



УДК 577.112.6

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПАУКА *Lachesana tarabaevi*

© 2007 г. А. А. Василевский<sup>\*,#</sup>, С. А. Козлов<sup>\*</sup>, М. Н. Жмак<sup>\*</sup>, И. А. Куделина<sup>\*</sup>, П. В. Дубовский<sup>\*</sup>, О. Я. Шатурский<sup>\*\*</sup>, А. С. Арсеньев<sup>\*</sup>, Е. В. Гришин<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>\*\*</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9

Поступила в редакцию 26.06.2006 г. Принята к печати 31.10.2006 г.

Осуществлен химический синтез аналогов латарцинов Ltc1 и Ltc3b – антимикробных пептидов, способных формировать амфифильные структуры в мембранном окружении без участия дисульфидных связей, выделенных из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi*. Последовательности аналогов соответствуют незрелым формам этих пептидов и содержат по одному дополнительному С-концевому аминокислотному остатку. На основании изучения биологической активности синтезированных аналогов сделан вывод, что в случае латарцина 3b посттрансляционное С-концевое амидирование является функционально важной модификацией и обеспечивает высокую активность зрелого пептида. Изучение взаимодействия синтезированных пептидов с модельными мембранами показало, что его характер зависит от липидного состава мембран. Установлено, что аналог латарцина 3b наиболее активен в отношении мембран, содержащих холестерин. На основании полученных результатов обсуждается механизм действия исследованных антимикробных пептидов на мембраны.

*Ключевые слова:* антимикробные пептиды; бислойные липидные мембраны; липосомы; амфифильная спираль; посттрансляционные модификации.

### ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы различного систематического положения продуцируют пептиды, обладающие антимикробными свойствами и получившие название антимикробных пептидов (АМП). В настоящее время АМП обнаружены практически во всех исследованных организмах [1, 2]. На основании многочисленных экспериментальных данных сформировано представление об АМП как об универсальном и эволюционно древнем механизме защиты высших организмов от инфекции и орудии в конкурентной борьбе у микроорганизмов [3].

Исследование АМП имеет большое практическое значение, так как они обладают рядом преимуществ перед прочими антибиотиками: отсутствие токсичности по отношению к клеткам макроорганизма, широкий спектр действия, включающий

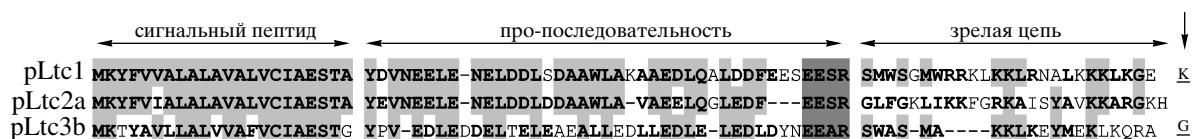
резистентные к другим антибиотикам штаммы, малая вероятность возникновения мутантов, устойчивых к действию АМП. Учитывая снижение со временем эффективности обычных антибиотиков, последнее свойство АМП позволяет рассматривать их в качестве основы для создания лекарственных средств нового поколения [4].

Большинство АМП имеют небольшой размер и не содержат остатков цистеина. Такая структурная особенность значительно облегчает их производство химическим или биотехнологическим путем. Линейные АМП были выделены из кишечника и крови млекопитающих, кожных желез амфибий, гемолимфы и ядов членистоногих [2, 5, 6]. Наибольшим разнообразием отличаются линейные АМП из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi*. Среди них были обнаружены 7 АМП, получивших название латарцины, еще 5 были идентифицированы при анализе транслированных нуклеотидных последовательностей [7]. Полные аминокислотные последовательности зрелых цепей всех латарцинов, а также структуры белков-предшественников известны и опубликованы в базе данных UniProt (<http://www.pir.uniprot.org/>) под номерами Q1ELT9, Q1ELU0–Q1ELU5, Q1ELU7–Q1ELU9, Q1ELV0.

При сравнении структуры зрелых латарцинов, выделенных из яда, со структурой белков-пред-

Сокращения: DOPG – диолеилфосфатидилглицерин; DOPC – диолеилфосфатидилхолин; DOPe – диолеилфосфатидилэтанолламин; TBUTU – O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий тетрафторборат; АМП – антимикробный пептид; БЛМ – бислойная липидная мембрана; СВФ – карбоксифлуоресцеин; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; TFE – трифторэтанол; МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (495) 336-6540; факс: (495) 330-7301; эл. почта: avas@ibch.ru).



