

577.323.7

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА AEDL С ДНК *IN VITRO*Е.А. Морозова¹, Н.С. Линькова^{2,4}, В.Х. Хавинсон^{2,3}, А.Ю. Соловьёв⁵, Н.А. Касьяненко¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Физический факультет, Россия
E-mail: morozova.kate91@gmail.com

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Россия

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Россия

⁵Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Статья поступила 11 мая 2016 г.

Пептид AEDL в опытах на клеточных культурах зарекомендовал себя как эффективное средство, стимулирующее процессы клеточного обновления и повышение функциональной активности клеток бронхиального эпителия. Предполагаемой мишенью действия пептида является молекула ДНК. В работе проведено изучение связывания пептида с высокомолекулярной ДНК в растворах разной ионной силы. Спектральные (УФ спектрофотометрия и круговой дихроизм) и гидродинамические (вискозиметрия) методы показали, что пептид AEDL в условиях эксперимента образует комплекс с ДНК, при этом в связывании участвуют азотистые основания. Характер спектральных изменений ДНК указывает на возможное взаимодействие пептида AEDL с ДНК в большой бороздке по позиции N7 гуанина без видимого нарушения двуспиральной структуры.

DOI: 10.15372/JSC20170229

Ключевые слова: тетрапептид AEDL, бронхиальный эпителий, ДНК-пептидные взаимодействия, круговой дихроизм, вискозиметрия.

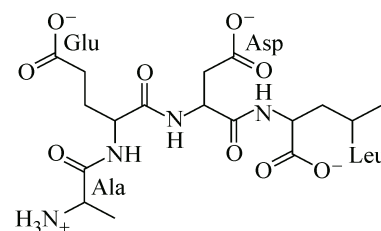
ВВЕДЕНИЕ

Короткие пептиды, состоящие не более чем из 20 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 3,5 кДа, играют важную роль в различных физиологических процессах. В частности, они являются сигнальными молекулами, участвующими в регуляции гомеостаза на различных уровнях организации живой материи. Основным физиологическим механизмом образования коротких пептидов является гидролиз высокомолекулярных белков.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были получены природные полипептидные экстракты, выделенные из органов крупного рогатого скота. Были также синтезированы их короткие аналоги, обладающие выраженной тканеспецифической активностью [1]. Регуляторная активность ряда природных и синтетических пептидов была изучена на клеточных культурах и в экспериментальных моделях на животных разного возраста и в клинических испытаниях у людей. Установлено, что пептиды стимулируют экспрессию генов и синтез белка в клетках тех органов, из которых они были выделены [2].

Пептид AEDL (рис. 1), регулирующий функции бронхо-легочной системы, был синтезирован в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии классическим методом пептидного синтеза в растворе [3].

Рис. 1. Структурная формула пептида AEDL



Биологическая активность AEDL установлена при анализе течения острого воспаления легких в результате бактериального повреждения, при хроническом фиброзном воспалительном процессе и сублетальном гипероксическом повреждении легких у животных [3]. Все перечисленные патологии характеризуются существенными изменениями морфологии легких и клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости. Установлено, что пептид AEDL способствует нормализации клеточного состава ткани бронхов при различных патологических процессах [4]. Пероральное применение биологически активной добавки, активным действующим веществом которой является пептид AEDL, показало свою эффективность и безопасность в комплексном лечении пациентов с хроническим бронхитом, что позволяет рекомендовать его применение у больных с нарушением функций легких и бронхов при хронических заболеваниях органов дыхания различного происхождения, а также для поддержания функции дыхательной системы у лиц старших возрастных групп.

Молекулярный механизм биологической активности пептида связан с его способностью эпигенетически регулировать синтез широкого спектра белков в бронхиальном эпителии человека [5, 6]. Пептид AEDL активирует процессы клеточного обновления в бронхиальном эпителии, стимулируя синтез белков Ki67, Mcl-1, p53 и регулируя функциональное состояние клеток, повышая экспрессию молекул CD79 и NOS-3. Тетрапептид активирует экспрессию генов дифференцировки бронхиального эпителия человека Nkx2.1, SCGB1A1, SCGB3A2, FoxA1, FoxA2, а также генов MUC4, MUC5AC, Sftpa1, снижение экспрессии которых коррелирует с развитием хронического бронхита [6]. Установлено, что в клетках бронхиального эпителия при старении и под действием пептида AEDL изменяется профиль метилирования промоторных участков генов NKX2-1 и SCGB1A1, что коррелирует с изменениями в уровне экспрессии этих генов.

