

УДК 577.112; 577.181

# Мини-бактенецины ChVac7.5N $\alpha$ и ChVac7.5N $\beta$ – антимикробные пептиды из лейкоцитов козы *Capra hircus*

О. В. Шамова<sup>1,3</sup>, Д. С. Орлов<sup>1,3</sup>, М. С. Жаркова<sup>1</sup>, С. В. Баландин<sup>2</sup>, Е. В. Ямщикова<sup>1</sup>, Д. Кнаппе<sup>4</sup>, Р. Хоффманн<sup>4</sup>, В. Н. Кокряков<sup>1,3</sup>, Т. В. Овчинникова<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

<sup>4</sup>Leipzig University, Deutscher Platz 5, D-04103 Leipzig, Germany

\*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 10.11.2015

Принята к печати 10.03.2016

**РЕФЕРАТ** Антимикробные пептиды (АМП) нейтрофилов играют важную роль в осуществлении защитных функций организма человека и животных. Из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* нами выделены два пептида (средние молекулярные массы 2895.5 и 2739.3 Да), обладающие высокой антимикробной активностью и представляющие собой N-концевые фрагменты (1–22 и 1–21) пролин-богатого пептида бактенецина 7.5 козы, структура гена которого представлена в базах данных, но соответствующий белковый продукт до настоящего времени не был выделен. Полученные АМП названы мини-бактенецинами (mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$ ) по аналогии с описанным ранее C-концевым фрагментом бактенецина 7.5, выделенным из лейкоцитов овцы [Anderson, Yu, 2003]. Мини-бактенецины козы в концентрации 0.5–4 мкМ проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, включая устойчивые к ряду применяемых в медицине антибиотиков штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, а также некоторых штаммов грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes* EGD, *Micrococcus luteus*). Исследуемые пептиды, как и большинство пролин-богатых АМП, оказывают антимикробное действие без существенного повреждения бактериальных мембран, обладают липополисахарид-связывающей активностью. Мини-бактенецины не токсичны по отношению к культивируемым клеткам человека, что дает основание рассматривать их как перспективные прототипы новых антибактериальных терапевтических препаратов. Обнаружение высокоактивных фрагментов антимикробного пептида в нейтрофилах козы свидетельствует в пользу гипотезы о том, что фрагментация АМП кателицидинового семейства важна для образования функционально активных молекул, в ряде случаев более активных, чем полноразмерные пептиды, и может играть значимую роль в антиинфекционной защите.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные пептиды, кателицидины, мини-бактенецины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМП – антимикробные пептиды; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПААГ – полиакриламидный гель; ПБ-АМП – пролин-богатые антимикробные пептиды; ЭФ – электрофорез; MALDI-TOF-MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбционной ионизацией; MRSA – устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, PG-1 – протегрин 1.

## ВВЕДЕНИЕ

В защите человека и животных от возбудителей инфекционных заболеваний участвуют антимикробные пептиды (АМП) – катионные молекулы, содержащиеся в лейкоцитах, клетках барьерного эпителия и некоторых других типах клеток. Кроме антимикроб-

ной активности АМП обладают и иными свойствами, в том числе иммуномодулирующими, что позволяет рассматривать эти соединения как прототипы новых антибиотических лекарственных средств комплексного действия. С этой точки зрения особый интерес представляют АМП семейства кателицидинов – об-

ширной группы пептидов, широко распространенных у позвоночных. Пептиды данного семейства образуются из белков-предшественников путем протеолитического отщепления N-концевой части (кателиноподобного домена) от C-концевого участка, представляющего собой зрелый АМП. Протеолиз происходит при активации нейтрофильных гранулоцитов и клеток барьерного эпителия при инфекционных процессах. У некоторых кателицидинов, например, кателицидина человека LL-37, процессингу подвергается и молекула зрелого АМП [1], что приводит к появлению фрагментов, каждый из которых имеет свой спектр биологических свойств, включая антибактериальную, противоопухолевую и другие виды активности. Подобное протеолитическое расщепление пептидов описано и для бактенецинов овцы [2]. Предполагается, что фрагментация зрелых АМП имеет биологический смысл, и именно эти фрагменты могут играть ключевую роль в осуществлении множественных защитных реакций [1, 2].

Из известных к настоящему времени АМП кателицидины животных отряда парнокопытных привлекают особое внимание благодаря высокой антимикробной активности и сочетанию свойств, делающих эти пептиды перспективными для практического применения. В число пептидов, полученных из лейкоцитов парнокопытных, входят такие АМП, как протегрины, PR-39 свиньи [3, 4]; бактенецины, ВМАР-27, -28, додекапептид, индолицидин быка [5–8]; SМАР-29 овцы [9] и др. Некоторые из этих пептидов стали объектами детальных исследований, направленных на разработку лекарственных препаратов. Интересно, что в нейтрофилах ряда парнокопытных, в том числе коз, отсутствуют АМП семейства дефенсинов [10], что свидетельствует о важной роли кателицидинов в защите этих животных от инфекций. Таким образом, изучение АМП нейтрофилов парнокопытных актуально как для возможного обнаружения новых биологически активных молекул, которые могут служить прототипами лекарственных средств, так и для развития фундаментальных представлений о роли кателицидинов в иммунитете. Целью представленной работы стал поиск и характеристика новых АМП лейкоцитов домашней козы *Capra hircus*. Ранее из лейкоцитов козы нами уже были получены два пептида – бактенецины ChVac5 и ChVac3.4 [11, 12]. В данной работе изучены и другие АМП.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

Использовали хлорид натрия (S9625), трис-(гидроксиметил)аминометан (Т1503), агаро-

зу (Type I, low ЕЕО, А6013), трифторуксусную (302031) и гептафтормасляную (52411) кислоты, о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (N1127), МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; М5655), бромистый цетилтриметиламмоний (Н6269) фирмы Sigma, США; нитроцефин (484400) фирмы Calbiochem, США; уксусную кислоту, хлористый аммоний, ацетат натрия фирмы «Вектон», Россия; эмбриональную телячью сыворотку (1.1.8.3.), питательные среды RPMI-1640 (1.3.4) и DMEM (1.3.5.1.) фирмы «Биолот», Россия для культивирования клеток; питательную среду Сабуро (бульон) сухой ЗАО НИФЦ, Россия; питательный бульон Мюллера–Хинтона (М391) фирмы HiMedia, Индия. В качестве пептидов сравнения использовали химически синтезированные пептиды – протегрин 1, любезно предоставленный Р. Лерером (Калифорнийский университет г. Лос-Анджелеса, США) и бактенецины ChVac5, ChVac5 20-43 и ChVac3.4, любезно предоставленные Н.И. Колодкиным («Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА).