**Рис. 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей белков-предшественников латарцинов 1, 2а и 3b (pLtc1, pLtc2a и pLtc3b соответственно) [7]. Сходные аминокислотные остатки выделены полужирным, идентичные – серым. Сайт процессинга пропептидов выделен темно-серым. Стрелкой указаны отщепляемые в ходе созревания C-концевые аминокислоты (лизин у Ltc1, глицин у Ltc3b), которые сохранены в последовательностях синтезированных аналогов (Ltc1-K и Ltc3b-G).

шественников, идентифицированных по транслированным нуклеотидным последовательностям и включающих отщепляемый в ходе процессинга N-концевой фрагмент, для ряда пептидных молекул было обнаружено наличие посттрансляционных модификаций. В составе белков-предшественников латарцинов 3a, 3b, 4a, 4b и 5 отмечено наличие дополнительного C-концевого остатка глицина, отщепляемого в ходе созревания с одновременным амидированием предшествующего остатка. Латарцин 1 в составе белка-предшественника содержит дополнительный C-концевой остаток лизина, который также отщепляется в ходе созревания. Оба типа посттрансляционных модификаций весьма распространены для секретруемых полипептидных молекул, в том числе АМП [8–10]. Для изучения функциональной значимости указанных посттрансляционных модификаций пептидов мы синтезировали аналоги латарцинов 1 и 3b с последовательностями, соответствующими непроцессированным формам природных молекул, и исследовали их биологическую активность.

**Таблица 1.** Содержание (%) элементов вторичной структуры в пептидах Ltc3b-G, Ltc1-K и Ltc2a по данным спектроскопии КД

Пептид	Условия	$\alpha$ -Спираль	$\beta$ -Структура	$\beta$ -Поворот	Клубок
Ltc3b-G	Вода	40	13	21	26
	50% TFE	76	2	4	18
Ltc1-K	Вода	7	28	22	43
	50% TFE	67	4	7	22
Ltc2a	Вода	6	30	23	41
	50% TFE	69	4	7	20

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Химический синтез аналогов латарцинов

На основании сведений о посттрансляционных модификациях латарцинов для синтеза были выбраны три аминокислотные последовательности (рис. 1). Последовательность Ltc1-K соответствовала структуре зрелого латарцина 1, удлиненной на C-концевой аминокислотный остаток лизина. Пептид Ltc3b-G соответствовал латарцину 3b (без амидной группы на C-концевом аланине), удлиненному на C-концевой остаток глицина. Третья аминокислотная последовательность Ltc2a полностью соответствовала латарцину 2a и была выбрана в качестве контрольного соединения. Выбранные пептиды были синтезированы твердофазным методом в количестве нескольких миллиграмм; содержание примесей в синтетических препаратах по данным ВЭЖХ не превышало 1%. Масс-спектрометрический анализ подтвердил корректность аминокислотных последовательностей синтезированных пептидов: Ltc3b-G характеризовался средней молекулярной массой 2483.7 Да (расчетное значение 2484.0 Да), Ltc1-K – 3201.7 Да (расчетная масса 3202.0 Да), Ltc2a – 2902.2 Да (расчетная масса 2902.6 Да).

### Исследование вторичной структуры

Все синтезированные пептиды анализировали при помощи спектроскопии КД с целью определения относительного содержания элементов вторичной структуры. Спектры КД были измерены в воде и 50%-ном трифторэтаноле, имитирующем мембранное окружение (рис. 2 и табл. 1).

