

В.Х. Хавинсон^{1, 2}, Н.С. Линькова^{1, 3, 4}, В.В. Ашапкин⁵, Г.А. Шиловский⁶,
Н.В. Борушко⁷, М.Г. Петухов⁷, Б.Ф. Ванюшин⁵

ПЕПТИД КЕ РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ SIRT1, PARP1, PARP2 В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3, e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6;

³ Белгородский национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85;

⁴ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4; ⁵ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1;

⁶ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1; ⁷ Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1

Показано, что пептид КЕ (*Lys–Glu*, вилон) обладает иммуномодулирующим, онкостатическим и геропротекторным свойствами. Цель работы — оценка влияния пептида КЕ на экспрессию генов и синтез белков SIRT1, PARP1, PARP2 при старении мезенхимальных стволовых клеток (MSC) человека. Пептид КЕ повышает экспрессию гена и синтез белка SIRT1 в «молодых» MSC, соответственно, в 6 и 8,2 раза. Пептид КЕ снижает экспрессию гена и синтез белка PARP1 при старении MSC, соответственно, в 2,1 и 5,3 раза, а также снижает экспрессию гена и синтез белка PARP2, соответственно, в 2,1 и 4,7 раза. По данным молекулярного моделирования, пептид КЕ может взаимодействовать с последовательностью GCGG двунитевой ДНК (днднк) в классической В-форме и с последовательностью GGGC искривленной днднк нуклеосомы. В промоторах генов SIRT1, PARP1, PARP2 человека обнаружены указанные последовательности днднк. Таким образом, пептид КЕ регулирует экспрессию генов и синтез белков SIRT1, PARP1, PARP2 в MSC человека при репликативном старении, что лежит в основе биологической активности и геропротекторного эффекта этого пептида.

Ключевые слова: пептид КЕ, SIRT, PARP, мезенхимальные стволовые клетки, старение

Биологическая активность дипептида КЕ

В полипептидном лекарственном иммунопротекторном препарате «Тималин» [48] методом ультраэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии был обнаружен дипептид *Lys–Glu* (КЕ, Vilon). Ранее было показано, что Тималин эффективен при COVID-19. Это может быть обу-

словлено биологической активностью его активного компонента — дипептида КЕ [3, 23, 34]. Пептид КЕ является фрагментом цитокинов (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- α), а также ряда биологически активных веществ — тимозина, тимопоэтинов I и II [23, 47]. Он повышает уровень внутриклеточного Ca²⁺ в тимоцитах и макрофагах. Кроме того, пептид КЕ стимулирует в тимоцитах и эпителиальных клетках экспрессию аргирофильных белков областей ядрышковых организаторов, которые ответственны за синтез, сборку и транспорт рибосом в цитоплазму. Этот процесс приводит к усилению синтеза белка. Следует полагать, что пептид КЕ способен включаться в механизм регуляции функционального состояния областей ядрышковых организаторов и локализованных в них рибосомных генов. Пептид КЕ нормализует функции митохондрий и рибосом в клетках тимуса при их репликативном старении [19]. Было показано, что он снижает уровень провоспалительного цитокина TGF- β в крови у крыс с хронической патологией почек [17]. Кроме того, пептид КЕ снижает темп ускоренного старения тимуса и селезенки у животных, подвергнутых действию ионизирующего излучения [31].

Пептид КЕ при введении в организм трансгенных мышей подавляет экспрессию онкогена HER-2/неу в 2 раза, что сопровождается уменьшением диаметра опухоли, и увеличивает продолжительность жизни животных. Также было пока-

зано, что пептид KE подавляет рост карциномы легкого у мышей разного возраста [8]. Этот пептид способствует увеличению доли транскрибируемого эухроматина и снижению количества гетерохроматина в лимфоцитах крови у лиц старческого возраста. Пептид KE стимулирует синтез мРНК IL-2 в лимфоидных и нервных клетках [24, 28]. Этот пептид повышает пролиферативный потенциал моноцитов и макрофагов и оказывает противовоспалительное действие путем регуляции сигнальных каскадов с участием IL-6 и TNF- α [7]. Ранее было изучено влияние пептида KE на экспрессию 15 247 генов в сердце мыши методом микрочиповой технологии. Выявлено, что из всех исследуемых генов дипептид регулировал только 180, что указывает на его селективный эффект. В этом эксперименте пептид KE в 2–3,7 раза повышал экспрессию генов, отвечающих за клеточное деление, структуру клетки, клеточный метаболизм человека: *EPS15*, *MCM10 homologue*, *CULLINE 5*, *APG5L*, *FUSED*, *ZNF01*, *FLJ12848 fis*, *ITPK1*, *SLC7A6*, *FLJ22439 fis*, *KIAA0029*, *FLJ13697 fis*, *KIAA0699*, *FLJ10914*, *GDAPI*, *MSTP028*, *MLLT3*, *PEPP2* [24, 27, 28]. Кроме того, пептид KE регулирует экспрессию генов *IGF1*, *FOXO1*, *TERT*, *TNKS2* и *NF κ B* в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга эмбрионов человека линии FetMSC при репликативном и стационарном старении [5]. Предполагается, что пептид KE регулирует экспрессию генов, проникая в цитоплазму и ядро клетки и взаимодействия с двуниевой ДНК (днДНК). Методом электрофореза в полиакриламидном геле установлено выраженное селективное связывание пептида KE с ДНК [32].

Влияние пептида KE, активного компонента лекарственного препарата «Тималин», на дифференцировку стволовых клеток может иметь важное значение для терапии COVID-19. Так, было установлено, что Тималин способствует дифференцировке гематopoэтических стволовых клеток человека. Это выражалось в повышении синтеза поверхностных гликопротеинов CD28 и CD44 на HSC. При этом важно отметить, что молекула CD28 вовлечена в активацию противовирусного иммунитета [26]. Кроме того, пептид KE снижает патологическую гиперкоагуляцию [35], что имеет важное значение в терапии COVID-19.

Таким образом, исследование влияния пептида KE на функции стволовых клеток человека имеет важное научно-практическое значение для понимания его геро- и иммунопротекторного действия.

Роль белков Parp1, Parp2, Sirt1 в регуляции клеточного старения

Причинами клеточного старения может являться повреждающее действие свободных радикалов, различных химических агентов и излучений на ДНК, белки и другие молекулы, обеспечивающие жизнеспособность клетки. Кроме того, старение клетки может детерминироваться ее программой онтогенеза, направленной на уничтожение функционально неактивных или малигнизированных клеток. Согласно одной из гипотез, важнейшим механизмом старения клеток является накопление повреждений ДНК в сочетании со снижением активности белков системы ее репарации [45]. Таким образом, невозможность поддержания стабильности генома приводит к старению и апоптозу клеток. Выявлена положительная корреляция между активностью систем, вовлеченных в репарацию ДНК, и продолжительностью жизни млекопитающих [15, 44].

