

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

КРАСНОДЕМБСКАЯ
АННА ДМИТРИЕВНА

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ
ЦЕЛОМОЦИТОВ ПЕСКОЖИЛА *Arenicola marina L.*

Специальность 03.00.04. – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена на кафедре биохимии Санкт-Петербургского Государственного Университета, в лаборатории общей патологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН и в Учебно-Научном Центре Института Биоорганической Химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Кокряков Владимир Николаевич

кандидат химических наук
Овчинникова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Морозов Владимир Игоревич

доктор биологических наук, член-корр РАСН
Черныш Сергей Иванович

Ведущее учреждение: Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова РАН

Защита диссертации состоится "10" апреля 2005 г. в 16 час. на заседании диссертационного совета Д 212.232.09 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Санкт-Петербургском Государственном Университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. А. М. Горького Санкт-Петербургского Университета

Авторсферат разослан "9" апреля 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор



З.И. Крутецкая

2006-4
5440

214185 3

Общая характеристика работы

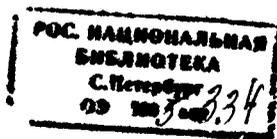
Актуальность проблемы В последнее время все большее значение приобретает изучение механизмов врожденного иммунитета животных, который обеспечивает защиту организмов на первых этапах взаимодействия с патогенами. Важнейшими молекулярными компонентами системы врожденного иммунитета являются антимикробные пептиды (АМП) (Lehrer et al., 1993, Кокряков, 1999). Исследования АМП животных проводятся уже более 40 лет, однако, видовой состав изученных организмов составляет весьма незначительную часть от общего числа известных видов (Zeya, Spitznagel, 1963, Ganz et al., 1985, Boman, 2000). Наиболее широко АМП изучены у представителей позвоночных животных (особенно млекопитающих), а так же у насекомых, гораздо меньше известно об этих веществах у других групп беспозвоночных животных.

Изучение защитных систем беспозвоночных важно с точки зрения сравнительной и эволюционной иммунологии, так как многие процессы из которых складывается сложнейший иммунный ответ у позвоночных животных (распознавание своего и несвоего, фагоцитоз, синтез гуморальных факторов), характерны и для беспозвоночных и нередко представлены у этих животных в более простой и доступной для анализа форме. Для понимания закономерностей эволюции эффекторных механизмов врожденного иммунитета необходимо дальнейшее накопление знаний о структуре и функциональных свойствах АМП у разных видов живых организмов, причем особый интерес представляют исследования ключевых в эволюционном плане групп животных.

Выбор в качестве объекта исследований представителя класса многощетинковых червей (класс *Polychaeta*, тип *Annelida*) определялся тем, что, в соответствии с существующими представлениями, полихеты являются ключевой группой в эволюции трохофорных животных, давшей начало моллюскам и членистоногим, антимикробные пептиды которых изучены достаточно подробно. Специальных же исследований АМП у представителей полихет ранее не проводилось.

Поиск новых АМП важен не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. Уже сейчас некоторые изученные антимикробные пептиды (протегрин-1, магейнин) проходят последние стадии клинических испытаний. Кроме того, широкое изучение природных АМП может служить основой для синтеза производных, обладающих еще более действенным терапевтическим эффектом.

Цель исследования Целью данной работы было выявление и изучение структурных и функциональных свойств антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* L.



Задачи исследования

1. Поиск, выделение и очистка антимикробных пептидов;
2. Изучение физико-химических свойств, определение первичной структуры обнаруженных пептидов,
3. Изучение функциональных свойств выделенных пептидов,

Научная новизна работы. В результате выполненной работы впервые были выявлены и комплексно изучены антимикробные пептиды целомоцитов пескожила *Arenicola marina* L. В процессе работы было идентифицировано и получено в чистом виде 11 катионных АМП. Среди выделенных АМП были подробно исследованы две изоформы новых антимикробных пептидов названных нами ареницинами, которые можно отнести к новому структурному семейству.

Получены данные, характеризующие антимикробную (в частности, изучены некоторые аспекты механизма антимикробного действия) и гемолитическую активность ареницина-1

Основные положения, выносимые на защиту

1. Целомоциты пескожила содержат набор катионных антимикробных пептидов. Из кислых экстрактов целомоцитов выделено в чистом виде 11 антимикробных пептидов. Из них наибольший интерес представляют новые антимикробные пептиды ареницины, обладающие уникальной среди известных антимикробных пептидов структурой.
2. Ареницин-1 является антибиотическим агентом с широким спектром действия на микроорганизмы. Его антимикробная активность стабильна в широком диапазоне условий. По эффективности микробицидного действия ареницин-1 сравним с самыми сильными пептидными антибиотиками (дефенсином кролика NP-1 и протегрином PG-1). Как и у подавляющего большинства антимикробных пептидов бактерицидное действие ареницина-1 определяется взаимодействием молекул пептида с цитоплазматической мембраной микробной клетки.