В воде пептиды имели преимущественно неупорядоченную структуру.  $\alpha$ -Спиральная структура (~40%) была обнаружена только у Ltc3b-G, что является необычным для линейных пептидов. Использование TFE для имитации мембранного окружения является обычной практикой при изучении АМП [11–14]. Пространственная организация большинства линейных АМП при контакте с

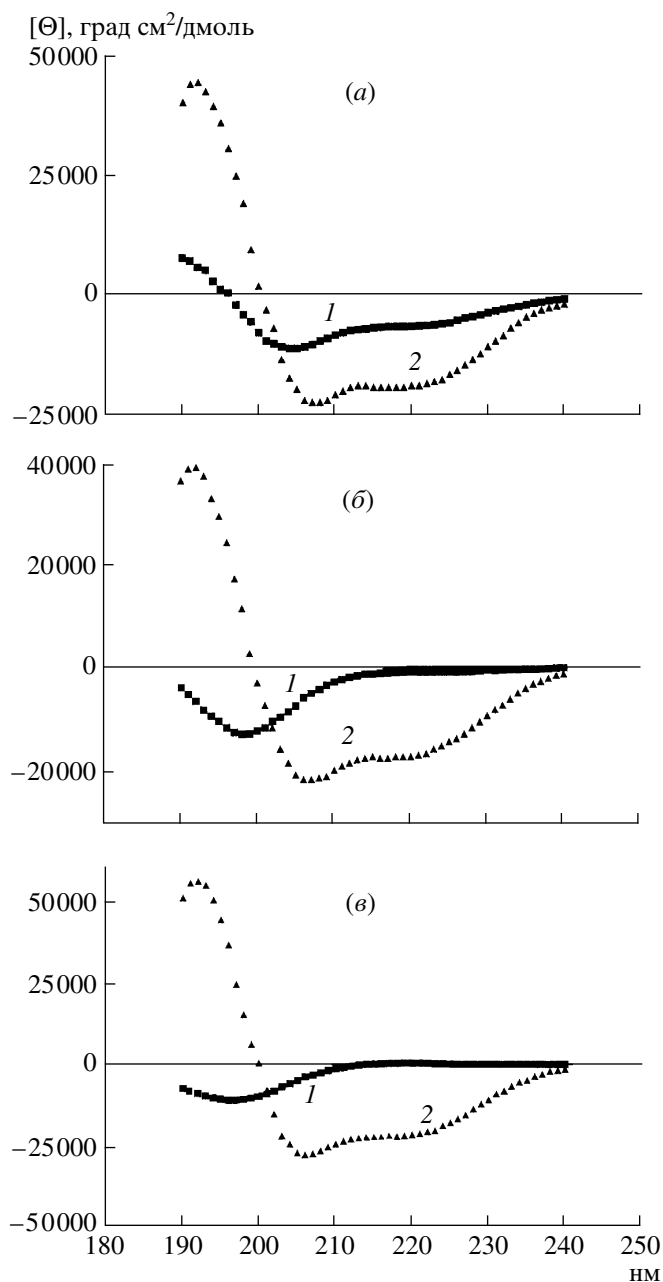
липидными структурами (мицеллы, липосомы, мембраны и т.п.) значительно изменяется, и пептиды принимают упорядоченную конформацию  $\alpha$ -спирали [2]. В 50%-ном TFE синтезированные пептиды преимущественно формировали упорядоченные  $\alpha$ -спиральные структуры (табл. 1). Сравнение результатов, полученных для синтезированных пептидов, с данными для соответствующих зрелых латарцинов [7] показывает отсутствие значительной разницы в их вторичных структурах, т.е. рассматриваемые посттрансляционные модификации не вносят существенных изменений во вторичную структуру латарцинов.

*Взаимодействие пептидов с искусственными мембранами*

Считается, что действие большинства АМП на клетки обусловлено их способностью взаимодействовать с клеточной мембраной и вызывать ее дестабилизацию и разрыв. Предложено несколько моделей, описывающих механизм действия АМП на мембрану [1]: формирование пептидных пор за счет олигомеризации определенным образом ориентированных молекул пептида в мембране; формирование липид-пептидных пор (поры формируются не только молекулами пептида, но и липидами), имеющих тороидальную конфигурацию; и глобальное нарушение структуры мембраны за счет множественного поверхностного связывания молекул пептида, так называемый “ковровый” механизм. Судя по данным, опубликованным ранее, характер действия латарцинов согласуется с “ковровым” механизмом [7].

Для подтверждения мембранной активности синтезированных пептидов было изучено их действие на липосомы, содержащие во внутреннем объеме флуоресцентный краситель – карбокси-флуоресцеин (CBF) в концентрации 50 мМ, при которой происходит самотушение флуоресценции этого красителя. Утечка CBF из липосом в окружающий водный раствор, вызванная лизирующим воздействием пептида, приводила к усилению флуоресценции образца. Выход CBF из липосом характеризовали параметром *R* (см. “Эксперимент. часть”). Экспериментальные данные, полученные для зависимости *R* от концентрации пептидов, приведены на рис. 3.

