

УДК 577.112, 577.181

Аципенсины – новые антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*

О. В. Шамова^{1,3}, Д. С. Орлов^{1,3}, С. В. Баландин^{2,4}, Е. И. Шрамова², Е. В. Цветкова³,
П. В. Пантелеев², Ю. Ф. Леонова², А. А. Тагаев², В. Н. Кокряков^{1,3}, Т. В. Овчинникова^{2,4*}

¹НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12

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

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7–9

⁴Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700,
Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 11.10.2014

РЕФЕРАТ Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшими компонентами системы врожденного иммунитета человека и животных. Охарактеризован ряд АМП, выделенных нами из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* – представителя подкласса хрящевых ганоидов, формирующих наиболее древнюю группу костных рыб. Структурный анализ пептидов, названных аципенсинами (Ас), показал, что лейкоциты осетра содержат шесть пептидов с молекулярными массами 5336.2, 3803.0, 5173.0, 4777.5 и 5449.4 и 2740.2 Да, обозначенных Ас1–Ас6 соответственно. Нами определены полные первичные структуры всех выделенных пептидов и исследована биологическая активность трех главных компонентов – Ас1, Ас2 и Ас6. Установлено, что Ас1, Ас2, Ас3, Ас4 и Ас5 представляют собой N-концевые ацетилированные фрагменты 1–50, 1–35, 1–49, 1–44 и 1–51 гистона H2A соответственно, а Ас6 является фрагментом 62–85 гистона H2A. Выделенные из лейкоцитов пептиды Ас1 и Ас2 обладают высокой антимикробной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (*Escherichia coli* ML-35p, *Listeria monocytogenes* EGD, MRSA ATCC 33591), а также гриба *Candida albicans* 820. Ас6 активен только в отношении грамотрицательной бактерии. Активность Ас1 и Ас2 в отношении гриба и MRSA снижалась при повышении ионной силы раствора. В концентрациях, близких к минимальным ингибирующим, Ас1, Ас2 и Ас6 увеличивали проницаемость наружной мембраны *E. coli* ML-35p для хромогенного маркера, но их влияние на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии не было существенным по сравнению с действием мембраноактивного пептида протегрина 1. Все три аципенсина не проявляли гемолитической активности в отношении эритроцитов человека в диапазоне концентраций от 1 до 40 мкМ и не оказывали цитотоксических эффектов на клетки K-562 и U-937 (1–20 мкМ) *in vitro*. Обнаружение в лейкоцитах осетра антимикробных пептидов, производных гистона H2A, свидетельствует в пользу предположения о биологически значимой роли гистонов и их фрагментов в обеспечении противоиной защиты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, аципенсины, врожденный иммунитет, лейкоциты осетра, производные гистона H2A.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; ЗФР – забуференный физиологический раствор; КОЕ – колониеобразующие единицы; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТГС – триптический гидролизат сои; трис – трис(гидроксиметил)аминометан; ТФУ – трифторуксусная кислота; EDTA – этилендиаминтетраацетат натрия; ЭФ – электрофорез; Ас – аципенсин; HNP (human neutrophil peptide) – пептид нейтрофилов человека (α -дефенсин); MALDI-TOF-MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбционной ионизацией; MRSA – метициллинустойчивый золотистый стафилококк; ONPG – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид; PG-1 – протегрин 1; SDS – додецилсульфат натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета играют важную роль в противомикробной защите человека и животных [1]. Особое место эти молекулярные факторы врожденного иммунитета занимают в обеспечении защитных функций у низших позвоночных (рыб, амфибий), так как система адаптивного иммунитета у пойкилотермных животных не может обеспечить формирование достаточно быстрого и эффективного ответа (антителообразование) на инфекцию при низкой температуре окружающей среды. Поэтому изучение антимикробных пептидов фагоцитов и слизистых покровов рыб представляется важным в связи с обоснованием биологической роли этой группы физиологически активных веществ в противомикробном иммунитете.

К настоящему времени описаны АМП (дефензины, кателицидины и др.) фагоцитов и барьерного эпителия различных представителей млекопитающих, птиц и амфибий. Сведения об АМП рыб пока весьма немногочисленны и в основном связаны с изучением этих соединений, выделенных из слизи, кожи, жабр, почек, селезенки и желудочно-кишечного тракта [2]. Так, из слизи камбалы *Pleuronectes americanus* были выделены плеуроцидины [3, 4] – группа линейных антимикробных пептидов, имеющих конформацию α -спирали и положительный заряд молекулы. Из слизистых покровов камбалы другого вида – *Pardachirus marmoratus* – был получен пептид, названный пардаксином [5]. Из жабр гибрида полосатого окуня выделен пептид хепцидин, содержащий четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика [6]. Позднее хепцидины были обнаружены и у других рыб. Из слизи кожных покровов амурского вьюна *Misgurnus anguillicaudatus* [7] был получен антимикробный пептид мисгурин, обладающий микробцидной активностью широкого спектра действия.

Пептиды семейства α -дефенсинов у рыб пока не обнаружены. Однако в последнее время появляются данные о β -дефенсидах костистых рыб: подобные пептиды найдены в эпителиальных клетках пищеварительного тракта, жабрах, селезенке китайского окуня *Siniperca chuatsi* [8], печени оранжевопятнистого групера *Epinephelus coioides* [9], в коже и жабрах карпа *Cyprinus carpio* L. [10]. Пептиды кателицидинового семейства обнаружены у радужной форели и других представителей лососевых, трески [11–15].

В коже и слизистых некоторых рыб выявлены пептиды, представляющие собой производные гистонов. Так, из слизистых покровов белокорого палтуса (*Hippoglossus hippoglossus* L.) и амурского сома *Parasilurus asotus* выделены антимикробные пепти-

ды, названные хиппосином [16] и паразином 1 [17] соответственно, которые являются N-концевыми частями гистона H2A. Из печени семги *Salmo salar* был выделен антимикробный белок (SAM) с молекулярной массой 20734 Да, оказавшийся гистоном H1 [18].

