

УДК 577.18.02

# N-Концевой участок антимикробного пептида Ltc1-K усиливает его токсичность для клеток эукариот

О. В. Самсонова<sup>1,2</sup>, К. С. Кудряшова<sup>1</sup>, А. В. Феофанов<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: avfeofanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.02.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Исходя из гипотезы и ряда экспериментальных данных о том, что гемолитическая активность линейных катионных антимикробных пептидов зависит от их гидрофобного N-концевого участка, определили свойства антимикробного пептида Ltc1-K и его производных без одного, двух или трех N-концевых аминокислотных остатков. Обнаружено, что удаление трех аминокислотных остатков приводит к значительному снижению токсичности пептида для клеток эукариот и к повышению за счет этого избирательности его действия в отношении некоторых видов бактерий. Исследования, проведенные на искусственных мембранах и эритроцитах человека, позволяют сделать вывод, что основной причиной наблюдаемого эффекта является многократное уменьшение аффинности пептида к плазматической мембране клеток эукариот, обогащенной цвиттер-ионными фосфолипидами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антибактериальные пептиды, латарцины, гемолитическая активность, круговой дихроизм, оптическая микроскопия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМП – антимикробные пептиды; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; КД – круговой дихроизм; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; БМЛ – большие моноламеллярные липосомы; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ЛМФХ – 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; КФ – карбоксифлуоресцеин; ФД70 и ФД500 – меченные флуоресцеином декстраны с молекулярным весом 70 и 500 кДа; ГК<sub>50</sub> – концентрация пептида, вызывающая 50% вытекание гемоглобина из эритроцитов; ЭК<sub>50</sub> – концентрация пептида, вызывающая гибель 50% клеток; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; K<sub>d</sub> – константа диссоциации.

## ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) – это природные соединения, разнообразные по структуре и биологическим функциям, объединенные способностью угнетать жизнедеятельность патогенных микроорганизмов. Считается, что эндогенные АМП являются одним из ключевых и, вместе с тем, эволюционно древних факторов врожденного иммунитета многоклеточных, что позволяет рассматривать их в качестве прототипов антибиотиков нового поколения [1–3]. Поиск новых и детальное изучение уже известных АМП стимулируется развитием у микроорганизмов устойчивости к классическим антибиотикам и способностью многих АМП преодолевать эту устойчивость.

Недавно из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* была выделена и охарактеризована новая

группа АМП, состоящая из семи коротких катионных линейных пептидов – латарцинов [4]. Латарцины Ltc1, Ltc2a и Ltc5, как и многие другие АМП, обладают не только высокой антибактериальной активностью, но и умеренной гемолитической активностью [4]. АМП рассматривают как альтернативу существующим антибиотикам, поэтому наличие у них цитотоксичности в отношении клеток человека нежелательно. Как с исследовательской, так и с практической точки зрения важно выявить структурные детерминанты, ответственные за цитотоксичность АМП. У линейных  $\alpha$ -спиральных АМП нами был идентифицирован один из таких структурных элементов [5]. На основе структурно-функционального анализа большого числа  $\alpha$ -спиральных АМП установлено, что гидрофобный N-концевой участок усиливает гемолитическую активность этих пептидов. На примере латарцинов

**Таблица 1.** Аминокислотные последовательности Ltc1-K и его производных

Пептид	Аминокислотная последовательность
Ltc1-K	SMWSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-1)Ltc1-K	MWSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-2)Ltc1-K	WSGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK
(-3)Ltc1-K	SGMWRRKLLKLRNALKKKCLKGEEK

Ltc2a и Ltc5 доказано, что снизить активность АМП в отношении клеток эукариот можно, если удалить у них N-концевой участок или ввести в него точечные аминокислотные замены, снижающие гидрофобный потенциал [5].

Развивая это направление, мы представляем результаты изучения свойств АМП Ltc1-K (табл. 1), который соответствует непротессированной форме латарцина Ltc1 с дополнительным остатком лизина на C-конце. По гемолитической активности и бактерицидному действию в отношении *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* Ltc1-K не отличается от зрелого Ltc1 [6]. Методом ЯМР показано, что при связывании Ltc1-K с мицеллами додецилсульфата натрия (простейшая модель, имитирующая мембрану) N-концевой участок  $\alpha$ -спирального пептида погружается в гидрофобную область мицеллы [7]. С учетом данных ЯМР [7] и структурно-функционального анализа [5] мы предположили, что N-концевой фрагмент усиливает связывание Ltc1-K с мембранами, состоящими из цвиттер-ионных липидов, и определяет цитотоксическую активность пептида. Для проверки этой гипотезы были синтезированы три аналога Ltc1-K, укороченных с N-конца на один, два и три аминокислотных остатка (табл. 1), и проведен сравнительный анализ их структуры, активности и особенностей гемолитического действия.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

В работе использованы следующие реактивы: 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) и 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ЛМФХ) фирмы «Avanti Polar Lipids» (США); питательная среда Мюллера-Хинтона, карбоксифлуоресцеин (КФ), меченные флуоресцеином декстраны с молекулярным весом 70 и 500 кДа (ФД70 и ФД500), флуоресцентные красители FM1-43, йодистый пропиций и Hoechst 33342 («Sigma-Aldrich», США); культуральная среда Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) компании «ПанЭко» (Россия); гепарин («Синтез», Россия). Остальные реагенты были категории «ос. ч.».

Пептиды (табл. 1) синтезированы методом твердофазного синтеза в лаборатории химии пептидов Института биоорганической химии РАН (Москва) (рук. группы Н.С. Егорова) и охарактеризованы методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии (MALDI-MS) как описано ранее [4, 6]. Концентрации пептидов в водных растворах определяли по УФ-поглощению с использованием спектрофотометра СФ-256 («ЛОМО», Россия) на основе молярных коэффициентов экстинкции  $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для (-3)Ltc1-K и  $11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K при длине волны 280 нм.

### Измерение и анализ спектров кругового дихроизма (КД)

Спектры КД пептидов измеряли в фосфатно-солевом буфере (110 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) и в ЛМФХ-мицеллах (30 mM по липиду) в фосфатно-солевом буфере при концентрации пептида 40 мкМ, используя спектрополяриметр Jasco J-810 («Jasco», Япония). Образцы, содержащие ЛМФХ, предварительно инкубировали в течение 30 мин при 25°C для установления равновесного распределения пептида между мицеллами. Спектры регистрировали в диапазоне 190–250 нм с шагом 0.2 нм (спектральная ширина щели 1 нм). Образец помещали в разборную кварцевую кювету («Hellma», Германия) с длиной оптического пути 0.01 см. Вторичные структуры пептидов рассчитывали по спектрам КД с помощью программы CONTILL [8]. Результаты расчета усредняли по двум независимым экспериментам.

