

DOI: 10.31116/tsitol.2018.06.06

## С-КОНЦЕВОЙ ТЕТРАПЕПТИДНЫЙ ФРАГМЕНТ ГИСТОНА H3 МОДУЛИРУЕТ СПОСОБНОСТЬ К АДГЕЗИИ ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ КЛЕТОК

В. П. Иванова,<sup>1,\*</sup> **З. В. Ковалева**,<sup>2</sup> А. И. Кривченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, и

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: valet@iephb.ru

Гистоны, как известно, представляют собой консервативные, ядерные белки с высоким содержанием основных аминокислотных остатков, образующих прочные комплексы с нуклеиновыми кислотами. Именно это свойство гистонов обеспечивает компактную укладку молекул ДНК в процессе структуризации хроматина. Кроме формирования структуры хроматина гистоны участвуют в регуляции экспрессии генов. В работе исследована роль С-концевого тетрапептидного фрагмента гистона H3 (GERA) в регуляции способности к адгезии эпителиоподобных клеток линии CHO-K1. Установлено, что пептид GERA участвует в регуляции адгезии и распластывания клеток, при этом регуляторный эффект пептида зависит от свойств субстрата. Пептид GERA стимулировал клеточную адгезию как на необработанном пластике, так и на пластике, покрытом желатином. Усиление клеточной адгезии на желатине под действием пептида было больше, чем на необработанном пластике, однако разница была не столь значительной, как можно было ожидать. Кроме того показано, что обработка клеток пептидом GERA приводит к увеличению количества распластанных клеток, при этом площадь распадастывания клеток также возрастает. Степень влияния пептида на распадастывание варьировала в зависимости от использованного субстрата. Если на желатине пептид оказывал большее влияние на степень клеточного распадастывания, то на необработанном пластике — на изменение количества распластанных клеток в клеточной популяции. Предварительная обработка клеток пептидом GERA приводила к частичному ингибированию клеточной адгезии на желатине и не влияла на число распластанных клеток и на изменение размеров клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляторный эффект пептида GERA определяется не только свойствами субстрата, но и временным периодом взаимодействия клетки с поверхностью субстрата. Обсуждается возможный механизм влияния пептида на процессы адгезии и распадастывания клеток.

Ключевые слова: С-концевой тетрапептидный фрагмент гистона H3, адгезия, распадастывание, клетки линии CHO-K1.

Принятые сокращения: BKM — внеклеточный матрикс, ДАГ — диацилглицерин, PKC<sub>ε</sub> — протеинкиназа C<sub>ε</sub>.

Гистоны представляют собой консервативные, положительно заряженные ядерные белки, которые не только структурируют хроматин (Chakravarthy et al., 2005; Woodcock, Ghosh, 2010; Li, Fang, 2015; Eslami-Mossallam et al., 2016), но и участвуют в регуляции экспрессии генов (Luger, 2006; Jiang, Pugh, 2009; Venkatesh, Workman, 2015). Установлено также, что гистоны могут проявлять биологическую активность и вне ядра при их выделении во внеклеточное пространство как активированными, так и поврежденными клетками (Holdenrieder et al., 2001; Wu et al., 2002). Циркулирующие в организме гистоны могут приводить к формированию токсических и воспалительных реакций (Xu et al., 2009; Allam et al., 2014). Некоторые авторы рассматривают гистоны в качестве потенциальных биомаркеров системных воспалительных заболеваний, включая инфекционные воспаления, такие как сепсис и перитониты, и неинфекционные, такие как ишемия, травматические повреждения, панкреатиты и инду-

цированная лекарствами токсичность (Chen et al., 2014; Silk et al., 2017). В ходе циркуляции в организме молекулы гистонов могут подвергаться протеолитическому расщеплению, и высвобождаемые пептидные фрагменты, содержащие различное число аминокислотных остатков, могут проявлять различную биологическую активность. При этом гистоновые фрагменты могут оказывать прямое или опосредованное влияние на функции клеток, входящих в состав различных тканей.

Одним из необходимых условий для нормальной жизнедеятельности клеток является их способность к контактному взаимодействию с поверхностью твердого субстрата, химическая природа которого может быть самой разнообразной. В организме таким субстратом является внеклеточный матрикс (BKM) (Frantz et al., 2010; Engel, Chiquet, 2011; Theocharis et al., 2016). В различных органах BKM варьирует как по химическому составу, так и по степени ригидности, что во многом и определяет

специфику прикрепления, распластывания и миграции различных клеток (Yeung et al., 2005; Wells, 2008). Первичное взаимодействие клетки с субстратом начинается с ее прикрепления к ВКМ, после которого следует фаза распластывания, сопровождающаяся изменением клеточной формы. Формирование характерного для определенного типа тканей морфотипа клеток является обязательным условием для перехода клеток к пролиферации и дифференцировке (Berrier, Yamada, 2007; Lai et al., 2015).

В последнее время в связи с необходимостью создания новых биосовместимых и биodeградируемых полимерных материалов для использования в медицинской практике усилился интерес к изучению роли различных субстратов, включая природные и синтетические полимерные материалы, в регуляции способности клеток к адгезии (Griffith, 2002; Rosso et al., 2005; Van der Mark et al., 2010; Yang et al., 2014).

В представленной работе исследовали влияние С-концевого тетрапептидного фрагмента гистона H3 Gly-Glu-Arg-Ala (GERA) на особенности процессов прикрепления и распластывания эпителиоподобных клеток к искусственному полимерному и природному белковому субстрату.

