

На правах рукописи

Пантелеев Павел Валерьевич

**Структурно-функциональное исследование антимикробных пептидов  
животного происхождения**

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Учебно-научном центре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Доктор химических наук Овчинникова Татьяна Владимировна

**Официальные оппоненты:**

Северин Евгений Сергеевич, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом нанобиотехнологии Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения;

Баратова Людмила Алексеевна, доктор химических наук, профессор, заведующая отделом хроматографического анализа Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Ведущая организация:**

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Защита состоится 2 марта 2016 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Открытие антибиотиков в XX веке произвело революцию в области лечения и профилактики инфекционных заболеваний различной этиологии. Тем не менее, за годы, прошедшие со времени открытия первых антибиотиков, массовое применение этих веществ привело к распространению целого ряда резистентных штаммов патогенных бактерий, причем в отношении большинства антибиотических соединений устойчивость развивается в течение нескольких лет. В связи с этим внутрибольничные бактериальные инфекции все чаще становятся причиной смерти пациентов, подвергающихся инвазивным процедурам, а лечение вновь зараженных пациентов создает дополнительную нагрузку для системы здравоохранения. Для преодоления проблемы резистентности к антибиотикам необходим поиск новых антимикробных соединений, принципиально отличающихся по механизму действия от используемых в настоящее время противoinфекционных средств.

Жизнь многоклеточных организмов во все времена протекала в среде обитания множества патогенов. Система врожденного иммунитета животных обеспечивает немедленную защиту организма в ответ на внедрение патогена благодаря большому числу молекулярных факторов, реализующих рекогносцировочные и эффекторные механизмы ее функционирования. Наряду с множеством белковых факторов врожденного иммунитета, таких как компоненты системы комплемента, лизоцим, лактоферрин, цитокины и другие, особую роль в защите организма от инфекции играют эндогенные антимикробные пептиды (АМП), продуцируемые позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями. В отличие от многих классических антибиотиков, являющихся продуктами вторичного метаболизма, подавляющее большинство АМП синтезируются непосредственно на рибосомах. Изначально АМП, выделенные из гемолимфы насекомых, кожных секретов амфибий и фагоцитов млекопитающих, обратили на себя внимание благодаря способности подавлять рост различных микроорганизмов. По мере обнаружения новых АМП стало очевидно, что эти молекулы являются универсальными и эволюционно древними элементами системы врожденного иммунитета.

Стоит отметить, что АМП обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с традиционными антибиотиками. Для большинства АМП мишенью действия являются мембраны клеток патогенных организмов, а механизмом действия – нарушение их нормальной проницаемости, вплоть до лизиса. По этой причине развитие резистентности патогенов к АМП менее вероятно, так как для этого необходимы изменения в структуре и электрофизиологических свойствах клеточной мембраны. Широкий спектр антибиотического действия, в том числе в отношении резистентных штаммов патогенов, относительно малая вероятность селекции устойчивых к АМП возбудителей инфекционных заболеваний, быстрое и эффективное уничтожение клеток-мишеней позволяют рассматривать эти пептидные соединения как основу для разработки лекарственных средств нового поколения, что особенно актуально на фоне снижения потенциала обычных антибиотиков.

Благодаря небольшому размеру (около 20 а.о.), высокой устойчивости к протеолизу и широкому спектру биологической активности особый интерес в плане практического применения представляют  $\beta$ -спилочные АМП, стабилизированные дисульфидными связями. Однако сравнительно высокая цитотоксичность этих природных пептидов в отношении нормальных клеток млекопитающих ограничивает их дальнейшее использование в медицине. Несмотря на возрастающее в последние годы число

публикаций, посвященных структурно-функциональным исследованиям АМП, закономерности, позволяющие точно прогнозировать биологические свойства и активность этих молекул, пока не выявлены. Более того, оценка вклада конкретного физико-химического параметра (суммарный заряд, гидрофобность, амфифильность и др.) представляет собой непростую задачу, поскольку все они находятся в значительной зависимости друг от друга. Фундаментальные исследования механизмов действия, а также взаимосвязи структуры и функций антимикробных пептидов открывают путь к созданию аналогов, обладающих пониженной токсичностью и более высокой селективностью действия.

## **Цели и задачи работы**

В данной работе было проведено структурно-функциональное исследование ряда АМП животного происхождения с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксические эффекты при использовании этих соединений. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получение рекомбинантных аналогов ряда антимикробных пептидов животного происхождения и сравнительный анализ их биологической активности.
2. Изучение взаимосвязи структуры и биологических свойств  $\beta$ -шпилечных антимикробных пептидов ареницина-1 и тахиплезина-1 с помощью сайт-направленного мутагенеза.
3. Создание менее токсичных аналогов  $\beta$ -шпилечных антимикробных пептидов, сохраняющих высокую антибактериальную активность.
4. Изучение эффектов совместного действия антимикробных пептидов на бактерии.

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

Получены рекомбинантные аналоги ряда антимикробных пептидов животного происхождения (всего 9 пептидов). Разработана эффективная система биотехнологического получения аналогов  $\beta$ -шпилечных АМП с использованием сайт-направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе с целью последующего скрининга на основе биологических свойств. Получен широкий спектр мутантных аналогов (всего 45 пептидов)  $\beta$ -шпилечных АМП ареницина-1 из целоцитозов морского червя *Arenicola marina* и тахиплезина-1 из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Выявлены аминокислотные остатки, оказывающие наиболее существенное влияние на антибактериальные и цитотоксические свойства пептидов. Показана ключевая роль димеризации ареницина-1 в проявлении высокой гемолитической активности пептида. На примере аналогов тахиплезина-1 показано, что изменение амфифильности молекулы путем точечных замен гидрофобных аминокислотных остатков является эффективным способом подавления цитотоксичности, характерной для природных АМП. Практическая значимость данной работы заключается в создании ряда менее токсичных (*in vitro* и *in vivo*) аналогов природных  $\beta$ -шпилечных АМП, сохраняющих высокую антибактериальную активность и мембранолитический механизм действия. Активность полученных аналогов, в ряде случаев превышающая показатели для природного пептида, была подтверждена в экспериментах на клинических изолятах бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам. Кроме того, полученные результаты дают основание полагать, что в будущем значительный практический интерес будет представлять терапия «коктейлями» АМП, действующими в

синергизме друг с другом. С одной стороны, это позволит снизить эффективные дозы индивидуальных АМП и стоимость курса лечения, с другой – свести к минимуму токсическое воздействие на организм пациента.

### **Апробация работы**

Основные материалы диссертации были представлены на VI, VII и VIII Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013, 2015); XXV, XXVI и XXVII Международных зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2013, 2014, 2015); 38-м конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, 2013); программе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса («УМНИК») в РАН» (Москва, 2013); Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014); 14-м Международном конгрессе по белкам, пептидам и аминокислотам (Вена, Австрия, 2015); 5-м Европейском симпозиуме по антимикробным препаратам и проблеме резистентности (Шибеник, Хорватия, 2015).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 130 страницах, содержит 37 рисунков, 8 таблиц и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и библиографический список, включающий 462 ссылки.

## Содержание работы

### Выбор объектов исследования

В ходе работы по поиску новых пептидов системы врожденного иммунитета животных сотрудниками Учебно-научного центра ИБХ РАН совместно с лабораторией общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» был выделен и охарактеризован ряд соединений из морских беспозвоночных и рыб, обладающих антимикробной активностью: ареницины из целомотитов морского кольчатого червя *Arenicola marina*, аципенсины из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* и аурелин из мезоглеи сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. На начальном этапе данной работы с целью сравнительного анализа антимикробного потенциала были получены рекомбинантные аналоги ареницина-1, аципенсина-1 и аурелина, а также ряда известных АМП животного происхождения, относящихся к различным структурным классам:  $\beta$ -шпилечные тахиплезин-1, гомезин и NZ17000; пролин-богатые бактенецин ChVac3.4 и апидаецин 1b; триптофан-богатый тритрптицин. В ходе экспериментов в условиях *in vitro* активность  $\beta$ -шпилечных АМП ареницина-1, тахиплезина-1 и NZ17000 в отношении ряда распространенных бактериальных возбудителей заболеваний на порядок превышала показатели для остальных пептидов. Благодаря высокому антибактериальному потенциалу для дальнейших структурно-функциональных исследований были выбраны АМП ареницин-1 и тахиплезин-1.

### 1. Структурно-функциональное исследование ареницина-1

Для создания терапевтически ценных аналогов ареницина-1 был применен матричный подход, который позволяет путем точечных замен выявить аминокислотные остатки в структуре пептида, обуславливающие высокую токсичность в отношении клеток млекопитающих. Известно, что высокая гидрофобность, характерная для большинства АМП, снижает растворимость пептидов в водных растворах, что приводит к процессам агрегации и неспецифическому связыванию с мембранами любого состава. Так, объект данной работы – ареницин-1 – содержит более 50% гидрофобных аминокислотных остатков, обладает выраженной амфифильностью, которая может усиливаться за счет димеризации пептида при взаимодействии с мембранами и мицеллами.

На первом этапе работы была поставлена задача – создать методику для направленного мутагенеза ареницина-1 и получить с ее помощью набор генно-инженерных конструкций для гетерологической экспрессии аналогов. На стадии планирования эксперимента были разработаны три группы праймеров для амплификации всей плазмиды с помощью «инвертированной» ПЦР: для мутагенеза N-концевой последовательности ареницина-1, области  $\beta$ -изгиба и C-концевого участка пептида. Использование при создании плазмидных конструкций палиндрома CCGCGG (сайт рестрикции SacII), частично кодирующего консервативный для многих  $\beta$ -шпилечных АМП дипептид Arg-Gly в области  $\beta$ -изгиба, позволило проводить сайт-направленный мутагенез центральной части пептидов с дальнейшей циркуляризацией ампликонов по липким концам. В результате анализа особенностей структуры ареницина-1 (R<sup>1</sup>WCVYAYVRV<sup>10</sup>RGVLRVYRRC<sup>20</sup>W<sup>21</sup>) и обобщения литературных данных была выработана стратегия сайт-направленного мутагенеза пептида, основными пунктами которой являлись следующие:

- в ходе сайт-направленного мутагенеза с помощью вырожденного триплета (G,A,C)GC вводили один из трёх остатков (глицин, серин или аргинин);

- в структуре пептида на первом этапе проводились точечные аминокислотные замены;
- замене не подвергались остатки, обеспечивающие стабильность структуры: дипептид Arg<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>, способствующий формированию  $\beta$ -изгиба; остатки Cys<sup>3</sup> и Cys<sup>20</sup>, образующие дисульфидную связь; остатки Tyr<sup>5</sup>, Tyr<sup>7</sup> и Tyr<sup>17</sup>, участвующие в  $\pi$ -катион-взаимодействиях;
- для оценки вклада отдельных аминокислот в суммарную гидрофобность и цитотоксичность проводили замены остатков аланина, валина, лейцина, триптофана на менее гидрофобный глицин или более гидрофильные серин или аргинин;
- для оценки влияния выраженной амфифильности ареницина-1 на уровень цитотоксичности производили замены остатков Val<sup>8</sup>, Val<sup>10</sup>, Val<sup>13</sup>, Val<sup>15</sup>, формирующих гидрофобную поверхность в структуре мономера, на остатки серина и аргинина;
- для оценки роли димеризации ареницина-1 в проявлении цитотоксичности производили замены остатков, входящих в состав N-концевой полупептида.