### Приготовление суспензии эритроцитов

Капиллярную кровь донора (100–150 мкл) смешивали со средой RPMI-1640, содержащей гепарин (10 ед./мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 300 g, а осадок ресуспендировали в среде без гепарина до конечной концентрации эритроцитов  $2 \times 10^7$  кл/мл. Все опыты проводили в течение 2–3 ч после забора крови.

### Анализ гемолитической активности

Для определения гемолитической активности пептидов суспензию эритроцитов смешивали в равном объемном соотношении с пептидом, предварительно разведенным RPMI-1640 до нужной концентрации, и инкубировали в течение 1 ч (37°C) при постоянном перемешивании (140 об/мин). При этом в среду добавляли или не добавляли 8% эмбриональной телячьей сыворотки. Затем клетки осаждали центрифугированием (1200 g, 5 мин) и отбирали супернатант. Выход гемоглобина из эритроцитов оценивали по оптической плотности супернатанта при длине волны 414 нм, измеренной в планшетном фотометре

ПИКОН (Россия). Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$ГК_{\%} = (ОП_s - ОП_0) / (ОП_{100} - ОП_0) \times 100\%, \quad (1)$$

где ОП<sub>s</sub>, ОП<sub>0</sub>, ОП<sub>100</sub> – оптические плотности (414 нм) супернатантов, полученных соответственно от исследуемого образца, контрольных и полностью лизированных клеток. Для полного лизиса эритроцитов среду RPMI-1640 заменяли деионизированной водой. Усредняли результаты двух независимых экспериментов, в каждом из которых измерения выполняли в трех повторах. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Концентрационную зависимость гемолиза аппроксимировали уравнением сигмоидальной зависимости и определяли концентрацию пептида, вызывающую 50% вытекание гемоглобина из эритроцитов (ГК<sub>50</sub>).

#### Анализ цитотоксичности

Клетки эритромиелоидного лейкоза человека K562 культивировали (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) в среде RPMI-1640 с 8% эмбриональной телячьей сывороткой и L-глутамином (2 мМ). Цитотоксичность пептидов определяли как описано ранее [9]. Клетки инкубировали в течение 3 ч (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) в среде, содержащей исследуемые пептиды в серийных разведениях (от 0.1 до 100 мкМ). Затем в среду вносили йодистый пропиций (10 мкМ), Hoechst 33342 (10 мкМ), через 10 мин анализировали состояние клеток при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия). Клетки, окрашенные только Hoechst 33342, считали живыми, а окрашенные Hoechst 33342 и йодистым пропицием – погибшими. При каждой концентрации пептидов анализировали не менее 500–1000 клеток. Усредняли результаты двух независимых экспериментов. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Концентрационную зависимость цитотоксичности аппроксимировали сигмоидальной кривой и определяли концентрацию пептидов, вызывающую гибель 50% клеток (ЭК<sub>50</sub>).

#### Анализ антибактериальной активности

Клетки *E. coli* C600, *Micrococcus luteus* Ac-2230 VKM и *B. subtilis* B-501 VKM культивировали в среде Мюллера–Хинтона (37°C). Антибактериальную активность пептидов определяли методом серийных разведений в жидкой среде как детально описано ранее [9]. Суспензию бактерий (10<sup>5</sup> кл./мл) инкубировали в среде Мюллера–Хинтона в присутствии серийных разведений пептидов в течение 24 ч при 37°C. Критерием активности пептида служило отсутствие размножения бактерий, которое регистрировали,

сравнивая оптическую плотность (595 нм) культуры бактерий в присутствии пептида и в контроле, при помощи планшетного спектрофотометра («Пикон», Россия). Усредняли результаты двух независимых экспериментов, в каждом из которых измерения выполняли в трех повторах. К контрольным клеткам добавляли эквивалентное количество среды без пептида. Активность характеризовали величиной минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

#### Приготовление больших моноламеллярных липосом (БМЛ)

Навеску ДОФХ гидратировали в фосфатно-солевом буфере (110 мМ NaCl, 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7.4) в течение 2 ч при 25°C и интенсивном встряхивании. Суспензию мультиламеллярных липосом с ДОФХ в концентрации 10 мМ получали методом замораживания–оттаивания в жидком азоте (10 циклов). БМЛ диаметром 100 нм готовили путем экструзии суспензии мультиламеллярных липосом через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм («Whatman», Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя мини-экстурдера («Avanti Polar Lipids», США).

#### Изучение взаимодействия пептидов с ДОФХ-липосомами

Связывание с липидным бислоем оценивали по коротковолновому сдвигу спектра флуоресценции остатков Trp в составе пептидов при переходе боковой цепи Trp из полярного окружения в гидрофобное. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре LS 55 («Perkin Elmer», Великобритания) при 25°C. Флуоресценцию возбуждали при 270 нм, а спектр испускания регистрировали в диапазоне от 300 до 500 нм с шагом измерения 0.5 нм. Чтобы снизить искажения спектров из-за рассеяния света на липосомах, использовали кварцевую кювету сечением 10 × 2 мм, регистрируя флуоресценцию от тонкого слоя образца (2 мм).

Образцы содержали 2 мкМ пептида и от 0.1 до 5 мМ ДОФХ в форме БМЛ в фосфатно-солевом буфере. Измеренные спектры анализировали в программе LabSpec2.0 («Dilor», Франция). Для расчета соотношения связанной и свободной форм пептида использовали математическую процедуру представления экспериментального спектра в виде суммы двух спектров (пептид в водном окружении и пептид, полностью связанный с липидами) с соответствующими весовыми коэффициентами. Для измерения спектра пептида, полностью связанного с липидами, использовали суспензию цвиттер-ионных ЛМФХ-мицелл (20 мМ липида). Полное связывание пептидов с ЛМФХ-мицеллами подтверждено методом КД

по зависимости формирования  $\alpha$ -спиральной конформации пептидов от концентрации мицелл.

Константу диссоциации ( $K_d$ ) определяли, как описано ранее [10], на основе усредненных по двум независимым опытам данных по формуле:

$$C_m/L = 1/K_d \times C_{\text{буф}}, \quad (2)$$

где  $C_{\text{буф}}$  – концентрация свободного пептида в растворе,  $C_m/L$  – концентрация мембраносвязанного пептида, нормированная на концентрацию липида.