Исследование молекулярных механизмов действия пептида AEDL и его эффективности в отношении лечения бронхо-легочной патологии позволяет сделать вывод о том, что он эпигенетически регулирует экспрессию генов и синтез белков, участвующих в дифференцировке и поддержании функциональной активности клеток бронхиального эпителия. Предполагаемой мишенью действия пептида *in vivo* является молекула ДНК [7]. Целью данной работы явилось исследование возможности связывания пептида AEDL с молекулой ДНК в растворе с использованием методов, которые позволяют следить за состоянием вторичной и третичной структуры макромолекулы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческий препарат ДНК тимуса теленка фирмы Sigma с молекулярной массой $8,8 \cdot 10^6$ Да, определенной по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl. Пептид AEDL был синтезирован в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Препарат ДНК растворяли в дистиллированной воде в течение 5 суток при температуре 4 °С, после чего смешивали с раствором с определенной концентрацией NaCl до достижения заданной ионной силы, фильтровали и определяли концентрацию ДНК по разнице поглощения ее гидролизованых растворов (15 мин при температуре 100 °С в 6 % HClO₄). Пептид растворяли в 5 мМ растворе NaCl. Исходная концентрация составляла около 10 мМ. Концентрацию соли в растворах ДНК пептидов варьировали (0,005, 0,015 и 1 М NaCl). При проведении исследований использовали растворы ДНК с пептидом, приготовленные сливанием равных объемов растворов компонентов взаимодействия. Концентрацию ДНК (или пептида) сохраняли постоянной при изменении концентрации второго компонента. Для характеристики растворов использовали отношение молярной концентрации пептида к молярной концентрации пар оснований ДНК *r*, показывающее какое количество молекул пептида приходится на пару оснований в растворе.

Спектры поглощения растворов регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-56 (Россия). Спектры кругового дихроизма ДНК и ее комплексов измеряли с использованием автодихрографа Mark IV (Франция).

Плавление ДНК и ее комплексов с пептидами исследовали при помощи спектрофотометра "Shimadzu UV-1700" (Япония) с термостатированными кюветами; нагревание растворов проводили со скоростью 2 град./мин. Концентрация ДНК во всех системах составляла 0,001 % (0,015 мМ (пары оснований (п.о.))), а количество пептида AEDL соответствовало соотношению две молекулы пептида на одну пару оснований ДНК. В результате получали кривые плавления контрольных растворов ДНК и ДНК в присутствии пептида AEDL, на основании которых рассчитывали температуру плавления и величину гиперхромного эффекта.

Для исследования влияния пептида AEDL на третичную структуру макромолекулы ДНК был использован метод вискозиметрии. Для определения вязкости растворов в работе использовали модифицированный низкоградиентный вискозиметр типа Зима—Крозерса. Определяли относительную вязкость растворов η_r , которую использовали для расчета приведенной вязкости $(\eta_r - 1)/C$, где C — концентрация ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения ДНК, пептида AEDL и их комплекса при концентрации NaCl 5 мМ представлены на рис. 2. Спектры получены в день приготовления систем.

Анализ данных показал, что взаимодействие пептида AEDL с ДНК в растворе 5 мМ NaCl проявлялось сразу после приготовления растворов и сохранялось спустя 7 суток при хранении растворов при 4 °С. Так как пептид не поглощает в области длин волн более 240 нм, мы можем следить за изменением спектра поглощения ДНК в комплексе в этом частотном диапазоне. Эксперимент показал, что связывание пептида с ДНК приводит к появлению небольшого гипохромного эффекта в области длин волн менее 272 нм, а при больших длинах волн появляется "плечо". Такие спектральные изменения могут быть связаны с присоединением лигандов к группе N7 гуанина в большой бороздке ДНК [8]. Спектральные исследования показали также, что в растворе 0,15 М и 1 М NaCl взаимодействие проявляется слабо.

На рис. 3 представлены спектры комплексов при различных концентрациях пептида ($C_{\text{ДНК}} = 0,001\%$). С увеличением r происходит постепенное увеличение гипохромного эффекта, а при $r > 10$ рассматриваемый тип связывания достигает насыщения, т.е. все возможные сайты связывания такого типа на ДНК заняты. Спектры кругового дихроизма также показывают

