

Е. И. Ильина, М. Н. Берлов, Я. А. Дубровский, Е. Г. Богомолова, В. Н. Кокряков

АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ ЛИСИЦЫ *VULPES VULPES**

Введение

Накопленные к настоящему времени данные позволяют сделать вывод о том, что антимикробные пептиды (АМП) являются одним из ключевых молекулярных компонентов системы врожденного иммунитета млекопитающих [1–4]. Большинство АМП млекопитающих — кодируемые генами антибиотики эволюционно древней системы защиты. Однако, важную физиологическую роль могут играть также АМП, представляющие собой продукты ограниченного протеолиза более крупных белков. В частности, одним из первых примеров такого рода было описание антимикробной активности производных гистонов [5].

Как правило, АМП обладают относительно низкой токсичностью по отношению к клеткам собственного организма, а резистентность к ним микробов вырабатывается медленнее, чем к традиционным антибиотическим агентам. Помимо непосредственного антимикробного действия, АМП нередко проявляют целый ряд иммуномодулирующих эффектов [1, 2]. В связи с этим выделение, очистка и структурно-функциональное изучение АМП животных создает предпосылки для разработки и производства гомологов подобных соединений и их внедрения в медицину и ветеринарию как дополнения, а в ряде случаев альтернативы конвенциональным антибиотикам.

Важную роль в изучении АМП играют сравнительные исследования их структурно-функциональных свойств, так как известно, что набор и структура АМП у разных видов животных даже в пределах одного семейства могут сильно варьировать. В нашей лаборатории ранее уже были проведены исследования спектра АМП лейкоцитов собаки [6] и песца [7], в связи с чем представляло интерес изучение АМП еще одного представителя семейства псовых — лисицы *Vulpes vulpes*. В настоящей работе мы выделили из лейкоцитов лисицы новый антимикробный пептид, являющийся фрагментом гистона H4, и охарактеризовали его по ряду структурных и функциональных свойств.

Ильина Елена Игоревна — студент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: elena.igorevna.ilina@gmail.com

Берлов Михаил Николаевич — канд. биол. наук, старший преподаватель, Санкт-Петербургский государственный университет; научный сотрудник, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН; e-mail: m.berlov@bio.spbu.ru

Дубровский Ярослав Александрович — аспирант, НИИ аналитического приборостроения РАН; e-mail: jar.chem@mail.ru

Богомолова Елена Григорьевна — студент, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Кокряков Владимир Николаевич — д-р биол. наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет; руководитель лаборатории, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН; e-mail: kokryak@yandex.ru

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №12-04-01573а).

© Е. И. Ильина, М. Н. Берлов, Я. А. Дубровский, Е. Г. Богомолова, В. Н. Кокряков, 2013

Методы исследования

Выделение пептида. Суспензия лейкоцитов лисицы *Vulpes vulpes* в дистиллированной воде хранилась при температуре -20°C . Материал размораживали, затем центрифугировали в течение 30 мин при 15 000 g. К осажденным клеткам добавляли 20 мл 10%-ной уксусной кислоты, гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера (стекло-тефлон) и инкубировали 2,5 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. После этого смесь центрифугировали в течение 30 мин при 15 000 g и отбирали супернатант.

Полученный экстракт подвергали последовательному хроматографическому фракционированию методами гель-фильтрации и офВЭЖХ. Для гель-фильтрации использовали колонку с биогелем P-10 высотой 90 см, диаметром 3,5 см. В качестве элюирующего буфера использовали 5%-ную уксусную кислоту. Для офВЭЖХ использовали колонку Supelco (Sigma-Aldrich) C18 длиной 25 см, диаметром 0,46 см и размером гранул 5 мкм. Пробу наносили в гидрофильном растворителе (0,1% ТФУ), в ходе хроматографического разделения увеличивали концентрацию ацетонитрила в элюенте (до 20% за первые 10 мин, затем — до 65% за 45 мин и до 100% за 15 мин).

Гомогенность материала в полученных фракциях анализировали с помощью электрофореза в 16%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Г. Шаггера и Г. фон Джагова [8].