Практическая значимость работы. Антибиотические свойства ареницинов позволяют считать эти АМП перспективными для разработки на их структурной основе новых лекарственных препаратов, при этом небольшой размер молекул пептидов (21 аминокислота) облегчает процесс их химического синтеза.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 1-й медико-биологической конференции молодых ученых Санкт-Петербурга (СПб., 1997), на межгородской конференции для молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (СПб, 1999), на III-й научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге '99» (СПб, 1999), на конференции «Актуальные проблемы фундаментальных исследований в области биологии и медицины», (СПб, 2000), на международной конференции «Antimicrobial peptides» (Gordon Research Conference, Italy,

Barga, 2003), на V научной сессии МБС Санкт-Петербургского Государственного Университета (СПб, 2004 г.), на Объединенном Иммунологическом Форуме (Екатеринбург, 2004 г.), на 7-й научной конференции с международным участием «Эйлеровские чтения» (Leonard Euler Symposium, St Petersburg State University, 2004).

Публикации По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 3 статьи в реферируемых журналах, 1 заявка на патент, 2 статьи в сборниках научных работ, 6 тезисов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 222 ссылки. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста и иллюстрирована 53 рисунками и 5 таблицами

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на беломорских полихетах – пескожилах, *Arenicola marina* L. Червей собирали в августе, после окончания сезона размножения, на верхней литорали в районе морской биологической станции СПбГУ (Чупинская губа Белого моря)

Проводили цитохимический анализ целоμοцитов как в интактном состоянии, так и при индуцированном фагоцитозе. Фагоцитарную активность целомоцитов пескожила наблюдали при введении в целомическую полость взвеси зимозана

Для получения целомоцитов в целомическую полость животного в районе гнуловидных сегментов вводили стерильную иглу для переливания крови и собирали целомическую жидкость в стерильные пробирки. Целомоциты отделяли центрифугированием при 400 г в течении 10 мин и фиксировали 10% уксусной кислотой. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 2000 г в течении 1 часа, (+4°C). Супернатант (Э₀) отбрасывали. Осадок клеток разрушали гомогенизацией в 10% уксусной кислоте. Процедуру экстракции повторяли 4-5 раз (Э₁-Э₅). Для обезсоливания и концентрации экстракты подвергали ультрафильтрации через фильтр "Amicon" YM-1 (США). Дальнейшее разделение препаратов проводили с помощью препаративного электрофореза в ПААГ (Harwig et al., 1994) на приборе Bio-Rad, модель - AG501-X8 (США). Для получения высокоочищенных препаратов катионных антимикробных пептидов применяли обратнo-фазовую высоко-эффективную жидкостную хроматографию (ОФВЭЖХ) (хроматограф Gold System (Beckman, США), колоноки Vydac C18, 5мм, 250x4.1 мм или Zorbach C18, 5мм, 150x4.1 мм). В ходе работы использовали системы растворителей. 100% ацетонитрил – 0,1% ТФУ или 100% ацетонитрил – 0,13% ГФМК.

На каждом этапе очистки производился электрофоретический анализ препарата в ПААГ в кислой буферной системе (Panyim, Chalkey, 1969) и в щелочной буферной системе в присутствии ДС-Na (Schägger, Von Jagow, 1987).

Молекулярную массу пептидов оценивали по результатам электрофореза в присутствии DС-Na (Weber, Osborn, 1969). Точную молекулярную массу устанавливали с помощью масс-спектрометрического анализа на MALDI-TOF масс-спектрометре Voyager DE ("Perseptive Biosystem Inc", Framingham, MA, США) на базе ЦКП фонда ТВН.

Наличие дисульфидных связей в молекуле пептида устанавливали с помощью восстановления пептидов дитиотриостолом и последующего алкилирования 4-винилпиридином. Образцы анализировали на масс-спектрометре.

Аминокислотные последовательности пептидов определяли методом автоматической деградации по Эдману. Секвенирование проводилось в Учебно-Научном Центре Института Биоорганической Химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН на секвенаторе «491 Precise» (PE Applied Biosystem, США).

Анализ гомологии полученных аминокислотных последовательностей с имеющимися в мировых базах данных белковыми и пептидными последовательностями проводили с помощью поисковой системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

Антимикробную активность экстрактов оценивали методом наложения геля после проведения ЭФ на чашку с культурой микроорганизма (Lehrer et al, 1991) Антимикробную активность проб на разных стадиях очистки оценивали методом радиальной диффузии в агарозном геле с культурой микроорганизма (Lehrer et al, 1991) В случае изучения влияния на активность пептидов различных условий среды в состав буфера для нижнего геля (в норме 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4) вносились соответствующие изменения (вносили 100-300 мМ NaCl, изменяли pH буфера от 5,8 до 8, добавляли 1 мМ цитрат Na или 0,1% питательную среду) Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении микроорганизмов тестировались последовательные разведения пептида в два раза от 100 мкг/мл до <1 мкг/мл. Точка пересечения графика линейной регрессии значений антимикробной активности с осью абсцисс принималась в качестве МИК

Влияние на антимикробную активность очищенных пептидов сыворотки крови кролика оценивалось с помощью антимикробного теста в жидкой среде в присутствии ресазурина. Метод основан на превращении этого вещества из окисленной (максимум поглощения при 602 нм) в восстановленную форму (максимум поглощения при 571 нм) под действием бактериальных дегидрогеназ (Shiloh et al., 1997; Gabrielson et al., 2002). Рост бактерий оценивали фотометрически. Результаты, получаемые этим методом, хорошо коррелируют с результатами, получаемыми общепринятым в микробиологических исследованиях методом подсчета колоний (Shiloh et al., 1997)

Бактерицидное действие ареницина оценивалось методом подсчета колоний.