### Выделение и очистка антимикробных пептидов из лейкоцитов домашней козы

Лейкоцитарную массу, обогащенную нейтрофилами, получали из крови взрослых здоровых коз (*C. hircus*). Гемолиз эритроцитов осуществляли раствором хлористого аммония. Из 1 л цельной крови получали 2.5 г лейкоцитарной массы (на сырой вес). Использовали два варианта экстракции белков. В первом случае клетки разрушали гомогенизацией в 10% растворе уксусной кислоты, гомогенат суспендировали на магнитной мешалке при 4°C в течение 18–24 ч, затем центрифугировали при 15000 g в течение 1 ч. Супернатант высушивали, перерастворяли в 0.1 М трис-НСl-буфере рН 7.5 и инкубировали при 37°C в течение 4 ч для расщепления предшественников кателицидинов. Во втором случае для экстракции использовали 0.3% раствор бромистого цетилтриметиламмония в 0.02 М натрий-ацетатном буфере рН 4.5. При использовании данного метода экстракции создавались условия для осуществления ферментативных реакций уже в ходе процесса экстракции. Полученный после экстракции материал подвергали ультрафильтрации через мембрану УМ-10 (НОММ 10 кДа) фирмы Amicon (США) для отделения низкомолекулярной белковой фракции, далее концентрировали и обессоливали при ультрафильтрации через мембрану УМ-1 (НОММ 1 кДа). Материал, содержащий кислоторастворимые полипептиды с молекулярной массой менее 10–15000 Да, наносили на электрофоретическую колонку для разделения с помощью препаративного электрофореза (ЭФ) в 12.5% полиакриламидном геле в кислой буферной

системе в присутствии мочевины [13] в аппарате фирмы Bio-Rad (США) при непрерывной элюции белков из геля. Фракции, в которых была выявлена антимикробная активность, отбирали и разделяли содержащиеся в них пептиды с помощью нескольких последовательных циклов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на установке Gold System фирмы Beckman (США) с использованием колонок Vydac C-18 (4.6 × 250 мм; диаметр частиц сорбента 5 мкм). Чистоту полученных после ОФ ВЭЖХ фракций оценивали с помощью аналитического ЭФ [14], масс-спектрометрии, а также аналитической ОФ ВЭЖХ. Концентрацию белка в очищенных препаратах определяли по методу Брэдфорд, а также по методу Вольфа [15]. Концентрацию растворов химически синтезированных пептидов рассчитывали по сухому весу порошка пептида.

#### Оценка антимикробной активности пептидов

Для характеристики антимикробной активности мини-бактенецинов использовали два метода – метод радиальной диффузии в агарозном геле и метод серийных разведений в жидкой питательной среде. Штаммы микроорганизмов любезно предоставлены Р. Лерером (Калифорнийский университет г. Лос-Анджелеса, США), А. Тосси (университет г. Триеста, Италия), Е.И. Ермоленко («ИЭМ»); сотрудниками Военно-медицинской академии; Г.Е. Афиногеновым (РНИИТО им. Вредена Минздрава России). Использован клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивый к азтреонаму, цефтазидиму, цефотаксиму, клинический изолят *Klebsiella* spp., устойчивый к тетрациклину (оба штамма получены из мочи больного циститом), клинический изолят *Acinetobacter baumannii*, устойчивый к меропенему (из инфицированной раны); клинический изолят *Staphylococcus intermedius* (из инфицированной раны, полученной после укуса собакой), устойчивый к ципрофлоксациму, цефуроксиму, клиндамицину, эритромицину, рифампицину, гентамицину, бензпенициллину, оксациллину; клинический изолят дрожжеподобного грибка *Candida parapsilosis*, устойчивый к амфотерицину и клотримазолу (соскоб с ногтевой пластины).

#### Метод радиальной диффузии в агарозных гелях.

Применяли методику, предложенную Лерером и др. [16] и подробно описанную [12]. Для количественной оценки антибиотического действия АМП измеряли диаметр зоны ингибирования роста микробов вокруг лунок в агарозном геле, в которые были внесены пептиды. За 1 условную единицу принимали размер 0.1 мм. Из измеренного значения вычитали 20 единиц,

соответствующих диаметру лунки. Минимальную ингибирующую рост микробов концентрацию (МИК) АМП определяли, строя графики зависимости антимикробной активности пептидов от их концентрации в программе Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., США) и рассчитывая значение для точки пересечения графика линейной регрессии с осью абсцисс (концентрация пептидов в мкМ), которое и принимали за МИК. В каждом опыте использовали по две параллельных пробы. Опыты повторяли 3 раза, рассчитывали среднее значение МИК ± среднеквадратичное отклонение.

#### Метод серийных разведений препаратов в жидкой питательной среде.

Использовали стандартную методику, применяемую в микробиологии для тестирования антибиотиков, но с небольшими модификациями, разработанными с учетом специфики АМП [17] согласно [12]. За МИК принимали наименьшую концентрацию пептида, при которой полностью ингибировался видимый рост микроорганизмов в лунках 96-луночных планшетов. В каждом опыте использовали по три параллельных пробы. Результаты представлены как медианы, полученные по трем–пяти независимым экспериментам.

#### Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML35r для хромогенных маркеров

Действие пептидов на барьерную функцию мембран грамотрицательной бактерии изучали с использованием метода [18] в модификации [19]. Штамм *E. coli* ML35r характеризуется отсутствием пермеазы лактозы, конститутивным синтезом β-галактозидазы в цитоплазме, а также содержит β-лактамазу в периплазматическом пространстве. О состоянии наружной и цитоплазматической мембран клеток *E. coli* ML35r судили по их проницаемости для хромогенных маркеров – нитроцефина и о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (ONPG), субстратов β-лактамазы и β-галактозидазы соответственно. Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета согласно [12] и измеряли оптическую плотность (OD) раствора, обусловленную появлением продукта гидролиза нитроцефина или ONPG при λ = 486 и 420 нм соответственно с помощью спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при 37°C и периодическом встряхивании планшетов в течение 2 ч. Данные обрабатывали в программе Sigma Plot 11.

#### Оценка липополисахаридсвязывающей активности пептидов

Липополисахаридсвязывающую (липополисахариднейтрализующую) активность пептидов изучали

с помощью количественного хромогенного Лимулюс-теста (Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate; Lonza Walkersville, США). При проведении экспериментов и обработке результатов использовали подходы, описанные Zhao и соавт. [20]. Приготавливали серийные двукратные разведения пептидов в воде с 0.01% уксусной кислоты и инкубировали АМП с липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* O111:B4 в конечной концентрации 0.5 Ед/мл в течение 30 мин при 37°C в планшетах Costar 3596 (Corning, США). Проводили количественное определение свободного ЛПС в соответствии с рекомендациями производителя набора. Планшет помещали в термостатируемую камеру спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США), инкубировали при 37°C, измеряя OD раствора при 405 нм; вычисляли разницу величин OD в начале инкубации и через 10 мин –  $\Delta OD_{405}$ .

Долю связанного ЛПС (%) определяли по формуле:

$$\% \text{ связанного ЛПС} = \frac{\alpha(\text{ЛПС без пептида}) - \alpha(\text{ЛПС с пептидом})}{\alpha(\text{ЛПС без пептида})},$$

где  $\alpha = \Delta OD_{405}$  (пептид (или вода) с ЛПС) –  $\Delta OD_{405}$  (пептид (или вода) без ЛПС). Строили кривые зависимости доли связанного ЛПС от концентрации АМП в инкубационной среде (программа Sigma Plot 11, Systat Software Inc., США) и определяли ЭК<sub>50</sub> (эффективная концентрация 50% или концентрация пептидов, при которой 50% ЛПС находится в связанном состоянии).

#### Анализ гемолитической активности пептидов

Эритроциты получали из крови здоровых доноров по стандартной методике. Из осадка эритроцитов (считали, что осадок содержит 100% суспензию клеток) получали 2.8% суспензию эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР). В анализируемые пробы вносили 27 мкл суспензии эритроцитов и 3 мкл исследуемого пептида (в разных концентрациях) в ЗФР или 3 мкл ЗФР (контроль). Пробы (по три повторности) инкубировали при 37°C в течение 30 мин, добавляли по 75 мкл охлажденного ЗФР и центрифугировали при 5000 g в течение 4 мин. Оптическую плотность супернатантов измеряли при  $\lambda = 540$  нм.

#### Оценка влияния пептидов на жизнеспособность культивируемых клеток

Жизнеспособность культивируемых клеток человека после их 20-часовой инкубации с пептидами оценивали с помощью стандартного МТТ-теста [21] согласно [12]. Культивирование клеток, выделение нейтрофилов и мононуклеарных клеток периферической

крови здоровых доноров проводили по стандартным методикам.

#### Масс-спектрометрия

Молекулярные массы выделенных пептидов определяли на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Reflect III (Bruker, Германия), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma, Германия) в 20% ацетонитриле, 0.1% ТФУ в концентрации 10 мг/мл. Указаны средние молекулярные массы.

#### Определение аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems, США). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков идентифицировали на анализаторе 120A PTH (Applied Biosystems, США).

#### Синтез мини-бактенецинов

Mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$  синтезировали с помощью твердофазного синтеза и Fmoc/tBu-стратегии на пептидном синтезаторе Syro2000 (MultiSynTech GmbH, Германия) [22]. После завершения синтеза пептиды снимали смесью 5% воды, 4% м-крезола, 5% тиоанизола и 2% этандитиола в ТФУ при комнатной температуре в течение 4 ч и осаждали охлажденным диэтиловым эфиром. Синтезированные пептиды очищали с использованием ВЭЖХ Äkta (Amersham Bioscience GmbH, Германия) на колонке Jupiter C18 (20 мм × 250 мм, Phenomenex Inc., США) в линейном градиенте ацетонитрила с 0.1% ТФУ. Молекулярные массы пептидов подтверждали с помощью MALDI-TOF-MS, чистоту – ОФ ВЭЖХ.