### Материал и методика

**Клетки.** Объектом исследования служила эпителиоподобная линия клеток CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells, клетки яичника китайского хомячка) из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки выращивали в пластиковых флаконах (Corning, США) в среде DMEM/F12, содержащей 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. В экспериментах использовали клетки, достигшие субмонослоя. В зависимости от цели эксперимента клетки ресуспендировали либо в полной питательной среде (10 % сыворотки), либо в неполной питательной среде (0.2 % или отсутствие сыворотки).

Влияние пептида GERA, синтезированного на кафедре химии природных соединений СПбГУ, на адгезию клеток линии CHO-K1 оценивали по описанному ранее методу (Иванова и др., 2008). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах (Corning, США), обработанных или не обработанных раствором желатина (20 мкг/мл в PBS, 18 ч при 4 °С). Пептид в концентрации от 10<sup>-10</sup> до 10<sup>-5</sup> М добавляли к клеткам, суспендированным в полной питательной среде (10 % сыворотки). Затем клеточную суспензию (10<sup>6</sup> кл./мл) переносили в планшеты. Предварительную обработку клеток пептидом (в том же диапазоне концентраций) проводили в неполной питательной среде 30 мин при 37 °С, после чего добавляли сыворотку (10 %). Полученную клеточную суспензию (10<sup>6</sup> кл./мл) переносили в планшет. Клетки выдерживали 1 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Оптическую плотность экстрагированного красителя измеряли на анализаторе Униплан (Пикон, Россия) при  $\lambda = 570$  нм. По величине оптической плотности судили об изменении количества прикрепившихся клеток.

Для изучения процесса распластывания клетки (2 · 10<sup>5</sup> кл./мл, неполная питательная среда с сывороткой или без 0.2 % сыворотки) рассеивали на чашки Петри (Corning, США), часть из которых предварительно покрывали

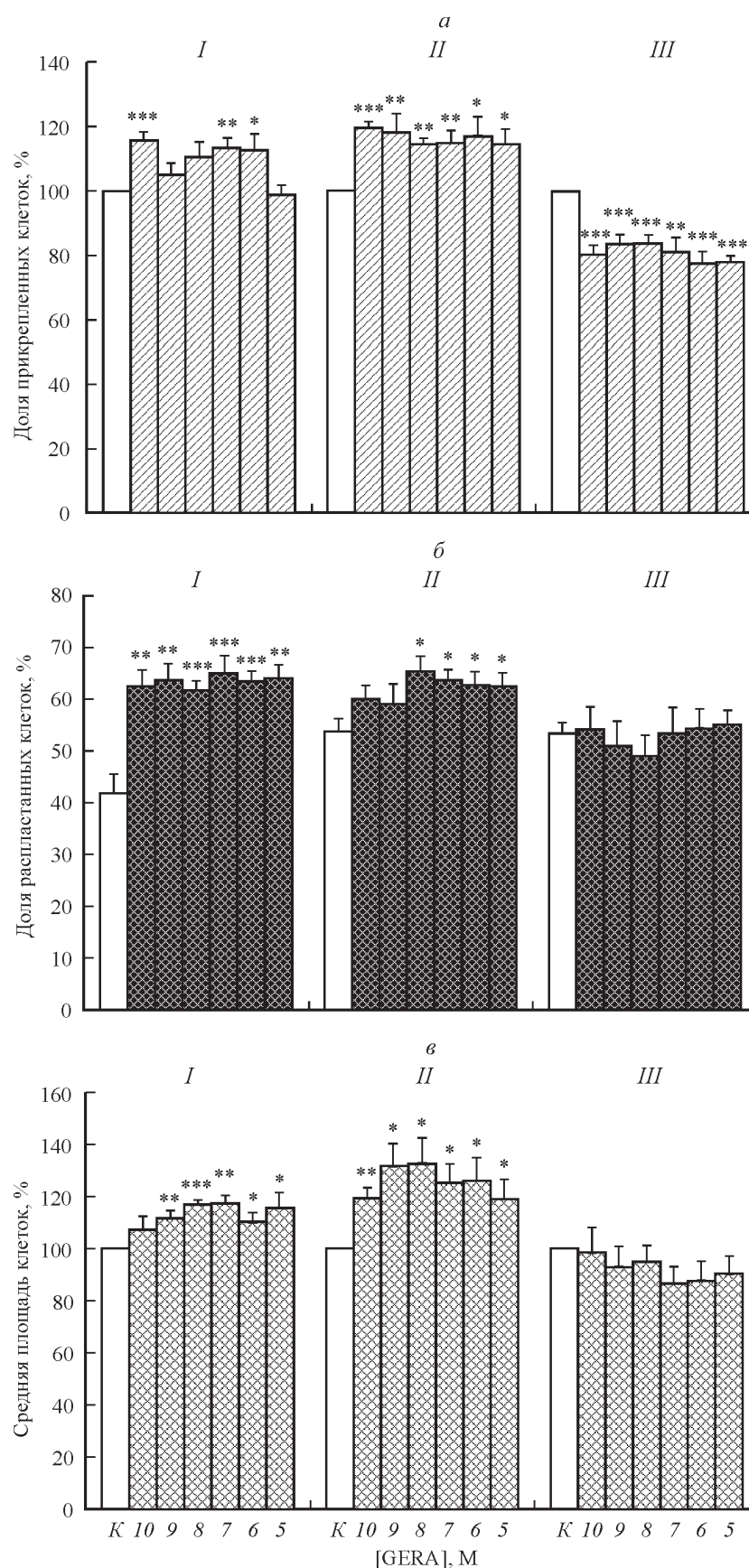
раствором желатина, так же как и лунки планшетов (см. выше), а часть чашек Петри не покрывали желатином. В зависимости от цели эксперимента клетки либо обрабатывали (30 мин при 37 °С) пептидом (в том же диапазоне концентраций) в среде без сыворотки, а затем добавляли 0.2 % сыворотки, либо пептид вносили в клеточную суспензию (среда с 0.2 % сыворотки) непосредственно перед посевом клеток на чашки Петри. Клетки выдерживали 45 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Определяли долю клеток (%) с распластанным морфотипом. Распластанным считали клетку с выраженными отростками, нераспластанный — клетку округлой формы. После фиксации клетки фотографировали в 5—7 случайно выбранных полях зрения, используя инвертированный микроскоп Axiovert 40C (Carl Zeiss, Германия) и камеру Canon EOS 1000D с объективом EFS 18—55 мм (Япония). Измерение площади клеток проводили с помощью программы Image J. При вычислении среднего значения площади клеток (в пикселях) учитывали все клетки, находящиеся на разных стадиях распластывания. Полученные данные после усреднения по каждой позиции (не менее 5 вариантов, в каждом из которых от 80 до 100 клеток) представляли относительно соответствующих контрольных значений и выражали в %. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты