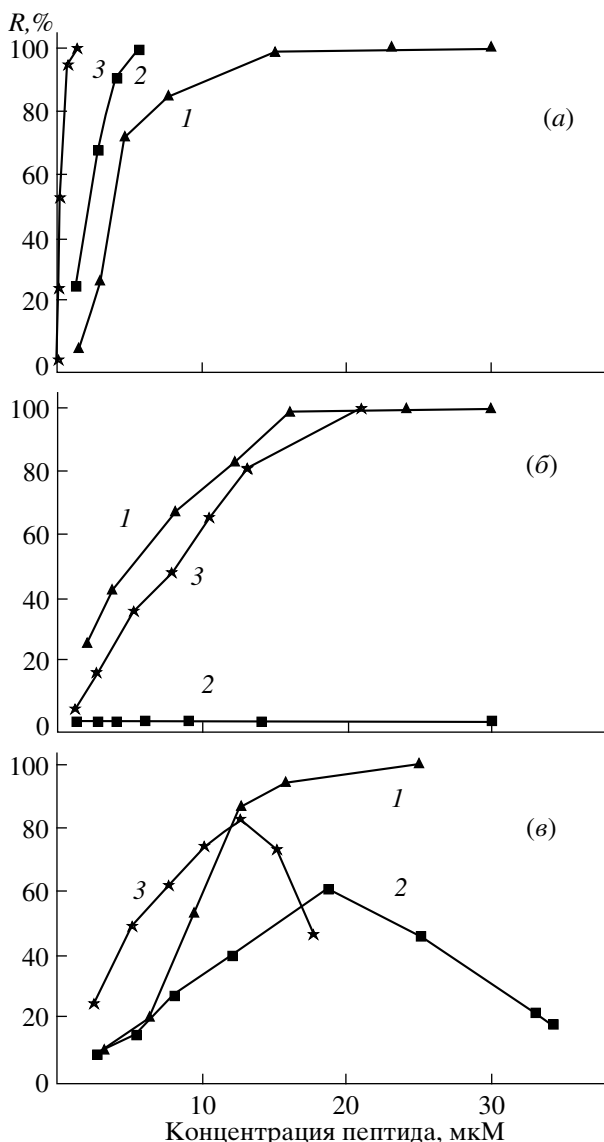
Способность АМП связываться с мембранами зависит от липидного состава последних [1, 2], поэтому каждый пептид тестировали на липосомах трех различных составов. Липосомы, состоящие из цвиттерионного диолеилфосфатидилхолина (DOPC), условно моделировали состав мембран эукариотических клеток; липосомы, состоящие из анионного диолеилфосфатидилглицерина (DOPG), моделировали клеточную мембрану грамположительных бактерий, а липосомы смешанного состава (DOPG с цвиттерионным диолеилфос-



**Рис. 2.** Спектры КД пептидов Ltc3b-G (а), Ltc1-K (б) и Ltc2a (в) в воде (1) и 50%-ном водном TFE (2). Концентрация пептидов 0.1 мМ. Ширина кюветы 0.01 см.

фатидилэтаноламином, DOPE) – цитоплазматическую мембрану грамотрицательных бактерий.

Как видно из рис. 3, действие тестируемых соединений действительно сильно зависело от состава липосом. Наибольшую активность все соединения проявляли на нейтральных цвиттерионных DOPC-липосомах. При увеличении содержания отрицательно заряженных липидов (DOPG) активность Ltc3b-G и Ltc2a снижалась. Необычно проявил себя пептид Ltc1-K, который будучи пол-



**Рис. 3.** Зависимость выхода флуоресцентного красителя CBF из липосом от концентрации Ltc3b-G (1), Ltc1-K (2) и Ltc2a (3). Диаметр липосом 100 нм. Индекс *R* соответствует доле (в %) CBF, вышедшего из липосом. Липосомы приготовлены из DOPC (а), из смеси DOPG и DOPE (1 : 1) (б) и из DOPG (в). Спад кривых 2 и 3 на рис. в, по-видимому, связан с увеличением светорассеивания вследствие пептид-индуцированного слияния липосом.

