментом, в котором может реализоваться α -спиральная структура. К таким тетрапептидам относится *Ala–Glu–Asp–Gly*. В физиологических условиях расстояние между первым и последним атомами углерода основной цепи *Ala–Glu–Asp–Gly* равно 5,43 Å, что точно соответствует шагу α -спирали в молекуле белка [12]. Следовательно, тетрапептид *Ala–Glu–Asp–Gly* может взаимодействовать с большой бороздкой ДНК.

Установлено, что пептид *Ala–Glu–Asp–Gly* обладает способностью увеличивать численность разных субпопуляций клеток тимуса в органотипической культуре клеток тимуса старых крыс. Так, под действием данного пептида в 2–4 раза увеличивалось количество *CD5⁺*-timoцитов, *CD8⁺*-клеток (цитотоксических Т-лимфоцитов), *CD20⁺*-клеток (В-лимфоциты) при одновремен-

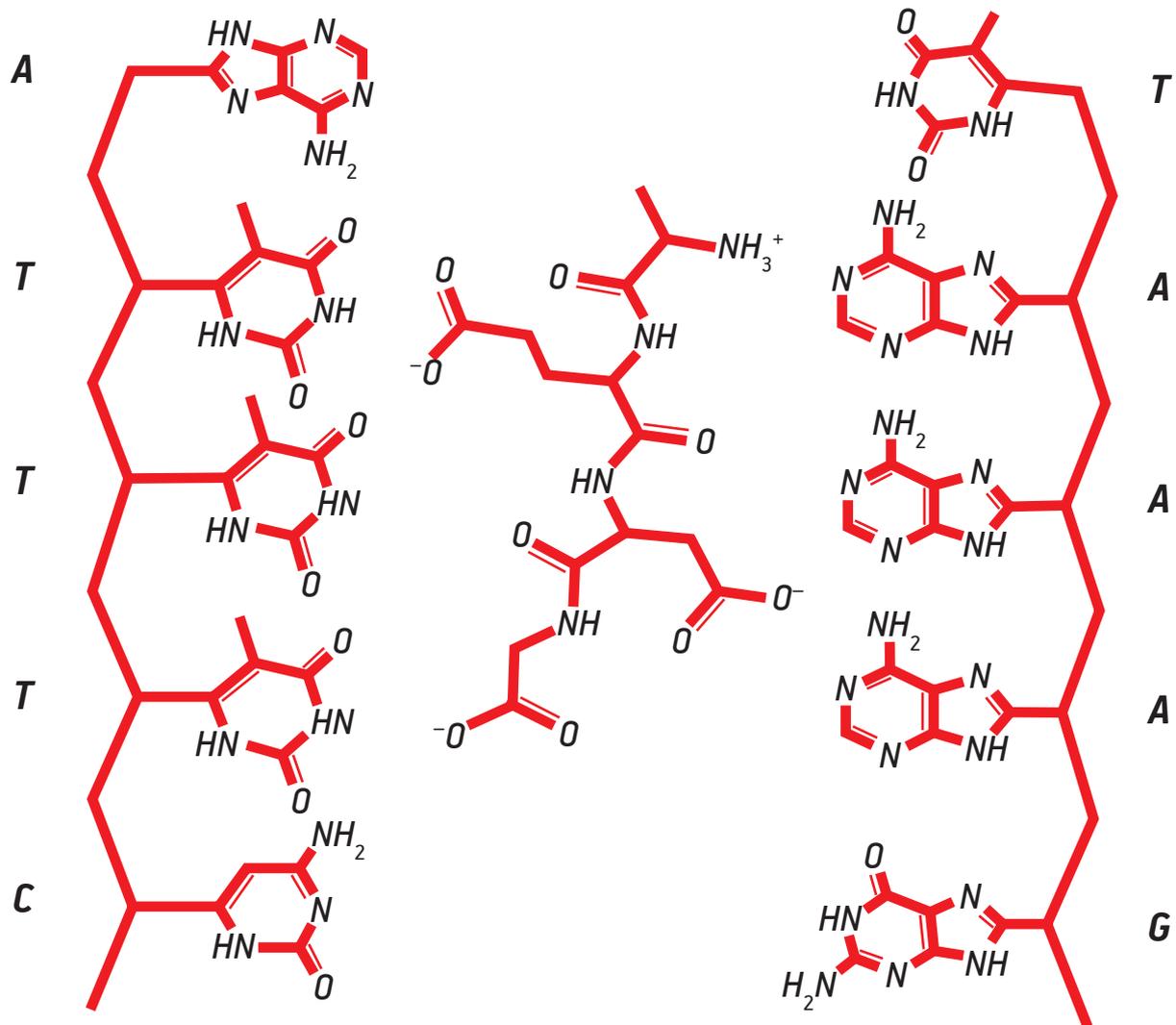


Рис. 2. Локализация пептида *Ala-Glu-Asp-Gly* в большой канавке двуспиральной ДНК в последовательности нуклеотидов *ATTTC* (5'-3') и комплементарной ей *TAAAC* (3'-5').

Жирные линии — связи между атомами углеродов, буквами обозначены атомы азота (N) и кислорода (O)

ном снижении экспрессии проапоптотического транскрипционного фактора *p53*.