Выявление дисульфидных связей. Для определения наличия или отсутствия дисульфидных связей в молекуле анализируемого пептида проводили окисление пробы надмуравьиной кислотой [9]. Пробы инкубировали на ледяной бане с реагентом (450 мкл муравьиной кислоты и 50 мкл 30%-ного пероксида водорода) в течение 2 ч. Затем избыток надмуравьиной кислоты удаляли двумя промывками дистиллированной водой, пробы лиофилизировали, применяя аппарат SpeedVac Savant. Результаты анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном ПААГ при кислых значениях pH по методу С. Паньима и Р. Челкли [10]. В качестве положительного контроля использовали лизоцим человека — белок, содержащий 4 дисульфидные связи.

Определение антимикробной активности. Для анализа антимикробной активности проб по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям — *Listeria monocytogenes* (штамм EGD) и *Escherichia coli* (штамм ML-35p), соответственно — использовали метод радиальной диффузии [11]. На чашках Петри, залитых агарозой, содержащей клетки микробов, размещали анализируемые пробы в лунках диаметром 1,5 мм из расчета 0,5 мкг белка на лунку. Также на чашки наносили положительный (ультрафильтрат экстракта из лейкоцитов крови кролика, содержащий дефенсины) и отрицательный (0,01% уксусная кислота) контроль. Чашки Петри с пробами инкубировали при температуре 37°C в течение 3 ч, затем добавляли агарозу с питательной средой и инкубировали 18 ч при температуре 37°C . О наличии антимикробной активности в пробах свидетельствуют зоны ингибирования роста, представляющие собой прозрачные участки на фоне помутневшей агарозы.

Масс-спектрометрический анализ. Образцы для проведения анализа растворяли в 10 мкл 0,1%-ной ТФУ в воде. На мишень наносили 0,5 мкл матрицы (синапиновой кислоты) (20 мг/мл в 0,1%-ной ТФУ в 50%-ном ацетонитриле) и 0,5 мкл образца. Затем высушивали на воздухе. Использовали времяпролетный масс-спектрометр Axima Performace с источником MALDI, оснащенный УФ-лазером (337 нм). Детектировали положительные ионы в диапазоне m/z от 4 000 до 20 000 Д. Масс-спектры регистрировали

при помощи программы MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония). Обработку спектров, полученных при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF Axima, проводили в программе MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония).

Для проведения триптического гидролиза пептида пробу растворяли в 25 мМ бикарбонате аммония до концентрации 0,1 мг/мл, добавляли раствор трипсина (массовое соотношение пептид : трипсин, 50 : 1) и инкубировали в течение ночи при температуре 37 °С.

Результаты исследования

Путем последовательного хроматографического разделения материала экстракта 10%-ной уксусной кислотой из лейкоцитов крови лисицы методами гель-фильтрации и оФВЭЖХ был получен в гомогенном виде антимикробный пептид с молекулярной массой 4690 Д. Электрофореграмма очищенного пептида представлена на рис. 1, масс-спектр — на рис. 2. В ходе гель-фильтрации данный пептид характеризовался объемом элюции 167 мл, а в ходе оФВЭЖХ элюировался с колонки при концентрации ацетонитрила 44%. Показано, что пептид проявляет выраженную антимикробную активность по отношению к *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* (рис. 3). Тест на наличие дисульфидных связей не выявил их в данном пептиде (результаты не представлены).

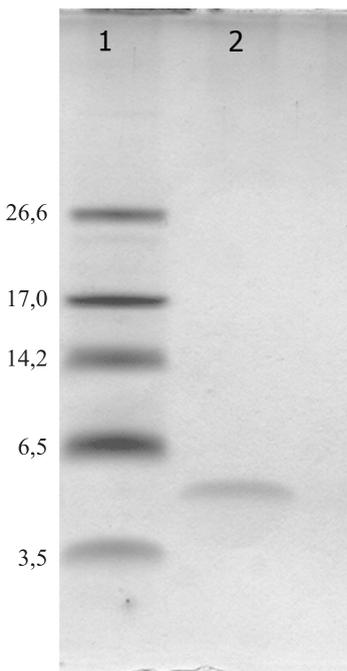


Рис. 1. Электрофореграмма очищенного пептида из лейкоцитов лисицы:

1 — стандартные белки с известной молекулярной массой (значения молекулярной массы в кД приведены слева); 2 — пептид.

