



## ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ЛКЕКК НА КЕРАТИНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Е. В. Наволоцкая\*., В. Б. Садовников\*, Д. В. Зинченко\*,  
Ю. А. Золотарев\*\*, В. М. Липкин\*\*\*, А. Н. Мурашев\*

\*Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 142290 Московская область, Пущино, проспект Науки, 6

\*\*ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 2

\*\*\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.

После доработки 24.04.2020 г.

Принята к публикации 29.04.2020 г.

Синтезирован пептид ЛКЕКК (Np5), соответствующий последовательности 16–20 тимозина- $\alpha_1$  (ТМ- $\alpha_1$ ) и последовательности 131–135 интерферона- $\alpha_2$  (IFN- $\alpha_2$ ), получили [ $^3\text{H}$ ]Np5 и установили, что он с высоким сродством и специфичностью связывается с кератиноцитами человека ( $K_d$  2.6 нМ). В диапазоне концентраций 50–1000 нМ Np5 дозозависимо снижал индуцированную интерлейкином-17А (IL-17А) продукцию кератиноцитами провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ ) и увеличивал продукцию ими противовоспалительного цитокина IL-10 *in vitro*. Показано, что действие пептида опосредовано активацией растворимой гуанилатциклазы.

**Ключевые слова:** белки, пептиды, рецепторы, цитокины, кератиноциты, воспаление, кожа

**DOI:** 10.31857/S0132342320060226

### ВВЕДЕНИЕ

Кожа, самый большой по площади орган человека и животных, выполняет защитную функцию, участвует в дыхании, терморегуляции, обменных и многих других жизненно важных процессах. Кожа млекопитающих состоит из двух слоев: эпидермиса, который образует защитный барьер на поверхности тела, и дермы, которая представляет собой соединительную ткань, содержащую петли капилляров, нервные окончания, волосные фолликулы, железы и мышечные волокна, придающие коже прочность и эластичность. Эпидермис представляет собой многослойный плоский эпителий, состоящий из пролиферирующих базальных и дифференцированных супрабазальных кератиноцитов, которые являются основными клетками эпидермиса [1]. Кератиноциты реагируют на различные факторы внешней среды и непосредственно участвуют в регуляции воспалительного ответа кожи. Показано, что пять провоспа-

лительных цитокинов, продуцируемых кератиноцитами, участвуют в индукции воспаления кожи: IL-17А, IL-22, онкостатин М, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  [2]. Установлена роль отдельных цитокинов в развитии воспалительных процессов кожи: IL-22 и онкостатин М контролируют эпидермальную гиперплазию и потерю дифференцировки, тогда как IL-1 $\alpha$ , IL-17А и TNF- $\alpha$  обеспечивают активацию врожденного иммунитета [3].

Несколько лет назад мы синтезировали пептид ЛКЕКК (Np5), соответствующий последовательностям 16–20 тимозина- $\alpha_1$  (ТМ- $\alpha_1$ ) и 131–135 интерферона- $\alpha_2$  (IFN- $\alpha_2$ ), и показали его способность специфически связываться с Т- и В-лимфоцитами человека [4, 5], мембранами эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы [6, 7], эпителиальными клетками линий IEC-6 крысы [8, 9] и Caco-2 человека [9], клетками линии Raw 264.7 мыши [10]. Во всех случаях обработка протеазами не влияла на связывание, что указывало на небелковую природу рецептора пептида; связывание конкурентно ингибировали ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и В субъединица холерного токсина. Мы предположили, что рецептором Np5 может быть рецептор токсина GM1-ганглиозид [11, 12].

Недавно показано, что Np5 способен подавлять развитие воспаления в эпителиальных клетках кишечника *in vitro* и *in vivo*: в клетках линии Caco-2

Сокращения: СТ-В – В-субъединица холерного токсина; cGMP – циклический гуанозин-3',5'-монофосфат; DSS – декстран сульфат натрия; IFN – интерферон; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; LPS – липополисахарид; ODQ – (1Н-[1,2,4]оксадиазол[4,3- $\alpha$ ]хиноксалин-1-он; pGC – мембраносвязанная гуанилатциклаза; sGC – растворимая гуанилатциклаза; ТМ- $\alpha_1$  – тимозин- $\alpha_1$ .