Для определения воздействия пептида на проницаемость внутренней мембраны *E.coli* применяли методику, разработанную в лаборатории проф. Р. Лерера (Lehrer et al., 1988), в

качестве тест-микроба использовали специальный штамм *Escherichia coli* ML-35p, характеризующийся конститутивной экспрессией β -галактозидазы.

Определение гемолитической активности пептидов проводили по стандартной методике, с использованием эритроцитов человека. Измерение поглощения проб при длине волны 540 нм производили на спектрофотометре Multiskan MS-353 (Labsystems, США). Позитивным контролем (100% лизис) служил Тритон X-100, негативным контролем – раствор для проб (0.01% уксусная кислота). За 50% Эффективную Концентрацию (ЭК50) принимали значимые концентрации пептида, при которой уровень гемолиза составлял 50% от вызванного тритоном X-100.

Миграция целомацитов оценивалась по стандартной методике с помощью 48-луночной камеры Бойдена для микрохемотаксиса (Neuroprobe, MD, USA). Использовались поликарбонатные мембраны (Neuroprobe), размер пор 3 мкм.

Высокоочищенные препараты дефенсинов человека (HNP-1,2,3), дефенсинов кролика (NP-1,2,3,4,5) и протегрин-1 получены в лаборатории Общей Патологии НИИЭМ путем выделения из лейкоцитарной массы (Ganz et al, 1985, Harwig et al, 1993a, Koktyakov et al, 1993), индолицидин и аргеницин-1 синтезированы с использованием Вос-технологии в лаборатории химии пептидов НИИОЧБ к х и Колодкиным Н И и Афониной М А.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием традиционных методов вариационной статистики. Представленные данные являются усредненными значениями (среднее \pm стандартное отклонение), полученными в трех независимых экспериментах, в каждом эксперименте проводили три параллельных опыта. Достоверность различий между средними двух групп оценивали с помощью t-критерия Стьюдента на уровне значимости $p < 0,05$. Обработку данных проводили с помощью программ Sigma Plot 4.0 и Microsoft Excel 2000.

Результаты исследования и их обсуждение.

1. Выделение антимикробных пептидов из целомацитов пескожила

Электрофоретический анализ экстрактов целомацитов пескожила в неденатурирующих условиях (в кислой буферной системе) выявил присутствие многих фракций, в том числе, по подвижности сравнимых с дефенсинами кролика NP-1-5. Экстракт Э₀ оказался более гетерогенным по составу, чем Э₁ и последующие, особенно в области катодных компонентов (Рис 1, А). Дальнейшее тестирование антимикробной активности методом наложения геля показало, что в экстрактах присутствует целый ряд фракций, обладающих антимикробной активностью в отношении 2-х видов бактерий (Рис 1, Б, В). Фунгицидной активностью обладала только одна мажорная фракция, по длине пробега соответствующая дефенсинам кролика NP-4 и NP-5, которая обнаруживается во всех экстрактах (Рис 1, Г).

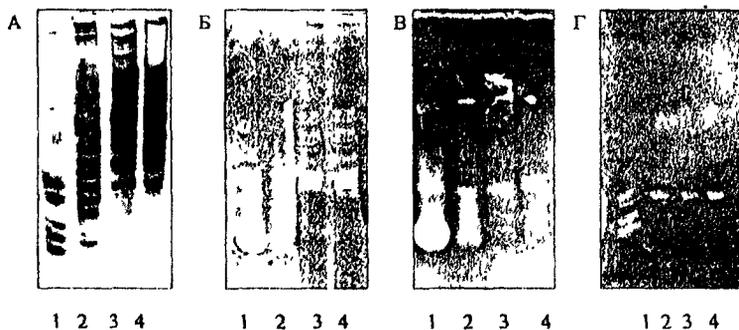


Рис. 1 Результаты антимикробного теста методом наложения геля.

А- электрофореграмма в ПААГ экстрактов целомотитов пескожила (10% уксусной к-той) в кислой буферной системе,

Б- агарозный гель с культурой рамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, после наложения геля А,

В- агарозный гель с культурой грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes*, после наложения геля А,

Г- агарозный гель с культурой гриба *Candida albicans*, после наложения геля А,

1- маркерная смесь дефенсинов кролика (NP-1,2,3,4,5), 2- Э₀ первичный экстракт целомотитов (без гомогенизации), 3- Э₁ вторичный экстракт целомотитов (с гомогенизацией), 4-Э₂ вторичный экстракт целомотитов (с гомогенизацией)

В совокупности, в кислых экстрактах целомотитов пескожила как действующие антибактериальные начала были идентифицированы и выделены в чистом виде 11 катионных пептидов с молекулярными массами 1121 Да, 1159 Да, 1450 Да, 1745 Да, 2007 Да, 2450 Да, 2758 Да, 2773 Да, 3287 Да, 3627 Да и 4670 Да. Доминирующими фракциями являются две изформы пептидов, названных нами ареницин-1 (2758 Да) и ареницин-2 (2773 Да), по порядку их элюции с колонки ВЭЖХ (Рис. 2, А)