Ранним ответом клетки на повреждение ДНК является поли(ADP-рибозил)ирование белков, осуществляемое ферментами поли(ADP-рибоза)-полимеразами (PARP). Белки семейства PARP (PARP1, PARP2 и некоторые другие) активируются при связывании с поврежденной ДНК и используют окисленную форму никотинамид-аденин-динуклеотида (NAD⁺) в качестве источника ADP-рибозы. Белки PARP синтезируют полимер ADP-рибозы (PAR), который ковалентно присоединяется к ряду белков-мишеней. Синтез PAR рассматривается как механизм, обеспечивающий формирование сигнала о повреждении ДНК и модулирование функционирования белков в ответ на генотоксические воздействия [42].

Белок PARP1 играет ключевую роль в репарации ДНК, эпигенетически регулируя экспрессию генов, продукты которых ответственны за поддержание жизнеспособности и дифференцировки клеток и предотвращение их апоптоза. Многократное связывание PARP1 с разрывами ДНК, которые не могут быть устранены системой репарации, способствует стабилизации структуры ДНК [2]. Нарушение экспрессии гена *PARP1* приводит к нестабильности генома, развитию сахарного диабета, патологии сетчатки, атеросклероза, нарушению функций клеток иммунной системы [13, 36, 38, 40].

PARP1 эпигенетически регулирует экспрессию генов путем связывания с коровыми гистонами

H2A, H2B, H3, H4, что приводит к деконденсации хроматина и изменению доступности генов для транскрипции. Также PARP1 участвует в каспаза-независимом апоптозе (партанатозе), связанном с транслокацией апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) в ядро [49]. В то же время, гиперактивация PARP1, вызванная многочисленными повреждениями ДНК, может привести к истощению запасов NAD⁺ и АТФ, подавлению гликолиза, митохондриального дыхания и некротической гибели клетки [11]. Возможно, этот механизм служит защитой от генетически нестабильных и склонных к трансформации клеток. Имеются данные о том, что ингибирование гиперэкспрессии PARP1 при раке молочной железы может быть одним из возможных терапевтических подходов для лечения этого заболевания [22]. Кроме того, ингибирование гиперэкспрессии PARP1 защищает кардиомиоциты от апоптоза и развития воспалительной реакции у пациентов с диабетической кардиомиопатией [43]. Таким образом, протекторная функция PARP1 как белка репарации ДНК наблюдается в норме. При патологии активация PARP1 ухудшает течение заболевания. В таких случаях ингибиторы PARP1 применяют в качестве лекарственных препаратов, уменьшающих длительность и тяжесть патологического процесса.

Функции и механизм действия белка PARP2 сходны с PARP1. Так, PARP1 и PARP2 играют важную роль в дифференцировке и поддержании функций В-лимфоцитов [16]. Однако при различных патологических процессах один из этих ферментов может иметь более важное значение. Например, ингибирование PARP2 может рассматриваться как один из подходов к фармакотерапии рака предстательной железы [18]. Выявлена положительная корреляция между видовой продолжительностью жизни и максимальной активностью PARP у животных и человека [9].

Важную роль в защите ДНК от повреждения при окислительном стрессе и геропротекции играют белки семейства сиртуинов (silent information regulator, SIRT 1–7). Сиртуины представляют собой семейство никотинамидадениндинуклеотид (НАД)-зависимых белков, регулирующих транскрипцию и клеточное старение при помощи деацетилирования гистоновых и негистоновых белков-мишеней [10, 14, 21, 45]. Повреждение ДНК при окислительном стрессе приводит к активации сигнальных каскадов, в которые вовлечены NMNAT (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1),

NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), PARP и SIRT [14]. Экспрессия SIRT1 снижается при старении, что приводит к митохондриальной дисфункции, развитию воспалительных реакций, нейродегенеративных и других ассоциированных с возрастом заболеваний. SIRT1 может активировать транскрипционные факторы PGC-1 α и HIF-1 α , синтез которых коррелирует с продолжительностью жизни [50]. Белки PARP и SIRT могут взаимодействовать друг с другом в физиологических и патофизиологических условиях. Сигнальный каскад NAD⁺/PARP1/SIRT1 участвует в регуляции уровня NAD⁺ в клетке, репарации повреждений ДНК и активности генов путем изменения статуса их метилирования [39].

Таким образом, функционирование системы поли(ADP-рибозил)ирования и сиртуинов направлено на обеспечение устойчивости клетки к внешним и внутренним факторам, вызывающим повреждение ДНК. Это позволяет рассматривать гены *PARP1*, *PARP2*, *SIRT1* в качестве потенциальных мишеней действия геропротекторов.

Цель работы — оценка влияния пептида KE на экспрессию генов и синтез белков SIRT1, PARP1, PARP2 при старении мезенхимальных стволовых клеток (MSC) человека.

Материалы и методы

Культивирование клеток

MSC костного мозга 5–6-недельного эмбриона человека линии FetMSC получены из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки линии FetMSC способны к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях [33]. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 5% содержании CO₂ и температуре 37 °C в среде DMEM с добавлением 10% FBS («Биолот», Россия), 1,5% HEPES-буфера, 1% раствора пенициллина и стрептомицина и α -глутамин («Биолот», Россия). Клетки пересевали в соотношении 1:3 по достижении 80–85% монослоя. Для открепления клеток от подложки использовали смесь версена (0,02%) и трипси-на (0,25%) в соотношении 1:1 («Sigma», США) с плотностью посева 4–5·10⁴ клеток/см².

Моделирование репликативного старения клеток

Старение культивируемых клеток изучали по методу Швайгерта [46] с модификациями. Для моделирования репликативного старения клетки выращивали до 7-го и 14-го пассажей, добавляя в культуральную среду при каждом пересеве

раствор пептида KE в конечной концентрации 20 нг/мл. В предварительных исследованиях и по предыдущим данным эта концентрация была наиболее эффективной [37]. В контрольные образцы культуры клеток добавляли соответствующий объем физраствора. На 7-м пассаже число клеток за 3 сут удваивалось, что указывало на фазу их активного роста. В связи с этим, клетки 7-го пассажа были обозначены как «молодые». На 14-м пассаже наблюдали статистически значимое снижение скорости удвоения клеток. Удвоение клеточной популяции наблюдали на 5-е сутки. Процент мертвых клеток определяли по окрашиванию трипановым синим. Снижение скорости удвоения клеток указывает на проявление репликативного старения культуры [29, 30]. Таким образом, клетки 14-го пассажа были обозначены как «старые», то есть подвергнутые репликативному старению.