Все 27 аналогов ареницина-1 с точечными заменами были получены с использованием единой схемы экспрессии и очистки. Разработка схемы проводилась с учетом опыта предшествующих работ по получению других рекомбинантных АМП в Учебно-научном центре ИБХ РАН, а также общих рекомендаций по созданию суперпродуцентов белков на основе *E. coli*. Выбор был сделан в пользу системы, основанной на использовании РНК-полимеразы бактериофага T7 и промотора T7, на экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3), а также на получении гибридного белка, содержащего октагистидиновую последовательность и модифицированный тиоредоксин, обеспечивающих, соответственно, возможность аффинной очистки белка и сверхэкспрессию токсичного для клетки-продуцента продукта в растворимой форме в цитоплазме клетки. С целью упрощения процедуры очистки расщепление гибридного белка проводили путем добавления бромциана непосредственно в элюат после металлохелатной хроматографии, поскольку наличие солей и других компонентов буферов не влияет на эффективность реакции. Очистку целевых пептидов из смеси проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ. Средний выход пептидов составил около 4 мг с 1 л бактериальной культуры. Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов подтверждали с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии.

Для всех пептидов была протестирована антимикробная активность в отношении ряда условно-патогенных грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерий. Эксперименты проводились в богатой питательной среде, а также в присутствии хлорида натрия в физиологической концентрации, которая снижает активность многих природных АМП. Цитотоксическая активность пептидов определялась по способности вызывать лизис человеческих эритроцитов. Оценка селективности действия полученных аналогов была проанализирована путем расчета соответствующих терапевтических индексов (ТИ) – отношения минимальной гемолитической концентрации (МГК) к среднему геометрическому значению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для трех бактериальных культур. Данные о биологической активности ареницина-1 и его аналогов представлены в таблице 1. Тестирование минимальной бактерицидной концентрации (МБК) с высевом содержимого лунок на твердую питательную среду показало, что в большинстве случаев МБК для наиболее активных аналогов совпадает или в два раза превышает значения МИК для соответствующего пептида. Это указывает на бактерицидный, а не бактериостатический механизм действия ареницина-1 и его аналогов.

**Таблица 1. Биологическая активность ареницина-1 и его аналогов**

Пептид	МИК <sup>а</sup> , мкМ			СГ <sup>б</sup> , мкМ	МГК <sup>в</sup> , мкМ	ТИ <sup>г</sup>
	<i>S. aureus</i> , 209P	<i>E. coli</i> , C600	<i>P. aeruginosa</i> , PAO1			
<b>Ареницин-1</b>	<b>6,25</b>	<b>1,56</b>	<b>6,25</b>	<b>3,9</b>	<b>4,1</b>	<b>1,1</b>
W2G	50	12,5	25	25,0	5,5	0,2
W2S	>50	25	25	39,7	5,5	0,1
W2R	>50	12,5	25	31,5	9,4	0,3
V4G	6,25	3,13	6,25	5,0	36,2	7,2
V4S	50	6,25	25	19,8	23,1	1,2
V4R	25	3,13	12,5	9,9	48,5	4,9
A6G	6,25	1,56	3,13	3,1	17,0	5,5
A6S	25	3,13	6,25	7,9	13,9	1,8
A6R	>50	6,25	25	25,0	71,0	2,8
V8G	6,25	1,56	1,56	2,5	6,7	2,7
V8S	3,13	0,8	1,56	1,6	26,8	16,8
V8R	6,25	1,56	1,56	2,5	125,0	50,0
V10G	>50	50	50	63,0	4,9	0,1
V10S	25	3,13	12,5	9,9	4,3	0,4
V10R	3,13	0,8	1,56	1,6	9,5	5,9
V13G	6,25	1,56	1,56	2,5	5,9	2,4
V13S	6,25	1,56	1,56	2,5	9,7	3,9
V13R	6,25	0,8	1,56	2,0	13,7	6,9
L14G	25	6,25	12,5	12,5	4,4	0,4
L14S	25	3,13	25	12,5	3,1	0,2
L14R	6,25	1,56	6,25	3,9	3,1	0,8
V15G	6,25	3,13	6,25	5,0	12,8	2,6
V15S	6,25	1,56	3,13	3,1	24,8	8,0
V15R	12,5	1,56	12,5	6,2	28,3	4,6
W21G	25	25	25	25,0	8,4	0,3
W21S	25	6,25	12,5	12,5	9,2	0,7
W21R	25	6,25	12,5	12,5	10,8	0,9
V8S,V15S	12,5	1,56	12,5	6,3	95,5	15,2
V8R,V15S	25	1,56	25	9,9	120,5	12,2
V8R,V15R	25	3,13	50	15,7	116,0	7,4

<sup>а</sup>МИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; <sup>б</sup>СГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; <sup>в</sup>МГК: минимальная гемолитическая концентрация (концентрация, вызывающая лизис 10% эритроцитов); <sup>г</sup>ТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. большие значения соответствуют большей селективности препарата. В случаях, когда МИК была >50 мкМ при расчете СГ использовали значение 100 мкМ.

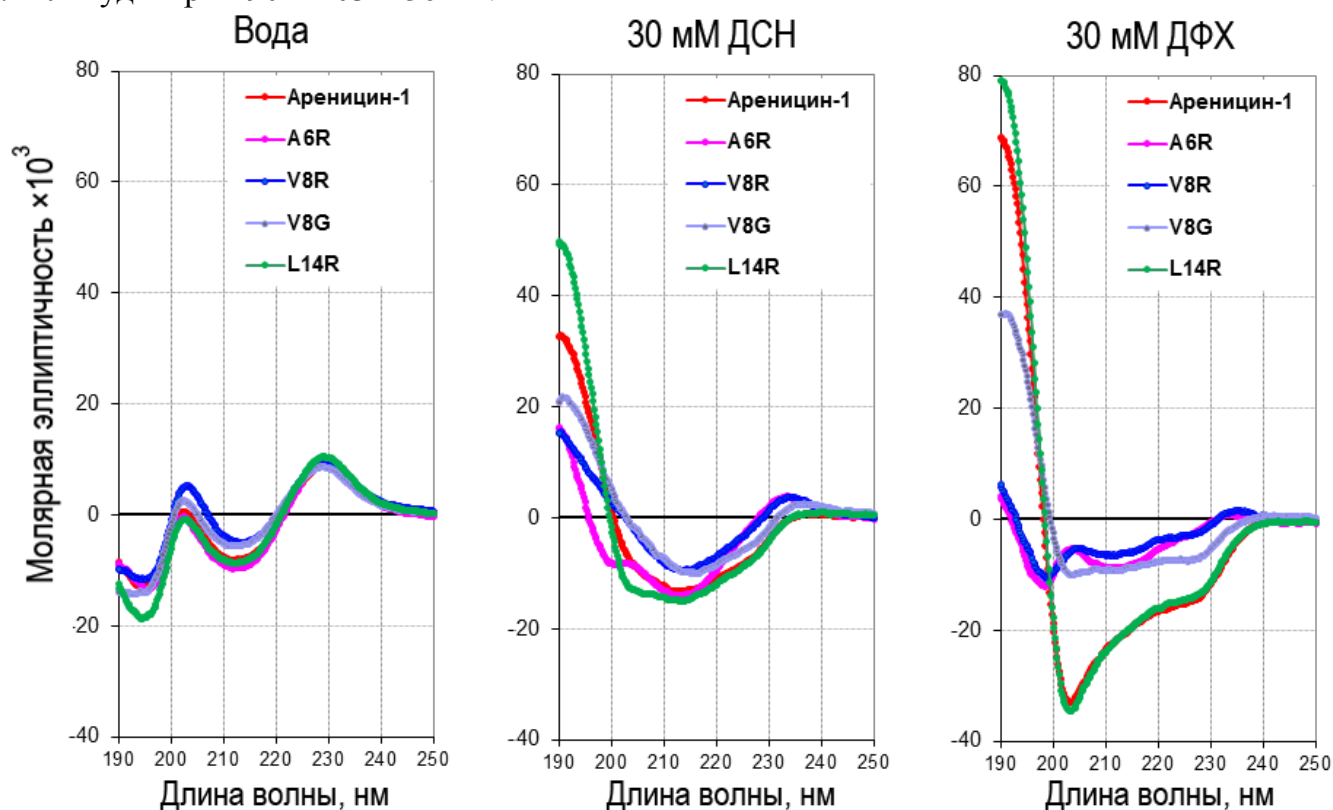
Рекомбинантный аналог природного ареницина-1 продемонстрировал выраженные гемолитические свойства. Низкая селективность действия ареницина-1 на мембраны клеток приводит к тому, что расчетный терапевтический индекс пептида имеет значение около 1. Учитывая наличие у ареницина-1 скрученной β-шпильчатой структуры, гидрофобность его аналогов оценивали не расчетными методами, а по времени удерживания на аналитической колонке ОФ-ВЭЖХ. Сравнительный анализ гемолитической активности аналогов, а также их общей гидрофобности приведен на рисунке 1.



**Рисунок 1. Сравнительный анализ гемолитической активности ареницина-1 и его аналогов при концентрации 100 мкМ и их времен удерживания на ОФ-ВЭЖХ колонке, соответствующих общей гидрофобности пептидов.**

Остатки Trp<sup>2</sup> и Trp<sup>21</sup> играют важную роль в реализации механизма действия ареницина-1 на бактериальные клетки, поскольку их замена приводит в большинстве случаев к снижению активности в 4 раза. Напротив, гемолитическая активность после таких замен снижается незначительно, несмотря на максимальное сокращение времени удерживания на хроматографической колонке среди всех проанализированных в работе аналогов (Рис. 1). Замены алифатических остатков в структуре различным образом влияют на биологические свойства пептида. Важно отметить, что гемолитическая активность снижается для большинства аналогов во всём диапазоне измеряемых концентраций. Исключение составляет остаток Leu<sup>14</sup>, замена которого не нарушает способность лизировать эритроциты, однако снижает антибактериальную активность. Данный факт, как и в случае с остатками триптофана, наводит на мысль, что общая гидрофобность пептида в меньшей степени влияет на гемолитическую активность по сравнению с выраженной амфифильностью и склонностью к димеризации. Введение остатка глицина, как правило, не снижало антимикробный потенциал пептида, что свидетельствует о жесткости пространственной структуры АМП. Менее толерантной к подобным заменам является область β-изгиба, поскольку аналог V10G практически потерял антимикробные свойства при сохранении гемолитических. Это может свидетельствовать о значительных различиях в механизме действия ареницина на бактерии и клетки млекопитающих. Введение остатков аргинина или серина в гидрофобную область, формируемую четырьмя остатками валина в положениях 8, 10, 13 и 15 пептида, в большинстве случаев приводило к увеличению антимикробной активности. Данный эффект может быть связан с повышением растворимости пептида, снижением агрегации в водных растворах и повышением способности проникать через внешнюю мембрану и клеточную стенку бактерий к бислою цитоплазматической мембраны. Максимальное значение ТИ (50,0) было достигнуто для аналога V8R, поскольку данная замена приводила как к повышению антимикробной активности, так и к практически полному отсутствию гемолитических свойств даже при концентрации 100 мкМ. Замены Val<sup>4</sup> и Ala<sup>6</sup> на остаток аргинина аналогичным образом приводили к подавлению гемолитической активности, однако, вместе с тем, снижался и антимикробный эффект пептидов. Среди всех протестированных пептидов лишь аналоги с точечными заменами Val<sup>4</sup>, Ala<sup>6</sup>, Val<sup>8</sup> на остаток аргинина сохраняли значительную толерантность к эритроцитам при повышении концентрации до 50–100 мкМ (Рис. 1). При

этом не наблюдалось корреляции между общей гидрофобностью молекулы и способностью лизировать эритроциты. Важно отметить, что все три остатка (Val<sup>4</sup>, Ala<sup>6</sup>, Val<sup>8</sup>) располагаются на N-полуцепях апеницина, при взаимодействии которых в присутствии мицелл цвиттерионного додецилфосфохолина (ДФХ) образуется ассиметричный димер по типу CN $\uparrow\uparrow$ NC. Полученные данные позволили высказать предположение о том, что наибольшее влияние на гемолитическую активность природных апеницинов оказывает димеризация пептидов на поверхности мембран, которая, как было показано ранее, сопровождается разворачиванием  $\beta$ -шпилек и формированием выраженной амфифильной структуры. Для проверки данной гипотезы методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) была проанализирована вторичная структура апеницина-1 и ряда его аналогов (Рис. 2). Важно отметить, что димеризация апеницина в мицеллах ДФХ сопровождается появлением характерного КД-спектра с возрастанием амплитуды при 190 и 203–230 нм.