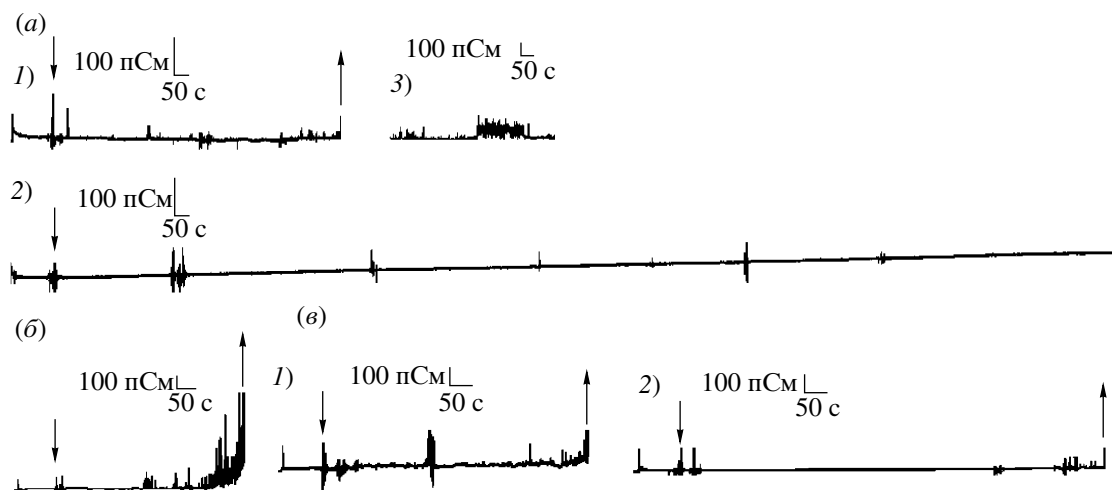
ностью неактивным на липосомах смешанного состава (DOPG/DOPE) обладал умеренной активностью на липосомах из чистого DOPG и был очень активен на липосомах из чистого DOPC. Следует отметить, что данные, полученные на липосомах, в некоторых случаях не согласуются с результатами биологических тестов (см. ниже), что может объясняться недостаточной адекватностью использованной модельной системы.

Для исследования механизма действия АМП мы провели эксперименты на бислойных липидных мембранах (БЛМ). Так как наиболее выраженный эффект пептидов наблюдался на DOPC-липосомах (см. рис. 3), то для имитации мембран клеток млекопитающих были выбраны БЛМ, состоящие из смеси фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 2 : 1.

В этой модельной системе исследуемые пептиды в диапазоне концентраций 0.1–1 мкМ дестабилизировали мембрану, что выражалось в разрыве мембраны через 5–20 мин, как правило, без предшествующих изменений проводимости (см. рис. 4а, 1; б; в; показано для концентраций пептидов 0.5 и 1 мкМ). Увеличение концентрации пептидов приводило к уменьшению времени жизни БЛМ. Так, под действием 0.5 мкМ Ltc2a мембрана разрушалась в среднем через 15 мин, а при увеличении концентрации этого пептида до 1 мкМ – через 7 мин (рис. 4в). Напротив, при более низких концентрациях пептидов (<0.1 мкМ) мембрана сохраняла свою целостность в течение нескольких часов, но уже через 25–70 мин, в зависимости от концентрации пептидов, можно было зарегистрировать ионную проводимость (см. рис. 4а, 3; показано для 1 нМ Ltc3b-G).

Скачкообразные изменения проводимости обусловлены, на наш взгляд, появлением локальных дефектов в строении плоской бислойной мембраны, вызванных связавшимися молекулами пептида. Подобные дефекты способствуют появлению нестабильных короткоживущих липидных или пептид-липидных пор, регистрируемых в виде неустойчивых и достаточно продолжительных скачкообразных возрастаний проводимости мембраны. Накопление дефектов с течением времени, вызываемое увеличением числа связавшихся молекул пептида, приводит к снижению общей стабильности мембраны и ее разрыву.