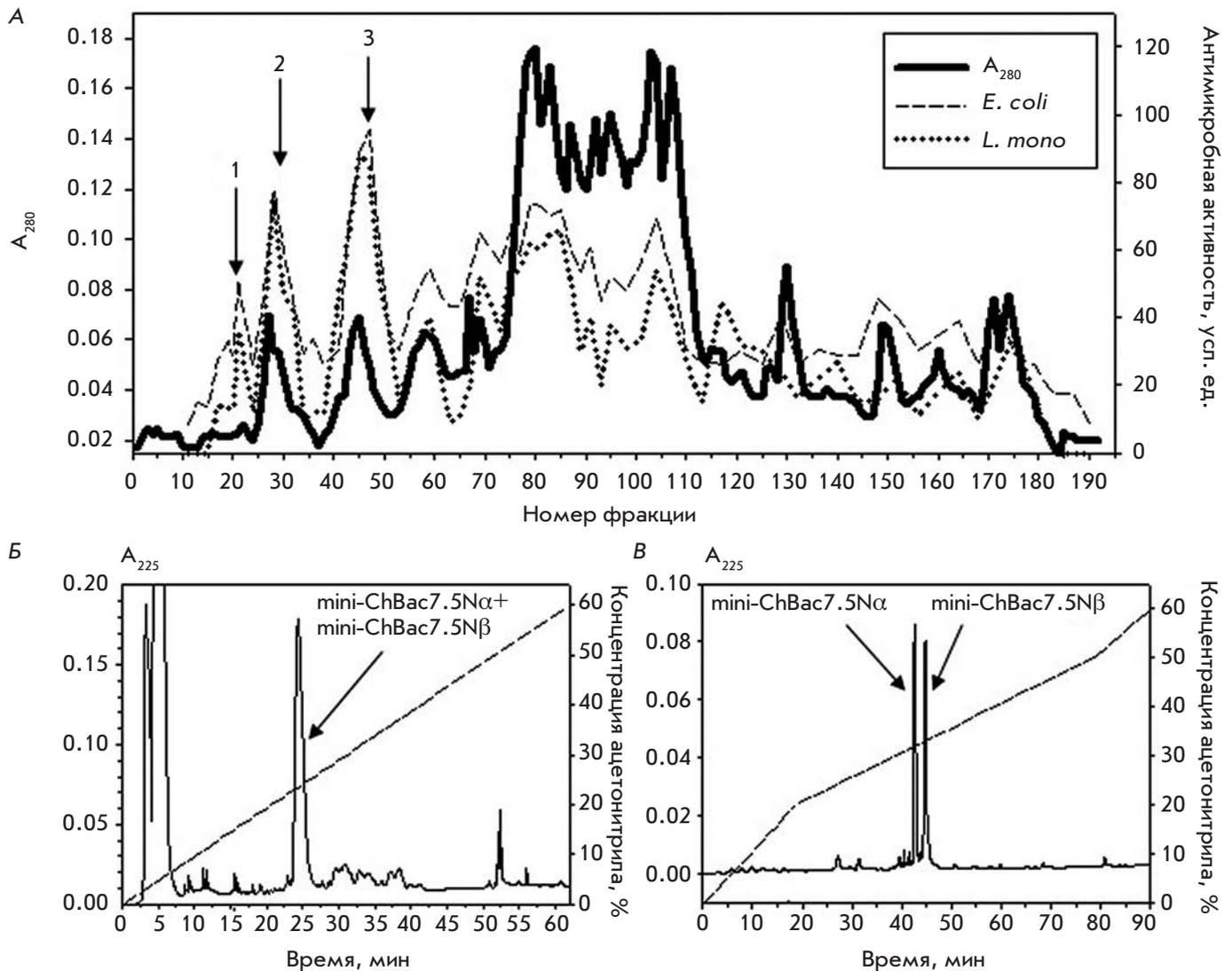
#### Статистическая обработка результатов

Статистическую значимость различий между опытными и контрольными группами при определении цитотоксической активности АМП для клеток человека оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$  в программе Prism 5 (GraphPad Software Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Выделение и очистка новых антимикробных пептидов из лейкоцитов козы

При выделении пептидов обеспечивали условия, при которых возможен процессинг предшественников кателицидинов с высвобождением зрелых АМП. Для разделения катионных пептидов, полученных



**Рис. 1.** Выделение и очистка мини-бактенецинов из экстракта лейкоцитов домашней козы. А – профиль элюции белков с электрофоретической колонки при проведении препаративного электрофореза (ПЭФ) белков из экстракта лейкоцитов козы после ультрафильтрации материала через мембрану УМ-10. Пик 1 – пептиды с молекулярными массами 2.8–6 кДа, в состав которых входили мини-бактенецины; пик 2 – ChBac3.4; пик 3 – ChBac5. Антимикробная активность белков во фракциях против *E. coli* ML35p и *Listeria monocytogenes* EGD (ось ординат – справа). Б, В – профиль элюции пептидов с колонки Yudas C-18 при проведении ОФ ВЭЖХ с использованием градиента концентраций ацетонитрила от 0 до 60% за 60 мин (с 0.1% трифторуксусной кислоты) для разделения объединенных фракций 19–24 после ПЭФ (Б) или 0–20% за 20 мин, 20–50% за 60 мин, 50–60% за 10 мин (с 0.13% гептафтормасляной кислоты) для разделения мини-бактенецинов (В). Стрелками отмечены пики, в которых выходили пептиды со средними молекулярными массами 2895.5 и 2739.3 Да – мини-бактенецины mini-ChBac7.5Nα и -β

после ультрафильтрации экстрактов лейкоцитов козы через мембрану УМ-10, использовали препаративный электрофорез. Фракции анализировали, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 280 нм, а также оценивая антимикробную активность методом радиальной диффузии (рис. 1А). Фракции 17–24 содержали компоненты с наиболь-

шей электрофоретической подвижностью по направлению к катоду – пептиды с молекулярными массами от 2.8 до 6 кДа, обладающие антимикробной активностью (пик 1), в пиках 2 и 3 – бактенецины ChBac3.4 и ChBac5 (рис. 1А).

Для получения индивидуальных пептидов, выходящих во фракциях, соответствующих пику 1, при-



Антимикробная активность мини-бактенецинов козы: минимальные ингибирующие концентрации пептидов (мкМ), установленные методом радиальной диффузии в агарозном геле (РД) и методом серийных разведений в жидкой питательной среде (СР)

Микроорганизм	mini-ChBac7.5N $\alpha$			mini-ChBac7.5N $\beta$		
	Метод РД*		Метод СР**	Метод РД*		Метод СР**
	без NaCl	100 мМ NaCl	питательный бульон***	без NaCl	100 мМ NaCl	питательный бульон***
<i>E. coli</i> ML35p	0.3 ± 0,1	1.5 ± 0.2	1	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	2
<i>E. coli</i> M17	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1.1 ± 0.4	3.7 ± 1.2	2	1.0 ± 0.3	3.2 ± 0.8	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> клинический изолят	-	-	2	-	-	2
<i>Klebsiella</i> spp. клинический изолят	-	-	4	-	-	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> клинический изолят	-	-	2	-	-	4
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2
<i>Micrococcus luteus</i> CIP A270	-	-	1	-	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i> 710A	0.7 ± 0.2	>50	> 64	0.6 ± 0.1	>50	> 64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	> 64	-	-	> 64
MRSA ATCC 33591	0.7 ± 0.2	>50	> 64	0.5 ± 0.1	>50	> 64
<i>Staphylococcus intermedius</i> клин. изолят	-	-	> 64	-	-	> 64
<i>Candida albicans</i> 820	0.3 ± 0.1	>50	64	0.3 ± 0.1	>50	> 64
<i>Candida parapsilosis</i> клинический изолят	-	-	> 64	-	-	> 64

\*Данные представлены как среднее ± среднее квадратичное отклонение ( $n = 6$ ); пептиды инкубировали с микроорганизмами – в одном случае в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4, в другом случае в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl.