С целью определения первичной структуры пептида были осуществлены его расщепление трипсином и последующий масс-спектрометрический анализ полученных фрагментов (рис. 4). Как видно из рис. 4, выявлено 4 мажорных пика, соответствующих фрагментам с молекулярными массами приблизительно 1179,6, 1335,7, 1480,8, 1593,9 Д. Анализ данных, проведенный с помощью программы MASCOT, позволил идентифицировать полученные фрагменты как фрагменты гистона Н4 (таблица).

Следует отметить, что гистон Н4 является одним из наиболее консервативных белков в эволюции эукариот [12]; широко известным, в частности, является факт различия первичных структур гистонов Н4 коровы и гороха всего лишь по двум аминокислотам [13]. К настоящему времени сведения о гистоне Н4 лисицы отсутствуют в базах данных, таких как Uniprot, GenBank. Однако имеется информация о гистоне Н4 другого представителя этого же рода животных — *Vulpes zerda* (фенек): известна первичная структура фрагмента, включающего 43 аминокислотных остатка [14], который полностью совпадает с фрагментом 31–73 гистона Н4 человека [15]. Также известна первичная структура гистона Н4 другого представителя семейства псовых — собаки *Canis lupus familiaris*, рассчитанная на основании секвенированной последовательности нуклеотидов гена этого белка [16]. Первичные структуры гистонов Н4 собаки и человека идентичны.

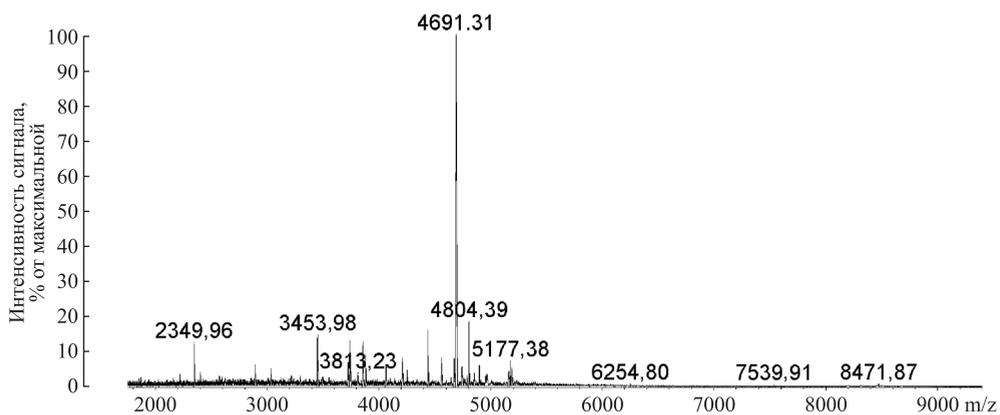


Рис. 2. Масс-спектр пептида из лейкоцитов лисицы

По оси абсцисс — отношение молекулярной массы (Д) к заряду иона (m/z); по оси ординат — интенсивность сигнала в процентах от максимальной. Значение m/z 4 691 для однозарядного иона соответствует значению молекулярной массы 4 690 Д.