Таким образом, к настоящему времени описан ряд антимикробных пептидов, выделенных из слизистых, кожи, пищеварительного тракта, жабр, селезенки и печени рыб. Однако практически отсутствуют данные об АМП из лейкоцитов крови рыб. Поэтому цель нашей работы состояла в изучении структурных свойств и биологической активности антимикробных пептидов из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* – представителя подкласса хрящевых ганоидов (Chondrostei), древнейшей группы костных рыб (Osteichthyes).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленабис-акриламид (Sigma, США), мочевины, хлорид натрия, трис(гидроксиметил)аминометан, МТТ (3-[4,5-диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид), агарозу, триптический гидролизат сои, трифторуксусную и гептафтормасляную кислоты, о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид фирмы Sigma (США); уксусную кислоту фирмы «Вектон» (Россия); среды и сыворотки для культур клеток фирмы «Биолот» (Россия); среду Сабуро НИЦФ (Россия); ферменты и буферы для ПЦР и геномной инженерии производства Thermo Fisher Scientific (США). В качестве стандартов были использованы антимикробные пептиды: химически синтезированный протегрин 1, любезно предоставленный профессором Робертом Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США), дефенсин человека HNP-1 и бактенецин 5, выделенные нами из лейкоцитов крови человека и козы соответственно, с использованием методики, описанной ранее [19].

Выделение и очистка антимикробных пептидов из лейкоцитов русского осетра

Кровь осетров *A. gueldenstaedtii*, отловленных в дельте Волги (Александровский осетровый завод), стабилизировали гепарином и оставляли на 6 ч в сосудах для расслаивания, после чего лейкоцитарную пленку (buffy coat) отбирали пипеткой и промывали дважды физиологическим раствором с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 400 g. Полученный осадок гомогенизировали. Экстракцию белков из лейкоцитарной массы проводили в 20% уксусной кислоте в течение 20 ч при 4°C при перемешивании на магнитной мешалке. Затем

гомогенат центрифугировали при 15000 *g* в течение 1 ч. Супернатант отбирали и подвергали ультрафильтрации через мембрану YM-10 на установке фирмы Amicon (США). Полученный материал, содержащий пептиды и низкомолекулярные белки с молекулярными массами менее 10–12 кДа, концентрировали с помощью ультрафильтрации через мембрану YM-0.5 до 1 мл и наносили на электрофоретическую колонку (предварительно добавив в пробу мочевины до концентрации 3 М) для разделения белков с помощью препаративного электрофореза (ЭФ). Препаративный ЭФ при непрерывной элюции белков проводили в 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой буферной системе в присутствии мочевины [20] в аппарате фирмы Bio-Rad (США). Элюированные с колонки белковые фракции анализировали с помощью аналитического ЭФ в присутствии додецилсульфата натрия [21], который проводили в пластинах ПААГ на приборе фирмы Hoeffer (США). Измеряли оптическую плотность раствора в каждой фракции при длине волны 280 нм, определяли антимикробную активность. Фракции, обладающие антимикробной активностью, 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; 10 × 250 мм; диаметр частиц сорбента 5 мкм), элюируя пептиды в градиенте концентраций ацетонитрила с использованием различных противоионов (0.1% трифторуксусная кислота или 0.13% гептафтормасляная кислота). Полученные после проведения ОФ ВЭЖХ фракции высушивали с помощью центрифугирования под вакуумом на установке SpeedVac (Savant, США). Оценку чистоты проводили с помощью аналитического ЭФ, масс-спектрометрии MALDI-TOF, а также аналитической ОФ ВЭЖХ. Концентрацию белка в экстрактах из лейкоцитов осетров и в очищенных пептидных препаратах определяли по методу Брэдфорд, а также по методу Вольфа с использованием следующей формулы: концентрация пептида (мкг/мл) = $(A_{215} - A_{225}) \times 144$ [22].

Оценка антимикробной активности пептидов методом радиальной диффузии в агарозных гелях

Антибиотическое действие пептидов, выделенных из лейкоцитов, определяли по методу, предложенному Лерером и соавт. [23]. Определяли антимикробную активность препаратов в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также одного из грибов. Использовали следующие штаммы бактерий: грамотрицательная бактерия *Escherichia*

coli ML-35p, грамположительные бактерии: *Listeria monocytogenes* EGD, MRSA ATCC 33591 (золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину), гриб *Candida albicans* 820. Бактерии выращивали на твердой среде, содержащей 3% триптический гидролизат сои (Sigma, США); грибы – на среде, содержащей 3% Сабуро. При культивировании *E. coli* ML-35p в среду добавляли 100 мкг/мл ампициллина, а MRSA ATCC 33591 – 6 мкг/мл оксациллина. Штаммы микроорганизмов были любезно предоставлены профессором Робертом Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США).

Микроорганизмы культивировали в течение 16–18 ч в среде, содержащей 3% раствор триптического гидролизата сои (ТГС) при 37°C. Из полученной культуры отбирали аликвоты суспензии бактерий, переносили в свежеприготовленные 3% растворы ТГС и инкубировали при 37°C в течение 2.5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в логарифмической фазе роста. В экспериментах с грибом *C. albicans* использовали ночную культуру. Суспензии микроорганизмов далее центрифугировали при 400 *g* в течение 10 мин, осадок дважды промывали в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4 (НФБ), и ресуспендировали в 3 мл того же буфера. Для приготовления агарозных гелей, содержащих микроорганизмы, рассчитывали объем суспензии, в котором имеется 4×10^6 клеток [23]. Количество бактериальных клеток оценивали, измеряя оптическую плотность суспензий при длине волны 620 нм (принимали, что величина оптической плотности 0.2 соответствует 5×10^7 КОЕ/мл). Для грибов использовали другую формулу: величина оптической плотности при длине волны 450 нм, равная 1, соответствует 2.86×10^7 КОЕ/мл [23]. Рассчитанное количество суспензии микроорганизмов добавляли к 8 мл стерильного 1% раствора агарозы в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.4 (в ряде экспериментов добавляли 100 мМ NaCl), при температуре 43°C. Полученную смесь выливали в стерильную пластиковую чашку Петри диаметром 90 мм, где смесь застывала с образованием агарозного геля. В агарозных гелях прокалывали отверстия диаметром 2 мм. В лунки вносили анализируемые образцы – серийные (двукратные) разведения пептидов в 0.01% водном растворе уксусной кислоты (контроль – 0.01% уксусная кислота без пептидов), и инкубировали в течение 3 ч при 37°C. За время инкубации пептиды диффундировали из лунок в агарозные гели. По окончании инкубации на поверхность агарозного геля наносили 1% раствор агарозы, содержащий 6% триптический гидролизат сои. Затем чашки инкубировали еще в течение 20 ч при 37°C. Для количественной оценки антибиотического действия пептидов измеряли диаметр зоны

ингибирования роста микробов вокруг лунок, принимая за 1 единицу 0.1 мм, и вычитали из измеренного значения 20 единиц, соответствующих диаметру лунки. Для каждого пептида определяли минимальную концентрацию, ингибирующую рост микробов (МИК), для чего строили графики зависимости антимикробной активности пептидов от их концентрации. За МИК принимали значение, полученное для точки пересечения графика линейной регрессии каждого пептида с осью абсцисс (концентрация пептидов в мкМ). В каждом эксперименте использовали по две параллельных пробы. Эксперименты повторяли 3 раза, рассчитывали среднее арифметическое полученных величин МИК \pm среднеквадратичное отклонение.