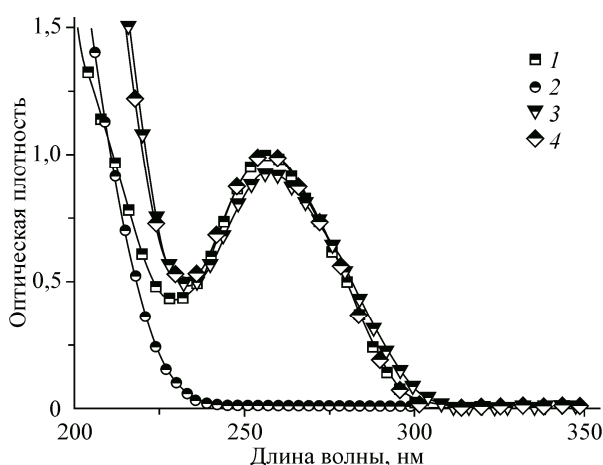


Рис. 2. Спектры УФ поглощения ДНК (1), пептида (2), их комплекса при $r = 2$ (3) в растворе 5 мМ NaCl и расчетный суммарный спектр поглощения компонентов (4)

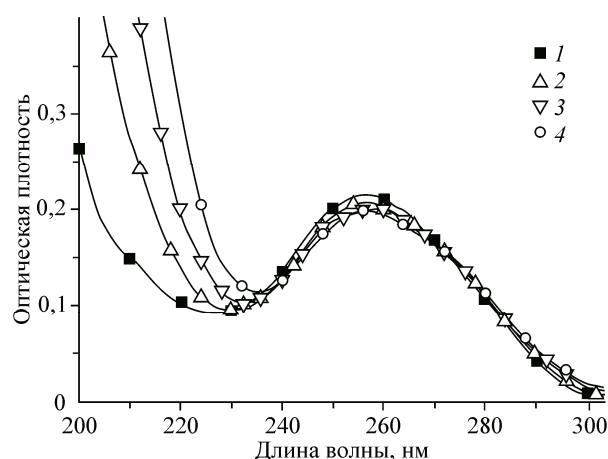


Рис. 3. Спектры поглощения комплексов ДНК с пептидом AEDL в растворе 5 мМ NaCl при концентрации ДНК 0,001 % (1) и различных концентрациях пептида ($r = 2$ (2), $r = 5$ (3), $r = 10$ (4))

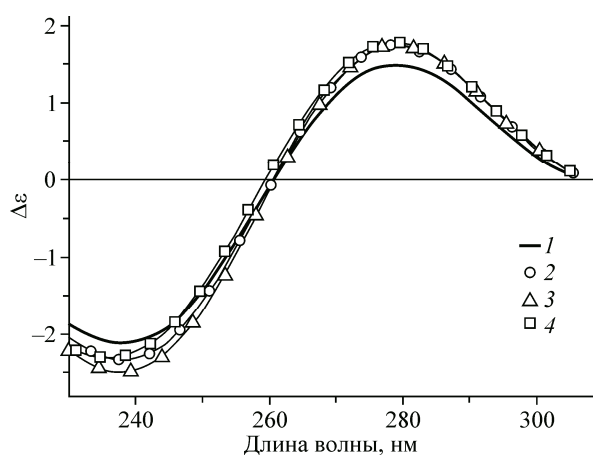


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма ДНК и ее комплексов с пептидом AEDL в растворе 5 мМ NaCl при концентрации ДНК $C = 0,001\%$ (1) и различных концентрациях пептида ($r = 1$ (2), $r = 5$ (3), $r = 15$ (4)), pH фиксировали с использованием *трис*-ацетатного буфера

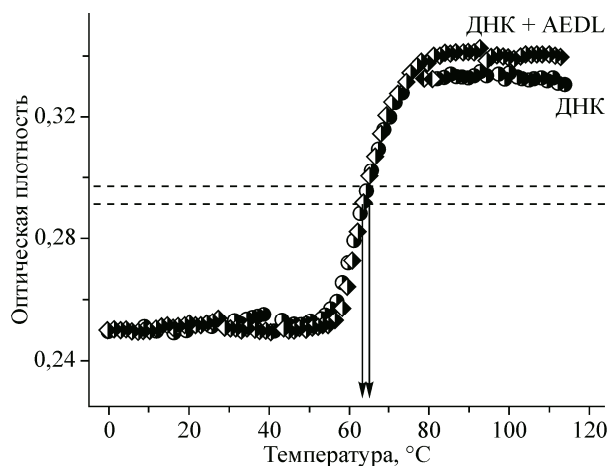


Рис. 5. Кривые плавления контрольной нативной тимусной ДНК и в присутствии пептида AEDL в водном растворе с ионной силой 5 мМ NaCl

(рис. 4), что пептид AEDL оказывает специфическое воздействие на вторичную структуру ДНК в 5 мМ NaCl.

Вид спектров кругового дихроизма при этом указывает на существенное влияние концентрации пептида в растворе ДНК на процесс связывания. Следует отметить, что в 0,15 М и 1 М NaCl видимых изменений в спектре КД ДНК не наблюдалось.

