

УДК 576.524:577.112.6

О ВАРИАТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОГО АДГЕЗИВНОГО ОТВЕТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РОДСТВЕННЫХ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ

© 2023 г. В. П. Иванова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*E-mail: valet@iephb.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 30.08.2022 г.

Принята к публикации 04.09.2022 г.

В работе изучена роль коротких пептидов FGER и GER, содержащих общий трипептидный фрагмент, в регуляции адгезивного ответа клеток CHO-K1. Оба пептида увеличивали клеточную адгезию, как на необработанном пластике, так и на желатине, адсорбированном на пластике, но не влияли на скорость прикрепления клеток к адсорбированному на пластике поли-L-лизину. Пептид GER больше стимулировал клеточную адгезию на необработанном пластике. Пептид FGER увеличивал скорость прикрепления клеток к желатину в более широком диапазоне концентраций по сравнению с таковой на необработанном пластике. Отмечена вариативность процесса распластывания клеток на разных субстратах под влиянием исследованных пептидов. На необработанном пластике оба пептида практически в равной степени стимулировали распластывание клеток. На желатине пептид FGER сохранял способность стимулировать распластывание клеток, а пептид GER частично ингибировал распластывание по сравнению с таковым на необработанном пластике. Установлено, что включение дополнительного N-концевого гидрофобного аминокислотного остатка Phe к трипептидному фрагменту GER изменяет регуляторную активность пептида на модели клеточной адгезии в зависимости от стадии взаимодействия клеток с субстратом и (или) от свойств поверхности прикрепления. Обсуждается структурно-функциональная активность исследованных пептидов в отношении различных структурных компонентов адгезионных структур.

Ключевые слова: родственные короткие пептиды, адгезия, распластывание, клетки CHO-K1

DOI: 10.31857/S0041377123010054, **EDN:** GOYZIE

Клеточная адгезия — динамический процесс, определяющий не только связь клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ), но и вовлечение молекул адгезии в процессы межклеточной сигнализации (Bergier, Yamada, 2007). На разных стадиях формирования адгезионных структур изменяется состав этих образований. Неизменным остается наличие в клеточно-матриксных адгезиях интегриновых рецепторов, которые обеспечивают связывание ВКМ с цитоскелетом клетки.

Интегрины представляют собой гетеродимерные трансмембранные рецепторы, состоящие из α - и β -субъединиц (Barczyk et al., 2010; Pan et al., 2016). К настоящему времени известно 24 вида интегриновых рецепторов. Гетерогенность интегриновых рецепторов определяет вариативность адгезивного ответа у клеток при прочих равных условиях. Молекула интегринов состоит из внеклеточного домена, осуществляющего связывание с лигандом, трансмембранного домена, определяющего разделение α - и β -трансмембранных участков рецептора в плоско-

сти мембраны, и короткого цитоплазматического домена, регулирующего связывание рецептора с белками цитоскелета и сигнальными системами (Luo et al., 2004; Morse et al., 2014). Активность интегринов регулируется двояким образом: во-первых, за счет связывания лиганда (белков ВКМ) с рецептором, которое приводит к активации посредством конформационных изменений в эктодомене (outside-in signaling); во-вторых, за счет ассоциации внутриклеточных адаптерных белков цитоскелета с цитоплазматическим доменом рецептора, которая завершается усилением аффинности интегринового рецептора (inside-out signaling) (Li et al., 2016; Иванова, 2021).

Правильное функционирование рецепторов необходимо для адекватного реагирования клетки на действие внешних факторов. Как известно, в основе многих биологических процессов, осуществляемых белками, лежит специфическое взаимодействие между белками и лигандами в функционально значимых зонах. Белок-белковые взаимодействия опосредуются специфическими местами связывания (Reichmann et al., 2007). Как правило, к ним относятся определенные пептидные сегменты, определяю-

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс; FGER — пептид Phe-Gly-Glu-Arg; GER — пептид Gly-Glu-Arg.

щие селективность взаимодействия. Ключевую роль в межбелковых контактах играют линейные пептидные структуры, способные связываться как со структурированными доменами, так и с неструктурированными участками белков (Petsalaki, Russell, 2008; Tompa et al., 2009). Чаще всего сайты связывания белков включают в свой состав крупные аминокислотные остатки (Tyr, Arg и Trp) (Reichmann et al., 2007; London et al., 2013).

Взросший интерес к поиску пептидных препаратов, способных имитировать сайты связывания (или другие функциональные центры белков) связан с реальной возможностью регуляции функций белков посредством направленного изменения межбелкового интерфейса с помощью синтетических пептидов (Eichler, 2008; London et al., 2013; Apostolopoulos et al., 2021). Не менее важна регуляторная роль пептидных молекул, не имеющих структурного сходства с межбелковыми сайтами связывания, в модуляции эффективности межбелковых контактов.

Регуляторные пептиды относятся к группе полифункциональных соединений (Ашмарин, Каразеева, 1996; Замятнин, 2004), т.е. обладают широким спектром физиологической активности и могут воздействовать на разные мишени. Связано это, прежде всего, с относительной простотой строения коротких пептидных соединений, содержащих от 2 до 8 аминокислотных остатков. Ввиду малой длины последовательности пептиды не образуют полноценной вторичной структуры. Возможно наличие определенных изгибов в аминокислотной цепи (β -изгибы или неполные спиралевидные обороты), влияющих на пространственную структуру пептида, чаще всего приводящую к флуктуации пространственной ориентации боковых радикалов аминокислотных остатков, входящих в состав пептида (Костецкий, Артемьев, 2000). Если в состав пептида не входят остатки Cys, способные образовывать дисульфидные связи, то пептид, в этом случае, не содержит внутримолекулярного пространственного стабилизатора. Большая часть биологически активных пептидов характеризуется подвижной конформацией, изменяющейся в зависимости от условий микроокружения, в первую очередь от величины pH среды. Пространственная подвижность регуляторных пептидов, с одной стороны, обуславливает их полифункциональность, с другой — создает трудности при отборе пептидов, регуляторное действие которых должно ограничиваться только одной клеточной мишенью.