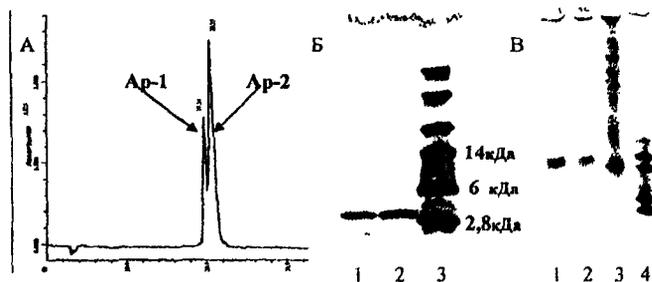


Рис. 2 Получение чистых фракций ареницинов с помощью ОФВЭЖХ;

А- ВЭЖХ хроматограмма объединенных фракций после ВЭЖХ 1, подвергнутых повторному разделению в градиенте ацетонитрила от 10 до 40% за 60 минут. Разделение проводилось на колонке *Yudac C-18* (1x25 см) (Буфер А 0,1% ТФУ, Буфер Б 100% Ацетонитрил)

Б- Электрофореграмма в ПААГ очищенных с помощью ОФВЭЖХ фракций ареницинов в щелочной буферной системе в присутствии ДС-На (1-ареницин-1, 2 - ареницин-2, 3 - смесь маркерных белков.)

В- Электрофореграмма в ПААГ очищенных с помощью ОФВЭЖХ фракций пептидов в кислой буферной системе (1 - ареницин-1, 2-ареницин-2, 3-экстракт Э₁ целомотитов 10% уксусной кислоты, 4- смесь дефенсинов кролика)

Анализ антимикробной активности чистых фракций ареницинов показал, что они обладают высокой активностью в отношении трех групп микроорганизмов, сравнимой с активностью дефенсина кролика (NP-1) и протеогрина (PG-1) в тех же концентрациях.

Различий между ареницинами 1 и 2 в действии на микроорганизмы не обнаружилось.

Опыты по выделению ареницинов проводились нами многократно (на материалах разных лет), и каждый раз, в результате использования разработанной нами схемы очистки, удавалось выделить пептиды с такими же свойствами. Это может свидетельствовать о том, что экспрессия данных пептидов является конститутивной, по крайней мере, на данном этапе жизненного цикла животных, и, по-видимому, является важным компонентом защиты организма от инфекции.

2. Определение структуры ареницинов

Масс-спектрометрический анализ ареницинов после процедуры алкилирования показал, что в результате модификации молекулярная масса каждого пептида возросла на 212 Да. Это свидетельствует о наличии в каждом пептиде двух остатков цистеина, образующих внутримолекулярную дисульфидную связь.

После автоматической деградации по Эдману были установлены первичные последовательности ареницинов (Рис. 3)

Ареницин-1	RWCVYAYVR <u>Y</u> RGVLVRYRRCW	2758 Да
Ареницин-2	RWCVYAYVR <u>I</u> RGVLVRYRRCW	2773 Да

Рис. 3. Аминокислотные последовательности ареницинов

Оба пептида состоят из 21 аминокислотного остатка и отличаются друг от друга всего лишь одной консервативной заменой в 10-ом положении (валин на изолейцин). Структуры содержат 9 гидрофобных и 6 положительно заряженных аминокислотных остатков. Характер распределения этих остатков придает молекулам ареницинов амфипатические свойства. Суммарный положительный заряд молекулы равен +6, а расчетная изоэлектрическая точка (pI) соответствует 10.9. В 3-ем и в 20-ом положении находятся два остатка цистеина, образующие дисульфидную связь. Молекула, таким образом, оказывается замкнутой в кольцо.

Ареницины можно отнести к группе пептидов с 1-ой дисульфидной связью (Wotan, 2000). В составе этой группы описаны многочисленные пептиды из кожи земноводных (в основном лягушек), которые характеризуются общей структурой, построенной по принципу лассо (имеют длинный N-терминальный линейный хвост и небольшое 6-членное кольцо на C-конце) (Morikawa et al., 1992; Simmaco et al., 1993). К этой же группе относится танатин, выделенный из гемолимфы насекомого *Podisus maculiventris* (от. Hemiptera) (Fehlbaum et al., 1996), его структура содержит 8-членное кольцо.

Молекулы ареницинов формируют 18-членное кольцо. Компьютерный анализ аминокислотной последовательности зрелого пептида с помощью поисковой системы BLAST не выявил какой-либо гомологии с имеющимися в базах данных белковыми последовательностями. В свете вышеизложенных данных можно рассматривать ареницины как первых представителей нового структурного семейства антимикробных пептидов.

3. Изучение антимикробной активности ареницина-1

Определение минимальных ингибирующих концентраций ареницина-1 в отношении целого ряда микроорганизмов показало, что ареницин-1 является эффективным антибиотическим веществом с широким спектром действия (таб. 1)

Исследуемый пептид проявлял сходную активность против всех тестируемых микробов, его МИК во всех случаях не превышали 1 мкМ.