Таким образом, полученные данные в целом согласуются с “ковровым” механизмом действия изученных пептидов, предложенным ранее для латарцинов [7], однако данные, полученные на малых концентрациях пептидов, говорят также и в пользу механизма порообразования. Поэтому, на наш взгляд, и “ковровый” механизм, и модель образования пептид-липидных пор недостаточно адекватно описывают процесс взаимодействия латарцинов с мембраной. Наиболее подходящей для данного случая можно было бы считать некую промежуточную модель, согласно которой связывающиеся с мембраной молекулы пептида способны образовывать короткоживущие поры. При высокой концентрации пептидов они быстро накапливаются на поверхности мембраны и ее разрыв возникает без проявления отдельных дефектов. В этом случае конечный результат действия пептида согласуется с “ковровым” механизмом.



**Рис. 4.** Записи мембранного тока через БЛМ, сформированные из смеси фосфатидилхолин–холестерин, 2 : 1 (для случая *a*, 2 – 2 : 0.5) в присутствии пептидов: (*a*) Ltc3b-G в концентрации 1 мкМ (кривые 1, 2) и 1 нМ – показан фрагмент записи от 35 до 42 мин с момента добавления пептида (3), (*б*) Ltc1-K в концентрации 1 мкМ и (*в*) Ltc2a в концентрации 1 мкМ (1) и 0.5 мкМ (2). Мембранный потенциал 60 мВ. Введение пептидов обозначено стрелкой, направленной вниз. Стрелка, направленная вверх, обозначает разрыв БЛМ.

мом. Однако при низкой концентрации пептидов появляется возможность регистрации отдельных дефектов в виде одиночных флуктуаций мембранной проводимости.

Как было отмечено выше, активность АМП зависит от липидного состава мембран. Особо наглядно эта зависимость проявляется в случае Ltc3b-G. При уменьшении содержания холестерина в 2 и более раз активность Ltc3b-G снижалась (см. рис. 4а, 1 и 2; показано отсутствие изменения мембранной проводимости под действием 1 мкМ пептида при снижении содержания холестерина). Это позволяет выдвинуть предположение о избирательности взаимодействия этого пептида с мембранами, содержащими много холестерина.

*Биологическая активность АМП и функциональная значимость посттрансляционных модификаций*

Биологическую активность синтезированных пептидов оценивали по их способности ингибиро-

вать рост грамположительных (*Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий. В результате проведенных экспериментов были определены минимальные концентрации (МИК) пептидов, вызывающие полное ингибирование роста этих микроорганизмов *in vitro*. Значения МИК и эффективных концентраций пептидов, вызывающих гемолиз эритроцитов кролика, приведены в табл. 2, где для сравнения представлены также соответствующие данные, полученные ранее для латарцинов [7].

По своей антимикробной и гемолитической активности Ltc1-K не отличался от зрелого латарцина 1. Это означает, что удаление С-концевого остатка лизина в процессе созревания не сказывается на биологической активности этого пептида. Напротив, антибактериальная активность Ltc3b-G снизилась на порядок по сравнению с латарцином 3b. Таким образом, С-концевое амидирование является, вероятно, функционально значимой посттрансляционной модификацией для латарцинов.

**Таблица 2.** Сравнение синтетических аналогов Ltc1-K и Ltc3b-G, изученных в настоящей работе, с латарцинами, изученными ранее [7], по ряду параметров

Параметры	Ltc1	Ltc1-K	Ltc3b	Ltc3b-G	Ltc2a
Содержание α-спирали, % (50% TFE)	78	67	85	76	69
МИК ( <i>B. subtilis</i> ), мкМ	1.0	1.0	2.9	23	0.4
МИК ( <i>E. coli</i> ), мкМ	1.0	1.0	23	н/а*	0.5
Гемолиз <sup>#</sup>	80	90	н/а*	н/а*	5.0

<sup>#</sup> Указаны концентрации пептидов (мкМ), вызывающие 20%-ный лизис эритроцитов кролика.

\* н/а – активность не обнаружена в диапазоне изученных концентраций (<100 мкМ).