Молекулярно-генетические методы исследования

Суммарную РНК выделяли из клеток 7-го и 14-го пассажей с использованием раствора для стабилизации РНК IntactRNA («Евроген», Москва). Выделение РНК осуществляли, используя набор RNeasy MiniKit («Qiagen», ФРГ) по прописи, рекомендуемой производителем. Первую нить кДНК синтезировали с использованием Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», США), используя 100 нг РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали непосредственно как матрицу для количественной ПЦР из расчета 1 мкл на 24 мкл реакционной смеси. Количественную ПЦР проводили на приборе «ДТ-322» («ДНК-Технология», Россия), используя набор для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген», Россия). Конструирование олигонуклеотидных праймеров осуществляли с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-Blast. Использовали пары праймеров, один из которых соответствовал участкам двух соседних экзонов. Синтез олигонуклеотидов осуществляли в НПО «Синтол» (Москва). Уровень экспрессии относительно референсного гена GAPDH определяли методом $\Delta\Delta C_q$. Статистическую обработку результатов и построение диаграмм осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010. В экспериментах использовали по три независимых образца клеток каждой группы (биологические параллели). Для каждого образца кДНК проводили минимум три параллельные реакции в соседних лунках прибора (технические параллели). Далее экспериментальные значения сравнивали попар-

но с контрольными по двухстороннему критерию Стьюдента при $p < 0,05$. Данные представляли в виде $m \pm 2SD$, где m — среднее значение, SD — стандартное отклонение от среднего.

Вестерн-блот анализ

Для вестерн-блот анализа белки изолировали из MSC 7-го и 14-го пассажей с использованием RIPA-буфера и коммерческого набора «Extraction Kit» («BestBio BB-3102», Китай). Концентрацию исследуемых белков измеряли с помощью BCA™ Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Белок выделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и переносили на PVDF-мембраны. Неспецифическое связывание белка на PVDF-мембранах блокировали в 5% растворе обезжиренного молока на Tris-буфере при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем проводили инкубацию с первичными антителами при 4 °C: anti-SIRT1, anti-PARP1, anti-PARP2, anti- β -actin («Abcam», США). Все первичные антитела разводили в соотношении 1:8 000. После этого PVDF-мембраны промывали и проводили инкубацию со вторичными антителами (1:8000, «Abcam», США) при комнатной температуре в течение 2 ч. Белки визуализировали хемолуминесценцией при помощи коммерческого набора «Thermo Fisher Scientific» («Waltham», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) и соответствующий уровень синтеза белков определяли количественно методом денситометрии с использованием программного обеспечения Image J по отношению к экспрессии β -актина в условных единицах (усл. ед.). Статистическую обработку полученных данных осуществляли в программном обеспечении SPSS 21.0. Данные представляли в виде $m \pm 2SD$. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Молекулярное моделирование взаимодействия дипептида KE и днДНК

На подготовительном этапе работы с помощью стандартных методов молекулярного конструирования пакета программ ICM-Pro на основе свойств комплементарности пар нуклеотидов симметричности пространственной структуры днДНК в классической В-форме, была построена библиотека 136 последовательностей днДНК, состоящих из четырех пар нуклеотидов и имеющих уникальные пространственные структуры, а также пространственная структура дипептида KE. С помощью

специально разработанных программных скриптов на языке ICM были сгенерированы пространственные структуры ДНК-рецепторов в классической линейной В-форме, состоящие из двух повторяющихся пар нуклеотидов (первые и последние четыре пары — АТ-богатые участки) и чередующихся последовательностей исследуемого сайта [32]. Для получения искривленной формы ДНК данные структуры были минимизированы в силовом поле программного пакета ICM-Pro (ICMFF) [1] с наложением пространственных ограничений на их структуры до получения искривления спирали в соответствии с участком днДНК в составе нуклеосом человека. Сайт связывания пептида KE определяли как центральные чередующиеся последовательности исследуемого сайта в молекуле днДНК. В соответствии с протоколом подготовки процедур докинга были созданы, параметризованы и энергетически минимизированы пространственные структуры всех ДНК рецепторов и пептидных лигандов, подготовлены соответствующие ICB и SDF файлы, а также скрипты для автоматического запуска процедур докинга в операционной среде высокопроизводительного суперкомпьютера. Докинг исследуемого пептида выполняли во внутреннем силовом поле программного пакета ICM-Pro (ICMFF) [4] и алгоритма DockScan (Molsoft LLC) с использованием вычислительных ресурсов ПИЯФ (многопроцессорный суперкомпьютер ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт»).

При расчетах осуществляли глобальную оптимизацию гибкого лиганда в силовом поле рецептора. С помощью метода Монте-Карло были получены стохастические конформации пептида с дальнейшей локальной минимизацией градиента энергии [1]. Генерацию новых конформаций пептида осуществляли с максимальной тщательностью по максимальному числу переборов угловых параметров лиганда ($\text{Thorough}=30$), которое подбирали экспериментально, основываясь на воспроизводимости результатов докинга [32]. После процедуры виртуального скрининга полученные комплексы ДНК-пептид были отсортированы в порядке увеличения значения их функции ICM-Score. Для дальнейшего анализа полученных комплексов были сохранены наиболее энергетически выгодные конформации лиганда в комплексе с днДНК.

Результаты и обсуждение

Влияние пептида KE на экспрессию генов Sirt1, Parp1, Parp2 при старении мезенхимальных стволовых клеток человека

В контрольных образцах молодых и старых культур MSC экспрессия гена *SIRT1* достоверно не различалась. Пептид KE статистически значимо повышал экспрессию гена *SIRT1* в молодых MSC в 6 раз по сравнению с контрольными (рис. 1). В контрольных образцах старых культур MSC экспрессия генов *PARP1* и *PARP2* была, соответственно, в 5,25 и 1,68 раза больше в сравне-