Цель представленной работы заключалась в изучении вариативности воздействия коротких пептидов с общим структурным ядром GER (Gly-Glu-Arg) и FGER (Phe-Gly-Glu-Arg) на адгезию эпителиоподобных клеток в зависимости от стадии клеточного адгезивного ответа и использованных полимерных носителей с различными характеристиками в качестве поверхности прикрепления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовали эпителиоподобную линию клеток CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells, клетки яичника китайского хомячка), полученную из “Коллекции культур клеток позвоночных” (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Для проведения экспериментов клетки культивировали в среде ДЕМЕМ/F12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки, достигшие монослоя, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS; Sigma, США) и суспендировали в питательной среде.

Оценка адгезии клеток. Влияние пептидов GER и FGER, синтезированных на кафедре химии природных соединений СПбГУ, на адгезию клеток линии CHO-K1 оценивали по описанному ранее методу (Yakuwa et al., 1989). Клетки инкубировали с пептидами или без пептидов (контроль). Пептиды вносили в клеточную суспензию в полной питательной среде в концентрациях от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁵ М перед экспериментом. Клеточную суспензию (10⁶ кл./мл) переносили в 96-луночные планшеты (Corning, США), предварительно обработанные или нет раствором желатина (здесь и далее: 20 мкг/мл в PBS, 18 ч при 4°C,) или поли-L-лизина (0.01%). Клетки выдерживали 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым (0.3% в метаноле). Связанный краситель экстрагировали этанолом. Оптическую плотность полученного экстракта измеряли на анализаторе “Униплан” (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм. По величине оптической плотности судили об изменении количества прикрепившихся клеток. Результаты выражали в % от контроля.

Оценка распластывания. Изучали процесс распластывания клеток на чашках Петри (Corning, США), покрытых или нет раствором желатина (см. выше), в которые вносили клетки (2 × 10⁵ кл./мл) в питательной среде, содержащей 0.2% сыворотки. Пептиды в концентрации от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁵ М вносили в клеточную суспензию перед посевом клеток на чашки Петри. Клетки выдерживали 45 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе. Подсчет клеток после их фиксации проводили под микроскопом Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия), используя объектив 20×. Распластанной считали клетку с выраженными отростками, нераспластанной — клетку округлой формы. Учитывали количество распластных клеток (%) при подсчете не менее 200 клеток в каждом варианте.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для сравнения контрольных и экспериментальных групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали влияние коротких пептидов: трипептида GER и тетрапептида FGER, отличающегося от трипептида наличием дополнительного аминокислотного остатка Phe на N-конце молекулы, на адгезивную способность эпителиоподобных клеток CHO-K1. Оценивали клеточный ответ под действием пептидов на разных субстратах клеток: культуральном пластике и на пластике, покрытом поли-L-лизинном (синтетическим поликатионом) или желатином (природным биodeградируемым полимером). Последний является продуктом денатурации коллагена I типа, одного из основных компонентов ВКМ, определяющих взаимодействие резидентных клеток.

Установлено, что пептид GER при всех использованных концентрациях увеличивал число прикрепившихся клеток к необработанному пластику, при этом максимальный эффект наблюдали при концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М ($P < 0.05$ или $P < 0.01$) (рис. 1а). Менее выраженный эффект отмечали при культивировании клеток с пептидом GER в дозах 10^{-7} – 10^{-5} М ($P < 0.01$ или $P < 0.05$).

Пептид FGER по сравнению с трипептидом GER стимулировал процесс прикрепления изученных клеток на необработанном пластике менее эффективно (рис. 1б). Культивирование клеток с пептидом FGER приводило к увеличению числа прикрепившихся клеток при концентрациях 10^{-10} – 10^{-9} М ($P < 0.01$) и 10^{-7} – 10^{-6} М ($P < 0.05$ или $P < 0.01$). Необходимо отметить, что усиление клеточной адгезии на культуральном пластике под действием пептида FGER в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-5} М сохранялось приблизительно на одном уровне.

Хорошо известно, что изменение физико-химических параметров субстрата влияет на степень клеточной адгезии (Maheshwari et al., 2000; Yeung et al., 2005; Wells, 2008). Адсорбция поли-L-лизина или желатина на культуральном пластике по-разному влияла на способность клеток, обработанных исследованными пептидами, прикрепляться к твердой поверхности (рис. 1). Пептиды GER и FGER, внесенные в питательную среду, не влияли на адгезию эпителиоподобных клеток к синтетическому поликатиону поли-L-лизину.

Оба изученных пептида увеличивали количество прикрепившихся клеток к желатину в широком диапазоне концентраций (кроме концентрации 10^{-5} М) по сравнению с контрольными клетками, не обработанными пептидами (рис. 1). При этом по абсолютным значениям пептид GER стимулировал клеточную адгезию на желатине больше, чем пептид FGER (за исключением концентрации 10^{-7} М) по сравнению с контрольными клетками.

Показано, что пептид GER в дозах от 10^{-10} до 10^{-8} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) стимулировал клеточную адгезию на желатине практически так же (по величине), как и на необработанном пластике, а в дозах 10^{-7} и 10^{-6} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) незначительно усиливал адгезию на желатине по сравнению с необработанным пластиком (рис. 1а). Количество прикрепившихся клеток на желатине под действием пептида FGER увеличивалось по сравнению с таковым на необработанном пластике. При этом пептид стимулировал клеточную адгезию на желатине в концентрации от 10^{-10} до 10^{-6} М ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) (рис. 1б).

Для интерпретации полученных данных введено понятие прироста прикрепленных (распластанных) клеток на определенном субстрате относительно соответствующих контрольных значений (использовали средние значения). Отношение прироста прикрепленных (распластанных) клеток на желатине к аналогичному показателю на необработанном пластике позволяет более четко оценить степень влияния типа субстрата на изменение числа прикрепленных (распластанных) клеток под воздействием пептидов.