Отметим, что при концентрации ДОФХ больше 1 мМ из-за светорассеяния снижается интенсивность регистрируемой флуоресценции, что приводит к занижению определяемых значений  $C_m$  и  $C_{\text{буф}}$ . Однако это не влияет на расчетное соотношение  $C_m/C_{\text{буф}}$ , которое используется для определения  $K_d$ .

### Микроскопические исследования

При изучении индуцированных пептидами морфологических изменений эритроцитов в среде RPMI-1640 смешивали равные объемы суспензии эритроцитов ( $6 \times 10^6$  кл./мл) и растворов пептидов, обеспечивая эквивалентные концентрации Ltc1-K и (-3)Ltc1-K (конечная концентрация в пробе – 4 мкМ Ltc1-K или 30 мкМ (-3)Ltc1-K), а также добавляли КФ (20 мкМ). Образец помещали в 12-луночную камеру flexiPERM («Perbio», Бельгия) со стеклянным дном толщиной 0.17 мм, центрифугировали в течение 1 мин при 250 об/мин, осаждая клетки на стекло, и переносили под микроскоп для анализа.

Для получения теней эритроциты в концентрации  $10^7$  кл./мл инкубировали в присутствии эквивалентных концентраций Ltc1-K (2 мкМ) или (-3)Ltc1-K (15 мкМ) в среде RPMI-1640 в течение 20 мин при 37°C. Затем к клеткам добавляли маркеры проницаемости мембраны (КФ, ФД70 или ФД500) в концентрации 20 мкМ и FM1-43 (0.9 мкМ), окрашивающий плазматическую мембрану. Образцы продолжали инкубировать в течение еще 1 ч при 37°C, а затем анализировали микроскопически.

Использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 Meta («Carl Zeiss», Германия) с объективом C-Apochromat 63x/1.2 W. Измерения выполняли с разрешением 0.3 мкм в фокальной плоскости и 0.6 мкм вдоль оптической оси объектива. Флуорофоры возбуждали Ar<sup>+</sup>-лазером с длинами волн 458 нм (FM1-43) и 488 нм (КФ, ФД70, ФД500). Флуоресценцию регистрировали, выделяя нужный спектральный диапазон с помощью полосового фильтра 505–550 нм (КФ, ФД70, ФД500) и длинноволнового барьерного фильтра с границей 585 нм (FM1-43). Одновременно с флуоресцентными изображениями регистрировали изображения клеток в проходящем свете.

При изучении процессов в динамике проводили 100 повторных измерений с интервалом 2 с.

Изображения обрабатывали с использованием программы ImageJ (National Institute of Health, США). Степень затекания (A) маркеров проницаемости мембраны (КФ, ФД70, ФД500) внутрь эритроцита (%) рассчитывали по формуле:

$$A = (F_b - F_0)/(F_{\text{вне}} - F_0) \times 100, \quad (3)$$

где  $F_b$  – средняя интенсивность флуоресценции внутри тени,  $F_{\text{вне}}$  – средняя интенсивность флуоресценции среды вокруг клеток,  $F_0$  – фоновый сигнал внутри интактных эритроцитов. Степень затекания усредняли по 100–150 клеткам.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Биологические активности пептидов

Для оценки влияния N-концевого участка на гемолитическую, цитотоксическую и антибактериальную активности сравнивали способность латарцина Ltc1-K и его производных (табл. 1) лизировать эритроциты и клетки эритромиелоидного лейкоза человека, а также ингибировать рост бактерий *in vitro* (табл. 2).

Удаление от одного до трех N-концевых аминокислотных остатков не повлияло на способность пептидов подавлять рост грамположительных бактерий *B. subtilis*. Активность в отношении грамотрицательных *E. coli* и грамположительных *M. luteus* значительно снизилась лишь в случае (-3)Ltc1-K. Не обнаружено связи между изменением спектра активности Ltc1-K при удалении N-концевого участка и морфологическими или тинкториальными свойствами бактерий: активность снизилась не только в отношении грамотрицательных бацилл *E. coli*, но и грамположительных кокков *M. luteus*, у которых нет липополисахаридной оболочки. В то же время чувствительность грамположительных бацилл *B. subtilis* остается на прежнем уровне. Можно предположить, что наблюдаемое снижение активности связано в значительной степени с особенностями взаимодействия пептидов с плазматической мембраной конкретных видов бактерий.

Наиболее вероятным механизмом антибактериального действия Ltc1-K и его аналога, как и других катионных линейных АМП, считается пептидопосредованная пермеабиллизация мембраны бактерий. Косвенно в пользу этого свидетельствуют данные о способности исследуемых пептидов формировать дефекты в мембране эритроцитов. Пермеабиллизация мембраны бактерий может происходить путем образования тороидальных липид-

Таблица 2. Характеристики взаимодействия Ltc1-K и его производных с эритроцитами, клетками K562, бактериями и ДОФХ-липосомами

Пептид	Клетки эукариот		Бактерии			ДОФХ-липосомы
	Эритроциты ГК <sub>50</sub> , мкМ	K562 ЭК <sub>50</sub> , мкМ	<i>E. coli</i> МИК, мкМ	<i>B. subtilis</i> МИК, мкМ	<i>M. luteus</i> МИК, мкМ	K <sub>d</sub> , мМ
Ltc1-K	1.1 ± 0.1	7.1 ± 0.4	1.3 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.5
(-1)Ltc1-K	0.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2	2.6 ± 0.6	0.7 ± 0.2	2.7 ± 0.6	1.4 ± 0.7
(-2)Ltc1-K	1.3 ± 0.1	11 ± 1	2.6 ± 0.6	0.7 ± 0.2	2.9 ± 0.6	1.7 ± 0.6
(-3)Ltc1-K	8.0 ± 2.0	39 ± 5	6.5 ± 1.6	0.7 ± 0.2	5.6 ± 0.9	15 ± 3

Примечание. GK<sub>50</sub> – концентрация пептида, приводящая к гемолизу 50% эритроцитов. ЭК<sub>50</sub> – концентрация пептида, приводящая к гибели 50% клеток. МИК – минимальная концентрация, ингибирующая рост микроорганизма в жидкой питательной среде. K<sub>d</sub> – константа диссоциации комплексов пептида с ДОФХ-липосомами.

пептидных пор или по так называемому «ковровому» механизму, вызывающему детергентоподобное повреждение мембраны [11]. В первом случае удаление гидрофобного N-концевого участка, скорее всего, будет снижать способность пептида встраиваться в гидрофобную область мембраны и инициировать формирование липид-пептидных пор. Во втором случае удаление N-концевого участка в меньшей степени будет влиять на эффективность повреждения мембраны. В обоих случаях исходное связывание пептида на мембране определяется электростатическими взаимодействиями катионных аминокислотных остатков и анионных липидов, которыми обогащена мембрана бактерий. При этом удаление N-концевого участка Ltc1-K не затрагивает электростатические взаимодействия.