# Автор для связи: (тел.: +7 (496) 773-66-68; факс: +7 (496) 733-05-27; эл. почта: navolotskaya@bibch.ru).

**Таблица 1.** Основные характеристики синтезированных пептидов

Пептид	Чистота, %	Данные аминокислотного анализа	Молекулярная масса, Да	
			экспериментальное значение	расчетное значение
Np5	>98	Glu 1.08 (1), Leu 1.00 (1), Lys 3.32 (3)	645.2	644.87
iNp5	>97	Glu 1.14 (1), Leu 1.05 (1), Lys 3.30 (3)	648.65	644.87

человека пептид значительно снижал TNF- $\alpha$ -индуцированную экспрессию IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и, в то же время, увеличивал экспрессию IL-10, а также уменьшал выраженность воспаления у мышей с экспериментальным колитом [13].

Цель данного исследования – охарактеризовать противовоспалительное действие Np5 на кератиноциты человека.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики пептидов (чистота, данные аминокислотного анализа, молекулярная масса) приведены в табл. 1.

Удельная активность [ $^3\text{H}$ ]Np5 составила 28 Ки/ммоль.

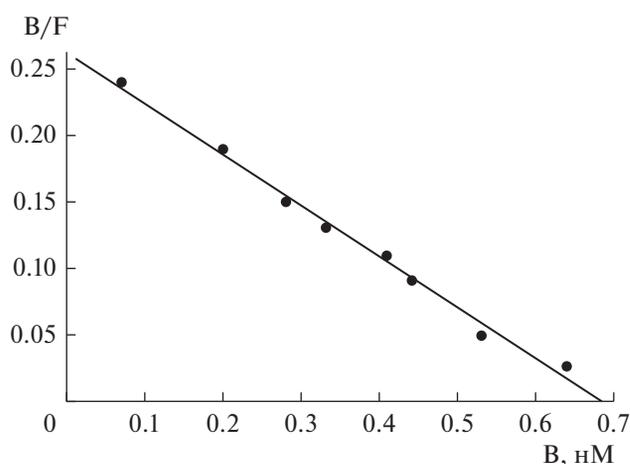
Эксперименты показали, что в выбранных нами условиях [ $^3\text{H}$ ]Np5 специфически связывается с кератиноцитами человека, связывание было обратимым и насыщаемым, динамическое равновесие в системе меченый пептид–рецептор устанавливалось примерно через 30 мин и сохранялось, по крайней мере, 1 ч. Поэтому для определения  $K_d$ , реакцию связывания проводили в течение 30 мин. Неспецифическое связывание меченого пептида в этих условиях составляло  $12.6 \pm 0.3\%$  от величины его общего связывания. На рис. 1 приведен график Скэтчарда, характеризующий специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]Np5 с кератиноцитами. Линейность графика свидетельствует о наличии на клетках одного типа рецепторов к СТ-В, а значение  $K_d = 2.6 \pm 0.2$  нМ – о высоком сродстве пептида к рецептору.

Для характеристики специфичности связывания [ $^3\text{H}$ ]Np5 с клетками, в качестве потенциальных конкурентов меченого пептида были протестированы немеченые ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$ , Np5 и iNp5. Приведенные в табл. 2 значения  $K_i$  свидетельствуют о высокой ингибирующей способности ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и Np5 и отсутствии таковой у пептида с инвертированной последовательностью iNp5. Неспособность iNp5 ингибировать связывание указывает на высокую специфичность рецептора. Таким образом, ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$  и Np5 связываются с высоким сродством и специфичностью с общим рецептором на кератиноцитах человека.