Оценка влияния пептидов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML-35p

Используемый в данном методе штамм *E. coli* ML-35p отличается отсутствием пермеазы лактозы (фермента, осуществляющего транспорт лактозы в клетку), причем синтез β -галактозидазы в цитоплазме этой бактерии не индуцибельный, как у большинства бактерий, а конститутивный. Кроме того, в периплазматическом пространстве *E. coli* ML-35p присутствует фермент β -лактамаза [24]. О состоянии цитоплазматической и наружной мембран *E. coli* ML-35p судили по ее проницаемости для хромогенных маркеров – *o*-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозида (ONPG) и нитроцефина – субстратов β -галактозидазы и β -лактамазы соответственно. Описанную ранее методику использовали в модификации [25]. При наличии в среде, окружающей бактерию, субстратов β -галактозидазы или β -лактамазы ферментативная реакция с участием этих субстратов может происходить только в том случае, если они способны проникать через бактериальные мембраны. Если под действием какого-либо повреждающего агента, например антимикуробного пептида, наружная и цитоплазматическая мембраны бактерии становятся проницаемыми для субстратов, то хромогенные продукты их гидролиза внутриклеточными ферментами выходят в инкубационную среду. Оптическая плотность среды при длине волны 496 или 420 нм (максимум поглощения хромогенных продуктов гидролиза нитроцефина или ONPG соответственно) увеличивается, что позволяет наблюдать за процессом повреждения наружной и цитоплазматической мембран бактерии под действием антимикуробного агента в режиме реального времени. Состав проб (100 мкл): 2.5 мМ ONPG или 20 мкМ нитроцефина; 2.5×10^7 КОЕ/мл бактерии; 0.01 М Na-фосфатный буфер pH 7.4; 0.03% ТГС; пептиды в concentra-

ции, равной их минимальной ингибирующей концентрации в данных условиях и измеренной с помощью стандартного метода подсчета колоний. Контрольные пробы содержали вместо препаратов равные объемы растворителя (0.01% уксусная кислота). Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность раствора при 496 и 420 нм с помощью спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США) при температуре 37°C и периодическом встряхивании планшетов в течение 2 ч. Данные обрабатывали в программе Sigma Plot 11. На графиках представлены результаты типичного эксперимента, каждая точка является средним арифметическим из двух значений, полученных для параллельных проб. Эксперименты повторяли 3 раза, характер кривых был аналогичным во всех трех сериях.

Анализ гемолитической активности пептидов

Кровь здоровых доноров собирали в пластиковые пробирки, используя гепарин в качестве антикоагулянта, центрифугировали в течение 10 мин при 250 *g* с охлаждением до 4°C. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 10 мл охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР) pH 7.4 с 4 мМ EDTA и центрифугировали в течение 10 мин при 250 *g* с охлаждением 4°C. Осадок промывали ЗФР 3 раза, проводя центрифугирование, как описано выше. Из осадка эритроцитов (условно принималось, что в осадке 100% содержание эритроцитов) отбирали 280 мкл, доводили объем суспензии до 10 мл охлажденным ЗФР, получая 2.8% суспензию. В анализируемые пробы вносили 27 мкл суспензии эритроцитов и 3 мкл исследуемого пептида в ЗФР в разных концентрациях. Для получения положительного контроля (100% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл детергента (10% раствор Тритон X-100). Для получения негативного контроля (0% лизис эритроцитов) к 27 мкл раствора эритроцитов добавляли 3 мкл ЗФР. Пробы в трех параллелях инкубировали при 37°C в течение 30 мин, реакцию останавливали добавлением 75 мкл охлажденного ЗФР. Пробы центрифугировали при 5000 *g* при 4°C в течение 4 мин, супернатант отбирали и вносили в ячейки 96-луночного планшета (Corning, США). Оптическую плотность проб при длине волны 540 нм измеряли на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Показатели гемолиза эритроцитов рассчитывали в процентах по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{\text{OD}_{540}(\text{образца}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})}{\text{OD}_{540}(100\% \text{ лизис}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})} \times 100\%.$$

МТТ-тест

Влияние пептидов на жизнеспособность клеток исследовали с помощью МТТ-теста [26]. Этот тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид – МТТ-реагента или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид – до голубого кристаллического формазана. В экспериментах использовали культивируемые клетки линий К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека) и U-937 (клетки гистиоцитарной лимфомы человека). Клеточные суспензии вносили в лунки 96-луночных планшетов (Orange Scientific, Бельгия) в среде RPMI 1640, по 20000 клеток на лунку, к клеткам добавляли по 10 мкл раствора пептида (в среде RPMI 1640) различной концентрации в четырех параллелях. В контрольные пробы вместо пептидов добавляли по 10 мкл среды. Планшеты далее помещали в CO₂-инкубатор на 20 ч. За 3 ч до окончания срока инкубации в лунки планшетов добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в ЗФР). По окончании инкубации в лунки вносили по 100 мкл изопропанола с 0.04 М HCl, перемешивали и измеряли оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 540 нм (вычитая величину оптической плотности при 690 нм как фоновую) на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Во всех расчетах за достоверный принимали 95% уровень значимости ($P < 0.05$).

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.

Определение N-концевой 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).