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ареницина-1 в отношении роста некоторых микроорганизмов

Микроорганизм		МИК (мкМ)
грамотрицательные бактерии	1. <i>Escherichia coli</i> ML-35p	0.55 ± 0.10
	2. <i>Escherichia coli</i> M-17	0.93 ± 0.20
	3. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.44 ± 0.10
	4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.55 ± 0.10
грамположительные бактерии	5. <i>Listeria monocytogenes</i> EGD	0.93 ± 0.20
	6. <i>Staphylococcus aureus</i> MR ATCC 33591	0.74 ± 0.15
	7. <i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	0.81 ± 0.15
	8. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	0.81 ± 0.15
грибы	9. <i>Candida albicans</i> 820	0.55 ± 0.10

Сравнение антимикробного действия разных пептидов показывает, что ареницин по своей эффективности в отношении протестированных микробов, сопоставим с самыми сильными пептидными антибиотиками - протегрином и дефенсином кролика NP-1. Фунгицидная активность ареницина почти на порядок больше, чем таковая индолицидина и дефенсина человека (таб. 2).

Таблица 2. Сравнение МИК разных антимикробных пептидов

	Минимальная ингибирующая концентрация (мкМ)				
	Ареницин-1	Протегрин-1	Индолицидин	HNP-1	NP-1
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	0.55 ± 0.10	0.27 ± 0.05	1.30 ± 0.50	2.14 ± 0.50	0.45 ± 0.10
<i>P. aeruginosa</i>	0.55 ± 0.10	0.27 ± 0.05	_____	_____	0.45 ± 0.10
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	0.93 ± 0.20	0.19 ± 0.05	1.40 ± 0.60	3.66 ± 0.80	0.27 ± 0.05
<i>S. aureus</i> MR ATCC 33591	0.74 ± 0.15	1.29 ± 0.20	_____	_____	0.45 ± 0.10
<i>Candida albicans</i> 820	0.55 ± 0.10	0.39 ± 0.05	5.36 ± 1.20	5.36 ± 1.50	0.67 ± 0.10

Изучение влияния на антимикробную активность ареницина-1 различных факторов среды (повышенной ионной силы, изменения pH, присутствия в среде двухвалентных катионов и

уровня метаболизма микробной клетки) показало, что антибактериальная активность ариеницина-1 под воздействием исследуемых факторов изменяется незначительно. Изменение условий тестирования сильнее всего влияет на фунгицидную активность ариеницина, существенно ослабляя ее. Наиболее действенными факторами являются повышенное содержание соли и уровень метаболизма клеток гриба. Тем не менее, хотя и весьма ослабленная, эта активность все-таки сохраняется в довольно широком диапазоне условий (Таб 3)

Таблица 3. Влияние на антимикробную активность ариеницина-1 различных факторов среды.

Микроорганизм	Минимальные ингибирующие концентрации, мкМ					
	pH 7.4	100 mM NaCl	pH 5.8	pH 8.0	1 mM цитрат Na	питательная среда (0,1%)
<i>E. coli ML-35p</i>	0.55±0.10	1.10±0.20	0.72±0.15	0.90±0.20	0.47±0.10	0.18±0.05
<i>L. monocytogenes EGD</i>	0.93±0.20	0.55±0.20	0.3±0.05	0.55±0.10	0.43±0.10	0.32±0.05
<i>Candida albicans 820</i>	0.55±0.10	9.05±2.50	7.00±0.50	0.72±0.20	1.50±0.20	9.10±2.50

С практической точки зрения особенно важным является устойчивость антимикробной активности ариеницина в гиперосмотических условиях. Так, при заболевании муковисцидозом содержание NaCl в поверхностной жидкости дыхательных путей может достигать 120 мМ, и антимикробные пептиды, продуцируемые клетками слизистого эпителия дыхательных путей теряют в таких условиях свою активность (Goldman et al., 1997; Bals et al., 1998). На этом факте базируется одна из гипотез возникновения хронических инфекций респираторной системы при этом заболевании (Gibson et al., 2003).

Микробиологические исследования легких больных муковисцидозом показывают, что основными патогенами являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Спектр действия ариеницина-1, включает в себя штаммы микроорганизмов этих видов (таб 1), что делает перспективными дальнейшие прикладные разработки терапевтических средств для лечения данного заболевания на структурной основе ариеницинов.

4. Изучение механизма бактерицидного действия ариеницина-1

В отношении большинства антимикробных пептидов обоснованным считается представление о том, что главной мишенью их воздействия на микроорганизмы являются поверхностные структуры клеток и собственно цитоплазматическая мембрана. Однако в последнее время появились данные, свидетельствующие, что для некоторых пептидов подобный механизм действия не свойственен или же не является основной причиной гибели клетки.