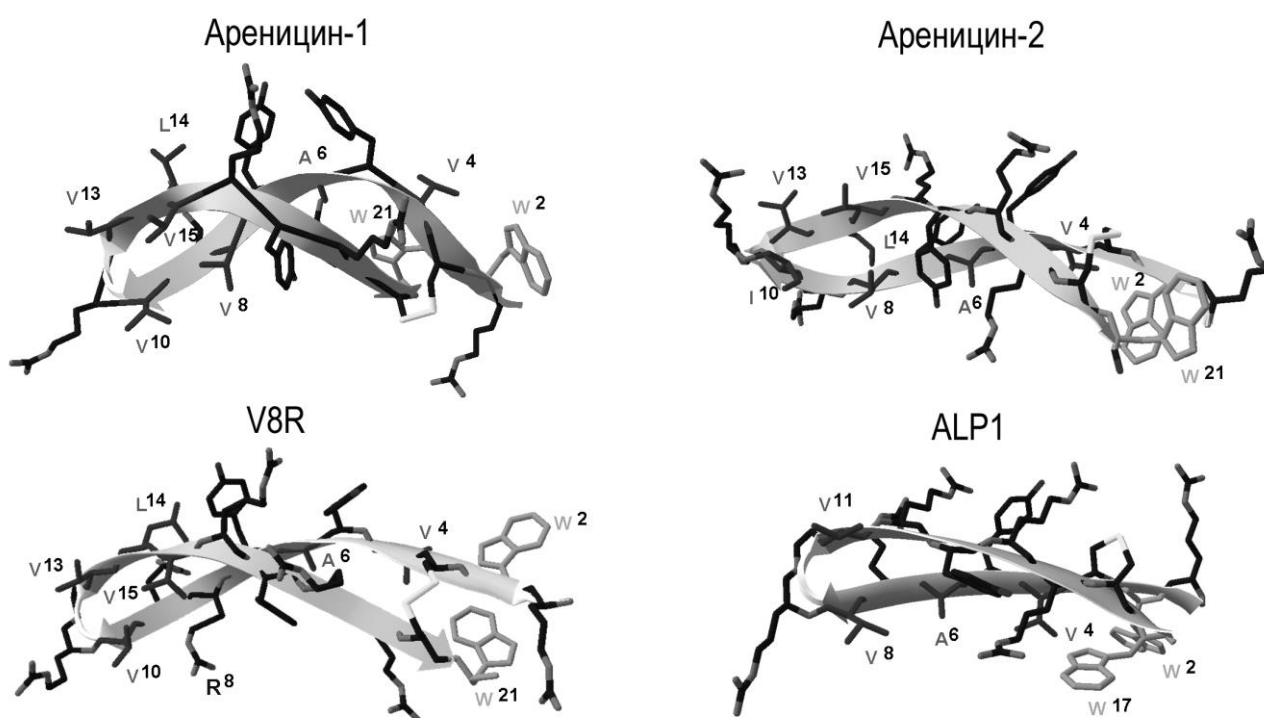


**Рисунок 2.** Спектры кругового дихроизма апеницина-1 и его аналогов в воде, мицеллах додецилсульфата натрия (ДСН) и мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ).

Исходя из биологических свойств, для исследования был отобран ряд пептидов: апеницин-1 (сильный антибиотик, сильный гемолитик), L14R (сильный антибиотик, сильный гемолитик), V8G (сильный антибиотик, умеренный гемолитик), V8R (сильный антибиотик, слабый гемолитик), A6R (слабый антибиотик, слабый гемолитик). Спектры для приведенных выше пептидов были сняты в воде, мицеллах ДСН (имитирующих отрицательно заряженные мембраны бактерий) и мицеллах ДФХ (имитирующих цвиттерионные мембраны клеток млекопитающих). Форма кривой КД-спектра для всех аналогов в воде была идентичной таковой у природного апеницина-1, что говорит об отсутствии влияния точечных замен на пространственную структуру пептида. В присутствии мицелл ДФХ пептиды, обладающие гемолитическими свойствами (ареницин-1, L14R, V8G), имели КД-спектр, характерный для димера. В ходе анализа гемолитически неактивных аналогов (A6R и V8R), напротив, было показано изменение конформации

пептидов по сравнению с ареницином-1, сопровождающееся значительными изменениями кривой КД-спектра. Форма этих спектров в большей степени напоминала таковую для водного раствора, в котором ранее было показано преобладание пептида в виде мономера. Интересно, что структурно близкие в воде и в отрицательно заряженных мицеллах ДСН аналоги V8G и V8R обладают идентичной антибактериальной активностью, однако значительно различаются по гемолитическим свойствам и структуре в мицеллахДФХ.

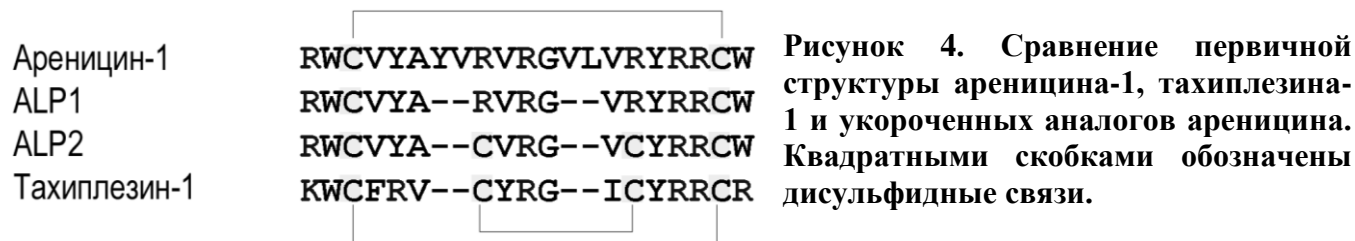
С целью изучения пространственной структуры методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии наиболее селективного аналога V8R, а также исследования процесса димеризации в мембрано-имитирующих средах был получен его рекомбинантный аналог, тотально меченный стабильным изотопом  $^{15}\text{N}$ . Трансформированные клетки *E. coli* BL21 Star (DE3) культивировали в бедной среде M9, содержащей  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  в качестве единственного источника азота. Выход пептида составил 7,5 мг с 1 л бактериальной культуры. Совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН была исследована пространственная структура аналога в воде, а также в растворе, содержащем мицеллыДФХ. Полученные результаты подтвердили высказанные ранее предположения: пространственная структура аналога в воде практически идентична природным ареницинам и представляет скрученную  $\beta$ -шпильку (Рис. 3); в отличие от природного ареницина, переходящего в форму амфифильного димера, аналог V8R существует преимущественно в виде мономера в присутствии нейтральных мицеллДФХ.



**Рисунок 3. Пространственные структуры ареницина-1 (PDB 2JSB), ареницина-2 (PDB 2JNI), аналога V8R, установленные методом ЯМР-спектроскопии, а также модель укороченного аналога ареницина ALP1.**

Еще одним важным структурным параметром, обуславливающим селективность мембрано-активных катионных АМП в отношении бактерий, является длина молекулы. Обобщая результаты целого ряда исследований, можно сделать основной вывод: слишком малый размер молекулы АМП не позволяет формировать стабильную вторичную структуру и эффективно взаимодействовать с мембраной клетки-мишени, в то время как избыточная длина ведет к снижению селективности действия на мембраны из-за более высокой вероятности агрегации пептида. Подход, связанный с изменением длины пептида,

был использован в отношении природного ареницина-1. В качестве матрицы при дизайне укороченных аналогов использовали структуру высокоактивного  $\beta$ -спилечного АМП тахиплезина-1 (Рис. 4). Таким образом, одновременно из N- и C-полуцепей ареницина-1 были удалены по два аминокислотных остатка (Tyr<sup>7</sup>, Val<sup>8</sup> и Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup>), что позволило значительно снизить долю гидрофобных остатков в структуре пептида, названного ALP1 (arenicin-like peptide).



На основе сконструированной плазмиды, предназначенной для экспрессии ALP1, методом направленного мутагенеза были синтезированы шесть генно-инженерных конструкций для биотехнологического получения аналогов укороченного пептида. Все укороченные рекомбинантные аналоги, состоящие из 17 остатков, были получены согласно вышеописанному методу. Средний выход целевых пептидов составил около 9 мг с 1 л бактериальной культуры. В структуру пептида ALP2 была введена вторая дисульфидная связь по аналогии со структурой тахиплезина. В остальных случаях проводили замены гидрофобных остатков Tyr<sup>5</sup>, Ala<sup>6</sup>, Val<sup>8</sup>, Val<sup>11</sup>, Trp<sup>17</sup> на остаток аргинина. Результаты тестирования биологической активности аналогов представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Биологическая активность укороченных аналогов ареницина-1**

Пептид	МИК <sup>а</sup> , мкМ			СГ <sup>б</sup> , мкМ	МГК <sup>в</sup> , мкМ	ТИ <sup>г</sup>
	<i>S. aureus</i> , 209P	<i>E. coli</i> , C600	<i>P. aeruginosa</i> , PAO1			
Ареницин-1	6,25	1,56	6,25	3,9	4,1	1,1
ALP1	1,56	0,8	6,25	2,0	68	34,0
ALP2	3,13	0,8	3,13	2,0	10	5,0
ALP3 (W17R)	3,13	3,13	6,25	3,9	110	28,2
ALP4 (V11R)	3,13	3,13	25	6,3	50	7,9
ALP5 (V8R)	3,13	3,13	50	7,9	73	9,2
ALP6 (A6R)	50	12,5	50	31,5	65,5	2,1
ALP7 (Y5R)	1,56	1,56	12,5	3,13	88	28,1

<sup>а</sup>МИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; <sup>б</sup>СГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; <sup>в</sup>МГК: минимальная гемолитическая концентрация (концентрация, вызывающая лизис 10% эритроцитов); <sup>г</sup>ТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. бóльшие значения соответствуют бóльшей селективности препарата.

Сокращение длины пептида позволило не только повысить активность ALP1 в среднем в два раза, но и снизить цитотоксичность в отношении эритроцитов более чем на порядок. Как результат, терапевтический индекс полученного аналога составил 34,0. Введение дополнительной дисульфидной связи путем замены остатков Arg<sup>6</sup> и Arg<sup>12</sup> на цистеины практически не повлияло на антимикробные свойства пептида, однако значительно усилило гемолитическую активность (Рис. 5). Согласно данным спектроскопии КД удаление четырех остатков из последовательности ареницина-1 не оказало влияния на пространственную структуру пептида в воде, поскольку для ALP1 наблюдалась аналогичная форма КД-спектра.