Деблокирование N-концевых аминокислотных остатков

Ацетильную группу N-концевого остатка ацетилсерина удаляли по методике [27] на инертном носителе

ле иммобилоне, используемом при автоматическом секвенировании белка. Образец пептида наносили на иммобилон, помещали в пробирку объемом 500 мкл, смачивали 30 мкл 25% раствора ТФУ и затем инкубировали в закрытой пробирке в течение 4 мин при 45°C. Иммобилон с нанесенным на него пептидом подсушивали в открытой пробирке в течение 5 мин при 20°C и еще 10 мин при 45°C, а затем термостатировали в герметично закрытой пробирке в течение 72 ч при 45°C. Полученный образец использовали для автоматического секвенирования пептида.

Выделение геномной ДНК

Фрагменты тканей осетра инкубировали в буфере TNES (10 mM Трис-HCl, pH 7.5; 400 mM NaCl; 100 mM EDTA, 0.6% SDS) с 10 мг/мл протеиназы К в течение 16 ч при 55°C. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин к супернатанту добавляли 0.25 объема 5 M NaCl и осаждали ДНК добавлением одного объема 95% этанола. Осадок промывали 80% этанолом, подсушивали в открытой пробирке и растворяли в воде. Затем проводили однократную очистку ДНК смесью фенол : хлороформ (1 : 1, v/v), экстрагировали остатки фенола равным объемом хлороформа и осаждали ДНК 95% этанолом.

Аmplификация нуклеотидных последовательностей

Для амплификации внутренней области гена гистона H2A осетра использовали вырожденные праймеры № 1 (ATGTGTGGACG(A,C)GG(C,T)-AA(A,G)AC(A,C,T)GG) и № 2 (GTCTTCTTGGG(C,G)-AG(C,T)AG(C,T)AC(G,T)GCC). ПЦР проводили со ступенчатым понижением температуры на стадии отжига праймера (step-down): 94°C – 1 мин; 5 × (94°C – 30 с, 61°C – 40 с, 68°C – 60 с); 5 × (94°C – 30 с, 58°C – 40 с, 68°C – 60 с); 30 × (94°C – 30 с, 55°C – 40 с, 68°C – 60 с).

Геномную ДНК осетра перед постановкой инвертированной ПЦР обрабатывали рестриктазой BglII. Состав реакционной смеси: 1× буфер O (Thermo Fisher Scientific), 50 нг/мкл ДНК, 40 ед. BglII (Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили при 37°C в течение 16 ч в объеме 50 мкл. Продукты реакции разбавляли водой в 25 раз (2 нг/мкл ДНК), после чего проводили реакцию лигирования в течение 16 ч при 4°C в присутствии 10 mM АТФ. После этого осаждали ДНК 95% этанолом, осадок растворяли в воде и использовали в качестве матрицы для инвертированной ПЦР.

Инвертированную ПЦР проводили с помощью двух пар праймеров в два этапа. На первом этапе использовали праймеры № 3 (GAGCACAGCGGCCAGATAGA) и № 4

(СТГАААТСТТGGAGCTGGC) и следующую программу амплификации: 94°C – 5 мин; 35 × (94°C – 30 с, 58°C – 60 с, 72°C – 120 с). Полученный продукт разбавляли водой (1 : 100) и использовали в качестве матрицы для гнездовой ПЦР с праймерами № 5 (CACGCTGGGCATAGTTTCC) и № 6 (GAATCATCCCGCGTCACTG) в следующих условиях: 94°C – 5 мин; 35 × (94°C – 30 с, 62°C – 60 с, 72°C – 120 с).

Клонирование и секвенирование продуктов ПЦР

Продукты ПЦР элюировали из легкоплавкой агарозы и лигировали по липким Т/А-концам с рGEM-T-вектором (Promega, США). Работы с рекомбинантной ДНК проводили согласно базовым методикам [28]. Для трансформации использовали компетентные клетки штамма *E. coli* DH-10B (Life Technologies, США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса. ДНК секвенировали с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистическая обработка результатов

Данные, полученные в ходе изучения антимикробной активности пептидов, представлены как среднее арифметическое ± среднееквадратичное отклонение. Среднее арифметическое получали из данных трех независимых экспериментов, в каждом из которых использовали по две параллельные пробы. Обработку данных проводили в программе Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структурная характеристика АМП из лейкоцитов русского осетра

Для получения антимикробных пептидов из лейкоцитов крови русского осетра использовали процедуру выделения и очистки, включающую кислотную экстракцию белков и пептидов из лейкоцитарной массы, ультрафильтрацию, препаративный ЭФ и обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию [29]. Применение этого комплекса методов позволило получить шесть очищенных АМП, имеющих молекулярные массы 5448.8, 5336.0, 5174.0, 4777.6, 3804.0 и 2741.7 Да, определенные с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, причем три пептида с молекулярными массами 5336.0, 3804.0 и 2741.7 Да составляли преобладающие пептидные фракции. Описанную выше процедуру выделения повторяли несколько раз с использованием лейкоцитов крови осетров разного пола и возраста, отловленных в разное время, причем в каждом цикле вы-

деления получали сходный спектр антимикробных пептидов. В ряде экспериментов в ходе получения лейкоцитарной массы и проведения экстракции применяли ингибитор сериновых протеаз фенолметилсульфонилфторид, что не приводило к заметному изменению спектра антимикробных пептидов. В задачи данной работы входила структурная характеристика выделенных пептидов и изучение их биологической активности.

Частичная N-концевая аминокислотная последовательность пептидов была установлена методом автоматического микросеквенирования. В ряде случаев секвенирование стало возможным после проведения химической реакции деблокирования N-концевых аминокислотных остатков. Удаление ацетильной группы N-концевого остатка ацетилсерина проводили в кислой среде с использованием 25% раствора ТФУ. После снятия ацетильной защиты N-концевая аминогруппа легко подвергалась модификации фенилизотиоцианатом, что позволило осуществить ступенчатую деградацию пептидов по методу Эдмана с помощью системы секвенирования белков Procise cLC 491 и идентифицировать фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков.

Анализ N-концевых последовательностей пептидов русского осетра *A. gueldenstaedtii*, которые мы назвали аципенсинами 1–5, с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показал, что они представляют собой N-концевые фрагменты гистона семейства H2A, в то время как еще один пептид, аципенсин 6, является фрагментом центральной части молекулы гистона этого же семейства. Эти АМП составляют основную часть кислоторастворимых пептидов лейкоцитов осетра, обладающих антимикробной активностью.