При изучении влияния пептида GERA на способность к адгезии клеток линии CHO-K1 в качестве субстрата использовали культуральный пластик (синтетический стироловый полимер) и белок животного происхождения желатин, являющийся продуктом частичной денатурации одного из компонентов ВКМ — коллагена I типа. Последний как полимер природного происхождения, подвергающийся естественной биodeградации в организме и не проявляющий побочного токсического действия, широко используется в заместительной терапии (Штильман, 1998).

На рисунке отражены полученные результаты о влиянии пептида GERA на долю прикрепленных и распластанных клеток линии CHO-K1 и их размеры. Данные, представленные на рисунке (а, б), показывают, что пептид GERA в диапазоне концентраций 10<sup>-10</sup>—10<sup>-5</sup> М увеличивает количество прикрепившихся клеток к необработанному пластику только в случае трех его концентраций — 10<sup>-10</sup> ( $P < 0.001$ ), 10<sup>-7</sup> ( $P < 0.01$ ) и 10<sup>-6</sup> ( $P < 0.05$ ) М. Можно выделить два максимума: более узкий при наименьшей из использованных концентраций (10<sup>-10</sup> М) и более широкий при концентрациях 10<sup>-7</sup> и 10<sup>-6</sup> М. Возможно, действие пептида GERA при малых дозах может быть связано с его триггерной активностью, т. е. способностью модулировать активность дополнительных регуляторных соединений, способных воздействовать на несколько функционально значимых для формирования биологического ответа клеточных мишеней (Ашмарин, 1982), а при высоких концентрациях — с его прямым воздействием на соответствующие рецепторные структуры.

Обработка пластиковой поверхности желатином приводит к усилению клеточной адгезии под действием пептида GERA, причем во всем диапазоне изученных концентраций (см. рисунок, а, б). Вместе с тем следует отметить, что вызванное пептидом усиление клеточной



Влияние пептида GERA на адгезию (а), долю распластавных (б) клеток CHO-K1 и их размеры (в).

Даны средние значения и их ошибки. I — необработанный пластик; II, III — пластик, покрытый желатином. Концентрации пептида (M):  $10^{-10}$  (столбец 10),  $10^{-9}$  (9),  $10^{-8}$  (8),  $10^{-7}$  (7),  $10^{-6}$  (6),  $10^{-5}$  (5); K — контроль. Детали культивирования клеток см. в разделе «Материал и методика». Достоверность отличий от контроля показана одной ( $P < 0.05$ ), двумя ( $P < 0.01$ ) или тремя ( $P < 0.001$ ) звездочками. Число экспериментов: 5 (а), 5—7 (б) и 4 (в).

адгезии на желатине превосходило таковую на необработанном пластике не столь существенно, как можно было ожидать для специфического клеточного ответа, за исключением значений при концентрациях  $10^{-9}$  и  $10^{-5}$  М.

Предварительная обработка клеток в течение 30 мин пептидом GERA ингибировала клеточную адгезию к иммобилизованному желатину при всех исследованных концентрациях, при этом количество прикрепившихся клеток уменьшалось от 16 до 23 % ( $P < 0.01$  или  $P < 0.001$ ) в зависимости от дозы пептида (см. рисунок, а, III).

Как известно, способность клеток распластываться на твердом субстрате с формированием адгезионных взаимодействий с ВКМ определяет рост и дифференцировку клеток. Установлено, что пептид GERA также регулирует процессы распластывания клеток линии CHO-K1 на твердой поверхности. Обработка клеток пептидом приводит к увеличению количества распластанных клеток как на необработанном полистироловом пластике (см. рисунок, б, I), так и на пластике, покрытом желатином (см. рисунок, б, II). Однако степень влияния пептида GERA на этот процесс зависела от использованного субстрата. Пептид GERA во всем диапазоне исследованных концентраций стимулировал распластывание клеток на необработанном пластике в 1.47—1.55 раза ( $P < 0.001$  или  $P < 0.01$ ) (см. рисунок, б, I). Менее выраженным было влияние пептида GERA в ходе распластывания клеток на иммобилизованном желатине (см. рисунок, б, II). Пептид увеличивал количество клеток, распластанных на этом субстрате при концентрации от  $10^{-8}$  до  $10^{-5}$  М ( $P < 0.05$ ), в 1.15—1.21 раза по сравнению с контрольными значениями.