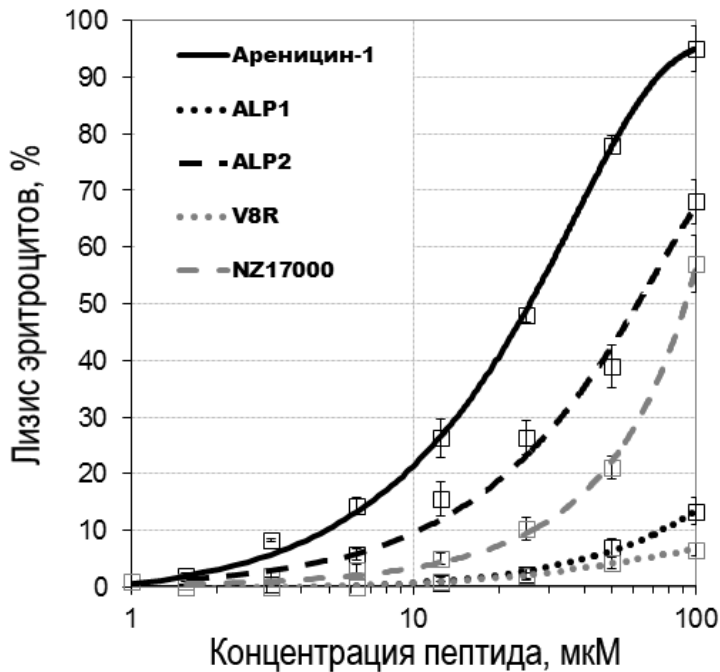
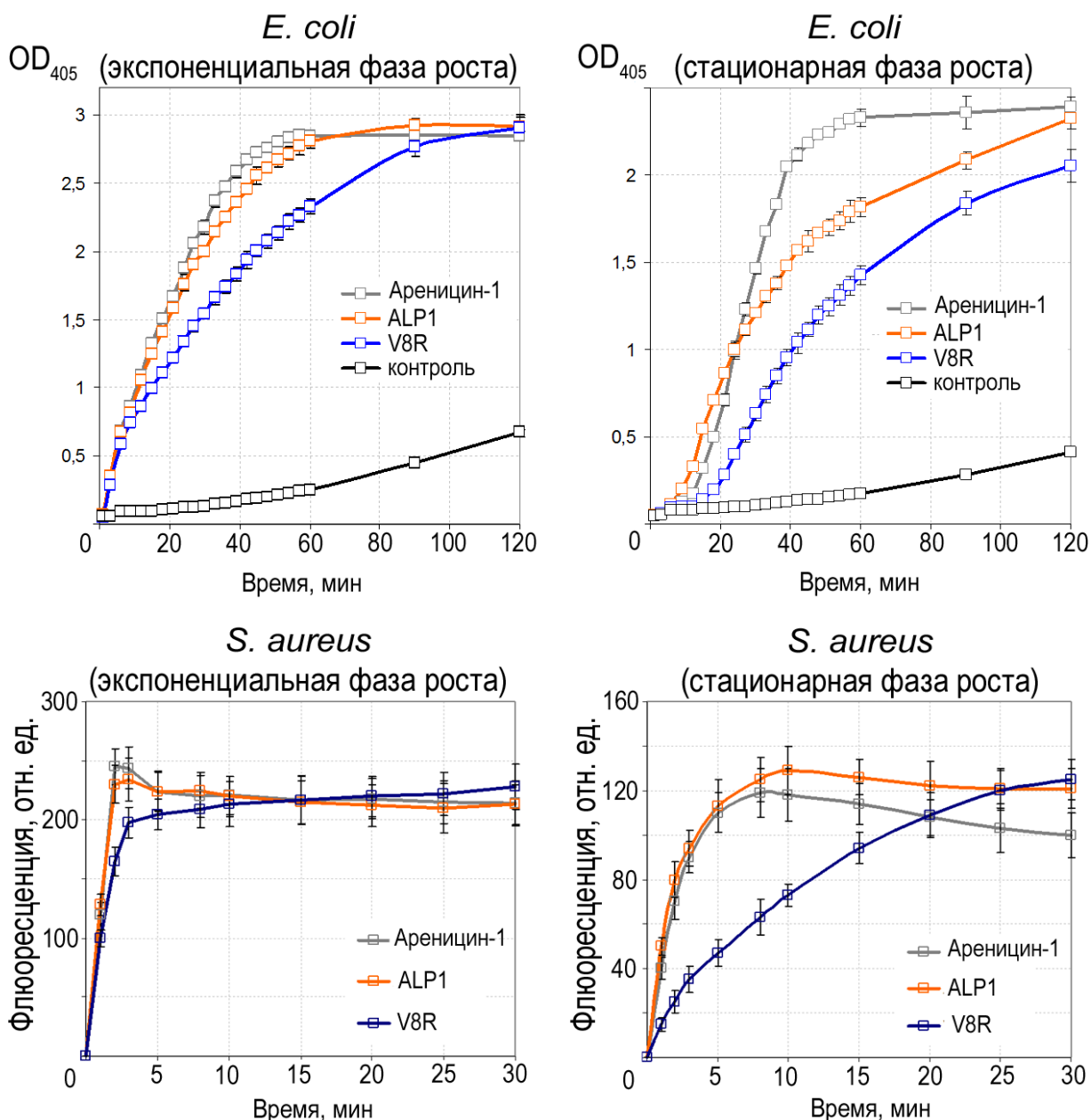


Рисунок 5. Сравнение гемолитической активности ареницина-1, NZ17000, укороченных производных ALP1 и ALP2, полноразмерного аналога V8R.

Далее была проанализирована способность ареницина-1 и укороченных аналогов связываться с ДНК – внутриклеточной мишенью для ряда катионных АМП. С этой целью смеси пептида с ДНК инкубировались в различных массовых соотношениях и далее подвергались электрофоретическому разделению. Подобно тахиплезину-1, который способен эффективно связываться с двухцепочечной ДНК, локализуясь в её малой бороздке, ареницин-1 и его аналоги взаимодействовали с плазмидной ДНК и снижали ее электрофоретическую подвижность при равном массовом соотношении ДНК и пептида. Для всех пептидов наблюдалось снижение эффективности связывания в растворах с повышенной ионной силой, что говорит об электростатической природе взаимодействий между АМП и ДНК.

На следующем этапе сравнивалась способность ареницина-1 и его аналогов нарушать целостность мембран бактерий в режиме реального времени. Для оценки действия АМП на грамотрицательные бактерии использовали штамм *E. coli* ML-35p, конститутивно синтезирующий фермент β-галактозидазу, функционирующий в цитоплазме клетки. Рост проницаемости цитоплазматической мембраны оценивался по накоплению хромогенного продукта реакции гидролитического расщепления β-галактозидазой субстрата ONPG после попадания последнего внутрь клетки. В случае с грамположительными клетками *S. aureus* использовали флюориметрический подход: под действием АМП происходит нарушение целостности мембраны, что приводит к взаимодействию ДНК и интеркалирующего красителя SYTOX Green (Рис. 7). Известно, что не все катионные АМП способны с одинаковой эффективностью убивать клетки-мишени, находящиеся в различных физиологических состояниях. Переход в стационарную фазу роста приводит к изменению структуры мембран, а также подавлению аэробного метаболизма у бактерий и, следовательно, снижению трансмембранного потенциала – одного из ключевых факторов, определяющих селективность катионных АМП в отношении бактериальных клеток. Ареницин-1 и ALP1 вызывали максимальную проницаемость мембраны *S. aureus* в течение 5–10 мин независимо от физиологического состояния клеток. Все пептиды проявили высокую и сопоставимую друг с другом активность в отношении метаболически активных клеток *E. coli*, в том числе, в присутствии солей в повышенной концентрации. Аналог ALP1 продемонстрировал идентичный природному пептиду характер действия на все бактериальные клетки, что говорит о сохранении механизма действия, несмотря на уменьшение длины молекулы.



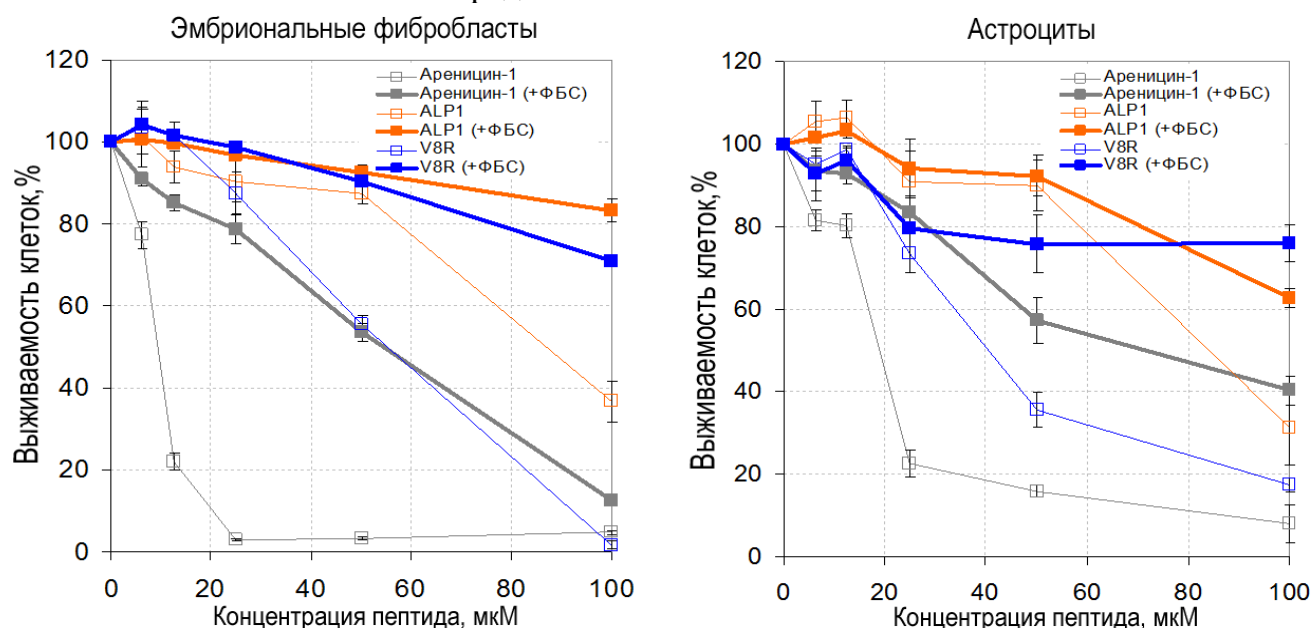
**Рисунок 7. Кинетика повышения проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий под действием ареницина-1 и его аналогов V8R и ALP1.**

Для целого ряда  $\beta$ -спилечных АМП ранее была показана способность убивать бактериальные клетки вне зависимости от наличия у них устойчивости к классическим антибиотикам, что свидетельствует об отсутствии кросс-резистентности к АМП. Для подтверждения данного эффекта ареницин-1 и ряд наиболее активных аналогов был протестирован в отношении метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA), а также клинических изолятов грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), обладающих устойчивостью к широкому спектру антибиотиков (Таблица 3). В качестве молекул сравнения использовали  $\beta$ -спилечные рекомбинантные АМП тахиплезин-1 и NZ17000. Стоит отметить, что NZ17000 относится к числу наиболее активных среди известных АМП, а его модифицированные аналоги были запатентованы фармацевтической компанией Adenium Biotech и в настоящее время проходят предклинические испытания в качестве антибиотиков широкого спектра действия. Разработанные аналоги ареницина-1 показали высокую активность в отношении всех культур, которая в ряде случаев была сопоставима с активностью референсных АМП.