Сравнивая значения прироста обработанных пептидами прикрепившихся клеток к желатину и к необработанному пластику, обнаружили следующее. Максимальное усиление адгезии клеток к желатину под влиянием пептида GER отмечали при концентрациях 10^{-7} (в 2.03 раза) и 10^{-6} М (в 1.41 раза) по сравнению с таковым на необработанном пластике. При обработке клеток пептидом FGER максимальное увеличение количества прикрепленных клеток к желатину обнаружено при концентрациях пептида 10^{-9} (в 1.83 раза), 10^{-7} (в 1.94 раза) и 10^{-6} М (в 1.76 раза). Это означает, что на желатине пептид GER наиболее эффективно действовал в дозах 10^{-7} и 10^{-6} М, а пептид FGER – в дозах 10^{-9} , 10^{-7} и 10^{-6} М в сравнении с необработанным пластиком.

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что пептиды GER и FGER участвуют в регуляции процессов расплывания эпителиоподобных клеток линии CHO-K1. Оба исследованных пептида стимулировали расплывание клеток на необработанном пластике во всем диапазоне исследованных концентраций. Не обнаружено зависимости доза–эффект для обоих пептидов, данные об увеличении числа распластанных клеток на необработанном пластике колебались в пределах близких значений для каждого из исследованных пептидов. Вместе с тем, наибольшее увеличение количества клеток, распластанных на пластике, выявлено под действием пептида GER в дозах 10^{-9} (в 1.29 раза), 10^{-7} (в 1.35 раза) и 10^{-5} М (в 1.29 раза), а под действием пептида FGER – при концентрациях 10^{-8} и 10^{-7} М (в 1.31 раза) по сравнению с контрольными клетками.

Процесс расплывания клеток CHO-K1 на пластике, покрытом желатином, после обработки клеток пептидом GER отличался от такового после культивирования клеток с пептидом FGER (рис. 2а, б). Пептид GER практически не влиял на процессы

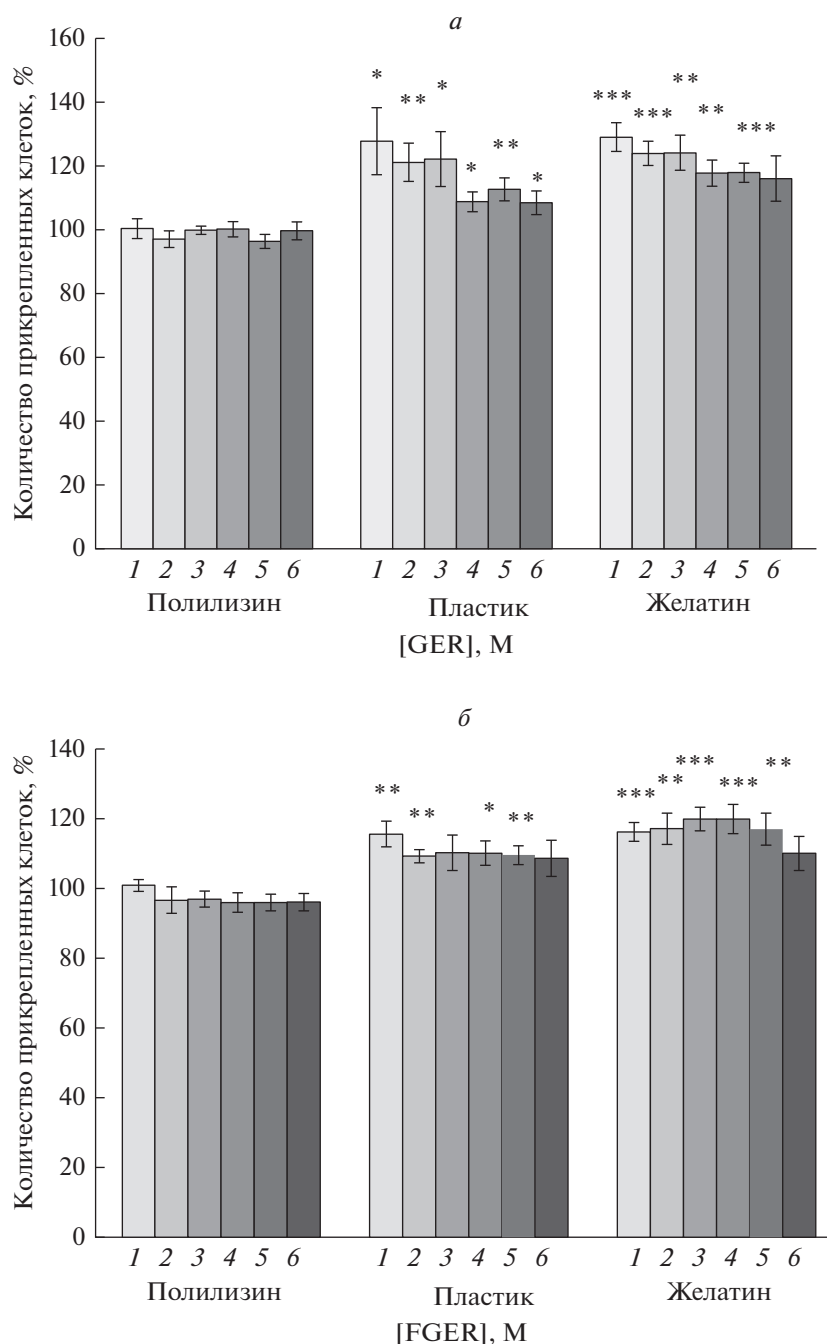


Рис. 1. Влияние пептидов GER (а) и FGER (б) на адгезию клеток CHO-K1 на необработанном пластике и на пластике, покрытом поли-L-лизинном или желатином. Концентрация пептидов (М): 10^{-10} (1), 10^{-9} (2), 10^{-8} (3), 10^{-7} (4), 10^{-6} (5), 10^{-5} (6). Представлены данные в % от контроля (клеток, не обработанных пептидами). Пептиды вносили в питательную среду с 10% сыворотки перед началом эксперимента. Через 1 ч культивирования при 37°C прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. По величине оптической плотности экстрагированного красителя судили об изменении числа прикрепившихся клеток. Достоверность отличий от контроля показана одной ($P < 0.05$), двумя ($P < 0.01$) или тремя ($P < 0.001$) звездочками (по *t*-критерию Стьюдента). В каждом варианте сделано от 5 до 7 независимых измерений.