Для установления полной первичной структуры аципенсинов было проведено клонирование и секвенирование кодирующих их нуклеотидных последовательностей. Известно, что в генах канонических гистонов, наиболее широко представленных в клетках эукариот, отсутствуют интроны, а их мРНК лишены 3'-концевой полиА-последовательности [30]. Полиаденилированию подвергаются лишь мРНК специализированных вариантов гистонов, составляющих минорную фракцию этих белков. Еще одна особенность канонических гистонов – наличие в геноме нескольких копий их генов. Все это делает предпочтительным использование геномной ДНК в качестве матрицы для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих гистоны. Предположив, что выделенные нами АМП представляют собой продукты частичного протеолиза преобладающей фракции гистона H2A осетра, мы решили амплифицировать участок геномной

Антимикробная активность аципенсинов Ac1, Ac2 и Ac6*

Пептид	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ							
	<i>E. coli</i> ML-35p		<i>Listeria monocytogenes</i> EGD		MRSA ATCC 33591		<i>Candida albicans</i> 820	
	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl	без NaCl	100 мМ NaCl
Ac1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.2	2.3 ± 0.4	0.9 ± 0.2	> 40	1 ± 0.2	> 40
Ac2	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1	> 40	0.9 ± 0.1	> 40
Ac6	2.5 ± 0.3	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
HNP-1	0.8 ± 0.1	> 50	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.3	> 50	2.1 ± 0.4	> 50
PG-1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.4
ChVac5	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.7	0.8 ± 0.3	>40	0.9 ± 0.2	> 40

*Пептиды инкубировали с микроорганизмами в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4 и в этом буфере, содержащем 100 мМ NaCl. Пептидами сравнения были протегрин 1 (PG-1) свиньи, α-дефенсин человека HNP-1, бактенецин козы ChVac5.

togenes EGD; устойчивого к метициллину *S. aureus* (MRSA) ATCC 33591 и гриба *C. albicans* 820 приведены в таблице. Сравнили активность аципенсинов и трех других АМП, имеющих различную структуру и механизм антимикробного действия: протегрина 1 свиньи, α-дефенсина человека HNP-1 и бактенецина козы ChVac5. α-дефенсины – основные представители антимикробных пептидов, наряду с кателицидином LL-37 нейтрофильных гранулоцитов человека. Обогащенные пролином бактенецины – преобладающее семейство АМП нейтрофилов коз и овец. Протегрин 1 (PG-1) лейкоцитов свиньи имеет конформацию β-шпильки и относится к наиболее активным из описанных к настоящему времени пептидов лейкоцитов животных, обладающих широким спектром антимикробного действия, основанного на его способности повреждать мембраны микроорганизмов.

Из таблицы видно, что в среде с низкой ионной силой аципенсины 1 и 2 имеют широкий спектр действия и проявляют высокую антимикробную активность как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также гриба. Однако при повышении ионной силы среды спектр активности Ac1 и Ac2 меняется: эффективность их действия в отношении грамположительной бактерии MRSA ATCC 33591 и *C. albicans* 820 существенно снижается. Ac6 проявляет антимикробный эффект лишь в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* в среде с низкой ионной силой. Характер анти-

микробного действия Ac1 и Ac2 отличен от действия мембраноактивного PG-1 и сходен с эффектами бактенецина ChVac5. Известно, что бактенецины проявляют антибактериальное действие преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий, причем эти пептиды не повреждают существенно бактериальные мембраны и воздействуют на внутриклеточные мишени [14]. Хотя аципенсины не имеют структурного сходства с пролин-богатыми бактенецинами, можно предположить, что основной мишенью их антибактериального действия не являются бактериальные мембраны. Изучение эффектов Ac1, Ac2, Ac6 на барьерную функцию бактериальных мембран было следующей задачей работы.

Влияние аципенсинов на проницаемость наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* ML-35p для хромогенных маркеров

На рис. 2 представлена кинетика действия аципенсинов 1, 2 и 6 (в концентрации, равной их минимальной ингибирующей концентрации в отношении этой бактерии) на наружную и внутреннюю (цитоплазматическую) мембраны *E. coli* ML-35p. Мембраноактивный пептид PG-1 использовали в качестве стандарта. Аципенсины 1 и 2 оказывают выраженное действие на проницаемость наружной мембраны бактерии для хромогенного маркера нитроцефина (о чем свидетельствует возрастание оптической плотности раствора, определяемое по появлению цветного продукта расщепления нитроцефина