Скрининг активности 36 цитокинов позволил идентифицировать пять мощных индукторов вос-

паления – IL-17A, IL-22, онкостатин М, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\alpha$ , при этом IL-1 $\alpha$ , IL-17A и TNF- $\alpha$  проявляли наибольшую активность [2]. Год назад мы продемонстрировали противовоспалительную активность Np5 на моделях TNF-индуцированного воспаления человеческих клеток кишечника линии Сасо-2 *in vitro* и DSS-индуцированного колита у мышей *in vivo* [13]. Здесь мы исследовали противовоспалительную активность Np5, используя *in vitro* модель IL-17A-индуцированного воспаления кератиноцитов человека. Для этого клетки обрабатывали пептидом (10–1000 нМ) и IL-17A (20 нг/мл) добавляли для индукции воспаления. Параллельно в качестве отрицательного контроля был протестирован пептид с инвертированной последовательностью iNp5. Эксперименты показали, что обработка кератиноцитов пептидом Np5 в диапазоне концентраций 50–1000 нМ дозозависимо снижала IL-17A-индуцируемую продукцию трех провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\alpha$ ) (табл. 3) и, в то же время, увеличивала выработку противовоспалительного цитокина IL-10 (табл. 4). Пептид с инвертированной последовательностью был неактивен, что указывало на высокую специфичность действия Np5.

Ранее мы установили, что действие Np5 на различные клетки (человеческие Т- и В-лимфоциты, человеческие Сасо-2 и крысиные IEC-6 эпители-



**Рис. 1.** Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания [ $^3\text{H}$ ]Np5 с кератиноцитами человека. В и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.

**Таблица 2.** Ингибирование немечеными лигандами специфического связывания [<sup>3</sup>H]Np5 с кератиноцитами человека

Лиганд	IC <sub>50</sub>	K <sub>i</sub>
	нМ ± SEM	
IFN-α <sub>2</sub>	7.2 ± 0.4	2.5 ± 0.2
TM-α <sub>1</sub>	7.6 ± 0.4	2.6 ± 0.3
Np5	8.3 ± 0.3	2.9 ± 0.2
iNp5	>100	>100

альные клетки кишечника, мышинные Raw 264.7 макрофагоподобные клетки) реализуется сGMP-зависимым путем передачи сигнала [4, 5, 8]. Результаты настоящей работы, представленные в табл. 5, показывают, что Np5 при концентрациях 50–1000 нМ дозозависимо увеличивает активность sGC в кератиноцитах, но не влияет на активность pGC; протестированный параллельно iNp5 был неактивен. Таким образом, связывание Np5 с кератиноцитами человека приводит к увеличению активности в них sGC. Мы также исследовали действие пептида на способность кератиноцитов к IL-17A-индуцированной продукции TNF-α и IL-1α при частичной или полной потери активности sGC. Для ингибирования активности фермента был использован ODQ, специфический ингибитор sGC [14]. Данные, представленные в табл. 6, показывают, что ODQ дозозависимо снижал активность sGC и ингибирующий эффект 500 нМ Np5 на IL-17A-индуцированную продукцию кератиноцитами TNF-α и IL-1α. Таким образом, снижение активности фермента сопровождалось потерей Np5 способности ингибировать секрецию провоспалительных цитокинов, и следовательно действие пептида опосредовано через sGC.

**Таблица 3.** Влияние Np5 и iNp5 на IL-17A-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов кератиноцитами человека