**Таблица 3. Антимикробная активность ареницина-1 и его аналогов в отношении MRSA и мультирезистентных (MDR, multidrug-resistant) штаммов грамотрицательных бактерий**

	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ						
	MRSA	MDR <i>E.coli</i>		MDR <i>P. aeruginosa</i>		MDR <i>K. pneumoniae</i>	
		-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl
Тахиплезин-1	0,06	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0
Ареницин-1	0,25	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	2,0
ALP1	0,06	1,0	0,5	2,0	4,0	1,0	2,0
ALP2	0,12	1,0	0,5	2,0	2,0	1,0	2,0
V8R	0,25	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
NZ17000	н.д.	0,25	0,25	0,5	1,0	1,0	1,0

По сравнению с аналогами V8R и ALP1 природный ареницин-1 вызывал более выраженный цитотоксический эффект в отношении нормальных клеток млекопитающих – эмбриональных фибробластов и астроцитов (Рис. 8). Гибель 50% обоих типов клеток происходила при концентрации 50 мкМ в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). В отсутствие сыворотки аналогичный эффект достигался уже при концентрации менее 20 мкМ. Было показано, что снижение активности в присутствии ФБС является результатом связывания пептидов с компонентами сыворотки крови, а не действия протеаз, входящих в состав ФБС. Стоит отметить, что аналог ALP1 при концентрации, достигающей 50 мкМ, практически не оказывал влияния на жизнеспособность клеток вне зависимости от наличия ФБС в среде.



**Рисунок 8. Цитотоксическое действие ареницина-1 и его аналогов на нормальные клетки млекопитающих *in vitro*. ФБС – 10% фетальная бычья сыворотка.**

Исследование острой токсичности пептидов на мышах CD-1 проводилось совместно с лабораторией биологических испытаний ФИБХ РАН. Значения ЛД<sub>50</sub> для ареницина-1 находились в диапазоне от 15 до 22,5 мг/кг. ЛД<sub>50</sub> для аналога V8R составило 45 мг/кг. Значения ЛД<sub>50</sub> для аналога ALP1 лежали в диапазоне от 30 до 45 мг/кг. Полученные данные согласуются с результатами вышеописанных экспериментов *in vitro* на клеточных линиях и позволяют предварительно отнести аналоги V8R и ALP1 к 3-му классу токсичности (20 > ЛД<sub>50</sub> > 700 мг/кг) для мышей CD-1.

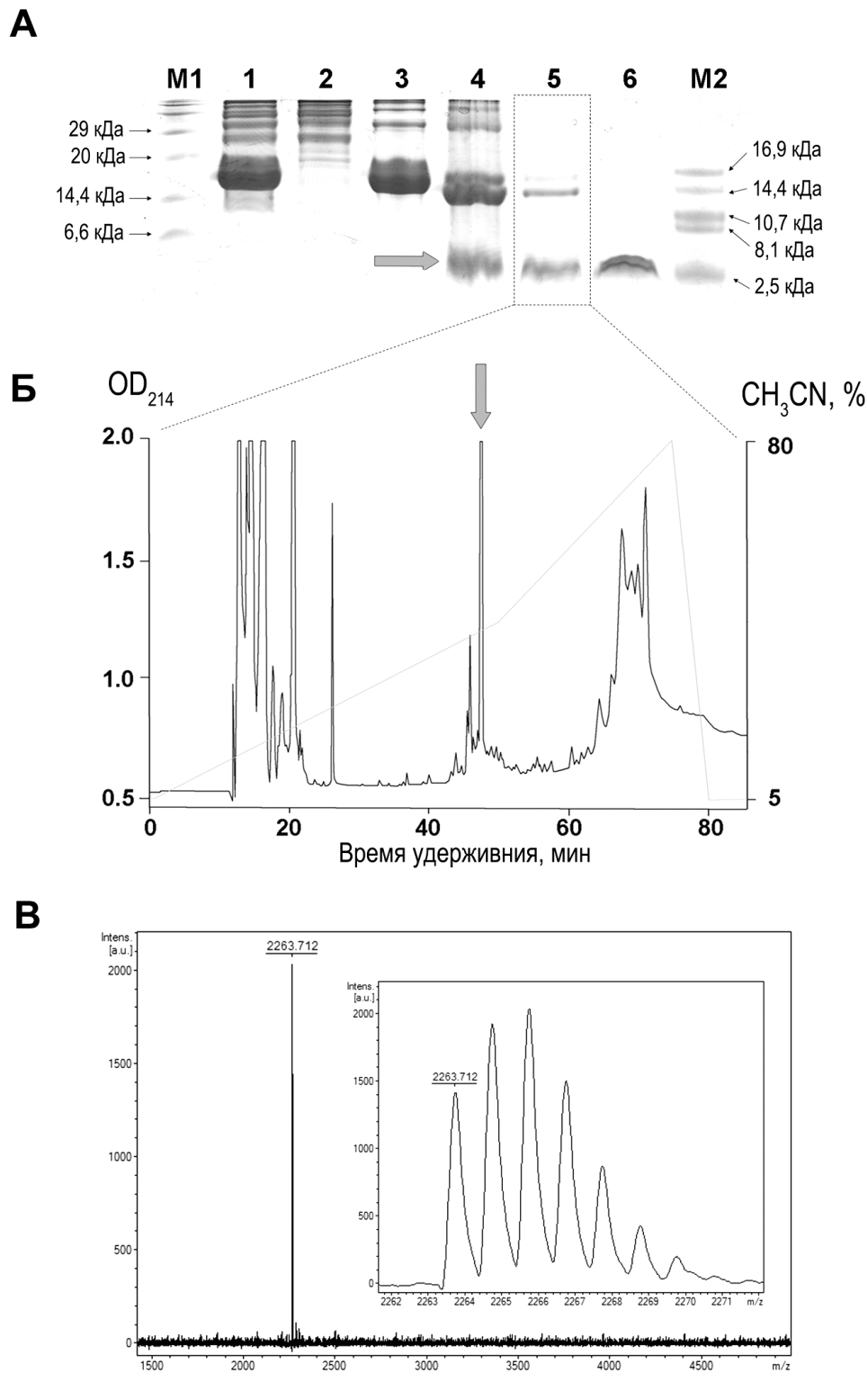
## 2. Структурно-функциональное исследование тахиплезина-1

Ранее из гемоцитов подковообразного краба *Tachypleus tridentatus* были выделены три изоформы катионных АМП, стабилизированных двумя дисульфидными связями и названных тахиплезинами. По своей структуре тахиплезины относятся к  $\beta$ -шпилечным АМП. Они входят в число наиболее активных АМП животного происхождения, вызывающих нарушение целостности бактериальных мембран, что было подтверждено нами в ходе предварительных экспериментов с рекомбинантным аналогом тахиплезина-1. Однако, в отличие от асеницинов и протегринов, механизм действия этих пептидов не связан с олигомеризацией и формированием стабильных пор. Ранее было показано, что при повышении концентрации цвиттерионного ДФХ в мицеллярном растворе тахиплезин-1 формирует обширную гидрофобную поверхность из двух цистинов и остатков Trp<sup>2</sup>, Val<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>. Было высказано предположение, что выраженная амфифильность тахиплезина-1 может быть причиной его высокой гемолитической активности, которая проявляется в значительных повреждениях эритроцитов даже при концентрации пептида 20 мкМ. В ходе дизайна аналогов тахиплезина-1 использовался разработанный ранее подход:

- замене не подвергались участки полипептидной цепи и отдельные аминокислотные остатки, обеспечивающие стабильность структуры, в том числе: дипептид Arg<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>, способствующий формированию  $\beta$ -изгиба, а также остатки Cys<sup>3</sup>, Cys<sup>7</sup>, Cys<sup>12</sup> и Cys<sup>16</sup>, образующие две дисульфидные связи;
- в консервативном для ряда  $\beta$ -шпилечных АМП участке Tyr-Arg-Arg, равно как и в ЛПС-связывающем N-концевом пентапептиде Lys-Trp-Cys-Phe-Arg, замены не проводились;
- заменам подвергались гидрофобные остатки Val<sup>6</sup>, Tyr<sup>8</sup>, Ile<sup>11</sup>, обуславливающие выраженную амфифильность пептида при контакте с мицеллами ДФХ.

Рекомбинантный тахиплезин-1 и ряд его аналогов были получены способом, сочетающим сайт-направленный мутагенез и гетерологическую экспрессию, с конечным выходом ~6-7 мг с 1 л бактериальной культуры. Для упрощения процедуры дальнейшего скрининга аналогов была поставлена задача оптимизации технологии их получения. Несмотря на то, что тиоредоксин обычно используется в качестве белка-носителя, увеличивающего растворимость целевого продукта в клетках *E. coli*, гибридные белки, содержащие  $\beta$ -шпилечные АМП, способны накапливаться в нерастворимой форме даже в ходе экспрессии при пониженной температуре. Данный эффект был показан ранее и использован нами для упрощения процедуры очистки гибридного белка, содержащего аминокислотную последовательность тахиплезина-1, за счет его преимущественного накопления в нерастворимой форме. Для увеличения выхода конечного продукта культивирование клеток-продуцентов проводили до достижения высоких значений оптической плотности бактериальной культуры. В ходе предварительных экспериментов по оптимизации условий экспрессии был достигнут максимальный выход белка в нерастворимой форме, равный ~1 мг с 1 мл культуры клеток. Отмывка нерастворимых в лизирующем буфере агрегатов позволила получить достаточно чистую фракцию, обогащенную гибридным белком и подходящую для прямого расщепления после солиubilизации в 6 М гуанидине. Таким образом, из процедуры очистки гибридного белка удалось исключить стадию аффинной хроматографии.

После расщепления гибридного белка бромцианом для снижения нагрузки на колонку ОФ-ВЭЖХ перед финальной очисткой большая часть белка-носителя была удалена путем селективного осаждения из реакционной смеси 10% трифторуксусной кислотой (Рис. 9).



**Рисунок 9.** Экспрессия и очистка рекомбинантного тахиплезина-1 по упрощенной методике. **А** – контроль экспрессии и очистки тахиплезина-1 с помощью ПААГ-электрофореза в присутствии мочевины (M1, M2 – смеси белков-стандартов молекулярных масс, 1 – суммарный клеточный лизат после индукции IPTG, 2 – растворимая фракция клеточного лизата, 3 – отмытая нерастворимая фракция клеточного лизата, 4 – нерастворимая фракция, содержащая гибридный белок, после расщепления бромцианом, 5 – реакционная смесь после осаждения белков, 6 – элюат ОФ-ВЭЖХ), **Б** – ОФ-ВЭЖХ очистка тахиплезина-1, **В** – МАЛДИ масс-спектрометрический анализ фракции ОФ-ВЭЖХ, соответствующей целевому пептиду. Стрелкой на электрофореграмме и хроматограмме отмечен рекомбинантный тахиплезин-1.

Стоит отметить, что использование в качестве белка-носителя кетостероидизомеразы, способствующей накоплению продукта в составе телец включения, приводило к высокому уровню экспрессии, однако на стадии обработки ТФУ происходило неселективное соосаждение большей части тахиплезина-1.