Ариеницин-1 способен к быстрому увеличению проницаемости внутренней мембраны *E. coli* (Рис. 5). Проницаемость начинает резко возрастать практически сразу же после

добавления пептида, латентный период составляет всего 2-4 минуты. Эта способность сохраняется даже при очень низких концентрациях пептида (0,5 мкг/мл), что составляет 0,36 МИК (правда, в этом случае лаг-период увеличивается до 5 минут). Лаг-период перед началом процесса пермеабиллизации, соответствует, видимо, стадии аккумуляции пептида на поверхности мембраны до достижения пороговой концентрации, необходимой для дальнейшего разрушительного действия.

Повреждение мембран бактерии является ключевым моментом в процессе гибели клетки под воздействием ариеницина. При сопоставлении двух графиков отчетливо видна корреляция между увеличением проницаемости цитоплазматической мембраны и бактерицидным действием пептида. Бактерицидное действие ариеницина начинает проявляться в течение первых 5 минут инкубации, а через 10 минут уже практически не остается жизнеспособных клеток (Рис. 6). Скорость с которой ариеницин-1 убивает бактериальные клетки является еще

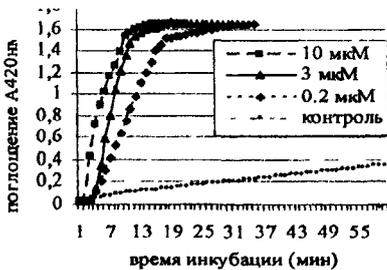


Рис. 5 Влияние ариеницина-1 на изменение проницаемости цитоплазматической мембраны *Escherichia coli*; доверительные интервалы каждого значения не превышали 0,04



Рис. 6 Зависимость бактерицидного действия ариеницина в отношении *Escherichia coli* от времени инкубации

одной важной функциональной характеристикой этого пептида. В сравнительных экспериментах по влиянию на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* различных по структуре пептидов наиболее сходным с ариеницином по характеру действия оказался протегрин. Механизм действия протегрина связывают с формированием в мембране стабильных, структурированных пор (Yang et al., 2000), возможно подобный механизм действия свойственен и ариеницину.

5. Изучение гемолитической активности ариеницина-1.

Известно, что многие антимикробные пептиды способны к проявлению цитотоксичности в отношении эукариотических клеток. Частным случаем является способность к повреждающему воздействию на мембраны эритроцитов. Поэтому при изучении новых веществ, с потенциальной возможностью использования в медицинской практике, необходимо установить наличие и характер их гемолитической активности.

При тестировании ареницина в стандартных условиях выяснилось, что начиная с концентрации 4 мкМ, он проявляет способность к гемолизу эритроцитов человека, хотя даже при высоких концентрациях 100%-го гемолиза не происходит (Рис. 7) При низких же концентрациях ареницина (1 и 2 мкМ) гемолиз практически не наблюдается, однако эти концентрации уже превышают МИК в отношении всех протестированных микроорганизмов (таб. 1).

В физиологических условиях действие пептида на клетки-мишени должно происходить в присутствии различных эндогенных факторов организма, например, белков плазмы крови. Для многих антимикробных пептидов установлено, что они могут связываться с некоторыми белками сыворотки крови, в частности с ингибиторами сериновых протеаз (Papuitch, Ganz, 1991). Такое взаимодействие может предотвращать гемолиз и является одним из защитных механизмов организма против аутоцитотоксичности собственных антимикробных пептидов. Тестирование ареницина, как и протегринов в присутствии сыворотки крови кролика показало, что в данном случае гемолитическая активность обоих пептидов резко снижается (уже при 2% сыворотке более чем в два раза, 10% сыворотка ингибировала гемолиз, вызываемый ареницином, полностью) (Рис. 7).

Для препарата, используемого в терапии, важно, чтобы взаимодействие с сывороткой крови предотвращая цитотоксичность, не оказывало негативного влияния на антимикробную активность тестируемого пептида. Как выявилось в наших экспериментах, ареницин-1 полностью удовлетворяет этому требованию (Рис. 8). Такой же эффект наблюдался и в случае протегрина (Shi & Ganz, 1998), α -дефенсина человека (Chaly et al., 2000). Это свойство так же говорит в пользу возможности применения ареницина на практике.

Механизмы, лежащие в основе такого дифференциального воздействия белков сыворотки крови на различные биологические активности антимикробных пептидов пока недостаточно изучены.

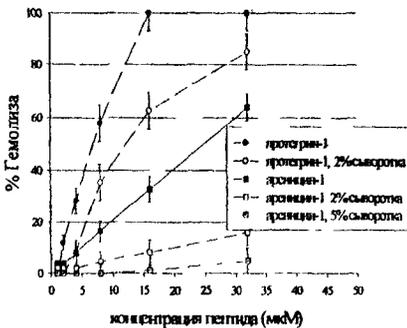


Рис. 7 Гемолитическая активность ареницина-1 и протегрина-1, влияние присутствия нормальной сыворотки крови кролика

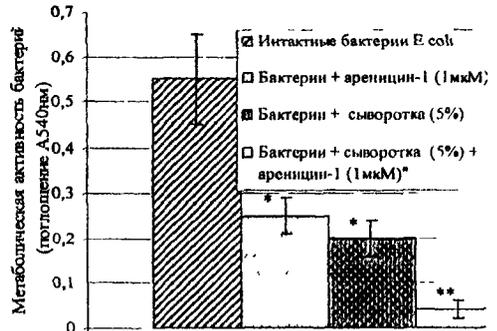


Рис. 8 Влияние сыворотки крови на антимикробную активность ареницина в отношении *Escherichia coli*; * - достоверное отличие от контроля (интактных бактерий), ** - достоверное отличие от антимикробного действия сыворотки крови, $p < 0,05$

