

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

Болосов Илья Александрович

**ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И  
СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ КАТЕЛИЦИДИНОВ  
КИТОПАРНОКОПЫТНЫХ**

Специальность 1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
Доктор химических наук  
Овчинникова Татьяна Владимировна

Москва – 2026

## Оглавление

Введение .....	5
1. Обзор литературы.....	13
1.1. Антимикробные пептиды — молекулярные компоненты системы врожденного иммунитета.....	13
1.2. Семейства антимикробных пептидов млекопитающих .....	14
1.2.1. Дефенсины .....	14
1.2.2. Кателицидины.....	19
1.3. Биологическая активность кателицидинов.....	23
1.4. Основные представители семейства кателицидинов.....	26
1.4.1. Мембранотропные $\alpha$ -спиральные кателицидины .....	26
1.4.2. Человеческий кателицидин LL-37 .....	28
1.4.3. Кателицидины с $\beta$ -шпилечной структурой.....	32
1.4.4. Пролин-богатые кателицидины .....	37
1.4.5. Пролин-богатые кателицидины – ингибиторы рибосом.....	39
1.5. Совместное действие антимикробных пептидов .....	42
2. Материалы и методы.....	45
2.1. Оборудование .....	45
2.2. Реактивы и расходные материалы .....	45
2.3. Конструирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих антимикробные пептиды .....	47
2.4. Получение компетентных клеток и трансформация.....	50
2.5. Выделение плазмидной ДНК .....	51
2.6. Экспрессия, выделение и очистка пептидов.....	51
2.7. Антимикробная активность.....	54
2.8. Исследования совместного действия антимикробных соединений.....	54

2.9. Гемолитическая активность .....	55
2.10. Цитотоксическая активность.....	55
2.11. Исследования проницаемости бактериальных мембран .....	57
2.12. Ингибирование биосинтеза белка <i>in vitro</i> .....	57
2.13. Исследование механизма возникновения резистентности.....	58
2.14. Генетический анализ бактериальных штаммов.....	59
2.15. Лечебная эффективность пептидов на мышинной модели инфекции .....	59
3. Результаты и обсуждение .....	61
3.1. Объекты исследования.....	61
3.2. Структурно-функциональное исследование mini-ChVac7.5N $\alpha$ .....	65
3.3. Изучение структуры и антимикробной активности додекапептидов .....	77
3.4. Изучение совместного действия кателицидинов козы <i>Capra hircus</i> .....	82
3.5. Структурно-функциональное исследование протегрина .....	88
4. Заключение.....	101
5. Выводы .....	103
6. Список литературы.....	104

## Список сокращений

ВБИ – внутрибольничные инфекции;

АМП – антимикробные пептиды;

ПБ-АМП – пролин богатые антимикробные пептиды;

PDB – база данных Protein Data Bank ([www.rcsb.org/structure/](http://www.rcsb.org/structure/));

NCBI – National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))

ЛПС – липополисахариды;

ЛТК – липотейхоевые кислоты;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

TLR – Толл-подобные рецепторы;

MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк

ПТЦ – пептидил-трансферазный центр;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

IPTG – изопропилтио- $\beta$ -D-галактопиранозид;

ONPG – *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид;

ЗФР – забуференный физиологический раствор;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

dNTP – дезоксинуклеотид трифосфаты;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

МИК – минимальная ингибирующая концентрация;

ФБС – фетальная бычья сыворотка;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид;

ДМСО – диметилсульфоксид;

РВМС – моноклеарные клетки периферической крови;

OD – оптическая плотность;

EGFP – зеленый флуорисцентный белок, улучшенная версия GFP;

КД – спектроскопия кругового дихроизма;

ИКФС – инфракрасная Фурье-спектроскопия;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

ДФХ – додецилфосфохолин;

ТИ – терапевтический индекс.

## Введение

### Актуальность темы исследования

Одной из значимых проблем современной медицины является рост числа инфекционных заболеваний, имеющих резистентность к одной или нескольким ключевым группам антибактериальных препаратов, приводящий к так называемому «кризису антибиотикорезистентности» [1]. После появления колистин-устойчивых патогенов, в клинической практике не осталось антибиотиков, эффективных против любых резистентных бактериальных штаммов [2,3]. Кроме того, зарегистрированы случаи появления штаммов, проявляющих устойчивость одновременно ко всем ключевым группам антибиотических агентов. Особенно часто резистентность к антибактериальным препаратам опосредована так называемыми внутрибольничными инфекциями (ВБИ).

Особенно остро проблема сопутствующих ВБИ проявляется во время массовых эпидемий, значительно повышающих нагрузку на стационары в системе здравоохранения. Наиболее высока доля заражений ВБИ в тех случаях, когда требуются интубации и инвазивная вентиляция легких. Было показано, что при лечении тяжелых респираторных заболеваний, таких как грипп или коронавирусная инфекция COVID-19, доля пациентов с сопутствующими бактериальными инфекциями значительно возрастает — с 3-8% зараженных на момент поступления в стационар до 18-33% к моменту попадания в отделение интенсивной терапии. По статистике, до 50% смертельных случаев при терапии вирусных респираторных заболеваний связаны с заражением ВБИ [4,5].

Одним из актуальных направлений в борьбе с сопутствующими бактериальными инфекциями является поиск принципиально новых антимикробных агентов широкого спектра действий. Среди кандидатов особого внимания заслуживают препараты, полученные на основе антимикробных пептидов (АМП) — пептидных факторов системы врожденного иммунитета различных организмов, включая человека [6]. Препараты на основе АМП имеют ряд преимуществ относительно классических антибиотиков. Ключевым преимуществом АМП считается способность эффективно уничтожать резистентные к классическим

антибиотикам бактериальные штаммы, а также низкий риск формирования устойчивости к данной группе соединений. На текущий момент в мире несколько десятков различных препаратов на основе АМП находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований. По крайней мере 16 соединений в недавнее время проходили различные стадии клинических испытаний в качестве антибиотических препаратов с прямым действием на клетки-мишени [7].

Особый интерес представляет способность некоторых АМП взаимно усиливать активность друг друга при совместном действии на бактериальные патогены. Такие соединения, действуя в синергизме, способны не только быстро и эффективно уничтожать патогены, но и препятствовать формированию резистентности в тех случаях, когда это возможно при применении индивидуальных соединений. Потенциальным источником коктейлей АМП, способных действовать в синергизме, являются организмы, одновременно экспрессирующие защитные пептиды, относящиеся к различным структурным классам. Среди млекопитающих такими организмами являются многие представители отряда китопарнокопытных (лат. Cetartiodactyla). Китопарнокопытные животные продуцируют ряд АМП, особую роль среди которых играют пептиды, относящиеся к семейству кателицидинов. Отличительной чертой данного семейства является общий тип структуры белка-предшественника, включающего три основных функциональных элемента: сигнальный пептид, обогащенный отрицательно заряженными аминокислотами белок-носитель, содержащий консервативный кателиновый домен, и вариативную последовательность, кодирующую зрелый пептид, отделенную от белка-носителя сайтом ферментативного процессинга. Зрелые кателицидины могут относиться к различным структурным классам, таким как  $\alpha$ -спиральные,  $\beta$ -шпильчатые, пролин-богатые и другие АМП. Поскольку арсенал защитных пептидов у многих видов животных включает в себя сразу несколько структурно различных кателицидинов, в ряде случаев коэкспрессируемых клетками иммунной системы, было высказано предположение, что данные пептиды могут действовать в синергизме. Изучение природных коктейлей АМП может дать ценную информацию о механизмах их антибактериального действия, что поможет осуществить рациональный дизайн новых антимикробных препаратов на их основе. Кроме того,

это даст информацию о возможном взаимодействии новых потенциальных пептидных антибиотиков с собственными пептидами иммунной системы человека.

### **Цели и задачи работы**

Целью данной работы было определить основные механизмы совместного действия пептидов китопарнокопытных при их одновременном применении, а также добиться снижения токсичности исследуемых пептидов в отношении нормальных клеток человека. Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить структурное и функциональное разнообразие кателицидинов китопарнокопытных. Разработать схему получения и выделить рекомбинантные аналоги кателицидинов козы *Capra hircus*, кашалота *Physeter catodon* и свиньи *Sus scrofa*, а также их модифицированные варианты.

2. Провести структурно-функциональное исследование пролин-богатого кателицидина mini-ChVac7.5N $\alpha$ , способного ингибировать бактериальный биосинтез белка, а также изучить биологическую активность его модифицированных вариантов.

3. Исследовать природное многообразие додекапептидов китопарнокопытных. Изучить структурную организацию кателицидина ChDode козы *Capra hircus* и его биологическую активность.

4. Изучить механизмы совместного действия коэкспрессирующихся кателицидинов из лейкоцитов козы *Capra hircus* в отношении бактериальных клеток. Провести оценку возможности их совместного применения для терапии бактериальных инфекций.

5. Исследовать природное многообразие протегринов китопарнокопытных. Провести структурно-функциональное исследование аналогов протегрина свиньи *Sus scrofa* с целью создания на его основе нового антимикробного агента.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

В ходе выполнения настоящей работы были получены рекомбинантные аналоги ряда кателицидинов млекопитающих семейства китопарнокопытных. Разработана биотехнологическая система получения кателицидинов с

использованием гетерологичной экспрессии в бактериальной системе. Изучена биологическая активность полученных кателицидинов.

Показана способность  $\alpha$ -спирального кателицидина козы *Capra hircus* ChMAP-28 эффективно нарушать целостность внешней и цитоплазматической мембран грамотрицательных бактерий. Установлена способность кателицидина козы *Capra hircus* mini-ChVac7.5N $\alpha$  и его укороченного аналога ингибировать работу бактериальной рибосомы, а также показана роль С-концевого участка пептида в его проникновении в клетку через бактериальные мембраны. Впервые получен ряд модифицированных аналогов mini-ChVac7.5N $\alpha$  и изучена их активность в отношении бактериальных клеток. Доказана ключевая роль бактериального транспортера SbmA в проникновении пролин-богатых пептидов в клетки грамотрицательных бактерий.

Изучено природное разнообразие и биологическая активность кателицидиновых додекапептидов китопарнокопытных. Показано, что додекапептид козы ChDode образует антипараллельный димер. Впервые обнаружен и изучен ортолог додекапептида ChDode – кателицидин PcDode из кашалота *Physeter catodon*. Установлено, что структура пептида PcDode состоит из двух додекапептидных блоков и замыкается в  $\beta$ -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями. Показано, что механизм действия ChDode обусловлен его действием на мембрану бактериальных клеток.

Впервые изучено совместное действие кателицидинов различных структурных классов в отношении бактериальных клеток. Выявлены выраженные синергические эффекты в пептидных парах ChDode + ChMAP-28 и mini-ChVac7.5N $\alpha$  + ChMAP-28.

Разработан протокол тестирования динамики формирования резистентности бактериальных штаммов в отношении АМП. Изучена способность к формированию резистентности бактериальными штаммами в присутствии субингибирующих концентраций индивидуальных кателицидинов и их смесей. Охарактеризованы отдельные мутации *E. coli*, приводящие к формированию резистентности к пролин-богатым кателицидинам.

Методом сайт-направленного мутагенеза получен ряд аналогов  $\beta$ -шпилечного кателицидина свиньи *Sus scrofa* (протегрин), обладающих более высоким

терапевтическим индексом по сравнению с природным пептидом за счет снижения их цитотоксичности при сохранении противобактериальной активности. Для лучшего из полученных аналогов значение терапевтического индекса было выше в 30 раз по сравнению с природным протегрином. Эффективность данного аналога была подтверждена *in vivo* на модели мышей, зараженных летальной инфекцией *E. coli* ATCC 25922.

Теоретическая значимость работы подтверждается публикациями в высокорейтинговых рецензируемых профильных международных журналах, входящих в списки изданий, индексируемых базами данных Web of Science, SCOPUS и РИНЦ.

Практическая значимость данной работы заключается в подтверждении того, что использование коктейлей антимикробных агентов представляет одно из наиболее перспективных направлений в терапии инфекционных заболеваний, поскольку это позволяет, с одной стороны, свести к минимуму токсические эффекты отдельных АМП за счет снижения эффективной дозы, а с другой, противодействовать формированию резистентности в отношении отдельных компонентов коктейля. Полученные данные позволяют по-новому оценить перспективы использования пептидных препаратов, способных действовать в синергизме с собственными молекулярными факторами иммунной системы человека.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Бактериальный транспортер SbmA играет ключевую роль в процессе проникновения пролин-богатых АМП в грамотрицательные бактерии. Определяющую роль в способности к проникновению через бактериальную мембрану пролин-богатых Vas7-подобных АМП играет С-концевой участок пептида.
2. Среди представителей китопарнокопытных широко распространены  $\beta$ -структурные кателицидины. Протегрин-подобные  $\beta$ -шпильки встречаются исключительно среди представителей подотряда свинообразных (лат. *Suina*), в то время как у других представителей отряда *Cetartiodactyla*  $\beta$ -структурные кателицидины представлены гомодимерными додекапептидами. В геноме кашалота

*Physeter catodon* обнаружен уникальный  $\beta$ -шпилечный кателицидин, структура которого состоит из двух додекапептидных цепей.

3. Совместно экспрессирующиеся в клетках китопарнокопытных кателицидины действуют в синергизме в отношении бактериальных клеток. Механизм синергизма отличается для разных пар кателицидинов. Совместное применение кателицидинов препятствует формированию бактериальной резистентности к отдельным компонентам коктейля.

4. Протегрин свиньи *Sus scrofa* является перспективным скаффолдом для создания на его основе менее токсичных аналогов в качестве потенциальных препаратов для системной антибактериальной терапии. Получен аналог, терапевтический индекс которого в 30 раз выше, чем у природного протегрин. Эффективность аналога подтверждена *in vivo* на модели мышинной септицемии.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность результатов исследований подтверждена современными биоинформатическими и экспериментальными подходами, а также воспроизводимостью, статистической обработкой и согласованностью данных, полученных различными методами, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию, времяпролетную масс-спектрометрию МАЛДИ, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, спектроскопию кругового дихроизма, Фурье ИК-спектроскопию, проточную цитометрию, а также другими методами качественного и количественного анализа.

Результаты работы опубликованы в 7 статьях в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах. Основные результаты работы докладывались на международных и российских научных конференциях, в том числе на Европейском симпозиуме, посвященном антимикробным веществам и устойчивости к ним (CESAR 2015), международных зимних молодежных научных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", V съезде биохимиков России, III международной конференции «Антимикробные пептиды как прототипы новых антибиотиков».

## Список опубликованных работ по теме исследования:

## Статьи:

1. Bolosov I.A., Kalashnikov A.A., Pantelev P.V., Ovchinnikova T.V. Analysis of Synergistic Effects of Antimicrobial Peptide Arenicin-1 and Conventional Antibiotics. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, Vol. 162, No. 6, P. 765-768. DOI:10.1007/s10517-017-3708-z
2. Pantelev P.V., Bolosov I.A., Kalashnikov A.A., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Emelianova A.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Combined Antibacterial Effects of Goat Cathelicidins With Different Mechanisms of Action. *Frontiers in Microbiology*, 2018, Vol. 9, P. 2983. DOI:10.3389/fmicb.2018.02983
3. Bolosov I.A., Pantelev P.V., Sychev S.V., Sukhanov S.V., Mironov P.A., Myshkin M.Yu., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. Dodecapeptide Cathelicidins of *Cetartiodactyla*: Structure, Mechanism of Antimicrobial Action, and Synergistic Interaction with Other Cathelicidins. *Frontiers in Microbiology*, 2021, Vol. 12, P. 725526. DOI:10.3389/fmicb.2021.725526
4. Pantelev, P. V., Bolosov, I. A., Khokhlova, V. A., Dhanda, G., Balandin, S. V., Haldar, J., & Ovchinnikova, T. V. Analysis of Antibacterial Action of Mammalian Host-Defense Cathelicidins and Induction of Resistance to Them in M $\beta$ L-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2022, Vol. 172 No. 4, P. 447-452. DOI:10.1007/s10517-022-05411-8
5. Pantelev P.V., Safronova V.N., Kruglikov R.N., Bolosov I.A., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. A Novel Proline-Rich Cathelicidin from the *Alpaca vicugna pacos* with Potency to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria: Mechanism of Action and the Functional Role of the C-Terminal Region. *Membranes*, 2022, Vol. 12, No. 5, P. 515. DOI:10.3390/membranes12050515
6. Bolosov I.A., Pantelev P.V., Balandin S.V., Shamova O.V., Ovchinnikova T.V. Structural and Functional Characteristics of the Proline-Rich Antimicrobial Peptide Minibactenecin from Leukocytes of Domestic Goat *Capra hircus*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, Vol. 174, No. 4, P. 440-445. DOI:10.1007/s10517-023-05725-1
7. Bolosov I.A., Pantelev P.V., Sychev S.V., Khokhlova V.A., Safronova V.N., Toropygin I.Yu., Kombarova T.I., Korobova O.V., Pereskokova E.S., Borzilov A.I.,

Ovchinnikova T.V., Balandin S.V. Design of Protegrin-1 Analogs with Improved Antibacterial Selectivity. *Pharmaceutics*, 2023, Vol. 15, No. 8, P. 2047.

DOI:10.3390/pharmaceutics15082047

Патенты:

1. Патент RU 2618850 от 11.05.2017. Плазмидный вектор pET-mChVac75Na, штамм бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)/ pET-mChVac75Na для экспрессии антимикробного пептида минибактенецина ChVac7.5N $\alpha$  и способ получения указанного пептида. Баландин С.В., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Овчинникова Т.В.
2. Патент RU 2702661 от 09.10.2019. Пептид, проявляющий антибактериальные и противоопухолевые свойства, Пантелеев П.В., Емельянова А.А, Болосов И.А., Баландин С.В., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В.
3. Патент RU 2778856 от 26.08.2022. Катионный пептид, проявляющий антибактериальные свойства, Пантелеев П.В., Болосов И.А., Овчинникова Т.В.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Антимикробные пептиды — молекулярные компоненты системы врожденного иммунитета

Выживание в нестерильной среде обитания требует наличие способности к защите организма хозяина от внешних биологических факторов, таких как бактерии, вирусы и другие микроорганизмы. В ходе эволюционного развития животные выработали разнообразные механизмы первичной защиты для подавления роста и предотвращения проникновения различных микроорганизмов. Эта первая линия защиты от патогенных микроорганизмов обеспечивается системой врожденного иммунитета. Одним из механизмов реализации функций данной системы является выработка эндогенных антибиотических соединений, которые называются антимикробными пептидами (от англ. antimicrobial peptides, сокращенно АМП) или пептидами защиты хозяина (от англ. host defence peptides). АМП играют важную роль в обеспечении начального этапа механизма защиты организма хозяина.

Впервые антимикробные соединения пептидной природы были обнаружены в простых организмах, таких как бактерии и грибы, и считались уникальными защитными соединениями одноклеточных организмов [8]. Характерными особенностями многих из таких соединений были нерибосомальный синтез, наличие нестандартных аминокислот и циклическая структура. Однако, по мере расширения области поиска новых защитных пептидов появились данные об АМП из многоклеточных организмов, например, после выделения бомбинина из слизи на коже жабы *Bombina variegata* [9,10] и цекропина из гемолимфы мотылька *Hyalophora cecropia* [11]. Открытие цекропина особенно интересно тем, что оно позволило ответить на вопрос о том, как не обладающие адаптивным иммунитетом насекомые обеспечивают себе эффективную защиту от микробов. В дальнейшем АМП были также выделены из лейкоцитов различных видов млекопитающих, включая человека, что расширило представления об АМП, продуцируемых не только организмами с отсутствующим адаптивным иммунитетом [12,13]. Эти открытия положили начало исследованиям АМП как важных защитных молекул у многих видов живых организмов. В настоящий момент АМП обнаружены у всех биологических видов, включая млекопитающих и человека [14], птиц [15],

насекомых [16], грибов [17] и растений [18], что свидетельствует о том, что АМП являются важными факторами иммунитета всех эукариотических.

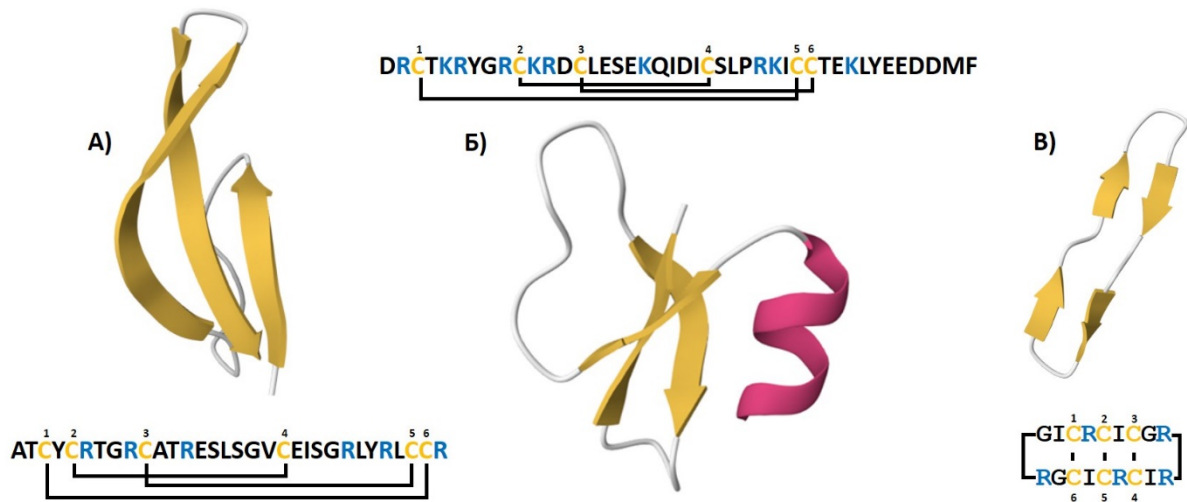
Количество обнаруженных природных АМП постоянно растет. Существующие базы данных (например, <https://aps.unmc.edu/AP/>) содержат более 4000 различных уникальных природных АМП. Большинство АМП обладает рядом общих структурных особенностей, таких как небольшой размер (в большинстве случаев до 40 аминокислотных остатков), амфифильность и катионная природа. Чаще всего аминокислотные остатки в АМП располагаются таким образом, что свернутый пептид имеет амфипатическую структуру. Эти свойства АМП определяют их способность взаимодействовать с бактериальной мембраной, что является важным этапом их антимикробного действия. Некоторые АМП приводят к пермеабиллизации или разрушению мембраны, что является основным механизмом их антимикробного действия [19], другие — транслоцируются внутрь клетки и действуют на различные внутриклеточные мишени [20]. Большинство АМП уникальны по своим свойствам, но среди них можно выделить определенные семейства, основанные на сходстве структурных форм зрелых пептидов и/или их белков-предшественников.

## **1.2. Семейства антимикробных пептидов млекопитающих**

### **1.2.1. Дефенсины**

Наиболее крупными семействами антимикробных пептидов являются дефенсины (от англ. defense — защита) и кателицидины. Дефенсины представляют собой катионные, богатые аргинином негликозилированные пептиды, содержащие шесть или восемь цистеинов, образующих от трех до четырех внутримолекулярных дисульфидных мостиков [21]. Все дефенсины разделяются на два суперсемейства — транс-дефенсины, объединяющие дефенсин-подобные АМП человека и других позвоночных, и цис-дефенсины, включающие дефенсин-подобные пептиды растений и грибов [22]. Эти суперсемейства были сформированы на основе особенностей их вторичной и третичной структуры, включающей формирующие дисульфидные связи цистеиновые мотивы, а также с учетом сходства нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов. Дефенсины млекопитающих можно

разделить на три основных структурных класса:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\theta$ -дефенсины [23] (**Рисунок 1**).



**Рисунок 1.** Структуры дефенсинов млекопитающих на основе данных ЯМР-спектроскопии а также их аминокислотные последовательности и организация дисульфидных связей. А) Человеческий  $\alpha$ -дефенсин 5 (PDB 2LXZ), Б) человеческий  $\beta$ -дефенсин 1 (PDB 1IJV) и В)  $\theta$ -дефенсин приматов (ретроциклин-2, PDB 2ATG). Желтым цветом выделены  $\beta$ -структурные участки, красным —  $\alpha$ -спиральный фрагмент.

Среди  $\alpha$ -дефенсинов наиболее изученными считаются человеческие HNP-1 из нейтрофилов [21] и HD-5, HD-6 из клеток тонкого кишечника [24].  $\alpha$ -Дефенсины имеют относительно небольшой размер, чаще всего от 30 до 35 аминокислотных остатков, но иногда встречаются более длинные варианты, вплоть до 50 остатков. Также для  $\alpha$ -дефенсинов характерно консервативное расположение дисульфидных связей между остатками Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>6</sub>, Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>4</sub>, и Cys<sub>3</sub>-Cys<sub>5</sub> (**Рисунок 1А**). Все шесть  $\alpha$ -дефенсинов человека, восемь  $\alpha$ -дефенсинов макаки-резус, а также дефенсины гамадрила демонстрируют среднюю степень гомологии — от 30 до 90% и имеют суммарный положительный заряд от +2 до +8 [25]. Кроме того, отличительными особенностями  $\alpha$ -дефенсинов считаются консервативные аминокислотные остатки. Ориентируясь на аминокислотную последовательность дефенсина HD-5, такими остатками являются положительно заряженный остаток аргинина в положении 6, остаток аргинина, отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты в положении 14 и остаток глицина в положении 18. Интересно, что продуцируемые в кишечнике клетками Панета дефенсины HD-5 и HD-6, несмотря на высокую степень гомологии, демонстрируют принципиальную разницу в механизмах антимикробного

действия. Оба пептида играют ключевую роль в регуляции метаболических процессов, опосредованных кишечной микробиотой и поддержании гомеостаза [26,27]. Кроме того, показана связь между болезнью Крона и уменьшением уровня синтеза дефенсинов клетками Панета [28].

В отличие от  $\alpha$ -дефенсинов,  $\beta$ -дефенсины характеризуются большей длиной аминокислотной последовательности — от 36 и до 100-150 аминокислотных остатков, а также особой аранжировкой трех внутримолекулярных дисульфидных связей: Cys<sub>1</sub>- Cys<sub>5</sub>, Cys<sub>2</sub>- Cys<sub>4</sub>, и Cys<sub>3</sub>- Cys<sub>6</sub> (**Рисунок 1Б**). Кроме того,  $\beta$ -дефенсины не имеют в своей последовательности высококонсервативных аминокислотных остатков, однако их общую первичную структуру можно выразить в виде формулы X<sub>2-10</sub>CX<sub>5-6</sub>(G/A)XCX<sub>3-4</sub>CX<sub>9-13</sub>CX<sub>4-7</sub>CCX<sub>n</sub>, где С — остаток цистеина, G/A — остаток глицина или аланина, X — любой другой аминокислотный остаток [29]. Наиболее изученными представителями  $\beta$ -дефенсинов являются человеческие hBD, обнаруживаемые в плазме крови и эпителиальных клетках [30]. Было показано, что эпителиальные клетки могут более эффективно продуцировать  $\beta$ -дефенсины при стимуляции при помощи провоспалительных цитокинов или при контакте с бактериальными патогенами [31,32]. Интересно, что падение уровня экспрессии дефенсинов наблюдается у больных атопическим дерматитом [33]. Кроме того, были высказаны предположения, что нарушение активности экспрессируемых эпителиальными клетками  $\beta$ -дефенсинов является основополагающим фактором патогенеза при муковисцидозе [34]. Это позволяет выделить  $\beta$ -дефенсины как важнейший фактор поверхностной защиты организма.

Наибольшие структурные отличия имеют  $\theta$ -дефенсины, называемые также ретроциклинами и образующиеся в ходе циклизации двух пептидов-предшественников, состоящих из 9 аминокислотных остатков (**Рисунок 1В**). На уровне пептидов данные соединения были обнаружены только у некоторых обезьян. Впервые  $\theta$ -дефенсины были выделены из лейкоцитов макаки-резус *Macaca mulatta* [35] и позднее были также обнаружены у павианов *Papio anubis* [36]. В человеческом организме, как и у ряда других приматов,  $\theta$ -дефенсины не продуцируются, поскольку гены, кодирующие данные АМП, имеют стоп кодон в области сигнальной последовательности [37]. Интересно, что у некоторых человекообразных обезьян, например, у орангутанов и сиамангов, были обнаружены одновременно как

пептидные  $\theta$ -дефенсины, так и их псевдогены [38]. Одной из уникальных особенностей процесса биосинтеза  $\theta$ -дефенсинов является тот факт, что зрелые пептиды образуются в результате рекомбинации продуктов двух независимо транскрибируемых генов. Цикл формируется за счет замыкания пептидных связей между первым аминокислотным остатком одного пептида и девятым аминокислотным остатком второго и наоборот, с образованием общего 18-членного кольца. Рекомбинация продуктов может происходить различным образом, давая в результате несколько различных продуктов [39]. Существует предположение, что  $\theta$ -дефенсины появились в ходе эволюции из генов  $\alpha$ -дефенсинов за счет формирования преждевременного стоп-кодона [40]. Таким образом, ретроциклины имеют достаточно компактный размер и высокий суммарный заряд — от +4 до +6. Пространственная структура этих пептидов сформирована из двух антипараллельных  $\beta$ -тяжей с поворотами, стабилизированными тремя дисульфидными связями. С точки зрения вторичной структуры ретроциклины формируют классическую  $\beta$ -шпильку, с той разницей, что оба конца молекулы содержат  $\beta$ -поворот. Как и многие другие  $\beta$ -шпилечные АМП, ретроциклины демонстрируют широкий спектр антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в также грибов рода *Candida* [36,41]. Важной характеристикой  $\theta$ -дефенсинов является сохранение антимикробной активности в физиологических условиях: в присутствии 150 мМ NaCl активность снижается незначительно, что выгодно отличает их от многих других антимикробных пептидов [35]. Интересно, что на фоне других  $\beta$ -шпилечных АМП ретроциклины обладают достаточно низкой цитотоксичностью [42]. При этом их способность вызывать нарушение барьерной функции бактериальной мембраны зависит от мембранного потенциала и повышается при физиологической активности бактериальных клеток, например, при добавлении в среду глюкозы. Кроме того, было показано, что обработка бактериальных клеток  $\theta$ -дефенсинами приводит к высвобождению аутолитических ферментов, которые гидролизуют пептидные мостики между гликановыми цепями муреина в клеточной стенке [43].

Все дефенсины образуют небольшие и компактные свернутые структуры, как правило, обладающие большим положительным зарядом и высокой стабильностью благодаря наличию дисульфидных связей. Дефенсины проявляют *in vitro* активность

в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов, простейших и вирусов в концентрациях от 0,5 до 5,0 мкМ. Подобно большинству АМП, дефенсины, в основном взаимодействуют с липидными мембранами микробов и разрушают их, что приводит к гибели микроорганизмов и часто сопровождается их полным лизисом [44,45]. Было показано, что дефенсины способны формировать димеры в водных растворах так же, как некоторые другие  $\beta$ -складчатые АМП. В ряде случаев димеризация и олигомеризация являются ключевыми звеньями механизма их антимикробной активности [46]. Дефенсины грибов [47,48] и беспозвоночных [49] способны связываться с высокой аффинностью с липидом II, ключевым мембранным липидом бактерий, участвующем в синтезе пептидогликана в процессе сборки клеточной стенки. Таким образом, связываясь с липидом II, дефенсины специфически ингибируют биосинтез клеточной стенки бактерий. Аналогично, взаимодействие с липидом II было также отмечено для двух дефенсинов млекопитающих, человеческих  $\alpha$ -дефенсин HNP-1 и  $\beta$ -дефенсин hBD3, оба из которых являются антимикробными соединениями широкого спектра действия [50,51]. Также для некоторых дефенсинов была показана способность связывать бактериальные липополисахариды (ЛПС) [52].

Помимо прямого антимикробного действия, дефенсины могут выполнять функцию модуляторов иммунной системы, индуцируя выработку провоспалительных цитокинов и действуя как хемокины для нейтрофилов [53], а также усиливать фагоцитоз макрофагами [54]. Продемонстрирована также способность человеческих  $\alpha$ -дефенсинов активировать хемотаксис моноцитов и направлять их в область инфекции [55]. Причем важно, что концентрации, в которых дефенсины демонстрируют способность к активации хемотаксиса иммунных клеток, на 1-2 порядка ниже, чем концентрации, в которых они проявляют прямое антимикробное действие, что раскрывает их высокую эффективность как иммуномодуляторов [56,57]. Кроме того было показано, что в некоторых случаях восстановление дисульфидных связей дефенсинов приводит к резкому увеличению их антимикробной активности [58], что может свидетельствовать о тесной связи биологической функции дефенсинов с окислительно-восстановительным потенциалом среды. Кроме того, это может являться косвенным свидетельством того, что дефенсины могут быть одновременно заточены под выполнение различных

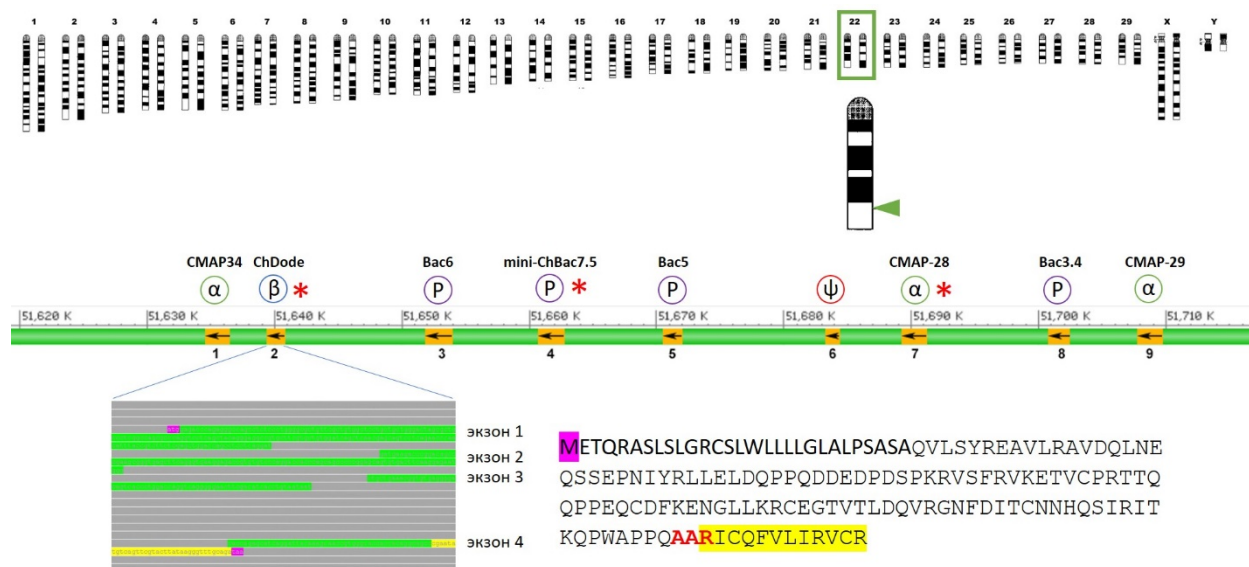
функций, действуя в очаге инфекции как прямой антимикробный агент, а на его периферии — как иммуномодулятор. Интересно, что для  $\theta$ -дефенсинов была показана активность в отношении вируса иммунодефицита человека [37], и потеря данного типа дефенсинов в ходе эволюции, возможно, снизила устойчивость людей к этой группе вирусов.

### 1.2.2. Кателицидины

В отличие от дефенсинов, другое семейство — кателицидины — характеризуется высокой степенью гетерогенности структур зрелых АМП, входящих в состав данного семейства. Основанием для объединения совершенно разных по структуре АМП в одно семейство является общность строения предшественников кателицидинов, содержащих участок, названный кателиновым доменом вследствие его гомологии с белком кателином, ингибитором катепсина L. Предшественники кателицидинов не проявляют антимикробной активности, но после отщепления препрочасти зрелые пептиды приобретают антибиотические свойства [59].

Кателицидины являются эволюционно древней группой АМП. Представители этого семейства обнаружены у всех хордовых животных, от круглоротых до человека. У некоторых организмов, например, у мышей, кроликов, собак и приматов, присутствует только одна копия гена кателицидина, в то время как у некоторых видов рыб, амфибий, рептилий, птиц и у большинства других млекопитающих было идентифицировано от 2 до 11 генов, кодирующих различные кателицидины [60–62]. Гены, относящиеся к данному семейству, были обнаружены у всех позвоночных животных, и помимо этого — в геноме миксин, относящихся к таксону примитивных бесчелюстных животных [63]. Морфологические признаки, ископаемые формы и большинство молекулярных данных указывают на то, что миксины относятся к сестринскому таксону миног и челюстноротых позвоночных. Данные о вымерших организмах свидетельствуют о том, что эти две линии имели общего предка около 0,5 миллиардов лет назад [64]. Таким образом, как семейство генов кателицидины должны были возникнуть на начальных этапах эволюции позвоночных.

Организация кателицидиновых генов имеет высокую степень консервативности у всех позвоночных. Их нуклеотидная последовательность включает в себя четыре экзона. Первые три экзона кодируют пептид-предшественник, состоящий из сигнальной аминокислотной последовательности и кателинового домена. Четвертый экзон кодирует зрелую последовательность кателицидина, отделенную от кателинового домена сайтом процессинга. Как правило, у видов, имеющих более одного представителя семейства кателицидинов, соответствующие гены располагаются компактными кластерами [65] (Рисунок 2). Кроме того, гены некоторых кателицидинов имеют в промоторных областях специфические сайты связывания транскрипционных факторов, повышающих экспрессию этих генов во время воспаления [66,67].

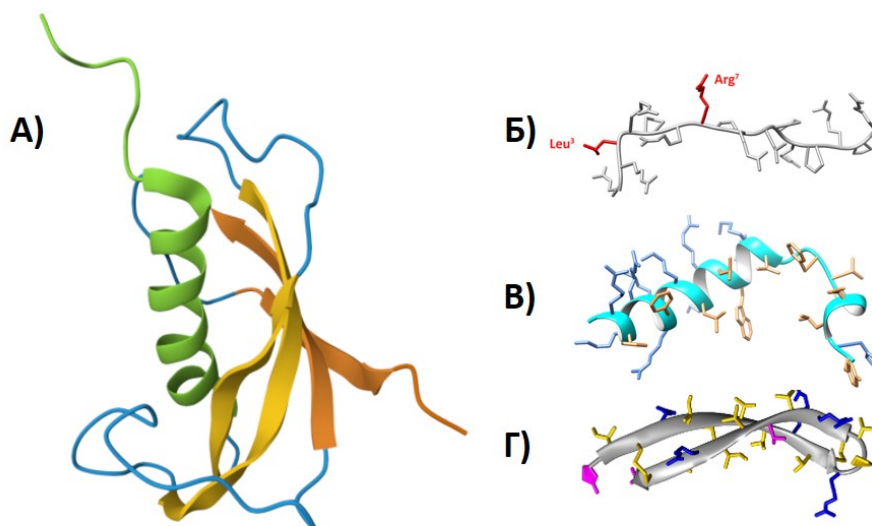


**Рисунок 2.** Организация генов кателицидинов на примере генома козы *Capra hircus* (по данным NCBI). Рассмотрена структура гена бактенецина-1, также известного как додекапептид. Зеленым цветом выделены участки сигнального пептида и кателинового домена, кодируемые первыми тремя экзонами. Желтым цветом выделен фрагмент зрелого додекапептида, отделенный от кателинового домена сайтом процессинга эластазой (AAR).