Конкретные механизмы формирования дефектов в мембране разных видов бактерий могут зависеть от состава и жесткости мембраны. Соответственно меньшая, чем у Ltc1-K, активность (-3)Ltc1-K в отношении *E. coli* и *M. luteus* может указывать на пермебилизацию мембраны этих бактерий по механизму образования тороидальных липид-пептидных пор, а в случае *B. subtilis* следует предположить детергентоподобное повреждение мембраны. Экспериментальная проверка этой гипотезы требует отдельных длительных исследований и выходит за рамки данной статьи.

В опытах на эритроцитах не обнаружено существенных различий в гемолитической активности Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K, в то время как активность (-3)Ltc1-K уменьшилась в 7 раз (табл. 2). Похожая закономерность выявлена при анализе цитотоксичности пептидов в отношении клеток K562 (табл. 2). Отметим, что для удобства гемолиз эритроцитов пептидами сравнивали в среде без сыворотки,

присутствие которой (как и плазмы крови) защищает эритроциты и снижает гемолитическую активность пептидов до умеренных значений. Так, в присутствии 8% эмбриональной телячьей сыворотки величины GK<sub>50</sub> для Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K составляют соответственно 28, 67 и 58 мкМ, а для (-3)Ltc1-K измерить GK<sub>50</sub> в доступном диапазоне концентраций не удается (рис. 1).

Для сравнения можно сказать, что GK<sub>50</sub> меллитина из яда *Apis mellifera*, относящегося к высокоактивным гемолитикам, в присутствии 8% сыворотки составляет 0.3 мкМ (данные не приведены), а GK<sub>50</sub> ранее

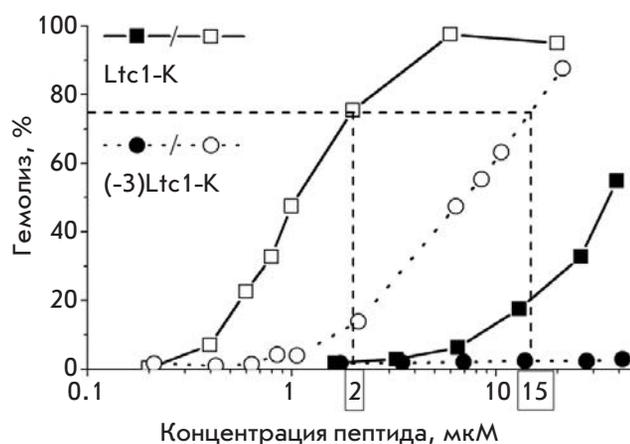


Рис. 1. Концентрационная зависимость гемолитического эффекта Ltc1-K (квадраты) и его производного (-3)Ltc1-K (кружки) в бессыывороточной среде (светлые символы) и в среде, содержащей 8% эмбриональной сыворотки телянка (темные символы). Пунктирные линии иллюстрируют определение эквивалентных концентраций Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, использованных в некоторых опытах.

исследованных латарцинов Ltc2a и Ltc5 равны 6 и 12 мкМ соответственно [5]. Цитотоксичность ( $ЭК_{50}$ ) Ltc2a и Ltc5 для клеток K562 составляет 3 и 12 мкМ [5]. Гемолитическая активность у Ltc1-K заметно менее выражена, чем у Ltc2a, Ltc5 и меллитина, но сравнима с активностью других латарцинов в отношении клеток K562. Удаление N-концевого фрагмента сопровождается многократным уменьшением цитотоксичности и гемолитической активности как у Ltc2a и Ltc5 [5], так и у Ltc1-K. Таким образом, полученные данные (табл. 2) подтверждают ранее сделанные выводы [5] о том, что гемолитическая и цитотоксическая активности  $\alpha$ -спиральных АМП усиливается за счет гидрофобного потенциала N-концевого участка. В случае Ltc1-K существенное снижение мембранолитической активности достигается после удаления N-концевого гидрофобного остатка Trp3.

Чтобы выявить причины снижения токсичности, мы изучили особенности взаимодействия Ltc1-K и его производных с эритроцитами, а также с липидными системами (ДОФХ-липосомы, мицеллы ЛМФХ), моделирующими мембрану клеток эукариот.

### Сравнительный анализ аффинности пептидов к ДОФХ-липосомам

Предположив, что токсичность в отношении клеток эукариот зависит от сродства пептида к цвиттер-ионным липидам, доминирующим в составе плазматической мембраны, мы измерили константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов Ltc1-K и его производных с ДОФХ-липосомами.

Результаты анализа связывания пептидов с липосомами представлены на рис. 2. Видно, что выбранная математическая модель хорошо описывает полученные изотермы связывания. Определенные по изотермам величины  $K_d$  для пептидов Ltc1-K, (-1)Ltc1-K и (-2)Ltc1-K одинаковы, а для (-3)Ltc1-K величина  $K_d$  возрастает в 10 раз (табл. 2), указывая на существенное снижение аффинности (-3)Ltc1-K к липидному бислою.

Оценка термодинамического вклада  $\Delta G^0_{N-term}$  N-концевого участка пептида в связывание с мембраной, проведенная по формуле

$$\Delta G^0_{N-term} \sim RT \ln (K_{d(Ltc1-K)} / K_{d((-3)Ltc1-K)}), \quad (4)$$

показывает, что свободные энергии взаимодействия с бислоем у Ltc1-K и (-3)Ltc1-K отличаются на 1.4 ккал/моль, т.е. изменение свободной энергии взаимодействия составляет ~20%. Основной вклад в свободную энергию взаимодействия N-концевого участка с липидами дает остаток Trp3, и это взаимодействие, по-видимому, имеет преимущественно гидрофобную природу. В пользу этой гипотезы

свидетельствует близость значения  $\Delta G^0_{N-term}$ , к величине -1.95 ккал/моль, предсказанной методом Уайта-Уимли, основанном на эмпирической шкале гидрофобности аминокислотных остатков [12].

Таким образом, удаление N-концевого участка Ltc1-K приводит к резкому снижению как гемолитической активности и цитотоксичности, так и величины  $K_d$ , подтверждая, что аффинность пептида к цвиттер-ионной мембране действительно имеет большое значение для развития гемолиза и цитотоксического эффекта.