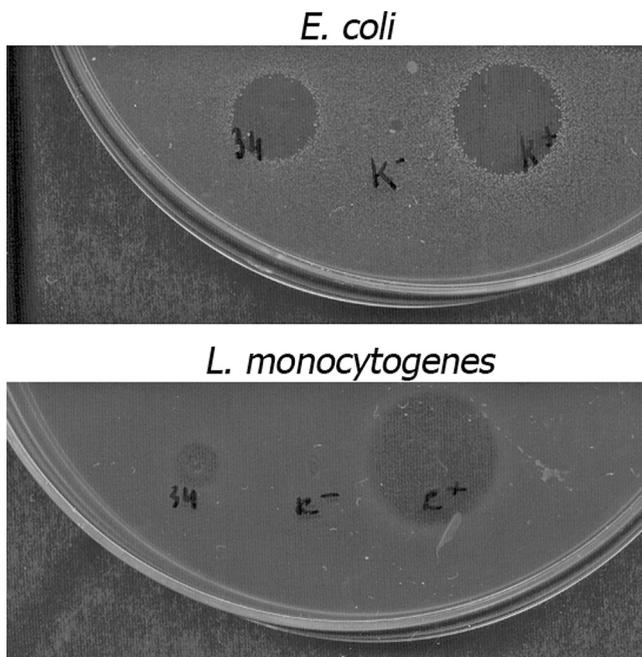


Рис. 3. Результаты антимикробного теста пептида из лейкоцитов лисицы методом радиальной диффузии по отношению к *E. coli* (вверху) и *L. monocytogenes* (внизу)

Пробы слева направо — пептид; отрицательный контроль (0,01%-ная уксусная кислота); положительный контроль (тотальный дефенсин кролика).

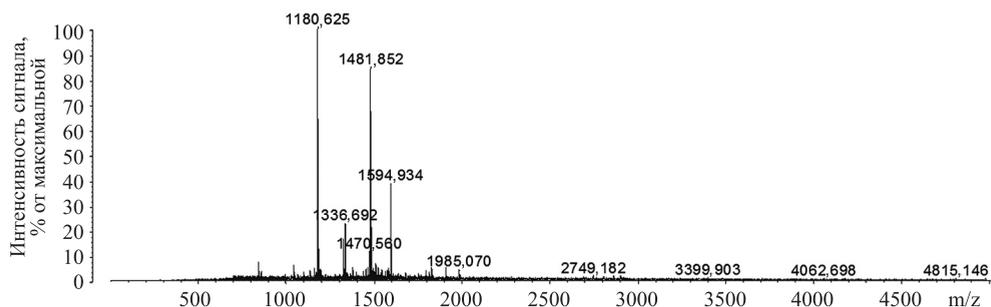


Рис. 4. Масс-спектр продуктов триптического гидролиза пептида из лейкоцитов лисицы. По оси абсцисс — отношение молекулярной массы (Д) к заряду иона (m/z); по оси ординат — интенсивность сигнала в процентах от максимальной.

Фрагменты гистона Н4, идентифицированные в результате анализа масс-спектра триптического гидролизата антимикробного пептида, выделенного из лейкоцитов лисицы

Положение в полипептидной цепи гистона Н4	Молекулярная масса (экспериментальная), Д	Молекулярная масса (расчетная), Д	Аминокислотная последовательность
46–55	1179,6060	1179,6135	R. ISGLIYEETR. G
45–55	1335,6717	1335,7146	K. RISGLIYEETR. G
23–35	1480,8349	1480,8474	L. RDNIQGITKPAIR. R
22–35	1593,9239	1593,9314	V. LRDNIQGITKPAIR. R

Таким образом, выделенный нами пептид по данным масс-спектрометрического анализа включает в себя фрагменты гистона Н4, ограниченные остатками 22–35 и 45–55. Молекулярная масса пептида составила 4690 Д (см. рис. 2). Чтобы восстановить его полную первичную структуру, необходимо было подобрать такой участок аминокислотной последовательности гистона Н4, который соответствовал бы данной молекулярной массе и полностью покрывал бы фрагменты 22–35 и 45–55. Из всех возможных вариантов данным требованиям более всего соответствует участок 19–59 (молекулярная масса — 4688,6 Д) (рис. 5), поскольку отклонение молекулярной массы от экспериментально полученного значения — менее 2 Д. Во всех прочих возможных вариантах отклонение превышает 5 Д. Таким образом, мы предполагаем, что выделенный нами пептид по своей первичной структуре соответствует участку 19–59 гистона Н4.



Рис. 5. Первичная структура гистона Н4

Жирным шрифтом выделена аминокислотная последовательность пептида из лейкоцитов лисицы.