Последовательность N-концевого участка препропептида высококонсервативна и имеет сходство с кателином — ингибитором цистеиновой протеазы свиньи катепсина L. Было показано, что подобно кателину, этот фрагмент препрокателицидина способен ингибировать активность катепсина L [68]. Функции кателинового домена являются предметом исследований и предположений. Одна из

основных моделей заключается в том, что он способствует биогенезу зрелого пептида. Отрицательно заряженный кателиновый домен может препятствовать действию пептида до его секреции, связываясь с положительно заряженным зрелым пептидом [69]. В качестве альтернативы, кателиновый домен может связывать зрелый пептид, защищая его от деградации протеазами [69]. Помимо способности ингибировать протеазу, кателиновый домен также обладает некоторыми свойствами анионного антимикробного белка и проявляет активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [68], хотя механизм этой активности пока остается не до конца изученным.

Хотя N-концевые участки препрокателицидинов обладают достаточно высокой степенью гомологии, их C-концевые фрагменты, кодирующие зрелые кателицидины, значительно различаются как по длине (от 12 до 100 аминокислотных остатков), так и по биологическим функциям зрелых пептидов. На основе аминокислотных последовательностей зрелые кателицидины можно разделить на три структурных группы (**Рисунок 3**). Первая группа включает линейные  $\alpha$ -спиральные кателицидины без остатков цистеина. К этой группе можно отнести такие пептиды, как человеческий LL-37 (функциональная часть кодируемого геном *SAMP* кателицидина hCAP-18, также обозначаемого как hCAP-18/LL-37) [70] и его мышинный аналог CRAMP [71]. Ко второй группе относятся пептиды, имеющие в своем составе четное количество остатков цистеина, которые формируют дисульфидные мостики в структуре зрелого кателицидина. К этой группе можно отнести, например,  $\beta$ -шпилечный АМП протегрин из нейтрофилов свиньи *Sus scrofa domesticus* [72], а также бактенецин-1 (додекапептид) из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* [73]. К третьей группе можно отнести кателицидины с неупорядоченной структурой, обогащенные определенными аминокислотами, например, пролин-богатые кателицидины бактенецин-7 (Bac7) быка *Bos taurus* [74] и PR-39 свиньи *Sus scrofa* [75].



**Рисунок 3.** А) Пространственная структура кателинового домена протегрина в водном растворе, установленная на основе данных ЯМР-спектроскопии (PDB 1N5H).

Многообразие структур зрелых кателицидинов: Б) Пролин-богатый фрагмент кателицидина mini-ChVac7.5Nα1–16. Красным цветом выделены аминокислотные остатки, отличающиеся от аналогичного фрагмента Vac7. В) α-Спиральный кателицидин ChMAP-28. Структура смоделирована с помощью программы MODELLER (Sali and Blundell, 1993) на основе ЯМР-структуры BMAP-27. Г) β-Шпильчатый кателицидин PcDode. Структура установлена методом ЯМР-спектроскопии.

Таким образом, кателицидины синтезируются в виде неактивных препропептидов. Для проявления их антимикробной активности необходимо отделить зрелый С-концевой пептид от белка-носителя. Предполагается, что этот процесс созревания кателицидинов происходит в активированных нейтрофилах во время дегрануляции и перемещения в фагоцитарную вакуоль или внеклеточную среду [76]. Высвобождение активных АМП зависит от ферментов, осуществляющих процессинг между кателиновым доменом и последовательностью зрелого кателицидина. Для большинства бычьих и свиных кателицидинов гидролиз осуществляется эластазой — сериновой протеазой, присутствующей в нейтрофилах. Известно, что активный центр этой протеазы вмещает аминокислотные остатки с небольшими боковыми группами, такие как глицин, аланин, серин или валин. В кателицидинах млекопитающих чаще всего в сайте расщепления встречаются валин, а также аланин и изолейцин [69]. В случае человеческого hCAP-18 эластаза

оказывается неэффективна из-за особенностей структуры сайта расщепления, в частности, из-за содержащегося в нем остатка треонина, поэтому аналогичную функцию выполняет протеиназа-3 [67]. Интересно, что у наиболее древних представителей семейства — кателицидинов миксин, сайт расщепления содержит четыре остатка аргинина и является специфичным для некоторых ферментов, например, для фуриновых протеиназ [63]. Таким образом, у различных биологических видов финальный этап высвобождения зрелых кателицидинов регулируется различными ферментами. Большинство кателицидинов были обнаружены в гранулах нейтрофилов и макрофагов, где они, судя по всему, участвуют в кислород-независимых механизмах проявления антимикробной активности [77]. Однако, впоследствии они также были обнаружены и в других клетках, включая эпителиальные [78], что свидетельствует о более широкой роли кателицидинов в иммунном ответе.

### **1.3. Биологическая активность кателицидинов**

Поскольку зрелые кателицидины имеют высокую степень гетерогенности, при обсуждении их биологической активности необходимо четкое разделение по группам, сформированным на основе структурной гомологии. Кроме того, в различных организмах кателицидины выполняют различные функции — от антимикробных агентов до иммуномодуляторов. Рассматривая активность кателицидинов в целом, можно выделить два основных механизма их прямого антимикробного действия: 1) взаимодействие с мембраной микроорганизма и непосредственное нарушение ее целостности и 2) транслокация через мембрану и последующее действие на внутриклеточные мишени.

Как правило, мембраноактивные кателицидины действуют по тем же принципам, что и другие мембранотропные АМП. Считается, что начальное связывание АМП с мембраной зависит от электростатических взаимодействий между положительно заряженными пептидами и отрицательно заряженными молекулами липидов на поверхности клетки микроорганизма. Дальнейшее встраивание АМП в мембрану происходит за счет амфифильных свойств пептида по одной из трех [79] основных моделей:

а) Модель бочонка предполагает агрегацию АМП на поверхности мембраны с последующим заглублением и формированием трансмембранных пор, где гидрофобные участки пептидов направлены внутрь липидного бислоя, а гидрофильные поверхности выстилают внутреннюю полость сформировавшихся пор [80]. Образовавшаяся таким образом пора действует как неспецифический канал, приводя к гибели клеток за счет нарушенной барьерной функции мембраны.

б) Модель тороидальной поры (другое название «агрегатная модель») предполагает формирование пептидом неструктурированных динамических кластеров в составе мембраны, которые трансформируются с образованием короткоживущих пор. Основным отличием от модели бочонка, помимо времени жизни пор, является то, что данная модель предполагает участие молекул липидов в формировании структуры поры [19]. Сформированные агрегатные каналы могут приводить к проникновению пептидов внутрь клетки, так и к высвобождению внутриклеточных компонентов.

в) Ковровая модель предполагает постепенное накопление АМП на поверхности бактериальной мембраны, которое при достаточно высокой концентрации пептида приводит к изменению геометрии мембраны [81]. В отличие от предыдущих моделей, в этом случае не наблюдаются внедрение пептида в гидрофобную область мембраны и агрегация молекул АПМ. Разрушение мембраны наступает при достижении определенной пороговой концентрации пептида. По мере накопления пептида на поверхности мембраны происходит ее дестабилизация по детергент-подобному механизму и возникают локальные изгибы мембраны, приводящие к частичному внедрению АПМ в структуру липидного бислоя. В результате происходит формирование пептид-липидных мицелл, что в итоге приводит к полному лизису мембраны.

Некоторые кателицидины не обладают способностью к разрушению мембраны в физиологических условиях и могут использовать специфические белки-транспортеры для проникновения в бактериальную клетку. Например, проникновение в клетку аналогов пролин-богатого *Vac7* опосредовано мембранными транспортерами, в частности, белком *SbmA*, что подтверждается экспериментами с мутантными штаммами *E. coli* с нокаутом гена *sbmA* [82]. Для ряда АМП была показана способность действовать на различные внутриклеточные

мишени. Многие кателицидины обладают ДНК-связывающей способностью [83]. Помимо этого, в качестве внутриклеточных мишеней АМП идентифицированы различные специфические молекулы. Например, микроцин В17 ингибирует ДНК-гиразу, тем самым влияя на репликацию ДНК [84], в то время как главной мишенью многих других АМП считается белок теплового шока DnaK [85]. Его основная функция — обеспечение правильного фолдинга белков, рефолдинг поврежденных структур и предотвращение агрегации белков, особенно в стрессовых условиях. Однако, главной мишенью пролин-богатых кателицидинов является бактериальная рибосома. Было показано, что пролин-богатые АМП (ПБ-АМП) могут взаимодействовать с рибосомой и подавлять биосинтез белка двумя основными способами:

1) ПБ-АМП I типа, называемые также онкоцин-подобными АМП из-за структурного сходства с одноименным пролин-богатым АМП насекомых [86]. Онкоцин-подобные пептиды характеризуются наличием консервативного мотива в N-концевой области, достаточно протяженного для связывания в пределах пептидного туннеля рибосомы. К этой группе относятся в том числе Vas7 и родственные ему кателицидины. Основным механизмом действия онкоцин-подобных пептидов является их взаимодействие с протяженным участком пептидного туннеля 50S субъединицы рибосомы с перекрытием сайта связывания аминоксил-тРНК в пептидил-трансферазном центре (ПТЦ), тем самым блокируя трансляцию на этапе ее инициации или на первом шаге элонгации [87].

2) ПБ-АМП II типа или апидацин-подобные пептиды, названные так из-за гомологии с пептидом апидацином 1b из медоносной пчелы *Apis mellifera* [88]. В отличие от предыдущего типа, апидацин-подобные пептиды ингибируют синтез белка на стадии терминации трансляции. Для прочного связывания ПБ-АМП II типа с рибосомой необходимо присутствие факторов терминации трансляции RF1 или RF2. Эти пептиды связываются в пептидном туннеле 70S рибосомы после завершения биосинтеза и высвобождения полипептида и взаимодействуют с факторами терминации (RF1/RF2) на рибосоме, препятствуя их диссоциации. Данный механизм уникален среди известных рибосом-направленных антибиотиков и обеспечивает высокую селективность действия.

## 1.4. Основные представители семейства кателицидинов

### 1.4.1. Мембранотропные $\alpha$ -спиральные кателицидины

Амфипатические  $\alpha$ -спиральные пептиды принадлежат к одному из часто встречающихся структурных классов как АМП в целом, так и кателицидинов в частности. С одной стороны, к этой группе АМП можно отнести человеческий LL-37. Однако, с учетом имеющихся у данного пептида дополнительных функций, его свойства целесообразно рассмотреть отдельно (см. раздел 1.4.2). Классические  $\alpha$ -спиральные АМП, как правило, сосредоточены на узкой задаче эффективного разрушения мембран микроорганизмов. К таким пептидам относятся, например, выделенные из нейтрофилов быка *Bos Taurus* антимикробные пептиды ВМАР-27 и ВМАР-28 сокращенное название которых расшифровывается как «бычий миелоидный антимикробный пептид» и указывает на то, что данные пептиды выделены из бычьих нейтрофилов. Следует отметить, что ВМАР-27 и ВМАР-28 — это различные АМП, имеющие только 28,5% идентичных аминокислот и 50%-ный общий уровень гомологии [89]. Пептиды имеют длину 26 и 27 аминокислотных остатков, соответственно, и обладают амидированным С-концевым остатком. Будучи классическими  $\alpha$ -спиральными амфипатическими АМП, ВМАР действуют на мембрану целевых микроорганизмов и вызывают ее пермеабиллизацию. Данные пептиды активны в отношении широкой панели грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов, причем способны оказывать антимикробное действие в микромолярном диапазоне концентраций независимо от присутствия солей в физиологических концентрациях [89]. Примечательно, что ВМАР демонстрируют достаточно высокий уровень токсичности в отношении нормальных клеток. Ряд исследований показал, что основной вклад в цитотоксические свойства пептида вносит его С-концевой фрагмент, удаление которого улучшает селективность ВМАР в отношении прокариотических мембран. Аналогичные эффекты были продемонстрированы и для других подобных АМП, например, свиного РМАР-36.

Свиной кателицидин РМАР-36 был впервые описан в 1994 году как катионный амфипатический  $\alpha$ -спиральный АМП, содержащий 36 аминокислотных остатков, включая пролин-богатую неструктурированную область. Большинство его основных остатков расположены в 20-членном N-концевом участке зрелой формы

пептида, образующем  $\alpha$ -спиральную структуру [90]. С-Концевой участок пептида обогащен пролином и имеет высокую степень гидрофобности. РМАР-36 содержит в своем составе единственный аминокислотный остаток цистеина в положении 35, что обеспечивает возможность формирования межмолекулярной дисульфидной связи с образованием гомодимера [91]. Исследование структурно-функциональной взаимосвязи показали, что основной вклад в антимикробную активность вносит центральный участок последовательности РМАР<sub>7-24</sub>, при этом отдельно выделяется роль гидрофобного остатка триптофана в положении 23 [92,93]. Полноразмерный пептид проявляет более высокую цитотоксическую и гемолитическую активность по сравнению с его укороченными формами. Интересно, что РМАР-36 обладает способностью связывать ЛПС, тем самым подавляя опосредованные этим активатором иммунные реакции и ЛПС-индуцированное воспаление [94]. Было показано, что мономерные аналоги РМАР-36, лишённые остатка цистеина, обладают схожей с полноразмерным вариантом антимикробной активностью, но имеют сниженную способность связывать ЛПС [95]. Интересно, что некоторые другие  $\alpha$ -спиральные кателицидины, например, куриный кателицидин СATH-2, также демонстрируют способность к связыванию молекул ЛПС, хотя сам механизм связывания, по всей видимости, отличается [95]. Таким образом, РМАР-36 модулирует иммунный ответ, связанный с активацией Толл-подобных рецепторов (TLR), нейтрализуя опосредованную ЛПС активацию макрофагов. С другой стороны, пептид значительно усиливает стимуляцию TLR свинных дендритных клеток, реагирующих на бактериальную ДНК, что приводит к усилению иммунного ответа, связанного с экспрессией интерферона- $\alpha$  [96]. Однако, этот эффект, судя по всему, является видоспецифичным, поскольку аналогичные эксперименты на макрофагах других животных не продемонстрировали схожих результатов [94].

Куриный кателицидин СATH-2 интересен, в первую очередь, своей необычной структурой: его зрелая полипептидная цепь состоит из двух  $\alpha$ -спиральных участков, разделенных шарнирной пролин-богатой областью. Как и большинство других  $\alpha$ -спиральных кателицидинов, СATH-2 нацелен на мембрану бактериальных клеток и вызывает ее разрушение в микромолярном диапазоне концентраций [97,98]. Кроме того, было показано, что СATH-2 обладает иммуномодулирующими свойствами. Так, СATH-2 стимулирует продукцию

хемокинов в куриных макрофагах [99], а также обладает ЛПС-связывающей способностью. Было показано, что куриный кателицидин способен индуцировать высвобождение TNF $\alpha$  клетками мышинных макрофагов в ответ на присутствие бактериальной ДНК. Примечательно, что аналогичной способностью обладает структурно-схожий свиной кателицидин PMAP-23, также состоящий из двух  $\alpha$ -спиральных участков, разделенных пролин-богатой шарнирной областью [94,100]. При этом, как было описано выше, другой свиной кателицидин — PMAP-36, в аналогичных условиях не оказал влияния на мышинные макрофаги.

Таким образом, несущие  $\alpha$ -спиральный мотив кателицидины могут в значительной степени различаться по своей структуре, но при этом их характерной особенностью остается мембранотропный механизм действия. Кроме того, большинство  $\alpha$ -спиральных кателицидинов обладают способностью связывать ЛПС и влиять на активность различных TLR, подавляя или наоборот активируя связанные с ними иммунные ответы. Однако, связанные с иммуномодулирующими функциями реакции часто оказываются видоспецифичными, что заставляет с осторожностью относиться к экспериментальным данным, полученным с использованием модельных животных.

#### 1.4.2. Человеческий кателицидин LL-37

Одним из наиболее изученных кателицидинов является единственный экспрессирующийся в человеческом организме кателицидин, кодируемый геном *SAMP*, называемый hCAP-18 и состоящий из 170 аминокислотных остатков [101]. Он экспрессируется в относительно высокой концентрации нейтрофилами и эпителиальными клетками, а также был обнаружен в клетках слизистых дыхательной, пищеварительной, мочеполовой систем и в клетках иммунной системы, включая НК-клетки и В-лимфоциты. hCAP-18 является препрокателицидином, который подвергается процессингу под действием сериновой протеиназы с высвобождением C-концевого участка, названного LL-37 по однобуквенному обозначению первых двух аминокислотных остатков и их общему числу в его полипептидной цепи. В водном растворе пептид не структурирован, однако принимает  $\alpha$ -спиральную конформацию в бислойных липидных мембранах, мицеллах а также в присутствии некоторых анионов

[102,103]. Хотя LL-37 принято считать единственным человеческим кателицидином, существуют его аналоги, образованные за счет расщепления исходного hCAP-18 по другим сайтам расщепления. Наиболее близким вариантом можно считать аналог ALL-38, образующийся в семенной жидкости из исходного препропептида в результате расщепления простатической протеазой гастриксином и несущий дополнительный N-концевой аминокислотный остаток аланина [104]. Помимо этого, под действием сериновых протеиназ в коже последовательность LL-37 может расщепляться с образованием множества более коротких вариантов, таких как RK-31, KS-30, LL-23 и KR-20 (**Рисунок 4**) [105]. Интересно, что многие из укороченных вариантов LL-37 демонстрируют более высокий уровень антимикробной активности по сравнению с полноразмерным аналогом. Эта более выраженная способность обеспечивать защитный барьер против бактерий и других микроорганизмов сопровождается снижением иммунологических функций. Таким образом, можно предположить, что подобное посттрансляционное расщепление является частью врожденной системы регуляции множественных функций LL-37.

MKTQRDGHSLGRWSLVLLLLGLVMPLAIIAQVLSYKEAVLRAI  
 DGINQRSSDANLYRLLDLDPRPTMDGDPDTPKPVSFVTKETVC  
 PRTTQQSPEDCDFKKGDLVKRCMGTVTLNQARGSFDISCDKDN  
 KRFALLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES  
 ↑↑    ↑↑    ↑↑    ↑    ↑



**Рисунок 4.** Человеческий кателицидин LL-37. В левой части рисунка указана первичная структура белка-предшественника hCAP-18. Зеленым цветом отмечен сигнальный пептид, красным – последовательность зрелого LL-37. Красными стрелками отмечены возможные сайты процессинга, приводящие к возникновению альтернативных форм пептида. В правой части рисунка изображена  $\alpha$ -спиральная структура LL-37, полученная на основе данных ЯМР-спектроскопии (PDB 2K6O).

В организме человека LL-37 выполняет множество разнообразных функций. Пептид обладает прямым антимикробным действием в отношении широкой панели разнообразных патогенов, включая антибактериальную, противогрибковую, противовирусную активности, а также способностью ингибировать образование биопленок [105–109]. Кроме того, была показана способность LL-37 действовать в синергизме с другими продуцируемыми организмом АМП, например, с  $\alpha$ -дефенсинами [110]. LL-37 способен выполнять множество регуляторных функций, таких как контроль воспалительных реакций, хемотаксис иммунных клеток,

модуляция экспрессии различных факторов иммунной системы и стимуляция ранозаживления [111,112]. Примечательно, что для реализации иммуномодулирующей функции требуются значительно более низкие концентрации LL-37, чем для проявления пептидом прямой антимикробной активности. Это позволяет некоторым исследователям относить данный пептид к особому классу специфических иммуноактивирующих белков и пептидов — так называемых аларминов [113]. Будучи сигнально-эффекторным пептидом, LL-37 продуцируется в тех клетках, которые первыми сталкиваются с инфекциями, т.е. в клетках иммунной системы и различных эпителиальных клетках. Экспрессия гена LL-37 подвергается достаточно строгой регуляции, поскольку к негативным последствиям может приводить как недостаточный уровень экспрессии пептида, приводящий к снижению устойчивости к бактериальным патогенам [114], так и слишком высокий уровень, приводящий к воспалительным заболеваниям. Например, повышенная экспрессия LL-37 в эпителии кожи, судя по всему, может вызывать атопический дерматит и розацеа [115,116]. В свою очередь, продукция и высвобождение из клеток кателицидина LL-37 стимулируется различными бактериальными метаболитами. Например, было показано, что под действием продуцируемой бактериальными клетками масляной кислоты усиливается ацилирование гистонов, связанных с промотором гена *SAMP*, что приводит к увеличению уровня его экспрессии [117,118]. Схожие эффекты наблюдаются при воздействии на клетки литохолевой кислоты, которая образуется в кишечнике из хенодезоксихолевой кислоты под действием бактерий, за счет ее взаимодействия с ядерными рецепторами с последующей активацией транскрипционных факторов [119]. Помимо этого, бактериальные метаболиты, такие как литохолевая кислота и ЛПС, могут повышать уровень экспрессии LL-37 за счет активации Толл-подобных рецепторов иммунных клеток, что приводит к продукции ими провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерлейкин-6 и TNF $\alpha$ , которые, в свою очередь, активируют выработку и высвобождение LL-37 [120]. Однако, некоторые бактериальные патогены способны подавлять выработку LL-37 в качестве собственного защитного механизма [121,122]. Примечательно, что существует связь между витамином D и индукцией выработки АМП [123,124], включая LL-37 [125],

что, по-видимому, является элементом общего механизма усиления защиты организма от различных инфекционных агентов.

Интересно, что LL-37 оказывает непосредственное влияние на активность TLR, как правило, ингибируя активность Толл-подобных рецепторов, опознающих бактериальные липид-содержащие лиганды, такие как ЛПС и липотейхоевые кислоты (ЛТК) [126]. Подобно другим  $\alpha$ -спиральным кателицидинам, таким как RMAP-39 и CATH-2, LL-37 обладает способностью к защите организма от ЛПС-индуцированного эндотоксического шока. Стоит отметить, что ЛПС-связывающая способность человеческого кателицидина значительно превосходит таковую у других  $\alpha$ -спиральных кателицидинов [95]. Показано, что образование комплекса LL-37 с ЛПС приводит к его усиленному поглощению клетками, что в некоторых случаях приводит к внутриклеточной активации TLR-4 и увеличению продукции провоспалительного интерлейкина-6, например, в клетках эпителия бронхов или толстого кишечника [127,128]. В то же время, для других клеточных линий, например, в клетках эндотелия печени усиленное поглощение ЛПС не приводит к иммунной активации клеток [129]. Образование аналогичных комплексов LL-37 с нуклеиновыми кислотами приводит не к ингибированию, а наоборот, к активации соответствующих TLR, реагирующих на бактериальную ДНК или РНК [126].

Ближайшим функциональным и структурным ортологом человеческого LL-37 является единственный мышинный кателицидин CRAMP. Пептиды обладают значительным сходством в структуре генов, аминокислотных последовательностях и антимикробных свойствах, что делает CRAMP ключевой моделью для изучения функций LL-37 [71,130]. Оба пептида кодируются родственными генами и обнаружены в консервативных областях геномов (хромосома 3 человека, хромосома 9 мыши), что может подтверждать их эволюционную взаимосвязь [71]. Центральная область мышинного кателицидина CRAMP имеет высокую степень сходства с аминокислотной последовательностью человеческого пептида LL-37. Суммарно, эти пептиды имеют около 50% гомологии, при этом оба имеют схожий общий заряд и одинаковую вторичную структуру. Интересно, что мыши с нокаутом гена кателицидина гораздо более восприимчивы к раневым инфекциям, вызываемым *Streptococcus sp.*, чем мыши дикого типа [131]. Кроме того, заражение вирусом оспы мышей с дефицитом кателицидина также приводило к более тяжелым

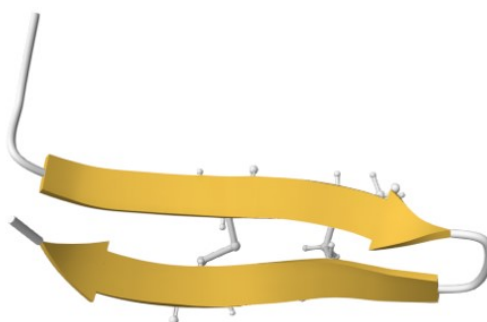
поражениям по сравнению с мышами дикого типа [132]. Эти результаты ярко демонстрируют защитные свойства кателицидинов в *in vivo* системе на уровне целого организма.

Таким образом, LL-37 представляет из себя мультифункциональную молекулу, которая совмещает в себе способность к одновременному выполнению различных функций защиты организма от инфекций. Исследователями предпринимались попытки выделить ключевые участки исходной молекулы, отвечающие за тот или иной тип активности. Так, например, было показано, что эффекторная антимикробная функция LL-37 обеспечивается его  $\alpha$ -спиральной амфипатической структурой, за счет чего пептид в высокой концентрации действует как классический мембранотропный АМП, вызывая пермеабиллизацию мембраны и ее полное разрушение. За антимикробную активность LL-37 в основном отвечает центральный фрагмент пептида, FK-16, который сохраняется в большинстве продуктов фрагментации исходного пептида [133]. В то же время, большой вклад в связывание с ЛПС вносят семь С-концевых остатков пептида, в то время как удаление первых двенадцати N-концевых аминокислот не оказывает существенного влияния на этот процесс [134]. Помимо этого, удаление N-концевой части пептида уменьшает его иммуномодулирующие свойства, но, с другой стороны, уменьшает его устойчивость к протеолитической деградации. Таким образом, LL-37 является весьма сложным, но очень интересным и перспективным АМП за счет открывающихся возможностей регуляции спектра его активности.

#### 1.4.3. Кателицидины с $\beta$ -шпилечной структурой

Яркими представителями АМП являются  $\beta$ -шпилечные пептиды беспозвоночных животных. Как правило, такие пептиды характеризуются жесткой структурой, стабилизированной 1-2 дисульфидными связями, что обеспечивает высокий уровень защиты от действия протеаз. Наиболее изученные представители этого класса – тахиплезины [135], гомезины [136] и ареницины [137] обладают широким спектром антимикробного действия и являются перспективными соединениями для разработки на их основе терапевтических противомикробных препаратов. Вместе с этим, у позвоночных животных  $\beta$ -шпилечные АМП представлены в основном дефенсинами. Единственным классическим

представителем  $\beta$ -шпилечных пептидов в семействе кателицидинов являются протегрины свиней. Протегрины — это семейство пептидов, первоначально выделенных из свиных лейкоцитов [72]. В настоящее время известно пять природных членов этого семейства, и кроме этого синтезировано множество их мутантных аналогов [138–140]. Природные протегрины имеют длину от 16 до 18 аминокислотных остатков и богаты положительно заряженными остатками аргинина. Их отличительной чертой является антипараллельная  $\beta$ -шпилечная структура с двумя дисульфидными связями, стабилизирующими пространственную структуру молекулы [141]. Структура наиболее распространенного природного варианта протегрина, обозначенного как PG-1, показана на **Рисунке 5**.



**Рисунок 5.** Структура PG-1 (аминокислотная последовательность RGGRLCYCRRRFCVGVGR) на основе данных ЯМР-спектроскопии (PDB 1PG1).

Протегрины обладают широким спектром активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против грибка *Candida albicans* и вируса иммунодефицита человека. Важно, что они проявляют бактерицидную активность отношении бактерий как в логарифмической, так и в стационарной фазе роста, включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) и *Pseudomonas aeruginosa* [138,142–144]. Однако, протегрины проявляют достаточно высокую токсичность в отношении нормальных человеческих клеток, а также оказывают гемолитический эффект на человеческие эритроциты [72], что значительно сужает потенциальное терапевтическое окно применения протегрина и создает серьезные препятствия для системного применения данного пептида. Это, в свою очередь, делает привлекательной идею создания его модифицированных аналогов со сниженными токсическими эффектами, что поспособствовало использованию протегринов в качестве

модельных пептидов в многочисленных структурно-функциональных (SAR) исследованиях. Благодаря широкому спектру антимикробной активности и бактерицидному механизму действия протегрины считаются перспективной матрицей для создания на их основе препаратов для противомикробной терапии. Так, модифицированный аналог протегрина, обозначенный как IB-367 или исеганан [143,145], был протестирован в рамках III фазы клинических исследований в качестве препарата наружного применения для лечения инфекций слизистых оболочек, однако не продемонстрировал ожидаемой эффективности. Другой циклический аналог протегрина – POL7080 или мурепавадин — является перспективным препаратом для лечения инфекций *Pseudomonas aeruginosa* и продемонстрировал эффективность, превосходящую колистин. Однако стоит отметить, что механизм действия POL7080 кардинальным образом отличается от такового для протегринов и основан на связывании с белком внешней мембраны LptD и блокировании транспорта ЛПС [146,147].

Стабилизирующие шпильку дисульфидные связи накладывают ограничение на распределение других аминокислотных остатков, входящих в состав пептида. Гидрофильные и положительно заряженные аминокислоты в основном оказываются на концах сформированной шпильки, в то время как центральную часть молекулы занимают гидрофобные аминокислотные остатки, что приводит к тому, что молекула имеет амфипатическую природу, характерную для многих АМП. Предполагается, что выраженные катионные свойства протегринов имеют важное значение для их способности избирательно связываться с мембранами бактериальных клеток, которые содержат значительную долю анионных липидов, в отличие от мембран млекопитающих, которые в основном состоят из цвиттерионных липидов [148]. В настоящее время общепринятая модель действия протегрина в отношении бактериальных клеток включает стадию электростатического притяжения и адсорбции катионного пептида протегрина на анионных липидах бактериальных мембран [149], за которой следует димеризация пептидов и последующее встраивание в мембрану с образованием более крупных агрегатов, состоящих из 4-5 димеров [150]. В итоге, молекулы протегринов формируют трансмембранную пору, обеспечивающую неконтролируемую утечку ионов и других молекул из цитоплазмы бактериальных клеток [151,152].

Таким образом, димеризация молекул протегрина является важным этапом его основного механизма антимикробного действия. Интересно, что изначально идея димеризации молекул протегрина была проблемной моделью, поскольку она предполагает расположение сильно заряженных остатков аргинина на двух мономерах в непосредственной близости друг от друга, что привело бы к электростатическому отталкиванию и дестабилизации димера [141]. Действительно, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что PG-1 существует преимущественно в виде мономера в водном растворе и в ДМСО [141,153]. Однако, ряд исследований методом ЯМР показал, что в определенных липидных средах водородные связи вдоль основной цепи двух мономеров достаточно сильны, чтобы преодолеть электростатическое отталкивание между остатками аргинина. Долгое время оставался открытым вопрос о том, как именно происходит димеризация — с образованием параллельных или антипараллельных димеров, причем исследования различными методами давали противоречивые результаты. Например, анализ ЯМР спектров взаимодействия PG-1 с мицеллами додецилфосфохолина (ДФХ) был приведен как доказательство формирования антипараллельного димера, причем авторы исключали возможность формирования параллельной структуры из-за наблюдаемых сильных ядерных эффектов Оверхаузера между остатками Arg18 и Phe12, а также Val14 и Val16, которые находятся в непосредственной близости только в антипараллельном димере [154]. Однако другое ЯМР исследование поведения PG-1 в фосфатно-солевом буферном растворе показало, что пептид образует большие олигомерные агрегаты, при этом данные диффузии спинов  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  указывают на параллельную ориентацию мономеров [155]. Дальнейшие исследования и использованием анионных липидных бислоев убедительно подтвердили формирование параллельного димера и позволили определить его трехмерную структуру [156]. Кроме того, дополнительный эксперимент в тех же условиях показал дальнейшую агрегацию параллельных димеров с образованием трансмембранных пор, состоящих из 4 или 5 димерных единиц [157]. Более поздние исследования одного из природных аналогов протегрина, PG-5, в мицеллах ДФХ также показали формирование октомерной поры, состоящей из четырех димерных единиц, однако свидетельствуют об антипараллельной организации димеров [150], что оставляет открытым вопрос о точной структурной организации

сформированных протегрином пор. Предполагается, что димеризация протегрина на поверхности цвиттерионных эукариотических мембран, содержащих холестерин, происходит по тому же механизму. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что димеризация является важным первым шагом в реализации механизма антимикробного действия протегрина, и что именно димерная форма является преобладающей в липидных системах, имитирующих биологические мембраны. Параллельная димерная структура наблюдалась в липидных бислоях, в то время как свидетельства формирования антипараллельного димера наблюдались только в мицеллах ДФХ.

Ранее, на примере другого  $\beta$ -спилечного АМП ареницина мы показали, что модифицируя аминокислотный состав молекулы можно влиять на процессы димеризации в различном липидном окружении, тем самым непосредственно влияя на селективность пептида [142,158,159]. Это открывает дорогу к созданию более селективных и менее токсичных аналогов протегрина.

Однако протегрин не является единственным представителем кателицидинов, который способен к формированию внутримолекулярных дисульфидных связей. Другим известным представителем пептидов этого класса являются бактенецины, также известные как кателицидины-1 или додекапептиды, поскольку они состоят из 12 аминокислотных остатков (RLCRIVVIRVCR). Впервые бактенецины были выделены из нейтрофильных гранул представителей семейства *Bovidae* [73]. Зрелый пептид имеет два остатка цистеина в позициях 3 и 11. Известно, что бычий бактенецин проявляет антибактериальную и антибиопленочную активность, хотя данные о его структуре и механизме действия довольно противоречивы [160]. Согласно ранним сообщениям, два остатка Cys образуют внутримолекулярную дисульфидную связь, в результате чего образуется 9-членное кольцо [73]. Однако, более поздние данные свидетельствуют о том, что нативной формой пептида может быть антипараллельный или параллельный димер, в котором остатки цистеина образуют два межмолекулярных дисульфидных мостика [161]. Данные об антимикробных свойствах бактенецина противоречивы, хотя большинство исследований сходятся на наличии средней или слабой активности, преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий. Было показано, что пептид проникает через внешнюю мембрану посредством самопроизвольного

поглощения и не вызывает существенной деполяризации цитоплазматической мембраны [19,162]. Кроме того, было показано, что бактенецин вызывает цитотоксические эффекты примерно в тех же концентрациях, в которых наблюдалось его антимикробное действие [163]. Стоит отметить, что из-за отсутствия понимания структурной организации зрелого пептида, в большинстве исследований изучалась мономерная форма с внутримолекулярной дисульфидной связью. Было показано, что ее наличие не вносит существенного вклада в антимикробную активность додекапептида [164], что повлекло за собой проведение ряда исследований по улучшению свойств его линейных форм [165]. Несмотря на имеющиеся данные об экспрессии додекапептидов в живых системах [166,167], их биологические функции до сих пор остаются не вполне ясными.

#### 1.4.4. Пролин-богатые кателицидины

Еще одним интересным представителем семейства кателицидинов являются пролин-богатые антимикробные пептиды — подсемейство катионных АМП, характеризующихся высоким содержанием остатков пролина и аргинина в своей аминокислотной последовательности. В отличие от  $\alpha$ -спиральных АМП, таких как LL-37 человека или ВМАР-28 крупного рогатого скота, пролин-богатые кателицидины демонстрируют нелитический механизм антимикробного действия, проникая внутрь бактериальной клетки за счет транслокации через мембрану или используя специализированные транспортные системы и ингибируя внутриклеточные мишени [168]. Как правило, это обуславливает их значительно более низкую цитотоксичность в отношении нормальных клеток эукариот по сравнению с мембранотропными АМП.

Одним из наиболее изученных представителей этого семейства является PR-39 (RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF). Впервые данный пептид был выделен из лизата эпителиальных клеток тонкого кишечника свиньи *Sus scrofa* [75], однако последующие исследования показали, что он преимущественно экспрессируется в костном мозге и других лимфоидных тканях, включая тимус и селезенку, а также в лейкоцитах [169,170]. Ген, кодирующий PR-39, был картирован на хромосоме 13, которая гомологична хромосоме 3 человека, где локализован ген hCAP-18/LL-37 [75,170]. Результаты множества исследований демонстрируют, что

PR-39 является многофункциональным пептидом и основой врожденной иммунной системы свиней. Пептид способен быстро транслоцироваться через мембрану бактериальных клеток и блокировать репликацию ДНК или биосинтез белка [171]. Кроме этого, PR-39 способен проникать также в эукариотические клетки. Например, есть данные о его способности связываться с внутриклеточным сигнальным белком p130(Cas), а также с другими белками, содержащими SH3 домены ( $\beta$ -структурные белковые домены из нескольких антипараллельных листов) [172]. Также некоторые исследования указывают на способность PR-39 стимулировать ангиогенез, ингибируя убиквитин-зависимую протеасомную деградацию белкового фактора HIF-1 $\alpha$  [173], что приводит к ускоренному формированию сосудистых структур *in vitro* и увеличению сосудистой сети миокарда на мышинной модели. Кроме этого, влияние PR-39 на протеасомную деградацию через обратимое связывание с  $\alpha 7$  субъединицей 27S протеасомы приводило к проявлению противовоспалительной активности, блокируя деградацию I $\kappa$ B $\alpha$  (ингибитора транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B), при этом не влияя на общую активность протеасомы [174]. Стоит отметить, что PR-39 не проявляет прямых цитотоксических эффектов и способствует процессу ранозаживления, стимулируя экспрессию мембранных протеогликанов, участвующих в клеточной адгезии [174].

Было показано, что PR-39 проявляет свою антибактериальную активность за счет проникновения внутрь микробных клеток без разрушения мембраны, и далее блокирует биосинтез бактериальной ДНК и белка. Для проявления части своих биологических функций PR-39 требует амидирования С-концевого остатка, так же как и некоторые другие ПБ-АМП, например, профенины [175,176]. Карбоксиамидирование пептида происходит с помощью пептидилглицин-амидирующей монооксигеназы, который удаляет С-концевую последовательность G-K-R [69,177]. PR-39 обладает широким спектром антимикробной активности против энтеропатогенных бактерий, таких как *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* — распространенными пищевыми патогенами, часто ассоциированными с кишечными инфекциями [75,171]. Кроме того, PR-39 продемонстрировал антимикробную активность *in vitro* против чувствительных и устойчивых к антибиотикам клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* [178]. Определение конкретной внутриклеточной мишени для PR-39 вызвало

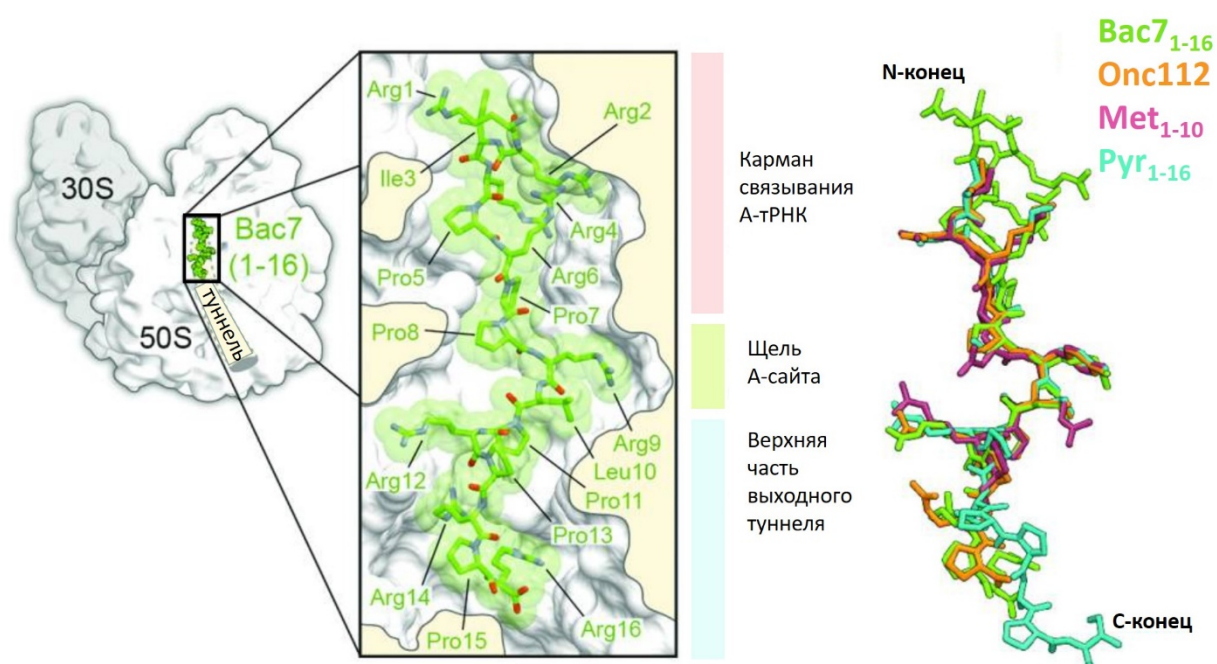
определенные трудности. Так, было показано, что пептид блокирует биосинтез белка и репликацию ДНК [179], однако конкретный механизм действия оставался не выясненным. В качестве основной мишени действия пептида предполагался белок теплового шока DnaK [171]. Кроме того, были проведены исследования, указывающие на другие мишени, такие как аргининдекарбоксилаза и белки, связанные с метаболизмом РНК и фолиевой кислоты [180]. Однако в настоящее время считается, что основной клеточной мишенью PR-39 является бактериальная рибосома.