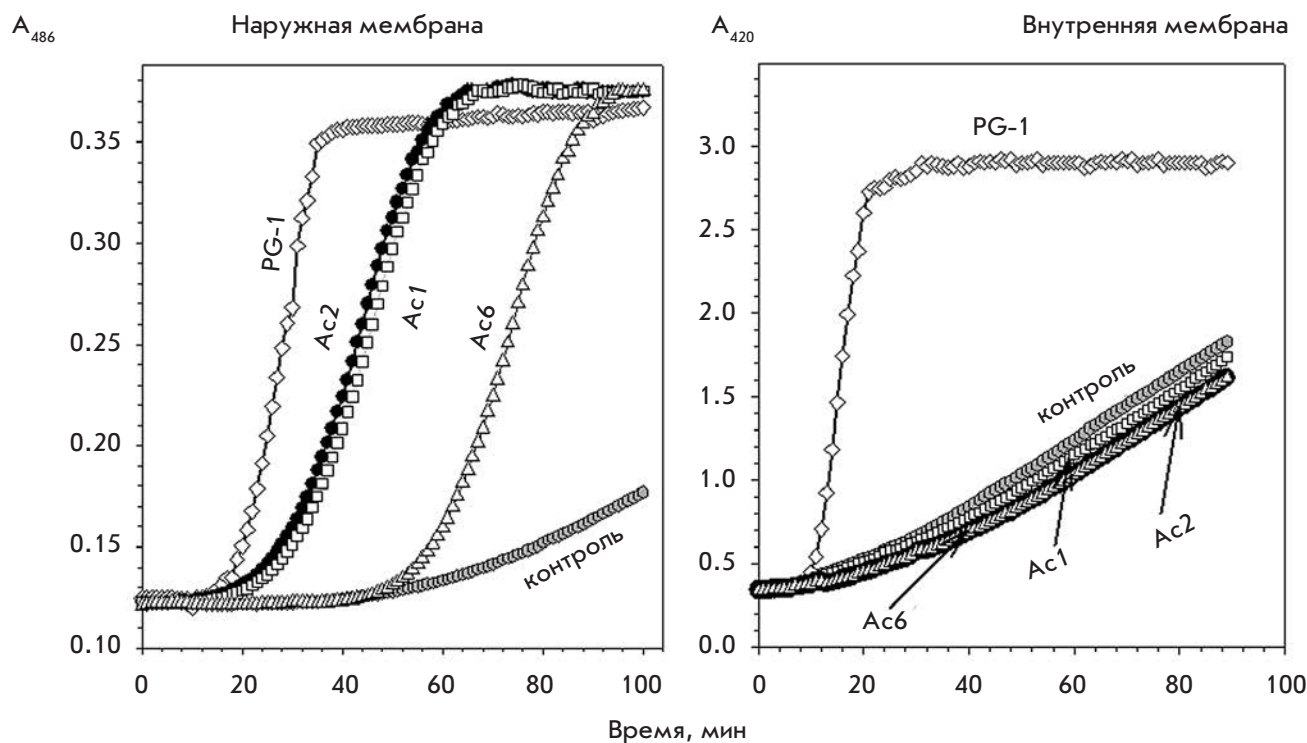


Рис. 2. Кинетика изменения проницаемости мембран *E. coli* ML-35r для хромогенных маркеров при действии antimicrobных пептидов. По оси ординат отложена оптическая плотность раствора, содержащего хромогенные маркеры (продукт гидролиза нитроцефина в случае наружной мембраны и продукт гидролиза ONPG (о-нитрофенол) в случае внутренней мембраны), по оси абсцисс – время инкубации пептидов с бактерией в минутах. Пептид сравнения – протегрин 1 (PG-1). Контролем служили пробы, содержащие бактерию в отсутствие пептидов

(см. «Экспериментальную часть»)), хотя и в несколько меньшей степени, чем PG-1. Увеличение проницаемости наружной мембраны наблюдалось через 15–29 мин после добавления Ac1 и Ac2 к бактериям и через 50 мин в случае Ac6. Однако через 90 мин после начала эксперимента действие всех трех аципенсинов на цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML-35r, оцениваемое данным методом, практически отсутствовало: проницаемость мембраны для хромогенного маркера ONPG не изменялась по сравнению с контрольными значениями (показатели в пробах, не содержащих пептиды). Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что основной мишенью действия аципенсинов и бактенецинов в концентрациях, близких к МИК, являются не бактериальные мембраны, а внутриклеточные компоненты. Известно, что кроме antimicrobной активности большинство АМП вызывают разнообразные эффекты в собственных клетках организма, в том числе и клеточную гибель, обусловленную цитотоксическим действием. Нами изучена возможность проявления аципенсинами токсического действия на клетки макроорганизма.

Цитотоксическая активность аципенсинов в отношении клеток человека *in vitro*

Как и в большей части публикаций, посвященных цитотоксической активности различных АМП, основной интерес вызывает активность этого типа пептидов в отношении клеток человека, поскольку природные АМП рассматриваются как перспективные прототипы новых лекарственных препаратов. Поэтому выяснение того, насколько токсичны данные соединения именно для клеток человека, представляется исключительно важным. Нами определена гемолитическая активность аципенсинов 1, 2 и 6 в отношении эритроцитов человека. Установлено, что в диапазоне концентраций 1–40 мкМ исследуемые пептиды не вызывают гемолиз эритроцитов (рис. 3). Как и в предыдущих экспериментах, в качестве положительного контроля использовали PG-1, обладающий высокой гемолитической активностью, в отличие от пептидов осетра. При изучении действия аципенсинов на культивируемые клетки человека линий К-562 (клетки эритромиелоидного лейкоза человека) и U-937 (клетки гистиоцитарной лимфомы человека) установлено, что в concentra-

ции 1–20 мкМ пептиды не оказывают токсических эффектов в отношении клеток-мишеней. После инкубации клеток с каждым из исследуемых аципенсинов в течение 20 ч доля жизнеспособных клеток была такой же, как в контрольных пробах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение у рыб и амфибий катионных пептидов, проявляющих антимикробную активность и представляющих собой фрагменты гистонов, позволило ряду ученых предположить, что эти производные гистонов могут иметь неядерную локализацию и выполнять функцию антимикробной защиты [18, 32, 33]. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные об обнаружении гистона Н1 в цитозоле ворсинок клеток кишечника человека [34]. У мышей Н1 выявлен на поверхности макрофагов, где служит рецептором тиреоглобулина [35]. Из гранулярной фракции макрофагов мыши были получены гистоны Н1 (MUMP-1 и -2) и Н2В (MUMP-3) [36]. Кроме того, гистон Н1 выявлен на поверхности нейронов мыши [37], моноцитов человека [38], неспецифических цитотоксических клеток канального сома (сходных с натуральными киллерными клетками млекопитающих) [39]. Важность роли гистонов в протекании иммунных процессов стала очевидной, когда появились сведения об их участии в функционировании нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs, Neutrophil extracellular traps) [40, 41]. Формирование данных структур, впервые идентифицированных в 2004 г., является третьим, наряду с фагоцитозом и секрецией антимикробных соединений, механизмом киллерной активности нейтрофилов [42]. Внеклеточные ловушки формируются в процессе «нетоза» (NETosis) – контролируемой клеточной гибели, существенно отличающейся от некроза и апоптоза, и представляют собой сеть из деконденсированного хроматина, которая включает антимикробные факторы как гранулярного (протеазы, АМП), так и ядерного (гистоны и продукты их частичного протеолиза) происхождения. Внеклеточные ловушки обеспечивают захват и уничтожение патогенных микроорганизмов, которые, по какой-либо причине, не могут быть обезврежены с помощью фагоцитоза. Благодаря структурирующей роли ДНК, диффузия антимикробных факторов из ловушки замедлена, что позволяет достичь высоких локальных концентраций этих веществ и снизить повреждающий эффект на здоровые ткани.