Одним из параметров, используемых для характеристики адаптации клеток к изменяющимся условиям внешней среды, является площадь клетки, которая может варьировать с изменением химических и физических свойств субстрата. В связи с этим нас интересовал вопрос о том, влияет ли пептид GERA на изменение площади клеток в ходе их распластывания, а также о том, в какой мере этот процесс зависит от характеристик твердой поверхности. Полученные данные (см. рисунок, в, I) показывают, что добавление пептида в культуральную среду в концентрации от  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  М приводит к увеличению площади клеток, распластанных на необработанном пластике, на 11—18 % ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  или  $P < 0.05$ ; см. рисунок) по сравнению с контрольными клетками. Оказалось, что степень распластанности клеток, обработанных пептидом, была намного выше на иммобилизованном желатине, чем на необработанном пластике (см. рисунок, в, II). Пептид GERA при всех использованных концентрациях способствовал увеличению среднего значения площади клеток на желатине на 19—33 % ( $P < 0.01$  или  $P < 0.05$  в зависимости от концентрации пептида) по сравнению с соответствующими контрольными значениями.

Предварительная обработка клеток пептидом GERA при всех исследованных концентрациях не приводила к изменению числа распластанных клеток на желатине и не влияла на изменение размеров клеток (см. рисунок, б, III; в, III).

Полученные нами результаты показывают, что пептид GERA стимулирует клеточную адгезию и распластывание как на необработанном культуральном пластике, так и на пластике, покрытом желатином. Пептид увеличивает количество прикрепленных и распластанных кле-

ток в клеточной популяции и вызывает ускорение степени распластывания. Предварительная обработка клеток пептидом GERA приводила к частичному ингибированию клеточной адгезии на желатине и не оказывала влияния на прирост распластанных клеток и увеличение клеточных размеров при посеве обработанных пептидом клеток на желатин.

## Обсуждение

Как уже отмечалось, исследованный нами С-концевой тетрапептидный фрагмент гистона H3 GERA обладает выраженным регулирующим влиянием на адгезионные свойства клеток линии CHO-K1.

В настоящее время не представляется возможным определить клеточные мишени, на которые воздействует исследованный пептид. Вместе с тем полученные нами данные об активности пептида GERA в отношении эпителиоподобных клеток позволяют высказать несколько предположений о возможных регуляторных свойствах этого пептида.

Полученные нами данные показывают, что пептид GERA усиливает клеточную адгезию как на необработанном пластике, так и на пластике, покрытом желатином (см. рисунок, а, I и II). В обоих случаях эффект усиления клеточной адгезии обусловлен активацией интегриновых рецепторов, которые, связываясь с белками ВКМ или их аналогами, обеспечивают прикрепление клеток к субстрату (Hynes, 2002; Yamada et al., 2003).

Усиление адгезии клеток линии CHO-K1, обработанных пептидом GERA, может быть связано с экспрессией или активацией специфических видов интегриновых рецепторов, которые, как известно, представляют собой гетеродимеры, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (Takada et al., 2007; Barczyk et al., 2010). Согласно данным из литературы, эпителиальные клетки могут экспрессировать такие интегриновые молекулы, как  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  и  $\alpha_v\beta_6$  (Plow et al., 2000; Filenius et al., 2003; Gilcrease, 2007; Pan et al., 2016).

При посеве клеток CHO-K1 на иммобилизованный желатин, как показано, экспрессируются  $\alpha_5\beta_1$ - и  $\alpha_v\beta_3$ -интегрины (Pfaff et al., 1993; Plow et al., 2000; Heino et al., 2007). При посеве этих клеток на необработанный пластик картина не столь однозначна. Известно, что эпителиальные клетки способны синтезировать такие компоненты ВКМ, как фибронектин и тенасцин С (Filenius et al., 2003). Фибронектин является лигандом не только для рецепторов  $\alpha_5\beta_1$  и  $\alpha_v\beta_3$ , но и для других интегринов —  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  и  $\alpha_v\beta_6$  (Van der Flier, Sonnenberg, 2001; Pankov, Yamada, 2002; Takada et al., 2007; Иванова и др., 2017). Тенасцин С может взаимодействовать с экспрессируемыми эпителиальными клетками интегринными  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_6$  (Tucker, Chiquot-Ehrismann, 2015). Можно предположить, что при посеве клеток на необработанный пластик более вероятен синтез фибронектина и тенасцина С в качестве компонентов ВКМ, которые и будут определять спектр экспрессируемых клетками интегриновых рецепторов. В этом случае более вероятны синтез и активация следующих интегриновых рецепторов: для связывания с фибронектином —  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  и  $\alpha_v\beta_6$ , а для связывания с тенасцином С —  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_6$ . Более широкий набор интегриновых рецепторов, который клетки CHO-K1 могут экспрессировать на синтезированных ими фибронектине и тенасцине С, частично компенсиру-

ет задержку синтетической активности в период лаг-фазы, когда клетки приспособляются к новому микроокружению.

Культивирование клеток на иммобилизованном желатине, как уже сказано, обуславливает экспрессию только двух видов интегриновых рецепторов, одновременно период адаптации клеток к этим условиям значительно укорачивается. Именно более ограниченным набором интегриновых рецепторов, индуцируемых на иммобилизованном желатине, можно объяснить не столь выраженное усиление клеточной адгезии на этом субстрате под влиянием пептида GERA по сравнению с клеточным ответом на необработанном пластике (см. рисунок, *а, I и II*).

Усиление процессов клеточной адгезии под действием пептида GERA может быть связано с активацией процессов лиганд-рецепторного взаимодействия. Выявленное нами частичное ингибирование клеточной адгезии на желатине после предварительной обработки пептидом GERA суспендированных клеток CHO-K1 (см. рисунок, *а, III*) свидетельствует о том, что исследованный пептид не блокирует первичные сайты связывания интегринов, определяющие лиганд-рецепторное взаимодействие. В противном случае наблюдалась бы характерная картина насыщения мест связывания у рецепторов с увеличением концентрации пептида в инкубационной среде. Связываясь с первичными сайтами, пептид блокирует их, тем самым препятствует взаимодействию рецепторов с лигандом (желатином). Это привело бы к дозозависимому ингибированию конечного биологического эффекта, что не было нами зафиксировано. Скорее всего, пептид GERA взаимодействует с неспецифическими зонами аллостерического связывания, содержащими разнооценно заряженные аминокислотные остатки. Связывание пептида GERA с подобными зонами может приводить к локальному изменению заряда в этих участках молекулы рецептора, а значит, и конформационным изменениям, в том числе и тех доменов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, которые участвуют в создании первичных центров связывания рецептора.