#### 1.4.5. Пролин-богатые кателицидины – ингибиторы рибосом

Пролин-богатые АМП встречаются у различных эволюционно далеких животных, причем некоторые из них обладают достаточно выраженной структурной гомологией и имеют консервативные мотивы, что свидетельствует о конвергентной эволюции этих соединений и о том, что они, возможно, имеют общую мишень действия. Впервые точный механизм антибактериального действия, основанный на ингибировании бактериальной рибосомы, был описан для ПБ-АМП онкоцина из клопа *Oncopeltus fasciatus* [181]. Согласно данным, полученным на основе кристаллического комплекса производного онкоцина (VDKPPYLPRPRPPRIYNR) Onc112 с бактериальной рибосомой, онкоцин образует пробку длиной 34 Å, которая блокирует доступ к сайтам А и Р 50S субъединицы бактериальной рибосомы. При этом его N-концевой участок оказывается вблизи пептидилтрансферазного центра (ПТЦ), где он блокирует как аминоксил-тРНК-связывающий участок А-сайта, так и пептидил-тРНК-связывающий участок Р-сайта. Средняя часть онкоцина занимает щель А-сайта в ПТЦ, расположенную у начала выходного туннеля, в то время как С-концевой участок онкоцина связывается внутри верхней камеры выходного пептидного туннеля и полностью блокирует его [181]. Таким образом, расположение пептида перекрывается с сайтами связывания сразу нескольких классов антибиотиков, что предполагает, что он ингибирует бактериальную рибосому посредством согласованного механизма действия, блокируя начальные стадии элонгации.

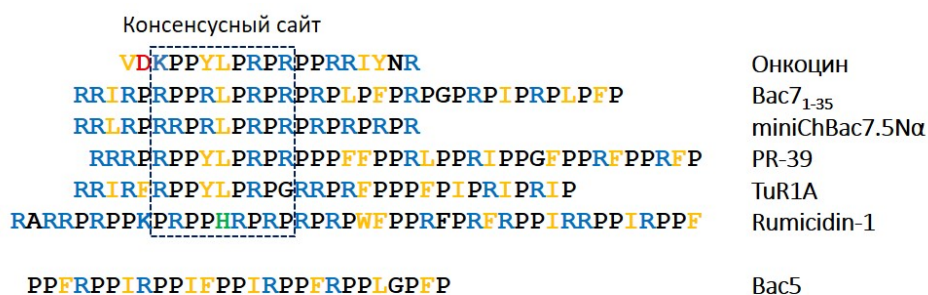
Примечательно, что различные пролин-богатые кателицидины, такие как бычий Bac7, козий miniChBac7.5Nα или Tur1A из дельфина *Tursiops truncatus* [182],

демонстрируют высокое сходство своих N-концевых последовательностей с ранее изученным онкоцином и другими ПБ-АМП насекомых. Кроме того было показано, что укороченные формы, например  $Vac7_{1-16}$  и  $Vac7_{1-35}$ , соответствующие первым 16 и 35 аминокислотным остаткам  $Vac7$  соответственно, демонстрируют аналогичную, если не улучшенную, антимикробную активность по сравнению с полноразмерным пептидом [74,183]. Проведенные рентгеноструктурные исследования взаимодействия фрагмента  $Vac7_{1-16}$  (RRIRPRPPRLPRPRPR) с 70S рибосомой *Thermus thermophilus* подтвердили, что пептид взаимодействует аналогичным онкоцину образом, однако использует боковые цепи аргинина для формирования дополнительных стеккинг-взаимодействий с открытыми нуклеотидными основаниями рРНК. Взаимодействие фрагмента  $Vac7$  с бактериальной рибосомой и сравнение с другими ПБ-АМП — ингибиторами трансляции, такими как Металниковин I ( $Met_{1-10}$ ,  $VDKPDYRPRPRPPNM$ ) из клопа-щитника *Palomena prasina* и пиррокорорин ( $Pyr_{1-16}$ ,  $VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN$ ) из клопа-солдатика *Pyrrhocoris apterus* показано на **Рисунке 6**.



**Рисунок 6.** Место связывания фрагмента  $Vac7_{1-16}$  на 70S рибосоме *Thermus thermophilus* в сравнении с онкоцином  $Onc112$ . В правой части рисунка представлено сравнение структур  $Vac7_{1-16}$  (зеленый) с онкоцином  $Onc112$  (оранжевый) и двумя пролин-богатыми пептидами насекомых:  $Met_{1-10}$ , (обозначен бордовым) и  $Pyr_{1-16}$ , (обозначен голубым). Иллюстрация адаптирована из [184].

Таким образом, было подтверждено, что пролин-богатые кателицидины ингибируют процессы биосинтеза белка с помощью механизма специфической инактивации рибосомы. Кроме того, структурно-функциональное исследование ПБ-АМП позволило выявить N-концевой консервативный сайт, который обеспечивает непосредственную связь с рибосомой. Примечательно, что данный сайт встречается у подавляющего большинства ПБ-АМП I типа, выделяемых из эволюционно далеких групп животных, в то время как структура С-концевого участка оказывается в значительной степени гетерогенна. Однако, не все ПБ-АМП млекопитающих попадают под эту классификацию. Так, например, из различных представителей отряда китопарнокопытных были выделены и охарактеризованы пептиды, названные бактенецинами-5 (Bac5). Было показано, что как и Bac7-подобные АМП, данный класс соединений блокирует биосинтез белка с помощью инактивации бактериальной рибосомы [185], причем действует схожим с ПБ-АМП I типа образом. Однако, хотя Bac5, подобно другим пролин-богатым пептидам, имеет высокое содержание остатков пролина и аргинина, низкая степень сходства его аминокислотной последовательности с другими ПБ-АМП I типа (**Рисунок 7**) затрудняет прогнозирование его взаимодействия с рибосомой.



**Рисунок 7.** Выравнивание последовательностей пролин-богатых АМП. Пунктирной рамкой выделена консенсусная последовательность, необходимая для ингибирования биосинтеза белка кателицидинами ПБ-АМП I типа.

Недавнее исследование структуры Bac5 в комплексе с 70S рибосомы *Vibrio natriegens* показало, что его механизм действия отличается от ПБ-АМП I и II типов. Пептид взаимодействует с рибосомным туннелем, располагаясь N-концевой частью в области ПТЦ и С-концевым участком, направленным в сторону выхода из туннеля так же, как это было показано ранее для ПБ-АМП I. Однако, в отличие от них, Bac5

принимает другую конформацию внутри выходного туннеля. Таким образом, Vas5 демонстрирует уникальный способ связывания с рибосомой, не характерный для других АМП. Кроме того, данные исследования позволяют предположить, что в отличие от онкоцин-подобных АМП, которые препятствуют стадии элонгации, связывания Vas5 с рибосомой мешает точному позиционированию инициаторной тРНК в Р-сайте во время инициации трансляции. Помимо этого, недавно обнаруженный нами другой тип ПБ-АМП, названный румицидины, имеет механизм действия, позволяющий отнести их к ПБ-АМП I типа, однако их последовательность не имеет типичного консенсусного мотива [186]. Изучение комплекса румицидина-2 с 70S рибосомой *E. coli* методом криоэлектронной микроскопии показало, что связывание с рибосомным туннелем происходит схожим с Vas7 образом, однако имеют место дополнительные взаимодействия с компонентами рибосомы, образующими область сужения рибосомного туннеля, за счет входящей в их состав консервативной диады Trp23-Phe24. Интересно, что для ПБ-АМП II типа была продемонстрирована аналогичная модель связывания, несмотря на то, что данные пептиды ориентированы в рибосомном туннеле в противоположном направлении [187]. Стоит отметить, что центральная часть полипептидной цепи румицидина-2 (остатки 12-22) занимает то же положение в ПТЦ, которое было продемонстрировано для Vas7 и онкоцина (остатки 7-17), и при этом некоторые отличающиеся аминокислотные остатки образуют связи с теми же компонентами рибосомального туннеля. Однако, в отличие от Vas7-подобных пептидов, румицидины демонстрируют значительно более высокую толерантность к аминокислотным заменам, что может быть объяснено их более обширными взаимодействиями с 50S субъединицей рибосомы [186]. Таким образом, подсемейство пролин-богатых кателицидинов является перспективным источником структурных скаффолдов для создания низкотоксичных антимикробных препаратов.

### **1.5. Совместное действие антимикробных пептидов**

Растущее распространение антибиотикорезистентности приводит к тому, что существующие антимикробные соединения теряют свою эффективность. В то же время, антимикробные пептиды не лишены этого недостатка, и существующие исследования показывают, что к ним также может возникать резистентность.

Основные механизмы формирования резистентности у бактериальных клеток по отношению к АМП связаны с модификациями клеточной поверхности, мутациями в ключевых мишенях действия АМП, включая транспортерные белки, гиперпродукцией протеаз и эффлюксных насосов [188]. Развитие механизмов устойчивости к АМП обусловлено не только взаимодействием патогенов с иммунной системой хозяина, но и прямой конкуренцией между различными видами бактерий. Таким образом, существует постоянная «гонка вооружений» между вырабатываемыми организмами АМП и бактериями, которые формируют к ним различные механизмы резистентности.

Одним из возможных способов преодоления резистентности патогенов является одновременное использование разнонаправленных антимикробных препаратов, которые действуют в синергизме. Стоит отметить, что в живых биологических системах АМП функционируют не изолированно, а действуют в составе сложных смесей, часто включающих более одного антимикробного компонента. В таких смесях могут наблюдаться синергические взаимодействия, при которых комбинированное действие двух или более пептидов значительно превосходит суммарный эффект их индивидуальных активностей. При этом значительно возрастает их антимикробное действие и уменьшаются эффективные концентрации, что может предотвращать формирование резистентности [189].

Классическим примером синергического действия смеси антимикробных пептидов считается пара лантибиотиков Lch $\alpha$  и Lch $\beta$ , продуцируемая штаммом *Bacillus licheniformis* [190]. Показано, что эти коэкспрессируемые пептиды действуют как двукомпонентная система, на порядки усиливая совместный эффект антимикробного действия по сравнению с индивидуальными активностями обоих компонентов. Часто различные АМП могут действовать в синергическом сочетании с другими соединениями, как, например, это было показано для человеческого кателицидина LL-37 при совместном действии с пептидным антибиотиком полимиксином В [191], а также с колистином и имипенемом [192] в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Для ряда других АМП также было показано проявление синергических эффектов в сочетании с классическими антибиотиками [193–195]. Существует предположение, что по крайней мере часть терапевтических эффектов при применении антибиотиков *in vivo*

связана непосредственно с их взаимодействием с компонентами иммунной системы [193].

АМП, изначально выделенные из разных источников, также могут действовать в синергическом сочетании. Такие эффекты были показаны для синтетического антимикробного пептида пексиганана (модифицированный аналог магаинина) и мелиттина — АМП из пчелиного яда [196]. Было также показано усиление действия протегрина свиней при совместном применении с человеческим LL-37, бычьими индолицидином или бактенецином-1 в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli* [197].

Наибольший интерес представляют синергические пары АМП, которые коэкспрессируются в одном природном источнике. Таким примером могут служить АМП из кожного секрета лягушки *Xenopus laevis* - магаинин-2 и PGLa, которые формируют гетеродимеры, эффективно разрушающие бактериальные мембраны. Было показано, что такая смесь имеет более высокую аффинность к мембране, образует комплексные поры и вызывает повышение проницаемости мембран в несколько раз сильнее, чем каждый из пептидов по отдельности [198]. Также наличие выраженного синергизма было показано на примере человеческого LL-37, в присутствии которого восстанавливается активность  $\alpha$ -дефенсинов, обычно сниженная в средах, содержащих NaCl в физиологической концентрации [199]. Синергизм антибактериального действия в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli* также наблюдался при комбинированном применении человеческих LL-37,  $\beta$ -дефенсина и лизоцима [200]. Таким образом, изучение взаимодействия различных АМП при их совместном применении и в сочетании с другими антимикробными препаратами преследует одновременно две ключевых цели — поиск эффективных сочетаний препаратов, которые за счет снижения эффективной дозы будут иметь пониженную токсичность в отношении нормальных клеток и при этом демонстрировать высокую активность в отношении резистентных бактериальных штаммов, а также создание препаратов, которые смогут проявлять синергические эффекты в сочетании с собственными АМП, продуцируемыми человеческим организмом.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Оборудование

Системы очистки воды RiOs (Merck Millipore), Система для получения сверхчистой воды Milli-Q (Merck Millipore), Пипетки автоматические, регулируемым объемом до 20, 200 и 1000 мкл (Gilson); пипетка автоматическая 8-канальная, регулируемый объем до 200 мкл (Eppendorf); Термоциклер «Терцик» (ДНК-Технология); УФ-транслюминатор (Vilber Lourmat); микроцентрифуга настольная «MiniSpin» (Eppendorf); твердотельный термостат «Гном» (ДНК-Технология); pH-метр P8-11 (Sartorius); камера для горизонтального электрофореза «GNA-100» (Pharmacia Fine Chemicals); источник питания «PS500XT» (Hoefer Scientific Instruments); Термостат твердотельный охлаждаемый TS-100C (Biosan); установка для лиофильной сушки «FreeZone 2.5» (Labconco); Центрифуга вакуумная HyperVac (Gyrozen); весы электронные «E5500S» (Sartorius); весы электронные аналитические «R200D» (Sartorius); воздушный термостат TC-1/80 (СКТБ); Планшетный шейкер PST-60HL-4 (Biosan); Шейкер-инкубатор ES-20/60 (Biosan), Шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick Scientific), CO<sub>2</sub> инкубатор MCO-15AC (Sanio), планшетный ридер AF2200 (Eppendorf); Хроматограф препаративный LC-20AP (Shimadzu); настольный ламинарный бокс «Purifier Cell Logic» (Labconco); настольный ламинарный бокс Safefast Elite (Faster); Центрифуга настольная высокоскоростная 5430R (Eppendorf); центрифуга напольная 1736 (Gyrozen); шкаф сухожаровой (Binder); Гомогенизатор под давлением EmulsiFlex-C3 (Avestin); гомогенизатор ультразвуковой Qsonica; Насос перистальтический 2115 Multiperperex (LKB), детектор Uvicord (LKB); денситометр Ultrospec 10 (Amersham); спектрофотометр NanoPhotometr (Implen); встряхиватель пробирок «Bio Vortex V1» (Biosan); автоклав «MLS-3781L» (Sanyo)

### 2.2. Реактивы и расходные материалы

Микропробирки центрифужные объемом 200 мкл, 1,5мл и 2 мл (Eppendorf), пробирки объемом 15 и 50 мл с коническим дном (Corning), наконечник для автоматических пипеток объемом 20, 200 и 1000 мкл (Nest), микропланшеты 96 луночные плоскодонные прозрачные (Nest), микропланшеты 96-луночные черные с V-образным дном (Greiner Bio-One); чашки петри пластиковые (Corning); набор для

выделения и очистки ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), ДНК-полимеразы Taq, Encyclo и Tersus и буферы для полимераз (Евроген), Т4-ДНК лигаза и буфер (Евроген), эндонуклеазы рестрикции EcoRI, BglII, (Fermentas); буфер FastDigest (Fermentas); аденозинтрифосфат (АТФ) (Amresco); дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Promega); ДНК маркеры молекулярных масс (Сибэнзим); Orange G (Serva); X-Gal (Promega); этидий бромид (Serva); трифторуксусная кислота (ТФУ) (Applied BioSystems); ацетонитрил (Panreac, Merck); соляная кислота (Реахим); <sup>15</sup>N-меченый хлорид аммония (Cambridge Isotope Laboratories); ацетат аммония (Fluka); ацетат калия (Реахим); ацетат натрия (Реахим); борная кислота (Реахим); гидроортофосфат натрия (Fluka); гуанидин гидрохлорид (Sigma-Aldrich); дигидроортофосфат калия (Реахим); дигидроортофосфат натрия (Fluka); имидазол (Sigma-Aldrich); парамолибдат аммония (Реахим); сульфат аммония (Реахим); сульфат меди II (Реахим); сульфат цинка (Реахим); хлорид железа III (Реахим); хлорид калия (Реахим); хлорид кальция (Реахим); хлорид кобальта II (Реахим); хлорид магния (Merck); хлорид марганца (Реахим); хлорид натрия (Реахим); хлорид никеля II (Реахим); HEPES (Sigma-Aldrich); гидрат кальциевой соли фолиновой кислоты (Sigma-Aldrich); гидроксид натрия (Sigma-Aldrich); глутамат аммония (Sigma-Aldrich); глутамат калия (Sigma-Aldrich); глутамат магния (Sigma-Aldrich); глюкоза (Ferak); Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 8000 (Acros Organics); Путресцин дигидрохлорид (Himedia); спермидин (Sigma-Aldrich); цитрат тринатрия (Merck); бакто-триптон (Difco); дрожжевой экстракт (Pronadisa); среда Мюллера-Хинтон (HiMedia); тиамин гидрохлорид (Мосхимфармпрепараты); ампициллин (Синтез, Applichem); Triton X-100 (Merck); Ni<sup>2+</sup>-сефароза (GE Healthcare); бромциан (Merck); нитроцефин (Calbiochem); о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG) (Sigma-Aldrich); полимиксин В сульфат (Applichem); изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG) (Applichem); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich); забуференный физиологический раствор (ЗФР) (Gibco); среда DMEM/F-12 (Gibco); среда RPMI (Gibco); фетальная бычья сыворотка (ФБС) (Gibco); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ-реагент) (Sigma-Aldrich); резазурин (Sigma-Aldrich); колонка ОФ ВЭЖХ Reprosil-pur C18-AQ (10 мм × 250 мм, размер частиц 5 мкм, Dr. Maisch). В работе были использованы бактериальные штаммы *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen); *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen); *Escherichia coli* BL21

STAR (DE3) (Thermo Fisher Scientific); *Escherichia coli* ClearColi BL21(DE3) (Research Corporation Technologies); *Escherichia coli* ML35p (ATCC collection); *Escherichia coli* ATCC 25922 (ATCC collection); *Escherichia coli* K12 BW25113 (ATCC collection); *Escherichia coli* 1057 SRCAMB B-10910 (MDR clinical isolate (urine, UTI; ESBL+)); *Escherichia coli* BW25113 ( $\Delta sbmA$ ); *Escherichia coli* BW25113 ( $\Delta ompF$ ); *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ATCC collection); *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ATCC 15692 (ATCC collection); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (ATCC collection); *Bacillus subtilis* B-886 (VKM collection); *Bacillus licheniformis* B-511 (VKM collection); *Micrococcus luteus* B-1314 (VKM collection); *Rhodococcus sp.* SS1 (VKM collection); *Staphylococcus aureus* 29213 (ATCC collection).

### **2.3. Конструирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих антимикробные пептиды**

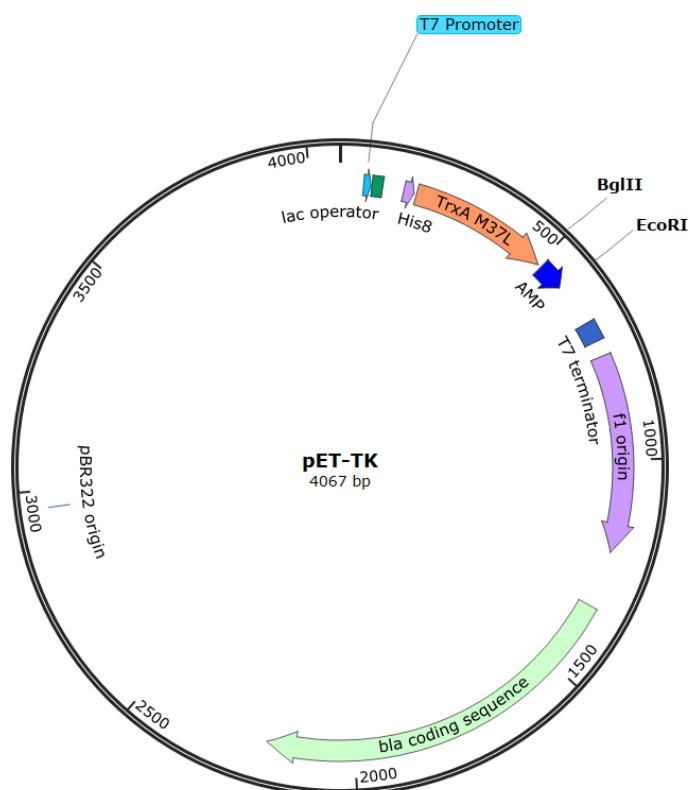
В настоящей работе был использован биотехнологический способ получения всех исследуемых антимикробных пептидов. Для получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые пептиды, с учетом частоты встречаемости кодонов у бактериальных штаммов *E. coli* были спроектированы праймеры для амплификации нуклеотидных последовательностей. Перед последовательностью, кодирующей целевой АМП, были включены метианиновые кодоны ATG, а в конце последовательности — один из стоп-кодонов TAA или TAG. Последовательности праймеров были оптимизированы с использованием программ OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) и Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) с целью снижения вероятности образования неспецифических вторичных структур при сборке методом ДНК-амплификации. Разработанные праймеры были синтезированы ЗАО Евроген с помощью автоматического ДНК синтезатора ABI 3900 (Applied Biosystems, США). Концентрацию праймеров проверяли при помощи спектрофотометра и готовили рабочее разведение с концентрацией 10 мкМ. Сборку фрагментов проводили с использованием двух или трех перекрывающихся праймеров. Для этого готовили эквимольную смесь двух соответствующих праймеров по 1 мкл с реакционной смесью, состоящей из 2 мкл смеси dNTP (по 2 мкМ), 0,5 мкл ДНК-полимеразы Encuslo и 2 мкл 10x буфера для полимеразы (Евроген), разбавленных до суммарного объема 20 мкл деионизированной водой, полученной при помощи лабораторной системы очистки

воды Mili Q Millipore (Merck, Германия). Реакцию амплификации проводили с использованием ДНК-амплификатора Терцик (ДНК-Технология, Россия) в течение 30 циклов с температурой плавления 95 °С, температурой отжига от 50 °С до 65 °С (температура отжига была рассчитана для каждой пары праймеров исходя из их последовательностей с использованием программы OligoAnalyzer) и температурой элонгации 72 °С и временем элонгации 30 сек. В случае необходимости проведения многоступенчатой сборки, полученный на первой стадии ПЦР-продукт очищали при помощи агарного гель-электрофореза и последующего выделения с помощью набора для выделения и очистки ДНК (Евроген), разбавляли до концентрации 10 мкМ и использовали в качестве матрицы для повторной ПЦР-реакции с добавлением дополнительных праймеров.

На более поздних этапах работы для получения вариантов исследуемых АМП с аминокислотными заменами помимо сборки *de novo* также использовали введение аминокислотных замен в ранее собранную конструкцию с использованием мутагенизирующих праймеров. В этом случае проводили ПЦР-амплификацию и использованием разбавленной аликвоты ранее собранной конструкции в качестве матрицы с добавлением мутагенизирующих праймеров, как описано выше. Амплификацию проводили методом инвертированной ПЦР с полным копированием исходной матрицы, с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген) и увеличенными временем элонгации (до 2,5 мин).

Финальную сборку нуклеотидных конструкций проводили с использованием ранее сконструированного в Учебно-научном центре ИБХ РАН плазмидного вектора, обозначенного как рЕТ-ТК. Используемый плазмидный вектор, собранный на базе плазмиды серии рЕТ20b(+), несет в себе встроенный фрагмент, кодирующий последовательность из восьми остатков гистидина и модифицированного тиоредоксина А (Met37Leu) под контролем T7lac промотора (**Рисунок 8**). Для облегчения встраивания исследуемых АМП в данный плазмидный вектор, в его последовательности введены сайты узнавания рестриктаз BglIII и EcoRI таким образом, что встраиваемый по данным сайтам пептид оказывается добавлен в качестве С-концевого участка последовательности тиоредоксина, отделенный от него аминокислотным остатком метионина. Использование в качестве белка-носителя модифицированного тиоредоксина А повышает общий выход

рекомбинантного белка за счет подавления цитотоксических свойств АМП. При этом тиоредоксин А имеет высокую растворимость и может накапливаться в цитоплазме бактериальных клеток в высокой концентрации. Октогистидиновая последовательность гибридного белка используется в качестве аффинного тега во время первичной очистки методом металлохелатной хроматографии, а введенный остаток метионина обеспечивает возможность химического расщепления гибридного белка при помощи бромциана.



**Рисунок 8.** Карта плазмидного вектора pET-TK. Встраивание целевого АМП (отмечено синим цветом) осуществляется с использованием сайтов рестрикции BglIII и EcoRI в состав находящегося под контролем T7lac промотора гибридного белка, включающего октогистидиновую последовательность и модифицированный тиоредоксин А (Met37Leu). Последовательности тиоредоксина и АМП разделены остатком метионина.

Для проведения сборки вектора, полученный ПЦР продукт очищали при помощи агарозного гель-электрофореза с последующим выделением при помощи набора для выделения и очистки ДНК (Евроген). К разбавленной аликвоте очищенного ПЦР-фрагмента объемом 16 мкл добавляли по 1 мкл ферментов рестрикции BglIII и EcoRI, а также 2 мкл универсального 10x буфера FastDigest

(Thermo Fisher Scientific). Реакцию проводили в течение 30 мин при 37 °С, далее ферменты инактивировали нагреванием до 75 °С в течение 10 мин. Аликвоту обработанного рестриктазами фрагмента смешивали с алиquotой обработанного аналогичным образом вектора рЕТ-ТК в эквимольной концентрации, далее добавляли в реакционную смесь 0,5 мкл Т4 ДНК-лигазы (Евроген) и 1 мкл 10х буфера для лигазы, общий объем реакционной смеси при необходимости доводили деионизованной водой до 10 мкл. Лигазную реакцию проводили в течение ночи при 4 °С. По завершении реакции, реакционную смесь разбавляли водой до объема 30 мкл и инактивировали лигазу нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. Аликвотой полученной лигазной смеси объемом 15 мкл трансформировали клетки *E. coli* DH10В.

#### 2.4. Получение компетентных клеток и трансформация

В рамках настоящей работы были использованы штаммы *E. coli* DH10В для работы с плазмидными конструкциями, а также штаммы *E. coli* BL21 и *E. coli* ClearColi для получения рекомбинантного белка. Химически компетентные клетки всех штаммов, используемых в работе, были получены в лаборатории методом СММ. Для приготовления компетентных клеток, культуру засеивали в 10 мл жидкой питательной среды LB и выращивали при 37 °С и перемешивании 200 мин<sup>-1</sup> в течение ночи. Аликвоту ночной культуры объемом 2 мл засеивали в 200 мл питательной среды LB с добавлением 6 мл 80% глицерина и 2 мл 1М MgSO<sub>4</sub>. Клетки выращивали при 30 °С и перемешивании 200 мин<sup>-1</sup> до достижения культурой OD<sub>600</sub>~0.4±0.1, и далее осаждали на центрифуге в течение 15 мин при 4 °С с перегрузкой 3500 g. Клеточный осадок дважды отмывали холодным буфером СММ (25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ PIPES), после чего ресуспендировали в 10 мл того же буфера. К клеточной суспензии добавляли 750 мкл DMSO, инкубировали 10 мин при 4 °С и далее алиquotили по пробиркам в объеме 200 мкл и замораживали в жидком азоте. Приготовленные таким образом компетентные клетки хранили в низкотемпературном холодильнике при -70 °С. При необходимости алиquotу клеток размораживали на ледяной бане, смешивали с плазмидой или лигазной смесью и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин. Далее, смесь клеток с плазмидой нагревали до 42 °С в течение 90 сек, повторно инкубировали в ледяной бане в

течение 5 мин и высевали при помощи стеклянного шпателя на чашки петри, содержащие селективную питательную среду LB с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Чашки петри инкубировали в воздушном термостате в течение ночи. Выросшие колонии, в зависимости от использованного штамма, в дальнейшем пересевали для выделения и секвенирования плазмидной ДНК или для экспрессии белка.

## 2.5. Выделение плазмидной ДНК

Отдельные выросшие колонии пересевали на новую чашку петри с селективной питательной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Одновременно с посевом, колонии анализировали методом ПЦР с праймерами, фланкирующими зону предполагаемой вставки. Полученные в результате ПЦР реакции образцы анализировали с использованием агарозного гель-электрофореза. Клоны, давшие ПЦР-продукт, длина которого соответствует расчетной, далее пересевали в 10 мл жидкой питательной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали в течение 4-5 ч до достижения  $OD_{600} \sim 3$ . Плазмидную ДНК из образцов выделяли при помощи набора для выделения и очистки плазмидной ДНК (Евроген) согласно инструкции производителя. Финальную элюцию ДНК с сорбента проводили при помощи деионизированной воды. Правильность сборки выделенных плазмидных конструкций проверяли методом секвенирования по Сенгеру с использованием универсального праймера на T7lac промотор, с использованием услуг ЗАО Евроген. Отобранными в результате анализа плазмидными конструкциями были, как описано выше, трансформированы клетки *E. coli* B121 DE3 и *E. coli* ClearColi для получения штаммов-продуцентов целевых АМП.

## 2.6. Экспрессия, выделение и очистка пептидов

Все используемые в работе АМП были получены рекомбинантным биотехнологическим способом с использованием бактериальной системы экспрессии. Основным способом получения белков была экспрессия за счет активации T7lac промотора добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозиды (IPTG). Для этого полученные штаммы-продуценты АМП, трансформированные соответствующей плазмидой, выращивали в течение ночи в небольшом объеме

жидкой питательной среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и далее культуру инокулировали а большой объем (от 1 до 4 л) жидкой питательной среды LB, содержащей 20 мМ глюкозы, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, и 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>. Для получения <sup>15</sup>N-меченых аналогов исследуемых пептидов в качестве питательной среды для проведения экспрессии использовали бедную жидкую среду M9, содержащую 1 г/л <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, 20 мМ глюкозу, 100 мкг/мл ампициллин, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, и 1 мл/л x1000 смеси микроэлементов (50 мМ FeCl<sub>3</sub>, 20 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ ZnSO<sub>4</sub>, 2 мМ CoCl<sub>2</sub>, 2 мМ CuCl<sub>2</sub>, и 2 мМ NiCl<sub>2</sub>). Культуру выращивали при 37 °С и 200 мин<sup>-1</sup> до достижения OD<sub>600</sub>~ 0.8±0.1, далее добавляли IPTG до финальной концентрации 0,3 мМ и снижали температуру до 30 °С. Индукцию проводили в течение 6-16 ч, далее клеточный осадок концентрировали методом центрифугирования в течение 15 мин при 4000 g. Полученный клеточный осадок разводили в буфере нанесения для металлохелатной хроматографии (100 мМ фосфатный буфер (pH 7,8), 6М гуанидина гидрохлорид, 20 мМ имидазол) до оптической плотности 100 единиц и далее лизировали, либо с использованием ультразвукового гомогенизатора, либо при помощи гомогенизатора под давлением в случае, если объем бактериальной суспензии для лизиса превышал 100 мл. Высокая концентрация гуанидина гидрохлорида в буфере для лизиса одновременно подавляет работу бактериальных протеаз и обеспечивает высокую степень растворения рекомбинантного белка, в том числе обеспечивает солубилизацию телец включения.

После проведения лизиса, лизат очищали от крупных примесей методом высокоскоростного центрифугирования (45 мин, 30000 g) и далее осветленный лизат очищали методом аффинной металлохелатной хроматографии. С этой целью использовали колонки стеклянные колонки объемом от 5 до 20 мл, заполненные Ni<sup>2+</sup>-сефарозой (GE Healthcare). Имобилизованные на сорбенте ионы Ni<sup>2+</sup> обеспечивают аффинное связывание с олигогистидиновой последовательностью гибридного белка. После нанесения лизата на колонку и промывки буфером, элюцию белка проводили повышением концентрации имидазола до 500 мМ. Выход белка детектировали по изменению оптического поглощения элюата при 280 нм.

Расщепление гибридного белка с высвобождением целевого АМП проводили методом химического расщепления бромцианом в кислой среде. С этой целью собранные после металлохелатной хроматографии фракции, содержащие

гибридный белок, закисляли добавлением концентрированной соляной кислоты до  $\text{pH} \sim 1,0$ . Далее добавляли 50% раствор бромциана в ацетонитриле из расчета 50 мкл на 1 мл раствора гибридного белка. Реакцию проводили в течение 12-16 ч в темноте при комнатной температуре. Далее реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды и бромциан отгоняли с использованием вакуумной центрифуги упариванием до исходного объема.

При наличии в структуре выделяемого АМП N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты, для проведения циклизации остатка глутамина, после удаления бромциана из реакционной смеси, ее дополнительно инкубировали в течение 24 ч при  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , сохраняя низкое значение  $\text{pH} \sim 1,0$ .

Финальную очистку рекомбинантных пептидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием обращенно-фазовой полу-препаративной колонки Reprosil-pur C18-AQ (10 мм  $\times$  250 мм, размер частиц 5 мкм, Dr. Maisch, Германия). В работе использовали систему из двух растворов ацетонитрила в деионизированной воде, с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Разделение проводили в градиенте ацетонитрила от 5% до 80%, выход фракций детектировали по изменению оптического поглощения при 214 и 280 нм. Фракции, соответствующие целевым пикам на хроматограмме собирали с помощью коллектора фракций и далее упаривали с использованием вакуумной центрифуги.

Для пептидов, используемых в экспериментах на животных, производили замену противоиона ТФУ на HCl. Для этого аликвоты пептидов после очистки и высушивания растворяли в воде до концентрации 1 мг/мл и добавляли раствор 100 мМ HCl до конечной концентрации 5 мМ. Растворы инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, далее замораживали и лиофильно высушивали. Для лучшего удаления ТФУ, операцию повторяли дважды.

Полученные пептиды анализировали методом МАЛДИ масс-спектрометрии в ЦКП ИБМХ РАН с использованием масс-спектрометра Reflex III (Bruker Daltonics, США).

Концентрации полученных АМП определяли спектрофотометрически, с использованием спектрофотометра NanoPhotometr. Расчет коэффициентов экстинкции проводили с использованием программы ProtParam (ExPASy).

## 2.7. Антимикробная активность

Изучение антимикробной активности исследуемых АМП проводили методом двойных серийных разведений в жидкой среде Мюллера-Хинтон (МН) с использованием 96 луночных микропланшетов. Для всех исследуемых соединений готовили двукратные последовательные разведения в требуемом диапазоне концентраций. Для уменьшения эффектов неспецифической сорбции пептидов, для разведения использовали 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). Тестируемые бактериальные штаммы выращивали в жидкой питательной среде LB в течение ночи, далее разводили до  $OD_{600} \sim 0.05$  и выращивали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $200\text{ мин}^{-1}$  до  $OD_{600} 1.0$ . Далее, тестовые культуры разводили в двукратной среде МН до концентрации  $10^6$  КОЕ/мл, после чего аликвоты тестовой культуры объемом 50 мкл добавляли в микропланшеты к равному объему предварительно разведенных исследуемых пептидов. Микропланшеты инкубировали в течение 24 ч при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и интенсивном перемешивании  $900\text{ мин}^{-1}$  с использованием планшетных шейкеров (Biosan, Латвия). Значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) определяли визуально и спектрофотометрически, как самую низкую концентрацию вещества, подавляющую рост бактерий. Дополнительно, для проверки дыхательной активности бактерий, в лунки планшета добавляли 5 мкл 0,5 мг/мл раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США), после чего инкубировали планшеты в течение 2 ч в тех же условиях и оценивали восстановление резазурина до резорфуфина с помощью микропланшетного ридера AF2200 (Eppendorf, Германия). Эксперименты проводились по меньшей мере трижды в трех повторностях, итоговое значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) определяли как медиану полученных значений.

## 2.8. Исследования совместного действия антимикробных соединений

Для изучения совместного действия различных антимикробных соединений в отношении бактериальных культур, изучали синергическую активность различных пар препаратов. Для этого культуры исследуемых бактериальных штаммов готовили, как описано выше. Разведения исследуемых пептидов готовили в двух планшетах, после чего смешивали крест-накрест по методу шахматной доски таким образом, чтобы каждая лунка в квадрате  $8 \times 8$  содержала смесь двух соединений в

возрастающих концентрациях, при этом лунки с самой высокой концентрацией каждого соединения находились в противоположных углах [201].

### **2.9. Гемолитическая активность**

Гемолитическую активность исследуемых АМП определяли в отношении суспензии свежесыведенных человеческих эритроцитов. Для этого кровь здорового донора центрифугировали в растворе фиколл-урографина (плотность 1,077 г/мл), после чего отбирали фракцию эритроцитов. Полученную фракцию трижды промывали двадцатью объемами забуференного физиологического раствора (ЗФР) рН 7,4, после чего готовили 8% объемную суспензию эритроцитов в двукратном ЗФР. Разведения исследуемых АМП в 96 луночных микропланшетах готовили методом двойных серийных разведений в 0.1% БСА. Аликвоты суспензии эритроцитов объемом 50 мкл смешивали с равными объемами исследуемых АМП. В качестве отрицательного контроля использовали лунки без добавления пептида, в качестве контроля 100% лизиса использовали 0,1% раствор Triton X-100. Далее, планшеты инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °С и интенсивном перемешивании 1000 мин<sup>-1</sup>. Интактные эритроциты осаждали при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 2000 g. Аликвоты супернатанта объемом по 50 мкл переносили в новый планшет. Высвобождение гемоглобина контролировали путем измерения поглощения при 405 нм с помощью микропланшетного ридера (Thermo Fisher Scientific). Расчет уровня гемолиза производили по формуле Гемолиз (%) =  $[(A_{06} - A_0) / (A_{100} - A_0)] \times 100\%$ , где  $A_{06}$  поглощение исследуемого образца,  $A_{100}$  поглощение образца 100% лизиса, и  $A_0$  — поглощение отрицательного контроля. На основе полученных данных определяли уровень 50% гемолитической концентрации (НС<sub>50</sub>) или в случае АМП, проявляющими низкую гемолитическую активность, рассчитывали уровень минимальной гемолитической концентрации, приводящую к лизису 2% эритроцитов.