Концентрация пептида (нМ)	Цитокин (пг/мг белка ± SEM)					
	TNF-α		IL-6		IL-1α	
	Np5	iNp5	Np5	iNp5	Np5	iNp5
– (Контроль)	28.3 ± 2.3		15.5 ± 1.7		27.4 ± 2.2	
10	29.6 ± 2.5	28.8 ± 2.7	15.9 ± 1.2	15.5 ± 1.6	28.0 ± 2.9	27.1 ± 2.5
50	23.4 ± 2.8*	27.5 ± 3.3	11.6 ± 1.4*	15.9 ± 1.4	24.7 ± 2.6	27.5 ± 2.7
100	19.6 ± 2.5*	28.2 ± 2.9	9.7 ± 1.3*	15.2 ± 1.5	20.7 ± 2.5*	27.7 ± 2.9
500	15.3 ± 2.4*	27.8 ± 2.5	8.5 ± 1.4*	16.0 ± 1.8	17.5 ± 2.4*	27.4 ± 2.8
1000	15.9 ± 2.7*	29.2 ± 2.6	8.8 ± 1.6*	15.7 ± 1.6	18.1 ± 2.9*	27.2 ± 2.3

\* Достоверное отличие от контроля ( $P < 0.05$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептид Np5 (LKEKK) связывается с высокой специфичностью и аффинностью с кератиноцитами человека, снижает их способность к IL-17A-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6 и IL-1α) и, в то же время, увеличивает выработку противовоспалительного цитокина IL-10. Таким образом, Np5, короткий пептид с простой структурой, обладает значительным противовоспалительным потенциалом и пригоден для разработки на его основе лекарственного препарата.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали TM-α<sub>1</sub>, IL-17A, TNF-α, IL-1α (“Immundiagnostik AG”, Германия), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), Tris (“Fluka”, США), аprotинин, лейпептин, пепстатин А, фетальную сыворотку теленка и Hepes (“ICN”, США); сахарозу, БСА, ЭДТА, ЭГТА, азид натрия (NaN<sub>3</sub>) (“Serva”, Германия), среду для культивирования клеток EpiGro (“Cell Applications, Inc.”, США), все остальные реагенты и растворители были отечественного производства и использовались после соответствующей очистки.

Пептиды Np5 (LKEKK) и iNp5 (KKEKL) синтезировали на автоматических синтезаторах (модель 430A и Vega Coupler, модель C250; “Applied Biosystems”, США) с использованием Boc/Bzl-тактики наращивания пептидной цепи и очищали препаративной обращеннофазовой хроматографией (хроматограф “Gilson”, Франция), колонка Waters SymmetryPrep C18 (19 × 300 мм) (“Malva”, Греция). Синтезированные пептиды были охарактеризованы данными аналитической обращеннофазовой ВЭЖХ (хроматограф “Gilson”, Франция; колонка XTerra RP18, “Malva”, Греция), аминокислотного анализа (гидролиз 6 М HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор 4151 Alpha Plus, “LKB”, Швеция) и масс-спектрально-

**Таблица 4.** Влияние Np5 и iNp5 на IL-17A-индуцированную продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 кератиноцитами человека

Концентрация пептида (нМ)	IL-10 (пг/мг белка $\pm$ SEM)	
	Np5	iNp5
– (Контроль)	33.4 $\pm$ 3.2	
10	30.9 $\pm$ 3.6	34.0 $\pm$ 3.7
50	26.2 $\pm$ 3.4*	33.2 $\pm$ 3.5
100	23.3 $\pm$ 3.3*	32.9 $\pm$ 3.3
500	20.5 $\pm$ 3.7*	33.7 $\pm$ 3.2
1000	21.1 $\pm$ 3.0*	33.5 $\pm$ 3.4

\* Достоверное отличие от контроля ( $P < 0.05$ ).

го анализа (масс-спектрометр “Finnigan”, США). Рекомбинантный интерферон- $\alpha_2$  был получен из ФГУП “Гос, НИИ ОЧБ” ФМБА (Санкт-Петербург, Россия).

Нормальные эпидермальные кератиноциты человека (NHEK, “Cell Applications, Inc.”, США) культивировали в течение 24 ч в не содержащей сыворотку среде EpiGro, содержащей 10% эмбриональную сыворотку теленка, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки (10<sup>6</sup>/лунка) высевали в 6-луночные планшеты для культивирования клеток (“Nunc”, Дания). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим (выживаемость клеток: 95%). Клетки преинкубировали с Np5 или iNp5 (10–1000 нМ) в течение 1 ч до стимуляции IL-17A (20 нг/мл) [15].