### Влияние N-концевого участка Ltc1-K на вторичную структуру пептида в комплексе с липидами

Еще один фактор, который может влиять на активность пептидов, – их конформация. Мы сравнили вторичную структуру Ltc1-K и его производных, проанализировав спектры КД пептидов в фосфатно-солевом буфере и в липидной системе – мицеллах цвиттер-ионного ЛМФХ, которую применяют для моделирования поверхности мембраны клеток эукариот [13]. ЛМФХ формирует объемную гидрофобную фазу, по диаметру сравнимую с толщиной гидрофобной области биологической мембраны [14]. Кроме того, ЛМФХ не имеет собственного спектра в области КД полипептидов и характеризуется низким уровнем светорассеяния при высокой концентрации фосфолипидного компонента, что дает возможность создать большой избыток липида над пептидом и обеспечить полное связывание пептида с мицеллами.

Обнаружено, что все исследуемые пептиды в буфере имеют преимущественно неупорядоченную

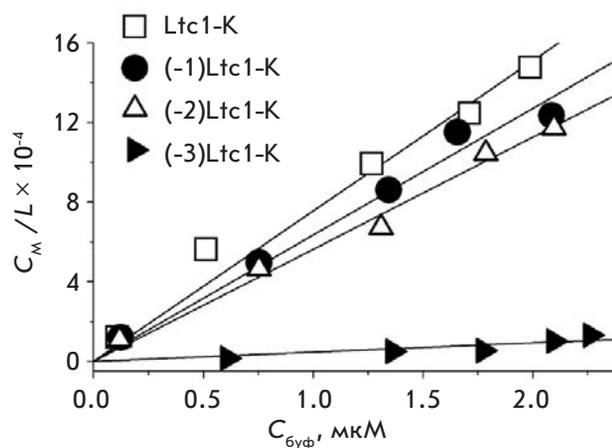


Рис. 2. Изотермы связывания Ltc1-K, (-1)Ltc1-K, (-2)Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с ДОФХ-липосомами. Сплошными линиями показана аппроксимация экспериментальных данных линейной зависимостью по формуле (2), проведенная методом наименьших квадратов.

**Таблица 3.** Вклад  $\alpha$ -спиральной конформации в структуру Ltc1-K и его производных по данным спектроскопии КД

Пептид	Фосфатно-солевой буфер		Мицеллы ЛМФХ	
	%*	а.о.**	%*	а.о.**
Ltc1-K	17	4	59	15
(-1)Ltc1-K	14	4	67	17
(-2)Ltc1-K	15	4	72	17
(-3)Ltc1-K	16	4	65	15

\*Процент  $\alpha$ -спирали в структуре молекулы.

\*\*Число аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование  $\alpha$ -спирали.

структуру (рис. 3) с одинаково низким содержанием элементов  $\alpha$ -спиральной конформации (табл. 3). При связывании с цвиттер-ионными мицеллами пептиды претерпевают существенные конформационные изменения (рис. 3): преобладающим структурным элементом становится  $\alpha$ -спираль, в образование которой вовлечено 15–17 аминокислотных остатков (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными о высоком потенциале спиралеобразования Ltc1-K в 50% трифторэтаноле [6] и соответствуют общим представлениям о типичных структурных изменениях, которые сопровождают взаимодействие линейных катионных АМП с липидным бислоем. Многие АМП имеют неупорядоченную структуру в воде и формируют амфипатическую  $\alpha$ -спираль при связывании с липидами (см. обзоры [14–16]).

Таким образом, характерное для Ltc1-K формирование  $\alpha$ -спирали в комплексе с липидами, а так-

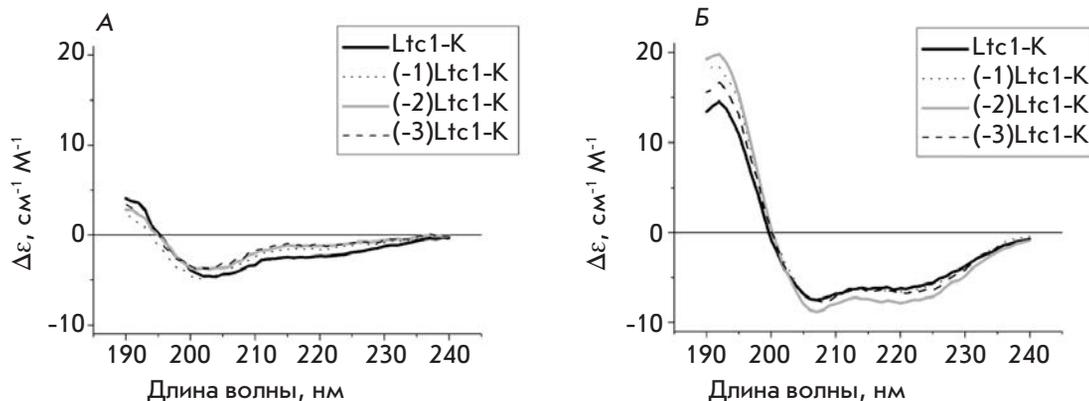
же ее размер сохраняются при удалении от одного до трех N-концевых аминокислотных остатков. По-видимому, N-концевой фрагмент Ltc1-K входит в состав участка с неупорядоченной структурой и за счет конформационной подвижности обеспечивает выигрыш в свободной энергии при связывании пептида с цвиттер-ионными липидами. Это предположение косвенно подтверждается структурой Ltc1-K в комплексе с отрицательно заряженными мицеллами додецилсульфата натрия, установленной методом ЯМР [7]. Полученные данные позволяют исключить конформационную перестройку из списка возможных причин более низкой, чем у Ltc1-K, цитотоксической и гемолитической активности (-3)Ltc1-K.

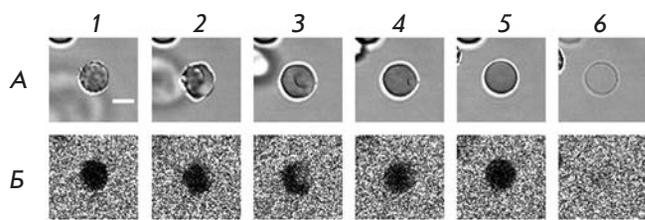
### Сравнительный анализ взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами

Поиск возможных причин, определяющих различия в активности Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, был продолжен на клеточном уровне. Сравнили особенности гемолиза при эквивалентных концентрациях Ltc1-K и (-3)Ltc1-K (4 и 30 мкМ соответственно), выбранных на основе концентрационных зависимостей гемолитического эффекта (рис. 1). Почти восьмикратная разница в концентрации пептидов в среде компенсировала отличия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K по аффинности к цвиттер-ионным липидам (табл. 2) и теоретически обеспечивала одинаковое количество Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, связанных на мембране клеток.