Обсуждение результатов исследования

В ходе этой работы мы выделили из лейкоцитов лисицы антимикробный пептид, соответствующий фрагменту гистона H4 19–59. Следует отметить, что данная аминокислотная последовательность полностью включает в себя первичную структуру четырех антимикробных пептидов, выделенных нами ранее из лейкоцитов собаки [6] (в цитируемой работе структуры не приведены) (рис. 6).

Антимикробная активность ядерных катионных белков — гистонов — представляет собой широко известный феномен, детально изученный в работах отечественных и зарубежных исследователей [5, 17–18]. Однако установленная в условиях *in vitro* антимикробная активность гистонов сама по себе не давала оснований приписывать им соответствующую физиологическую функцию. В настоящее время рассматривается концепция нейтрофильных экстраклеточных ловушек — NETs (Neutrophil Extracellular Traps), предусматривающая, в частности, реализацию антимикробного потенциала ядерных гистонов в физиологических условиях [19, 20]. Согласно этой концепции, после активации нейтрофильные гранулоциты могут высвобождать из клетки фрагменты хроматина и гранулярные белки, которые, в свою очередь, сорбируются на хроматине. В результате формируются внеклеточные структуры, способствующие элиминации патогенов, циркулирующих в кровотоке, за счет повышения локальной концентрации антимикробных белков и пептидов (включая как белки гранулярного происхождения, так и ядерные гистоны) и создания физико-химического барьера, предотвращающего дальнейшее распространение как бактерий, так и самих антимикробных веществ, которые, в противном случае, могут вызвать аутоповреждение структур организма хозяина.

Немало сведений имеется в литературе и об антимикробной активности фрагментов гистонов, выделенных из различных природных источников. В составе нейтрофильных экстраклеточных ловушек многие молекулы гистонов присутствуют в частично деградированной форме [19]. Часто АМП, являющиеся фрагментами гистонов, обнаруживают в слизистой кожи рыб: из различных видов были выделены производные гистонов H1, H2A, H2B [21–23]. В желудке азиатской жабы *Bufo bufo gargarizans* обнаружен АМП буфорин I — производное гистона H2A [24]. Фрагменты гистона H1 с антимикробной активностью находили и в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта человека [25]. Наконец, источником АМП — производных гистонов — нередко становятся и лейкоциты. Активные фрагменты гистона H1 обнаружены в стимулированных гранулоцитах человека [26]. Антимикробные пептиды, являющиеся фрагментами гистона H2A, были выделены и из лейкоцитов русского осетра *Acipenser guldenstadti* [27]. Как уже отмечалось выше, фрагменты гистона H4 с антимикробной активностью, представляющие собой укороченные варианты пептида, исследованного в данной работе, были ранее выделены из лейкоцитов собаки *Canis lupus familiaris* [6].

Есть основания предполагать, что, по крайней мере, в части рассмотренных случаев образование протеолитических фрагментов гистонов, обладающих антимикробной

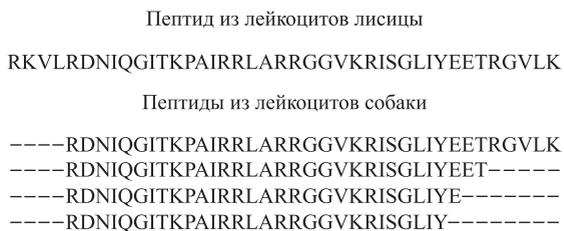


Рис. 6. Сравнение первичной структуры пептида из лейкоцитов лисицы и четырех пептидов из лейкоцитов собаки, выделенных ранее [6]

активностью, происходит в физиологических условиях и является этапом реализации защитных механизмов организма. Однако в нашем случае генерация антимикробного пептида, скорее всего, происходит в ходе препаративного эксперимента при гомогенизации лейкоцитов, что нарушает внутриклеточную компартментализацию и делает ядерные белки — гистоны — доступными действию внутриклеточных протеиназ. Тем не менее высокая антимикробная активность полученного фрагмента гистона H4 позволяет рассматривать его как перспективную матрицу для разработки пептидных антибиотиков нового поколения для медицины и ветеринарии.