клеточного распластывания на желатине при концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М и только при концентрации 10^{-7} ($P < 0.01$) и 10^{-6} М ($P < 0.05$) увеличивал количество распластных клеток по сравнению с контрольными клетками. Пептид FGER во всем

диапазоне использованных концентраций увеличивал число распластных клеток на желатине ($P < 0.01$ или $P < 0.001$) по сравнению с контролем.

Интересно отметить, что прирост распластных клеток на желатине под действием пептида FGER су-

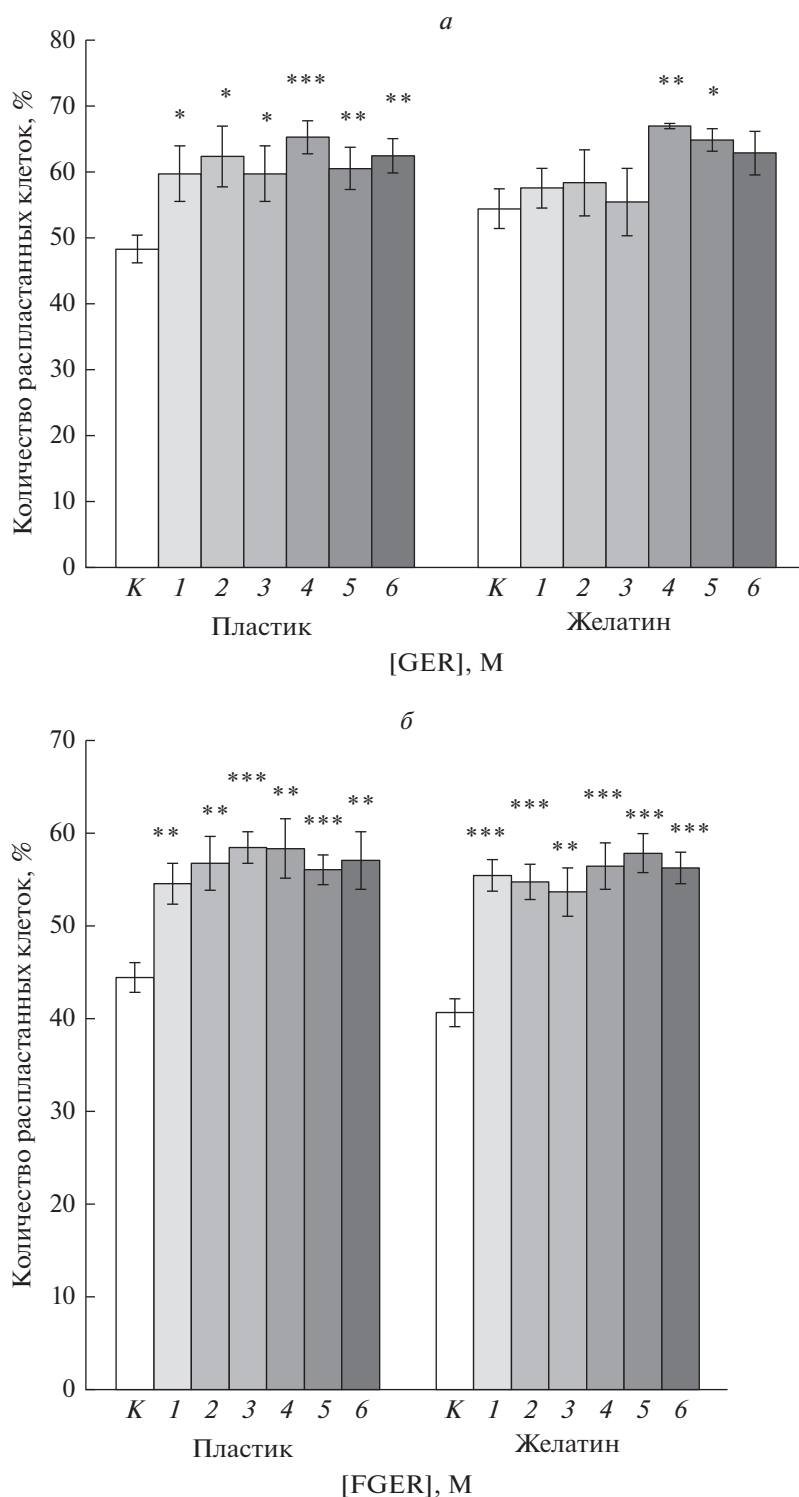


Рис. 2. Влияние пептидов GER (*a*) и FGFR (*б*) на распластывание клеток CHO-K1 на необработанном пластике или на пластике, покрытом желатином. Концентрация пептидов (М): 10^{-10} (1), 10^{-9} (2), 10^{-8} (3), 10^{-7} (4), 10^{-6} (5), 10^{-5} (6). Контроль (К) – клетки, не обработанные пептидами. Данные представлены в % (см. Материал и методика).

Пептиды вносили в питательную среду с 0.2% сыворотки перед началом эксперимента. Подсчет распластанных клеток проводили через 45 мин культивирования при 37°C. Достоверность отличий от контроля показана одной ($P < 0.05$), двумя ($P < 0.01$) или тремя ($P < 0.001$) звездочками (по *t*-критерию Стьюдента). В каждом варианте сделано от 4 до 6 независимых измерений.

щественно возрастает в дозах 10^{-10} (в 1.46 раза), 10^{-6} (в 1.48 раза) и 10^{-5} М (в 1.23 раза) по сравнению с аналогичными значениями на необработанном пластике (рис. 2б). В то же время пептид GER уменьшал прирост распластанных клеток на желатине в концентрациях 10^{-7} (в 1.35 раза) и 10^{-6} М (в 1.17 раза) по сравнению с приростом распластанных клеток на необработанном пластике после внесения пептида в культуральную среду (рис. 2а).