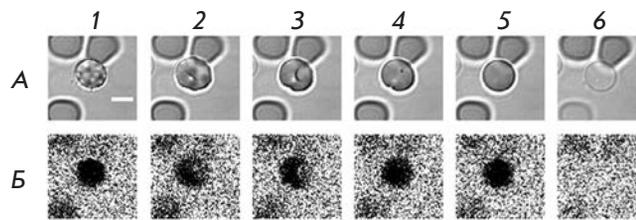
Взаимодействия пептидов с мембраной эритроцитов анализировали в реальном времени методом ЛСКМ с синхронной регистрацией изображений клеток в проходящем свете (для оценки морфологии эритроцитов) и флуоресцентных изображений, характеризующих проницаемость мембраны по затеканию в цитоплазму КФ (рис. 4). Способность ЛСКМ регистрировать флуоресценцию лишь от тонкого слоя вблизи фокуса объектива, устраняя сигналы от слоев, расположенных выше и ниже, критична

**Рис. 3.** Спектры КД Ltc1-K и его производных в фосфатно-солевом буфере (А) и в мицеллах из ЛМФХ (Б).





**Рис. 4.** Типичная последовательность трансформаций эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного Ltc1-K. 1 – Эхиноцит, 2 – переход эхиноцита в стоматоцит, 3 – стоматоцит, 4 – переход стоматоцита в сфероцит, 5 – сфероцит, 6 – тень. А – Изображения эритроцита в разные моменты времени после внесения пептида, регистрируемые в проходящем свете. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения КФ вокруг и внутри эритроцита. Темная область на месте эритроцита свидетельствует об интактности плазматической мембраны и неспособности КФ проникать в цитоплазму. Масштабная черта 5 мкм.



**Рис. 5.** Типичная последовательность трансформаций эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного (-3)Ltc1-K. 1 – Эхиноцит, 2 – переход эхиноцита в стоматоцит, 3 – стоматоцит, 4 – переход стоматоцита в сфероцит, 5 – сфероцит, 6 – тень. А – Изображения эритроцита в разные моменты времени после внесения пептида, регистрируемые в проходящем свете. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения КФ вокруг и внутри эритроцита. Темная область на месте эритроцита свидетельствует об интактности плазматической мембраны и неспособности КФ проникать в цитоплазму. Масштабная черта 5 мкм.

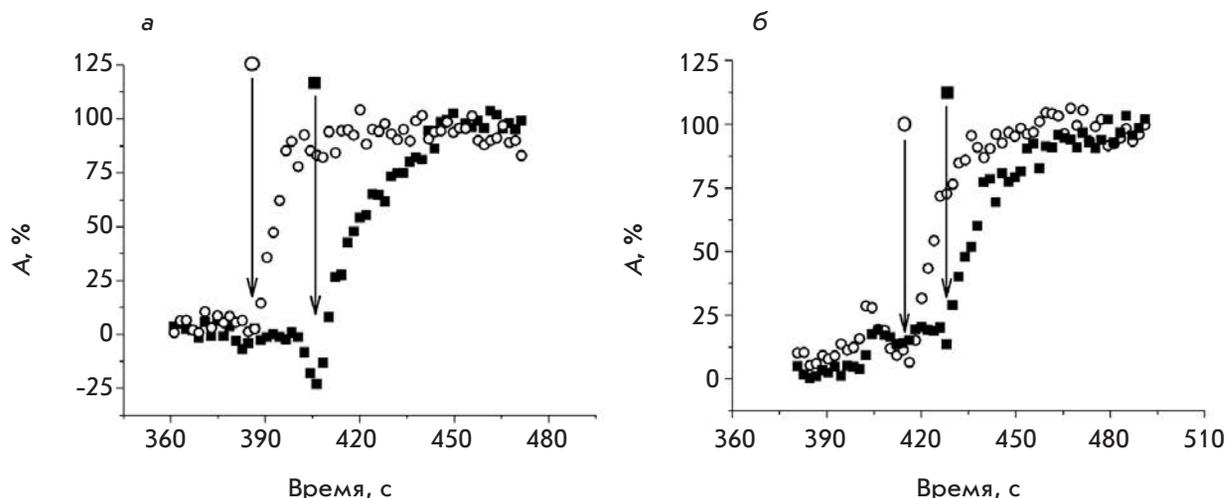
для получения контрастных изображений распределения КФ вокруг и внутри клеток.

Воздействие Ltc1-K и (-3)Ltc1-K вызывает одинаково полное вытекание гемоглобина из части эритроцитов с превращением их в тени, а доля лизированных эритроцитов возрастает при увеличении концентрации пептидов в среде. Процесс гемолиза протекает очень неоднородно: часть эритроцитов не подвергается заметным изменениям, в части эритроцитов с разной задержкой после внесения пептида возникают морфологические изменения, которые завершаются образованием теней. Различия в отклике клеток не связаны с локальными градиентами концентраций добавляемых пептидов. Фактор высокой неоднородности распределения пептида в среде был исключен за счет тщательного и быстрого перемешивания равных объемов раствора пептида и суспензии клеток. Воздействие Ltc1-K и (-3)Ltc1-K вызывает одинаковую последовательность трансформаций эритроцитов (рис. 4, 5): дискоцит, эхиноцит, стоматоцит, сфероцит, тень. Время жизни эхиноцита варьирует в широком диапазоне (от нескольких минут до часа) и является лимитирующей стадией кинетики гемолиза. Длительность стадии стоматоцита составляет в среднем несколько минут. Сфероцит – наиболее короткоживущее состояние. Оно длится не более 10 с. Не обнаружено достоверных отличий в длительности отдельных стадий трансформации эритроцитов под действием обоих пептидов. Увеличение концентрации пептидов в среде приводит, в первую очередь, к снижению среднего времени жизни эхиноцитов.