Процесс очистки контролировался с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза в трис-трициновой буферной системе, содержащей 6 М мочевины (Рис. 9А). Полученная фракция ОФ-ВЭЖХ (Рис. 9Б) анализировалась с помощью автоматического микросеквенирования и МАЛДИ масс-спектрометрии (Рис. 9В). Экспериментальное значение  $m/z$  моноизотопного иона (2263,71) соответствовало расчетному значению молекулярной массы протонированного иона целевого пептида, содержащего две дисульфидные связи (2264,10 Да). Корректность замыкания дисульфидных связей (С1-С4, С2-С3) была доказана путем гидролиза трипсином, с последующим разделением на аналитической ОФ-ВЭЖХ колонке и анализом фракций с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Данный подход позволил получить около 17 мг целевого пептида с 1 л бактериальной культуры. Идентичность полученного рекомбинантного аналога и природного тахиплезина-1 была доказана с помощью спектроскопии КД и анализа биологической активности. Данные об исследовании биологических свойств полученных аналогов тахиплезина-1 представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Биологическая активность тахиплезина-1 и его аналогов**

Пептид	Аминокислотная последовательность	МИК <sup>а</sup> , мкМ			СГ <sup>б</sup> , мкМ	МГК <sup>в</sup> , мкМ	ТИ <sup>г</sup>
		<i>S. aureus</i> 209P	<i>E. coli</i> C600	<i>P. aeruginosa</i> PAO1			
Полимиксин В	-	6,25	0,4	1,56	1,56	н.д.	н.д.
Тахиплезин-1	KWCFRVCYRGICYRRCR	1,56	0,8	1,56	1,24	12	9,7
V6S	KWCFRSCYRGICYRRCR	6,25	1,56	12,5	4,96	280	56,5
V6R	KWCFRRCYRGICYRRCR	>50	1,56	>50	25,0	200	8,0
Y8S	KWCFRVC <sup>S</sup> RGICYRRCR	3,13	0,8	3,13	1,97	310	157,4
Y8R	KWCFRVCR <sup>R</sup> RGICYRRCR	3,13	1,56	6,25	3,13	195	62,4
I11S	KWCFRVCYRG <sup>S</sup> CYRRCR	3,13	0,8	3,13	1,97	190	96,4
I11R	KWCFRVCYRG <sup>R</sup> CYRRCR	1,56	1,56	6,25	2,48	80	32,3
[+Z]	<sup>Z</sup> KWCFRVCYRGICYRRCR	1,56	0,8	1,56	1,24	39	31,5
[+Z,-R]	<sup>Z</sup> KWCFRVCYRGICYRRC	3,13	3,13	3,13	3,13	43	13,7

<sup>а</sup>МИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; <sup>б</sup>СГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; <sup>в</sup>МГК: минимальная гемолитическая концентрация (вызывающая лизис 2% эритроцитов); <sup>г</sup>ТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. большие значения соответствуют большей селективности препарата. \*н.д. – нет данных

Рекомбинантный тахиплезин-1 продемонстрировал высокую антибактериальную активность, сопоставимую с полимиксином В, а также вызывал лизис около 30% эритроцитов в суспензии при концентрации 100 мкМ, что соответствует литературным данным для природного пептида. В данной работе с целью создания менее токсичных аналогов был использован рациональный дизайн, учитывающий особенности строения тахиплезина-1 при контакте с нейтральными мицеллами, имитирующими мембрану клеток млекопитающих. Как и ожидалось, замена остатка Val<sup>6</sup> или Tyr<sup>8</sup>, каждый из которых вовлечен в формирование обширной гидрофобной поверхности при контакте с мицеллами

ДФХ, на полярный остаток приводила к практически полной потере гемолитических свойств (Рис. 10).

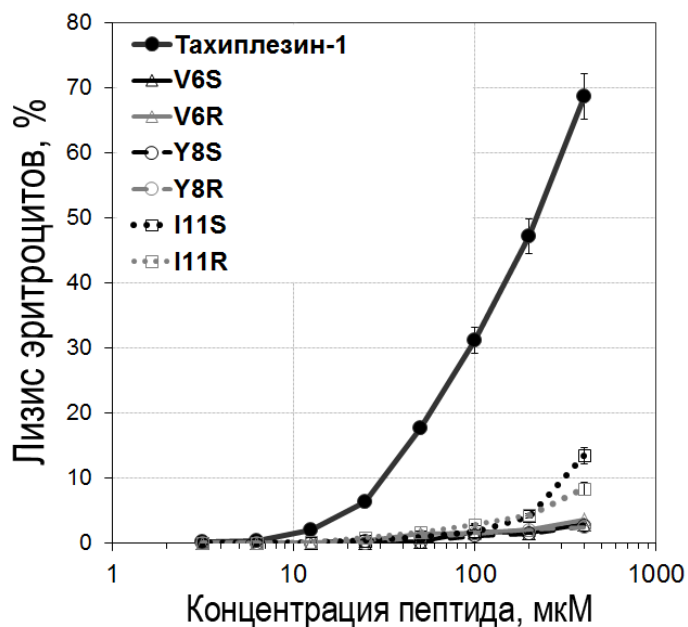


Рисунок 10. Гемолитическая активность тахиплезина-1 и его аналогов.

Изменение амфифильных свойств тахиплезина-1 позволило создать аналоги Y8S и I11S, которые в значительной степени сохранили антимикробный потенциал природной молекулы при увеличении терапевтического индекса в 16 и 10 раз, соответственно. Рекомбинантный тахиплезин-1 и его аналог с аминокислотной заменой I11S вызывали быстрое разрушение мембран грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток независимо от их физиологического состояния, действуя аналогично ареницину-1. Тахиплезин-1 вызывал гибель 50% астроцитов и фибробластов уже при концентрации 20–40 мкМ как в присутствии, так и в отсутствие ФБС в среде (Рис. 11). Важно отметить, что наиболее перспективный с практической точки зрения аналог I11S продемонстрировал низкую цитотоксичность при повышении концентрации вплоть до 50 мкМ.

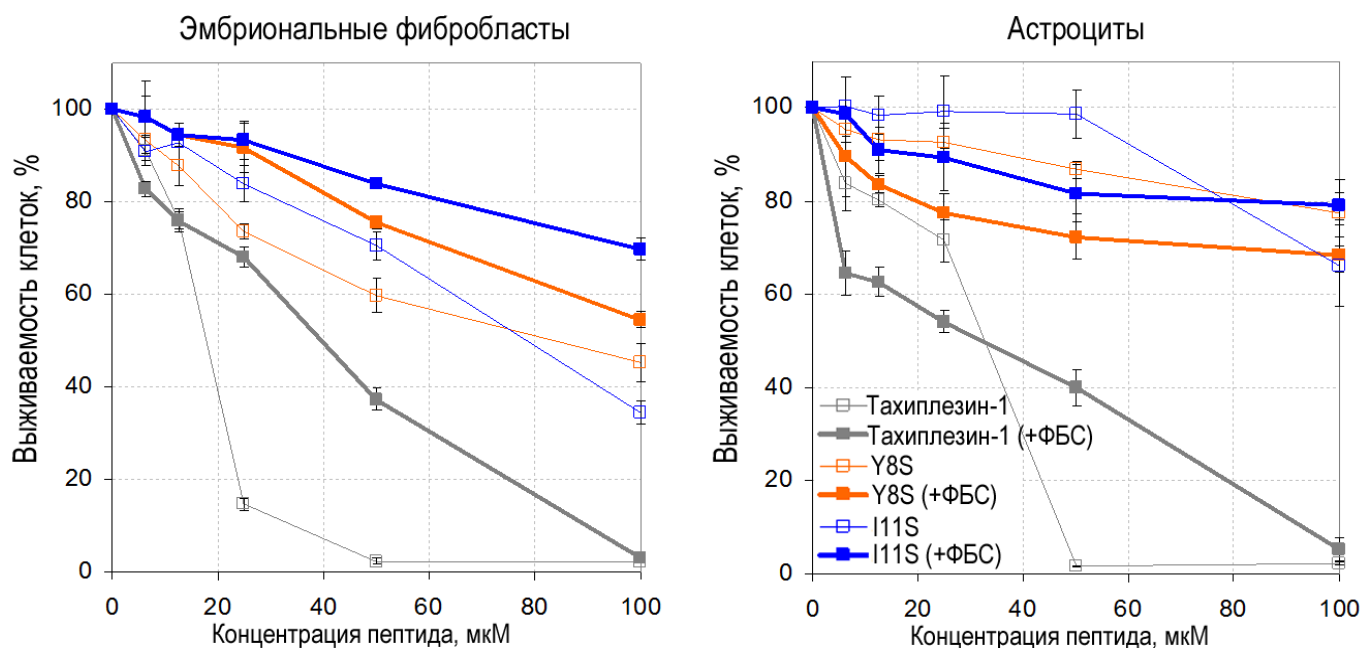
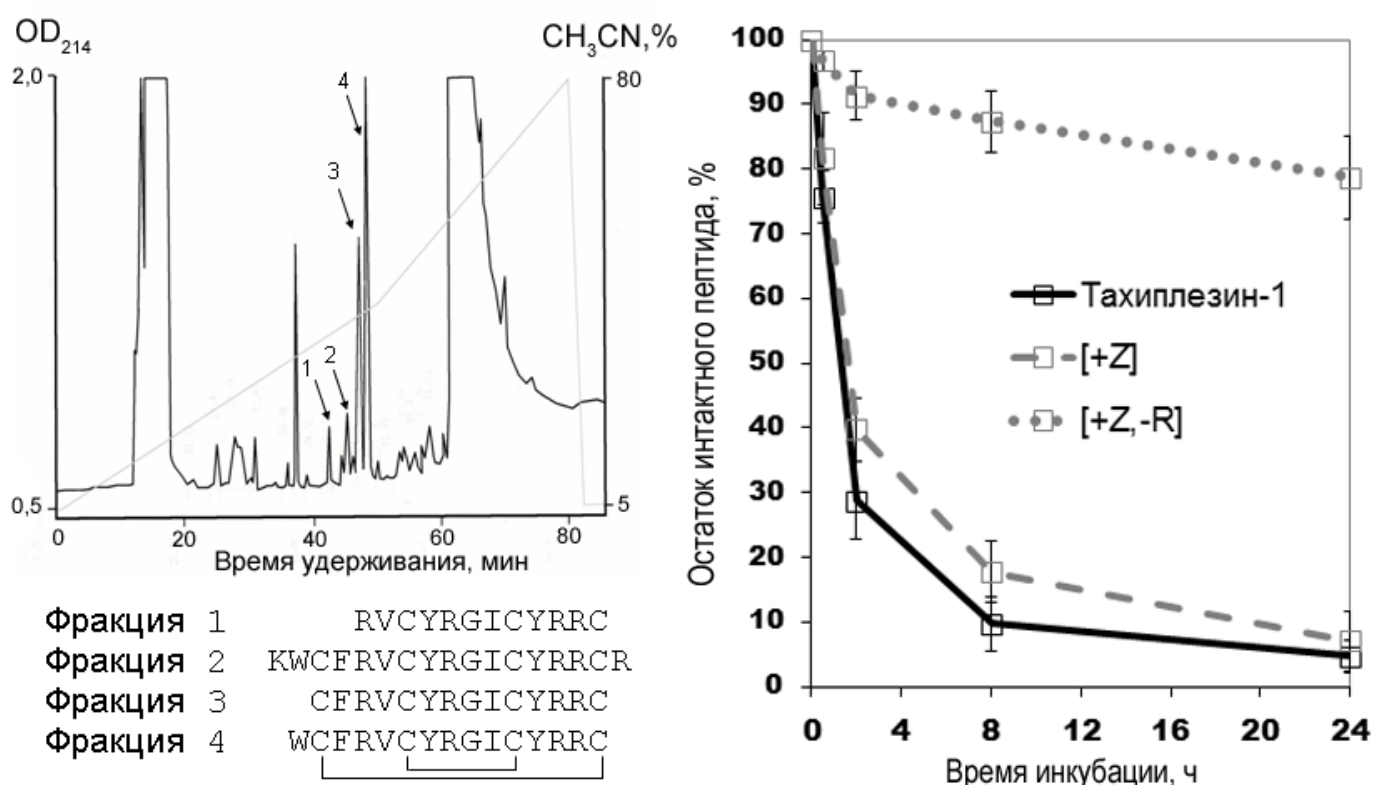


Рисунок 11. Цитотоксическое действие тахиплезина-1 и его аналогов на нормальные клетки человека *in vitro*. ФБС – 10% фетальная бычья сыворотка.