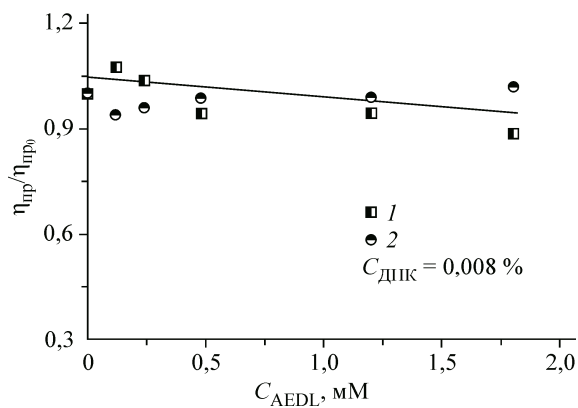
Для изучения влияния пептида AEDL на стабильность молекулы ДНК было проведено плавление комплекса ДНК и пептида AEDL (рис. 5). Температура плавления ДНК составила 65 °С, а в присутствии пептида значение составило 62 °С. Так, под действием пептида AEDL температура плавления ДНК по сравнению с контролем не меняется. Это согласуется и со спектральными данными, рассмотренными выше.

Для исследования влияния тетрапептида AEDL на третичную структуру молекулы ДНК применяли метод низкоградиентной вискозиметрии.

Из рис. 6 видно, что при взаимодействии пептида AEDL с молекулой ДНК происходит весьма незначительное изменение вязкости. Мы не можем утверждать, что объем макромолекулы при взаимодействии меняется, так как эти изменения лежат в пределах ошибки эксперимента. Этот результат не указывает на отсутствие связывания пептида AEDL с ДНК, так как другие методы фиксируют взаимодействие. Экспериментальные данные указывают также на отсутствие дестабилизации вторичной структуры ДНК при взаимодействии с пептидом.

Таким образом, сочетание спектральных изменений при отсутствии заметного падения объема макромолекулы указывает на то, что в связывании с пептидом участвуют азотистые основания ДНК, но такое связывание не дестабилизирует вторичную структуру макромолекулы и не вызывает уменьшения жесткости макромолекулы. Мы полагаем, что пептид располагается в большой бороздке ДНК.

Рис. 6. Относительное изменение приведенной вязкости раствора ДНК в присутствии пептида AEDL в различных концентрациях. Измерения проведены при ионной силе 5 мМ (1) и 0,15 М (2)



На основании полученных данных можно заключить, что пептид AEDL взаимодействует с макромолекулой ДНК в растворе, причем увеличение концентрации низкомолекулярной соли затрудняет взаимодействие компонентов. Совокупность экспериментальных результатов указывает, что пептид связывается с азотистыми основаниями ДНК, вызывая характерные изменения ее спектра УФ поглощения. Предполагаемым местом связывания тетрапептидов с ДНК является атом N7 гуанина в большой бороздке. При этом связывание пептида не приводит к дестабилизации вторичной структуры макромолекулы, как это следует из анализа кривых плавления ДНК в комплексе с пептидом. Связывание пептида также не оказывает существенного влияния на третичную структуру ДНК в растворе.

На данном этапе исследований полученные результаты экспериментально подтверждают возможность взаимодействия пептида AEDL с ДНК *in vivo*. Однако открытым остается вопрос об установлении нуклеотидных последовательностей (участков связывания) пептида с ДНК. Проведенное исследование очерчивает также круг концентраций компонентов взаимодействия и открывает возможности для дальнейшего исследования молекулярных механизмов взаимодействия тетрапептида с ДНК *in vitro* другими методами.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований 13-03-01192а и СПбГУ 11.37.290.2015.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хавинсон В.Х., Анисимов С.В., Малинин В.В. и др. Пептидная регуляция генома и старение. – М.: РАМН, 2005.
2. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // *Biogerontology*. – 2010. – **11**. – P. 139 – 149.
3. Khavinson V.Kh., Ryzhak G.A., Grigoriev E.I. et al. // US Patent US 7,625,870. – 2009.
4. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Polyakova V.O. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2012. – **153**, N 1. – P. 148 – 151.
5. Khavinson V.Kh., Tendler S.M., Vanyushin B.F. et al. *Lung*, published online. – 2014. – DOI: 10.1007/s00408-014-9620-7.
6. Khavinson V.Kh., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2013. – **154**, N 3. – P. 403 – 408
7. Fedoreeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh. et al. // *Biochemistry*. – 2010. – **76**. – P. 1210 – 1219.
8. Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В. // *Молек. биол.* – 1989. – **23**. – С. 975 – 982.