В заключение хотелось бы обратить внимание на обнаруженное нами различие между эффективными концентрациями АМП при действии на БЛМ и на живые клетки. Более низкая чувствительность живых клеток к действию АМП по сравнению с модельными системами, по-видимому, обусловлена способностью клеточных мембранных систем к репарации. Изучение АМП в модельных системах поможет более детально определить механизм их действия, а поскольку АМП способны избирательно взаимодействовать с мембранами определенного липидного состава, эти соединения могут иметь большое практическое значение для разработки новых антибиотиков и для конструирования селективных зондов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и материалы Sigma (США), ICN (США), Fluka (Германия), Merck (Германия), Химмед и Криохром (Россия). Все растворы приготовлены на деионизованной воде (сопротивление 18.2 МОм), полученной на установке Millipore (США).

**Химический синтез пептидов.** Для синтеза пептидов использовали реактивы и производные аминокислот (Merck и Fluka), *n*-алкоксибензильный полимер (Merck). Пептиды обессоливали на колонке с сефадексом G-10 (Pharmacia, Швеция). ВЭЖХ проводили на хроматографе System Gold (Beckman, США), используя колонки Jupiter C<sub>18</sub> 5μ 300 Å 250 × 4.60 мм (Phenomenex, США) для аналитической хроматографии и Reprosil-Pur C<sub>18</sub>AQ 5μ 250 × 10 мм (Dr. Maisch, Германия) для препаративной хроматографии. MALDI-масс-спектры получали на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания).

Твердофазный синтез пептидов проводили на *n*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль/г. Нарастивание полипептидной цепи осуществляли, используя 5–8 мл растворителя на каждой стадии, кроме операции 4, на которой объем реакционной смеси составлял 3–4 мл, по следующему протоколу: 1) DMF (5 × 2 мин); 2) 20% пиперидин в DMF (20 мин); 3) DMF (4 × 2 мин); 4) конденсация: 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч). Для активации Fmoc-аминокислот к раствору 5 экв. Fmoc-аминокислоты и 5 экв. TBTU в 3–4 мл DMF добавляли 5 экв. диизопропилэтиламина, раствор перемешивали 10 мин. Содержание непрореагировавших аминокислот пептидилполимера контролировали с помощью нингидринового теста после операции 4. При положительном тесте повторяли реакцию конденсации.

Пептиды отщепляли от полимера с одновременным деблокированием путем обработки 300 мг пептидилполимера 5 мл смеси TFA (95%), триизопр-

пилсилана (2.5%), H<sub>2</sub>O (2.5%) в течение 2 ч. После отщепления раствор отфильтровывали от полимера, упаривали при пониженном давлении и смешивали со 100 мл этилового эфира. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали эфиром и растворяли в 5 мл 10% уксусной кислоты в течение 20 мин, после чего нерастворимый остаток отфильтровывали. Полученный раствор лиофилизовали, остаток растворяли в 0.1 М уксусной кислоте и обессоливали на колонке с сефадексом G-10 в 0.1 М уксусной кислоте.

Очистку пептидов проводили с помощью оф-ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur в линейном градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA от 10 до 40% за 30 мин при скорости элюции 3 мл/мин, регистрируя оптическое поглощение элюата при длине волны 226 нм.

**Спектры КД** измеряли с помощью спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония) в кювете с длиной оптического пути 0.01 см в диапазоне длин волн 190–250 нм с шагом 1 нм. Конформацию пептидов в воде и в 50% TFA исследовали в концентрации 0.1 мМ. Спектры КД приведены в единицах молярной эллиптичности [Θ], рассчитанной по формуле: [Θ] = 115 × Θ<sub>экср</sub> / (10 × C × l), где Θ<sub>экср</sub> – наблюдаемая эллиптичность в миллиградусах, C – концентрация пептида в мг/мл, l – длина оптического пути (толщина кюветы) в см, 115 – средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка. Содержание элементов вторичной структуры оценивали по программе CONTINLL [15].

**Действие пептидов на липосомы.** Моноламеллярные липосомы (диаметр 100 нм), содержащие флуоресцентный краситель CBF (Sigma, США) в концентрации 50 мМ, приготовлены методом экстракции из DOPC, DOPG или DOPG/DOPE, 1 : 1, в 115 мМ Трис-НСl-буфере (рН 7.5). Выход CBF из липосом регистрировали на флуориметре F-4000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 492 нм и длине волны эмиссии 515 нм. Суммарная концентрация фосфолипидов в кювете объемом 1.2 мл составляла 10–20 мкМ. Интенсивность флуоресценции измеряли через 2 мин после добавления пептидов и рассчитывали долю вышедшего из липосом CBF по формуле:

$$R = 100(F_t - F_0)/(F_{100} - F_0),$$

где R – доля вытекшего CBF в процентах; F<sub>0</sub>, F<sub>t</sub>, F<sub>100</sub> – значения интенсивности флуоресценции в отсутствие пептида, в его присутствии и при полном разрушении липосом после добавления 20 мкл 10%-ного раствора Triton X-100 соответственно.