Известно, что специфические особенности микроокружения клеток определяют не только физиологические функции, но и фенотипические характеристики клеток, включая форму клетки и степень распластывания на субстрате (Daley et al., 2008; Bettinger et al., 2009; Bruekers et al., 2017). Проведенный анализ показывает, что пептид GERA регулирует процессы распластывания клеток линии CHO-K1 на твердой поверхности.

Регулирующая роль исследованного пептида GERA на клеточное распластывание может быть связана с его влиянием на скорость формирования адгезивных комплексов вокруг кластеров интегриновых рецепторов, сформированных в период инициального прикрепления клеток к субстрату. Различный набор интегриновых рецепторов, экспрессируемых клетками в процессе адгезии и последующего распластывания на иммобилизованном желатине или на необработанном пластике, определяет вариативность формирующихся фокальных комплексов, а затем и зрелых фокальных контактов (адгезий) (Gilcrease, 2007; Byron et al., 2010).

Пептид GERA на этапе распластывания клеток может регулировать процессы вовлечения специфических сигнальных и адаптерных белков в фокальные комплексы, ускоряя или ингибируя процессы перехода их в зрелые фокальные адгезии (Wozniak et al., 2004). Как известно, основное значение зрелых фокальных адгезий состоит в

обеспечении связи между компонентами ВКМ посредством интегриновых рецепторов с белками цитоскелета (Calderwood et al., 2000; Gilcrease, 2007).

При сопоставлении данных о влиянии пептида GERA на количество распластанных клеток и размер площади распластанный клетки на использованных субстратах можно выявить определенную зависимость. Степень распластывания клеток на желатине значительно увеличивается после обработки пептидом, при этом количество распластанных клеток на этом субстрате увеличивается не столь значительно. Одновременно на необработанном пластике наблюдается обратная зависимость, т. е. обработка клеток пептидом GERA в меньшей степени влияет на степень клеточного распластывания и в большей степени — на увеличение числа распластанных клеток. На основании этих данных можно предположить, что на желатине распластывание в популяции уже прикрепившихся клеток, обработанных пептидом, происходит быстрее, чем на исходном культуральном пластике. Можно предположить, что этому процессу способствует более быстрый переход, индуцируемый пептидом GERA, от незрелых лабильных фокальных контактов к зрелым стабильным фокальным адгезиям. Чем больше у клетки образуется стабильных контактов с субстратом, тем быстрее происходит их распластывание на субстрате.

Как уже отмечалось, предварительная обработка клеток пептидом GERA при всех исследованных концентрациях не приводила к изменению числа распластанных клеток на желатине и не влияла на изменение размеров клеток (см. рисунок, *б, III; в, III*). Эти данные свидетельствуют о том, что после перехода клеток от фазы прикрепления к распластыванию на желатине регулирующее влияние пептида GERA на процессы клеточного распластывания не связано с его прямым взаимодействием с молекулами интегриновых рецепторов. Другими словами, влияние пептида GERA на клетки, распластывающиеся на твердой поверхности, более вероятно связано, как это нами уже отмечалось, с регулированием структурных перестроек в локусах фокальных адгезий, определяющих как особенности взаимодействия клетки с субстратом, так и специфику передачи сигнала в клетку (Calderwood et al., 2000).

Феномен стимулирующего действия пептида GERA на количество распластанных клеток на необработанном пластике можно объяснить активацией пептидом экспрессии интегриновых рецепторов более широкого спектра, способных связываться с клетками ВКМ, основным компонентом которого могут быть фибронектин и тенасцин.

Известно, что образование кластеров интегриновых рецепторов в фокальных адгезиях индуцирует активацию мембранной фосфолипазы  $A_2$ , которая отщепляет остаток арахидоновой кислоты из фосфолипидов, формирующих липидный бислой клеточной мембраны (Cybulski et al., 1993; Whitfield, Jacobson, 1999). Известно также, что лейкотриены, образующиеся при окислении арахидоновой кислоты (липоксигеназный путь), вызывают освобождение диацилглицерина (ДАГ), активирующего протеинкиназу С эпсилон (PKC $\epsilon$ ). В свою очередь PKC $\epsilon$  индуцирует полимеризацию актина, которая и определяет распластывание клеток на субстрате (Chun et al., 1997; Stockton, Jacobson, 2001; Glenn, Jacobson, 2002).

Можно предположить, что пептид GERA, находясь в примембранной зоне, может влиять на активность фосфолипазы  $A_2$  или опосредованно, индуцируя процессы клас-

теризации интегринов, или при прямом взаимодействии пептида с аминокислотными участками фермента. В результате активация пептидом GERA фермента приведет к увеличению скорости выделения арахидоновой кислоты из фосфолипидов, а значит, и лейкотриенов, индуцирующих через выделение ДАГ активацию РКС $\epsilon$  и, следовательно, стимулирование процессов полимеризации актина, что неизбежно приведет к ускорению распластывания клеток на субстрате.