Системное применение АМП в значительной степени осложняется их быстрой протеолитической деградацией и связыванием с белками крови. После 24 ч инкубации в 25% сыворотке крови рекомбинантного тахиплезина-1, стабилизированного двумя дисульфидными связями, продукты протеолиза были проанализированы с помощью ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии (Рис. 12). Важно отметить, что гидролиз пептидных связей происходил в основном за пределами стабилизированной дисульфидными связями шпильки, что может свидетельствовать о ключевом значении цистинов в формировании устойчивости пептида к протеазам. Время полураспада для рекомбинантного тахиплезина-1 составило около 1,5 ч. Для сравнения, время полураспада для линейного АМП буфорина-2 в аналогичных условиях составило менее 5 мин. Аналог тахиплезина-1, защищенный N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты и лишенный C-концевого остатка аргинина, подвергнулся незначительной деградации даже после 24-часовой инкубации в сыворотке крови (Рис. 12). В результате тестирования антимикробной активности аналогов было показано, что введение остатка пироглутаминовой кислоты в структуру тахиплезина-1 (аналог [+Z]) не влияет на антимикробные свойства пептида (Таблица 4), однако повышает устойчивость к протеолизу. Кроме того, основным продуктом деградации аналога [+Z] спустя 24 ч инкубирования является аналог [+Z,-R]. Таким образом, было показано, что защита пептида с помощью N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты является эффективным приёмом для создания рекомбинантных  $\beta$ -шпилечных АМП с повышенным уровнем стабильности в сыворотке крови без ущерба для антимикробных свойств.



**Рисунок 12.** Изучение протеолитической деградации рекомбинантного тахиплезина-1 и его аналогов в сыворотке крови человека. Слева – анализ продуктов протеолиза рекомбинантного тахиплезина-1 после 24 ч инкубации в 25% сыворотке крови. Справа – сравнительное исследование устойчивости природного пептида и его аналогов к протеолитической деградации в 25% сыворотке крови.

### 3. Получение рекомбинантных аналогов антимикробных пептидов и исследование их совместного действия на бактерии

Всесторонние исследования структуры и биологических свойств АМП требуют значительных количеств вещества, которые практически невозможно получить из природного источника. Отсутствие существенных посттрансляционных модификаций в структуре природных АМП позволило сделать выбор в пользу гетерологической экспрессии в прокариотических клетках. В ходе предварительных испытаний было установлено, что для большинства АМП удастся достичь значительного уровня биосинтеза при экспрессии в составе гибридного белка, содержащего олигогистидиновую последовательность и модифицированный тиоредоксин (M37L).

В Учебно-научном центре ИБХ РАН совместно с лабораторией общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» ведется работа по исследованию аурелина – пептида, выделенного из мезоглеи сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. Аурелин состоит из 40 аминокислотных остатков, шесть из которых – цистеины, образующие три внутримолекулярные дисульфидные связи. Показано, что рекомбинантный аналог аурелина формирует ShKT тип пространственной структуры, характерный для блокирующих калиевые каналы токсинов из яда морских анемонов. Ранее методом радиальной диффузии в агарозном геле была продемонстрирована антимикробная активность в отношении ряда бактериальных штаммов. Для проведения дальнейших испытаний биологической активности была поставлена задача оптимизации метода получения рекомбинантного аурелина. В рамках данной работы был использован метод гетерологической экспрессии АМП в составе гибридного белка путем автоиндукции лактозой. Параллельно, экспрессию аурелина также проводили в стандартных условиях с индукцией 0,2 мМ IPTG в течение 5 ч. Относительное содержание гибридного белка в клеточном лизате было равным, однако большие значения конечной оптической плотности бактериальной культуры при автоиндукции позволяли достичь в 4 раза более высокого выхода по массе гибридного белка с литра культуры. Очистку аурелина в обоих случаях проводили без использования денатурирующих агентов, при пониженной температуре согласно следующей методике: металлохелатная хроматография растворимой фракции клеточного белка, диализ элюата против раствора уксусной кислоты, химическое расщепление гибридного белка, повторная металлохелатная хроматография с целью удаления белка-носителя, финальная очистка пептида с помощью ОФ-ВЭЖХ. Соответствие основной фракции ОФ-ВЭЖХ целевому продукту подтверждали с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии и КД-спектроскопии. Конечный выход пептида при индукции IPTG составил 4,5 мг с 1 л бактериальной культуры. Метод автоиндукции лактозой позволил увеличить выход пептида до 18,9 мг с 1 л бактериальной суспензии, что позволяет рассматривать предложенный подход в качестве основного для дальнейшего получения рекомбинантных аналогов цистеин-богатых АМП в растворимой форме. В ходе исследования биологической активности было показано, что рекомбинантный аурелин не способен подавлять рост бактерий при тестировании в жидкой питательной среде даже при концентрации 50 мкМ, в том числе в отсутствие NaCl. Важно отметить, что аурелин не оказывал повреждающего действия на эритроциты человека даже при концентрации 100 мкМ.

В ходе совместной работы Учебно-научного центра ИБХ РАН и лаборатории общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* были выделены и охарактеризованы новые катионные АМП, названные

аципенсинами и являющиеся фрагментами гистона H2A. В ходе данной работы была поставлена задача получения рекомбинантного аналога аципенсина-1 и изучения его биологических свойств. В результате оптимизации условий гетерологической экспрессии выход пептида составил 13,1 мг с 1 л бактериальной культуры. Рекомбинантный аципенсин-1 аналогично природному пептиду не проявлял гемолитической активности в диапазоне концентраций от 0 до 100 мкМ. Как и в случае с другими производными гистона H2A, антимикробная активность аципенсина-1, по-видимому, обусловлена транслокацией через цитоплазматическую мембрану и связыванием с внутриклеточными мишенями – нуклеиновыми кислотами. Исследование ДНК-связывающей активности *in vitro* подтвердило это предположение: после кратковременной инкубации рекомбинантного аципенсина-1 с плазмидной ДНК при массовом соотношении 1:1 электрофоретическая подвижность последней значительно снижалась.

Наряду с аурелином и аципенсином-1 для сравнительного исследования антибактериальной активности были отобраны и получены рекомбинантные аналоги АМП животных, обладающие различными механизмами действия и типами пространственной структуры (Таблица 5): гомезин из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, нарушающий целостность мембран; апидаецин 1b из гемолимфы пчелы *Apis mellifera*, связывающий белки теплового шока; бактенецин ChVac3.4 из лейкоцитов козы *Capra hircus* и тритрптицин из костного мозга свиньи *Sus scrofa*, действующие как на мембраны, так и на внутриклеточные мишени. В таблице 5 приведены АМП, полученные в данной работе с использованием тиоредоксина в качестве белка-носителя. Полученные данные указывают на способность тиоредоксина как белка-носителя нейтрализовать токсические эффекты большинства АМП в ходе гетерологической экспрессии в бактериальной системе.

**Таблица 5. Аминокислотные последовательности и выходы рекомбинантных АМП**

Название	Структурный класс	Аминокислотная последовательность	Выход, мг/л
Аципенсин-1	$\alpha$ -спиральный	SGRGKTGCKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAQRVVGAGAPVY	13,1
Аурелин	$\alpha$ -спиральный	AACSDRAHGHICESFKSFCKDSGRNGVKLRANCKKTCGLC	18,9
Ареницин-1	$\beta$ -шпилечный	RWCVYAYVRVGRVGLVRYRRCW	4,5
NZ17000	$\beta$ -шпилечный	GFCWYVCVYRNGVRVCYRRCN	5,2
Гомезин	$\beta$ -шпилечный	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR	9,2
Тахиплезин-1	$\beta$ -шпилечный	KWCFRVCYRGICYRRCR	17,0
ChVac3.4	Про-богатый	RFRLPFRRPPIRIHPPPFYPPFRRFL	3,8
Апидаецин 1b	Про-богатый	GNNRPVYIQPRPPHPL	0,3
Тритрптицин	Трп-богатый	VRRFPWWWPFLLR	11,6

Сравнительный анализ антибактериальной активности всех полученных в данной работе АМП проводили методом серийных разведений в богатой питательной среде в присутствии 0,05% БСА и 170 мМ NaCl (Таблица 6).  $\beta$ -Шпилечные АМП, за исключением гомезина, продемонстрировали высокую активность в отношении всех тест-культур, сопоставимую с бактерицидным антибиотиком полимиксином В. Стоит отметить, что многие из проанализированных АМП действовали с большей эффективностью в бессолевах средах. В то же время, повышенная ионная сила практически не оказывала влияния на активность  $\beta$ -шпилечных АМП. Было высказано предположение, что слабо выраженная активность отдельных защитных пептидов животных может повышаться за счет синергического эффекта при совместном действии с другими АМП в очаге инфекции. Для проверки данной гипотезы было решено проанализировать антибактериальные свойства аципенсина-1, бактенецина ChVac3.4 и тритрптицина в присутствии тахиплезина-

1, теоретически способного потенцировать их активность благодаря выраженному мембранолитическому механизму действия.

**Таблица 6. Антибактериальная активность рекомбинантных АМП и полимиксина В**

АМП	МИК, мкМ			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Полимиксин В	6,25	0,2	0,8	1,56
Ареницин-1	1,56	0,8	1,56	6,25
Тахиплезин-1	0,8	0,4	0,8	0,8
Гомезин	25	6,25	25	н.д.
Аурелин	>50	>50	>50	>50
Аципенсин-1	>50	>50	>50	>50
Апидаецин 1b	>50	>50	>50	>50
ChVac3.4	>50	3,13	>50	50
Тритрптицин	>50	12,5	>50	>50

\*н.д. – нет данных

Тестирование пар соединений проводилось методом серийных разведений в описанных выше условиях. Оценку синергического эффекта проводили путем вычисления индекса фракционной ингибирующей концентрации (индекс ФИК, FIC index – fractional inhibitory concentration index) по формуле:  $ФИК = [A]/МИК_A + [B]/МИК_B$ , где  $МИК_A$  и  $МИК_B$  – минимальные ингибирующие концентрации для индивидуальных веществ, а  $[A]$  и  $[B]$  – минимальные ингибирующие концентрации при совместном применении препаратов. При значении индекса  $ФИК = 0,5$  достигается четырехкратное снижение значений индивидуальных МИК в смеси из двух соединений. Таким образом, значение индекса  $ФИК \leq 0,5$  указывает на синергический эффект при совместном применении пептидов. Результаты совместного действия АМП на бактериальные клетки представлены в таблице 7. В случаях, когда значение МИК индивидуального вещества составляло >50 мкМ, для расчета индекса ФИК использовали значение 100 мкМ.