### **2.10. Цитотоксическая активность**

Цитотоксическую активность исследуемых АМП в отношении нормальных клеток млекопитающих проводили с помощью МТТ-теста и исследования дыхательной активности с помощью восстановления резазурина. Для проведения МТТ теста, исследуемые клеточные линии высаживали в 96 луночные планшеты в

концентрации  $10^4$  КОЕ в лунке и выращивали среде DMEM/F-12 в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в течение 24 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>). Далее, культуральную жидкость заменяли свежей средой с предварительно подготовленными двойными серийными разведениями исследуемых пептидов, после чего планшеты инкубировали дополнительно 24 ч в тех же условиях. Для измерения жизнеспособности клеток, в лунки вносили 20 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) в 3ФР в концентрации 5 г/л после чего инкубировали еще 4 ч. Далее, среду из лунок удаляли и в лунки вносили 100 мкл смеси диметилсульфоксида (ДМСО) и этилового спирта (1 к 1) для растворения образовавшихся под действием дегидрогеназ живых клеток кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора измеряли при 570 нм с помощью микропланшетного ридера. Долю живых клеток определяли по формуле:  $\text{выживаемость (\%)} = [(A_{об} - A_0) \times 100 / (A_k - A_0)]$ , где  $A_{об}$  поглощение исследуемого образца,  $A_k$  поглощение лунки без добавления пептидов, а  $A_0$  фоновое поглощение лунки с растворителем.

Для исследования цитотоксического действия пептидов в отношении мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) был использован анализ восстановления резазурина до резорубина. Для проведения анализа проводили двойные серийные разведения исследуемых пептидов в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС в стерильных 96-луночных полистироловых микропланшетах с плоским дном. Затем к раствору пептидов добавляли равный объем среды RPMI, содержащей суспензию свежeweделенных РВМС, до общего объема 100 мкл и концентрации клеток  $10^5$  в лунке. Планшеты инкубировали в течение 44 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С), после чего добавляли 5 мкл раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,1 мг/мл, и инкубацию продолжали еще 4 ч. Флуоресценцию образовавшегося резорубина измеряли с помощью микропланшетного ридера AF2200 (Eppendorf, Германия) ( $\lambda_{Exc} = 535$  нм;  $\lambda_{Em} = 595$  нм). Уровень жизнеспособности клеток оценивали по аналогичной формуле, как при исследовании с применением МТТ. На основе полученных данных определяли уровень 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) исследуемых АМП.

### 2.11. Исследования проницаемости бактериальных мембран

Оценку влияния исследуемых АМП на проницаемость внешней и цитоплазматической мембран грамотрицательных бактерий оценивали с использованием штамма *E. coli* ML35p, конститутивно экспрессирующего цитоплазматическую  $\beta$ -галактозидазу, но не имеющего пермеазы, а также экспрессирующего  $\beta$ -лактамазу в переплазматическое пространство. Барьерную функцию цитоплазматической мембраны оценивали на основе ее проницаемости для хромогенного маркера *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида (ONPG, AppliChem, Германия), который является субстратом  $\beta$ -галактозидазы, и расщепляется под ее действием с высвобождением *o*-нитрофенола, который имеет желтый цвет и имеет максимум поглощения при длине волны 420 нм. Аналогично, барьерную функцию внешней мембраны оценивали по ее проницаемости для нитроцефина, который при гидролизе под действием переплазматических  $\beta$ -лактамаз дает продукт с высоким поглощением в районе 500 нм.

Клетки *E. coli* ML35p выращивали в жидкой среде LB в течение 18 ч при 37 °С, трижды промывали холодным ЗФР (рН 7,4) для удаления остатков питательной среды, ресуспендировали осадок в исходном объеме двукратного холодного ЗФР. Рабочую суспензию готовили, разбавляя клеточную суспензию в 20 раз холодным двукратным ЗФР с добавлением ONPG до конечной концентрации 4 мМ или нитроцефина до конечной концентрации 20 мкМ. Образцы пептидов двукратно разбавляли в 96-луночной планшете в объеме 100 мкл с использованием 0,1% БСА, после чего добавляли равный объем подготовленной клеточной суспензии. Оптическую плотность (OD) раствора, возрастающую из-за появления *o*-нитрофенола или в результате гидролиза нитроцефина, измеряли при 405 нм или 540 нм, соответственно, с помощью микропланшетного ридера. Между измерениями планшеты инкубировали при 37 °С и примешивании со скоростью 500 об/мин. Контрольные эксперименты проводили в тех же условиях без добавления пептида.

### 2.12. Ингибирование биосинтеза белка *in vitro*

Исследование способности пептидов подавлять бактериальную трансляцию исследовали с использованием бесклеточной реакционной смеси, продуцирующей быстро созревающий вариант зеленого флуоресцентного белка EGFP (F64L, S65T,

Q80R, F99S, M153T, и V163A) под контролем промотора T7. Клеточный лизат был приготовлен с использованием штамма *E. coli* BL21 Star (DE3), экспрессирующего T7 РНК-полимеразу. Реакционная смесь, в пересчете на конечную концентрацию, состояла из следующих компонентов: 1,2 мМ АТФ, 0,8 мМ УТФ, 0,8 мМ ГТФ, 0,8 мМ ЦТФ, 2 мМ каждой из 20 протеиногенных аминокислот, 1,5 мМ спермидина, 1 мМ дигидрохлорида путресцина, 0,06647 мМ фолината кальция, 170 нг/мл тРНК из штамма *E. coli* MRE 600, 0,33 мМ НАД, 120 мМ HEPES-KOH (pH 8,0), 10 мМ глутамата аммония, 175 мМ глутамата калия, 60 мМ глюкозы, 9 мМ глутамата магния, 2% ПЭГ 8000, 25% лизата клеток *E. coli* BL21 Star (DE3), 1 нг/мл плазмидной ДНК.

Исследуемые пептиды последовательно разводили в объеме 17 мкл 0,1% раствора БСА и использованием черных полипропиленовых планшетов с V-образным дном. Подготовленную концентрированную бесклеточную реакционную смесь добавляли в объеме 33 мкл. Реакционную смесь с добавлением пептидов инкубировали в течение 2 ч при 30 °С и перемешивании при 800 об/мин с использованием планшетного шейкера. Уровень синтеза EGFP измеряли с использованием микропланшетного ридера AF2200 (Eppendorf, Германия) ( $\lambda_{\text{Exc}} = 485$  нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 535$  нм). Флуоресценцию лунок без добавления АМП принимали за 100%. Кривые нелинейной регрессии были построены с использованием GraphPad Prism v.8.0.1 (GraphPad Software).

### 2.13. Исследование механизма возникновения резистентности

Селекцию штаммов, резистентных к исследуемым АМП, проводили, используя вышеописанную методику определения МИК в жидкой питательной среде с использованием 96 луночных планшетов, многократно, с интервалом  $20 \pm 2$  ч, пересевая бактерии в свежую питательную среду с различными концентрациями АМП. При этом, начиная со второго дня, для засева нового планшета использовали культуру предыдущего дня из лунки, содержащей субингибирующую концентрацию АМП, максимально близкую к МИК. Для этого 2 – 4 мкл содержимого лунки разбавляли 2 мл свежей двукратной среды МН, содержащей 1,8% NaCl или без добавления соли. Полученную суспензию добавляли аликвотами по 50 мкл в новый планшет к 50 мкл растворов тестируемого АМП, серийно

разведенного в концентрациях от 0,25х до 16х от текущего значения МИК. Последовательные пересевы проводили от 7 до 26 дней, далее еще в течение 7 дней пересевы повторяли в отсутствии пептида (контроль стабильности резистентного фенотипа), после чего производили итоговое определение МИК и консервацию штамма.

#### **2.14. Генетический анализ бактериальных штаммов**

Гены *sbmA* и *yaiW*, кодирующие белки внутренней или внешней мембраны *E. coli* соответственно, а также регуляторную часть их общего оперона, были амплифицированы методом ПЦР с использованием ген-специфических праймеров ((dir: 5'-GTCGAAACAATTCTTATGGTCAG-3', rev: 5'-GCGAAGATAGAGGATTGACGCG-3'). Отдельные бактериальные колонии исследуемого штамма были отобраны из чашки Петри и использованы в качестве матрицы для ПЦР. Для ПЦР смешивали следующие компоненты: 2 мл 10 мМ буфера Encyclo, 0,4 мл 50 мМ ДНК-полимеразы Encyclo, 10 мМ прямого праймера (dir), 10 мМ обратного праймера (rev), 0,2 мМ дНТФ, исследуемые клетки на бактериальной петле и воду, разбавляя смесь до общего объема 20 мл. Амплификация проводилась на термоциклере с использованием следующей программы: начальная денатурация (95 °С, 10 мин), 25 циклов амплификации (94 °С, 30 сек; 55 °С, 40 сек; 72 °С, 90 сек) и финальная элонгация (72 °С, 10 мин). Продукты разделяли электрофорезом на 1,5% агарозном геле (4 В/см) и визуализировали на УФ-трансиллюминаторе. Далее продукты ПЦР выделяли из геля с помощью набора для выделения ДНК (Евроген) согласно инструкции производителя, встраивали в плазмиду pAL-TA (Евроген), согласно протоколу производителя и проводили трансформацию клеток *E. coli* DH10b, с последующим выделением плазмиды с использованием наборов (Евроген) и секвенированием с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems).

#### **2.15. Лечебная эффективность пептидов на мышинной модели инфекции**

Оценку лечебной эффективности исследуемых АМП проводили на модели внутрибрюшинной септицемии совместно с ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. Для этого были использованы самки мышей BALB/c в возрасте 8–10 недель (22–24 г; питомник лабораторных животных «Андреевка» ФМБА, Россия). Группы мышей

по 5-6 животных были инфицированы внутрибрюшинно (в/б) суспензией *E. coli* ATCC 25922 в количестве  $10^6$  КОЕ на особь в присутствии 2,5% муцина (m/v). Контрольная группа с лечением получала ципрофлоксацин (Sigma-Aldrich, США) в качестве положительного контроля в дозе 10 мг/кг на инъекцию, вводимого в/б двукратно, спустя 1 ч и 4 ч после инфицирования. В качестве контрольной группы без лечения использовали группу, получавшую 0,9% раствор NaCl (физиологический раствор), вводимый однократно через 1 ч после заражения. Экспериментальная группа получала раствор исследуемого АМП в дозе 5 мг/кг двукратно, в/б, спустя 1 ч и 4 ч после инфицирования. Выживаемость мышей отслеживалась в течение 7 дней. После этого все выжившие животные были подвергнуты эвтаназии с использованием CO<sub>2</sub> камеры. Для проведения анализа обсемененности, для всех погибших и подвергнутых эвтаназии мышей производили изъятие селезенки. Далее, селезенку гомогенизировали, последовательно разводили и высевали на плотную среду «Эндо-ГРМ» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Объекты исследования

Одним из возможных подходов к решению проблемы антибиотикорезистентности является поиск соединений с принципиально новым механизмом антимикробного действия. Потенциальным источником таких соединений является пул антимикробных пептидов — молекулярных факторов системы врожденного иммунитета. Одной из наиболее интересных групп АМП, выделяющейся особенностями биосинтеза, являются кателицидины. Кателицидины — это большая структурно гетерогенная группа АМП, играющая важную роль во врожденном иммунном ответе позвоночных животных [202]. Данное семейство пептидов характеризуется общей структурой белка-предшественника, включающего сигнальный участок, консервативный кателин-подобный домен и переменный С-концевой участок, из которого в ходе процессинга формируется зрелый АМП [76]. Гены, кодирующие кателицидины, были обнаружены у подавляющего числа позвоночных животных. При этом для некоторых видов характерно наличие всего лишь одного гена кателицидина (например, человеческий LL-37 или мышинный CRAMP), в то время как другие организмы могут экспрессировать сразу несколько различных кателицидинов. Одними из наиболее богатых с точки зрения разнообразия кателицидинов являются виды млекопитающих из отряда китопарнокопытных (лат. *Cetartiodactyla*), включая подотряды мозолоногих (*Tyloroda*), жвачных (*Ruminantia*), свинообразных (*Suina*) и бегемотообразных или китоанкодонтов (*Cetancodonta*). Характерной чертой представителей отряда китопарнокопытных является одновременная экспрессия нескольких структурно различных кателицидинов. Было высказано предположение, что такие пептиды могут взаимно усиливать эффективность друг друга при одновременном воздействии на бактериальные клетки, т.е. проявлять синергизм. В качестве основной модельной системы в рамках данной работы была выбрана панель кателицидинов домашней козы *Capra hircus*. Выбор данного вида был обусловлен доступностью биологического материала, а также наличием в публичных репозиториях многочисленных геномных проектов и транскриптомных данных, полученных из различных тканей. Так же, как и в случае других парнокопытных, в организме козы экспрессируется несколько кателицидинов,

зрелые формы которых относятся к различным структурным классам. Для части из них ранее было показано наличие зрелой матричной РНК в лейкоцитарных клетках [167]. Наибольший уровень экспрессии был показан для генов кателицидина-1 (другие названия: бактенецин-1, додекапептид), кателицидина-3 (другое название: бактенецин 7,5) и кателицидина-6 (другое название: MAP-28).

Ранее нами совместно с коллегами из Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург) из лейкоцитов домашней козы были выделены два новых АМП, названных мини-бактенецинами и обозначенных как mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$  [203]. Эти пептиды являются N-концевыми фрагментами (22 и 21 а.о., соответственно) гипотетического пептида бактенецина ChVac7.5, также классифицируемого как кателицидин-3. Считается, что мини-бактенецины, являясь пролин-богатыми АМП, в качестве мишени в первую очередь воздействуют на внутриклеточные структуры, такие как рибосома 70S и/или белок теплового шока DnaK [87]. Ранее было показано, что для кателицидина-3 из быка *Bos taurus* (другое название Vac7) минимально активным фрагментом, проявляющим способность подавлять биосинтез белка *in vitro*, является N-концевой участок пептида 1-16 [184], поэтому для исследования функциональной активности были выбраны два пептида — полноразмерный mini-ChVac7.5N $\alpha$ , имеющий молекулярную массу 2,9 кДа и включающий 22 аминокислотных остатка, и его укороченный аналог mini-ChVac7.5N $\alpha$  (1-16), имеющий молекулярную массу 2,1 кДа (**Рисунок 9А**). Использование двух вариантов исследуемого АМП с различной длиной аминокислотной последовательности позволяет выявить биологическую роль фрагмента PRPRPR, локализованного на C-концевом участке пептида mini-ChVac7.5N $\alpha$ . Кроме того, в ходе работы было проведено структурно функциональное исследование пептида mini-ChVac7.5N $\alpha$  и получен ряд его модифицированных вариантов с различными аминокислотными заменами.

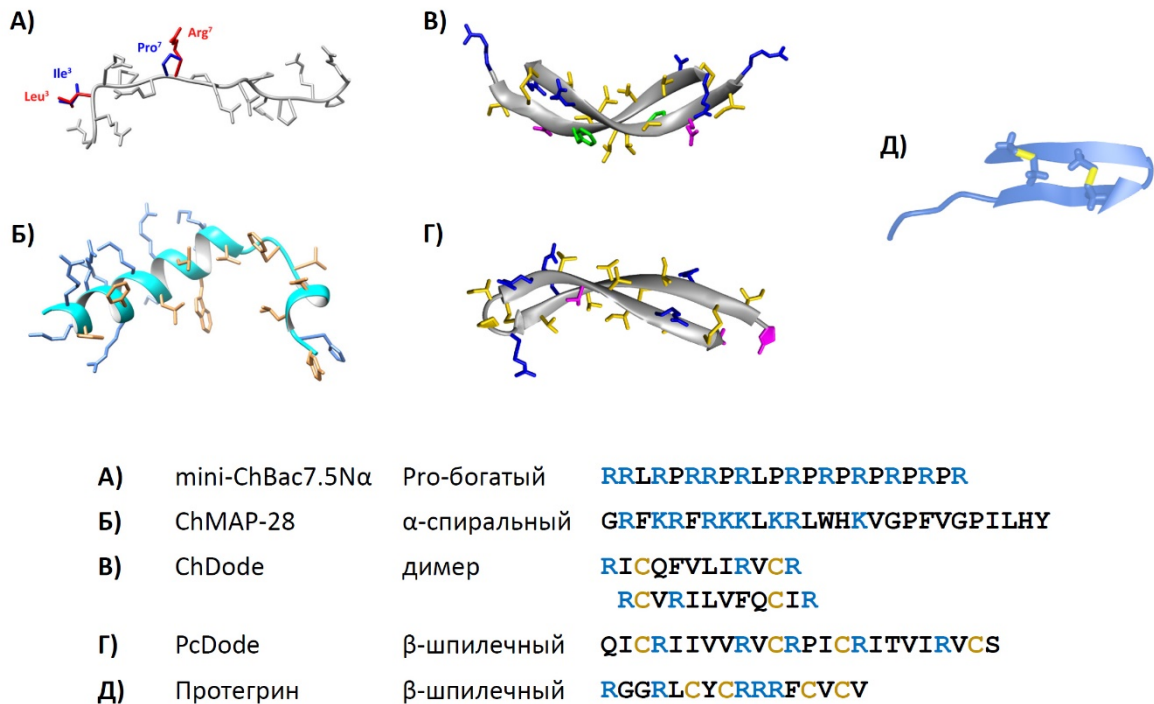
Наряду с mini-ChVac7.5N $\alpha$  был исследован ранее не изученный козий миелоидный АМП кателицидин-6, названный нами ChMAP-28. Первичная структура пептида была предсказана путем анализа депонированной в GenBank последовательности мРНК (AJ243126.1), кодирующей соответствующий белок-предшественник. Данный кателицидин имеет относительно высокий уровень гомологии с альфа-спиральным кателицидином быка *B. taurus* VMAP-27. ChMAP-28

имеет молекулярную массу 3,34 кДа и содержит 11 основных аминокислотных остатков (Arg, Lys, His) (**Рисунок 9Б**).

Еще один пептид, исследованный в рамках данной работы, кателицидин-1 или додекапептид козы *Capra hircus*, обозначенный как ChDode. Его наиболее близким структурным гомологом является кателицидин-1, выделенный из быка *B. taurus*, также известный как бактенецин-1. Первичная структура ChDode была предсказана путем анализа депонированной в GenBank последовательности мРНК (XM\_018038479.1). ChDode состоит из 12 аминокислотных остатков и имеет в своем составе два остатка цистеина (**Рисунок 9В**). Для его гомолога, бактенецина-1 быка, было показано как формирование циклического мономера, так и образование параллельных и антипараллельных димеров [73,161,204]. Поэтому одной из задач исследования было определение пространственной структуры козьего додекапептида. В процессе поиска гомологичных соединений у других китопарнокопытных, в геноме кашалота *Physeter catodon* был обнаружен уникальный ортолог кателицидина-1, обозначенный как PcDode. Позднее предполагаемая последовательность белка-предшественника PcDode была автоматически аннотирована алгоритмами GenBank (XM\_007124827.2). Пептид PcDode включает в себя 24 аминокислотных остатка, в том числе 4 остатка цистеина (**Рисунок 9Г**). Аминокислотная последовательность PcDode состоит из двух додекапептидных участков. Наличие остатка пролина в месте соединения этих двух участков дает основание полагать, что структурно PcDode представляет из себя  $\beta$ -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями. Этот же факт свидетельствует в пользу того, что зрелые додекапептиды могут формировать антипараллельные димеры.

Наибольший интерес с точки зрения использования АМП в качестве препаратов для системного применения представляют  $\beta$ -шпилечные пептиды. За счет своей жесткой структуры они обладают более высокой устойчивостью к деградации протеолитическими ферментами и способностью сравнительно долго циркулировать в кровотоке. Среди кателицидинов наиболее изученным  $\beta$ -шпилечным АМП является протегрин [72], выделенный из лейкоцитов свиньи *Sus scrofa* (**Рисунок 9Д**). Протегрин обладает широким спектром антимикробного действия, однако для него также характерна высокая цитотоксичность в отношении

нормальных клеток человека. Было высказано предположение, что цитотоксичность протегрина может быть следствием его способности к неспецифическому формированию олигомерных структур. С целью уменьшения цитотоксичности протегрина в ходе работы было проведено его структурно-функциональное исследование и получен ряд модифицированных вариантов с более высоким терапевтическим индексом.



**Рисунок 9.** Исследуемые объекты. А) Пространственная структура фрагмента mini-ChBac7.5Nα(1–16), смоделированная на основе кристаллической структуры Bac7(1–16). Б) Модельная пространственная структура ChMAP-28. В) Структура димера ChDode, построенная на основе данных ЯМР-спектроскопии. Г) Структура PcDode, полученная на основе данных ЯМР-спектроскопии. Д) Структура протегрина-2, установленная методом ЯМР-спектроскопии.

Все изученные в рамках настоящей работы АМП не имеют иных посттрансляционных модификаций, кроме образования дисульфидных связей, а также формирования N-концевой пироглутаминовой кислоты (5-оксопролина) у пептида PcDode, поэтому для их получения была выбрана бактериальная система экспрессии на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3). Нуклеотидные конструкции, кодирующие исследуемые пептиды, получали генно-инженерным способом при

помощи сборки из праймеров или путем сайт-направленного мутагенеза ранее полученных конструкций. Собранные нуклеотидные последовательности клонировали в плазмиды семейства рЕТ под контролем промотора T7. Экспрессию белков-предшественников проводили методом автоиндукции лактозой или с добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG). Исследуемые АМП получали в виде слитого белка с модифицированным (M37L) тиоредоксином в качестве белка-носителя. С целью облегчения процесса очистки пептидов к последовательности белка-носителя был добавлен аффинный октагистидиновый участок. Гибридный белок расщепляли бромцианом по введенному в его аминокислотную последовательность остатку метионина. Выделение и очистка исследуемых АМП включала стадии получения клеточного осадка методом центрифугирования, обработку суспензии клеток методом ультразвукового лизиса или с использованием гомогенизатора высокого давления, получения осветленного лизата методом высокоскоростного центрифугирования, а также стадии первичной очистки с использованием аффинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе и финальной очистки методом ВЭЖХ на обращенно-фазовых колонках C18. Гомогенность полученных пептидов контролировали методами аналитической ВЭЖХ и времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ.

### 3.2. Структурно-функциональное исследование mini-ChVac7.5N $\alpha$

Ранее нами совместно с коллегами из Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург) из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* были выделены два пептида с молекулярными массами 2895,5 Да и 2739,3 Да, обладающие выраженной антимикробной активностью и представляющие собой N-концевые фрагменты (1–22 и 1–21) гипотетического пролин-богатого пептида бактенецина 7.5 козы *Capra hircus*, также классифицируемого как кателицидин-3 [203]. Пептиды были названы мини-бактенецинами (mini-ChVac7.5N $\alpha$  и mini-ChVac7.5N $\beta$ , соответственно).

На первом этапе работы в рамках исследования mini-ChVac7.5N $\alpha$  был получен его укороченный аналог (1-16), соответствующий минимальному фрагменту пептида Vac7, способному согласно литературным данным проявлять антимикробную активность и ингибировать биосинтез белка в бактериальных

клетках [184]. Наряду с мини-бактенецинами в качестве второго модельного объекта был выбран ранее не исследованный миелоидный пептид козы, обозначенный ChMAP-28. Его аминокислотная последовательность была собрана на основе депонированной в GenBank последовательности мРНК (AJ243126.1), кодирующей белок-предшественник, обозначаемый как кателицидин-6. Последовательность ChMAP-28 обладает достаточно высокой степенью гомологии с бычьим кателицидином VMAP-27, чтобы предположить, что он будет также обладать высокой антимикробной активностью и мембранотропным механизмом действия. Как и ожидалось, ChMAP-28 продемонстрировал крайне высокий уровень антимикробной активности в отношении всех протестированных штаммов (Таблица 1). Кроме этого, было показано, что подобно VMAP-27 он проявляет свои антимикробные свойства независимо от присутствия физиологических концентраций солей, которые ингибируют *in vitro* активность многих АМП [205]. При этом ChMAP-28 продемонстрировал сравнительно высокий уровень токсичности. Его  $HC_{50}$  в отношении свежесыведенных эритроцитов оказалась на уровне 64 мкМ, в то время как  $IC_{50}$  в отношении клеток линии НЕК293Т (трансформированные клетки эмбриональной почки человека) составила 3,5 мкМ. Примечательно, что схожий уровень токсичности в отношении мышинных клеток линии 3Т3 (линия мышинных эмбриональных фибробластов) (<3,75 мкМ) был показан для VMAP-28, в то время как его  $HC_{50}$  составлял около 20 мкМ.

Ранее было показано, что грамотрицательные бактерии, как правило, более чувствительны к ПБ-АМП по сравнению с грамположительными. Полученные нами результаты тестирования mini-ChBac7.5N $\alpha$  подтверждают это наблюдение. Помимо этого, тестирование активности mini-ChBac7.5N $\alpha$  и mini-ChBac7.5N $\alpha$ (1-16) на панели бактериальных штаммов показало высокую чувствительность данных пептидов к ионной силе среды. (Таблица 1). Ранее подобное снижение чувствительности бактерий в присутствии солей было показано для некоторых ПБ-АМП [206]. Укороченный аналог mini-ChBac7.5N $\alpha$ (1-16) оказался менее активным и более чувствительным к присутствию соли в среде по сравнению с mini-ChBac7.5N $\alpha$  дикого типа. Интересно, что антибактериальная активность данных пептидов была примерно равной при тестировании в бессолевой среде в отношении культур *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae*. В отличие от других

протестированных штаммов (грамположительные бактерии и *P. aeruginosa*), эти бактерии имеют транспортную систему ABC, включающую мембранный белок SbmA. Данный транспортер, а также липопротеин YaiW, могут быть использованы пролин-богатыми пептидами для проникновения в клетку, поскольку мутации в генах, кодирующих данные белки или их делеция приводит к значительному снижению чувствительности клеток, как это было показано для ПБ-АМП Bac7 [207]. Полученные нами результаты показали, что присутствие С-концевого фрагмента PRPRPR не влияет на эффективность транслокации пептида через мембрану с помощью транспортера SbmA в бессолевой среде, но может играть ключевую роль при действии против бактерий с дефицитом SbmA. Ранее различная чувствительность укороченной и полноразмерной форм пептида к ионной силе среды была показана для свиного ПБ-АМП PR-39. Добавление 100 мМ NaCl практически полностью ингибировало активность его укороченных форм, то время как активность полноразмерного варианта в тех же условиях практически не менялась [171]. Наблюдаемые эффекты могут объясняться термодинамическими причинами или изменениями кинетики электростатического взаимодействия между пептидом и отрицательно-заряженными бактериальными мембранами в зависимости от ионной силы раствора, как это было показано для некоторых взаимодействующих с мембранами АМП [205]. Помимо этого, анализ цитотоксической активности минибактенецинов показал, что оба варианта пептида проявляют умеренную активность в отношении клеточной линии НЕК293Т в концентрациях, превышающих ~25 мкМ. Примечательно, что гемолитическая активность обоих пептидов при этом находится на минимальном уровне и приводит к лизису менее 2% эритроцитов в концентрациях 100 мкМ.

**Таблица 1.** Антимикробная активность кателицидинов в среде Мюллера-Хинтон в отсутствие или с добавлением соли в физиологической концентрации.

Штамм	sbmA/ yaiW	МИК * ( мкМ)					
		ChMAP-28		mini-ChBac7.5N $\alpha$		mini-ChBac7.5N $\alpha$ (1-16)	
		Без NaCl	0,9% NaCl	Без NaCl	0,9% NaCl	Без NaCl	0,9% NaCl
<i>M. luteus</i> В-1314	-/-	0,25	0,5	0,125	0,5	1	8
<i>B. subtilis</i> В-886	-/-	0,25	1	0,25	4	1	>32

<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-/-	4	>8	>32	>32	>32	>32
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-/-	1	2	8	>32	>32	>32
<i>S. aureus</i> 209P	-/-	0,06	0,5	2	16	8	>32
<i>E. coli</i> C600	+/+	0,06	0,125	2	4	2	16
<i>E. coli</i> ML35p	+/+	0,06	0,06	0,5	4	0,5	8
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-/-	0,25	1	2	>32	16	>32
<i>A. baumannii</i> (XDR CI 2675)	+/-	0,03	0,25	2	>32	4	>32
<i>K. pneumoniae</i> (CI 287)	+/+	0,125	0,5	4	16	4	>32
<i>E. cloacae</i> (XDR CI 4172)	+/+	0,125	0,25	1	4	1	>32

\*медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах

Несмотря на высокую степень гомологии с N-концевым фрагментом известного пролин-богатого АМП Bac7, минибактенецин mini-ChBac7.5N $\alpha$  обладает рядом существенных структурных отличий, которые могут влиять на механизм его взаимодействия с рибосомой. Целью данной части работы было проведение структурно-функционального исследования минибактенецина козы mini-ChBac7.5N $\alpha$  и поиск в его структуре ключевых аминокислотных остатков для проявления антимикробной активности. Полученные результаты могут быть использованы для создания терапевтически ценных вариантов данного пептида. В рамках данного исследования был получен ряд модифицированных вариантов исследуемого АМП (**Рисунок 10**). Панель исследуемых соединений включает в себя рекомбинантный mini-ChBac7.5N $\alpha$  и его укороченный аналог mini-ChBac7.5N $\alpha$ (1-16), а также мутантные варианты: включающие дополнительный N-концевой аминокислотный остаток Arg или Ala, варианты с аминокислотными заменами в C-концевом участке пептида с целью повышения его гидрофобности (mini-PF, mini-PL и mini-PW) также набор вариантов с последовательной заменой каждой из первых восьми аминокислот на остаток аланина с целью проведения структурно-функционального исследования. Кроме этого был получен химерный вариант, несущий N-концевой мотив VDK, с целью сократить длину пептида и придать ему структурное сходство онкоцином клопа *Oncopeltus fasciatus*, для которого ранее было показано высокое сродство с 50S субъединицей рибосомы [86]. Позднее был

получен еще один вариант с удлиненным С-концевым участком с добавлением дополнительных остатков Trp, обозначенный mini-(PW)3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Bac7(1-22)	R	R	I	R	P	R	P	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	F	P	R
mini-ChBac7.5a	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini-ChBac7.5Na(1-16)	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	-	-	-	-	-	-
mini-PF	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	F	P	R
mini-PL	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	R	P	R
mini-PW	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	W	P	W	P	R
mini-(PW)3	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[+R]	R	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
mini[+A]	A	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
mini[R1A]	A	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[R2A]	R	A	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[L3A]	R	R	A	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[R4A]	R	R	L	A	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[P5A]	R	R	L	R	A	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[R6A]	R	R	L	R	P	A	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[R7A]	R	R	L	R	P	R	A	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[P8A]	-	R	R	L	R	P	R	R	A	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
mini[VDK]	-	-	-	-	V	D	K	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
Онкоцин	-	-	-	-	V	D	K	P	P	Y	L	P	R	P	R	P	R	R	I	Y	N	R

**Рисунок 10.** Выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых вариантов минибактенецина mini-ChBac7.5Na и известных пролин-богатых АМП. Консервативная консенсусная последовательность, обеспечивающая эффективное связывание онкоцин-подобных пролин-богатых АМП в рибосомном тоннеле, выделена пунктирной линией.

Для всех полученных модифицированных вариантов минибактенецина была определена биологическая активность в отношении нескольких бактериальных штаммов *E. coli* (Таблица 2), включая клинический изолят *E. coli* 1057, обладающий множественной лекарственной устойчивостью, а также штаммы с нокаутным фенотипом по трансмембранным белкам-транспортёрам OmpF и SbmA, поскольку ранее было показано, что мутации в данных белках могут быть причиной развития устойчивости к пролин-богатым АМП [208,209].

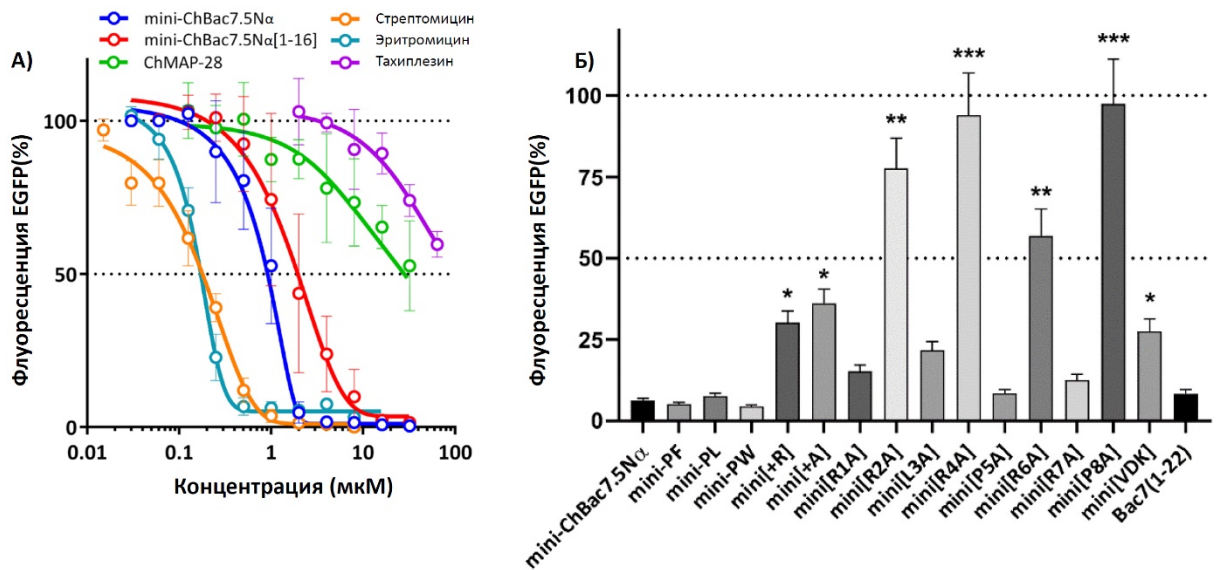
Ингибирование бактериальной трансляции подтверждали с использованием бесклеточной системы, синтезирующий репортерный белок EGFP. Способность минибактенецина и его укороченного аналога (1-16) ингибировать биосинтез белка сравнили с таковой для конвенциональных антибиотиков, а также других антимикробных пептидов — ChMAP-28 и  $\beta$ -шипилечного АМП тахиплецина

(Рисунок 11А). Значение концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) для mini-ChBac7.5N $\alpha$  составило 1 мМ, что сопоставимо с таковым для антибиотиков-ингибиторов бактериальной трансляции — стрептомицина и эритромицина. Кроме того, значения  $IC_{50}$  для mini-ChBac7.5N $\alpha$  соответствовали опубликованным ранее значениям  $IC_{50}$  его гомологов — фрагментов Bac7 [184], а также хорошо коррелируют с ранее определенными значениями МИК в отношении *E. coli* в бессолевой среде. Фрагмент mini-ChBac7.5N $\alpha$ (1–16) сохраняет способность ингибировать биосинтез белка, однако действует в два раза менее эффективно, чем mini-ChBac7.5N $\alpha$  дикого типа, что хорошо согласуется с общим снижением его антимикробной активности по сравнению с полноразмерным пептидом (Таблица 2). Способность модифицированных вариантов минибактенецина подавлять синтез белка сравнивали с ингибирующей активностью природного mini-ChBac7.5N $\alpha$  и фрагмента Bac7(1-22) с использованием той же системы (Рисунок 11Б). Для проведения скрининга была выбрана концентрация пептидов 4 мкМ, что сопоставимо со значениями МИК для природного минибактенецина в отношении *E. coli*.

**Таблица 2.** Сравнение антибактериальной активности минибактенецина и его модифицированных вариантов.

Пептид	МИК* (мкМ)			
	Штамм			
	<i>E. coli</i> 1057	<i>E. coli</i> BW25113	<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta sbmA$	<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta ompF$
mini-ChBac7.5N $\alpha$	8	8	32	16
mini-PF	4	4	32	8
mini-PL	4	4	32	16
mini-PW	4	2	32	8
mini[+R]	8	8	64	32
mini[+A]	8	8	64	32
mini[R1A]	8	8	32	16
mini[R2A]	16	8	64	32
mini[L3A]	8	8	32	32
mini[R4A]	16	16	64	32
mini[P5A]	8	8	32	16
mini[R6A]	16	16	64	32
mini[R7A]	4	8	32	8
mini[P8A]	64	64	128	256
mini[VDK]	64	32	128	128

\* медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах



**Рисунок 11.** А) Влияние ChMAP-28, полноразмерного mini-ChBac7.5Nα и его укороченного аналога (1-16), тахиплезина-1 и классических антибиотиков в различных концентрациях на флуоресценцию, возникающую в результате синтеза EGFP *in vitro* в бесклеточной системе с использованием экстракта клеток *E. coli* BL21 (DE3) Star. Б) Оценка ингибирования модифицированными аналогами mini-ChBac7.5Nα в концентрации 4 мкМ процесса трансляции в той же системе.

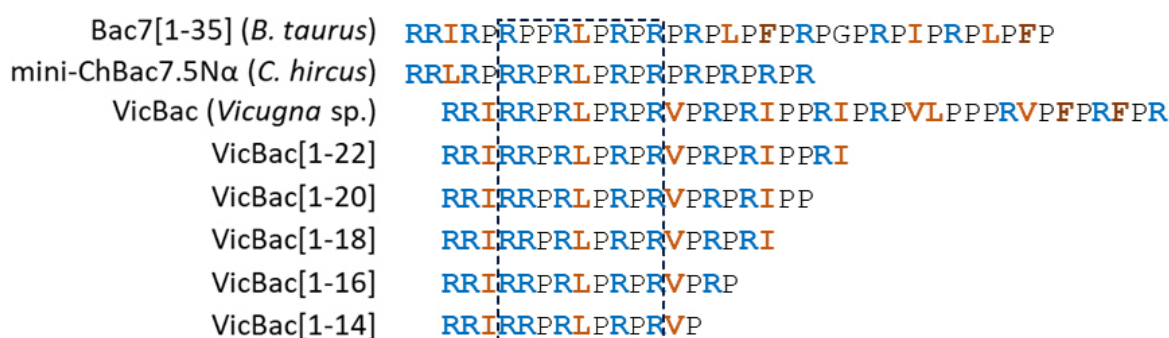
Все исследованные модифицированные варианты минибактенецина mini-ChBac7.5Nα, за исключением mini-[P8A] и mini-[VDK], показали близкие значения МИК в отношении природного штамма *E. coli* BW25113. Для большей части из них также показано снижение активности в отношении штамма *E. coli* ΔompF. Как и ожидалось, варианты с повышенной гидрофобностью — mini-PF и mini-PW (но не mini-PL) продемонстрировали независимость от функционирования данного транспортера. Интересно, что аналогичный эффект наблюдался для пептида mini[R7A]. Для всех протестированных вариантов наблюдается значительное снижение активности в отношении штамма *E. coli* ΔsbmA, что свидетельствует о высокой значимости транспортера SbmA для транслокации минибактенецина через внутреннюю мембрану *E. coli*.

Результаты исследования ингибирования процесса трансляции (**Рисунок 11Б**) показывают, что замена остатков аргинина на аланин во всех случаях, за исключением варианта mini[R7A], негативно сказывается на способности вариантов

минибактенецина ингибировать биосинтез белка. Данный эффект может объясняться ролью, которую играет гуанидиновая группа остатков аргинина при взаимодействии с компонентами рибосомного туннеля [85]. Однако, сопутствующее увеличение гидрофобности вариантов минибактенецина, потенциально улучшающее их способность к транслокации внутрь клеток, может объяснить менее выраженное снижение их активности в отношении клеток *E. coli* (Таблица 2). Косвенно это подтверждается тем фактом, что вариант mini[R7A], для которого не наблюдается подавление способности к ингибированию биосинтеза белка, проявляет несколько более высокую активность в отношении штамма с делецией гена *ompF*, по всей видимости, за счет более эффективного проникновения через внешнюю мембрану *E. coli*. По всей видимости, остаток Arg7, в отличие от тех же остатков в других положениях, не формирует сильных взаимодействий при связывании с бактериальной рибосомой. Косвенно этот факт подтверждается тем, что в аналогичной позиции у гомологичного Bac7 на данном месте находится остаток пролина. Примечательно, что замена остатка Pro8 на аланин приводит к значительному снижению антимикробной активности пептида и его способности подавлять синтез EGFP, что подтверждает ключевую роль данного остатка во взаимодействии с рибосомой. Интересно, что химерный вариант mini[VDK] демонстрирует незначительное уменьшение способности ингибировать работу рибосомы, которая сравнима с таковой для mini[+R] и mini[+A] и ощутимо превосходит активность вариантов с заменами аргинина во 2, 4 и 6 положениях. Однако по сравнению с ними, уровень активности данного варианта в отношении живой культуры *E. coli* оказывается значительно снижен, что, вероятно, может объясняться пониженной способностью данного варианта к проникновению в живые клетки, что дополнительно подтверждается его минимальной активностью в отношении штамма  $\Delta ompF$ .