\*\*Данные представлены как медианы, полученные в результате трех–пяти серий экспериментов (каждый выполняли в трех повторах).

\*\*\*Бульон Мюллера–Хинтона для бактерий, среда Сабуро для грибов.

«-» – Тест не проводили.

при повышении ионной силы среды активность АМП снижается в отношении как стафилококков, так и *C. albicans*. В случае грамотрицательных бактерий зависимость активности мини-бактенецинов от ионной силы среды менее выражена.

При изучении антимикробной активности пептидов методом серийных разведений в жидкой питательной среде (таблица) показана высокая антимикробная активность мини-бактенецинов против грамотрицательных бактерий, включая штаммы, устойчивые к ряду применяемых в клинике антибиотиков: *P. aeruginosa* (устойчивость к азтреонаму, цефтазидиму, цефотаксиму), *Klebsiella* spp. (устойчивость к тетрациклину), *A. baumannii* (устойчивость к меропенему) – МИК 2–4 мкМ. Пептиды проявляют выраженную активность в отношении грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* и *Micrococcus luteus*, однако их антибактериальное действие в отношении стафилококков, а также представителей рода *Candida* практически не выявляется в диапазоне концентраций от 1 до 64 мкМ.

### Влияние АМП на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML35p для хромогенных маркеров

Одна из важнейших задач изучения функциональных свойств АМП – обнаружение основной мишени их антимикробного действия. У большинства АМП это бактериальные мембраны – пептиды вызывают их быструю и необратимую дезинтеграцию. Однако некоторые АМП, в том числе ПБ-АМП, преимущественно нарушают внутриклеточные процессы в бактериальных клетках и повреждают их мембраны лишь в концентрациях, значительно превышающих МИК [25]. Нами изучено влияние мини-бактенецинов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35p. На рис. 3 представлена кинетика действия mini-ChBac7.5N $\alpha$  в концентрации 0.6–20 мкМ на мембраны *E. coli* ML35p. В качестве пептида сравнения использовали бактенецин козы ChBac3.4 (5 мкМ, что в 2 раза выше МИК), а положительным контролем служил мембраноактивный пептид протегрин 1 (PG-1) свиньи. Проницаемость наружной мембраны бактерии для хромогенного

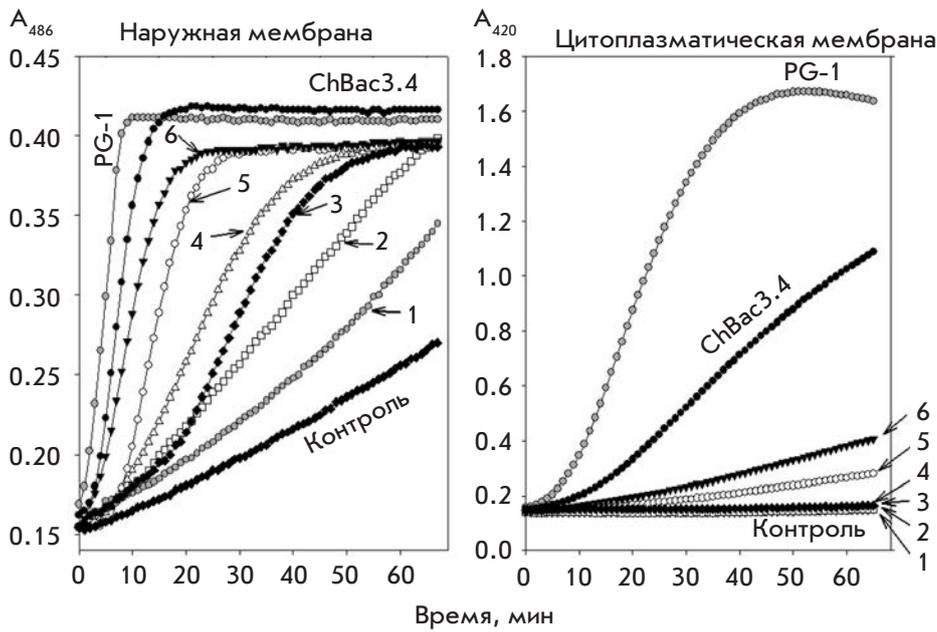


Рис. 3. Кинетика изменения проницаемости наружной (левая панель) и цитоплазматической (правая панель) мембран *E. coli* ML35r для хромогенных маркеров при действии мини-бактенецина mini-ChBac7.5N $\alpha$  в различных концентрациях (мкМ): 1 – 0.6; 2 – 1.2; 3 – 2.5; 4 – 5; 5 – 10; 6 – 20. По оси ординат – время инкубации пептидов с бактерией; по оси абсцисс – оптическая плотность раствора, содержащего продукты гидролиза хромогенных субстратов. В качестве пептида сравнения использовали бактенецин козы ChBac3.4 (5 мкМ), а положительного контроля – протегрин 1 (PG-1 – 2.5 мкМ)