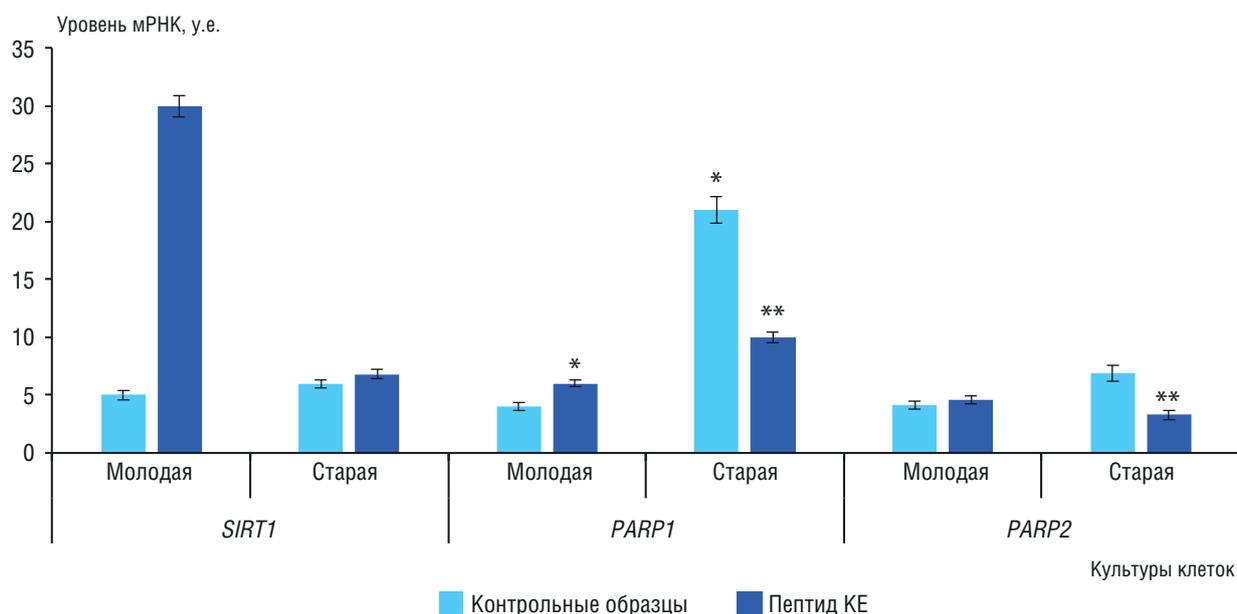


Рис. 1. Влияние пептида KE на экспрессию генов *SIRT1*, *PARP1*, *PARP2* при старении мезенхимальных стволовых клеток человека.

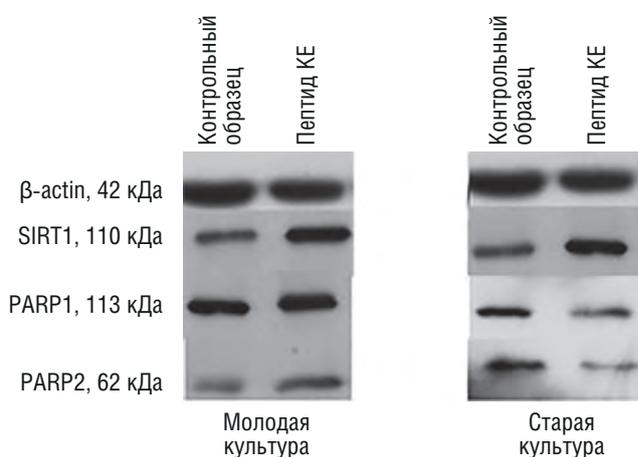
По оси ординат — экспрессия гена, нормализованная по GAPDH, $\cdot 10^6$; * $p < 0,05$ — по сравнению с контрольными образцами молодой культуры; ** $p < 0,01$ — по сравнению с контрольными образцами старой культуры

нии с молодыми клетками. Пептид KE статистически значимо снижал экспрессию генов *PARP1* и *PARP2* в старых MSC в 2,1 раза. При этом в молодых культурах пептид KE повышал экспрессию гена *PARP1* в 1,5 раза по сравнению с контрольными (см. рис. 1). Активация экспрессии гена *PARP1* в молодых MSC под действием пептида KE может служить одним из механизмов инициации дифференцировки этих клеток. Кроме того, белок PARP1 является ферментом репарации разрывов ДНК. С одной стороны, разрывы ДНК, особенно двунитевые, являются одной из ключевых причин клеточного старения, и с этой точки зрения повышение экспрессии гена *PARP1* под действием пептида KE

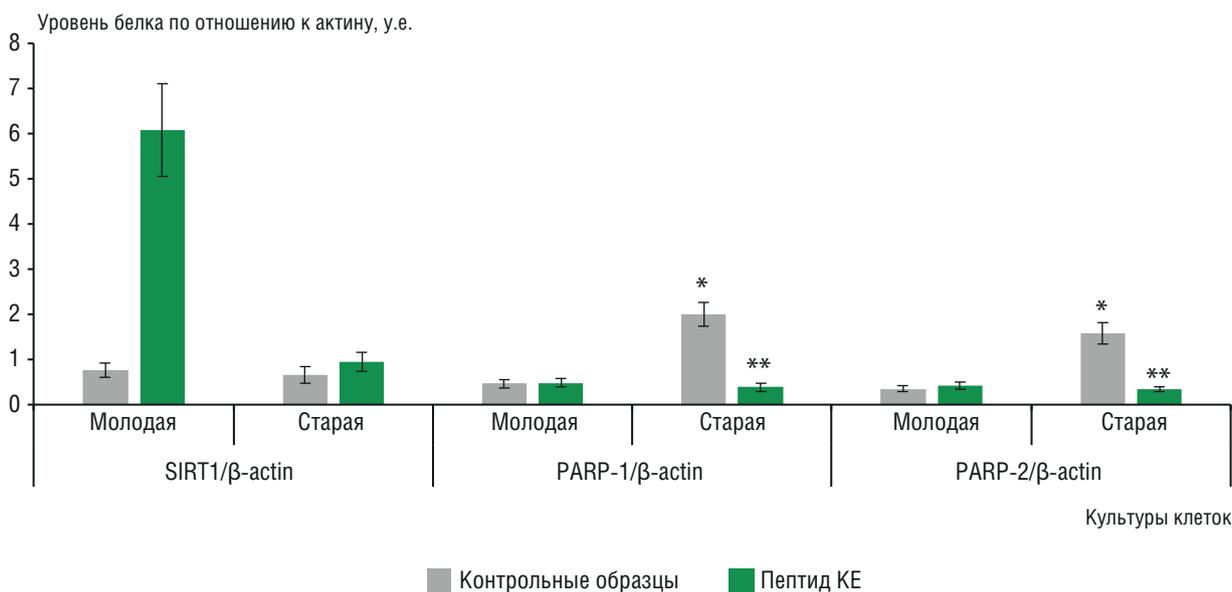
можно отнести к эффектам, направленным на предупреждение старения MSC. С другой стороны, PARP1 активно участвует в метаболизме НАД и при сильном повышении синтеза PARP1 может наблюдаться ускоренное старение [6]. Таким образом, пептид KE умеренно стимулирует экспрессию гена *PARP1* и усиливает защиту клеток от появления разрывов ДНК.