Кроме того, пептид *Ala-Glu-Asp-Gly* оказывает ингибирующее действие на эпителиальные клетки тимуса и активирует тимоциты: с одной стороны, снижает экспрессию молекул-маркеров активации эпителиальных тимических клеток (*CD54*, *CD69* и *HLA-DR*), с другой — усиливает экспрессию молекул активации тимоцитов (*CD54* и *HLA-DR*) [20].

Таким образом, иммунопротекторное действие пептида *Ala-Glu-Asp-Gly* может быть связано с активацией тимоцитов и зрелых лимфоцитов, в том числе и с усилением синтеза в них *IFNγ*. Оказывая влияние на экспрессию генов *IL-2* и *IFNγ*, тетрапептид способствует нормализации функций не только клеточного (через *CD8⁺* и *NK*-клетки),

но и гуморального (через *T*-хелперы 2-го клона) иммунитета и, тем самым, обеспечивает снижение заболеваемости и смертности среди лиц пожилого возраста. Разумеется, при этом не отрицаются и иные эффекты эпиталона, а именно нормализация антиоксидантной защиты [8], системы гемостаза [3, 4] и многие другие.

Литература

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Феникс, 2008.
2. Кудряшева И. А., Полунина О. С. Сравнительное изучение продукции провоспалительных цитокинов при внебольничной пневмонии в разные сроки заболевания в зависимости от возраста пациентов // Фундаментальные исследования. 2007. № 12. С. 113–114.
3. Кузник Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010.