Полученные в настоящей работе сведения о структурных и функциональных свойствах антимикробных пептидов лейкоцитов русского осетра – аципенсинов, производных гистона Н2А, подтверждают гипотезу о том, что в процессе эволюции у отдель-

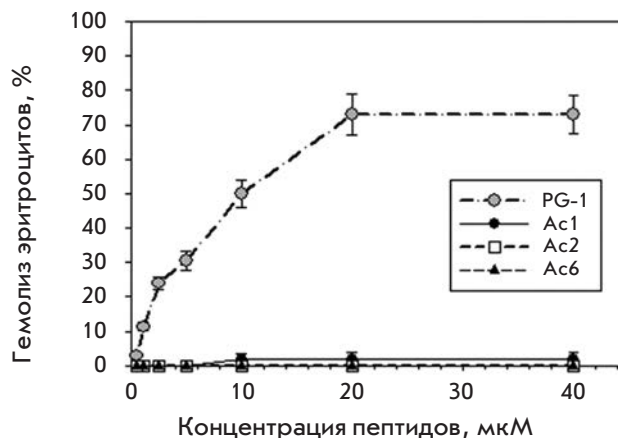


Рис. 3. Гемолитическая активность аципенсинов.

По оси ординат указана величина гемолиза эритроцитов в процентах (за 100% принимали величину, полученную при действии на эритроциты 1% раствора Триптона X-100), по оси абсцисс – концентрация пептидов в мкМ. Пептид сравнения – протегрин 1 (PG-1)

ных групп животных в качестве эндогенных антибиотических пептидов могли отобраться производные белков, обычно имеющих ядерную локализацию. Это свидетельствует об удивительном разнообразии структурных семейств АМП у представителей различных таксонов животного мира. Известно, что наиболее распространенная группа АМП – представители семейства дефенсинов, функциональная активность которых реализуется в фагоцитах (нейтрофилы и макрофаги позвоночных, амебоциты и целомоциты беспозвоночных) и на уровне барьерного эпителия внешних покровов и слизистых животных. Однако в лейкоцитах осетра мы не выявили пептиды дефенсинового семейства. Дефенсины отсутствуют и в фагоцитах некоторых видов млекопитающих (мышь, кошка, собака, овца, коза) – функцию молекул, инактивирующих фагоцитированные микробы, у этих видов выполняют пептиды кателицидинового семейства (бактенецины, протегрины и др.). Своеобразие видового паттерна антимикробных пептидов лейкоцитов русского осетра заключается в доминировании среди них производных гистона Н2А, которые не обнаруживали ранее в фагоцитах рыб.

Аципенсины обладают широким спектром антимикробного действия, как и другие известные в настоящее время производные гистона Н2А: буфорин, паразин, хиппосин, абхизин (пептид моллюска халиотиса) [16, 17, 31, 43]. В отличие от паразина и буфорина 1 у аципенсинов 1–5 ацетилирован N-конец. Этим же свойством обладает молекула хиппосина [16]. Установлено, что ацетилирование N-конца

не требуется для проявления антимикробной активности, поскольку синтетический неацетилованный хиппосин оказался активным [16].

Наблюдаемое снижение антимикробной активности аципенсинов при повышении ионной силы раствора характерно для многих описанных АМП, например, α -дефенсинов человека, бактенецинов козы. Известно, что антимикробная активность дефенсинов может восстанавливаться в средах, содержащих физиологические концентрации хлорида натрия, в результате синергичного взаимодействия с другими АМП нейтрофилов человека, в частности, с кателицидином LL-37 [44]. Можно предположить, что наряду с конститутивно синтезируемыми аципенсинами в лейкоцитах осетра имеются индуцибельные антимикробные факторы, синтез которых при развитии инфекционного процесса усиливается. Эти факторы могут действовать совместно с аципенсинами, в результате чего повышается эффективность антимикробного действия АМП.

Данные о низкой по сравнению с Ас1 и Ас2 антимикробной активности Ас6 позволяют предположить, что именно N-концевые производные гистона H2A играют ключевую роль в осуществлении противоинойфекционной защиты.

Механизмы действия описанных в литературе АМП, производных гистона H2A, несколько различаются: основной механизм антимикробного действия буфорина 2 связывают с его способностью проникать в бактериальные клетки без существенного повреждения их мембран и взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, что приводит к угнетению жизненно важных процессов в микробных клетках и их гибели [45, 46]. Однако другой пептид – паразин – значительно повреждает бактериальные мембраны [47]. Показано, что синтетический аналог хиппосина тоже обладает способностью увеличивать проницаемость мембран бактерии (*E. coli* ATCC 25922) [48]. Хотя аципенсины имеют значительное структурное сходство с хиппосином, в наших экспериментах не наблюдалось заметного возрастания проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p при действии аципенсинов. С одной стороны, можно предположить, что разница в результатах связана с тем, что в нашей работе использовались другие штаммы бактерий и маркеры проницаемости. С другой стороны, возможно, решающую роль играет концентрация пептидов. Так, установлен двунаправленный механизм действия (Dual mode of action) обогащенных пролином пептидов, в частности, бактенецинов быка [49]: в концентрациях, близких к МИК, пептиды не оказывали повреждающего действия на мембраны, их эффекты были связаны с влиянием на внутриклеточные мишени, в то время как в кон-

центрациях, превышающих МИК, эти АМП нарушали структурную целостность мембран, в дополнение к ингибированию внутриклеточных процессов. Так как в экспериментах по оценке влияния аципенсинов на проницаемость бактериальных мембран использовали концентрации, близкие к МИК, можно предположить, что в более высоких концентрациях аципенсины, как бактенецины и хиппосин способны нарушать и барьерную функцию мембран бактерий. Наконец, нельзя исключать и того, что наблюдаемое расхождение в результатах может быть связано с теми немногочисленными аминокислотными заменами, которые отличают Ас1 и Ас2 от аналога хиппосина, используемого в работе [48]. Более детальное исследование действия аципенсинов на бактериальные мембраны будет проведено нами с применением рекомбинантных аналогов аципенсинов.