маркера повышается при действии мини-бактенецина практически во всем исследуемом диапазоне концентраций, хотя в случае PG-1 (2.5 мкМ, что в 2 раза выше МИК) эффект более выражен. Однако пептид лейкоцитов козы не оказывает существенного воздействия на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* для маркерной молекулы. Лишь при высоких концентрациях пептида (10 и 20 мкМ), значительно превышающих МИК (1–2 мкМ), данные несколько отличаются от значений в контроле, где отсутствовали АМП. Эффект ChBac3.4, в отличие от мини-бактенецина, проявляется уже в концентрации, в 2 раза превышающей МИК. Для второго мини-бактенецина и mini-ChBac7.5N $\alpha$  результаты практически не отличались (данные не приведены). Полученные данные позволяют заключить, что бактериальные мембраны не являются основной мишенью изучаемых нами мини-бактенецинов, как и других известных ПБ-АМП. Вероятно, подобно фрагментам Bac7 быка и OaBac7.5 овцы они могут связываться с шапероном DnaK и модулировать его АТР-азную активность, нарушая процесс белкового фолдинга в клетке [25, 26], или взаимодействовать с 70S рибосомами, нарушая процесс трансляции, как показано для апидецинов, онкоцинов, фрагмента 1–35 Bac7 быка [27, 28]. Как и фрагменты 1–35 Bac7 быка, которые воздействовали на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML35r в концентрациях, в несколько раз превышающих МИК [24], мини-бактенецины влияют на проницаемость внутренней мембраны этой бактерии лишь в концентрациях, в 10–20 раз превышающих МИК.

#### Липополисахаридсвязывающая активность мини-бактенецинов козы

Связывание с липополисахаридом (ЛПС) – компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий – одно из важных свойств АМП, так как от характера этого связывания во многом зависит и последующая эффективность антимикробного действия пептидов. При разработке лекарственных препаратов на основе АМП большое внимание наряду с антимикробными свойствами уделяют и ЛПС-связывающей (нейтрализующей) активности, учитывая важность получения соединения, которое может способствовать не только инактивации патогенных микроорганизмов, но и предотвращать или устранять последствия септического шока, вызываемого грамотрицательными бактериями, – серьезного осложнения инфекционных заболеваний, часто приводящего к смертельному исходу. В последнее время опубликовано большое количество работ, в которых комплексно анализируется зависимость особенностей структуры пептидов – прототипов лекарственных средств от их антимикробного действия, селективности по отношению к прокариотическим клеткам и ЛПС-нейтрализующим свойствам. Показано, что ЛПС-нейтрализующая активность пептида зависит от соотношения гидрофобности/величины суммарного положительного заряда его молекулы [29]. Путем определения эффективной концентрации, при которой 50% ЛПС (ЛПС *E. coli* O111:B4) находится в связанном с пептидом состоянии [20], нами оценена ЛПС-связывающая активность мини-бактенецинов. Для сравнения приведены

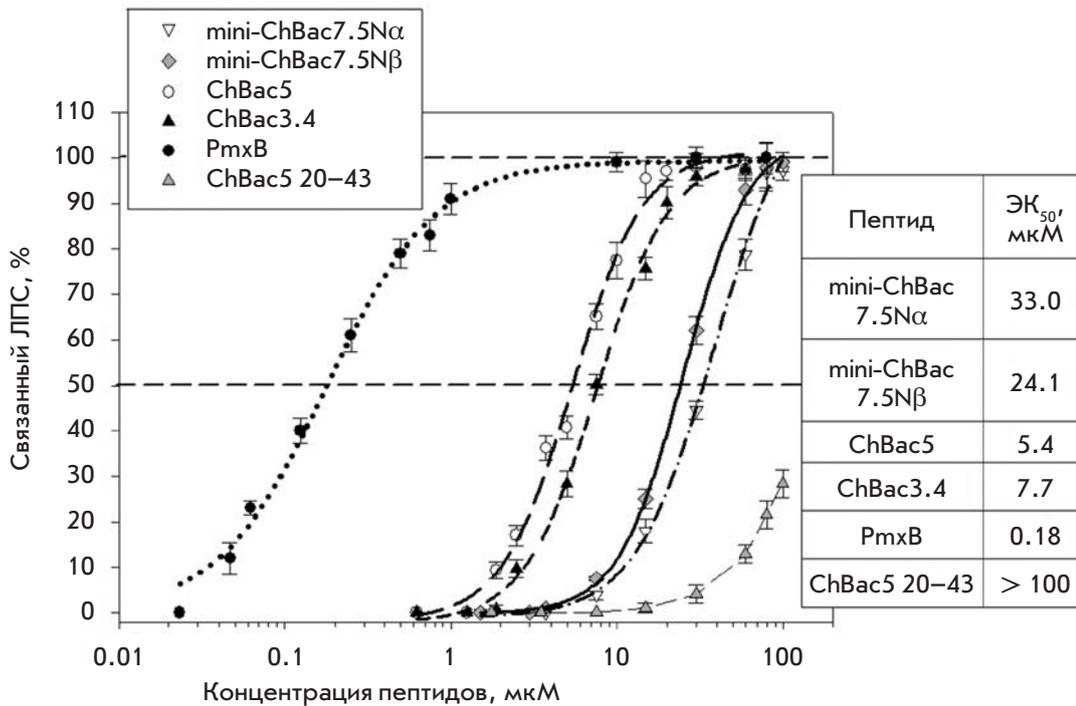


Рис. 4. Связывание липополисахарида мини-бактенецинами в сравнении с бактенецинами козы ChBac3.4 и ChBac5 и фрагментом ChBac5 20–43, обладающим низкой антимикробной активностью. Положительный контроль – полимиксин В (PmxB). Приведены средние значения ± среднеквадратичное отклонение,  $n = 6$ . В таблице указаны ЭК<sub>50</sub> пептидов