Большая часть функциональных свойств ареницинов является вполне объяснимой с позиций основных существующих на сегодняшний день представлений о взаимосвязи структуры и активности антимикробных пептидов. Ареницины можно кратко охарактеризовать, как небольшие амфипатические циклические молекулы, несущие большой положительный заряд. Обычно такая структура является очень стабильной, устойчивой к воздействию протеаз, и должна придавать молекуле сильные мембраноактивные свойства. Пептиды, имеющие подобный тип строения (например, протегрины (Kokuyakov et al., 1993)) характеризуются широким спектром действия, сильной эффективностью, устойчивостью к изменению условий среды, в частности к солености, а так же существенной гемолитической активностью.

6. Исследование способности ареницина-1 вызывать направленную миграцию целоцитов пескожила

Многие антимикробные пептиды млекопитающих в дополнение к своей основной функции микробцидных агентов обладают целым рядом других биологических активностей. В частности, они могут выступать в качестве модуляторов защитных реакций (Gallo, 2002, Bevins, 2003, Yang et al., 2004). В нашей работе была предпринята попытка выявить присутствие у ареницина хемотаксической активности в отношении целоцитов пескожила. Полученные предварительные результаты свидетельствуют о способности ареницина вызывать направленную миграцию клеток целолической жидкости, при этом оптимальными концентрациями пептида оказались 4-6 мкг/мл. Полученные нами данные согласуются с результатами работы японских ученых (Niyonsaba et al., 2004), исследовавших хемотаксис нейтрофилов, обработанных TNF- α , к β -дефенсинам человека hBD-1,2.

7. Исследование первичной структуры других АМП из целоцитов пескожила

Кроме ареницинов, пока удалось частично расшифровать первичную структуру только двух из других выделенных пептидов (1745 Да и 2450 Да). Оказалось, что они имеют гомологию с N-концевыми фрагментами гистонов H2A и H3, соответственно (Рис. 4).

Фрагмент (1-9) пептида 1745 Да
Фрагмент (21-29) гистона H2A из
Platynereis dumerilii (Annelida; Polychaeta)

AGLQFPVGR
AGLQFPVGR (100% гомология)

Фрагмент (1-9) пептида 2450 Да
Фрагмент (28-36) гистона H3 из
Platynereis dumerilii

RSAPATGGV
KSAPATGGV (89% гомология)

Рис. 4 Частичные аминокислотные последовательности пептидов 1745 Да и 2450 Да

Наличие антимикробной активности у частей более крупных молекул, появляющихся в результате протеолитического расщепления, было многократно описано (Boman, 2000, Scott & Hancock, 2000, Zasloff, 2002). Наибольшее число производных с антимикробной

активностью известно для гистонов (Kim et al, 1998, Park I et al., 1998, Birkemo et al., 2003). В частности, два производных гистона H1A были выделены из активированных гранулоцитов человека (Wang et al, 2002).

Одновременное присутствие различающихся по структуре АМП в клетках, участвующих в защитных реакциях, является обычным для многих изученных видов животных и может быть объяснено тем, что в процессе эволюции отбирался набор молекулярных матриц, который наиболее эффективно осуществлял защиту организма-хозяина от патогенов, характерных для конкретной экологической ниши.

Выводы

1. Осуществлены поиск, выделение, физико-химический и функциональный анализ антимикробных пептидов из целомочитов пескожила (*Arenicola marina* L., *Annelida*). Установлено, что в целомочитах пескожила содержится по крайней мере 11 катионных антимикробных пептидов с различной молекулярной массой (1121 Да, 1159 Да, 1450 Да, 1745 Да, 2007 Да, 2450 Да, 2758 Да, 2772 Да, 3287 Да, 3627 Да и 4670 Да). Получены высокоочищенные препараты выявленных пептидов.

2 Среди всех обнаруженных в целомочитах пескожила антимикробных пептидов два (с молекулярной массой 2758 Да и 2772 Да) являются доминирующими и проявляют наибольшую антимикробную активность по сравнению с другими пептидами, выявленными в настоящей работе. Установлена первичная структура этих антимикробных пептидов, представляющих собой изоформы, и названных нами ареницин-1 и ареницин-2. Молекулы ареницинов состоят из 21 аминокислотного остатка, среди которых 9 гидрофобных и 6 положительно-заряженных. Остатки цистеина, расположенные в 3-ем и 20-м положении образуют внутримолекулярную дисульфидную связь, формируя 18-членное кольцо. Подобная структура является уникальной среди известных антимикробных пептидов, что позволяет отнести ареницины к отдельному структурному семейству.