Влияние пептида KE на синтез белков SIRT1, PARP1, PARP2 при старении мезенхимальных стволовых клеток человека

В контрольных образцах молодых и старых культур MSC количество белка SIRT1 достовер-



а



б

Рис. 2. Влияние пептида KE на уровень белков SIRT1, PARP1, PARP2 в мезенхимальных стволовых клетках человека при старении, вестерн-блот анализ.

* $p < 0,05$ — по сравнению с контрольными образцами молодой культуры; ** $p < 0,05$ — по сравнению с контрольными образцами старой культуры

Наиболее энергетически выгодные комплексы дипептида KE с днДНК в классической В-форме и искривленной форме (в составе нуклеосомы)

Последовательность ДНК	Последовательность пар баз	ICM-Score	Hbond	Hphob	VwInt	Dsolv	SolEI	Eintl	Форма ДНК
TCGA*	WSSW	-35,8	-12	-3,1	-22	17,1	-1,1	0,1	b
GCGC	SSSS	-30,7	-11	-2,8	-24	18,1	6,12	0	c
GGGC	SSSS	-29,2	-12	-2,7	-21	19,9	5,62	0	c
AGAC	WSWS	-28,4	-11	-3,3	-25	20,2	6,99	0	b
AGCC	WSSS	-28,1	-10	-3,3	-25	19,8	7,78	0	b
AGTC	WSWS	-28,0	-11	-3,3	-25	20,4	7,1	0	b
AGTG	WSWS	-28,0	-11	-3,3	-25	20,3	7,31	0	b
GCGG	SSSS	-28,0	-13	-3,3	-21	20,1	9,53	2,9	b
AGAG	WSWS	-27,6	-11	-3,3	-25	20,2	8,12	0	b
CACG	SWSS	-27,6	-13	-2,8	-22	21,6	9,44	0	c

Примечание. DNA — центральный исследуемый участок днДНК; DNA_abb — кодовое обозначение последовательности ДНК (W означает А или Т, S означает С или G); Score — оценка вероятности связывания лиганда с рецептором; при значении меньше -32 возможно образование устойчивого комплекса; Hbond — значение энергетического вклада водородной связи; Hphob — значение энергетического вклада гидрофобного воздействия; VwInt — значение энергии взаимодействия Ван-дер-Ваальса; Dsolv — энергия десольватации водородной связи донора и акцептора; SolEI — энергия электростатической сольватации при связывании лиганда; Eint — значение внутренней энергии конформации лиганда; b — классическая В-форма днДНК, c — искривленная форма ДНК в составе нуклеосомы.

* Данные получены ранее и опубликованы в работе [32].

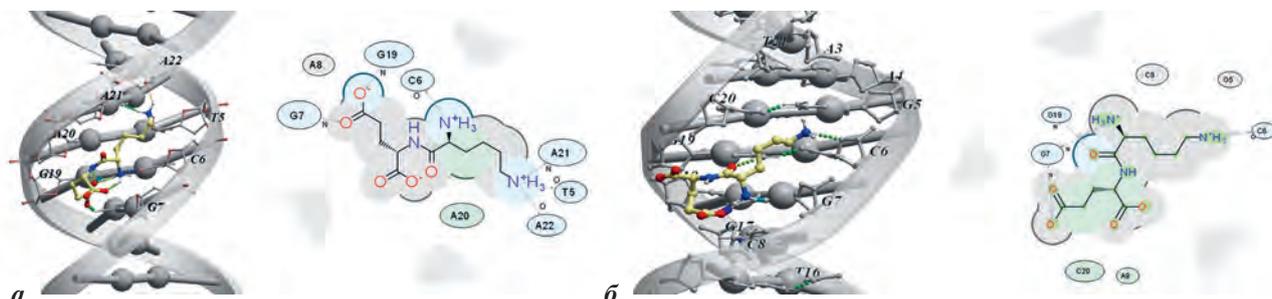


Рис. 3. Структура наиболее низкоэнергетического комплекса дипептида KE: а — с участком днДНК TCGA в классической В-форме [32]; б — с участком днДНК GCGC в искривленной форме.

Двухмерная схема демонстрирует лиганд с лучшим ICM-Score для данного рецептора и нуклеотидные остатки, находящиеся с лигандом в прямом контакте, а также межмолекулярные водородные связи, если они имеются

но не различалась. Пептид KE статистически значимо повышал уровень SIRT1 в молодых MSC в 8,2 раза по сравнению с контрольными (рис. 2). Это коррелирует с повышением экспрессии гена SIRT1 в молодых MSC под действием пептида KE. Полученные данные могут указывать на способность пептида KE предотвращать развитие окислительного стресса и повреждения ДНК в MSC. Возможно, что эффект пептида проявлялся в молодых клетках, так как у них, в сравнении со старыми MSC, больше функциональных возможностей. В контрольных образцах старых культур MSC уровень белков PARP1 и PARP2 был, соответственно, в 4,42 и 4,59 раза больше в сравнении с молодыми клетками. Пептид KE статистически значимо сни-

жал синтез белков PARP1 и PARP2 в «старых» MSC в 5,3 и 4,7 раза соответственно (см. рис. 2). Это коррелирует с уменьшением экспрессии генов PARP1 и PARP2 в старых MSC под действием пептида KE. Способность пептида KE снижать экспрессию генов и синтез белков PARP1 и PARP2 в старых MSC может быть направлена на защиту от образования раковых клеток и патологических физиологических сигнальных каскадов.