Исследованиями последних лет показано, что не только интактные молекулы гистонов, но и их пептидные фрагменты проявляют биологическую активность. Молекулы гистонов могут выступать в качестве предшественников биологически активных пептидных соединений, длина которых может варьировать от нескольких аминокислот до нескольких десятков аминокислот. Другими словами, в структуре гистонов могут содержаться пептидные последовательности, специфическая регуляторная активность которых может проявляться только после высвобождения подобных фрагментов из гистонов в ходе неполного протеолиза. Так, N-концевые пептидные фрагменты гистонов, содержащие от 19 до 70 аминокислотных остатков, проявляют антимикробную активность (Park et al., 1998; Fernandes et al., 2004; Cho et al., 2009; Bustillo et al., 2014). Обнаружены биологически активные олигопептидные фрагменты в первичной структуре гистонов, способные регулировать некоторые физиологические процессы. Так, пентапептиды RKESY (фрагмент 33—37 гистона H2B) и YGFGG (фрагмент 99—103 гистона H4) проявляют анальгетическую активность, сравнимую с таковой у лей-энкефалина (Харченко, Багров, 1986; Харченко и др., 1988). Некоторые пептидные фрагменты гистонов могут участвовать в регуляции иммунного ответа. Тетрапептидные фрагменты гистонов ТКРА (фрагмент 30—34 гистона H4), TAVR (фрагмент 96—99 гистона H2B) и TARK (фрагмент 6—9 гистона H3) стимулируют фагоцитоз гранулоцитов человека (Konopinska et al., 1977), а пентапептид RKNY (фрагмент 35—39 гистона H2A) стимулирует процесс антителообразования при вторичном иммунном ответе к Т-зависимому антигену у мышей (Иванова, Сорочинская, 1992).

В результате проведенных нами исследований показано, что С-концевой тетрапептидный фрагмент гистона H3 участвует в регуляции адгезивной способности клеток линии CHO-K1. При этом модулирующий эффект пептида GERA на клеточное прикрепление и распластывание зависит от свойств субстрата, которые могут определять спектр экспрессируемых клетками интегриновых рецепторов и последующую их активацию (при адгезии) или структурные перестройки фокальных адгезий (в ходе распластывания), индуцирующих, с одной стороны, взаимодействие клетки с субстратом, с другой — различные пути передачи сигнала в клетку.

Выявленное на стадии прикрепления частичное ингибирование клеточной адгезии на желатине после предварительной обработки клеток пептидом свидетельствует о том, что действие пептида GERA связано с активацией лиганд-рецепторного взаимодействия, но не в первичных центрах связывания рецепторов, а, что более вероятно, в неспецифических зонах аллостерического взаимодействия. Однако после перехода клеток от фазы прикрепления к распластыванию на желатине регулирующее действие пептида GERA на процессы клеточного распластывания не связано с его прямым взаимодействием с интегриновыми рецепторами, поскольку у клеток, пред-

варительно обработанных пептидом, практически не изменялась способность к распластыванию.

Функциональная активность, а также жизнеспособность адгезионных клеток, как известно, определяется экспрессией и активацией специфических адгезионных рецепторов, которые клетка использует для взаимодействия с субстратом. Оптимальную функциональную активность интегриновых рецепторов у клеток можно контролировать, с одной стороны, изменяя свойства полимерных материалов (с помощью химической модификации или физических воздействий), используемых в качестве субстрата, с другой — добавляя в культуральную среду различные растворимые ростовые факторы и регуляторные соединения, в том числе и пептиды.

Более перспективными для использования в качестве субстрата, особенно в медицине, являются природные полимерные материалы, поскольку они вызывают селективную клеточную адгезию, обладают механическими свойствами, сходными с естественными тканями, относятся к биосовместимым полимерам и легко подвергаются биодegradации. В связи с этим основная задача специалистов в области органической химии заключается в создании новых искусственных полимеров, физико-химические свойства которых не были бы однообразными. Сложная структура и химический состав новых материалов повысят качество сигналов, поступающих в клетку от субстрата, и будут способствовать оптимизации клеточной адгезии в тех или иных условиях.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (гос. регистрация № АААА-А18-118012290371-3).

### Список литературы

- Ашмарин И. П. 1982. Регуляторные пептиды, происхождение и иерархия. Журн. эволюц. биохим. физиол. 18 (1) : 3—10. (Ashmarin I. P. 1982. Regulatory peptides, their origin and system of subordination. J. Evol. Biochem. Physiol. (Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii). 18 : 3—10.)
- Иванова В. П. 2017. Фибронектины: структурно-функциональные связи. Журн. эволюц. биохим. физиол. 53 (6) : 398—410. (Ivanova V. P. 2017. Fibronectins: structural-functional relationships. J. Evol. Biochem. Physiol. (Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii). 53 : 450—464.)
- Иванова В. П., Ковалева З. В., Забелинский С. А., Гринчук Т. М., Кривченко А. И. 2008. Роль трипептидного фрагмента коллагена GERA в активации адгезии и модификации жирнокислотного состава фосфолипидов мембран клеток линии CHO-K1. Цитология. 50 (4) : 309—316. (Ivanova V. P., Kovaleva Z. V., Zabelinskii S. A., Grinchuk T. M., Krivchenko A. I. 2008. Role of collagen tripeptide fragment GER on activation of adhesion and modification of fatty acid composition in membrane phospholipids of CHO-K1 cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 2 : 115—122.)
- Иванова В. П., Сорочинская Е. И. 1992. Иммуноактивные пептиды. IV. Эркагнин — иммуноактивный фрагмент гистона H2A. Хим.-фарм. журн. 26 (9—10) : 34—37. (Ivanova V. P., Sorochinskaya E. I. 1992. Immunoactive peptides. IV. Erkagnin is an immunoactive fragment of histone H2A. Pharm. Chem. J. (Khimiiko-Farmaceuticheskii Zhurnal). 26 : 34—37.)
- Харченко Е. П., Багров А. Я. 1986. Гисторфин — новый опиоидный пептид из гистона H4. Докл. АН СССР. 289 (4) : 1009—1011. (Kharchenko E. P., Bagrov A. Ya. 1986. Historphin is a new opioid peptide from histone H4. Dokl. Biol. Sci. (Doklady Akademii Nauk SSSR.) 289 : 1009—1011.)
- Харченко Е. П., Калихевич В. Н., Соколова Т. В., Шестак К. И., Ардемасова З. А., Сорочинская Е. И. 1988. Принци-