Как и другие природные АМП, производные гистона H2A, все три исследованных нами аципенсина – Ас1, Ас2 и Ас6 – не проявляли существенной цитотоксической активности в отношении культивируемых клеток человека. Дальнейшее изучение взаимодействия аципенсинов и их структурных аналогов позволит установить, обладают ли они, подобно буфоринам, способностью транслоцироваться через мембраны эукариотических клеток [46]. Наличие подобных свойств открывает перспективы практического применения пептидов в противоопухолевой терапии, в качестве векторов для доставки лекарственных препаратов в малигнизированные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые из лейкоцитов русского осетра *A. gueldenstaedtii* получен набор антимикробных пептидов, названных аципенсинами и представляющих собой фрагменты гистона H2A. Эти пептиды обладают широким спектром антимикробной активности, но не проявляют токсических свойств в отношении клеток макроорганизма. Полученные данные вносят вклад в развитие представлений об эволюции молекулярных факторов врожденного иммунитета, а также свидетельствуют в пользу предположения о биологической роли гистонов как защитных молекул, участвующих в реализации противоинойфекционной функции иммунной системы. ●

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 прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0104.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
2. Rieger A.M., Barreda D.R. // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. V. 35. № 12. P. 1238–1245.
3. Cole A.M., Weis P., Diamond G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 18. P. 12008–12013.
4. Douglas S.E., Gallant J.W., Gong Z., Hew C. // *Dev. Comp. Immunol.* 2001. V. 25. № 2. P. 137–147.
5. Shai Y., Fox J., Caratsch C., Shih Y.L., Edwards C., Lazarovici P. // *FEBS Lett.* 1988. V. 242. P. 161–166.
6. Shike H., Lauth X., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., van Olst J.C., Shimizu C., Bulet P., Burns J.C. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 2232–2237.
7. Park C., Lee J., Park I., Kim M., Kim S. // *FEBS Lett.* 1997. V. 411. № 2–3. P. 173–178.
8. Wang G., Li J., Zou P., Xie H., Huang B., Nie P., Chang M. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 33. № 3. P. 522–531.
9. Guo M., Wei J., Huang X., Huang Y., Qin Q. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 32. № 5. P. 828–838.
10. Marel Mv., Adamek M., Gonzalez S.F., Frost P., Rombout J.H., Wiegertjes G.F., Savelkoul H.F., Steinhagen D. // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. V. 32. № 3. P. 494–501.
11. Maier V.H., Dorn K.V., Gudmundsdottir B.K., Gudmundsson G.H. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. P. 3723–3730.
12. Chang C., Pleguezuelos O., Zhang Y., Zou J., Secombes C. // *Infection, Immunity.* 2005. V. 73. P. 5053–5064.
13. Chang C., Zhang Y., Zou J., Nie P., Secombes C. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006. V. 50. P. 185–195.
14. Scocchi M., Pallavicini A., Salgaro R., Bociek K., Gennaro R. // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2009. V. 152. № 4. P. 376–381.
15. Bridle A., Nosworthy E., Polinski M., Nowak B. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. e23417.
16. Birkemo G. A., Lüders T., Andersen Ø., Nes I.F., Nissen-Meyer J. Hippusin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1646. P. 207–215.
17. Park I.Y., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 258–262.
18. Richards R.C., O'Neil D.B., Thibault P., Ewart K.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 284. P. 549–555.
19. Shamova O., Orlov D., Stegemann C., Czihal P., Hoffmann R., Brogden K., Kolodkin N., Sakuta G., Tossi A., Sahl H.-G., et al. // *Internat. J. Peptide Res. Therapeut.* 2009. V. 15. № 1. P. 31–35.
20. Harwig S.S., Chen N.P., Park A.S.K., Lehrer R.I. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 382–346.
21. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
22. Wolf P. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 129. № 1. P. 145–155.
23. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. V. 137. № 2. P. 167–173.
24. Lehrer R., Barton A., Ganz T. // *J. Immunol. Meth.* 1988. V. 108. P. 153–158.
25. Артамонов А.Ю., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Орлов Д.С. // *Вестн. Санкт-Петербургского университета.* 2008. Сер. 3. № 2. С. 139–142.
26. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55–63.
27. Wellner D., Panneerselvam C., Horecker B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 1947–1949.
28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manuals.* 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
29. Шамова О.В., Орлов Д.С., Овчинникова Т.В., Сал Х.Г., Тверьянович И.А., Попова В.А., Дюбин В.А., Кокряков В.Н. // *Фундаментальные исследования.* 2006. № 1. С. 10–13.
30. Marzluff W.F., Wagner E.J., Duronio R.J. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 11. P. 843–854.
31. Kim H.S., Park C.B., Kim M.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 229. № 2. P. 381–387.
32. Kawasaki H., Iwamuro S. // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2008. V. 8. № 3. P. 195–205.
33. Parseghian M., Luhrs K. // *Biochem. Cell Biol.* 2006. V. 84. № 4. P. 589–604.
34. Rose F.R., Bailey K., Keyte J.W., Chan W.C., Greenwood D., Mahida Y.R. // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. P. 3255–3263.
35. Brix K., Summa W., Lottspeich F., Herzog V. // *J. Clin. Invest.* 1998. V. 102. P. 283–293.
36. Hiemstra P.S., Eisenhauer P.B., Harwig S.S., van den Barselaar M.T., van Furth R., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1993. V. 61. P. 3038–3046.
37. Bolton S.J., Perry V.H. // *J. Neurocytol.* 1997. V. 26. P. 823–831.
38. Holers V.M., Kotzin B.L. // *J. Clin. Invest.* 1985. V. 76. P. 991–998.
39. Evans D.L., Kaur H., Leary J. 3rd, Praveen K., Jaso-Friedmann L. // *Dev. Comp. Immunol.* 2005. V. 29. № 12. P. 1049–1064.
40. Nauseef W.M., Borregaard N. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 7. P. 602–611.
41. Zawrotniak M., Rapala-Kozik M. // *Acta Biochim. Pol.* 2013. V. 60. № 3. P. 277–284.
42. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. // *Science.* 2004. V. 303. № 5663. P. 1532–1535.
43. De Zoysa M., Nikapitiya C., Whang I., Lee J.S., Lee J. // *Fish Shellfish Immunol.* 2009. V. 27. № 5. P. 639–646.
44. Nagaoka I., Hirota S., Yomogida S., Ohwada A., Hirata M. // *Inflamm. Res.* 2000. V. 49. № 2. P. 73–79.
45. Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 1. P. 253–257.
46. Cho J.H., Sung B.H., Kim S.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. № 3. P. 1564–1569.
47. Koo Y.S., Kim J.M., Park I.Y., Yu B.J., Jang S.A., Kim K.S., Park C.B., Cho J.H., Kim S.C. // *Peptides.* 2008. V. 29. P. 1102–1108.
48. Bustillo M.E., Fischer A. L., LaBouyer M.A., Klaips J. A., Webb A.C., Elmore D.E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1838. № 9. P. 2228–2233.
49. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1760. P. 1732–1740.