Взаимодействие пептида KE с двунитевой ДНК в классической В-форме и искривленной форме (в составе нуклеосомы)

В табл. 1 представлено 10 наилучших вариантов для взаимодействия дипептида KE с днДНК. На рис. 3 также представлены структуры наи-

Таблица 2

Последовательности днДНК в искривленной и классической В-форме в промоторах генов *SIRT1*, *PARP1*, *PARP2* человека, комплементарные пептиду **KE**

Название и последовательность нуклеотидов промотора гена (eukaryotic promoter database)	Последовательности днДНК, комплементарные пептиду KE	ICM-Score	Форма днДНК	Частота встречаемости в промоторе
SIRT1 CGGGTCACGGTGATGGGGGTTTAAATCTCCCGCAGCCGGAGCCGGGG ^{egg} GGCCSACATGCCCCG	GCGC	-30,7	c	1 раз
	GGGC	-29,2	c	1 раз
	AGCC	-28,1	b	2 раза
	AGTG	-28,0	b	1 раз
	GCGG	-28,0	b	1 раз
PARP1 CGCCCCGTGGACGGGGTTCCTGGGGGTTCCCGGGCCAGGCATCAGCAATCTATCAGG	CACG	-27,6	c	1 раз
	GGGC	-29,2	c	1 раз
	GCGG	-28,0	b	2 раза
PARP2 TGACACTGGGGCCCGGATCTTGGAGGGGGTTGATGACGTGACGGTTCGAAATTCACATGG	TCGA	-35,8	b	1 раз
	GGGC	-29,2	c	1 раз
	GCGG	-28,0	b	1 раз

более низкоэнергетических комплексов пептида **KE** с днДНК в классической В-форме и в искривленной форме. При взаимодействии с участком днДНК *TCCGA* в В-форме дипептид **KE** образует четыре внутримолекулярные и шесть межмолекулярных водородных связей со стороны малой бороздки: *N*-концевая группа пептида взаимодействует с карбонильной группой цитозина в позиции С6, *N*-концевой лизин с карбонильной группой тимина Т5, атомом азота аденина А21 и кислородом фосфатного остова в позиции А22, карбоксильная группа *C*-концевой глутаминовой кислоты с аминогруппой гуанидина в позициях G7 и G19 (см. рис. 3, а) [32].

В искривленной днДНК малая бороздка значительно расширяется, что значительно изменяет оптимальную по энергии взаимодействия конформацию пептида **KE**. В результате этого положительно заряженные группы основной и боковой цепи пептида **KE** теряют возможности взаимодействия с фосфатным остовом ДНК, переключаясь на взаимодействия с атомами кислорода рибозы и оснований ДНК. Значительно изменяется также гидратация пептида, связанного в малой бороздке искривленной днДНК. Полученные результаты указывают на важную роль последовательности и искривления спирали днДНК на эффективность связывания пептида **KE** с днДНК.

Заключение

При репликативном старении MSC экспрессия генов и синтез белков *PARP1* и *PARP2* возрастают. Наблюдаемая гиперактивация экспрессии генов *PARP*, направленная на устранение ошибок в ДНК, возникающая при клеточном старении [20], может приводить к истощению защитных систем и гибели клеток. Возможно, повышение экспрессии гена и синтеза белка *SIRT1* при репликативном старении MSC также служит одним из механизмов поддержания стабильности генома в условиях старения клеток. Гиперактивация генов *PARP1* и *PARP2*, по данным литературы, может приводить к развитию патологических процессов [18, 22, 43], тогда как для гена *SIRT1* такие данные отсутствуют. Таким образом, повышение экспрессии генов и синтеза белков *PARP1* и *PARP2* может являться проявлением репликативного старения MSC, а повышение экспрессии гена и синтеза белка *SIRT1* направлено на компенсацию проявлений старения, которое может приводить к гибели клеток. Пептид **KE** при репликативном старении

MSC снижает экспрессию генов и синтез белков *PARP1* и *PARP2* и повышает экспрессию гена и синтеза белка *SIRT1*.

В промоторах генов *SIRT1*, *PARP1*, *PARP2* человека найдены последовательности днДНК в классической В-форме (b) и искривленной форме (c), комплементарные пептиду КЕ. В промоторе гена *SIRT1* найдено семь участков днДНК, комплементарных пептиду КЕ: четыре — для днДНК в классической В-форме и три — для искривленной формы днДНК. В промоторе гена *PARP1* найдено три участка днДНК, комплементарных пептиду КЕ: два — для днДНК в классической В-форме и один — для искривленной формы днДНК. В промоторе гена *PARP2* найдено три участка днДНК, комплементарных пептиду КЕ: два — для днДНК в классической В-форме и один — для искривленной формы днДНК (табл. 2).

Таким образом, пептид КЕ примерно с одинаковой частотой связывается с днДНК в классической В-форме и при ее взаимодействии с нуклеосомой (искривленная форма). Следовательно, пептид КЕ может оказывать регуляторный эффект на экспрессию генов *SIRT1*, *PARP1*, *PARP2* двумя путями — при взаимодействии с нуклеотидами днДНК или гистоновыми белками, с ней связанными.

Интересно отметить, что в промоторах всех этих генов комплементарными для пептида КЕ являются последовательности искривленной днДНК GGGC и днДНК в классической В-форме GCGG. Можно предположить, что эти две последовательности днДНК в промоторах генов являются сайтами связывания факторов транскрипции, регулирующих баланс белков-антагонистов *SIRT1*, *PARP1* и *PARP2*, участвующих в репарации ДНК, ответе на окислительный стресс, регуляции апоптоза и дифференцировки клеток [12, 41]. Эти данные подтверждают ранее высказанное предположение о том, что ди-, три- и тетрапептиды, в том числе пептид КЕ, могут оказывать регуляторные эффекты через взаимодействие с GC-«богатыми» участками днДНК [25, 27].

Поскольку при репликативном старении MSC наблюдается гиперэкспрессия генов и увеличение синтеза белков *PARP1*, *PARP2* и снижение экспрессии гена и синтеза белка *SIRT1*, можно отнести эти эффекты пептида КЕ к геропротекторным. Учитывая высокую биологическую активность исследуемого дипептида при различных патологических процессах и старении организма, полученные