- пиально отличные по первичной структуре от энкефалинов опиатоподобные пептиды. Биохимия. 53 (7): 1128—1135. (Kharchenko E. P., Kalikhevich V. N., Sokolova T. V., Sheshtak K. I., Ardemasova Z. A., Sorochinskaya E. I. 1988. Opiate-like peptides with primary structure different from that of enkephalins. Biochemistry (Moscow). (Biokhimiya.) 53 : 1128—1135.)
- Штильман М. И. 1996. Полимеры в биологически активных системах. Соросовский образов. журн. 5 : 48—53. (Shtil'man M. I. 1996. Polymers in biological active systems. Sorosovskii Obrazovatel'nyi Zhurnal. 5 : 48—53.)
- Allam R., Kumar S. V., Darisipudi M. N., Anders H. J. 2014. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. J. Mol. Med. (Berlin). 92 : 465—472.
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. 2010. Integrins. Cell Tissue Res. 339 : 269—280.
- Berrier A. L., Yamada K. M. 2007. Cell-matrix adhesion. J. Cell. Physiol. 213 : 565—573.
- Bettinger C. J., Langer R., Borenstein J. T. 2009. Engineering substrate micro- and nanotopography to control cell function. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 48 : 5406—5415.
- Bruekers S. M. C., Bao M., Hendriks J. M. A., Mulder K. W., Huck W. T. S. 2017. Adaptation trajectories during adhesion and spreading affect future cell states. Sci. Rep. 7 : a12308.
- Bustillo M. E., Fischer A. L., LaBouyer M. A., Klaips J. A., Webb A. C., Elmore D. E. 2014. Modular analysis of Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide consisting of membrane translocating and membrane permeabilizing fragments. Biochim. Biophys. acta. 1838 : 2228—2233.
- Byron A., Morgan M. R., Humphries M. J. 2010. Adhesion signalling complexes. Curr. Biol. 20 : R1063—R1067.
- Calderwood D. A., Shattil S. J., Ginsberg M. H. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. J. Biol. Chem. 275 : 22 607—22 610.
- Chakravarthy S., Park Y.-J., Chodaparambil J., Edayathuman-galam R. S., Luger K. 2005. Structure and dynamic properties of nucleosome core particle. FEBS Lett. 579 : 895—898.
- Chen R., Kang R., Fan X.-G., Tang D. 2014. Release and activity of histone in disease. Cell Death Dis. 5 : e1370.
- Cho J. H., Sung B. H., Kim S. C. 2009. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. Biochim. Biophys. acta. 1788 : 1564—1569.
- Chun J., Auer K. A., Jacobson B. S. 1997. Arachidonate initiated protein kinase C activation regulates HeLa cell spreading on a gelatin substrate by inducing F-actin formation and exocytotic upregulation of  $\beta_1$  integrin. J. Cell. Physiol. 173 : 361—370.
- Cybulsky A. V., Carbonetto S., Cyr M. D., McTavish A. J., Huang Q. 1993. Extracellular matrix-stimulated phospholipase activation is mediated by beta 1-integrin. Amer. J. Physiol. 264 : C323—C332.
- Daley W. P., Peters S. B., Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. J. Cell Sci. 121 : 255—264.
- Engel J., Chiquet M. 2011. An overview of extracellular matrix structure and function. In: The extracellular matrix: an overview. Berlin: Springer-Verlag. 1—39.
- Eslami-Mossallam B., Schiessel H., van Noort J. 2016. Nucleosome dynamics: sequence matters. Adv. Colloid Interface Sci. 232 : 101—113.
- Fernandes J. M. O., Molle G., Kemp G. D., Smith V. J. 2004. Isolation and characterization of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Develop. Compar. Immunol. 28 : 127—138.
- 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. 44 : 3317—3325.
- Frantz C., Stewart K. M., Weaver V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. J. Cell Sci. 123 : 4195—4200.
- Gilcrease M. Z. 2007. Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett. 247 : 1—25.
- Glenn H. L., Jacobson B. S. 2002 Arachidonic acid signaling to the cytoskeleton: the role of cyclooxygenase and cyclic AMP-dependent protein kinase in actin bundling. Cell Motil. Cytoskeleton. 53 : 239—250.
- Griffith L. G. 2002. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. Ann. N. Y. Acad. Sci. 961 : 83—95.
- Heino J. 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. BioEssays. 29 : 1001—1010.
- Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., von Pawel J., Schalhorn A., Nagel D., Seidel D. 2001. Circulating nucleosomes in serum. Ann. N. Y. Acad. Sci. 945 : 93—102.
- Hynes R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 110 : 673—687.
- Jiang C., Pugh B. F. 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. Nat. Rev. Genet. 10 : 161—172.
- Konopinska D., Nawrocka E., Siemion I. Z., Szymaniec S., Klonowska E. 1977. Partial sequences of histones with tuftsin activity. Int. J. Peptide Protein Res. 9 : 71—77.
- Lai M., Hermann C. D., Cheng A., Olivares-Navarrete R., Gittens R. A., Bird M. M., Walker M., Cai Y., Cai K., Sandhage K. H., Schwartz Z., Boyan B. D. 2015. Role of  $\alpha_2\beta_1$  integrins in mediating cell shape on micro-textured titanium surfaces. J. Biomed. Mater. Res. 103 : 564—573.
- Li M., Fang Y. D. 2015. Histone variants: the artists of eukaryotic chromatin. Sci. China Life Sci. 58 : 232—239.
- Luger K. 2006. Dynamic nucleosomes. Chromosome Res. 14 : 5—16.
- Pan L., Zhao Y., Yuan Z., Qin G. 2016. Research advances on structure and biological functions of integrins. SpringerPlus. 5 : a1094.
- Pankov R., Yamada K. M. 2002. Fibronectin at a glance. J. Cell Sci. 115 : 3861—3863.
- Park I. Y., Park C. B., Kim M. S., Kim S. C. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. FEBS Lett. 437 : 258—262.
- Pfaff M., Aumailley M., Specks U., Knolle J., Zerwes H. G., Timpl R. 1993. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. Exp. Cell Res. 206 : 167—176.
- Plow E. F., Haas T. A., Zhang L., Loftus J., Smith J. W. 2000. Ligand binding to integrins. J. Biol. Chem. 275 : 21 785—21 788.
- Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Parmeggiani D., Barbarisi A. 2005. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. J. Cell. Physiol. 203 : 465—470.
- Silk E., Zhao H., Weng H., Ma D. 2017. The role of extracellular histone in organ injury. Cell Death Dis. 8 : e2812.
- Stockton R. A., Jacobson B. S. 2001. Modulation of cell-substrate adhesion by arachidonic acid: lipoxygenase regulates cell spreading and ERK1/2-inducible cyclooxygenase regulates cell migration in NIH-3T3 fibroblasts. Mol. Biol. Cell. 12 : 1937—1956.
- Takada Y., Ye X., Simon S. 2007. The integrins. Genome Biol. 8 : 215.1—215.9.
- Theocharis A. D., Skandalis S. S., Gialeli C., Karamanos N. K. 2016. Extracellular matrix structure. Adv. Drug Deliv. Rev. 97 : 4—27.
- Tucker R. P., Chiquet-Ehrismann R. 2015. Tenascin-C: its functions as an integrin ligand. Int. J. Biochem. Cell Biol. 65 : 165—168.
- Van der Flier A., Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res. 305 : 285—298.
- Van der Mark K., Park J., Bauer S., Schmulki P. 2010. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. Cell Tissue Res. 339 : 131—153.
- Venkatesh S., Workman J. L. 2015. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16 : 178—189.
- Wells R. G. 2008. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. Hepatology. 47 : 1394—1400.
- Whitfield R. A., Jacobson B. S. 1999. The  $\beta_1$ -integrin cytosolic domain optimizes phospholipase A2-mediated arachidonic acid re-