В результате проведенного анализа показано, что изученные пептиды GER и FGER стимулировали клеточную адгезию как на необработанном пластике, так и на желатине, адсорбированном на пластике. На желатине отчетливой зависимости между увеличением количества прикрепленных клеток и использованной концентрацией пептидов при их добавлении в клеточную суспензию не выявлено. Установлено, что степень влияния пептидов GER и FGER на распластывание клеток существенно зависела от свойств субстрата. Так, на культуральном пластике пептиды GER и FGER стимулировали распластывание клеток, в то же время на желатине пептид FGER сохранял свою активность, а пептид GER частично ее утрачивал.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная адгезия является многофакторным процессом, в котором ключевую роль играют трансмембранные интегриновые рецепторы, обеспечивая взаимосвязь между внеклеточными лигандами (компонентами ВКМ) и цитоскелетом клетки (Humphries et al., 2004; Harburger, Calderwood, 2009; Barczyk et al., 2010; Byron, Frame, 2016). Свойства субстрата оказывают непосредственное влияние на поведение культивируемых клеток, изменяя их рост, дифференцировку и метаболизм (Yamada et al., 2003; Dubin-Thaler et al., 2004; Zemljic et al., 2007; Kim et al., 2011).

Полученные нами данные о регуляции пептидами GER и FGER адгезивной способности эпителиоподобных клеток линии CHO-K1 на стадии прикрепления и распластывания клеток свидетельствуют о вовлечении в этот процесс молекул адгезии интегринов. Косвенным подтверждением этого положения являются данные об отсутствии влияния исследованных пептидов на адгезию клеток к поли-L-лизину. Возможно, это связано с неспецифическим характером образующихся электростатических связей между повторяющимися NH_2 -группами поликатиона и фосфатными группами фосфолипидных молекул клеточных мембран в процессе прикрепления клеток к положительно заряженному поли-L-лизину (Cuvelier et al., 2007; Reuter et al., 2009).

Установлено, что пептиды GER и FGER увеличивали клеточную адгезию как на культуральном пластике, так и на пластике, покрытом природным полимером желатином. Вместе с тем скорость прикрепления клеток на желатине существенно возрастала после

воздействия исследованными пептидами. При этом пептид GER в большей степени стимулировал процессы клеточной адгезии на желатине в концентрации 10^{-7} М, а пептид FGER – в концентрации 10^{-9} и 10^{-7} М, если сравнивать с клеточной адгезией на необработанном пластике.

Степень влияния пептидов GER и FGER на распластывание клеток существенно зависела от свойств субстрата. Если на необработанном пластике оба пептида практически в равной степени стимулировали распластывание клеток, то на желатине только пептид FGER сохранил эффект стимулирования процессов распластывания, а пептид GER частично ингибировал распластывание клеток по сравнению с таковым на необработанном пластике.

Известно, что скорость прикрепления клеток к субстрату зависит от продолжительности первичных контактов клеток с адгезивной поверхностью. Можно предположить, что на необработанной пластиковой поверхности продолжительность первичных контактов клеток после их обработки пептидами значительно больше, чем на желатине. Это обуславливает большую начальную скорость прикрепления обработанных пептидами клеток на желатине. Второй возможной причиной относительного уменьшения скорости прикрепления клеток на пластике после действия пептидов может быть увеличение у клеток периода адаптации к условиям микроокружения, что может быть связано, главным образом, с синтезом молекул ВКМ (например, фибронектина для эпителиальных клеток) (Filenius et al., 2003; Xu, Mosher, 2011) и экспрессией интегриновых рецепторов (более шести, самый распространенный интегрин – $\alpha_5\beta_1$), для которых лигандом является фибронектин (Takada et al., 2007; Xu, Mosher, 2011; Иванова, 2017). Клетки, посеянные на желатин, экспрессируют интегрины $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$, связывающиеся с желатином в качестве лиганда (Plow 2000; Heino, 2007).

Пептиды GER и FGER могут по-разному влиять на активность интегринов. Например, пептиды могут взаимодействовать аллостерически с разными участками рецепторной молекулы, приводя к различным конформационным перестройкам рецептора. В результате этих процессов может изменяться степень рецепторного взаимодействия с лигандами, замедляя или ускоряя лиганд-рецепторное связывание (Cavalcanti-Adam et al., 2007). Доля лиганд-связанных рецепторов, в свою очередь, может определять степень кластеризации интегринов (Hantgan et al., 2003; Selhuber-Unkel et al., 2008). Это означает, что чем больше количество лиганд-связанных интегринов имеется в клеточной мембране, тем крупнее формирующиеся кластеры рецепторов, и наоборот.

На стадии формирования первичных адгезионных структур во время прикрепления клеток к субстрату, по-видимому, размеры формирующихся рецепторных кластеров (Maheshwari et al., 2000) не оказывают определяющего влияния на клеточный

ответ. Общее количество клеточных контактов с субстратом возрастает независимо от размеров первичных адгезионных комплексов, основой которых являются кластеры интегринов. Это означает, что на первом этапе прикрепления клеток к субстрату пептиды GER и FGER приблизительно в равной степени влияют на клеточный ответ.

При переходе клетки к распластыванию размеры формирующихся адгезионных структур определяют процесс их созревания. Часть мелких адгезионных комплексов распадается, другие укрупняются и рекрутируют дополнительные белки с различными свойствами. Можно предположить, что пептид GER при высеве клеток на желатин ограничивает либо процесс кластеризации интегринов, либо частично ингибирует процессы перехода более мелких по размеру адгезионных структур в более крупные образования. Именно с этими процессами может быть связано относительное ингибирование клеточного распластывания на желатине после обработки клеток пептидом GER.

Пептид FGER, аллостерически взаимодействуя с определенными короткими сайтами рецептора, не только не ограничивал процессы лигирования рецепторов, но, напротив, ускорял их, вероятно, за счет увеличения скорости диффузии рецепторов в плоскости клеточной мембраны (Lepzelter, Zaman, 2010). В конечном итоге, пептид FGER увеличивал скорость укрупнения кластеров интегринов, а значит и адгезионных структур при высеве клеток на желатин.

Приблизительно равный эффект стимулирования распластывания клеток на культуральном пластике у исследованных пептидов (рис. 2) может быть связан не только с сохранением числа адгезионных контактов клетки с субстратом, сформированных на этапе прикрепления клеток, но и с возможным сходным влиянием пептидов на силу связывания адгезионных структур с субстратом (Wolfenson et al., 2014).