3 Ареницин-1 является эффективным антибиотическим препаратом с широким спектром микробоцидного действия. Этот пептид проявлял активность в отношении грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* EGD, *Staphylococcus aureus* MR ATCC 33591, *Staphylococcus aureus* SG 511, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ML-35p, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* и грибов *Candida albicans* 820. Минимальные ингибирующие концентрации ареницина-1 в отношении всех 9-ти протестированных штаммов не превышают 1 мкМ.

4. Антимикробная активность ареницина-1 стабильна в широком диапазоне условий (при

разных концентрациях NaCl (0-300мМ), при различных значениях pH (5 8-8.0), уровне метаболизма микробной клетки, в присутствии хелатора двухвалентных катионов цитрата натрия). Важной функциональной особенностью ариеницина-1 является сохранение антимикробной активности в присутствии 5% нормальной сыворотки крови кролика.

5. Изучение механизма бактерицидного действия ариеницина-1 в отношении грамотрицательных бактерий *E.coli ML-35p* выявило, что оно связано с повреждением цитоплазматической мембраны клетки. Бактерицидное действие ариеницина-1 начинает проявляться в течении первых 5 минут инкубации, через 10 минут уже практически не остается жизнеспособных клеток.

6 Ариеницин-1 способен повреждать эритроциты человека. Гемолитическая активность ариеницина начинает проявляться при довольно высоких концентрациях (4 мкМ) намного превышающих его МИК в отношении микроорганизмов. ЭК50 составляет 25 мкМ

Список публикаций по теме диссертации

1. Матукова А.Д. Поиск, выделение и очистка катионных антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила (*Arenicola marina*) // Материалы 1-й медико-биологической конференции молодых ученых Санкт-Петербурга, СПб, 1997, с.49-50.
2. Матукова А.Д., Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Изучение антимикробных пептидов животных // Материалы третьей научной конференции с международным участием «Дни иммунологи в Санкт-Петербурге» Медицинская иммунология, 1999, Т 1, № 3-4, с 18-19.
3. Матукова А.Д., Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Изучение антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила // Материалы научной конференции «Актуальные проблемы патофизиологии». СПб, 1999, с. 85-86
4. Краснодембская А.Д., Алешина Г.М., Краснодембский Е.Г., Кокряков В.Н. Антимикробные пептиды из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* // Материалы научной конференции «Актуальные проблемы фундаментальных исследований в области биологии и медицины», посвященной 110-летию института экспериментальной медицины СПб., 2000, с 87-88
5. Краснодембская А.Д., Алешина Г.М., Лодыгин П.А., Овчинникова Т.В., Краснодембский Е.Г., Кокряков В.Н. Новые антимикробные пептиды из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* (*Polychaeta, Annelida*) // Вестник СПбГУ, 2001, Сер 3, вып.4, №27, с.104-108
6. Краснодембская А.Д., Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Краснодембский Е.Г. Новые данные об антимикробных пептидах у пескожила *Arenicola marina* (*Annelida, Polychaeta*) // Материалы V научной сессии морской биологической станции Санкт-Петербургского Государственного Университета, СПб., 2004, с.9-10
7. Краснодембская А.Д., Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В., Краснодембский Е.Г. Описание двух новых антимикробных пептидов из целомоцитов кольчатого червя

Arenicola marina. Съезд Иммунологов России Russian Journal of Immunology, 2004, vol 9, suppl. 1, p. 74

8 Овчинникова Т В , Алешина Г М , Баландин С В , Маркелов М Л , Краснодембская А Д, Кокряков В. Н Пептидные антибиотики асеницины из морского червя *Arenicola marina*, принадлежащие к новому структурному типу антимикробных пептидов и обладающие широким спектром антимикробного действия // Заявка на патент РФ

№2004103808/13(004051), зарегистрирована 10.02.2004 г., 10 с.

9 Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Шамова О.В., Леонова Л.Е., Лодыгин П.А., Цесткова Е.В., Берлов М.Н., Краснодембская А.Д., Меньшенин А.В. Антибиотические пептиды как регуляторные молекулы // Нервная система, 2004, вып 37, с 52-63

10 Краснодембская А.Д., Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Попова В.А., Краснодембский Е.Г. Оценка разнообразия антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* (*Annelida, Polychaeta*) // Вестник СПбГУ, 2004, Сер.3, Вып 4, с. 93-97

11 Краснодембская А.Д., Краснодембский Е.Г., Кокряков В.Н. Асеницин, новый антимикробный пептид из целомоцитов беломорской полихеты *Arenicola marina* может быть хемоаттрактантом // "Естествознание и гуманизм" Сборник научных работ под редакцией акад. Н.Н. Ильинских, Сибирский Государственный Медицинский Университет, Томск, 2004, Том 1, N1, с.68-70

12. Ovchinnikova T, Aleshina G, Balandin S., Krasnodembskaya A, Markelov M, Frolova E, Leonova Y, Tagaev A, Krasnodembsky E, Kokryakov V Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* // FEBS Lett, 2004, vol. 577, p.209-214.

Подписано в печать 04.04.05. Формат 60x84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л.0.93. Тираж 100 экз.Заказ № 12.

ЦОП типографии Издательства СПбГУ.
199061, С-Петербург, Средний пр., 41.

4

0

1

6

7

2

€ 8340

РНБ Русский фонд

2006-4

5440