lease required for NIH-3T3 cell spreading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 : 306—312.

Woodcock C. L., Ghosh R. P. 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 : a000596.

Wozniak M. A., Modzelewska K., Kwong L., Keely P. J. 2004. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. acta.* 1692 : 103—119.

Wu D., Ingram A., Lahti J. H., Mazza B., Grenet J., Kapoor A., Liu L., Kidd V. J., Tang D. 2002. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 277 : 12 001—12 008.

Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C. T., Semeraro F., Taylor F. B., Esmon N. L., Lupu F., Esmon C. T. 2009.

Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15 : 1318—1321.

Yamada K. M., Pankov R., Cukierman E. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 : 959—966.

Yang L., Liu H., Lin Y. 2014. Biomaterial nanotopography-mediated cell responses: experiment and modeling. *Int. J. Smart Nano Materials.* 5 : 227—256.

Yeung T., Georges P. C., Flanagan L. A., Marg B., Ortiz M., Funaki M., Zahir N., Ming W., Weaver V., Janmey P. A. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 60 : 24—34.

Поступила 14 III 2018

### THE C-TERMINAL TETRAPEPTIDE FRAGMENT OF HISTONE H3 MODULATES ADHESIVE RESPONSE OF EPITHELIAL-LIKE CELLS

V. P. Ivanova,<sup>1,\*</sup> Z. V. Kovaleva,<sup>2</sup> A. I. Krivchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,  
St. Petersburg, 194223,

and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: valet@iephb.ru

Histones are known to be conserved nucleic proteins with high content of basic amino acid residues forming stable complexes with nucleic acids. This property of histones provides compaction of DNA molecules during the process of chromatin structurization. Besides the formation of chromatin structure histones participate in the regulation of gene transcription. In this study, the role of the C-terminal tetrapeptide fragment from histone H3 (GERA) in regulation of the adhesive response of CHO-K1 cells was investigated. It was established that regulatory effect of peptide GERA on cell attachment and spreading was dependent on substrate properties. Peptide GERA stimulated cell adhesion both to untreated plastic and to gelatin-coated plastic. The peptide-induced stimulation effect of cell adhesion to gelatin surpassed such effect to untreated plastic however the difference between these effects was no so significant as it might be expected. Cell incubation with the peptide was shown to lead to increasing in the number of spread cells therewith an average cell area of spread cells also increases. The extent of peptide influence on cell spreading varied depending on the used substrate. If on immobilized gelatin the peptide more intensive affected the extent of cell spreading, in the case of untreated plastic it did the growth of the number of spread cells. Preliminary cell treating with peptide GERA led to the partial inhibition of cell adhesion to gelatin and had no effect on cell spreading to this substrate (growth of spread cells and changing of cell size). The data obtained indicate that the regulatory effect of the peptide is determined not only by substrate properties, but also by a temporal period of cell interaction with substrate surface. The possible mechanism of the peptide effect on the processes of cell adhesion and spreading is discussed.

Key words: C-terminal tetrapeptide fragment from histone H3, adhesion, spreading, CHO-K1 cells.