Исследование другого ингибитора бактериальной трансляции — пролин-богатого кателицидина из альпаки *Vicugna pacos*, названного нами VicBac, показало, что N-концевой участок данного пептида играет ключевую роль в процессе ингибирования рибосомы, как это было ранее показано для пептидов Bac7 и Tur1A [74,182], а C-концевой гидрофобный участок отвечает за способность пептида к проникновению в клетку. Полноразмерный VicBac проявляет высокую

биологическую активность, не зависящую от присутствия в среде солей, а также от наличия SbmA транспортера. В то же время, его укороченные аналоги (**Рисунок 12**) сохраняют способность к ингибированию трансляции вплоть до уменьшения размера пептида до 16 первых аминокислотных остатков. Однако, антимикробная активность укороченных пептидов резко снижается в присутствии солей в физиологической концентрации. Кроме того, активность укороченных аналогов зависит от наличия основных транспортерных белков SbmA и OmpF (**Таблица 3**), что дополнительно подтверждено в рамках эксперимента по индукции бактериальной резистентности к аналогам VicBac: в отношении всех укороченных аналогов наблюдалось быстрое развитие резистентности по механизму инактивации или модификации SbmA транспортера. Помимо этого, полноразмерный VicBac проявлял активность в отношении не продуцирующих транспортерные белки штаммов *P. aeruginosa* (значение МИК 4-8 мкМ), в то время как его укороченные аналоги теряли данную активность.



**Рисунок 12.** Выравнивание аминокислотных последовательностей VicBac, его укороченных аналогов и других известных пролин-богатых кателицидинов. Консенсусная последовательность, необходимая для ингибирования синтеза белка пролин-богатыми АМП, выделена пунктирной рамкой.

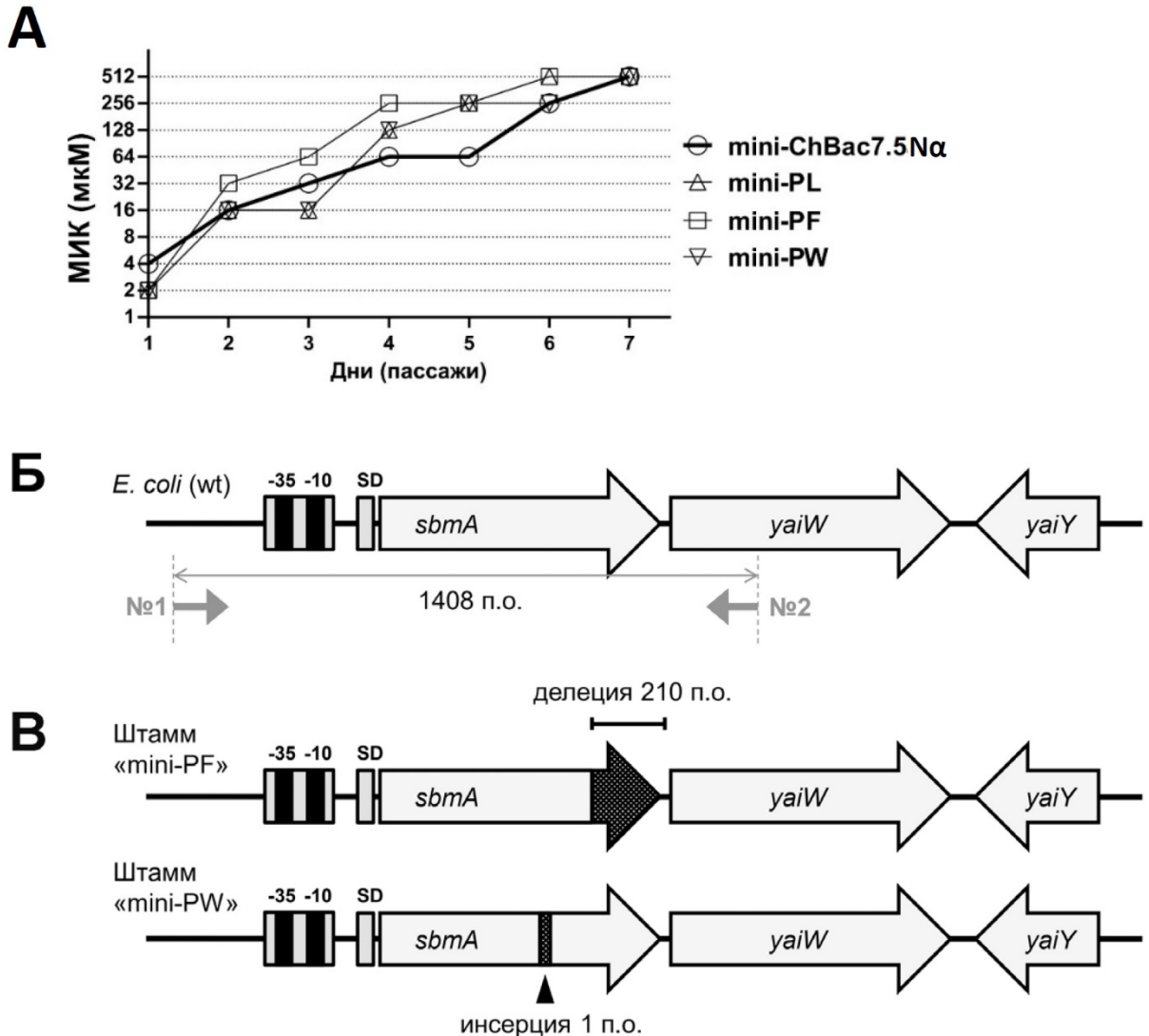
**Таблица 3.** Антибактериальная активность полноразмерного VicBac ([1-39]) дикого типа и его укороченных вариантов в среде Мюллера-Хинтон в отсутствие или с добавлением 0,9% NaCl.

Штамм <i>E. coli</i>	0,9% NaCl	МИК (мкМ)					
		Аналоги VicBac					
		[1-14]	[1-16]	[1-18]	[1-20]	[1-22]	[1-39]
ATCC25922	+	32	4	2	8	1	1
	-	>64	32	2	4	0,5	0,5

BW25113	+	64	8	4	8	2	1
	-	>64	64	4	4	1	1
$\Delta sbmA$	+	64	8	4	8	4	2
	-	>64	>64	>64	>64	16	2
$\Delta ompF$	+	64	8	8	16	2	1
	-	>64	64	16	64	8	1

С целью изучения способности вариантов минибактенецина с дополнительными гидрофобными остатками вызывать формирование резистентности была проведена оценка динамики развития резистентности штамма *E. coli* 1057 к аналогу природного mini-ChVac7.5Na, а также к его вариантам с повышенной гидрофобностью (mini-PF, mini-PL, mini-PW) (**Рисунок 13А**). В результате эксперимента было показано быстрое формирование устойчивости штамма *E. coli* 1057 в течение 7 дней ко всем тестируемым пептидам. Отобранные клоны, сохраняющие уровень резистентности в течение семи последовательных пересевов без добавления пептида, были исследованы методом ПЦР-амплификации и последующего секвенирования гена *sbmA* с целью подтверждения ожидаемого механизма развития резистентности. Как и ожидалось, в результате секвенирования штаммов *E. coli*, устойчивых к гидрофобным вариантам mini-PF и mini-PW, были обнаружены мутации в гене *sbmA* (**Рисунок 13Б**), вызывающие нарушение его функциональной активности (делеция 210 п.о., затрагивающая С-концевую часть последовательности SbmA, включая стоп-кодон; и однонуклеотидная инсерция, приводящая к сдвигу рамки считывания), что согласуется с ранее полученными данными для других пролин- богатых АМП [210,211]. Полученный результат является подтверждением того, что белок SbmA служит ключевым транспортером коротких пролин-богатых АМП с различной структурой в присутствии солей в физиологической концентрации. Кроме того, было обнаружено, что кривые роста у полученных резистентных штаммов и исходного *E. coli* (MDR) 1057 были аналогичны, что свидетельствует о низкой затратности (fitness cost) данных мутаций, т.е. свидетельствует о незначительной роли транспортера SbmA для роста бактерий в условиях эксперимента. Стоит отметить, что физиологическая роль транспортера SbmA до сих пор неизвестна, хотя показано, что ряда штаммов гомологичные белки

отвечают за симбиотические взаимоотношения, как это было показано для клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti* [212], или являются факторами вирулентности [213,214].



**Рисунок 13.** А) Формирование резистентности к вариантам минибактенецина у штаммов *E. coli* 1057. Б) Схема ПЦР-амплификации участка генома *E. coli*, включающего гены *sbmA* и *yaiW*, входящие в один оперон. В) Локализация обнаруженных в гене *sbmA* мутаций у штаммов, полученным на основе *E. coli* 1057 и характеризующихся пониженной чувствительностью к пептидам mini-PF и mini-PW.

Поскольку замены остатков аргинина на триптофан или фенилаланин в С-концевом участке полипептидной цепи минибактенецина оказалось недостаточно для преодоления зависимости эффективности его проникновения в клетку от наличия SbmA транспортера, нами был разработан вариант mini-(PW)<sub>3</sub> с увеличенной гидрофобностью С-концевого участка за счет его удлинения и

добавления трех остатков триптофана (**Рисунок 10**). Тестирование антимикробной активности данного варианта продемонстрировало его способность подавлять рост штаммов *E. coli* с инактивированным SbmA транспортером, резистентных к mini-ChVac7.5Na. Помимо этого, добавление гидрофобного С-концевого участка значительно повысило эффективность действия варианта mini-(PW)3 в отношении некоторых бактериальных штаммов (**Таблица 4**), включая отобранные резистентные штаммы с устойчивостью к полимиксину В, минибактенецину и Vac7. Данные штаммы, названные [PMB-res], [mini $\alpha$ -res] и [Vac7-res], соответственно, были получены на основе исходного штамма *E. coli* 1057. Следует отметить, что изучение способности варианта mini-(PW)3 влиять на проницаемость цитоплазматической мембраны не выявило никаких отличий относительно природного варианта mini-ChVac7.5Na [215]. Полученные данные свидетельствуют о том, что модификация С-концевого участка пролин-богатых бактенецин-подобных ингибиторов трансляции является перспективным направлением, позволяющим улучшить прямое антимикробное действие данных пептидов.

**Таблица 4.** Антибактериальная активность mini-ChVac7.5 $\alpha$  дикого типа и его варианта mini-(PW)3 в среде Мюллер-Хинтон с добавлением 0,9% NaCl в отношении слабочувствительных бактерий.

Бактериальный штамм	МИК (мкМ)	
	mini-ChVac7.5 $\alpha$	mini-(PW)3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	0,5
<i>E. coli</i> (MDR) 1057	4	0,25
<i>E. coli</i> 1057 [PMB-res]	64	2
<i>E. coli</i> 1057 [mini $\alpha$ -res]	>64	1
<i>E. coli</i> 1057 [Vac7-res]	>64	1
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	16	1
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	32	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>32	16
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	>32	16
<i>P. aeruginosa</i> (MDR CI 223)	>32	>32

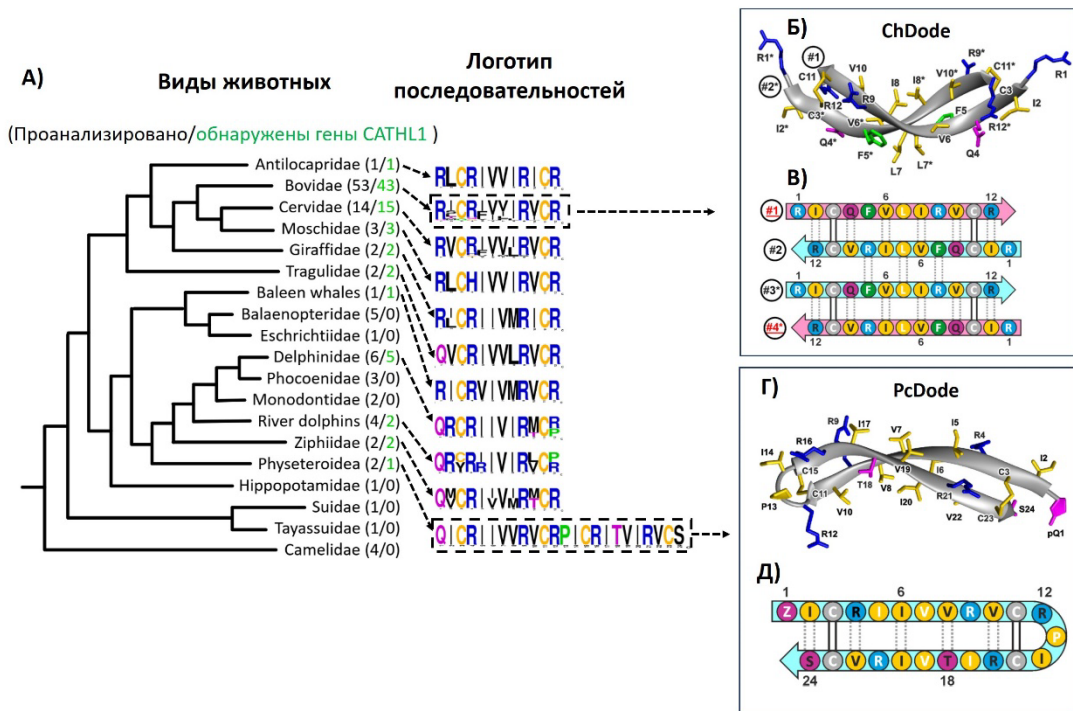
<i>P. aeruginosa</i> (XDR CI 236)	>32	32
<i>P. aeruginosa</i> (MDR CI 1049)	>32	>32
<i>P. aeruginosa</i> (XDR CI 1995)	>32	8

### 3.3. Изучение структуры и антимикробной активности додекапептидов

Кателицидины-1 (также известные как бактенецины или додекапептиды) — небольшие антимикробные пептиды, впервые выделенные из нейтрофильных гранул представителей семейства полорогих (лат. Bovidae). Наиболее изученным представителем додекапептидов является бактенецин быка *Bos taurus*. Зрелый бактенецин состоит из 12 аминокислотных остатков и содержит два остатка цистеина в положениях 3 и 11 [73]. Считается, что бактенецин образует внутреннюю дисульфидную связь, приводящую к формированию 9-членного кольца. Однако в некоторых работах показано, что нативная форма пептида может представлять собой антипараллельный или параллельный  $\beta$ -структурный димер, где остатки цистеина образуют два межмолекулярных дисульфидных мостика [161].

В рамках данной работы была проанализирована естественная изменчивость генов кателицидинов-1 *CATHL1* у различных видов из отряда китопарнокопытных (лат. Cetartiodactyla) (**Рисунок 14А**) и изучена пространственная структура полученного рекомбинантного додекапептида козы *Capra hircus*, обозначенного как ChDode. Всего было проанализировано 108 видов семейства Cetartiodactyla и было идентифицировано 77 последовательностей, кодирующих целевые пептиды. Полученные данные свидетельствуют о том, что происхождение генов додекапептидов произошло после разделения клады Cetruminantia и других представителей отряда Artiodactyla, поскольку соответствующие гены не были обнаружены у представителей семейства Suidae и подотряда Tylopoda. Анализ возможной псевдогенизации гена *CATHL1* не был проведен, однако в соответствующих генах китайского мунтжака *Muntiacus reevesi* и африканского буйвола *Syncerus caffer* были обнаружены мутации, приводящие к появлению стоп-кодона на месте первого аминокислотного остатка, соответствующего зрелой форме пептида. Согласно данным, полученным методами спектроскопии кругового дихроизма (КД), инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИКФС) и ЯМР-

спектроскопии, рекомбинатный ChDode в водной среде имеет структуру ковалентно сшитого антипараллельного  $\beta$ -структурного гомодимера, содержащего 24 аминокислотных остатка и стабилизированного двумя межмолекулярными дисульфидными связями. В среде, имитирующей мембрану, ChDode подвергается дальнейшей олигомеризации с образованием плоского  $\beta$ -структурного тетрамера. Пространственная структура симметричного антипараллельного нековалентного тетрамера, сформированного из двух ковалентных димеров ChDode (**Рисунок 14Б,В**), была определена совместно с сотрудниками отдела структурной биологии ГНЦ ИБХ РАН с помощью ЯМР-спектроскопии в мицеллах ДФХ. Таким образом, было показано, что наряду с протегинами, додекапептиды являются представителями  $\beta$ -структурных кателицидинов.



**Рисунок 14.** А) Представленность генов *CATHL1* в отряде Cetartiodactyla встречаемость аминокислотных остатков (логотип последовательности). Б) Структура ковалентного антипараллельного димера козьего кателицидина-1 ChDode в воде, установленная методом ЯМР-спектроскопии (PDB 7ACE). В) Схематическое изображение антипараллельного нековалентного тетрамера из двух антипараллельных ковалентно сшитых гомодимеров ChDode, формирующийся в мицеллах ДФХ. Г) Структура  $\beta$ -шпильчатого кателицидина-1 PcDode в воде, установленная методом ЯМР-спектроскопии (PDB 7OSC). Д) Схематическое изображение PcDode.

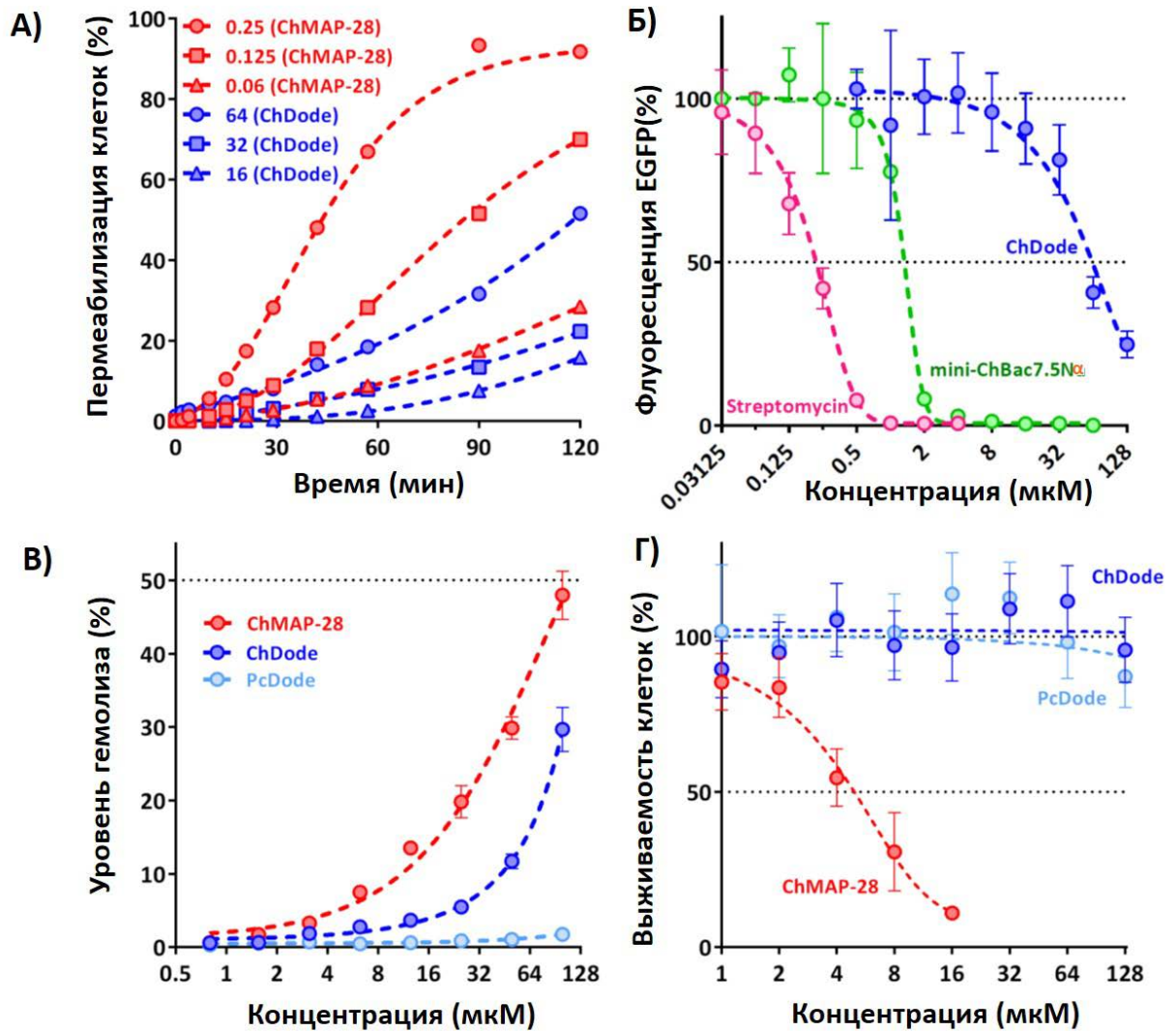
В ходе изучения естественной изменчивости генов *CATHL1* нами был обнаружен уникальный додекапептид кашалота *Physeter catodon*, обозначенный как PcDode. Аминокислотная последовательность PcDode содержит 24 остатка и представляет собой два додекапептидных блока. Вероятно, такая структура появилась в результате дубликации соответствующего участка гена. Анализ структуры данного гена, как и козьего *CATHL1*, показал, что он обладает всеми признаками функционального кателицидина [216], включая суммарный размер гена (около 2 кб), расположение четырех экзонов с функциональными сайтами сплайсинга, расположенный перед сайтом транскрипции ТАТА-бокс и расположенный примерно в 80 п.о. от стоп-кодона сигнал полиаденилирования.

Согласно результатам ЯМР-спектроскопии, PcDode принимает структуру  $\beta$ -шпильки, стабилизированную двумя внутримолекулярными дисульфидными связями между остатками цистеинов в положениях 3-23 и 11-15 (**Рисунок 14Г,Д**). Структурная организация PcDode является дополнительным подтверждением того, что природные додекапептиды могут формировать антипараллельные димеры. Тестирование антимикробной активности додекапептидов показало, что они обладают сравнительно невысоким уровнем антимикробной активности. Так измеренные значения МИК для ChDode в отношении тестового штамма *E. coli* ML35r составили 8 мкМ в бессолевой среде и 16 мкМ при добавлении 0.9% NaCl. В аналогичных тестах PcDode показал значения 16 и 64 мкМ, соответственно. Тестирование активности ChDode в отношении липосом и плоских липидных мембран показало, что он обладает мембранотропной активностью и способен образовывать тороидальные поры при воздействии на модельную мембрану, содержащую анионные липиды. При этом пептид продемонстрировал довольно низкий уровень пермеабилзации мембраны в отношении клеток *E. coli* ML35r при тестировании их проницаемости для ONPG (**Рисунок 15А**). В концентрации, соответствующей значению МИК (16 мкМ) ChDode вызывал менее чем 20% уровень повреждения цитоплазматической мембраны бактерий. Для сравнения: мембраноактивный пептид ChMAP-28 вызвал пермеабилзацию 30% и 75% клеток в близких к МИК концентрациях 0,06 и 0,125 мкМ, соответственно. Таким образом, мы предполагаем, что ChDode обладает мембранотропной активностью и снижает

барьерную функцию бактериальных мембран, но не приводит к их быстрому и полному разрушению.

Мы предполагаем, что именно воздействие на мембрану является основным механизмом его прямого антимикробного действия. Вместе с этим, ChDode способен в некоторой степени ингибировать биосинтез белка, возможно, за счет ДНК-связывающей активности (**Рисунок 15Б**), как это было показано для некоторых других  $\beta$ -шпилечных АМП [217]. Однако, ингибирование биосинтеза белка происходит в диапазоне концентраций, значительно превышающих значения МИК. Оценку цитотоксических эффектов ChDode проводили в отношении человеческих эритроцитов и адгезионной клеточной культуры человеческих кератиноцитов (HaCaT). Эксперимент показал, что ChDode демонстрирует весьма умеренный гемолитический эффект. Однако, концентрация, вызывающая лизис 10% эритроцитов при воздействии ChDode составляет 50 мкМ и всего в три раза превышает его значение МИК в отношении *E. coli*, что указывает на низкую специфичность его действия (**Рисунок 15В**). В то же время PcDode продемонстрировал меньшую антимикробную активность, но при этом полное отсутствие гемолитического эффекта. Интересно, что при изучении цитотоксической активности в отношении линии HaCaT, оба пептида показали полное отсутствие токсических эффектов даже в максимальной концентрации 128 мкМ, (**Рисунок 15Г**), что может быть объяснено их связыванием с белками сыворотки крови.

Таким образом, было показано, что аналоги кателицидина-1 широко представлены среди представителей отряда китопарнокопытных, однако их прямая антимикробная активность находится на достаточно низком уровне, что вызывает вопросы о функциях данного подсемейства кателицидинов. Возможная биологическая роль додекапептидов была раскрыта в настоящей работе в рамках исследования совместного действия АМП.



**Рисунок 15.** Биологическая активность кателицидинов. А) Изменение проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35r при действии додекапептида ChDode в сравнении с кателицидином ChMAP-28. Тестирование пермеабилзации клеток с использованием *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида (ONPG). Б) Влияние кателицидинов и стрептомицина в различных концентрациях на флуоресценцию, возникающую в результате синтеза EGFP *in vitro* с использованием экстракта клеток *E. coli* BL21 (DE3) Star. Сравнение с пролин-богатым кателицидином mini-ChBac7.5N $\alpha$ . В) Гемолитическая активность пептидов. Анализ разрушения эритроцитов и высвобождения гемоглобина после 1,5 ч инкубации с пептидами. Г) Цитотоксичность пептидов по отношению к кератиноцитам человека (клеткам HaCaT). МТТ-тестирование после 24 ч инкубации с пептидами.

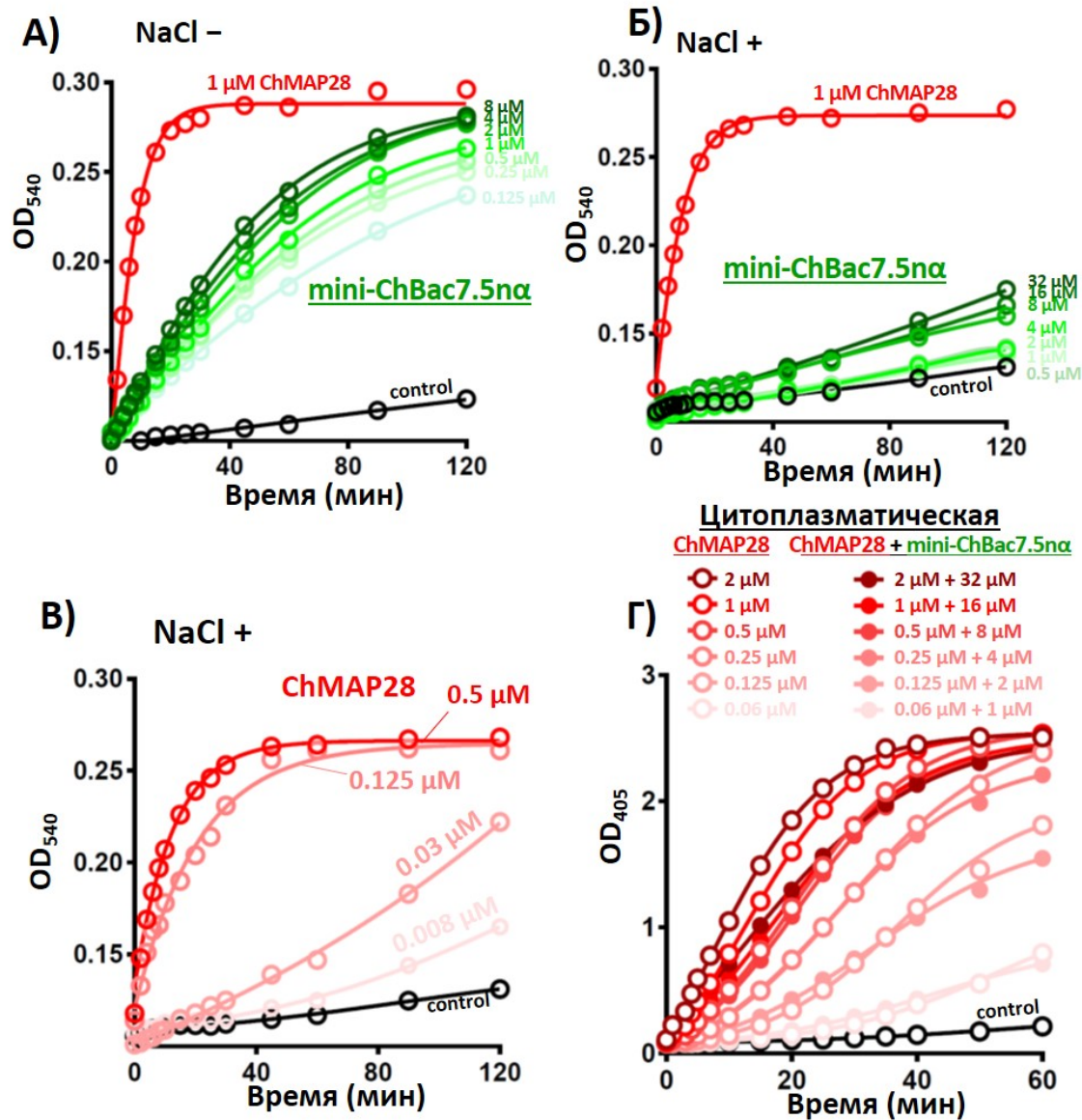
### 3.4. Изучение совместного действия кателицидинов козы *Capra hircus*

Для всех представителей отряда Cetartiodactyla характерной особенностью является наличие множественных генов кателицидинов. Часто в организме одного представителя китопарнокопытных могут экспрессироваться сразу несколько структурно различных кателицидинов. Так, в лимфоцитах козы *Capra hircus* ранее был обнаружен высокий уровень синтеза мРНК для трех кателицидинов -  $\alpha$ -спирального ChMAP-28, пролин-богатого mini-ChBac7.5N $\alpha$  и  $\beta$ -структурного ChDode [167]. Кателицидин ChMAP-28 обладает ярко выраженной мембранотропной активностью. Для ChDode также характерна активность в отношении бактериальных мембран, тогда как mini-ChBac7.5N $\alpha$  действует на внутриклеточные мишени. При этом способность mini-ChBac7.5N $\alpha$  к проникновению через мембрану зависит от ионной силы раствора и подавляется физиологическими концентрациями солей. Данные особенности исследуемых кателицидинов позволили предположить возможность синергического эффекта при их совместном применении в отношении бактериальных клеток. Исследование синергического действия пептидов изучали методом перекрестных двойных серийных разведений в жидкой среде (методом «шахматной доски») [201]. Наличие синергического эффекта определяли, рассчитывая индекс ФИК =  $\text{ФИК}_A + \text{ФИК}_B = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$ , где  $\text{МИК}_A$  и  $\text{МИК}_B$  - значения МИК для тестируемых соединений при индивидуальном применении, а [A] и [B] - концентрации тестируемых соединений в лунке, определяемой как МИК при совместном применении. Значения индекса  $\text{ФИК} < 0.5$  свидетельствуют о проявлении соединениями синергических эффектов.

При отработке методики эксперимента, нами было проведено изучение синергизма между АМП и классическими антибиотиками. Было показано, что существенный вклад в наблюдаемые значения МИК исследуемых пептидов вносят сорбция пептидов на пластике микропланшетов и состав культуральной среды. Внесение второго антимикробного агента может влиять в том числе на процессы сорбции исследуемого АМП, что может приводить к наблюдению ложно синергических эффектов. Для получения более стабильных результатов при определении значений МИК в жидкой среде и изучения синергизма нами была разработана методика, включающая приготовление растворов исследуемых

пептидов с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), что предотвращает неспецифическую сорбцию АМП и повышает их биодоступность.

Нами было показано, что присутствие NaCl в физиологической концентрации значительно снижает активность mini-ChVac7.5N $\alpha$  в отношении бактериальных клеток. Исследование проницаемости внешней мембраны для нитроцефина под действием различных концентраций минибактенецина показала, что в присутствии 0,9% NaCl наблюдается его значительное снижение (**Рисунок 16А,Б**). В то же время, ChMAP-28 способен вызывать повышение проницаемости внешней и цитоплазматической мембраны независимо от присутствия солей (**Рисунок 16В**). Исследование совместного действия и расчет индекса ФИК для пары mini-ChVac7.5N $\alpha$  + ChMAP-28 показал наличие ярко выраженного синергического эффекта (**Таблица 5**). Интересно, что в наблюдаемой паре соединений, присутствие незначительных концентраций ChMAP-28 восстанавливало активность компонента mini-ChVac7.5N $\alpha$  до такого уровня, который наблюдался в отношении данных штаммов при тестировании в отсутствие солей. Ранее подобное восстановление утерянной под действием солей активности было показано для  $\alpha$ -дефенсинов в присутствии человеческого LL-37 [199]. При этом проницаемость цитоплазматической мембраны, индуцируемая ChMAP-28, не увеличивается в присутствии mini-ChVac7.5N $\alpha$  в различных концентрациях (**Рисунок 16Г**). Таким образом мы предполагаем, что синергизм в паре mini-ChVac7.5N $\alpha$  + ChMAP-28 проявляется, в первую очередь, за счет увеличения проницаемости мембраны под действием ChMAP-28 в субингибирующих концентрациях, что приводит к более эффективному проникновению mini-ChVac7.5N $\alpha$  в клетку.



**Рисунок 16.** Изменение проницаемости внешней и цитоплазматической мембран *E. coli* ML35p, измеренная с использованием хромогенных маркеров — продуктов гидролиза нитроцефина (OD<sub>540</sub>) и ONPG (OD<sub>405</sub>), соответственно. А) Проницаемость внешней мембраны после инкубации бактерий с mini-ChBac7.5Nα в различных концентрациях (от 0,125 до 32 мМ, выделено градиентом зеленого цвета) в среде МН без добавления NaCl. Б) То же самое в присутствии 0,9% NaCl. В) Анализ проницаемости внешней мембраны, индуцированной в результате инкубации с ChMAP-28 в присутствии 0,9% NaCl. Г) Сравнительный анализ проницаемости цитоплазматической мембраны после инкубации с индивидуальным ChMAP-28 или с комбинациями ChMAP-28 и mini-ChBac7.5Nα.

**Таблица 5.** Синергизм между парой кателицидинов ChMAP-28 и mini-ChBac7.5Na.

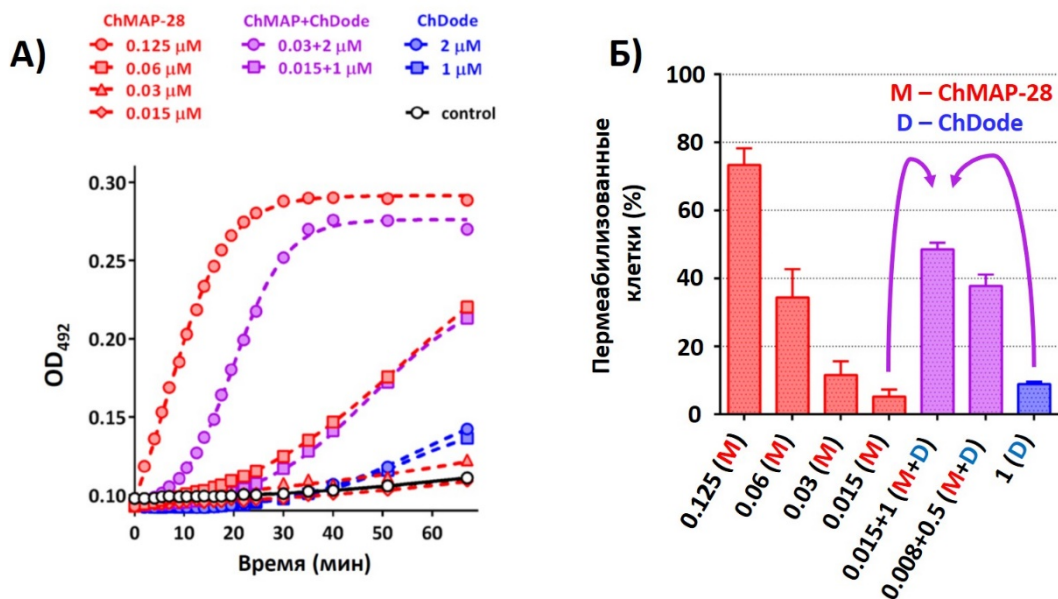
Штамм	ChMAP-28			mini-ChBac7.5Na			ФИК	Синергизм
	МИК <sub>А</sub>	[А]	ФИК <sub>А</sub>	МИК <sub>Б</sub>	[Б]	ФИК <sub>Б</sub>		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,06	0,015	0,25	8	1	0,125	0,375	Да
<i>E. coli</i> ML35p	0,06	0,008	0,125	4	1	0,25	0,375	Да
<i>E. coli</i> C600	0,125	0,015-0,03	0,125-0,25	4	1	0,25	0,375-0,5	Да
<i>E. coli</i> 1057	0,125	0,008	0,063	8	2	0,25	0,313	Да
<i>E. coli</i> (CI 214)	0,06	0,015	0,25	>64	4	0,031	0,281	Да
<i>E. cloacae</i> (XDR CI 4172)	0,25	0,03	0,125	4	0,5	0,125	0,25	Да
<i>K. pneumoniae</i> (CI 287)	0,5	0,06	0,125	16	2	0,125	0,25	Да
<i>A. baumannii</i> (XDR CI 2675)	0,25	0,03	0,125	>32	0,5	0,008	0,133	Да
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,125	0,06	0,5	>32	8	0,125	0,625	Нет
<i>S. aureus</i> 209P	0,5	0,03	0,063	16	2	0,125	0,188	Да

Исследование синергизма между кателицидинами позволило пролить свет на возможную биологическую функцию  $\beta$ -структурных додекапептидов. Нами было показано наличие ярко выраженного синергического эффекта при совместном применении кателицидинов ChDode и ChMAP-28 в среде, содержащей NaCl в физиологической концентрации (Таблица 6). При этом данный эффект наблюдался при смешивании обоих пептидов в различных молярных соотношениях (Рисунок 17). Было показано, что при добавлении ChDode в субингибирующих

концентрациях,  $\alpha$ -спиральный мембрано-активный ChMAP-28 демонстрирует 8-16-кратное увеличение антимикробного действия. Значение фракционной ингибирующей концентрации для ChMAP-28 в отношении *E. coli* снижается вплоть до наномолярного диапазона концентраций (8–16 нМ). Пара PcDode и ChMAP-28 продемонстрировала схожие, хотя и менее выраженные, синергетические эффекты ( $0,25 < \text{ФИК} < 0,5$ ). Таким образом, несмотря на более низкую активность PcDode, по-видимому, имеет механизм действия, сходный с таковым у ChDode.