Кроме того, пептиды GER и FGER могут влиять на активность интегриновых рецепторов опосредованно через регуляцию функций других белков, вовлеченных в структурирование адгезионных структур (Flier, Sonnenberg, 2001; Morse et al., 2014), что приведет к реорганизации цитоскелета, которая в свою очередь обеспечит деформацию клеточной мембраны, т.е. позволит клетке распластываться на субстрате. Например, пептиды GER и FGER могут по-разному регулировать у клеток процесс рекрутирования талина, одного из адаптерных белков, в интегриновые кластеры в зависимости от использованного субстрата.

Связывание головного домена талина с NPXY-фрагментом цитоплазматического домена β -субъединицы интегринов осуществляется на начальных стадиях формирования адгезионных структур и формирует первичную адгезионную платформу для вовлечения дополнительных актин-связывающих бел-

ков, таких как винкулин и др. (Ziegler et al., 2008; Moser et al., 2009; Critchley, 2009; Иванова, 2021), основное значение которых заключается в формировании дополнительных связей с F-актином цитоскелета. Можно предположить, что влияние пептидов GER и FGER может варьировать на стадии вовлечения в формирующиеся адгезионные структуры актин-связывающих белков в зависимости от субстрата. Так, пептид FGER, аллостерически взаимодействуя с интегринами, может ускорять связывание талина с β -субъединицей рецептора, которое в свою очередь ускорит связывание талина с молекулами винкулина. В конечном итоге, это приведет к увеличению количества связей между адаптерными белками и F-актином, а значит и ускорению ассоциации интегринов с актиновыми филаментами. В этом случае условия для клеточного распластывания на желатине под воздействием пептида FGER будут оптимальными.

Возможно, изменение пространственной структуры рецепторов под влиянием пептида GER при высеве клеток на желатин приводило к ограничению числа молекул талина, связавшихся с β -субъединицей интегринов, может быть, в результате маскировки фрагмента NPXY у части популяции рецепторов. Соответственно, уменьшение количества молекул талина, связавшихся с рецепторами, обусловит сокращение рекрутированных в адгезионные структуры молекул винкулина, что, безусловно, замедлит ассоциацию интегринов с цитоскелетом. Как результат, распластывание клеток, обработанных пептидом GER, на желатине будет замедляться.

Активность пептидов определяется их структурой. Как уже упоминалось, исследованные трипептид GER и тетрапептид FGER содержат общий трипептидный фрагмент. Оба пептида в качестве C-концевой аминокислоты содержат одинаковый остаток (Arg). В качестве N-концевого аминокислотного остатка трипептид содержит неполярный остаток Gly без бокового радикала, а тетрапептид — неполярный остаток Phe, содержащий в боковом радикале бензольное кольцо (Шульц, Ширмер, 1982; Кантор, Шиммель, 1984).

Известно, что все элементы пептидной связи (CO—NH) располагаются в одной плоскости и препятствуют вращению вокруг нее пептидной цепи. Осевое вращение остова пептидной цепи возможно вокруг связи, которая соединяет α -углеродный атом и карбонильный углерод пептидной связи во втором с N-конца аминокислотном звене, или связи, которая соединяет α -углеродный атом и NH-группу пептидной связи в 3-ем с N-конца аминокислотном остатке. Такой поворот изменяет направление хода пептидной цепи, т.е. по месту осевого поворота происходит изгиб основной цепи в пространстве (Кантор, Шиммель, 1984; Щербак, 2005).

Концевые аминокислотные остатки пептидов не участвуют в осевом вращении остова пептидной цепи. В случае пептида FGER более вероятно осевое

вращение вокруг связи между α -углеродным атомом и карбонилем пептидной связи остатка Gly и менее вероятно осевое вращение между α -углеродным атомом и карбонилем пептидной связи остатка Glu ввиду стерических ограничений из-за больших размеров боковых радикалов у остатков Glu и Arg у тетрапептида. Можно предположить, что пептид FGER в среде инкубации может находиться в изогнутой в результате осевого вращения форме, а также в виде биологически активных конформеров с характерными перегибами пептидной цепи без изменения оси вращения по пептидным связям. Что касается пептида GER, то ввиду очень короткой пептидной цепи осевой поворот пептидной цепи по месту расположения остатка Glu мало вероятен. Однако сохраняется возможность перегибов пептидной цепи без изменения оси вращения вокруг пептидных связей.

Выявленные различия в действии пептидов GER и FGER на адгезивный ответ клеток, по-видимому, обусловлены их структурными различиями. Тетрапептид, контактируя с определенным участком рецептора, может фиксировать свой N-конец с помощью гидрофобного радикала остатка Phe с любым гидрофобным аминокислотным остатком рецептора, одновременно C-концевая аминокислота пептида Arg может взаимодействовать электростатически через положительно заряженную гуанидиновую группу с боковыми радикалами отрицательно заряженных аминокислотных остатков (Glu или Asp), локализованных в интегринах рецептора. Кроме того, отрицательно заряженный остаток Glu в пептиде может также связываться электростатически с положительно заряженными аминокислотными остатками рецептора.

В отличие от тетрапептида, пептид GER на N-конце содержит остаток Gly, который из-за отсутствия бокового радикала характеризуется высокой подвижностью в плоскости основной пептидной цепи, что может уменьшать скорость фиксации остатка Gly у пептида с рецептором. Ориентация боковых радикалов у аминокислотных остатков (Glu и Arg) определяет взаимодействие этого пептида с каким-либо участком интегрина.

Кроме вклада в связывающую активность исследованных пептидов боковых радикалов аминокислотных остатков, входящих в состав этих пептидов, не менее важна способность пептидов изменять свою пространственную конфигурацию. Как уже упоминалось, тетрапептид FGER, в отличие от пептида GER, может формировать более разнообразный спектр конформеров с изогнутой конформацией, обеспечивая тем самым большую вариативность взаимодействий пептида с рецептором в зависимости от условий микроокружения. Это создает условия для проявления большей активности пептида FGER по сравнению с пептидом GER на модели адгезивного ответа клеток линии CHO-K1.