Сходным для обоих пептидов образом мембрана эритроцита становится проницаемой для низкомо-

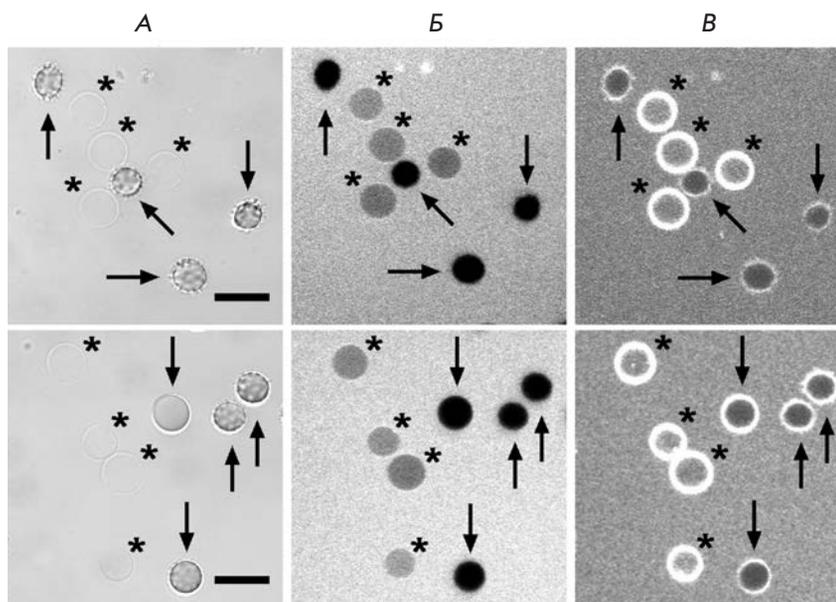
лекулярного маркера КФ только на этапе перехода сфероцита в тень (рис. 4–6). Появление КФ в цитоплазме детектируется одновременно с началом утечки гемоглобина из сфероцита (рис. 6), что указывает на формирование крупных мембранных дефектов без различимой в условиях нашего эксперимента промежуточной стадии образования маленьких липид-пептидных пор, проницаемых для КФ (гидродинамический диаметр молекулы ~0.5 нм), но непроницаемых для гемоглобина (гидродинамический диаметр 6.3 нм).

Обнаружено, что мембрана теней, образовавшихся под воздействием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, сохраняет проницаемость для КФ, в отличие от мембраны теней, возникающих после осмотического гемолиза эритроцитов, вызываемого заменой среды на дистиллированную воду (данные не показаны). Следовательно, Ltc1-K и (-3)Ltc1-K формируют стабильные липид-пептидные поры в мембране эритроцитов. Средний размер этих пор был оценен нами по способности меченных флуоресцеином декстранов различного размера проникать через поры внутрь теней. Обнаружено, что декстраны размером 40 кДа и менее, добавленные в среду к лизированным эритроцитам, легко проникают в тени, быстро выравнивая внутри- и внеклеточную концентрации. В то же время диффузия через поры внутрь теней декстранов размером 70 и 500 кДа затруднена (рис. 7, 8). При этом степень затекания ФД70 составляет около 70%, а ФД500 – менее 40% (рис. 8). Достоверной разницы в затекании ФД70 и ФД500 в тени, образованные под действием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K, не обнаружено (рис. 8). С учетом гидродинамических диаметров ФД70 и ФД500



**Рис. 6.** Типичные кинетики затекания КФ в цитоплазму эритроцита в процессе гемолиза, индуцированного Ltc1-K (а) и (-3)Ltc1-K (б). На каждой панели представлены данные для двух клеток (○, ■). А – степень затекания КФ в эритроцит, рассчитанная в процентах по формуле (3). По оси абсцисс – время после внесения пептида в среду. Задержка между внесением пептида и началом гемолиза индивидуальна для каждого эритроцита и в значительной степени определяется временем в состоянии эхиноцита. Стрелкой обозначен момент начала утечки гемоглобина, регистрируемый по изображениям клетки в проходящем свете.

**Рис. 7.** Анализ способности ФД500 проникать через мембранные поры внутрь тени, образованных в результате воздействия Ltc1-K (верхняя панель) или (-3)Ltc1-K (нижняя панель). Изображения получены методом ЛСКМ от эритроцитов, к которым после воздействия пептидов добавлены ФД500 и мембранный маркер FM1-43. А – Изображения клеток в проходящем свете. Метка масштаба – 10 мкм. Б – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения ФД500 вокруг и внутри эритроцитов. В – Конфокальные флуоресцентные изображения распределения FM1-43 на мембране эритроцитов. Звездочками отмечены тени с мембраной, ограниченно проницаемой для ФД500. Стрелками указаны эритроциты с мембраной, не проницаемой для ФД500.

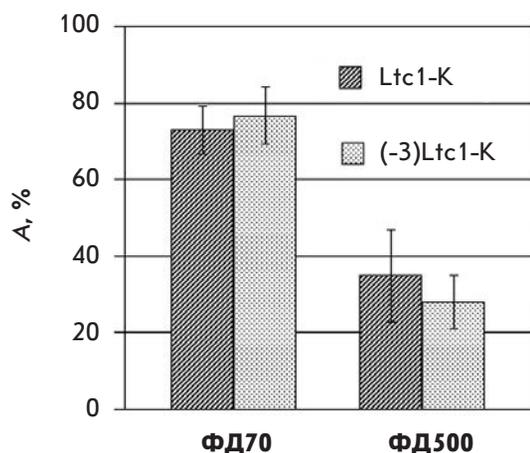


(13 и 32 нм соответственно [17]) можно заключить, что Ltc1-K и (-3)Ltc1-K формируют в мембране эритроцита поры диаметром около 30 нм.

Таким образом, удаление N-концевого участка не влияет на характер, последовательность и продолжительность стадий трансформации эритроцитов в процессе гемолиза, а также на особенности формирования и размер пор в мембране. Это свидетельствует в пользу того, что механизм и особенности

взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами одинаковы.

Модель взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами может основываться на теории бислоистой пары [18–21]. Эта теория рассматривает асимметричную плазматическую мембрану как два белково-липидных слоя, способных к сравнительно независимой адаптивной деформации без нарушения контакта между ними. Теорию бислоистой пары



**Рис. 8.** Степень затекания (А) маркеров проницаемости мембраны ФД70 и ФД500 в тени, образованные в результате воздействия на эритроциты пептидов Ltc1-K и (-3)Ltc1-K. Представлены средние данные по выборке из 100–150 клеток.

часто используют для объяснения образования эхиноцитов и стоматоцитов под действием мембраноактивных агентов, в том числе АМП [18, 22, 23]. Согласно этой теории, образование эхиноцита обусловлено накоплением воздействующего соединения в наружном слое мембраны. Взаимодействия с любым соединением, растягивающие наружный слой относительно внутреннего, приводят к образованию «шипов»-выпячиваний на мембране, которые являются характерной особенностью эхиноцитов. В свою очередь, формирование стоматоцита вызывается накоплением соединения во внутреннем слое и его деформацией, которая завершается преобразованием дискоцита в сфероид с впадиной на мембране.