**Таблица 6.** Синергизм между парой кателицидинов ChMAP-28 и ChDode.

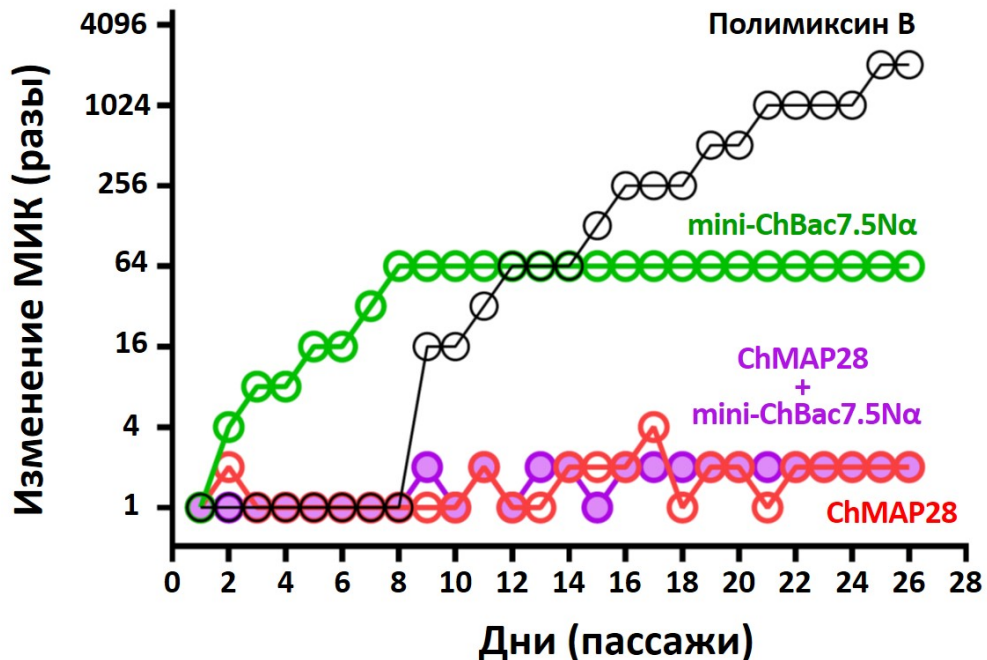
Штамм	ChDode			ChMAP-28			ФИК	Синергизм
	МИК <sub>А</sub>	[А]	ФИК <sub>А</sub>	МИК <sub>Б</sub>	[Б]	ФИК <sub>Б</sub>		
<i>E. coli</i> ML35p	16	0,5	0,031	0,06	0,008	0,125	0,156	Да
<i>S. aureus</i> 209P	>64	8	<0,125	0,5	0,03	0,063	<0,188	Да



**Рисунок 17.** А) Изменение проницаемости внешней мембраны *E. coli* ML-35p, измеренной с использованием хромогенного маркера — продукта гидролиза нитроцефина (OD<sub>492</sub>). Сравнительный анализ проницаемости внешней мембраны клеток *E. coli* ML35p при их инкубации с индивидуальными кателицидинами ChMAP-28 и ChDode в различных концентрациях, а также с их комбинацией. Б) Тестирование проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35p с использованием маркера — продукта гидролиза ONPG (OD<sub>405</sub>). Приведенная диаграмма демонстрирует эффекты пептидов в различных концентрациях через 2 ч инкубации.

Поскольку для обоих кателицидинов — ChMAP-28 и ChDode — был показан мембранотропный механизм действия, нами была исследована способность данных пептидов усиливать активность друг друга в отношении бактериальных мембран. При совместном использовании данная пара кателицидинов демонстрирует усиление способности нарушать целостность как внешней (**Рисунок 17А**), так и цитоплазматической (**Рисунок 17Б**) мембран *E. coli*, значительно превосходящую таковую для индивидуальных пептидов. Примечательно, что ChDode в диапазоне концентраций 1–4 мкМ оказывает сравнимый или больший эффект на увеличение проницаемости внешней мембраны, чем ChMAP-28 в концентрациях до 0,03 мкМ (концентрации, соответствующие его ФИК в комбинации с другими АМП). В то же время, в отличие от ChMAP-28, для ChDode не наблюдались синергические эффекты в комбинации с mini-ChBac7.5N $\alpha$  (рассчитанное значение индекса ФИК 1,0), что свидетельствует о различных механизмах увеличения проницаемости мембраны, демонстрируемых данными кателицидинами. Поскольку экспериментальные данные указывают, что основной механизм действия ChDode связан с формированием трансмембранных пор, можно предположить, что размер этих пор слишком мал для того, чтобы крупные молекулы, такие как богатые пролином АМП, могли проникать сквозь них. Анализ результатов синергического действия ChMAP-28 и ChDode позволяет предположить, что при совместном использовании данные пептиды формируют смешанный мембраноактивный комплекс, подобно тому, как это было показано для некоторых других АМП, например человеческого LL-37 и дефенсина [199], или лягушачьих магаинина-2 и PGLa [218]. Одновременное использование коктейля из трех кателицидинов козы *Capra hircus* в отношении *E. coli* ML35p позволяет снизить фракционную ингибирующую концентрацию самого токсичного компонента смеси — ChMAP-28 до значений ~4 нМ. Значения фракционных ингибирующих концентраций как для ChDode, так и для mini-ChBac7.5N $\alpha$  при этом составляют всего 1 мкМ, что значительно ниже тех концентраций, в которых наблюдаются какие-либо токсические эффекты в отношении нормальных клеток. Дополнительно в рамках исследования индукции резистентности к исследуемым кателицидинам нами было продемонстрировано, что при использовании синергической пары ChMAP-28 и mini-ChBac7.5N $\alpha$  многократное последовательное пассажирование

*E. coli* ML35p не приводит к развитию резистентности (**Рисунок 18**), в то время как в случае индивидуального mini-ChBac7.5N $\alpha$  наблюдается быстрое формирование устойчивости.



**Рисунок 18.** Динамика изменения МИК исследуемых соединений в отношении штамма *E. coli* 1057, в среде Мюллера-Хинтон в присутствии 0,9% NaCl. Указано увеличение МИК относительно исходного значения. Исходные значения МИК, соответствующие 1 на графике: полимиксин В 0,125 мкМ; индивидуальный ChMAP-28 0,125 мкМ; индивидуальный mini-ChBac7.5N $\alpha$  8 мкМ; коктейль ChMAP-28 + mini-ChBac7.5N $\alpha$  (0,03 + 2 мкМ, соответственно).

Таким образом есть основания полагать, что додекапептиды действуют в первую очередь как адьювант, усиливая общий антибактериальный эффект продуцируемого лейкоцитами коктейля АМП. При этом ChDode усиливает эффективность СМАР-28 в отношении бактериальных клеток, который в свою очередь усиливает и поддерживает активность mini-ChBac7.5N $\alpha$ .

### 3.5. Структурно-функциональное исследование протегрина

Считается, что протегрины — единственная группа кателицидинов, зрелая форма которых формирует  $\beta$ -шпильчатый АМП, в то время как додекапептиды формируют короткие петли. В настоящей работе мы показали, что додекапептиды также способны к формированию  $\beta$ -структур. Дополнительно был обнаружен и

охарактеризован уникальный  $\beta$ -шпилечный додекапептид PcDode. Тем не менее, в отличие от протегринов, додекапептиды не обладают высокой антимикробной активностью при индивидуальном использовании. Поэтому в рамках работы по созданию нового антимикробного агента на основе АМП был осуществлен рациональный дизайн вариантов протегрина свиньи *Sus scrofa* (PG-1) [72] с целью снижения его цитотоксических свойств. Механизм прямого антимикробного действия протегринов основан на образовании димеров из мономерных шпилек в липидном бислое, дальнейшую самоассоциацию димеров в октамерные  $\beta$ -бочонки или тетрамерные дуги и, наконец, образование пор, приводящее к неконтролируемому трансмембранному транспорту ионов и низкомолекулярных метаболитов [72]. В высокой концентрации протегрин приводит к разрушению мембраны по детергент-подобному механизму.

В рамках настоящей работы был проведен поиск генов протегринов среди представителей отряда китопарнокопытных на основе депонированных в Genbank геномных проектов 120 видов. Нами было установлено, что структурные гомологи протегрина встречаются исключительно у представителей семейства Suidae. Из литературных данных известно о пяти изоформах протегрина, которые были обнаружены в лейкоцитах свиньи *Sus scrofa* [219]. Анализ данных 28 геномных проектов, включая различные породы *Sus scrofa*, а также бородавочника *Phacochoerus africanus*, позволили идентифицировать шестую изоформу протегрина. В ходе анализа еще 13 представителей семейства Suidae, для которых отсутствует сборка геномов, но было проведено полногеномное секвенирование, а также данных секвенированных транскриптомов для 4 видов, с использованием алгоритмов BLAST, нами были обнаружены еще 6 дополнительных гомологов протегринов (**Рисунок 19А**). Анализ природной вариабельности семейства протегринов, состоящего из 12 гомологов (**Рисунок 19Б**), показывает, что природный PG-1 имеет высокую степень сходства с консенсусной последовательностью и таким образом хорошо представляет общие свойства данного семейства. Поскольку анализ природной вариабельности не выявил гомологов со значительными отличиями аминокислотной последовательности, было принято решение провести рациональный дизайн модифицированных вариантов протегрина-1.

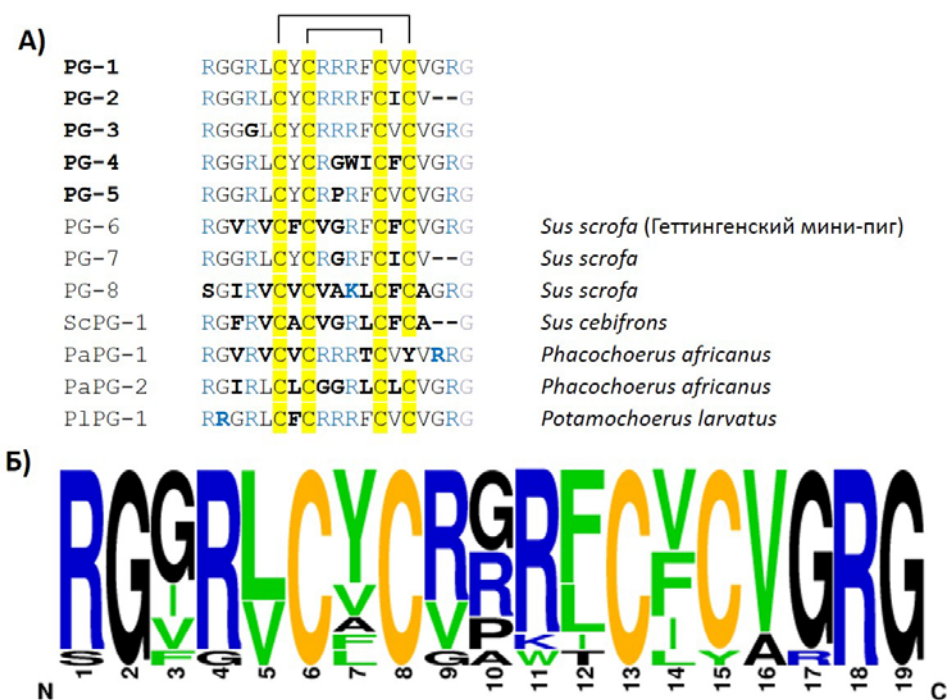
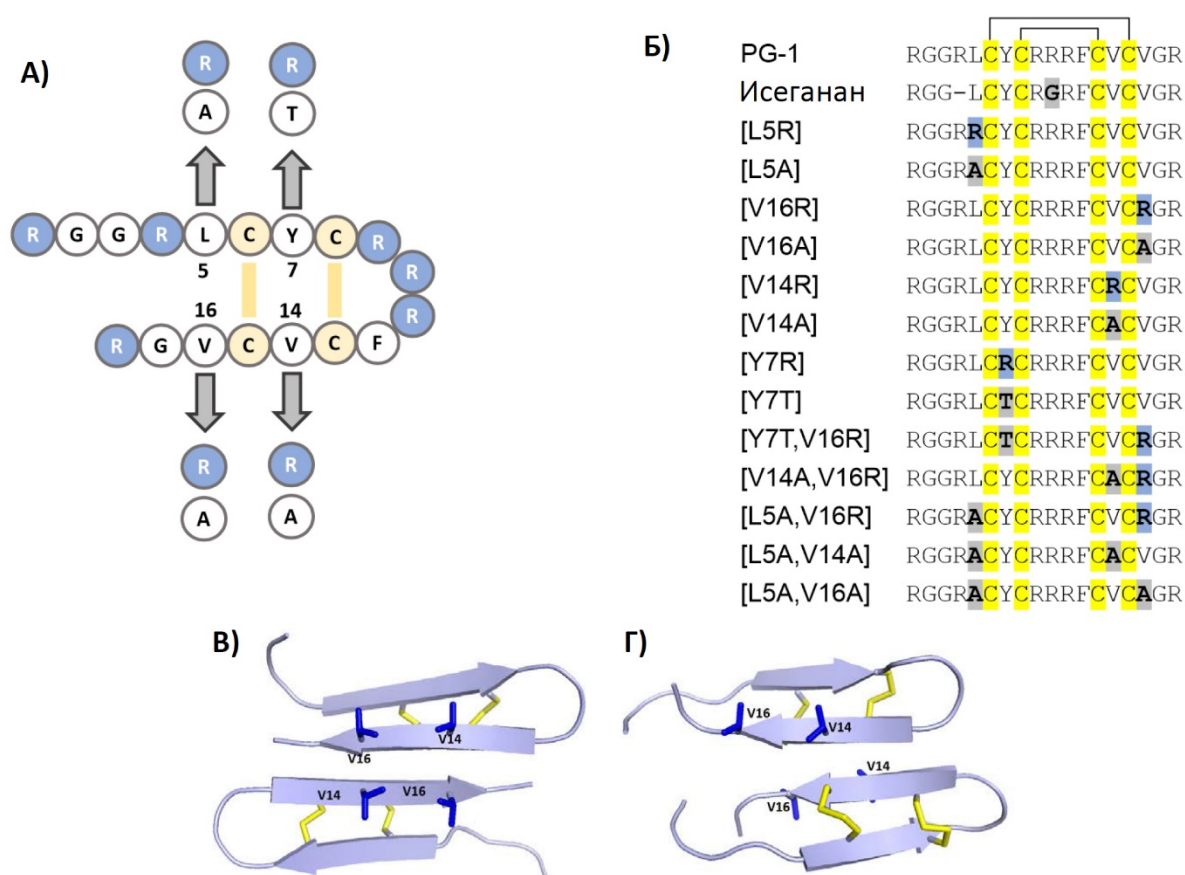


Рисунок 19. А) Выравнивание аминокислотных последовательностей известных протегринов PG-1-5 из свиньи *Sus scrofa* с обнаруженными природными гомологами.

Жирным шрифтом отмечены аминокислотные замены в структуре новых последовательностей по сравнению с протегрином-1. Квадратными скобками отмечен характер замыкания дисульфидных мостиков. Б) Логотип аминокислотных последовательностей панели природных гомологов протегрина-1.

Ранее мы провели структурно-функциональные исследования для улучшения терапевтических свойств ряда  $\beta$ -шпилечных АМП, таких как ареницин-1 [142]. Нами было показано, что образование олигомерных структур предопределяет активность ареницина в отношении эукариотических клеток и способствует проявлению его цитотоксичности. В настоящей работе была использована стратегия рационального дизайна, основанная на нашем опыте предыдущих исследований  $\beta$ -шпилечных АМП. Основной целью является стремление снизить общую гидрофобность, способность к олигомеризации и тенденцию к агрегации вне специфического липидного окружения, сохраняя при этом структуру  $\beta$ -шпильки. Поскольку ранее было показано, что дисульфидные связи оказывают ключевое влияние на проявление протегрином прямой антимикробной активности [220], мы сохранили соответствующие остатки цистеина, хотя при окислении они вносят существенный вклад в общий уровень гидрофобности протегрина. Было принято решение сосредоточиться на центральной области пептида, аминокислотные остатки в

которой участвуют в агрегации пептида. В рамках работы нами был получен ряд модифицированных вариантов природного протегрина-1 (PG-1) с заменами гидрофобных остатков на аргинин, а именно: [V14R], [V16R], [Y7R] и [L5R]. Мы предположили, что введение дополнительного положительного заряда в определенные положения  $\beta$ -складчатой области окажет негативное влияние на способность пептида к димеризации и образованию олигомерных структур, тем самым снизив его склонность к агрегации, а кроме этого — усилит взаимодействие с отрицательно заряженными бактериальными липидами за счет образования гуанидинфосфатных комплексов [221–223], тем самым модифицируя спектр биологической активности полученных модифицированных аналогов протегрина. Схема эксперимента и общий список полученных вариантов представлены на **Рисунке 20А,Б**.



**Рисунок 20.** Аминокислотные замены в структуре протегрина PG-1 (А) и список полученных модифицированных аналогов (Б). Пространственные структуры антипараллельных (В) и параллельных (Г) димеров протегрина, полученные на основе данных ЯМР-спектроскопии в различных средах.

Для более мягкого снижения гидрофобности был получен ряд вариантов, содержащих замены лейцина и валина на менее гидрофобный аланин, а именно: [L5A], [V14A] и [V16A]. Кроме того, был разработан вариант с заменой [Y7T] для снижения гидрофобности боковой цепи с сохранением гидроксильной группы в ее структуре. После тестирования антимикробной активности модифицированных аналогов с единственной аминокислотной заменой был также получен набор пептидов с двумя замещенными аминокислотными остатками (**Рисунок 20Б**). В качестве пептида сравнения нами был использован Исеганан, также известный как IB-367, — укороченный аналог протегрина, который прошел III фазу клинических испытаний в качестве антибиотика наружного применения. Для всех полученных модифицированных аналогов конечный выход чистого пептида составил от 4,0 до 7,2 мг на 1 л бактериальной культуры. Терапевтический потенциал полученных вариантов протегрина-1 оценивали по селективности их действия в отношении бактериальных клеток по сравнению с клетками человека — эритроцитами и кератиноцитами HaCaT. Антимикробную активность пептидов определяли в отношении панели грамотрицательных и грамположительных бактерий методом двукратных серийных разведений (**Таблица 7**). Ни один из полученных модифицированных аналогов протегрина-1 не продемонстрировал значительного увеличения активности в отношении панели тестовых штаммов, хотя в отдельных случаях наблюдалось снижение МИК в 2 раза. Три варианта с заменами на аланин ([L5A], [V14A], [V16A]) продемонстрировали уровень активности, близкий к природному протегрину-1. Большая часть полученных вариантов с единственной аминокислотной заменой показали сравнимый с природным вариантом уровень активности в отношении штаммов *E. coli*, за исключением мутанта [V14R]. Из вариантов с двойными аминокислотными заменами высокий уровень активности в отношении большинства штаммов сохранился только у пептидов [L5A,V14A] и [L5A,V16A]. Важно отметить высокую наблюдаемую разницу в активности вариантов с аминокислотными заменами V14R и V16R. Стоит отметить, что данные аминокислотные остатки могут оказывать различный вклад в процессы олигомеризации протегрина-1, в зависимости от того, как именно происходит агрегация — с образованием параллельных или антипараллельных димеров (**Рисунок 20 В,Г**).

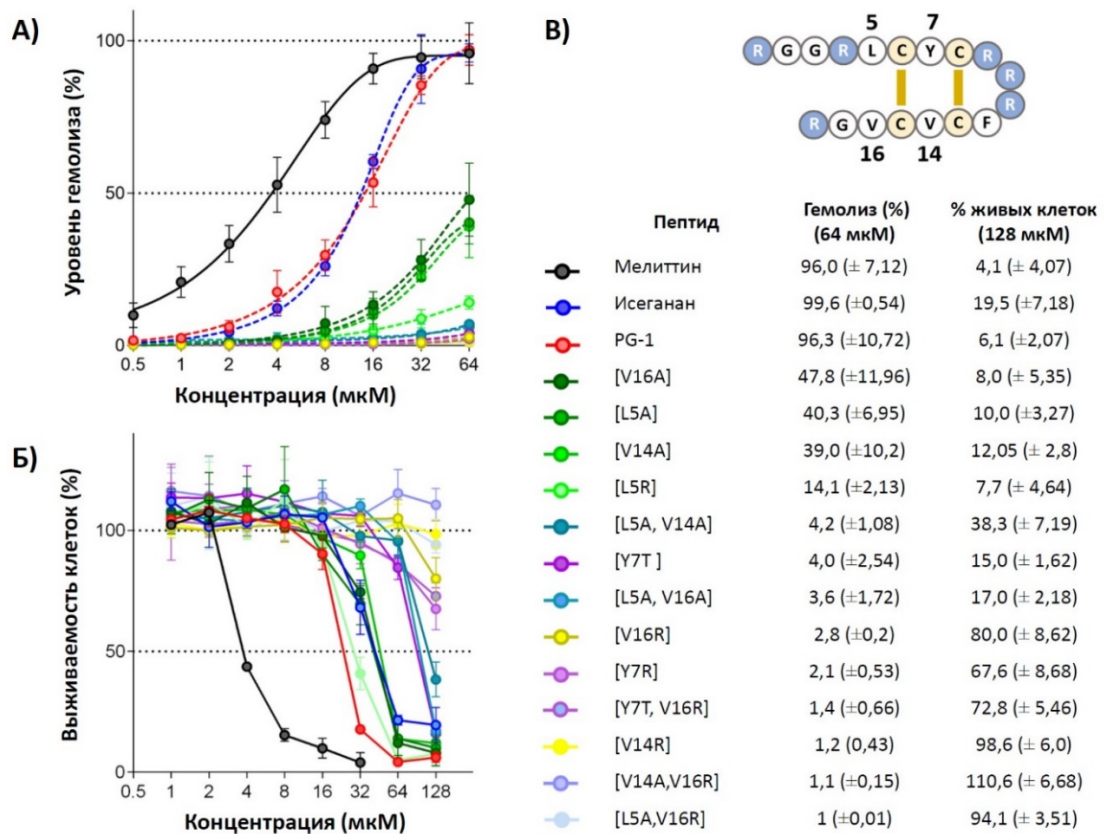
Таблица 7. Антимикробная активность протегрина и его вариантов.

Пептид	МИК*, мкМ									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ML35p	<i>E. coli</i> BW 25113	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>S. aureus</i> 209P	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>M. luteus</i> B-1314
PG-1	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,25	1	0,5	1	0,25
Исеганан	0,5	0,5	0,5	8	4	0,5	4	2	4	0,5
[L5R]	1	0,5	0,25	1	1	0,5	8	4	4	1
[L5A]	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,25	1	1	1	0,5
[V16R]	0,5	0,25	0,25	1	0,5	0,125	4	4	4	1
[V16A]	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	0,125	1	1	1	0,5
[V14R]	4	4	2	32	>32	2	32	32	32	2
[V14A]	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	1	1	1	0,5
[Y7R]	0,5	0,5	0,5	8	4	0,5	8	16	16	2
[Y7T]	1	0,5	0,5	2	2	0,5	8	16	16	4
[Y7T,V16R]	8	4	8	>32	>32	4	>32	>32	>32	4
[V14A,V16R]	2	1	2	8	4	0,5	32	32	32	4
[L5A,V16R]	2	1	2	8	4	0,5	32	32	32	4
[L5A,V14A]	0,5	0,5	0,5	1	1	0,25	8	4	>32	4
[L5A,V16A]	0,5	0,5	0,5	1	1	0,25	8	4	>32	4

\* медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах

Для того, чтобы оценить влияние введенных аминокислотных замен на взаимодействие полученных пептидов с эукариотическими мембранами, было проведено тестирование гемолитической активности в отношении человеческих эритроцитов (Рисунок 21А). Все модифицированные варианты, в особенности содержащие замены аминокислотных остатков на аргинин, продемонстрировали сниженную способность к разрушению эритроцитов по сравнению с PG-1 и Исегананом. Данные о гемолитической активности модифицированных аналогов

были сопоставлены с данными измерения жизнеспособности клеток HaCaT после 24 ч инкубации с пептидами с помощью МТТ-теста (**Рисунки 21Б,В**). Нами была подтверждена выраженная корреляция между снижением уровня гемолитической активности полученных вариантов протеина и повышением выживаемости тестовой культуры. Из общего тренда выбиваются только Исеганан, активность которого в отношении HaCaT оказалась ниже, чем у PG-1 при одинаковом уровне их гемолитической активности и варианты [L5A,V16A] и [Y7T], которые продемонстрировали более высокий уровень токсичности, чем можно было ожидать на основании их гемолитических свойств. Так же стоит отметить, что в обоих исследованиях вариант [V14R] продемонстрировал значительно меньший уровень активности по сравнению с [V16R].



**Рисунок 21.** А) Гемолитическая активность пептидов после 1,5 ч инкубации. Анализ разрушения эритроцитов и высвобождения гемоглобина. Б) Цитотоксичность в отношении линии клеток HaCaT кератиноцитов человека после 18 ч инкубации (МТТ-тест). В) Значения гемолитической активности пептидов и выживаемости клеток HaCaT (МТТ-тест).

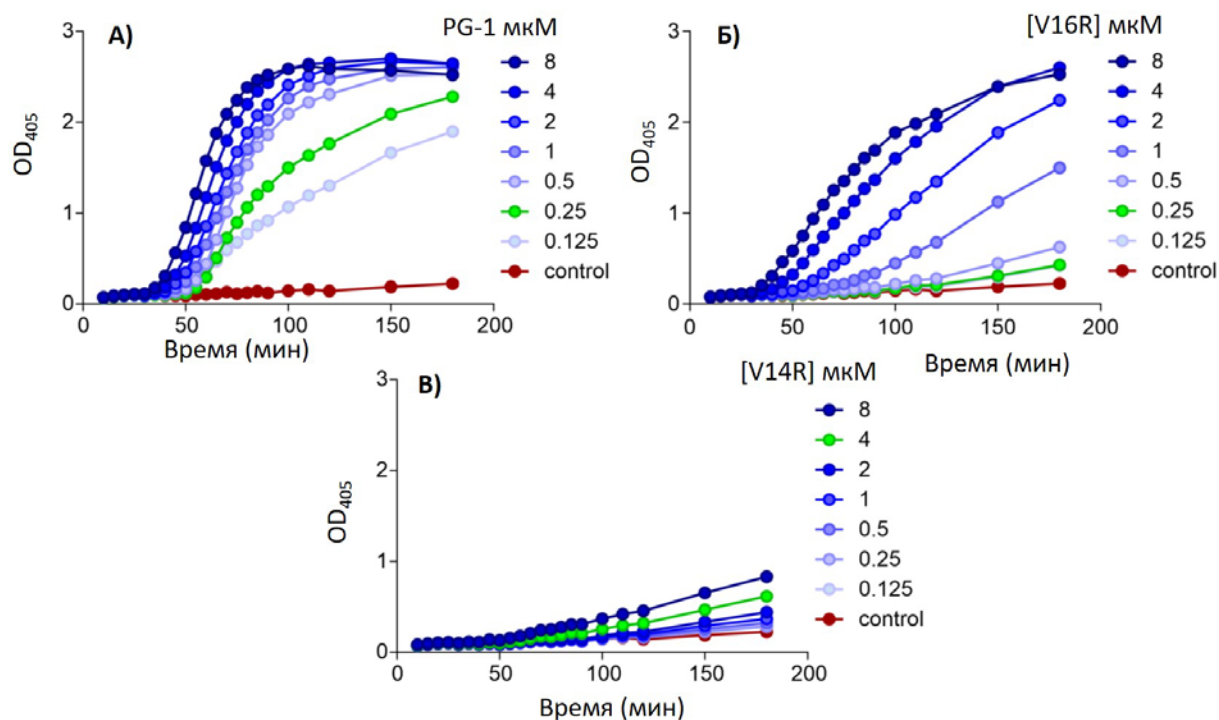
Для оценки возможного терапевтического окна для исследуемых вариантов был проведен расчет терапевтического индекса (ТИ) (Таблица 8). Значение ТИ рассчитывали как соотношение значений минимальной гемолитической концентрации (МГК) и среднего геометрического МИК пептида (МИК(СГ)) в отношении всех исследованных штаммов. При этом МГК определяли как концентрацию пептида, вызывающую 2% гемолиза свежих человеческих эритроцитов. Если в концентрации 64 мкМ уровень гемолиза составлял менее 2%, для расчетов использовали значение 128 мкМ. Аналогично, использовали значение 64 мкМ для расчета значения МИК(СГ) в случае, если в концентрации 32 мкМ МИК не достигался. По результатам расчета вариант [V16R] продемонстрировал самый высокий ТИ: он был значительно менее токсичен в отношении нормальных клеток, чем природный пептид, сохраняя практически тот же уровень антимикробной активности. Низкая цитотоксичность варианта [V16R] коррелирует с данными МТТ-теста: в концентрации до 64 мкМ пептид не вызывает достоверного уменьшения жизнеспособности клеток HaCaT, и снижает ее до 80% только в концентрации 128 мкМ.

**Таблица 8.** Биологическая активность вариантов протегрина и их терапевтические индексы

	МГК	МИК(СГ)	ТИ*
PG-1	0,7	0,4	1,8
Исеганан	1	1,4	0,7
[L5R]	4,1	1,2	3,3
[L5A]	4,1	0,4	9,4
[V16R]	49,2	0,8	60,6
[V16A]	4,3	0,4	10,6
[V14R]	>64	9,8	13,0
[V14A]	5,5	0,4	13,5
[Y7R]	61,4	2,5	24,9
[Y7T]	33,5	4,4	7,6
[Y7T,V16R]	>64	21,1	6,1
[V14A,V16R]	>64	4,9	26,0
[L5A,V16R]	>64	4,9	26,0
[L5A,V14A]	18,8	4,5	4,2
[L5A,V16A]	11,9	4,5	2,7

\* Наибольшие значения ТИ указывают на более высокую селективность пептида.

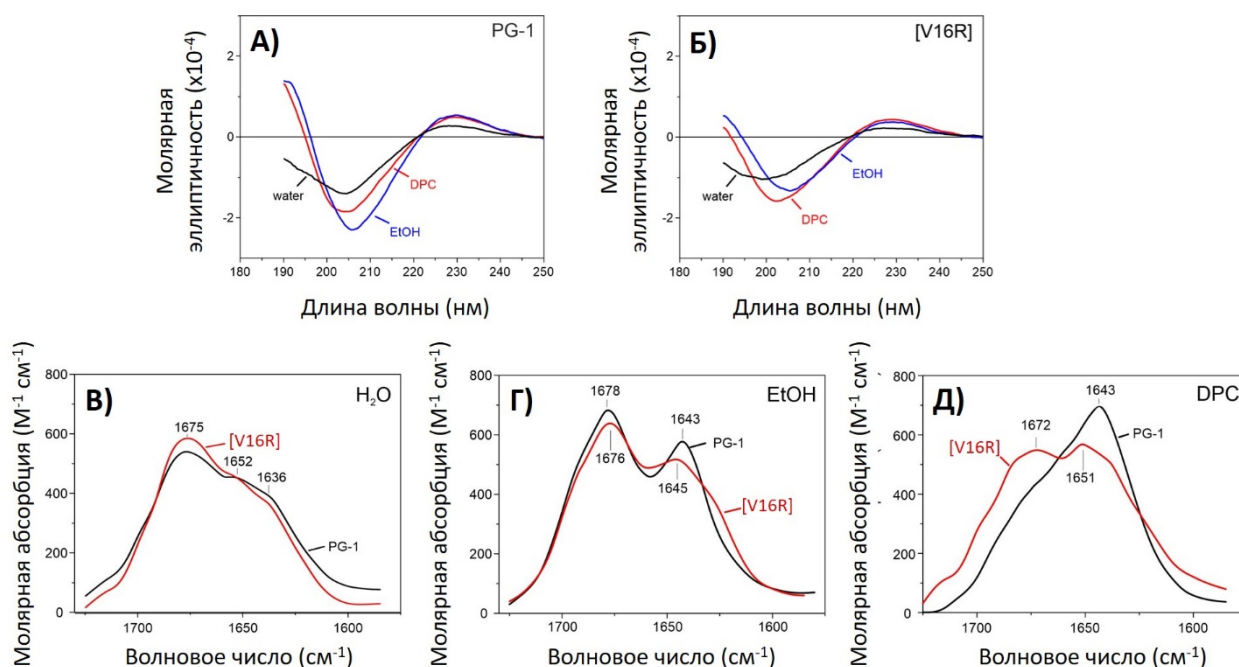
Дальнейшее изучение механизма действия проводили для природного пептида PG-1 и двух его модифицированных вариантов: [V16R], продемонстрировавшего наибольшую селективность действия; и [V14R], активность которого оказалась в значительной степени снижена. В первую очередь, нами была исследована способность пептидов нарушать целостность мембран *E. coli* ML35p с использованием теста на проницаемость для хромогенного субстрата ONPG (**Рисунок 22**). PG-1 продемонстрировал выраженный мембранолитический эффект в диапазоне концентраций, соответствующих его значениям МИК (**Рисунок 22А**), что хорошо согласуется с литературными данными об основном механизме действия данного пептида [150,156,219,224–226]. Для наиболее селективного варианта [V16R] наблюдаемый эффект отличался от такового у PG-1. Хотя значение МИК PG-1 и [V16R] в отношении *E. coli* ML35p были равными для обоих пептидов (0,25 мкМ), вариант [V16R] в соответствующей концентрации оказывал незначительное влияние на проникновение ONPG внутрь клетки (**Рисунок 22Б**). Это может указывать на определенные изменения механизма действия модифицированного пептида. Мы предполагаем, что указанная аминокислотная замена снижает способность пептида к олигомеризации, что приводит к изменению характера его взаимодействий с липидным бислоем. Схожие, но более выраженные эффекты наблюдались для варианта [V14R] — пептид продемонстрировал крайне медленную кинетику разрушения мембраны (**Рисунок 22В**), подобную наблюдаемой ранее для  $\beta$ -шпилечного АМП капителицина [227]. По-видимому, из-за более центрального положения остатка V14 введение положительного заряда приводит к сильному электростатическому отталкиванию и предотвращает образование димеров (**Рисунки 20В,Г**), что значительно снижает активность данного варианта в отношении биологических мембран любого состава.



**Рисунок 22.** Влияние PG-1 и его модифицированных вариантов в различных концентрациях на проницаемость мембран *E. coli* ML35r (анализ проникновения ONPG). Концентрация, соответствующая значению МИК для каждого из пептидов в отношении *E. coli* ML35r выделена зеленым цветом.

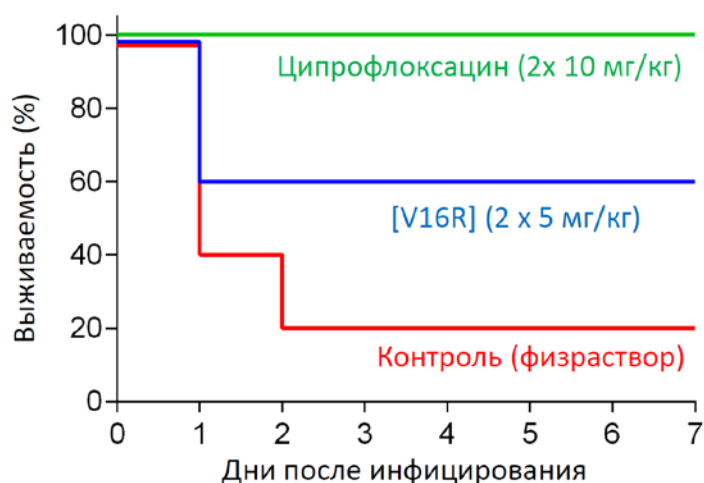
Способность PG-1 и [V16R] к олигомеризации в различных средах оценивали с помощью спектроскопии КД и Фурье ИК. Спектры КД обоих пептидов в воде, этаноле и мицеллах ДФХ не имели существенных различий (**Рисунок 23А,Б**). Небольшой красный сдвиг минимума спектров в этаноле и мицеллах ДФХ относительно водных спектров (с 200-204 до 208 нм, эффект более выражен для варианта [V16R]), а также увеличение молярной эллиптичности при ~190 нм свидетельствуют о формировании более упорядоченных структур в неполярном окружении. Таким образом, оба пептида демонстрируют спектры, типичные для  $\beta$ -структурных АМП [204,228,229]. Согласно данным Фурье ИК спектроскопии, оба пептида имеют достаточно схожую структуру в воде и этаноле. Причем в спектрах в этаноле наблюдается две основные полосы поглощения при ~1677 и ~1644  $\text{см}^{-1}$ , типичные для  $\beta$ -структурных АМП [230]. Сильная полоса ~1677  $\text{см}^{-1}$ , доминирующая в водных спектрах для обоих вариантов, соответствует слабосольватированным амидным карбонильным группам, не участвующим во внутримолекулярных водородных связях [231,232], в то время как полоса ~1644  $\text{см}^{-1}$

соответствует поглощению для групп C=O, формирующих водородные связи. Усиление этой полосы в спектре обычно связывают с формированием параллельных или антипараллельных  $\beta$ -тяжей [230,233]. Сравнение спектров дает основания предполагать преимущественно мономерную форму в воде и формирование димеров в этаноле для обоих пептидов (**Рисунок 23В,Г**). Сильное отличие в спектрах наблюдается только в присутствии мицелл ДФХ, имитирующих мембранное окружение (**Рисунок 23Д**). Здесь спектральные данные для PG-1 позволяют предположить образование октамерной структуры с компактной упаковкой тяжей, подобно тому, как это было ранее показано для PG-5 [150], о чем свидетельствует значительное преобладание в спектре компонента  $1643\text{ см}^{-1}$  и отсутствие полосы  $1677\text{ см}^{-1}$ , указывающее на низкую долю карбонильных групп, не участвующих в водородных связях [233]. Напротив, форма Фурье ИК спектра варианта [V16R] в мицеллах ДФХ остается подобной таковой в этаноле и больше соответствует димерной структуре. Это подтверждает предыдущее предположение о том, что введение дополнительного заряженного остатка аргинина в область одной из  $\beta$ -цепей PG-1 препятствует плотной упаковке  $\beta$ -тяжей и ослабляет их дальнейшую олигомеризацию.



**Рисунок 23.** Спектроскопический анализ PG-1 и его варианта [V16R]. КД спектры PG-1 (А) и [V16R] (Б) в различных средах — в воде (черный), этаноле (синий) и ДФХ (красный). Фурье ИК-спектры PG-1 (черный) и [V16R] (красный) в воде (В), этаноле (Г) и ДФХ (Д).

Пептид [V16R], показавший самый высокий терапевтический индекс среди протестированных вариантов PG-1, был выбран в качестве кандидатного соединения для исследования на мышинной модели бактериальной инфекции. Для экспериментов на животных рекомбинантный пептид был получен в системе экспрессии ClearColi® BL21(DE3), у которых нарушен синтез пирогенных эндотоксинов. Дополнительно, для снижения неспецифической токсичности препарата, противоионы трифторацетата (ТФУ) были заменены хлорид-ионами [234]. С целью исследования эффективности пептида была использована модель мышинной септицемии. В исследовании были использованы группы по пять животных (**Рисунок 24**). В качестве положительного контроля был использован антибиотик ципрофлоксацин (10 мг/кг). Исследуемый пептид и контрольный антибиотик вводились двукратно в течение первого дня заражения. Для пептида была выбрана дозировка 5 мг/кг, поскольку отсутствуют данные о его *in vivo* токсичности. Внутривентриальное инфицирование мышей BALB/c суспензией *E. coli* ATCC 25922 в присутствии муцина привело к гибели в течение двух дней четырех из пяти мышей, получавших контрольный раствор, и выживанию всех мышей, получавших ципрофлоксацин.