Литература

1. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета / Кокряков В. Н., Алешина Г. М., Шамова О. В., Орлов Д. С., Андреева Ю. В. // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. С. 149–160.
2. Choi K.-Y., Chow L. N. Y., Mookherjee N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation // *J. Innate Immun.* 2012. Vol. 4. P. 361–370.
3. Guani-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Teran L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease // *Clin. Immunol.* 2010. Vol. 135. P. 1–11.
4. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application / Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. // *Peptides.* 2012. Vol. 37. P. 207–215.
5. Антибактериальные и антивирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования / Ашмарин И. П., Ждан-Пушкина С. М., Кокряков В. Н., Самедов А. Ш., Антонова С. А. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1972. № 4. С. 502–508.
6. Кораблева Е. С., Берлов М. Н., Андреева Ю. В., Кокряков В. Н. Антимикробный пептид из лейкоцитов собаки: структурно-функциональные свойства // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2007. Вып. 3. С. 80–88.
7. Выделение и характеристика антимикробных низкомолекулярных белков из лейкоцитов крови голубого песца *Alopex lagopus* / Богомолова Е. Г., Берлов М. Н., Дубровский Я. А., Кораблева Е. С., Кокряков В. Н. // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2012. Вып. 1. С. 47–59.
8. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 — 100 kDa // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 166. P. 368–379.
9. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977. 123 с.
10. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. Vol. 130. P. 337–346.
11. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / Lehrer R. I., Rosenman M., Harwing S. S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. Vol. 137. P. 167–173.
12. Piontkivska H., Rooney A. P., Ney M. Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19. P. 689–697.
13. DeLange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J. Calf and pea histone IV.3. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 5669–5679.
14. The Universal Protein Resource. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6B830> (дата обращения: 8.10.2012).
15. The Universal Protein Resource. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P62805> (дата обращения: 8.10.2012).
16. The Universal Protein Resource. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/F2Z4N2> (дата обращения: 8.10.2012).
17. Ждан-Пушкина С. М. О действии протаминов, гистонов и полипептидов основного характера на микроорганизмы // Науч. докл. высшей школы. 1973. Вып. 8. С. 82–98.
18. Hirsch J. G. Bactericidal action of histone // *J. Exp. Med.* 1958. Vol. 108. P. 925–944.
19. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? // *J. Cell Biol.* 2012. Vol. 198. P. 773–783.
20. Papayannopoulos V., Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons // *Trends Immunol.* 2009. Vol. 30. P. 513–521.

21. *Fernandes J.M., Kemp G.D., Molle M.G., Smith V.J.* Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Biochem. J.* 2002. Vol. 368. P.611–620.
22. Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin / *Patrzykat A., Zhang L., Mendoza V., Iwama G.K., Hancock R.E.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45. P.1337–1342.
23. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins / *Robinette D., Wada S., Arroll T., Levy M.G., Miller W.L., Noga E.J.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 1998. Vol. 54. P.467–475.
24. *Park C.B., Kim M.S., Kim S.C.* A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 218. P.408-413.
25. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract / *Rose F.R., Bailey K., Keyte J.W., Chan W.C., Greenwood D., Mahida Y.R.* // *Infect. Immun.* 1998. Vol. 66. P.3255–3263.
26. Antibacterial peptides in stimulated human granulocytes: characterization of ubiquitinated histone H1A / *Wang Y., Griffiths W.J., Jornvall H., Agerberth B., Johansson J.* // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. P.512–518.
27. Антимикробные пептиды из лейкоцитов русского осетра (*Acipenser guldenstadti*) / *Шамова О.В., Орлов Д.С., Овчинникова Т.В., Сал Х.Г., Тверьянович И.А., Попова В.А., Орлов С.Б., Дюбин В.А., Кокряков В.Н.* // *Фундаментальные исследования. Биологические науки.* 2006. № 1. С.10–13.

Статья поступила в редакцию 11 декабря 2012 г.