[<sup>3</sup>H]Np5 получали реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [16]. К раствору 2.0 мг пептида в 0.5 мл воды добавляли 50 мг окиси алюминия и упаривали на роторном испарителе. Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Полученную твердую смесь помещали в ампулу объемом 10 мл. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным

трением до давления 250 мм рт. ст., нагревали до 170°C и выдерживали при этой температуре в течение 20 мин. Затем ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом и повторно вакуумировали. Меченый пептид экстрагировали из твердой реакционной смеси двумя порциями по 3 мл 50% водного этанола, полученный раствор объединяли и упаривали. Для удаления лабильного трития процедуру повторяли дважды. Очистку меченого пептида проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометром “Beckman” при длинах волн 254 и 280 нм на колонке Kromasil (4  $\times$  150 мм, зернение 5 мкм) при 20°C, элюент – 0.1% ТХУ, градиент метанола 42–70% за 20 мин, скорость потока 3 мл/мин. Включение трития в пептид рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета.

Реакцию связывания [<sup>3</sup>H]Np5 с кератиноцитами проводили в соответствии со следующей схемой: клеточную суспензию (10<sup>6</sup> клеток/мл) инкубировали с меченым пептидом (10<sup>-11</sup>–10<sup>-7</sup> М, три параллельных пробы для каждой концентрации) в 1 мл среды EpiGro, содержащей 10 мМ Hepes, 20 мМ NaN<sub>3</sub> и 50 мкМ PMSF, pH 7.4, при 4°C в течение 30 мин. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолнистые фильтры GF/A (“Whatman”, Англия). Фильтры промывали ледяным физиологическим раствором, содержащим 10 мМ Hepes, pH 7.4 (три раза по 5 мл). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS 5801 (“Beckman”, США). Величину специфического связывания [<sup>3</sup>H]Np5 с клетками определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием, а величину неспецифического связывания [<sup>3</sup>H]Np5 – в присутствии 10<sup>-4</sup> М немеченого пептида (1000-кратный избыток по отношению к самой большой концентрации меченого пептида – 10<sup>-7</sup> М). Для определения равновесной константы диссоциации  $K_d$  строили график зависимости отношения

**Таблица 5.** Влияние Np5 и iNp5 на активность sGC и pGC в кератиноцитах человека

Пептид (нМ)	Гуанилатциклазная активность (нмоль cGMP/мг белка за 10 мин $\pm$ SEM)			
	sGC		pGC	
	Np5	iNp5	Np5	iNp5
Контроль	1.6 $\pm$ 0.2		2.2 $\pm$ 0.2	
10	1.7 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3
50	2.1 $\pm$ 0.2*	1.7 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3
100	2.4 $\pm$ 0.2*	1.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.4
500	2.9 $\pm$ 0.3*	1.5 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2
1000	2.8 $\pm$ 0.3*	1.8 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.4

\* Достоверное отличие от контроля ( $P < 0.05$ ).

**Таблица 6.** Влияние ODQ на активность sGC и IL-17A-индуцированный уровень цитокинов в кератиноцитах человека, преинкубированных с 500 нМ Nr5

ODQ (мкМ)	Гуанилатциклазная активность (нмоль cGMP/мг белка за 10 мин ± SEM)	Цитокин (пг/мг белка ± SEM)	
		TNF-α	IL-1α
Контроль	2.8 ± 0.2	15.9 ± 2.7	18.0 ± 2.4
5	2.2 ± 0.3*	18.2 ± 2.5*	20.2 ± 2.6
10	1.3 ± 0.3*	20.3 ± 2.2*	24.2 ± 2.3*
50	<0.1*	29.2 ± 2.7*	26.6 ± 2.9*
100	<0.1*	28.5 ± 2.4*	27.0 ± 2.5*

\* Достоверное отличие от контроля ( $P < 0.05$ ).