При взаимодействии пептидов с молекулами рецепторов возможны два варианта ориентации пептидов относительно аминокислотной последовательности интегрина — параллельная или антипараллельная. В обоих случаях ввиду конформационной изменчивости пептидов возможно взаимодействие как пары заряженных аминокислотных остатков, так и одного из двух указанных остатков (или Arg, или Glu) у исследованных пептидов с противоположно заряженными остатками аминокислот, локализованных в последовательности интегрина. Неполярный остаток Phe у пептида FGER может формировать дополнительно гидрофобную связь с неполярными аминокислотными остатками рецептора. Возможно, пептиды взаимодействуют с участками, расположенными в карманоподобных структурах рецепторов, содержащих кластеры из полярных и гидрофобных аминокислотных остатков. В любом случае такие локальные взаимодействия могут привести к изменению заряда или ориентации боковых радикалов у аминокислотных остатков в рецепторной молекуле, а значит к мозаичным изменениям конформации, которые в зависимости от условий окружения могут маскировать или демаскировать в интегринных эпитопы связывания, тем самым ослаблять или усиливать активность интегриновых рецепторов.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что исследованные в работе пептиды могут участвовать в регуляции межбелковых взаимодействий на разных ступенях адгезивного ответа клеток в зависимости от имеющихся условий окружения. Пептиды могут связываться с одним и тем же или сходным по строению сайтом в молекуле рецептора, вызывая сходный биологический эффект, например, при адгезии и распластывании на необработанном пластике, или с сайтами, расположенными в разных участках рецептора, приводя к разнонаправленному влиянию на адгезивный ответ, например, при распластывании клеток на желатине. Не исключено также, что пептиды могут взаимодействовать с несколькими участками рецептора одновременно, обуславливая суммарное усиление или ослабление адгезивного ответа клеток.

В период пост-пептидного связывания с определенными участками рецептора (или других компонентов адгезии) могут происходить краткосрочные или долговременные изменения структурной ориентации рецепторов, вызванные локальными диссоциациями во вторичной или третичной структурах рецептора, обусловленные образованием электростатических и (или) гидрофобных связей с регуляторными пептидами. Т.е. можно говорить о существовании механизма регуляции межбелковых взаимодействий, включая лиганд-рецепторные связи, через изменение пространственной структуры участников взаимодействия с помощью коротких регуляторных пептидов. В этом случае регуляторные пептиды (в том числе GER и FGER) можно отнести к группе низкомолекулярных аллостерических мо-

дуляторов, способных при определенных внешних условиях изменять межбелковый интерфейс связывающихся белков.

Регуляторные пептиды с подобными функциональными характеристиками являются перспективными для использования в терапии заболеваний, связанных с патологией межбелковых контактов, таких как вирусные и бактериальные инфекции, а также аутоиммунные и онкологические заболевания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клетки СНО-К1 получены из “Коллекции культур клеток позвоночных” (в ЦКП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург), поддержанной Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-01052-22-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не было экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. 1996. Нейропептиды. В кн.: Нейрохимия. М.: Институт биомед. химии РАН. С. 296. (Ashmarin I.P., Karazeeva E.P. 1996. Neuropeptides. In: Neurochemistry. Moscow: IBCH RAMS. P. 296.)
- Замятнин А.А. 2004. Биохимические проблемы олигопептидной регуляции. Биохимия. Т. 69. № 11. С. 1565. (Zamyatnin A.A. 2004. Biochemical problems of regulation by oligopeptides. Biochemistry (Moscow). V. 69. P. 1276.)
- Иванова В.П. 2017. Фибронектины: структурно-функциональные связи. Журн. эвол. биохим. физиол. Т. 53. № 6. С. 398. (Ivanova V.P. 2017. Fibronectins: structural-functional relationships. J. Evol. Biochem. Physiol. (Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii). V. 53. P. 450.)
- Иванова В.П. 2021. Талин: структурно-функциональные связи. Цитология. Т. 63. № 1. С. 3. (Ivanova V.P. 2021. Talin: structural and functional relationships. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 15. P. 416.)
- Кантор Ч., Шиммель П. 1984. Биофизическая химия. М.: Мир. Т. 1. 336 с. (Cantor C., Schimmel P. 1980. Biophysical Chemistry. San Francisco: W.H. Freeman and Co. Part 1. 367 p.)
- Костецкий П.В., Артемьев И.В. 2000. Конформационный анализ RGD-содержащего антиадгезивного пептида цикло(ArgGlyAspPhe-D-Val). Биохимия. Т. 65. № 9. С. 1231. (Kostetsky P.V., Artemjev I.V. 2000. Conformational analysis of the biologically active RGD-containing anti-adhesive peptide cyclo(ArgGlyAspPhe-D-Val). Biochemistry (Moscow) (Biokhimiya). V. 65. P. 1041.)
- Шульц Г., Ширмер Р. 1982. Принципы структурной организации белков. М.: Мир. 360 с. (Schulz G., Schirmer R. 1979. Principles of protein structure. N.Y.-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag. 332 p.)
- Щербак И.Г. 2005. Биологическая химия. СПб: СПбГМУ. 480 с. (Scherbak I.G. 2005. Biological chemistry. St. Petersburg: SPbSMU. 480 p.)
- Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Lopez O.P., Parhiz H., Perera C.O., Pickholz M., Remko M. 2021. A global review on short peptides: frontiers and perspectives. Molecules. V. 26. P. 430. <https://doi.org/10.3390/molecules.26020430>
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. 2010. Integrins. Cell Tiss. Res. V. 339. P. 269.
- Berrier A.L., Yamada K.M. 2007. Cell-matrix adhesion. J. Cell Physiol. V. 213. P. 565.
- Byron A., Frame M.C. 2016. Adhesion protein networks reveal functions proximal and distal to cell-matrix contacts. Curr. Opin. Cell. Biol. V. 39. P. 93.
- Cavalcanti-Adam E.A., Volberg T., Micoulet A., Kessler H., Geiger B., Spatz J.P. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. Biophys. J. V. 92. P. 2964.
- Critchley D.R. 2009. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. Annu. Rev. Biophys. V. 38. P. 235.
- Cuvelier D., Thery M., Chu Y.S., Dufour S., Thiery J.P., Bornens M., Nassoy P., Mahadevan L. 2007. The universal dynamics of cell spreading. Curr. Biol. V. 17. P. 694.
- Dubin-Thaler B.J., Giannone G., Döbereiner H.G., Sheetz M.P. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. Biophys. J. V. 86. P. 1794.
- Eichler J. 2008. Peptides as protein binding site mimetics. Curr. Opin. Chem. Biol. V. 12. P. 707.
- Filenius S., Tervo T., Virtanen I. 2003. Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. V. 44. P. 3317.
- Flier van der A., Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. Cell Tiss. Res. V. 305. P. 285.
- Hantgan R.R., Lyles D.S., Mallett T.C., Rocco M., Nagaswami C., Weisel J.W. 2003. Ligand binding promotes the entropy-driven oligomerization of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. J. Biol. Chem. V. 278. P. 3417.
- Harburger D.S., Calderwood D.A. 2009. Integrin signalling at a glance. J. Cell Sci. V. 122. P. 159.
- Heino J. 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. BioEssays. V. 29. P. 1001.
- Humphries M.J., Travis M.A., Clark K., Mould A.P. 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. Biochem. Soc. Trans. V. 32. P. 822.
- Kim S.H., Turnbull J., Guimond S. 2011. Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. J. Endocrinol. V. 29. P. 139.
- Lepzelter D., Zaman M.H. 2010. Clustered diffusion of integrins. Biophys. J. V. 99. P. L106.