данные могут иметь важное значение для молекулярной геронтологии и регенеративной медицины.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. *Abagyan R., Totrov M.* Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins // *J. molec. Biol.* 1994. Vol. 235. P. 983–1002. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1052>
2. *Alemasova E.E., Lavrik O.I.* At the interface of three nucleic acids: the role of RNA-binding proteins and poly(ADP-ribose) in DNA repair // *Acta Natur.* 2017. Vol. 9, № 2. P. 4–16.
3. *Anisimov V.N., Khavinson V. Kh.* Peptide bioregulation of aging: results and prospects // *Biogerontology.* 2010. Vol. 11, № 2. P. 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9249-8>
4. *Arnautova Y.A., Abagyan R.A., Totrov M.* Development of a new physics-based internal coordinate mechanics force field and its application to protein loop modeling // *Proteins.* 2011. Vol. 79. P. 477–498.
5. *Ashapkin V.V., Khavinson V. Kh., Shilovsky G.A. et al.* Gene expression in human mesenchymal stem cell aging cultures: modulation by short peptides // *Molec. Biol. Rep.* 2020. Vol. 47. P. 4323–4329. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05506-3>
6. *Ashapkin V.V., Fedoreeva L.I., Kutueva L.I., Vanuyshin, B.F.* Chapter 9. Aging Epigenetics Accumulation of Errors and More // In: Ahmad S.I. *Aging: Exploring a Complex Phenomenon* (1st ed.). Boca Raton: CRC Press, 2017.
7. *Avolio F., Martinotti S., Khavinson V. Kh. et al.* Peptides Regulating Proliferative Activity and Inflammatory Pathways in the Monocyte/Macrophage THP-1 Cell Line // *IJMS.* 2022. Vol. 23, № 7. P. 3607. <https://doi.org/10.3390/ijms23073607>
8. *Barykina O.P., Iuzhakov V.V., Chalisova N.I. et al.* Combined effect of vilon and cyclophosphane on tumor transplants and lymphoid tissue explants in mice and rats of various age // *Adv. Geront.* 2003. Vol. 12. P. 128–131.
9. *Bürkle A., Beneke S., Muir M.L.* Poly(ADP-ribosyl)ation and aging // *Exp. Geront.* 2004. Vol. 39, № 11–12. P. 1599–1601. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.07.010>
10. *Chen B., Zang W., Wang J. et al.* The chemical biology of Sirtuins // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44. P. 5246–5264. <https://doi.org/10.1039/c4cs00373j>
11. *Chiarugi A.* Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation in lymphocytes and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats // *Brit. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 137, № 6. P. 761–770. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704934>
12. *Chung H.T., Joe Y.* Antagonistic crosstalk between *SIRT1*, *PARP-1*, and *-2* in the regulation of chronic inflammation associated with aging and metabolic diseases // *Integr. Med. Res.* 2014. Vol. 3, № 4. P. 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.09.005>
13. *Echeverri Tirado L.C., Ghonim M.A., Wang J. et al.* *PARP-1* Is Critical for Recruitment of Dendritic Cells to the Lung in a Mouse Model of Asthma but Dispensable for Their Differentiation and Function // *Mediators Inflamm.* 2019. Vol. 2019. Article ID 1656484. <https://doi.org/10.1155/2019/1656484>
14. *Fan C., Ma Q., Xu M. et al.* Ginsenoside Rb1 Attenuates High Glucose-Induced Oxidative Injury via the NAD-PARP-SIRT Axis in Rat Retinal Capillary Endothelial Cells // *Int. J. molec. Sci.* 2019. Vol. 20, № 19. pii: E4936. <https://doi.org/10.3390/ijms20194936>
15. *Feng J.X., Riddle N.C.* Epigenetics and genome stability // *Mamm. Genome.* 2020. Vol. 31, № 5–6. P. 181–195. <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09836-2>
16. *Galindo-Campos M.A., Bedora-Faure M., Farrés J. et al.* Coordinated signals from the DNA repair enzymes *PARP-1* and *PARP-2* promotes B-cell development and function // *Cell Death Differ.* 2019. Vol. 26, № 12. P. 2667–2681. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0326-5>
17. *Gavrisheva N.A., Malinin V.V., Ses T.P. et al.* Effect of peptide Vilon on the content of transforming growth factor-beta and