молярных концентраций связанного (В) и свободного (F) меченого пептида от молярной концентрации связанного меченого пептида (В) [17].

Для оценки способности ТМ- $\alpha_1$ , IFN- $\alpha_2$ , пептидов Nr5 и iNr5 ингибировать специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]Nr5 с кератиноцитами, клетки ( $10^6$ /мл) инкубировали с меченым пептидом (5 нМ) и одним из потенциальных конкурентов (диапазон концентраций  $10^{-10}$ – $10^{-5}$  М, три повтора для каждой концентрации), как описано выше. Константу ингибирования ( $K_i$ ) определяли по формуле:  $K_i = [\text{IC}]_{50}/(1 + [\text{L}]/K_d)$  [18], где [L] – молярная концентрация [ $^3\text{H}$ ]Nr5;  $K_d$  – равновесная константа диссоциации комплекса [ $^3\text{H}$ ]Nr5–рецептор;  $[\text{IC}]_{50}$  – концентрация немеченого лиганда, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого пептида, Величину  $[\text{IC}]_{50}$  определяли графически на основании кривой ингибирования. Значение  $K_d$  измеряли предварительно, как описано выше.

Для определения активности растворимой (sGC) и мембраносвязанной (pGC) гуанилатциклазы в кератиноцитах, их ресуспендировали в 10 мМ Tris-HCl-буферном растворе, pH 7.5, содержащем 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреитол, 5 мкМ пепстатин А, 50 мкМ PMSF, 10 мкМ ингибитор трипсина из сои и 1 мМ бензамидин. Полученную суспензию ( $2.5 \times 10^8$  клеток/мл) гомогенизировали в ледяной бане и гомогенат центрифугировали при 100000 g, (10 мин, 4°C). Супернатанты отбирали, а осадки ресуспендировали в равных объемах буферного раствора. Супернатанты и ресуспендированные осадки использовали для определения активности sGC и pGC соответственно. Гуанилатциклазную активность определяли путем мониторинга превращения  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]GTP в [ $^{32}\text{P}$ ]cGMP и выражали в нмоль cGMP, образовавшегося за 10 мин в расчете на 1 мг белка [19], продукт выделяли преципитацией с карбонатом цинка и хроматографией на колонке с окисью алюминия [20]. Концентрацию белка определяли с помощью метода Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Для ингибирования ак-

тивности sGC использовали ингибитор фермента ODQ (1Н-[1,2,4]оксадиазол[4,3- $\alpha$ ]хиноксалин-1-он) в диапазоне концентраций 5–100 мкМ [14]. Для оценки достоверности различий между средними значениями в контроле и опыте использовали  $t$ -критерий Стьюдента.

Для определения продукции кератиноцитами цитокинов клетки гомогенизировали в тройном объеме ледяного натрий-фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7.4), содержащего 1 мМ PMSF, аprotинин, лейпептин, пепстатин А (10 мкг/мл каждого, и центрифугировали при 12000 g (10 мин, 4°C). Концентрацию белка определяли по Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Иммуоферментный анализ проводили с помощью ELISA Kits (BD Biosciences, San Jose, CA) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № III-12, руководитель – чл.-корр. РАН В.М. Липкин).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все международные этические стандарты при работе с животными были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Breitkreutz D., Mirancea N., Nischt R. // Histochem. Cell. Biol. 2009. V. 132. P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0586>
2. Guilloreau K., Paris I., Pedretti N., Boniface K., Juchaux F., Huguier V., Guillet G., Bernard F.-X., Lecron J.-C.,