**Таблица 7. Совместное действие АМП на бактерии**

Тест-культура	Индекс ФИК ([A]+[B])				
	Полимиксин В + тахиплезин-1	Ареницин-1+ тахиплезин-1	Аципенсин-1 + тахиплезин-1	Тритрптицин + тахиплезин-1	ChVac3.4 + тахиплезин-1
<i>S. aureus</i>	<b>1,125</b> (0,8+0,8)	<b>0,75</b> (0,8+0,2)	<b>0,141</b> (1,56+0,1)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)
<i>E. coli</i>	<b>0,75</b> (0,1+0,1)	<b>1,0</b> (0,4+0,2)	<b>0,067</b> (0,4+0,025)	<b>0,313</b> (0,8+0,1)	<b>0,375</b> (0,4+0,1)
<i>P. aeruginosa</i>	<b>1,0</b> (0,4+0,4)	<b>0,75</b> (0,8+0,2)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)	<b>0,563</b> (6,25+0,4)	<b>0,563</b> (6,25+0,4)
<i>K. pneumoniae</i>	<b>0,75</b> (0,4+0,4)	<b>1,0</b> (1,56+0,4)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)	<b>0,281</b> (3,13+0,2)

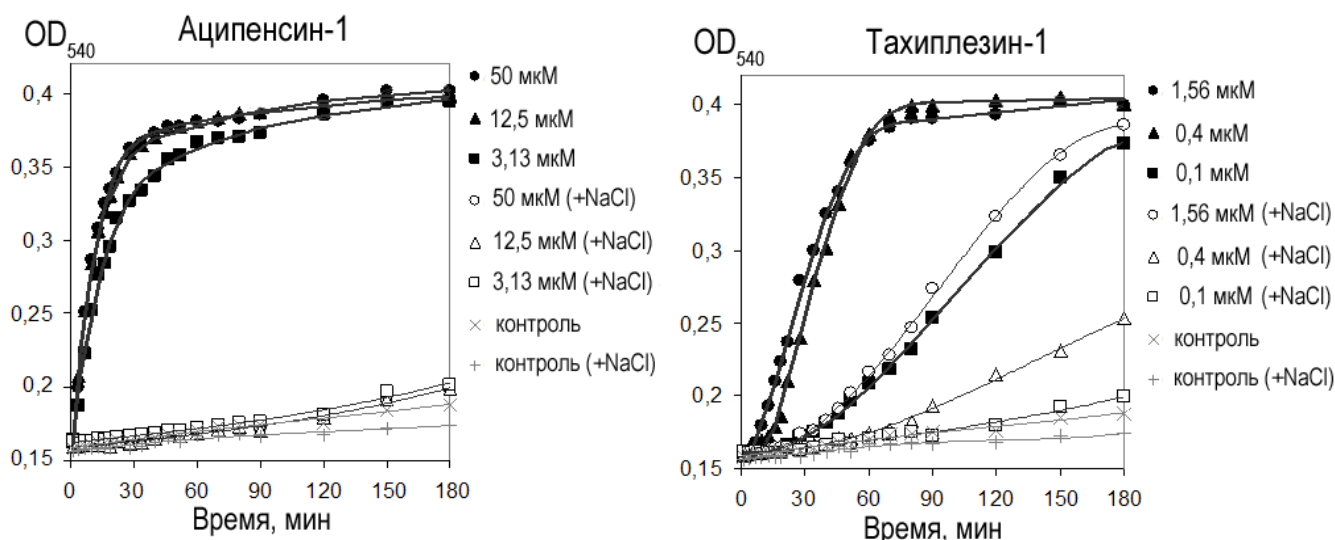
Как и предполагалось, действующие по схожему механизму пары пептидов (полимиксин В/тахиплезин-1 и ареницин-1/тахиплезин-1) проявили лишь аддитивный эффект (ФИК ~1) в отношении всех бактериальных культур. В остальных случаях (кроме тестирования пар тритрптицин/тахиплезин-1 и ChVac3.4/тахиплезин-1 в отношении *P. aeruginosa*) наблюдался синергический эффект с падением значений МИК для тахиплезина-1 в 4–16 раз. Особое внимание привлекла пара АМП аципенсин-1/тахиплезин-1. Во-первых, данные пептиды проявили выраженный синергизм при действии на все бактериальные тест-культуры. Во-вторых, тахиплезин-1, действуя в наномолярном

диапазоне концентраций, был способен активировать аципенсин-1 в присутствии 170 мМ NaCl, снижая значение его МИК с >50 мкМ до 0,4–3,13 мкМ. Важно отметить, что весьма схожий эффект снижения МИК для аципенсина-1 достигался путем удаления NaCl из питательной среды при тестировании методом серийных разведений (Таблица 8).

**Таблица 8. Сравнение антибактериальной активности тахиплезина-1 и аципенсина-1**

АМП	МИК, мкМ							
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl
Тахиплезин-1	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8
Аципенсин-1	3,13	>50	1,56	>50	1,56	>50	3,13	>50

Было высказано предположение, что повышение ионной силы раствора приводит к созданию электростатического барьера вокруг бактериальной клетки, препятствующего взаимодействию с мембраной катионных АМП, не обладающих выраженной амфифильностью. Исходя из этого, была исследована способность аципенсина-1 и тахиплезина-1 нарушать целостность внешней мембраны грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35р в отсутствие и в присутствии 170 мМ NaCl (Рис. 13).



**Рисунок 13. Фотометрическая оценка повышения проницаемости внешней мембраны *E. coli* ML-35р при действии антимикробных пептидов аципенсина-1 и тахиплезина-1.**

В условиях данного эксперимента были установлены значения МИК для аципенсина-1 (МИК<sub>(-NaCl)</sub> 12,5 мкМ, МИК<sub>(+NaCl)</sub> >50 мкМ) и тахиплезина-1 (МИК<sub>(-NaCl)</sub> 1,56 мкМ, МИК<sub>(+NaCl)</sub> 3,13 мкМ). В отсутствие солей аципенсин-1 быстро разрушал внешнюю мембрану бактерий, действуя, в том числе, в субингибирующих концентрациях. Наоборот, в присутствии 170 мМ NaCl действие аципенсина-1 на мембрану не наблюдалось даже при максимальной концентрации – 50 мкМ. В случае тахиплезина-1 наличие соли также оказывало негативное влияние на скорость разрушения внешней мембраны. Тем не менее, независимо от присутствия NaCl в среде, тахиплезин-1 продемонстрировал способность повышать проницаемость внешней мембраны *E. coli* при действии в концентрации 1/8×МИК. Полученные результаты указывают на возможность совместного применения различных АМП в медицине. Кроме того, использование β-спилечных АМП, таких как тахиплезин-1, может способствовать повышению антибактериальной активности ряда защитных пептидов млекопитающих в условиях *in vivo*.

## Выводы

1. Получены рекомбинантные аналоги антимикробных пептидов животного происхождения аципенсина-1 из лейкоцитов осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, гомезина из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, тахиплезина-1 из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, апидаецина 1b из гемолимфы пчелы *Apis mellifera*, бактенецина ChVac3.4 из лейкоцитов козы *Capra hircus*, тритрптицина из костного мозга свиньи *Sus scrofa*. Оптимизирована технология получения рекомбинантного аурелина из мезоглеи медузы *Aurelia aurita*.
2. С помощью сайт-направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе получен широкий спектр рекомбинантных аналогов  $\beta$ -спилечных АМП ареницина-1 из целоцитов морского червя *Arenicola marina* и тахиплезина-1 с точечными аминокислотными заменами.
3. Показана ключевая роль димеризации ареницина-1 в проявлении высокой гемолитической активности пептида.
4. В структуре ареницина-1 и тахиплезина-1 выявлены аминокислотные остатки, оказывающие наиболее существенное влияние на антибактериальные и цитотоксические свойства пептидов. Показана возможность использования природных  $\beta$ -спилечных АМП в качестве матрицы для создания менее токсичных аналогов, сохраняющих высокую антибактериальную активность и мембранолитический механизм действия.
5. Проведено сравнительное исследование антимикробной активности рекомбинантных пептидов животного происхождения. Показан выраженный синергический эффект при совместном действии тахиплезина-1 и ряда других АМП на бактерии. Выявлена и изучена способность тахиплезина-1 восстанавливать антимикробную активность аципенсина-1 в присутствии солей в физиологических концентрациях.

## Список опубликованных работ по теме диссертации

### Статьи:

1. Pavel V. Panteleev, Iliia A. Bolosov, Tatiana V. Ovchinnikova. Bioengineering and functional characterization of arenicin shortened analogs with enhanced antibacterial activity and cell selectivity. *J Pept Sci.* **2015**, doi: 10.1002/psc.2843.
2. Pavel V. Panteleev, Tatiana V. Ovchinnikova. Improved strategy for recombinant production and purification of antimicrobial peptide tachypleusin I and its analogs with high cell selectivity. *Biotechnol Appl Biochem.* **2015**, doi: 10.1002/bab.1456.
3. Pavel V. Panteleev, Iliia A. Bolosov, Sergey V. Balandin, Tatiana V. Ovchinnikova. Design of antimicrobial peptide arenicin analogs with improved therapeutic indices. *J Pept Sci.* **2015**, 21, 105-113.
4. П.В. Пантелеев, И.А. Болосов, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова. Строение и биологические функции  $\beta$ -спилечных антимикробных пептидов. *Acta Naturae.* **2015**, 7, 39-50.
5. О.В. Шамова, Д.С. Орлов, С.В. Баландин, Е.И. Шрамова, Е.В. Цветкова, П.В. Пантелеев, Ю.Ф. Леонова, А.А. Тагаев, В. Н. Кокряков, Т.В. Овчинникова. Аципенсины – новые антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*. *Acta Naturae.* **2014**, 6, 105-116.
6. Zakhar O. Shenkarev, Pavel V. Panteleev, Sergey V. Balandin, Albina K. Gizatullina, Dmitry A. Altukhov, Ekaterina I. Finkina, Vladimir N. Kokryakov, Alexander S. Arseniev, Tatiana V. Ovchinnikova. Recombinant expression and solution structure of antimicrobial peptide aurelin from jellyfish *Aurelia aurita*. *Biochem Biophys Res Commun.* **2012**, 429, 63-69.

### **Тезисы докладов:**

1. P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Balandin, T.V. Ovchinnikova. Animal  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides as a scaffold for drug design // 5<sup>th</sup> Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance (Sibenik, Croatia). - 2015.
2. P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Balandin, T.V. Ovchinnikova. Synergy between host defense peptides with different mechanisms of action // 14<sup>th</sup> International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Wien, Austria); Amino Acids. - 2015. - 47. p. 1648-1649.
3. Пантелеев П.В., Иванова Ю.Д., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения аналога антимикробного пептида тахиплезина с повышенной стабильностью в сыворотке крови // Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - М., 2015. - С. 77-78.
4. Иванова Ю.Д., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Биоинженерия укороченных аналогов антимикробного пептида ареницина // Материалы XXVII Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - М., 2015. - С. 128.
5. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Антимикробные пептиды как факторы врожденного иммунитета // Материалы XXVII Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - М., 2015. - С. 33.
6. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Бета-шпилечные защитные пептиды как основа для создания новых антимикробных средств // Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, Россия); Acta Naturae. - 2014. - Спецвыпуск № 1. - С. 41.
7. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Создание аналогов бета-шпилечных антимикробных пептидов с повышенной селективностью действия // Материалы XXVI Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - М., 2014. - С. 68.
8. Пантелеев П.В. Разработка препарата для лечения ран, осложненных вторичной инфекцией, на основе бета-шпилечных антимикробных пептидов // Тезисы осеннего финала конкурса «У.М.Н.И.К.» 2013 в РАН. - М., 2013. - С. 72-75.
9. P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Balandin and T.V. Ovchinnikova. Bioengineering of antimicrobial peptide arenicin analogs with improved therapeutic indices by site-directed mutagenesis // 38<sup>th</sup> FEBS Congress (St. Petersburg, Russia); FEBS Journal. - 2013. - 280 (Suppl. 1). - p.351.
10. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Морозова Х.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Получение терапевтически ценных аналогов антимикробного пептида ареницина методом сайт-направленного мутагенеза // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - М., 2013, - С. 67-69.
11. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Получение аналогов антимикробного пептида ареницина-1 методом сайт-направленного мутагенеза // Материалы XXV Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - М., 2013. - С. 8.
12. Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения антимикробного пептида аурелина, меченного стабильным изотопом <sup>15</sup>N // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - М., 2011. - С. 88-89.