- permeability of microvessels during experimental chronic renal failure // *Bull. exp. Biol. Med.* 2005. Vol. 139, № 1. P. 24–26. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0202-9>
18. *Gui B., Gui F., Takai T. et al.* Selective targeting of PARP-2 inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer growth through disruption of FOXA1 function // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* 2019. Vol. 116, № 29. P. 14573–14582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908547116>
 19. *Ivko O.M., Drobintseva A.O., Leont'eva D.O. et al.* Influence of AEDG and KE Peptides on Mitochondrial Staining and the Expression of Ribosomal Protein L7A with Aging of the Human Pineal Gland and Thymus Cell in Vitro // *Adv. Geront.* 2021. Vol. 11, № 3. P. 261–267. <https://doi.org/10.1134/S2079057021030061>
 20. *Jubin T., Kadam A., Jariwala M. et al.* The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival // *Cell Prolif.* 2016. Vol. 49, № 4. P. 421–437. <https://doi.org/10.1111/cpr.12268>
 21. *Kaeberlein M., McVey M., Guarente L.* The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms // *Genes. Dev.* 1999. Vol. 13. P. 2570–2580. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2570>
 22. *Kaiser A., Krüger T., Eiselt G. et al.* Identification of PARP-1, Histone H1 and SIRT-1 as New Regulators of Breast Cancer-Related Aromatase Promoter I.3/II // *Cells.* 2020. Vol.9. № 2. P. 427. <https://doi.org/10.3390/cells9020427>
 23. *Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A. et al.* Peptides: Prospects for Use in the Treatment of COVID-19 // *Molecul. Spec. Iss. Peptide Therapeutics 2.0.* 2020. Vol. 25, № 19. P. 4389. <https://doi.org/10.3390/molecules25194389>
 24. *Khavinson V. Kh., Malinin V.V.* Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Basel: Karger AG, 2005. P. 1–104.
 25. *Khavinson V. Kh., Fedoreeva L.I., Vanyushin B.F.* Site-Specific Binding of Short Peptides with DNA Modulated Eukaryotic Endonuclease Activity // *Bull. exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 151, № 1. P. 66–70. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1261-8>
 26. *Khavinson V. Kh., Linkova N.S., Kvetnoy I.M. et al.* Thymalin: Activation of Differentiation of Human Hematopoietic Stem Cells // *Bull. exp. Biol. Med.* 2020. Vol. 170, № 1. P. 118–122. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-05016-z>
 27. *Khavinson V. Kh., Malinin V.V., Vanyushin B.F.* Role of Peptides in Epigenetic Regulation of Gene Activities in Ontogeny // *Bull. exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 152, № 4. P. 470–474. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1555-5>
 28. *Khavinson V.Kh., Popovich I.G., Linkova N.S. et al.* Peptide Regulation of Gene Expression: A Systematic Review // *Molecules.* 2021. Vol. 26, № 22. P. 7053. <https://doi.org/10.3390/molecules26227053>
 29. *Khokhlov A.N.* Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. P. 14–20. <https://doi.org/10.2174/18746098112059990009>
 30. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., et al.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69, № 1. P. 10–14.
 31. *Kniaz'kin I.V., Poliakova V.O.* The effect of vilon on the thymus and spleen in a radiation model of premature aging // *Adv. Geront.* 2002. Vol. 9. P. 105–109.
 32. *Kolchina N., Khavinson V., Linkova N. et al.* Systematic search for structural motifs of peptide binding to double-stranded DNA // *Nucl. Acids Res.* 2019. Vol. 47. P. 10553–10563. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz850>
 33. *Krylova T.A., Kol'tsova A.M., Zenin V.V. et al.* Comparative characteristics of new mesenchymal stem cell lines derived from human embryonic stem cells, bone marrow and foreskin // *Tsitologija.* 2012. Vol. 54, № 1. P. 5–16.
 34. *Kuznik B., Khavinson V., Shapovalov K. et al.* Peptide Drug Thymalin Regulates Immune Status in Severe COVID-19 Older Patients // *Adv. Geront.* 2021. Vol. 11, № 4. P. 368–376. <https://doi.org/10.1134/S2079057021040068>
 35. *Kuznik B.I., Isakova N.V., Kliuchereva N.N. et al.* Effect of vilon on the immunity status and coagulation hemostasis in patients of different age with diabetes mellitus // *Adv. Geront.* 2007. Vol. 20, № 2. P. 106–115.
 36. *Li P., Wang Y., Liu X. et al.* Loss of PARP-1 attenuates diabetic arteriosclerotic calcification via Stat1/Runx2 axis // *Cell Death Dis.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 22. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2215-8>
 37. *Linkova N.S., Drobintseva A.O., Orlova O.A. et al.* Peptide regulation of skin fibroblast functions during their aging in vitro // *Bull. exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 161, № 1. P. 175–178. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3370-x>
 38. *Luo X., Nie J., Wang S. et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation of FOXP3 Protein Mediated by PARP-1 Protein Regulates the Function of Regulatory T Cells // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 3. P. 1201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661611>
 39. *Mendelsohn A.R., Larrick J.W.* The NAD⁺/PARP1/SIRT1 Axis in Aging // *Rejuvenat. Res.* 2017. Vol. 20, № 3. P. 244–247. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1980>
 40. *Pan Y.-R., Song J.-Y., Fan B. et al.* MTOR may interact with PARP-1 to regulate visible light-induced parthanatos in photoreceptors // *Cell Commun. Signal.* 2020. Vol. 18. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0498-0>
 41. *Park S.A., Joo N.R., Park J.H., Oh S.M.* Role of the SIRT1/p53 regulatory axis in oxidative stress-mediated granulosa cell apoptosis // *Molec. Med. Rep.* 2021. Vol. 23, № 1. P. 20. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11658>
 42. *Prasad R., Horton K.J., Dai D.-P., Wilson S.H.* Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks // *DNA Repair. (Amst).* 2019. Vol. 73. P. 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.004>
 43. *Qin W., Liu G., Wang J. et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 24. P. 35618–35631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8343>
 44. *Sikora E., Bielak-Żmijewska A., Mosieniak G.* What is and what is not cell senescence // *Postepy Biochem.* 2018. Vol. 64, № 2. P. 110–118. https://doi.org/10.18388/pb.2018_120
 45. *Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., Khokhlov A.N.* Protein poly(ADP-ribosyl)ation system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // *Biochemistry (Mosc.).* 2017. Vol. 82, № 11. P. 1391–1401. <https://doi.org/10.1134/S0006297917110177>
 46. *Sweigert S.E., Eguchi-Kasai K., Wartens R.L., Dethlefsen L.A.* Repair of DNA single- and double-strand breaks in proliferating and quiescent murine tumor cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1989. Vol. 56. P. 253–264. <https://doi.org/10.1080/09553008914551421>
 47. *Terekhov A. Yu., Kormilets D. Yu., Linkova N.S. et al.* Peptide KE in Human Proteome // *Bull. exp. Biol. Med.* 2020. Vol. 168, № 5. P. 631–633. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04767-z>
 48. *Trofimova S.V., Khavinson V. Kh., Trofimov A.V.* Medicinal Peptide Drugs: A Promising Direction in Modern Pharmacology // *EC clin. Med. Case Rep.* 2022. Vol. 5, № 3. P. 17–24.
 49. *Wang Y., Kim N.S., Haince J.F. et al.* Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) // *Sci. Signal.* 2011. Vol. 4, № 167. P. 1–13. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000902>
 50. *Yuan Y., Cruzat V.F., Newsholme P. et al.* Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis // *Mech. Ageing Dev.* 2016. Vol. 155. P. 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.02.003>

Поступила в редакцию 08.02.2023
 После доработки 30.03.2023
 Принята к публикации 14.04.2023

V. Kh.Khavinson^{1,2}, N.S. Linkova^{1,3,4}, V.V. Ashapkin⁵, G.A. Shilovsky⁶,
N.V. Borushko⁷, M.G. Petukhov⁷, B.F. Vanuyshin⁵

**KE PEPTIDE REGULATES SIRT1, PARP1, PARP2 GENE EXPRESSION
AND PROTEIN SYNTHESIS IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AGING**

¹ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dynamo pr., St. Petersburg 197110, e-mail: ibg@gerontology.ru; ² I.P. Pavlov Institute of Physiology of RAS, 6 Makarova emb., St. Petersburg 199034; ³ Belgorod State National Research University, 85 Pobeda str., Belgorod 308015; ⁴ Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, 2–4 Lygovsky pr., St. Petersburg 191036; ⁵ A.N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye gori, Moscow 119992; ⁶ Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye gori, Moscow 119234; ⁷ B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center «Kurchatov Institute», 1 mkr. Orlova rosha, Gatchina 188300, Leningradskaya area

It was shown that KE peptide (*Lys–Glu*, vilon) has immunomodulatory, oncostatic and geroprotective effects. The aim of this work is to evaluate the effect of the KE peptide on gene expression and protein synthesis of SIRT1, PARP1, PARP2 during aging of human mesenchymal stem cells (MSC). The KE peptide increased gene expression and synthesis of the SIRT1 protein in «young» MSCs by 6 and 8,2 times, respectively. The KE peptide reduced gene expression and PARP1 protein synthesis during MSC aging by 2,1 and 5,3 times, respectively; and also reduced gene expression and PARP2 protein synthesis by 2,1 and 4,7 times, respectively. According to molecular modeling data, the KE peptide can interact with the GCGG sequence of double-stranded DNA (dsDNA) in the classical B-form and with the GGGC sequence of the curved dsDNA nucleosome. The indicated dsDNA sequences were found in the promoters of the human *SIRT1*, *PARP1*, *PARP2* genes. Thus, the KE peptide regulates gene expression and synthesis of SIRT1, PARP1, PARP2 proteins in human mesenchymal stem cells during replicative ageing, which underlies the biological activity and geroprotective effect of this peptide.

Key words: KE peptide, SIRT, PARP, mesenchymal stem cells, aging