- Morel F. // J. Immunol. 2010. V. 184. P. 5263–5270.  
https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464
3. Robeony H., Petit-Paris I., Garnier J., Barrault C., Pedretti N., Guilloteau K., Jegou J.-F., Guillet G., Huguiet V., Lecron J.-C., Bernard F.-X., Morel F. // PLoS One. 2014. V. 9. e101937.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101937
  4. Наволоцкая Е.В., Зинченко Д.В., Золотарев Ю.А., Колобов А.А., Липкин В.М. // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 1109–1114. [Navolotskaya E.V., Zinchenko D.V., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A., Lipkin V.M. // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 871–875.]  
https://doi.org/10.1134/S0006297916080071
  5. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. // Int. Immunopharmacol. 2017. V. 50. P. 279–282.  
https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.011
  6. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Колобов А.А. // Биоорг. химия. 2016. Т. 42. С. 533–538. [Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Kolobov A.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 479–483.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162016050137
  7. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 655–660. [Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 673–677.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162017060115
  8. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Липкин В.М. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 401–406. [Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 403–407.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162018030123
  9. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. // Toxicology in Vitro. 2018. V. 47. P. 269–273.  
https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.010
  10. Наволоцкая Е.В., Садовников В.Б., Зинченко Д.В., Владимиров В.И., Золотарев Ю.А., Липкин В.М., Мурашев А.Н. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 288–294. [Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Zinchenko D.V., Vladimirov V.I., Zolotarev Y.A., Lipkin V.M., Murashev A.N. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 122–128.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162019020092
  11. Cuatrecasas P. // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 3558–3566.
  12. Holmgren J., Lönnroth I., Svennerholm L. // Infect. Immun. 1973. V. 8. P. 208–214.
  13. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. // J. Clin. Exp. Immunol. 2019. V. 4. P. 1–6.  
https://doi.org/10.33140/JCEI.04.04.03
  14. Feelisch M.I., Kotsonis P., Siebe J., Clement B., Schmidt H.H. // Mol. Pharmacol. 1999. V. 56. P. 243–253.  
https://doi.org/10.1124/mol.56.2.243
  15. Chorachoo J., Lambert S., Furnholm T., Roberts L., Reingold L., Auepemkiate S., Voravuthikunchai S.P., Johnston A. // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0205340.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205340
  16. Zolotarev Y.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Y.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 2003. V. 24. P. 325–333.  
https://doi.org/10.1007/s00726-002-0404-7
  17. Pennock B.E. // Anal. Biochem. 1973. V. 56. P. 306–309.
  18. Cheng Y.C., Prusoff W. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
  19. Schultz G., Buhme E. Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1984. P. 379–389.
  20. Southam E. // Curr. Protoc. Toxicol. 2001. V. 10. P. 10.5.  
https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1005s04
  21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr O.L., Randal R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.

## Effect of Peptide LKEKK on Human Keratinocytes

E. V. Navolotskaya\*,#, V. B. Sadovnikov\*, D. V. Zinchenko\*,  
Y. A. Zolotarev\*\*, V. M. Lipkin\*\*\*, and A. N. Murashev\*

#Phone: +7 (496) 773-66-68; fax: +7 (496) 733-05-27; e-mail: navolotskaya@bibch.ru

\*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, pr. Nauki 6, Moscow region, Pushchino, 142290 Russia

\*\*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

\*\*\*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Synthesized the peptide LKEKK (Np5) corresponding to the sequence 16–20 of thymosin- $\alpha_1$  (TM- $\alpha_1$ ) and to the sequence 131–135 of interferon- $\alpha_2$  (IFN- $\alpha_2$ ), prepared [ $^3\text{H}$ ]Np5 and found that it binds with high affinity and specificity to human keratinocytes. In the concentration range of 50–1000 nM Np5 increased in a dose-dependent manner the soluble guanylate cyclase activity in keratinocytes, significantly reduced IL-17A-induced secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\alpha$ ) and increased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by the cells *in vitro*. It was shown that the action of the peptide is mediated through a soluble guanylate cyclase-dependent signaling pathway.

*Keywords:* protein, peptide, receptor, cytokine, keratinocyte, inflammation, skin