данные, полученные для других АМП лейкоцитов козы – бактенецинов ChBac3.4, ChBac5 и пептида с низкой антимикробной активностью – химически синтезированного С-концевого участка (аминокислотные остатки 20–43) бактенецина ChBac5 (ChBac5 20–43). Положительным контролем служил полимиксин В, известный как соединение, обладающее высокой аффинностью к ЛПС (рис. 4). Мини-бактенецины характеризуются значительно более высокими показателями рассматриваемого вида активности по сравнению с ChBac5 20–43, хотя и несколько уступают бактенецинам ChBac3.4 и ChBac5, что может объясняться большим суммарным положительным зарядом молекул мини-бактенецинов и меньшей их гидрофобностью по сравнению с ChBac3.4 и ChBac5 (рис. 4). Mini-ChBac7.5Nα содержит 12 остатков аргинина и лишь два остатка лейцина (mini-ChBac7.5Nβ – 11 остатков аргинина и два лейцина). Кроме того, мини-бактенецины не содержат остатков ароматических аминокислот, присутствие которых (в особенности остатка триптофана), как полагают, обуславливает повышенную ЛПС-нейтрализующую активность [30]. ChBac3.4 и ChBac5, напротив, содержат относительно большое количество остатков ароматических аминокислот, главным образом, фенилаланина. Полученные данные предоставляют информацию для анализа закономерностей проявления различных видов биологической активности АМП, а также указывают на возможность разработки антибиотических препаратов на основе мини-бактенецинов путем

создания их аналогов, содержащих большее количество остатков гидрофобных аминокислот, в частности триптофана.

#### Действие мини-бактенецинов на клетки млекопитающих

Как известно, большинство ПБ-АМП не обладает выраженной токсичностью для клеток млекопитающих [25]. Оценка гемолитической активности мини-бактенецинов в отношении эритроцитов человека показала, что в концентрации 1–100 мкМ оба пептида не оказывают выраженного действия на эритроциты. Показатели проб, содержащих пептиды в этих концентрациях, не отличались статистически значимо от показателей в контрольных пробах, не содержащих АМП ( $p > 0.05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента,  $n = 9$ ).

С применением МТТ-теста определено действие мини-бактенецинов в концентрации 1–30 мкМ на клетки человека. Установлено, что пептиды обладают низкой цитотоксической активностью в отношении различных типов культивируемых клеток человека, а именно, клеток эритромиелоидного лейкоза К-562, гистиоцитарной лимфомы U-937, промиелоцитарного лейкоза HL-60, эпителиоидной карциномы легкого А-549, эпидермоидной карциномы А-431, остеосаркомы человека MG-63, а также нормальных фибробластов кожи человека, фибробластов легкого эмбриона человека MRC-5, нейтрофилов и мононуклеарных клеток периферической крови человека. Показатели цитотоксичности, полученные после

24 ч инкубации с пептидами, не отличались значимо от величин, рассчитанных для контрольных проб, не содержащих пептиды, во всем диапазоне концентраций – 1–30 мкМ ( $p > 0.05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента,  $n = 9$ ). Эти данные свидетельствуют об избирательности действия мини-бактенецинов козы в отношении микробных клеток, что согласуется с наблюдениями, в которых установлена низкая токсичность N-концевых фрагментов 1–16, 1–23, 1–35 Vac7 быка для клеток млекопитающих [24].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из лейкоцитов домашней козы *C. hircus* нами выделены два антимикробных пептида, названных мини-бактенецинами mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$ , которые являются N-концевыми фрагментами пептида ChVac7.5, впервые полученными из клеток крови. Из лейкоцитов овцы ранее были выделены несколько фрагментов бактенецинов – OaVac11, OaVac5, OaVac7.5 [2]. С-Концевой фрагмент (32–60), выделенный Андерсон и соавт. [2] и названный OaVac7.5mini, имел относительно низкую антимикробную активность [31] по сравнению с активностью N-концевых фрагментов бактенецина 7.5 козы. Мини-бактенецины козы имеют структурное сходство и с N-концевой частью Vac7 быка [5] (рис. 2). Для проявления антимикробной активности Vac7 быка необходим именно N-концевой участок молекулы (не менее 16 аминокислотных остатков) [24], по длине примерно соответствующий выделенным нами пептидам. С-Концевые фрагменты Vac7 быка имели низкую антимикробную активность [24]. В молекулах бактенецинов 7.5 козы и овцы, а также бактенецина 7 быка N-концевые участки имеют высокое структурное сходство, в то время как С-концевые области значительно различаются. Обнаружение фрагментов бактенецинов 7.5 овцы [2] и мини-бактенецинов козы позволяет предположить, что именно после фрагментации образовавшиеся пептиды и выполняют основные защитные функции: N-концевые производные – антимикробную, а С-концевые, возможно, играют другую роль, которая еще до конца не выяснена.

Предположение о важности фрагментации зрелых форм АМП, в том числе и для регуляции их биологических эффектов в ходе развития инфекционного процесса, было выдвинуто при изучении протеолитического расщепления кателицидина LL-37 человека. В результате расщепления этого пептида образуются фрагменты, часть из которых обладает более выраженной антимикробной активностью, чем полноразмерный LL-37 [1, 32]. Однако установлено, что при высокой антимикробной активности иммуномодулирующая активность этих пептидов

снижена по сравнению с полноразмерным кателицидином [32]. Характер фрагментации кателицидина зависит от многих факторов, но в наибольшей степени – от активности протеаз, осуществляющих его процессинг, и от активности их ингибиторов [1]. Эти факторы, в свою очередь, зависят от параметров, определяемых микроокружением, которое может изменяться в ходе инфекционного или других патологических процессов. Поэтому фрагментация кателицидина человека может рассматриваться как один из механизмов тонкой и многогранной регуляции функциональной активности АМП. С другой стороны, на основании изучения биологической активности фрагментов этого пептида разрабатываются разнообразные антибактериальные, а также и противоопухолевые пептидные препараты – производные LL-37, которые рассматриваются как перспективные прототипы новых лекарственных средств.

Фрагментации подвергаются и другие антимикробные полипептиды, при расщеплении которых образуются их укороченные варианты с выраженной бактерицидной активностью. Например, при процессинге лактоферрина, компонента специфических гранул нейтрофилов, образуется антимикробный пептид лактоферрицин, который рассматривается как соединение, играющее самостоятельную биологическую роль в осуществлении защитных функций нейтрофилов [33]. Из лейкоцитов и кожных покровов ряда рыб и амфибий получены фрагменты гистонов, обладающие антимикробной активностью и, как предполагается, выполняющие защитные функции [34, 35].