Объяснение трансформаций эритроцита под воздействием Ltc1-K и (-3)Ltc1-K на основе теории бислошной пары осложнено тем, что сценарии образования эхиноцита и стоматоцита рассматриваются как альтернативные. Если предположить, что перемещение соединения с наружного на внутренний слой сопровождается трансформацией эхиноцита в дискоцит, то взаимодействия Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами могут быть объяснены следующим образом. Переход дискоцита в эхиноцит инициируется первоначальной адсорбцией пептида на поверхности эритроцита. Накопление связанного на внешней стороне мембраны пептида приводит к реорганизации липид-пептидных комплексов и созданию условий для транслокации пептида на внутреннюю поверхность плазматической мембраны, что и вызывает преобразование эхиноцита в стоматоцит. Следует

подчеркнуть, что предполагаемая транслокация пептида не сопровождается формированием структурированных дефектов бислоя, так как мембрана и эхиноцита, и стоматоцита непроницаема для КФ (рис. 4, 5). Переход стоматоцита в сфероцит, по-видимому, соответствует значительному накоплению катионного пептида во внутреннем слое мембраны, обогащенном отрицательно заряженными фосфолипидами, и созданию критического натяжения обоих слоев мембраны. Процесс завершается формированием липид-пептидных пор, которые уменьшают натяжение мембраны, а также создают условия для вытекания гемоглобина и образования тени.

Данная модель взаимодействий Ltc1-K и (-3)Ltc1-K с эритроцитами согласуется с регистрируемыми в эксперименте временами жизни отдельных стадий трансформации эритроцитов. Большие времена жизни эхиноцитов отражают длительный процесс постепенного накопления пептида на внешней стороне мембраны. При увеличении концентрации пептида в среде этот процесс ускоряется. Увеличение количества связанного на мембране пептида до критического уровня скачком повышает вероятность транслокации пептида на внутренний слой мембраны и значительно дестабилизирует мембрану, что выражается в ускорении последующих процессов, ведущих к гемолизу.

Все полученные нами данные указывают, что связывание пептида с внешним слоем мембраны эритроцитов, в составе которого доминируют цвиттер-ионные фосфолипиды, и накопление критического количества пептида на мембране являются спусковым механизмом процесса гемолиза. Удаление N-концевого участка Ltc1-K резко снижает способность пептида связываться на мембране, защищая тем самым эритроциты от гемолиза. Увеличение концентрации (-3)Ltc1-K в среде компенсирует нехватку связанного пептида, а все последующие стадии гемолиза с участием (-3)Ltc1-K протекают так же, как и в случае исходного пептида Ltc1-K.

Можно предположить, что механизм предсказанного нами для ряда линейных катионных АМП и показанного на примере латарцинов Ltc2a и Ltc5 снижения токсичности пептидов за счет удаления их N-концевых участков [5] сходен с механизмом, установленным для Ltc1-K. У АМП, организованных по схеме «неупорядоченный гидрофобный N-концевой участок + амфипатическая α-спираль», N-концевой участок, по-видимому, отвечает за эффективность связывания пептида с цвиттер-ионными мембранами клеток эукариот. Если аффинность N-концевого участка АМП к мембранам эукариот выше, чем к мембранам бактерий, то за счет удаления N-концевых аминокислот можно повысить безо-

пасность использования АМП в качестве антибактериального средства.

### ВЫВОДЫ

Удаление трех N-концевых аминокислотных остатков Ltc1-K существенно снижает гемолитическую активность АМП, повышая тем самым избирательность его антибактериального действия.

Основная причина наблюдаемого эффекта – многократное уменьшение аффинности пептида к плазматической мембране клеток эукариот, обогащенной цвиттер-ионными фосфолипидами.

Гемолиз, вызываемый АМП Ltc1-K и его производным (-3)Ltc1-K – это сложный многостадийный процесс. Связывание пептидов с цвиттер-ионной мембраной эритроцитов сопровождается их переходом в  $\alpha$ -спиральную конформацию. Связанные пептиды, дестабилизируя мембрану, трансформируют эритроцит из дискоцита в эхиоцит, затем в стоматоцит и сфероцит. При накоплении пептида на мембране в количестве, достаточном для образования пор, сфероцит подвергается гемолизу с образованием стабильных липид-пептидных пор диаметром около 30 нм. Роль N-концевого участка Ltc1-K заключается в усилении связывания пептида на мембране эритроцита. На особенности следующих стадий взаимодействия пептида с эритроцитом, приводящих к гемолизу, N-концевой участок не влияет. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта Carl Zeiss.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hancock R.E.W., Chapple S.D. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 1317–1323.
- Finlay B.B., Hancock R.E.W. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 497–504.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. // Clin. Microbiol. Rev. 2006. V. 19. P. 491–511.
- Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 20983–20992.
- Polyansky A.A., Vassilevski A.A., Volynsky P.E., Vorontsova O.V., Samsonova O.V., Egorova N.S., Krylov N.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., et al. // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 2425–2428.
- Василевский А.А., Козлов С.А., Жмак М.Н., Куделина И.А., Дубовский П.В., Шатурский О.Я., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 405–412.
- Dubovskii P.V., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Karpunin D.V., Chupin V.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 3525–3533.
- Provencher S.W., Glockner J. // Biochemistry. 1982. V. 20. P. 33–37.
- Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Samsonova O.V., Egorova N.S., Karpunin D.V., Pluzhnikov K.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. // Biochem. J. 2008. V. 411. P. 687–696.
- Seelig J. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1666. P. 40–50.
- Brogden K.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 238–250.
- White S.H., Whimley W.C. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999. V. 28. P. 319–365.
- Yuan P., Fisher P.J., Prendergast F.G., Kemple M.D. // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 2223–2238.
- Strandberg E., Ulrich A. // Concepts Magn. Reson. Part A. Bridg. Educ. Res. 2004. V. 23. P. 89–120.
- Fernandez D.I., Gehman J.D., Separovic F. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. P. 1630–1638.
- Dathe M., Wieprecht T. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1462. P. 71–87.
- Armstrong J.K., Wenby R.B., Meiselman H.J., Fisher T.C. // Biophys. J. 2004. V. 87. P. 4259–4270.
- Sheetz M.P., Singer S.J.J. // J. Cell Biol. 1976. V. 70. P. 247–251.
- Evans E.A. // Biophys. J. 1974. V. 14. P. 923–931.
- Iglič A., Kralj-Iglič V., Hägerstrand H. // Eur. Biophys. J. 1998. V. 27. P. 335–339.
- Lim G.H.W., Wortis M., Mukhopadhyay R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16766–16769.
- Isomaa B., Hägerstrand H., Paatero G. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 899. P. 93–103.
- Semrau S., Monster M.W., van der Knaap M., Florea B.I., Schmidt T., Overhand M. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1798. P. 2033–2039.