**Рисунок 24.** Исследование эффективности *in vivo* выбранного варианта протегрина-1 [V16R] в модели мышинной септицемии: показатели выживаемости мышей BALB/c (n = 5), внутривентриально инфицированных *E. coli* ATCC 25922 ( $10^6$  бактерий в присутствии 2,5% муцина).

В модели мышинной септицемии была продемонстрирована терапевтическая эффективность, составляющая 60% (смерть двух из пяти мышей) после 7-дневного

эксперимента, при двукратном введении варианта [V16R] в дозе 5 мг/кг. Для всех выживших животных после эвтаназии и контроля обсемененности селезенки колониеобразующие единицы *E. coli* обнаружены не были. Эти данные *in vivo* активности дают основание полагать, что модифицированные варианты  $\beta$ -спилечных АМП являются перспективными кандидатами для создания антимикробных препаратов в отношении грамотрицательных бактерий. Таким образом, пептид [V16R] является наиболее селективным вариантом с ТИ 60,2 (более чем в 30 раз выше, чем у природного PG-1), проявляет умеренную эффективность *in vivo* в качестве системного антибиотика и может рассматриваться как кандидатное соединение для дальнейшего проектирования лекарственного препарата.

#### 4. Заключение

В условиях стремительного распространения антибиотикорезистентности, природные антимикробные пептиды рассматриваются как перспективные кандидатные соединения для разработки антибиотиков нового поколения. Полученные в рамках работы результаты демонстрируют, что семейство кателицидинов является богатым источником новых соединений для борьбы с резистентными инфекциями. Консервативная структура белка-предшественника кателицидинов облегчает поиск новых аналогов данных АМП в геномных и транскриптомных базах данных. При этом зрелые кателицидины демонстрируют большое разнообразие структурных форм, что позволяет использовать данный подход для изучения природной вариабельности пептидов различных классов.

У животных кателицидины экспрессируются во многих тканях и органах, причем часто наблюдается одновременная экспрессия нескольких структурно различных пептидов, что открывает возможность их применения в качестве коктейля антимикробных соединений. В рамках работы были изучены три кателицидина, коэкспрессирующиеся лейкоцитами коз. Была изучена как индивидуальная антимикробная активность этих соединений, так и синергические эффекты, наблюдаемые при их совместном применении. Один из основных компонентов коктейля – Vac7-подобный минибактенецин mini-ChVac7.5N $\alpha$  проявляет свою активность за счет связывания с бактериальной рибосомой, приводящего к ингибированию биосинтеза белка. Процесс проникновения минибактенецина через бактериальную мембрану в присутствии солей в физиологической концентрации тесно связан с бактериальным SbmA транспортером. Мутации в данном белке являются причиной развития резистентности бактерий по отношению Vac7-подобным пептидам. В результате проведенных в рамках работы исследований аналогов Vac7-подобных пептидов было показано, что снизить зависимость от ионной силы среды, а также наличия у клетки-мишени транспортера SbmA можно при помощи модификации C-концевого участка пептидов или за счет из совместного применения с мембраноактивным пептидом ChMAP-28. Совместное применение этих пептидов также препятствует возникновению бактериальной резистентности.

Было показано, что пептид ChMAP-28 проявляет высокую активность в отношении широкой панели бактериальных штаммов, но, вместе с тем, отличается высоким уровнем токсичности в отношении нормальных эукариотических клеток. Совместное применения ChMAP-28 и других коэкспрессируемых лейкоцитами коз АМП позволяет снизить его минимальную эффективную концентрацию, тем самым маскируя токсические эффекты. В рамках работы было показано, что пептид ChMAP-28 восстанавливает активность минибактенецина в присутствии солей, а также увеличивает способность к пермеабиллизации бактериальных мембран при одновременном применении с додекапептидом ChDode.

В ходе изучения додекапептидов китопарнокопытных было показано, что они формируют  $\beta$ -структуру в виде антипараллельного гомодимера, стабилизированного двумя межмолекулярными дисульфидными связями. Также у кашалота был обнаружен его уникальный ортолог, формирующий  $\beta$ -шпилечный пептид. Мы показали, что основная биологическая функция додекапептидов может заключаться в усилении действия АМП, экспрессирующихся совместно с ними.

В ходе изучения структурно-функциональной активности протегринов свиней был разработан мутантный вариант АМП, имеющий значительно более высокую селективность в отношении бактериальных клеток за счет снижения его цитотоксических эффектов. Было показано, что данный аналог имеет менее выраженную склонность к олигомеризации и более медленную кинетику мембранотропного действия. Исследование эффективности полученного аналога протегрина на мышинной модели бактериальной инфекции показало, что он оказывает лечебный эффект и способствует увеличению выживаемости животных. Таким образом, полученный вариант протегрина может рассматриваться как перспективный кандидат для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

## 5. Выводы

1. Разработаны биотехнологические способы получения ряда кателицидинов китопарнокопытных. Получены  $\alpha$ -спиральный ChMAP-28, пролин-богатый mini-ChBac7.5N $\alpha$  и  $\beta$ -структурный гомодимер ChDode из лейкоцитов козы *Capra hircus*, а также  $\beta$ -шпилечные PcDode кашалота *Physeter catodon* и протегрин свиньи *Sus scrofa*. С целью изучения взаимосвязи структуры и биологических свойств АМП получены модифицированные варианты пептидов mini-ChBac7.5N $\alpha$  и протегрина, а также тотально  $^{15}\text{N}$ -меченые аналоги ChDode и PcDode.
2. Установлено, что бактериальный транспортер SbmA играет ключевую роль в процессе проникновения пролин-богатых АМП в грамотрицательные бактерии. Доказана определяющая роль С-концевого участка Bac7-подобных АМП, таких как VicBac альпаки *Vicugna pacos* и минибактенецин mini-ChBac7.5N $\alpha$  козы *Capra hircus*, в их способности к проникновению через бактериальную мембрану.
3. Показано, что  $\beta$ -структурные кателицидины широко представлены среди представителей отряда китопарнокопытных. Установлено, что пептид ChDode представляет собой  $\beta$ -структурный антипараллельный димер. Обнаружен и охарактеризован уникальный  $\beta$ -шпилечный додекапептид кашалота PcDode.
4. Изучено совместное действие пептидов, коэкспрессирующихся в лейкоцитах кателицидинов козы *Capra hircus*. Показано наличие выраженных синергических эффектов при совместном действии кателицидинов ChMAP-28 и mini-ChBac7.5N $\alpha$ , а также ChMAP-28 и ChDode. Установлено, что совместное применение первой пары АМП препятствует формированию бактериальной резистентности в отношении mini-ChBac7.5N $\alpha$ .
5. Изучено природное многообразие протегринов китопарнокопытных. Показано, что протегрины встречаются исключительно среди представителей подотряда свинообразных (лат. Suina). Проведено структурно-функциональное исследование протегрина свиньи *Sus scrofa* и получен ряд модифицированных вариантов протегрина с повышенной селективностью в отношении бактериальных клеток. Для лучшего из них значение терапевтического индекса более чем в 30 раз превосходит значение такового у природного протегрина. Антимикробная активность разработанного аналога протегрина подтверждена *in vivo* на модели мышинной септицемии.

## 6. Список литературы

1. Lewis, K. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* **2020**, *181*, 29–45, doi:10.1016/j.cell.2020.02.056.
2. Yigit, H.; Queenan, A.M.; Anderson, G.J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.W.; Steward, C.D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 1151–1161, doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
3. Tóth, Á.; Damjanova, I.; Puskás, E.; Jánvári, L.; Farkas, M.; Dobák, A.; Böröcz, K.; Pászti, J. Emergence of a Colistin-Resistant KPC-2-Producing *Klebsiella Pneumoniae* ST258 Clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2010**, *29*, 765–769, doi:10.1007/s10096-010-0921-3.
4. Westblade, L.F.; Simon, M.S.; Satlin, M.J. Bacterial Coinfections in Coronavirus Disease 2019. *Trends in Microbiology* **2021**, *29*, 930–941, doi:10.1016/j.tim.2021.03.018.
5. Chen, N.; Zhou, M.; Dong, X.; Qu, J.; Gong, F.; Han, Y.; Qiu, Y.; Wang, J.; Liu, Y.; Wei, Y.; et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study. *The Lancet* **2020**, *395*, 507–513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
6. Lazzaro, B.P.; Zasloff, M.; Rolff, J. Antimicrobial Peptides: Application Informed by Evolution. *Science* **2020**, *368*, eaau5480, doi:10.1126/science.aau5480.
7. Safronova, V.N.; Bolosov, I.A.; Pantelev, P.V.; Balandin, S.V.; Ovchinnikova, T.V. Therapeutic Potential and Application Prospects of Antimicrobial Peptides in the Era of Global Spread of Antibiotic Resistance. *RUBI* **2023**, *49*, 243–258, doi:10.31857/S0132342323030181.
8. Perlman, D.; Bodanszey, M. Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 449–464, doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.002313.
9. Kiss, G.; Michl, H. Über Das Giftsekret Der Gelbbauchunke, *Bombina Variegata* L. *Toxicon* **1962**, *1*, 33–34, doi:10.1016/0041-0101(62)90006-5.
10. Csordás, A.; Michl, H. Primary Structure of Two Oligopeptides of the Toxin of *Bombina Variegata* L. *Toxicon* **1969**, *7*, 103–108, doi:10.1016/0041-0101(69)90072-5.
11. Hultmark, D.; Steiner, H.; Rasmuson, T.; Boman, H.G. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora Cecropia*. *European Journal of Biochemistry* **1980**, *106*, 7–16, doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x.
12. Patterson-Delafield, J.; Szklarek, D.; Martinez, R.J.; Lehrer, R.I. Microbicidal Cationic Proteins of Rabbit Alveolar Macrophages: Amino Acid Composition and Functional Attributes. *Infect Immun* **1981**, *31*, 723–731, doi:10.1128/iai.31.2.723-731.1981.
13. Ganz, T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 710–720, doi:10.1038/nri1180.
14. Larrick, J.W.; Hirata, M.; Zhong, J.; Wright, S.C. Anti-Microbial Activity of Human CAP18 Peptides. *Immunotechnology* **1995**, *1*, 65–72, doi:10.1016/1380-2933(95)00006-2.
15. Gong, D.; Wilson, P.W.; Bain, M.M.; McDade, K.; Kalina, J.; Hervé-Grépinet, V.; Nys, Y.; Dunn, I.C. Gallin; an Antimicrobial Peptide Member of a New Avian

- Defensin Family, the Ovodefensins, Has Been Subject to Recent Gene Duplication. *BMC Immunol* **2010**, *11*, 12, doi:10.1186/1471-2172-11-12.
16. Fehlbauer, P.; Bulet, P.; Michaut, L.; Lagueux, M.; Broekaert, W.F.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A. Insect Immunity. Septic Injury of *Drosophila* Induces the Synthesis of a Potent Antifungal Peptide with Sequence Homology to Plant Antifungal Peptides. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 33159–33163.
  17. Mygind, P.H.; Fischer, R.L.; Schnorr, K.M.; Hansen, M.T.; Sönksen, C.P.; Ludvigsen, S.; Raventós, D.; Buskov, S.; Christensen, B.; De Maria, L.; et al. Plectasin Is a Peptide Antibiotic with Therapeutic Potential from a Saprophytic Fungus. *Nature* **2005**, *437*, 975–980, doi:10.1038/nature04051.
  18. Florack, D.E.; Stiekema, W.J. Thionins: Properties, Possible Biological Roles and Mechanisms of Action. *Plant Mol Biol* **1994**, *26*, 25–37, doi:10.1007/BF00039517.
  19. Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R.E. Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia Coli*. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7235–7242, doi:10.1021/bi9826299.
  20. Mardirossian, M.; Grzela, R.; Giglione, C.; Meinel, T.; Gennaro, R.; Mergaert, P.; Scocchi, M. The Host Antimicrobial Peptide Bac71-35 Binds to Bacterial Ribosomal Proteins and Inhibits Protein Synthesis. *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 1639–1647, doi:10.1016/j.chembiol.2014.10.009.
  21. Ganz, T.; Selsted, M.E.; Szklarek, D.; Harwig, S.S.; Daher, K.; Bainton, D.F.; Lehrer, R.I. Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J Clin Invest* **1985**, *76*, 1427–1435, doi:10.1172/JCI112120.
  22. Shafee, T.M.A.; Lay, F.T.; Phan, T.K.; Anderson, M.A.; Hulett, M.D. Convergent Evolution of Defensin Sequence, Structure and Function. *Cell Mol Life Sci* **2017**, *74*, 663–682, doi:10.1007/s00018-016-2344-5.
  23. Schneider, J.J.; Unholzer, A.; Schaller, M.; Schäfer-Korting, M.; Korting, H.C. Human Defensins. *J Mol Med* **2005**, *83*, 587–595, doi:10.1007/s00109-005-0657-1.
  24. Ghosh, D.; Porter, E.; Shen, B.; Lee, S.K.; Wilk, D.; Drazba, J.; Yadav, S.P.; Crabb, J.W.; Ganz, T.; Bevins, C.L. Paneth Cell Trypsin Is the Processing Enzyme for Human Defensin-5. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 583–590, doi:10.1038/ni797.
  25. Tanabe, H.; Yuan, J.; Zaragoza, M.M.; Dandekar, S.; Henschen-Edman, A.; Selsted, M.E.; Ouellette, A.J. Paneth Cell Alpha-Defensins from Rhesus Macaque Small Intestine. *Infect Immun* **2004**, *72*, 1470–1478, doi:10.1128/IAI.72.3.1470-1478.2004.
  26. Ericksen, B.; Wu, Z.; Lu, W.; Lehrer, R.I. Antibacterial Activity and Specificity of the Six Human  $\alpha$ -Defensins. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 269–275, doi:10.1128/AAC.49.1.269-275.2005.
  27. Ehmann, D.; Wendler, J.; Koeninger, L.; Larsen, I.S.; Klag, T.; Berger, J.; Marette, A.; Schaller, M.; Stange, E.F.; Malek, N.P.; et al. Paneth Cell  $\alpha$ -Defensins HD-5 and HD-6 Display Differential Degradation into Active Antimicrobial Fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 3746–3751, doi:10.1073/pnas.1817376116.
  28. Lala, S.; Ogura, Y.; Osborne, C.; Hor, S.Y.; Bromfield, A.; Davies, S.; Ogunbiyi, O.; Nuñez, G.; Keshav, S. Crohn's Disease and the NOD2 Gene: A Role for Paneth Cells. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 47–57, doi:10.1016/s0016-5085(03)00661-9.
  29. Yang, D.; Chertov, O.; Bykovskaia, S.N.; Chen, Q.; Buffo, M.J.; Shogan, J.; Anderson, M.; Schröder, J.M.; Wang, J.M.; Howard, O.M.; et al. Beta-Defensins:

- Linking Innate and Adaptive Immunity through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* **1999**, 286, 525–528, doi:10.1126/science.286.5439.525.
30. Pazgier, M.; Hoover, D.M.; Yang, D.; Lu, W.; Lubkowski, J. Human Beta-Defensins. *Cell Mol Life Sci* **2006**, 63, 1294–1313, doi:10.1007/s00018-005-5540-2.
  31. Diamond, G.; Bevins, C.L. Beta-Defensins: Endogenous Antibiotics of the Innate Host Defense Response. *Clin Immunol Immunopathol* **1998**, 88, 221–225, doi:10.1006/clin.1998.4587.
  32. Diamond, G.; Kaiser, V.; Rhodes, J.; Russell, J.P.; Bevins, C.L. Transcriptional Regulation of Beta-Defensin Gene Expression in Tracheal Epithelial Cells. *Infect Immun* **2000**, 68, 113–119, doi:10.1128/IAI.68.1.113-119.2000.
  33. Howell, M.D.; Boguniewicz, M.; Pastore, S.; Novak, N.; Bieber, T.; Girolomoni, G.; Leung, D.Y.M. Mechanism of HBD-3 Deficiency in Atopic Dermatitis. *Clin Immunol* **2006**, 121, 332–338, doi:10.1016/j.clim.2006.08.008.
  34. Singh, P.K.; Jia, H.P.; Wiles, K.; Hesselberth, J.; Liu, L.; Conway, B.-A.D.; Greenberg, E.P.; Valore, E.V.; Welsh, M.J.; Ganz, T.; et al. Production of  $\beta$ -Defensins by Human Airway Epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, 14961–14966, doi:10.1073/pnas.95.25.14961.
  35. Tang, Y.-Q.; Yuan, J.; Ösapay, G.; Ösapay, K.; Tran, D.; Miller, C.J.; Ouellette, A.J.; Selsted, M.E. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated  $\alpha$ -Defensins. *Science* **1999**, 286, 498–502, doi:10.1126/science.286.5439.498.
  36. Garcia, A.E.; Ösapay, G.; Tran, P.A.; Yuan, J.; Selsted, M.E. Isolation, Synthesis, and Antimicrobial Activities of Naturally Occurring  $\theta$ -Defensin Isoforms from Baboon Leukocytes. *Infect Immun* **2008**, 76, 5883–5891, doi:10.1128/IAI.01100-08.
  37. Cole, A.M.; Hong, T.; Boo, L.M.; Nguyen, T.; Zhao, C.; Bristol, G.; Zack, J.A.; Waring, A.J.; Yang, O.O.; Lehrer, R.I. Retrocyclin: A Primate Peptide That Protects Cells from Infection by T- and M-Tropic Strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 1813–1818, doi:10.1073/pnas.052706399.
  38. Nguyen, T.X.; Cole, A.M.; Lehrer, R.I. Evolution of Primate Theta-Defensins: A Serpentine Path to a Sweet Tooth. *Peptides* **2003**, 24, 1647–1654, doi:10.1016/j.peptides.2003.07.023.
  39. Leonova, L.; Kokryakov, V.N.; Aleshina, G.; Hong, T.; Nguyen, T.; Zhao, C.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I. Circular Minidefensins and Posttranslational Generation of Molecular Diversity. *J Leukoc Biol* **2001**, 70, 461–464.
  40. Cole, A.M.; Wang, W.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I. Retrocyclins: Using Past as Prologue. *Curr Protein Pept Sci* **2004**, 5, 373–381, doi:10.2174/1389203043379657.
  41. Basso, V.; Garcia, A.; Tran, D.Q.; Schaal, J.B.; Tran, P.; Ngole, D.; Aqeel, Y.; Tongaonkar, P.; Ouellette, A.J.; Selsted, M.E. Fungicidal Potency and Mechanisms of  $\theta$ -Defensins against Multidrug-Resistant *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, 62, e00111-18, doi:10.1128/AAC.00111-18.
  42. Tran, D.; Tran, P.; Roberts, K.; Ösapay, G.; Schaal, J.; Ouellette, A.; Selsted, M.E. Microbicidal Properties and Cytocidal Selectivity of Rhesus Macaque Theta Defensins. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, 944–953, doi:10.1128/AAC.01090-07.

43. Wilmes, M.; Stockem, M.; Bierbaum, G.; Schlag, M.; Götz, F.; Tran, D.Q.; Schaal, J.B.; Ouellette, A.J.; Selsted, M.E.; Sahl, H.-G. Killing of Staphylococci by  $\theta$ -Defensins Involves Membrane Impairment and Activation of Autolytic Enzymes. *Antibiotics (Basel)* **2014**, *3*, 617–631, doi:10.3390/antibiotics3040617.
44. Lehrer, R.I.; Barton, A.; Daher, K.A.; Harwig, S.S.; Ganz, T.; Selsted, M.E. Interaction of Human Defensins with Escherichia Coli. Mechanism of Bactericidal Activity. *J Clin Invest* **1989**, *84*, 553–561, doi:10.1172/JCI114198.
45. Wimley, W.C.; Selsted, M.E.; White, S.H. Interactions between Human Defensins and Lipid Bilayers: Evidence for Formation of Multimeric Pores. *Protein Science* **1994**, *3*, 1362–1373, doi:10.1002/pro.5560030902.
46. Pazgier, M.; Wei, G.; Ericksen, B.; Jung, G.; Wu, Z.; de Leeuw, E.; Yuan, W.; Szmajdzinski, H.; Lu, W.-Y.; Lubkowski, J.; et al. Sometimes It Takes Two to Tango. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 8944–8953, doi:10.1074/jbc.M111.332205.
47. Oeemig, J.S.; Lynggaard, C.; Knudsen, D.H.; Hansen, F.T.; Nørgaard, K.D.; Schneider, T.; Vad, B.S.; Sandvang, D.H.; Nielsen, L.A.; Neve, S.; et al. Eurocin, a New Fungal Defensin: Structure, Lipid Binding, and Its Mode of Action. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 42361–42372, doi:10.1074/jbc.M112.382028.
48. Schneider, T.; Kruse, T.; Wimmer, R.; Wiedemann, I.; Sass, V.; Pag, U.; Jansen, A.; Nielsen, A.K.; Mygind, P.H.; Raventós, D.S.; et al. Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* **2010**, *328*, 1168–1172, doi:10.1126/science.1185723.
49. Schmitt, P.; Wilmes, M.; Pugnière, M.; Aumelas, A.; Bachère, E.; Sahl, H.-G.; Schneider, T.; Destoumieux-Garzón, D. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action: Oyster Defensins Inhibit Peptidoglycan Biosynthesis by Binding to Lipid II. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 29208–29216, doi:10.1074/jbc.M110.143388.
50. de Leeuw, E.; Li, C.; Zeng, P.; Li, C.; Diepeveen-de Buin, M.; Lu, W.-Y.; Breukink, E.; Lu, W. Functional Interaction of Human Neutrophil Peptide-1 with the Cell Wall Precursor Lipid II. *FEBS Lett* **2010**, *584*, 1543–1548, doi:10.1016/j.febslet.2010.03.004.
51. Sass, V.; Schneider, T.; Wilmes, M.; Körner, C.; Tossi, A.; Novikova, N.; Shamova, O.; Sahl, H.-G. Human Beta-Defensin 3 Inhibits Cell Wall Biosynthesis in Staphylococci. *Infect Immun* **2010**, *78*, 2793–2800, doi:10.1128/IAI.00688-09.
52. Scott, M.G.; Vreugdenhil, A.C.; Buurman, W.A.; Hancock, R.E.; Gold, M.R. Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *J Immunol* **2000**, *164*, 549–553, doi:10.4049/jimmunol.164.2.549.
53. Oppenheim, J.J.; Biragyn, A.; Kwak, L.W.; Yang, D. Roles of Antimicrobial Peptides Such as Defensins in Innate and Adaptive Immunity. *Ann Rheum Dis* **2003**, *62 Suppl 2*, ii17-21, doi:10.1136/ard.62.suppl\_2.ii17.
54. Soehnlein, O.; Kai-Larsen, Y.; Frithiof, R.; Sorensen, O.E.; Kenne, E.; Scharffetter-Kochanek, K.; Eriksson, E.E.; Herwald, H.; Agerberth, B.; Lindbom, L. Neutrophil Primary Granule Proteins HBP and HNP1-3 Boost Bacterial Phagocytosis by Human and Murine Macrophages. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 3491–3502, doi:10.1172/JCI35740.
55. Agerberth, B.; Charo, J.; Werr, J.; Olsson, B.; Idali, F.; Lindbom, L.; Kiessling, R.; Jörnvall, H.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. The Human Antimicrobial and

- Chemotactic Peptides LL-37 and Alpha-Defensins Are Expressed by Specific Lymphocyte and Monocyte Populations. *Blood* **2000**, *96*, 3086–3093.
56. Cole, A.M.; Ganz, T.; Liese, A.M.; Burdick, M.D.; Liu, L.; Strieter, R.M. Cutting Edge: IFN-Inducible ELR- CXC Chemokines Display Defensin-like Antimicrobial Activity. *J Immunol* **2001**, *167*, 623–627, doi:10.4049/jimmunol.167.2.623.
  57. Yang, D.; Chen, Q.; Chertov, O.; Oppenheim, J.J. Human Neutrophil Defensins Selectively Chemoattract Naive T and Immature Dendritic Cells. *J Leukoc Biol* **2000**, *68*, 9–14.
  58. Schroeder, B.O.; Wu, Z.; Nuding, S.; Groscurth, S.; Marcinowski, M.; Beisner, J.; Buchner, J.; Schaller, M.; Stange, E.F.; Wehkamp, J. Reduction of Disulphide Bonds Unmasks Potent Antimicrobial Activity of Human  $\beta$ -Defensin 1. *Nature* **2011**, *469*, 419–423, doi:10.1038/nature09674.
  59. Kościuczuk, E.M.; Lisowski, P.; Jarczak, J.; Strzałkowska, N.; Józwick, A.; Horbańczuk, J.; Krzyżewski, J.; Zwierzchowski, L.; Bagnicka, E. Cathelicidins: Family of Antimicrobial Peptides. A Review. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 10957–10970, doi:10.1007/s11033-012-1997-x.
  60. Ramanathan, B.; Davis, E.G.; Ross, C.R.; Blecha, F. Cathelicidins: Microbicidal Activity, Mechanisms of Action, and Roles in Innate Immunity. *Microbes and Infection* **2002**, *4*, 361–372, doi:10.1016/S1286-4579(02)01549-6.
  61. Masso-Silva, J.A.; Diamond, G. Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 265–310, doi:10.3390/ph7030265.
  62. Kim, D.; Soundarajan, N.; Lee, J.; Cho, H.; Choi, M.; Cha, S.-Y.; Ahn, B.; Jeon, H.; Le, M.T.; Song, H.; et al. Genomewide Analysis of the Antimicrobial Peptides in Python Bivittatus and Characterization of Cathelicidins with Potent Antimicrobial Activity and Low Cytotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e00530-17, doi:10.1128/AAC.00530-17.
  63. Uzzell, T.; Stolzenberg, E.D.; Shinnar, A.E.; Zasloff, M. Hagfish Intestinal Antimicrobial Peptides Are Ancient Cathelicidins. *Peptides* **2003**, *24*, 1655–1667, doi:10.1016/j.peptides.2003.08.024.
  64. Donoghue, P.C.; Forey, P.L.; Aldridge, R.J. Conodont Affinity and Chordate Phylogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* **2000**, *75*, 191–251, doi:10.1017/s0006323199005472.
  65. Zhao, C.; Ganz, T.; Lehrer, R.I. Structures of Genes for Two Cathelin-Associated Antimicrobial Peptides: Prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett* **1995**, *376*, 130–134, doi:10.1016/0014-5793(95)01237-3.
  66. Frohm, M.; Agerberth, B.; Ahangari, G.; Stähle-Bäckdahl, M.; Lidén, S.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 15258–15263, doi:10.1074/jbc.272.24.15258.
  67. Sørensen, O.E.; Follin, P.; Johnsen, A.H.; Calafat, J.; Tjabringa, G.S.; Hiemstra, P.S.; Borregaard, N. Human Cathelicidin, hCAP-18, Is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3. *Blood* **2001**, *97*, 3951–3959, doi:10.1182/blood.v97.12.3951.
  68. Zaiou, M.; Nizet, V.; Gallo, R.L. Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence. *J Invest Dermatol* **2003**, *120*, 810–816, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12132.x.

69. Shinnar, A.E.; Butler, K.L.; Park, H.J. Cathelicidin Family of Antimicrobial Peptides: Proteolytic Processing and Protease Resistance. *Bioorg Chem* **2003**, *31*, 425–436, doi:10.1016/s0045-2068(03)00080-4.
70. Frohm Nilsson, M.; Sandstedt, B.; Sørensen, O.; Weber, G.; Borregaard, N.; Ståhle-Bäckdahl, M. The Human Cationic Antimicrobial Protein (hCAP18), a Peptide Antibiotic, Is Widely Expressed in Human Squamous Epithelia and Colocalizes with Interleukin-6. *Infect Immun* **1999**, *67*, 2561–2566, doi:10.1128/IAI.67.5.2561-2566.1999.
71. Gallo, R.L.; Kim, K.J.; Bernfield, M.; Kozak, C.A.; Zanetti, M.; Merluzzi, L.; Gennaro, R. Identification of CRAMP, a Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Expressed in the Embryonic and Adult Mouse. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 13088–13093, doi:10.1074/jbc.272.20.13088.
72. Kokryakov, V.N.; Harwig, S.S.; Panyutich, E.A.; Shevchenko, A.A.; Aleshina, G.M.; Shamova, O.V.; Korneva, H.A.; Lehrer, R.I. Protegrins: Leukocyte Antimicrobial Peptides That Combine Features of Corticostatic Defensins and Tachyplesins. *FEBS Lett* **1993**, *327*, 231–236, doi:10.1016/0014-5793(93)80175-t.
73. Romeo, D.; Skerlavaj, B.; Bolognesi, M.; Gennaro, R. Structure and Bactericidal Activity of an Antibiotic Dodecapeptide Purified from Bovine Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 9573–9575, doi:10.1016/S0021-9258(19)81553-3.
74. Benincasa, M.; Scocchi, M.; Podda, E.; Skerlavaj, B.; Dolzani, L.; Gennaro, R. Antimicrobial Activity of Bac7 Fragments against Drug-Resistant Clinical Isolates. *Peptides* **2004**, *25*, 2055–2061, doi:10.1016/j.peptides.2004.08.004.
75. Agerberth, B.; Lee, J.-Y.; Bergman, T.; Carlquist, M.; Boman, H.G.; Mutt, V.; Jornvall, H. Amino Acid Sequence of PR-39. Isolation from Pig Intestine of a New Member of the Family of Proline-Arginine-Rich Antibacterial Peptides. *Eur J Biochem* **1991**, *202*, 849–854, doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16442.x.
76. Panyutich, A.; Shi, J.; Boutz, P.L.; Zhao, C.; Ganz, T. Porcine Polymorphonuclear Leukocytes Generate Extracellular Microbicidal Activity by Elastase-Mediated Activation of Secreted Propeptidases. *Infect Immun* **1997**, *65*, 978–985, doi:10.1128/iai.65.3.978-985.1997.
77. Cowland, J.B.; Johnsen, A.H.; Borregaard, N. hCAP-18, a Cathelin/pro-Bactenecin-like Protein of Human Neutrophil Specific Granules. *FEBS Letters* **1995**, *368*, 173–176, doi:10.1016/0014-5793(95)00634-L.
78. Bals, R.; Wang, X.; Zasloff, M.; Wilson, J.M. The Peptide Antibiotic LL-37/hCAP-18 Is Expressed in Epithelia of the Human Lung Where It Has Broad Antimicrobial Activity at the Airway Surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 9541–9546, doi:10.1073/pnas.95.16.9541.
79. van 't Hof, W.; Veerman, E.C.; Helmerhorst, E.J.; Amerongen, A.V. Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Biol Chem* **2001**, *382*, 597–619, doi:10.1515/BC.2001.072.
80. Boheim, G. Statistical Analysis of Alamethicin Channels in Black Lipid Membranes. *J Membr Biol* **1974**, *19*, 277–303, doi:10.1007/BF01869983.
81. He, K.; Ludtke, S.J.; Heller, W.T.; Huang, H.W. Mechanism of Alamethicin Insertion into Lipid Bilayers. *Biophys J* **1996**, *71*, 2669–2679, doi:10.1016/S0006-3495(96)79458-4.

82. Holfeld, L.; Hoffmann, R.; Knappe, D. Correlating Uptake and Activity of Proline-Rich Antimicrobial Peptides in *Escherichia Coli*. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409*, 5581–5592, doi:10.1007/s00216-017-0496-2.
83. Leonard, B.C.; Chu, H.; Johns, J.L.; Gallo, R.L.; Moore, P.F.; Marks, S.L.; Bevins, C.L. Expression and Activity of a Novel Cathelicidin from Domestic Cats. *PLoS One* **2011**, *6*, e18756, doi:10.1371/journal.pone.0018756.
84. Zamble, D.B.; Miller, D.A.; Heddle, J.G.; Maxwell, A.; Walsh, C.T.; Hollfelder, F. In Vitro Characterization of DNA Gyrase Inhibition by Microcin B17 Analogs with Altered Bisheterocyclic Sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 7712–7717, doi:10.1073/pnas.141225698.
85. Graf, M.; Mardirossian, M.; Nguyen, F.; Seefeldt, A.C.; Guichard, G.; Scocchi, M.; Innis, C.A.; Wilson, D.N. Proline-Rich Antimicrobial Peptides Targeting Protein Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 702–711, doi:10.1039/C7NP00020K.
86. Krizsan, A.; Volke, D.; Weinert, S.; Sträter, N.; Knappe, D.; Hoffmann, R. Insect-Derived Proline-Rich Antimicrobial Peptides Kill Bacteria by Inhibiting Bacterial Protein Translation at the 70S Ribosome. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12236–12239, doi:10.1002/anie.201407145.
87. Gagnon, M.G.; Roy, R.N.; Lomakin, I.B.; Florin, T.; Mankin, A.S.; Steitz, T.A. Structures of Proline-Rich Peptides Bound to the Ribosome Reveal a Common Mechanism of Protein Synthesis Inhibition. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 2439–2450, doi:10.1093/nar/gkw018.
88. Casteels, P.; Ampe, C.; Jacobs, F.; Vaeck, M.; Tempst, P. Apidaecins: Antibacterial Peptides from Honeybees. *EMBO J* **1989**, *8*, 2387–2391, doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x.
89. Skerlavaj, B.; Gennaro, R.; Bagella, L.; Merluzzi, L.; Risso, A.; Zanetti, M. Biological Characterization of Two Novel Cathelicidin-Derived Peptides and Identification of Structural Requirements for Their Antimicrobial and Cell Lytic Activities. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 28375–28381, doi:10.1074/jbc.271.45.28375.
90. Storici, P.; Scocchi, M.; Tossi, A.; Gennaro, R.; Zanetti, M. Chemical Synthesis and Biological Activity of a Novel Antibacterial Peptide Deduced from a Pig Myeloid cDNA. *FEBS Letters* **1994**, *337*, 303–307, doi:10.1016/0014-5793(94)80214-9.
91. M, S.; I, Z.; M, B.; R, G.; A, M.; A, T. Structural Aspects and Biological Properties of the Cathelicidin PMAP-36. *The FEBS journal* **2005**, *272*, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04852.x.
92. Lv, Y.; Wang, J.; Gao, H.; Wang, Z.; Dong, N.; Ma, Q.; Shan, A. Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86364, doi:10.1371/journal.pone.0086364.
93. Lyu, Y.; Yang, Y.; Lyu, X.; Dong, N.; Shan, A. Antimicrobial Activity, Improved Cell Selectivity and Mode of Action of Short PMAP-36-Derived Peptides against Bacteria and *Candida*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 27258, doi:10.1038/srep27258.
94. Coorens, M.; Scheenstra, M.R.; Veldhuizen, E.J.A.; Haagsman, H.P. Interspecies Cathelicidin Comparison Reveals Divergence in Antimicrobial Activity, TLR Modulation, Chemokine Induction and Regulation of Phagocytosis. *Sci Rep* **2017**, *7*, 40874, doi:10.1038/srep40874.

95. Scheenstra, M.R.; van den Belt, M.; Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M.; Schneider, V.A.F.; Ordonez, S.R.; van Dijk, A.; Veldhuizen, E.J.A.; Haagsman, H.P. Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 Are Similar Peptides with Different Modes of Action. *Sci Rep* **2019**, *9*, 4780, doi:10.1038/s41598-019-41246-6.
96. Baumann, A.; Démoulin, T.; Python, S.; Summerfield, A. Porcine Cathelicidins Efficiently Complex and Deliver Nucleic Acids to Plasmacytoid Dendritic Cells and Can Thereby Mediate Bacteria-Induced IFN- $\alpha$  Responses. *The Journal of Immunology* **2014**, *193*, 364–371, doi:10.4049/jimmunol.1303219.
97. Van Dijk, A.; Molhoek, E.M.; Veldhuizen, E.J.A.; Bokhoven, J.L.M.T.; Wagendorp, E.; Bikker, F.; Haagsman, H.P. Identification of Chicken Cathelicidin-2 Core Elements Involved in Antibacterial and Immunomodulatory Activities. *Molecular Immunology* **2009**, *46*, 2465–2473, doi:10.1016/j.molimm.2009.05.019.
98. Veldhuizen, E.J.A.; Brouwer, E.C.; Schneider, V.A.F.; Fluit, A.C. Chicken Cathelicidins Display Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria without Inducing Strong Resistance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61964, doi:10.1371/journal.pone.0061964.
99. Van Dijk, A.; Van Eldik, M.; Veldhuizen, E.J.A.; Tjeerdsma-van Bokhoven, H.L.M.; De Zoete, M.R.; Bikker, F.J.; Haagsman, H.P. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activities of Chicken Cathelicidin-2 Derived Peptides. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147919, doi:10.1371/journal.pone.0147919.
100. Yang, S.-T.; Shin, S.-Y.; Shin, S.-H. The Central PXXP Motif Is Crucial for PMAP-23 Translocation across the Lipid Bilayer. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 9752, doi:10.3390/ijms22189752.
101. Agerberth, B.; Gunne, H.; Odeberg, J.; Kogner, P.; Boman, H.G.; Gudmundsson, G.H. FALL-39, a Putative Human Peptide Antibiotic, Is Cysteine-Free and Expressed in Bone Marrow and Testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 195–199, doi:10.1073/pnas.92.1.195.
102. Burton, M.F.; Steel, P.G. The Chemistry and Biology of LL-37. *Nat Prod Rep* **2009**, *26*, 1572–1584, doi:10.1039/b912533g.
103. Johansson, J.; Gudmundsson, G.H.; Rottenberg, M.E.; Berndt, K.D.; Agerberth, B. Conformation-Dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 3718–3724, doi:10.1074/jbc.273.6.3718.
104. Sørensen, O.E.; Gram, L.; Johnsen, A.H.; Andersson, E.; Bangsbøll, S.; Tjabringa, G.S.; Hiemstra, P.S.; Malm, J.; Egesten, A.; Borregaard, N. Processing of Seminal Plasma hCAP-18 to ALL-38 by Gastricsin: A Novel Mechanism of Generating Antimicrobial Peptides in Vagina. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 28540–28546, doi:10.1074/jbc.M301608200.
105. Murakami, M.; Lopez-Garcia, B.; Braff, M.; Dorschner, R.A.; Gallo, R.L. Postsecretory Processing Generates Multiple Cathelicidins for Enhanced Topical Antimicrobial Defense. *J Immunol* **2004**, *172*, 3070–3077, doi:10.4049/jimmunol.172.5.3070.
106. den Hertog, A.L.; van Marle, J.; van Veen, H.A.; Van't Hof, W.; Bolscher, J.G.M.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. Candidacidal Effects of Two Antimicrobial Peptides: Histatin 5 Causes Small Membrane Defects, but LL-37 Causes Massive Disruption of the Cell Membrane. *Biochem J* **2005**, *388*, 689–695, doi:10.1042/BJ20042099.