- Li Z., Lee H., Zhu C. 2016. Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion. *Exp. Cell Res.* V. 349. P. 85.
- London N., Raveh B., Schueler-Furman O. 2013. Druggable protein-protein interactions – from hot spots to hot segments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* V. 17. P. 952.
- Luo B.H., Springer T.A., Takagi J. 2004. A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol.* V. 2. e153. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020153>
- Maheshwari G., Brown G., Lauffenburger D.A., Wells A., Griffith L.G. 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* V. 113. P. 1677.
- Morse E.M., Brahme N.N., Calderwood D.A. 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry.* V. 53. P. 810.
- Moser M., Legate K.R., Zent R., Fässler R. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* V. 324. P. 895.
- Pan L., Zhao Y., Yuan Z., Qin G. 2016. Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springer Plus.* V. 5. 1094. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2502-0>
- Petsalaki E., Russell R.B. 2008. Peptide-mediated interactions in biological systems: new discoveries and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 19. P. 344.
- Plow E.E., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* V. 275. P. 21785.
- Reichmann D., Rahat O., Cohen M., Neuvirth H., Schreiber G. 2007. The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 17. P. 67.
- Reuter M., Schwieger C., Meister A., Karlsson G., Blume A. 2009. Poly-L-lisines and poly-L-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophys. Chem.* V. 144. P. 27.
- Selhuber-Unkel C., Lopez-Garcia M., Kessler H., Spatz J.P. 2008. Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion. *Biophys. J.* V. 95. P. 5424.
- Takada Y., Ye X., Simon S. 2007. The integrins. *Genome Biol.* V. 8. 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>
- Tompa P., Fuxreiter M., Oldfield C.J., Simon I., Dunker A.K., Uversky V.N. 2009. Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *Bioessays.* V. 31. P. 328.
- Wells R.G. 2008. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology.* V. 47. P. 1394.
- Wolfenson H., Iskratsch T., Sheetz M.P. 2014. Early events in cell spreading as a model for quantitative analysis of biomechanical events. *Biophys. J.* V. 107. P. 2508.
- Xu J., Mosher D. 2011. Fibronectin and other adhesive glycoproteins. In: *The extracellular matrix: an overview.* Berlin: Springer-Verlag. P. 41.
- Yakuwa N., Inoue T., Watanabe T., Takashi K., Sendo F. 1989. A novel neutrophil adherence test effectively reflects the activated state of neutrophils. *Microbiol. Immunol.* V. 33. P. 834.
- Yamada K.M., Pankov R., Cukierman E. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 36. P. 959.
- Yeung T., Georges P.C., Flanagan L.A., Marg B., Ortis M., Funaki M., Zahir N., Ming W., Weaver V., Janmey P.A. 2005. Effects of substance stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton.* V. 60. P. 24.
- Zemljic J.S., Znidarcic T., Svetina S., Batista U. 2007. The effect of substrate and adsorbed proteins on adhesion, growth and shape of CaCo-2 cells. *Cell Biol. Int.* V. 31. P. 1097.
- Ziegler W.H., Gingras A.R., Critchley D.R., Emsley J. 2008. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem. Soc. Trans.* V. 36. P. 235.

On the Variativity of Cell Adhesive Response under the Action of Related Short Peptides

V. P. Ivanova*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

**e-mail: valet@iephb.ru*

Analysis of the participation of short peptides GER and FGER containing common tripeptide fragment in the regulation of adhesive response of CHO-K1 cells was conducted. Both peptides stimulated cell adhesion both to untreated plastic and to gelatin-coated plastic, but did not change cell attachment to poly-L-lysine-coated plastic. Tripeptide GER had larger stimulation effect on cell adhesion to untreated plastic. Peptide FGER increased the rate of cell attachment to gelatin in a wider range of concentrations as compared to adhesion to untreated plastic. Variativity of cell spreading to different substrates under peptide action was demonstrated. On untreated plastic both investigated peptides practically in equal extent stimulated cell spreading. On gelatin peptide FGER kept the stimulation effect on cell spreading, but peptide GER partly inhibited cell spreading as compared to cell spreading on untreated plastic. It was established that insertion of additional N-terminal hydrophobic amino acid residue Phe to tripeptide fragment GER changes the regulatory activity of peptide at the cell adhesion model depending on the stage of cell connection with substrate and/or on substrate properties. The structural-functional activity of investigated short peptides on the instance of different structural components of adhesive structures is discussed.

Keywords: related short peptides, adhesion, spreading, CHO-K1 cells