4. Кузник Б. И., Лиханов И. Д., Цепелев В. Л., Сизоненко В. А. Теоретические и клинические аспекты биорегулирующей терапии в хирургии и травматологии. Новосибирск: Наука, 2008.
5. Лосева Е. В., Логинова Н. А., Акмаев Н. Г. Роль интерферона альфа в регуляции функций нервной системы // Успехи физиол. наук. 2008. № 2. С. 32–46.
6. Сукманова И. А., Яхонтов Д. А., Поспелова Т. И. и др. Клиническая картина, морфофункциональные параметры и функция эндотелия у пациентов с систолической ХСН разных возрастных групп // Цитокины и воспаление. 2010. Т. 9. № 3. С. 30–34.
7. Ярилин А. А., Хавинсон В. Х., Полякова В. О. и др. Изменения дифференцировки, пролиферации и апоптоза тимоцитов под влиянием синтетических пептидов // Морфология. 2011. Т. 140. № 4. С. 23–26.
8. Anisimov V. N., Khavinson V. Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11. P. 139–149.
9. Caytanot F., Nygard M., Perret M. et al. Plasma levels of interferon γ correlate with age-related disturbances of circadian rhythm and survival in a non-human primate // Chronobiol. Int. 2009. Vol. 26. № 8. P. 1587–1601.
10. Chugh A., Eudes F., Shim Y. S. Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells // IUBMB Life. 2010. Vol. 62. № 3. P. 183–193.
11. 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 deoxyribooligonucleotides and DNA // Biochemistry. 2011. Vol. 76. № 11. P. 1505–1516.
12. Khavinson V. Kh., Malinin V. V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland): Karger AG, 2005.
13. Khavinson V. Kh., Fedoreeva L. I., Vanyushin B. F. Short peptides modulate the effect of endonucleases of wheat seedling // Dokl. Biochem. Biophys. 2011. Vol. 437. P. 64–67.
14. Khavinson V. Kh., Shataeva L. K., Chernova A. A. DNA double-helix binds regulatory peptides similarly to transcription factors // Neuroendocr. Lett. 2005. Vol. 26. № 3. P. 237–241.
15. Khavinson V. Kh., Lezhava T. A., Monaselidze J. R. et al. Peptide Epitalon activates chromatin at the old age // Neuroendocr. Lett. 2003. Vol. 24. № 5. P. 329–333.
16. Kuznik B. I., Pateiuk A. V., Khavinson V. Kh., Malinin V. V. Effect of epitalon on the immunity and hemostasis in hypophysectomized chicken and old hens // Adv. Geront. 2004. Vol. 13. P. 90–93.
17. Kuznik B. I., Isakova N. V., Kliuchereva N. N. et al. Effect of vilon on the immunity status and coagulation hemostasis in patients of different age with diabetes mellitus // Adv. Geront. 2007. Vol. 20. № 2. P. 106–115.
18. Kuznik B. I., Pateiuk A. V., Rusaeva N. S. et al. Effects of hypophyseal Lys–Glu–Asp–Gly and Ala–Glu–Asp–Gly synthetic peptides on immunity, hemostasis, morphology and functions of the thyroid gland in neonatally hypophysectomized chicken and one-year-old birds // Pat. Fiziol. Eksp. Ter. 2010. Vol. 1. P. 14–18.
19. Kvetnoy I. M., Polyakova V. O., Trofimov A. V. et al. Hormonal function and proliferative activity of thymic cells in humans: immunocytochemical correlations // Neuroendocr. Lett. 2003. Vol. 24. № 3–4. P. 263–268.
20. Lin'kova N. S., Polyakova V. O., Kvetnoy I. M. Interrelation of cell apoptosis and proliferation in the thymus during its involution // Bull. exp. Biol. Med. 2011. Vol. 151. № 4. P. 460–462.
21. Linkova N. S., Polyakova V. O., Trofimov A. V. et al. Influence of peptides from pineal gland on thymus function with aging // Adv. Geront. 2011. Vol. 1. № 3. P. 240–243.
22. Lin'kova N. S., Polyakova V. O., Kvetnoy I. M. et al. Specific features in the pineal gland –thymus relationships during aging // Adv. Geront. 2011. Vol. 1. № 4. P. 295–298.
23. Seeman N. C., Rosenberg J. M., Rich A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73. № 3. P. 804–808.
24. Trabulo S., Cardoso A. L., Mano M. et al. S4(13)-PV cell penetrating peptide and cationic liposomes act synergistically to mediate intracellular delivery of plasmid DNA // Pharmaceuticals 2010. Vol. 3. P. 961–993.
25. Tünnemann G., Martin R. M., Haupt S. et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells // FASEB J. 2006. Vol. 20. № 11. P. 1775–1784.
26. Yarin A. A., Belyakov I. M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // Curr. Med. Chem. 2004. Vol. 11. № 4. P. 447–464.

Adv. geront. 2012. Vol. 25. № 3. P. 478–482

N. S. Linkova¹, B. I. Kuznik², V. Kh. Khavinson^{1,3}

PEPTIDE ALA–GLU–ASP–GLY AND INTERFERON GAMMA: THEIR ROLE IN IMMUNE RESPONSE DURING AGING

¹ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 pr. Dinamo, St. Petersburg 197110; e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Chita State Medical Academy, 39-a ul. Gor'kogo, Chita 672000; e-mail: macadem@mail.chita.ru; ³ I. P. Pavlov Institute of Physiology, RAS, 6 Nab. Makarova, St. Petersburg 199034

The decrease of lymphocyte interferon gamma expression during aging is one of the main mechanisms leading to the immunodeficiency state in the elderly. Cell penetrating geroprotective peptide *Ala–Glu–Asp–Gly* has the capability to activate the proliferation of lymphocytes in thymus during its aging. The nucleotide sequence which is complementary contacted with peptide *Ala–Glu–Asp–Gly* was found in promoter region of interferon gamma gene. Thus, the immune protection of this peptide can be explained by its activation of the interferon gamma production in T-cells.

Key words: *interferon gamma, lymphocytes, peptide Ala–Glu–Asp–Gly, aging*