107. López-García, B.; Lee, P.H.A.; Yamasaki, K.; Gallo, R.L. Anti-Fungal Activity of Cathelicidins and Their Potential Role in *Candida Albicans* Skin Infection. *J Invest Dermatol* **2005**, *125*, 108–115, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23713.x.
108. Bergman, P.; Walter-Jallow, L.; Broliden, K.; Agerberth, B.; Söderlund, J. The Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits HIV-1 Replication. *Curr HIV Res* **2007**, *5*, 410–415, doi:10.2174/157016207781023947.
109. Overhage, J.; Campisano, A.; Bains, M.; Torfs, E.C.W.; Rehm, B.H.A.; Hancock, R.E.W. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infection and Immunity* **2008**, doi:10.1128/IAI.00318-08.
110. Drab, E.; Sugihara, K. Cooperative Function of LL-37 and HNP1 Protects Mammalian Cell Membranes from Lysis. *Biophys J* **2020**, *119*, 2440–2450, doi:10.1016/j.bpj.2020.10.031.
111. Lai, Y.; Gallo, R.L. AMPed up Immunity: How Antimicrobial Peptides Have Multiple Roles in Immune Defense. *Trends Immunol* **2009**, *30*, 131–141, doi:10.1016/j.it.2008.12.003.
112. Mookherjee, N.; Hamill, P.; Gardy, J.; Blimkie, D.; Falsafi, R.; Chikatamarla, A.; Arenillas, D.J.; Doria, S.; Kollmann, T.R.; Hancock, R.E.W. Systems Biology Evaluation of Immune Responses Induced by Human Host Defence Peptide LL-37 in Mononuclear Cells. *Mol Biosyst* **2009**, *5*, 483–496, doi:10.1039/b813787k.
113. Oppenheim, J.J.; Yang, D. Alarmins: Chemotactic Activators of Immune Responses. *Curr Opin Immunol* **2005**, *17*, 359–365, doi:10.1016/j.coi.2005.06.002.
114. Huang, L.C.; Petkova, T.D.; Reins, R.Y.; Proske, R.J.; McDermott, A.M. Multifunctional Roles of Human Cathelicidin (LL-37) at the Ocular Surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2006**, *47*, 2369–2380, doi:10.1167/iovs.05-1649.
115. Yamasaki, K.; Di Nardo, A.; Bardan, A.; Murakami, M.; Ohtake, T.; Coda, A.; Dorschner, R.A.; Bonnart, C.; Descargues, P.; Hovnanian, A.; et al. Increased Serine Protease Activity and Cathelicidin Promotes Skin Inflammation in Rosacea. *Nat Med* **2007**, *13*, 975–980, doi:10.1038/nm1616.
116. Mallbris, L.; Carlén, L.; Wei, T.; Heilborn, J.; Nilsson, M.F.; Granath, F.; Ståhle, M. Injury Downregulates the Expression of the Human Cathelicidin Protein hCAP18/LL-37 in Atopic Dermatitis. *Exp Dermatol* **2010**, *19*, 442–449, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00918.x.
117. Zasloff, M. Inducing Endogenous Antimicrobial Peptides to Battle Infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8913–8914, doi:10.1073/pnas.0603508103.
118. Kida, Y.; Shimizu, T.; Kuwano, K. Sodium Butyrate Up-Regulates Cathelicidin Gene Expression via Activator Protein-1 and Histone Acetylation at the Promoter Region in a Human Lung Epithelial Cell Line, EBC-1. *Mol Immunol* **2006**, *43*, 1972–1981, doi:10.1016/j.molimm.2005.11.014.
119. Termén, S.; Tollin, M.; Rodriguez, E.; Sveinsdóttir, S.H.; Jóhannesson, B.; Cederlund, A.; Sjövall, J.; Agerberth, B.; Gudmundsson, G.H. PU.1 and Bacterial Metabolites Regulate the Human Gene CAMP Encoding Antimicrobial Peptide LL-37 in Colon Epithelial Cells. *Mol Immunol* **2008**, *45*, 3947–3955, doi:10.1016/j.molimm.2008.06.020.
120. Cohen, J. The Immunopathogenesis of Sepsis. *Nature* **2002**, *420*, 885–891, doi:10.1038/nature01326.
121. Islam, D.; Bandholtz, L.; Nilsson, J.; Wigzell, H.; Christensson, B.; Agerberth, B.; Gudmundsson, G. Downregulation of Bactericidal Peptides in Enteric Infections: A

- Novel Immune Escape Mechanism with Bacterial DNA as a Potential Regulator. *Nat Med* **2001**, *7*, 180–185, doi:10.1038/84627.
122. Chakraborty, K.; Ghosh, S.; Koley, H.; Mukhopadhyay, A.K.; Ramamurthy, T.; Saha, D.R.; Mukhopadhyay, D.; Roychowdhury, S.; Hamabata, T.; Takeda, Y.; et al. Bacterial Exotoxins Downregulate Cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and Human Beta-Defensin 1 (HBD-1) Expression in the Intestinal Epithelial Cells. *Cell Microbiol* **2008**, *10*, 2520–2537, doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01227.x.
  123. Wang, T.-T.; Nestel, F.P.; Bourdeau, V.; Nagai, Y.; Wang, Q.; Liao, J.; Tavera-Mendoza, L.; Lin, R.; Hanrahan, J.W.; Mader, S.; et al. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J Immunol* **2004**, *173*, 2909–2912, doi:10.4049/jimmunol.173.5.2909.
  124. Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaubert, J.; Wu, K.; Meinken, C.; et al. Toll-like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* **2006**, *311*, 1770–1773, doi:10.1126/science.1123933.
  125. Gombart, A.F.; Borregaard, N.; Koeffler, H.P. Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Is a Direct Target of the Vitamin D Receptor and Is Strongly up-Regulated in Myeloid Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *FASEB J* **2005**, *19*, 1067–1077, doi:10.1096/fj.04-3284com.
  126. Scheenstra, M.R.; van Harten, R.M.; Veldhuizen, E.J.A.; Haagsman, H.P.; Coorens, M. Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1137, doi:10.3389/fimmu.2020.01137.
  127. Marin, M.; Holani, R.; Shah, C.B.; Odeón, A.; Cobo, E.R. Cathelicidin Modulates Synthesis of Toll-like Receptors (TLRs) 4 and 9 in Colonic Epithelium. *Mol Immunol* **2017**, *91*, 249–258, doi:10.1016/j.molimm.2017.09.011.
  128. Shaykhiev, R.; Sierigk, J.; Herr, C.; Krasteva, G.; Kummer, W.; Bals, R. The Antimicrobial Peptide Cathelicidin Enhances Activation of Lung Epithelial Cells by LPS. *FASEB J* **2010**, *24*, 4756–4766, doi:10.1096/fj.09-151332.
  129. Suzuki, K.; Murakami, T.; Hu, Z.; Tamura, H.; Kuwahara-Arai, K.; Iba, T.; Nagaoka, I. Human Host Defense Cathelicidin Peptide LL-37 Enhances the Lipopolysaccharide Uptake by Liver Sinusoidal Endothelial Cells without Cell Activation. *J Immunol* **2016**, *196*, 1338–1347, doi:10.4049/jimmunol.1403203.
  130. Zhang, M.; Liang, W.; Gong, W.; Yoshimura, T.; Chen, K.; Wang, J.M. The Critical Role of the Antimicrobial Peptide LL-37/CRAMP in Protection of Colon Microbiota Balance, Mucosal Homeostasis, Anti-Inflammatory Responses, and Resistance to Carcinogenesis. *Crit Rev Immunol* **2019**, *39*, 83–92, doi:10.1615/CritRevImmunol.2019030225.
  131. Nizet, V.; Ohtake, T.; Lauth, X.; Trowbridge, J.; Rudisill, J.; Dorschner, R.A.; Pestonjamasp, V.; Piraino, J.; Huttner, K.; Gallo, R.L. Innate Antimicrobial Peptide Protects the Skin from Invasive Bacterial Infection. *Nature* **2001**, *414*, 454–457, doi:10.1038/35106587.
  132. Howell, M.D.; Jones, J.F.; Kisich, K.O.; Streib, J.E.; Gallo, R.L.; Leung, D.Y.M. Selective Killing of Vaccinia Virus by LL-37: Implications for Eczema Vaccinatum. *J Immunol* **2004**, *172*, 1763–1767, doi:10.4049/jimmunol.172.3.1763.
  133. Li, X.; Li, Y.; Han, H.; Miller, D.W.; Wang, G. Solution Structures of Human LL-37 Fragments and NMR-Based Identification of a Minimal Membrane-Targeting Antimicrobial and Anticancer Region. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 5776–5785, doi:10.1021/ja0584875.

134. Nell, M.J.; Tjabringa, G.S.; Wafelman, A.R.; Verrijck, R.; Hiemstra, P.S.; Drijfhout, J.W.; Grote, J.J. Development of Novel LL-37 Derived Antimicrobial Peptides with LPS and LTA Neutralizing and Antimicrobial Activities for Therapeutic Application. *Peptides* **2006**, *27*, 649–660, doi:10.1016/j.peptides.2005.09.016.
135. Nakamura, T.; Furunaka, H.; Miyata, T.; Tokunaga, F.; Muta, T.; Iwanaga, S.; Niwa, M.; Takao, T.; Shimonishi, Y. Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachyplesus Tridentatus*). Isolation and Chemical Structure. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 16709–16713.
136. Silva, P.I.; Daffre, S.; Bulet, P. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-Rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria Gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family\*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 33464–33470, doi:10.1074/jbc.M001491200.
137. Ovchinnikova, T.V.; Aleshina, G.M.; Balandin, S.V.; Krasnosdembskaya, A.D.; Markelov, M.L.; Frolova, E.I.; Leonova, Y.F.; Tagaev, A.A.; Krasnodembsky, E.G.; Kokryakov, V.N. Purification and Primary Structure of Two Isoforms of Arenicin, a Novel Antimicrobial Peptide from Marine Polychaeta *Arenicola Marina*. *FEBS Lett* **2004**, *577*, 209–214, doi:10.1016/j.febslet.2004.10.012.
138. Chen, J.; Falla, T.J.; Liu, H.; Hurst, M.A.; Fujii, C.A.; Mosca, D.A.; Embree, J.R.; Loury, D.J.; Radel, P.A.; Chang, C.C.; et al. Development of Protegrins for the Treatment and Prevention of Oral Mucositis: Structure-Activity Relationships of Synthetic Protegrin Analogues. *Biopolymers* **2000**, *55*, 88–98, doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<88::AID-BIP80>3.0.CO;2-K.
139. Frecer, V. QSAR Analysis of Antimicrobial and Haemolytic Effects of Cyclic Cationic Antimicrobial Peptides Derived from Protegrin-1. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, 6065–6074, doi:10.1016/j.bmc.2006.05.005.
140. Ostberg, N.; Kaznessis, Y. Protegrin Structure-Activity Relationships: Using Homology Models of Synthetic Sequences to Determine Structural Characteristics Important for Activity. *Peptides* **2005**, *26*, 197–206, doi:10.1016/j.peptides.2004.09.020.
141. Fahrner, R.L.; Dieckmann, T.; Harwig, S.S.; Lehrer, R.I.; Eisenberg, D.; Feigon, J. Solution Structure of Protegrin-1, a Broad-Spectrum Antimicrobial Peptide from Porcine Leukocytes. *Chem Biol* **1996**, *3*, 543–550, doi:10.1016/s1074-5521(96)90145-3.
142. Panteleev, P.V.; Bolosov, I.A.; Balandin, S.V.; Ovchinnikova, T.V. Design of Antimicrobial Peptide Arenicin Analogs with Improved Therapeutic Indices. *J Pept Sci* **2015**, *21*, 105–113, doi:10.1002/psc.2732.
143. Mosca, D.A.; Hurst, M.A.; So, W.; Viajar, B.S.; Fujii, C.A.; Falla, T.J. IB-367, a Protegrin Peptide with in Vitro and in Vivo Activities against the Microflora Associated with Oral Mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, *44*, 1803–1808, doi:10.1128/AAC.44.7.1803-1808.2000.
144. Steinberg, D.A.; Hurst, M.A.; Fujii, C.A.; Kung, A.H.; Ho, J.F.; Cheng, F.C.; Loury, D.J.; Fiddes, J.C. Protegrin-1: A Broad-Spectrum, Rapidly Microbicidal Peptide with in Vivo Activity. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 1738–1742, doi:10.1128/AAC.41.8.1738.
145. Isegaran. IB 367, Protegrin IB 367. *Drugs R D* **2002**, *3*, 52–55, doi:10.2165/00126839-200203010-00012.

146. Martin-Loeches, I.; Dale, G.E.; Torres, A. Murepavadin: A New Antibiotic Class in the Pipeline. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2018**, *16*, 259–268, doi:10.1080/14787210.2018.1441024.
147. Srinivas, N.; Jetter, P.; Ueberbacher, B.J.; Werneburg, M.; Zerbe, K.; Steinmann, J.; Van der Meijden, B.; Bernardini, F.; Lederer, A.; Dias, R.L.A.; et al. Peptidomimetic Antibiotics Target Outer-Membrane Biogenesis in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Science* **2010**, *327*, 1010–1013, doi:10.1126/science.1182749.
148. Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* **2003**, *55*, 27–55, doi:10.1124/pr.55.1.2.
149. Gidalevitz, D.; Ishitsuka, Y.; Muresan, A.S.; Konovalov, O.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I.; Lee, K.Y.C. Interaction of Antimicrobial Peptide Protegrin with Biomembranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 6302–6307, doi:10.1073/pnas.0934731100.
150. Usachev, K.S.; Kolosova, O.A.; Klochkova, E.A.; Yulmetov, A.R.; Aganov, A.V.; Klochkov, V.V. Oligomerization of the Antimicrobial Peptide Protegrin-5 in a Membrane-Mimicking Environment. Structural Studies by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Eur Biophys J* **2017**, *46*, 293–300, doi:10.1007/s00249-016-1167-5.
151. Bolintineanu, D.; Hazrati, E.; Davis, H.T.; Lehrer, R.I.; Kaznessis, Y.N. Antimicrobial Mechanism of Pore-Forming Protegrin Peptides: 100 Pores to Kill *E. Coli*. *Peptides* **2010**, *31*, 1–8, doi:10.1016/j.peptides.2009.11.010.
152. Sokolov, Y.; Mirzabekov, T.; Martin, D.W.; Lehrer, R.I.; Kagan, B.L. Membrane Channel Formation by Antimicrobial Protegrins. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1420*, 23–29, doi:10.1016/s0005-2736(99)00086-3.
153. Aumelas, A.; Mangoni, M.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E.; Grassy, G.; Calas, B.; Chavanieu, A. Synthesis and Solution Structure of the Antimicrobial Peptide Protegrin-1. *Eur J Biochem* **1996**, *237*, 575–583, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0575p.x.
154. Roumestand, C.; Louis, V.; Aumelas, A.; Grassy, G.; Calas, B.; Chavanieu, A. Oligomerization of Protegrin-1 in the Presence of DPC Micelles. A Proton High-Resolution NMR Study. *FEBS Lett* **1998**, *421*, 263–267, doi:10.1016/s0014-5793(97)01579-2.
155. Tang, M.; Waring, A.J.; Hong, M. Intermolecular Packing and Alignment in an Ordered Beta-Hairpin Antimicrobial Peptide Aggregate from 2D Solid-State NMR. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 13919–13927, doi:10.1021/ja0526665.
156. Mani, R.; Tang, M.; Wu, X.; Buffy, J.J.; Waring, A.J.; Sherman, M.A.; Hong, M. Membrane-Bound Dimer Structure of a Beta-Hairpin Antimicrobial Peptide from Rotational-Echo Double-Resonance Solid-State NMR. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8341–8349, doi:10.1021/bi060305b.
157. Mani, R.; Cady, S.D.; Tang, M.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I.; Hong, M. Membrane-Dependent Oligomeric Structure and Pore Formation of a  $\beta$ -Hairpin Antimicrobial Peptide in Lipid Bilayers from Solid-State NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 16242–16247, doi:10.1073/pnas.0605079103.
158. Panteleev, P.V.; Bolosov, I.A.; Ovchinnikova, T.V. Bioengineering and Functional Characterization of Arenicin Shortened Analogs with Enhanced Antibacterial Activity and Cell Selectivity. *J Pept Sci* **2016**, *22*, 82–91, doi:10.1002/psc.2843.
159. Pv, P.; My, M.; Zo, S.; Tv, O. Dimerization of the Antimicrobial Peptide Arenicin Plays a Key Role in the Cytotoxicity but Not in the Antibacterial Activity.

- Biochemical and biophysical research communications* **2017**, 482, doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.035.
160. Pantelev, P.V.; Balandin, S.V.; Ivanov, V.T.; Ovchinnikova, T.V. A Therapeutic Potential of Animal  $\beta$ -Hairpin Antimicrobial Peptides. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 24, 1724–1746, doi:10.2174/0929867324666170424124416.
  161. Storici, P.; Tossi, A.; Lenarčič, B.; Romeo, D. Purification and Structural Characterization of Bovine Cathelicidins, Precursors of Antimicrobial Peptides. *European Journal of Biochemistry* **1996**, 238, 769–776, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0769w.x.
  162. Wu, M.; Hancock, R.E. Interaction of the Cyclic Antimicrobial Cationic Peptide Bactenecin with the Outer and Cytoplasmic Membrane. *J Biol Chem* **1999**, 274, 29–35, doi:10.1074/jbc.274.1.29.
  163. Radermacher, S.W.; Schoop, V.M.; Schluesener, H.J. Bactenecin, a Leukocytic Antimicrobial Peptide, Is Cytotoxic to Neuronal and Glial Cells. *J Neurosci Res* **1993**, 36, 657–662, doi:10.1002/jnr.490360606.
  164. Wu, M.; Hancock, R.E. Improved Derivatives of Bactenecin, a Cyclic Dodecameric Antimicrobial Cationic Peptide. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43, 1274–1276, doi:10.1128/AAC.43.5.1274.
  165. Sun, C.; Gu, L.; Hussain, M.A.; Chen, L.; Lin, L.; Wang, H.; Pang, S.; Jiang, C.; Jiang, Z.; Hou, J. Characterization of the Bioactivity and Mechanism of Bactenecin Derivatives Against Food-Pathogens. *Front Microbiol* **2019**, 10, 2593, doi:10.3389/fmicb.2019.02593.
  166. Wang, A.; Zhou, M.; Chen, Q.; Jin, H.; Xu, G.; Guo, R.; Wang, J.; Lai, R. Functional Analyses of Three Targeted DNA Antimicrobial Peptides Derived from Goats. *Biomolecules* **2023**, 13, 1453, doi:10.3390/biom13101453.
  167. Zhang, G.-W.; Lai, S.-J.; Yoshimura, Y.; Isobe, N. Expression of Cathelicidins mRNA in the Goat Mammary Gland and Effect of the Intramammary Infusion of Lipopolysaccharide on Milk Cathelicidin-2 Concentration. *Veterinary Microbiology* **2014**, 170, 125–134, doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.029.
  168. Holani, R.; Shah, C.; Haji, Q.; Inglis, G.D.; Uwiera, R.R.E.; Cobo, E.R. Proline-Arginine Rich (PR-39) Cathelicidin: Structure, Expression and Functional Implication in Intestinal Health. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2016**, 49, 95–101, doi:10.1016/j.cimid.2016.10.004.
  169. Shi, J.; Ross, C.R.; Chengappa, M.M.; Blecha, F. Identification of a Proline-Arginine-Rich Antibacterial Peptide from Neutrophils That Is Analogous to PR-39, an Antibacterial Peptide from the Small Intestine. *J Leukoc Biol* **1994**, 56, 807–811, doi:10.1002/jlb.56.6.807.
  170. Gudmundsson, G.H.; Magnusson, K.P.; Chowdhary, B.P.; Johansson, M.; Andersson, L.; Boman, H.G. Structure of the Gene for Porcine Peptide Antibiotic PR-39, a Cathelin Gene Family Member: Comparative Mapping of the Locus for the Human Peptide Antibiotic FALL-39. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 7085–7089, doi:10.1073/pnas.92.15.7085.
  171. Veldhuizen, E.J.A.; Schneider, V.A.F.; Agustindari, H.; van Dijk, A.; Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M.; Bikker, F.J.; Haagsman, H.P. Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of PR-39 Derived Peptides. *PLoS One* **2014**, 9, e95939, doi:10.1371/journal.pone.0095939.

172. Chan, Y.R.; Gallo, R.L. PR-39, a Syndecan-Inducing Antimicrobial Peptide, Binds and Affects P130(Cas). *J Biol Chem* **1998**, *273*, 28978–28985, doi:10.1074/jbc.273.44.28978.
173. Li, J.; Post, M.; Volk, R.; Gao, Y.; Li, M.; Metais, C.; Sato, K.; Tsai, J.; Aird, W.; Rosenberg, R.D.; et al. PR39, a Peptide Regulator of Angiogenesis. *Nat Med* **2000**, *6*, 49–55, doi:10.1038/71527.
174. Gao, Y.; Lecker, S.; Post, M.J.; Hietaranta, A.J.; Li, J.; Volk, R.; Li, M.; Sato, K.; Saluja, A.K.; Steer, M.L.; et al. Inhibition of Ubiquitin-Proteasome Pathway-Mediated I Kappa B Alpha Degradation by a Naturally Occurring Antibacterial Peptide. *J Clin Invest* **2000**, *106*, 439–448, doi:10.1172/JCI9826.
175. Zhu, S.; Gao, B. A Fossil Antibacterial Peptide Gives Clues to Structural Diversity of Cathelicidin-Derived Host Defense Peptides. *FASEB J* **2009**, *23*, 13–20, doi:10.1096/fj.08-114579.
176. Vunnam, S.; Juvvadi, P.; Merrifield, R.B. Synthesis and Antibacterial Action of Cecropin and Proline-Arginine-Rich Peptides from Pig Intestine. *J Pept Res* **1997**, *49*, 59–66, doi:10.1111/j.1399-3011.1997.tb01121.x.
177. Shamova, O.; Brogden, K.A.; Zhao, C.; Nguyen, T.; Kokryakov, V.N.; Lehrer, R.I. Purification and Properties of Proline-Rich Antimicrobial Peptides from Sheep and Goat Leukocytes. *Infect Immun* **1999**, *67*, 4106–4111, doi:10.1128/IAI.67.8.4106-4111.1999.
178. Linde, C.M.; Hoffner, S.E.; Refai, E.; Andersson, M. In Vitro Activity of PR-39, a Proline-Arginine-Rich Peptide, against Susceptible and Multi-Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **2001**, *47*, 575–580, doi:10.1093/jac/47.5.575.
179. Boman, H.G.; Agerberth, B.; Boman, A. Mechanisms of Action on Escherichia Coli of Cecropin P1 and PR-39, Two Antibacterial Peptides from Pig Intestine. *Infect Immun* **1993**, *61*, 2978–2984, doi:10.1128/iai.61.7.2978-2984.1993.
180. Ho, Y.-H.; Shah, P.; Chen, Y.-W.; Chen, C.-S. Systematic Analysis of Intracellular-Targeting Antimicrobial Peptides, Bactenecin 7, Hybrid of Pleurocidin and Dermaseptin, Proline–Arginine-Rich Peptide, and Lactoferricin B, by Using Escherichia Coli Proteome Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics* **2016**, *15*, 1837–1847, doi:10.1074/mcp.M115.054999.
181. Roy, R.N.; Lomakin, I.B.; Gagnon, M.G.; Steitz, T.A. The Mechanism of Inhibition of Protein Synthesis by the Proline-Rich Peptide Oncocin. *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 466–469, doi:10.1038/nsmb.3031.
182. Mardirossian, M.; Pérébaskine, N.; Benincasa, M.; Gambato, S.; Hofmann, S.; Huter, P.; Müller, C.; Hilpert, K.; Innis, C.A.; Tossi, A.; et al. The Dolphin Proline-Rich Antimicrobial Peptide Tur1A Inhibits Protein Synthesis by Targeting the Bacterial Ribosome. *Cell Chem Biol* **2018**, *25*, 530-539.e7, doi:10.1016/j.chembiol.2018.02.004.
183. Podda, E.; Benincasa, M.; Pacor, S.; Micali, F.; Mattiuzzo, M.; Gennaro, R.; Scocchi, M. Dual Mode of Action of Bac7, a Proline-Rich Antibacterial Peptide. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1760*, 1732–1740, doi:10.1016/j.bbagen.2006.09.006.
184. Seefeldt, A.C.; Graf, M.; Pérébaskine, N.; Nguyen, F.; Arenz, S.; Mardirossian, M.; Scocchi, M.; Wilson, D.N.; Innis, C.A. Structure of the Mammalian Antimicrobial Peptide Bac7(1–16) Bound within the Exit Tunnel of a Bacterial Ribosome. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 2429–2438, doi:10.1093/nar/gkv1545.

185. Mardirossian, M.; Barrière, Q.; Timchenko, T.; Müller, C.; Pacor, S.; Mergaert, P.; Scocchi, M.; Wilson, D.N. Fragments of the Nonlytic Proline-Rich Antimicrobial Peptide Bac5 Kill Escherichia Coli Cells by Inhibiting Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62*, e00534-18, doi:10.1128/AAC.00534-18.
186. Panteleev, P.V.; Pichkur, E.B.; Kruglikov, R.N.; Paleskava, A.; Shulenina, O.V.; Bolosov, I.A.; Bogdanov, I.V.; Safronova, V.N.; Balandin, S.V.; Marina, V.I.; et al. Rumicidins Are a Family of Mammalian Host-Defense Peptides Plugging the 70S Ribosome Exit Tunnel. *Nat Commun* **2024**, *15*, 8925, doi:10.1038/s41467-024-53309-y.
187. Florin, T.; Maracci, C.; Graf, M.; Karki, P.; Klepacki, D.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Vázquez-Laslop, N.; Wilson, D.N.; Rodnina, M.V.; et al. An Antimicrobial Peptide That Inhibits Translation by Trapping Release Factors on the Ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **2017**, *24*, 752–757, doi:10.1038/nsmb.3439.
188. Nawrocki, K.L.; Crispell, E.K.; McBride, S.M. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics (Basel)* **2014**, *3*, 461–492, doi:10.3390/antibiotics3040461.
189. Yu, G.; Baeder, D.Y.; Regoes, R.R.; Rolff, J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60*, 1717–1724, doi:10.1128/AAC.02434-15.
190. Shenkarev, Z.O.; Finkina, E.I.; Nurmukhamedova, E.K.; Balandin, S.V.; Mineev, K.S.; Nadezhdin, K.D.; Yakimenko, Z.A.; Tagaev, A.A.; Temirov, Y.V.; Arseniev, A.S.; et al. Isolation, Structure Elucidation, and Synergistic Antibacterial Activity of a Novel Two-Component Lantibiotic Lichenicidin from *Bacillus Licheniformis* VK21. *Biochemistry* **2010**, *49*, 6462–6472, doi:10.1021/bi100871b.
191. Ridyard, K.E.; Elsayy, M.; Matrasingh, D.; Klein, D.; Strehmel, J.; Beaulieu, C.; Wong, A.; Overhage, J. Synergy between Human Peptide LL-37 and Polymyxin B against Planktonic and Biofilm Cells of Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa. *Antibiotics (Basel)* **2023**, *12*, 389, doi:10.3390/antibiotics12020389.
192. Geitani, R.; Ayoub Moubareck, C.; Touqui, L.; Karam Sarkis, D. Cationic Antimicrobial Peptides: Alternatives and/or Adjuvants to Antibiotics Active against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa. *BMC Microbiol* **2019**, *19*, 54, doi:10.1186/s12866-019-1416-8.
193. Zharkova, M.S.; Orlov, D.S.; Golubeva, O.Yu.; Chakchir, O.B.; Eliseev, I.E.; Grinchuk, T.M.; Shamova, O.V. Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics—A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front Cell Infect Microbiol* **2019**, *9*, 128, doi:10.3389/fcimb.2019.00128.
194. Jahangiri, A.; Neshani, A.; Mirhosseini, S.A.; Ghazvini, K.; Zare, H.; Sedighian, H. Synergistic Effect of Two Antimicrobial Peptides, Nisin and P10 with Conventional Antibiotics against Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii and Colistin-Resistant Pseudomonas Aeruginosa Isolates. *Microb Pathog* **2021**, *150*, 104700, doi:10.1016/j.micpath.2020.104700.
195. Kampshoff, F.; Willcox, M.D.P.; Dutta, D. A Pilot Study of the Synergy between Two Antimicrobial Peptides and Two Common Antibiotics. *Antibiotics (Basel)* **2019**, *8*, 60, doi:10.3390/antibiotics8020060.

196. Dobson, A.J.; Purves, J.; Kamysz, W.; Rolff, J. Comparing Selection on *S. Aureus* between Antimicrobial Peptides and Common Antibiotics. *PLoS One* **2013**, *8*, e76521, doi:10.1371/journal.pone.0076521.
197. Yan, H.; Hancock, R.E.W. Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 1558–1560, doi:10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001.
198. Aisenbrey, C.; Amaro, M.; Pospíšil, P.; Hof, M.; Bechinger, B. Highly Synergistic Antimicrobial Activity of Magainin 2 and PGLa Peptides Is Rooted in the Formation of Supramolecular Complexes with Lipids. *Sci Rep* **2020**, *10*, 11652, doi:10.1038/s41598-020-68416-1.
199. Nagaoka, I.; Hirota, S.; Yomogida, S.; Ohwada, A.; Hirata, M. Synergistic Actions of Antibacterial Neutrophil Defensins and Cathelicidins. *Inflamm. Res.* **2000**, *49*, 73–79, doi:10.1007/s000110050561.
200. Chen, X.; Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Okuda, D.; Nagaoka, I.; Ikeda, S.; Okumura, K.; Ogawa, H. Synergistic Effect of Antibacterial Agents Human Beta-Defensins, Cathelicidin LL-37 and Lysozyme against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *J Dermatol Sci* **2005**, *40*, 123–132, doi:10.1016/j.jdermsci.2005.03.014.
201. Berditsch, M.; Jäger, T.; Stempel, N.; Schwartz, T.; Overhage, J.; Ulrich, A.S. Synergistic Effect of Membrane-Active Peptides Polymyxin B and Gramicidin S on Multidrug-Resistant Strains and Biofilms of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59*, 5288–5296, doi:10.1128/AAC.00682-15.
202. Zanetti, M. Cathelicidins, Multifunctional Peptides of the Innate Immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **2004**, *75*, 39–48, doi:10.1189/jlb.0403147.
203. Shamova, O.V.; B, III.O.; Orlov, D.S.; C, O.Д.; Zharkova, M.S.; C, Ж.М.; Balandin, S.V.; B, Б.С.; Yamschikova, E.V.; B, Я.Е.; et al. Minibactenecins ChBac7.N $\alpha$  and ChBac7. N $\beta$  - Antimicrobial Peptides from Leukocytes of the Goat *Capra Hircus*. *Acta Naturae* **2016**, *8*, 136–146, doi:10.32607/20758251-2016-8-3-136-146.
204. Raj, P.A.; Karunakaran, T.; Sukumaran, D.K. Synthesis, Microbicidal Activity, and Solution Structure of the Dodecapeptide from Bovine Neutrophils. *Biopolymers* **2000**, *53*, 281–292, doi:10.1002/(SICI)1097-0282(20000405)53:4<281::AID-BIP1>3.0.CO;2-2.
205. Ghosh, S.; Pandit, G.; Debnath, S.; Chatterjee, S.; Satpati, P. Effect of Monovalent Salt Concentration and Peptide Secondary Structure in Peptide-Micelle Binding. *RSC Adv* *11*, 36836–36849, doi:10.1039/d1ra06772a.
206. Gennaro, R.; Zanetti, M.; Benincasa, M.; Podda, E.; Miani, M. Pro-Rich Antimicrobial Peptides from Animals: Structure, Biological Functions and Mechanism of Action. *Curr Pharm Des* **2002**, *8*, 763–778, doi:10.2174/1381612023395394.
207. Arnold, M.F.F.; Caro-Hernandez, P.; Tan, K.; Runti, G.; Wehmeier, S.; Scocchi, M.; Doerrler, W.T.; Walker, G.C.; Ferguson, G.P. Enteric YaiW Is a Surface-Exposed Outer Membrane Lipoprotein That Affects Sensitivity to an Antimicrobial Peptide. *Journal of Bacteriology* **2014**, *196*, 436–444, doi:10.1128/JB.01179-13.
208. Mardirossian, M.; Sola, R.; Beckert, B.; Valencic, E.; Collis, D.W.P.; Borišek, J.; Armas, F.; Di Stasi, A.; Buchmann, J.; Syroegin, E.A.; et al. Peptide Inhibitors of Bacterial Protein Synthesis with Broad Spectrum and SbmA-Independent Bactericidal Activity against Clinical Pathogens. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 9590–9602, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00665.

209. Apetrei, A.; Asandei, A.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Winterhalter, M.; Luchian, T. Unimolecular Study of the Interaction between the Outer Membrane Protein OmpF from *E. Coli* and an Analogue of the HP(2-20) Antimicrobial Peptide. *J Bioenerg Biomembr* **2010**, *42*, 173–180, doi:10.1007/s10863-010-9273-z.
210. Schmidt, R.; Krizsan, A.; Volke, D.; Knappe, D.; Hoffmann, R. Identification of New Resistance Mechanisms in *Escherichia Coli* against Apidaecin 1b Using Quantitative Gel- and LC–MS-Based Proteomics. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 2607–2617, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00169.
211. Corbalan, N.; Runti, G.; Adler, C.; Covaceuszach, S.; Ford, R.C.; Lamba, D.; Beis, K.; Scocchi, M.; Vincent, P.A. Functional and Structural Study of the Dimeric Inner Membrane Protein SbmA. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195*, 5352–5361, doi:10.1128/JB.00824-13.
212. Marlow, V.L.; Haag, A.F.; Kobayashi, H.; Fletcher, V.; Scocchi, M.; Walker, G.C.; Ferguson, G.P. Essential Role for the BacA Protein in the Uptake of a Truncated Eukaryotic Peptide in *Sinorhizobium Meliloti*. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 1519–1527, doi:10.1128/JB.01661-08.
213. LeVier, K.; Phillips, R.W.; Grippe, V.K.; Roop, R.M.; Walker, G.C. Similar Requirements of a Plant Symbiont and a Mammalian Pathogen for Prolonged Intracellular Survival. *Science* **2000**, *287*, 2492–2493, doi:10.1126/science.287.5462.2492.
214. Domenech, P.; Kobayashi, H.; LeVier, K.; Walker, G.C.; Barry, C.E. BacA, an ABC Transporter Involved in Maintenance of Chronic Murine Infections with *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 477–485, doi:10.1128/JB.01132-08.
215. Panteleev, P.V.; Bolosov, I.A.; Khokhlova, V.A.; Dhanda, G.; Balandin, S.V.; Haldar, J.; Ovchinnikova, T.V. Analysis of Antibacterial Action of Mammalian Host-Defense Cathelicidins and Induction of Resistance to Them in M $\beta$ L-Producing *Pseudomonas Aeruginosa*. *Bull Exp Biol Med* **2022**, *172*, 447–452, doi:10.1007/s10517-022-05411-8.
216. Whelehan, C.J.; Barry-Reidy, A.; Meade, K.G.; Eckersall, P.D.; Chapwanya, A.; Narciandi, F.; Lloyd, A.T.; O’Farrelly, C. Characterisation and Expression Profile of the Bovine Cathelicidin Gene Repertoire in Mammary Tissue. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 128, doi:10.1186/1471-2164-15-128.
217. Yonezawa, A.; Kuwahara, J.; Fujii, N.; Sugiura, Y. Binding of Tachyplesin I to DNA Revealed by Footprinting Analysis: Significant Contribution of Secondary Structure to DNA Binding and Implication for Biological Action. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2998–3004, doi:10.1021/bi00126a022.
218. Zerweck, J.; Strandberg, E.; Kukharenko, O.; Reichert, J.; Bürck, J.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S. Molecular Mechanism of Synergy between the Antimicrobial Peptides PGLa and Magainin 2. *Sci Rep* **2017**, *7*, 13153, doi:10.1038/s41598-017-12599-7.
219. Bolintineanu, D.S.; Kaznessis, Y.N. Computational Studies of Protegrin Antimicrobial Peptides: A Review. *Peptides* **2011**, *32*, 188–201, doi:10.1016/j.peptides.2010.10.006.
220. Lai, J.R.; Huck, B.R.; Weisblum, B.; Gellman, S.H. Design of Non-Cysteine-Containing Antimicrobial Beta-Hairpins: Structure-Activity Relationship Studies with Linear Protegrin-1 Analogues. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12835–12842, doi:10.1021/bi026127d.

221. Schmidt, N.W.; Lis, M.; Zhao, K.; Lai, G.H.; Alexandrova, A.N.; Tew, G.N.; Wong, G.C.L. Molecular Basis for Nanoscopic Membrane Curvature Generation from Quantum Mechanical Models and Synthetic Transporter Sequences. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 19207–19216, doi:10.1021/ja308459j.
222. Schmidt, N.W.; Mishra, A.; Lai, G.H.; Davis, M.; Sanders, L.K.; Tran, D.; Garcia, A.; Tai, K.P.; McCray, P.B.; Ouellette, A.J.; et al. Criterion for Amino Acid Composition of Defensins and Antimicrobial Peptides Based on Geometry of Membrane Destabilization. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 6720–6727, doi:10.1021/ja200079a.
223. Wu, Z.; Cui, Q.; Yethiraj, A. Why Do Arginine and Lysine Organize Lipids Differently? Insights from Coarse-Grained and Atomistic Simulations. *J Phys Chem B* **2013**, *117*, 12145–12156, doi:10.1021/jp4068729.
224. Niu, M.; Chai, S.; You, X.; Wang, W.; Qin, C.; Gong, Q.; Zhang, T.; Wan, P. Expression of Porcine Protegrin-1 in *Pichia Pastoris* and Its Anticancer Activity in Vitro. *Exp Ther Med* **2015**, *9*, 1075–1079, doi:10.3892/etm.2015.2202.
225. Bechinger, B.; Lohner, K. Detergent-like Actions of Linear Amphipathic Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 1529–1539, doi:10.1016/j.bbamem.2006.07.001.
226. Langham, A.A.; Khandelia, H.; Schuster, B.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I.; Kaznessis, Y.N. Correlation between Simulated Physicochemical Properties and Hemolycity of Protegrin-like Antimicrobial Peptides: Predicting Experimental Toxicity. *Peptides* **2008**, *29*, 1085–1093, doi:10.1016/j.peptides.2008.03.018.
227. Safronova, V.N.; Pantelev, P.V.; Sukhanov, S.V.; Toropygin, I.Y.; Bolosov, I.A.; Ovchinnikova, T.V. Mechanism of Action and Therapeutic Potential of the  $\beta$ -Hairpin Antimicrobial Peptide Capitellacin from the Marine Polychaeta *Capitella Teleta*. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 167, doi:10.3390/md20030167.
228. Lee, J.Y.; Yang, S.-T.; Lee, S.K.; Jung, H.H.; Shin, S.Y.; Hahn, K.-S.; Kim, J.I. Salt-Resistant Homodimeric Bactenecin, a Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptide. *The FEBS Journal* **2008**, *275*, 3911–3920, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06536.x.
229. Greenfield, N.; Fasman, G.D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116, doi:10.1021/bi00838a031.
230. Langham, A.A.; Waring, A.J.; Kaznessis, Y. Comparison of Interactions between Beta-Hairpin Decapeptides and SDS/DPC Micelles from Experimental and Simulation Data. *BMC Biochemistry* **2007**, *8*, 11, doi:10.1186/1471-2091-8-11.
231. Hollósi, M.; Majer, Z.; Rónai, A.Z.; Magyar, A.; Medzihradszky, K.; Holly, S.; Perczel, A.; Fasman, G.D. CD and Fourier Transform IR Spectroscopic Studies of Peptides. II. Detection of Beta-Turns in Linear Peptides. *Biopolymers* **1994**, *34*, 177–185, doi:10.1002/bip.360340204.
232. Mantsch, H.H.; Perczel, A.; Hollósi, M.; Fasman, G.D. Characterization of Beta-Turns in Cyclic Hexapeptides in Solution by Fourier Transform IR Spectroscopy. *Biopolymers* **1993**, *33*, 201–207, doi:10.1002/bip.360330202.
233. Chirgadze, Y.N.; Nevskaya, N.A. Infrared Spectra and Resonance Interaction of Amide-I Vibration of the Parallel-Chain Pleated Sheets. *Biopolymers* **1976**, *15*, 627–636, doi:10.1002/bip.1976.360150403.

234. Andrushchenko, V.V.; Vogel, H.J.; Prenner, E.J. Optimization of the Hydrochloric Acid Concentration Used for Trifluoroacetate Removal from Synthetic Peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 37–43, doi:10.1002/psc.793.