Представляют интерес ферменты, которые могут осуществлять подобный процессинг ПБ-АМП, в частности бактенецина 7.5 козы. Можно предположить, что в этом процессе принимают участие несколько различных протеаз, а расщепление, возможно, включает несколько стадий. В случае mini-ChVac7.5N $\beta$  одним из таких ферментов может быть пролилэндопептидаза (PREP [КФ 3.4.21.26]) или пролилкарбоксипептидаза (PRCP [КФ 3.4.16.2]), расщепляющие пептидную связь между остатками пролина и аргинина (в молекуле ChVac7.5 – между остатками пролина 21 и аргинина 22). Эти протеазы присутствуют в нейтрофильных гранулоцитах и, как показано, играют немаловажную роль в реакциях воспалительного процесса [36]. Дальнейшее исследование с использованием ингибиторов протеаз различного типа позволит пролить свет на этот вопрос.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение из лейкоцитов домашней козы высокоактивных антимикробных пептидов, названных нами мини-бактенецинами mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-

ChVac7.5Nβ и представляющих собой N-концевые фрагменты бактенецина 7.5, свидетельствует в пользу представления о важности фрагментации антимикробных пептидов врожденного иммунитета – одного из факторов, необходимых для реализации и регуляции защитных реакций при развитии инфекционного или воспалительного процессов. Показано, что минибактенецины проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамотрицательных бактерий, включая антибиотикоустойчивые штаммы, обладают липополисахаридсвязывающей активностью, не проявляют токсичности по отношению к культивируемым клеткам человека. Все это свидетельствует

о перспективности дальнейшего исследования антимикробной активности этих соединений на большем числе микроорганизмов и изучения возможности разработки на их основе новых антибактериальных терапевтических препаратов. ●

*Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0104). Уникальный идентификатор RFMEFI60414X0104.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamasaki K., Schaubert J., Coda A., Lin H., Dorschner R., Schechter N., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Gallo R.L. // *FASEB J.* 2006. V. 20. № 12. P. 2068–2080.
2. Anderson R., Yu P.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 312. P. 1139–1146
3. Kokryakov V.N., Harwig S.S., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // *FEBS Lett.* 1993. V. 327. P. 231–236.
4. Agerbert B., Lee J.Y., Bergman T., Carlquist M., Boman H.G., Mutt V., Jörnvald H. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 202. P. 849–854.
5. Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. // *Infect. Immun.* 1989. V. 57. P. 3142–3146.
6. Skerlavaj B., Gennaro R., Bagella L., Merluzzi L., Risso A., Zanetti M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 28375–28381.
7. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 9573–9575.
8. Selsted M., Novotny M., Morris W., Tang Y., Smith W., Cullor J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 7. P. 4292–4295.
9. Huttner K.M., Lambeth M., Burkin H., Burkin D., Broad T. // *Gene.* 1998. V. 206. P. 85–91.
10. Zhao C., Nguen T., Liu L., Shamova O., Brogden K.A., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 11. P. 6221–6224.
11. Shamova O., Brogden K.A., Zhao C., Nguen T., Turner J., Kokryakov V., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 8. P. 4106–4111.
12. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., Kokryakov V., Lehrer R.I. // *Int. J. Pept. Res. Therap.* 2009. V. 15. № 1. P. 31–42.
13. Harwig S.S., Chen N.P., Park A.S.K., Lehrer R.I. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 382–386.
14. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
15. Wolf P. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 129. Pt. 1. P. 145–155.
16. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. V. 137. № 2. P. 167–173.
17. Tossi A., Scocchi M., Zanetti M., Genaro R., Storici P., Romeo D. In *Antibacterial peptide protocols / Ed. Shafer W. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1998. P. 133–151.*
18. Lehrer R.I., Barton A., Ganz T. // *J. Immunol. Meth.* 1988. V. 108. P. 153–158.
19. Артамонов А.Ю., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Орлов Д.С. // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3: Биология.* 2008. № 2. С. 139–142.
20. Zhao C., Nguyen T., Boo L., Hong T., Espiritu C., Orlov D., Wang W., Waring A., Lehrer R.I. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 10. P. 2695–2702.
21. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55–63.
22. Singer D., Lehmann J., Hanisch K., Härtig W., Hoffmann R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 346. P. 819–828.
23. Zhao C., Nguyen T., Brogden K., Lehrer R. // *EMBL/GenBank/DDBJ databases.* 1999.
24. Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M. // *Curr. Pharmaceut. Design.* 2002. V. 8. P. 763–778.
25. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 68. P. 2317–2330.
26. Zahn M., Kieslich B., Berthold N., Knappe D., Hoffmann R., Sträter N. // *Protein Pept Lett.* 2014. V. 21. № 4. P. 407–412.
27. Krizsan A., Volke D., Weinert S., Sträter N., Knappe D., Hoffmann R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 45. P. 12236–12239.
28. Mardirossian M., Grzela R., Giglione C., Meinel T., Gennaro R., Mergaert P., Scocchi M. // *Chem. Biol.* 2014. V. 21. № 12. P. 1639–1647.
29. Rosenfeld Y., Lev N., Shai Y. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 853–861.
30. Nan Y., Bang J., Jacob B., Park I., Shin S. // *Peptides.* 2012. V. 35. № 2. P. 239–247.
31. Anderson R.C., Hancock R.E.W., Yu P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. № 2. P. 673–676.
32. Braff M., Hawkins M., Di Nardo A., Lopez-Garcia B., Howell M., Wong C., Lin K., Streib J., Dorschner R., Leung D., et al. // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 4271–4278.
33. Gifford J., Hunter H., Vogel H. // *Cell Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. № 22. P. 2588–2598.
34. Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 258–262.
35. Shamova O.V., Orlov D.S., Balandin S.V., Shramova E.I., Tsvetkova E.V., Panteleev P.V., Leonova Yu.F., Tagaev A.A., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4 (23). P. 99–109.
36. Waumans Y., Baerts L., Kehoe K., Lambeir A., De Meester I. // *Front. Immunol.* 2015. V. 7. № 6. 387. doi: 10.3389/fimmu.2015.00387.