**Бислойные липидные мембраны.** БЛМ формировали из раствора фосфатидилхолина яичного желтка (РС) (Биолек, Украина) или DOPC (Avanti Polar Lipids, США) в *n*-гептане на отверстиях диаметром 0.6 мм в тефлоновом стакане, помещенном в стеклянную ячейку. Соотношение РС : хо-

лестерин составило 2 : 1 и DOPC : холестерин – 2 : 1 и 2 : 0.5 при общей концентрации липидов 20 мг/мл. Формирование липидного бислоя наблюдали визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9 (ЛОМО, Россия). Измерения мембранного тока проводили при комнатной температуре в 10 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.4), содержащем 100 мМ КСI, с использованием хлорсеребряных электродов, расположенных в наружном отсеке объемом 9 мл и внутри стаканчика объемом 1 мл. Потенциал внутреннего отсека (*транс*-сторона) принимали равным 0 мВ, а необходимый поляризационный потенциал (60 мВ) задавали в наружном отсеке (*цис*-сторона), добавление и перемешивание исследуемых образцов осуществляли с *цис*-стороны.

**Антимикробная активность.** Для определения антимикробной активности синтетических пептидов использовали следующие штаммы микроорганизмов: *B. subtilis* ВКМ В-501, *E. coli* DH5 $\alpha$ . Антимикробную активность оценивали по ингибированию роста культуры в жидкой среде. Определение минимальных концентраций пептидов, необходимых для полного ингибирования роста микроорганизмов (МИК), проводили методом серийных разведений, используя модифицированную методику [16]. Бактерии культивировали в жидкой низкосолековой среде LB (1% бакто-триптон, 0.5% бакто-дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl, рН7) при 37°C и перемешивании со скоростью 220 об/мин в течение 18 ч. Полученные культуры разбавляли в 200 раз, используя среду LB, и выращивали в тех же условиях в течение 3–5 ч до достижения экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность культуры при 620 нм OD<sub>620</sub> ~ 0.3–0.5), после чего снова разбавляли средой LB до концентрации клеток 10<sup>5</sup> колониеобразующих единиц в 1 мл. Культуры помещали в стерильные 96-луночные планшеты, по 90 мкл в лунку, куда затем добавляли по 10 мкл растворов тестируемых пептидов различных концентраций, полученных серийными разведениями. Отрицательным контролем служила культура клеток с добавлением 10 мкл чистой воды, положительным – чистая среда LB. Планшеты инкубировали в условиях, описанных выше, в течение 24 ч, после чего измеряли OD<sub>620</sub>. МИК определяли как наименьшие концентрации веществ, полностью подавлявшие рост микроорганизмов. Каждый опыт проводили в трех независимых повторах.

**Гемолитическая активность.** Гемолитическую активность пептидов определяли с использованием крови кролика. Кровь из краевой вены уха кролика (2 мл) собирали в пробирку с 8 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса, содержащего гепарин (10 ед./мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 180–220 g, ресуспендировали в растворе Хенкса до концентрации 1–3  $\times$  10<sup>7</sup> клеток в 1 мл. Полученную

суспензию (1 мл) смешивали с 10 мкл раствора пептида нужной концентрации, в качестве отрицательного контроля к суспензии клеток добавляли 10 мкл чистого раствора Хенкса. Образцы инкубировали при 37°C и перемешивании со скоростью 120 об/мин в течение 3 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием в течение 3–5 мин при 4000 g. По 100 мкл супернатанта отбирали в стерильные 96-луночные планшеты, выход гемоглобина из эритроцитов оценивали по оптической плотности при 414 нм. Гемолитическую активность выражали в процентах от максимально возможного гемолиза (положительный контроль), который достигали путем ресуспендирования клеток в чистой воде вместо раствора Хенкса также до концентрации 1–3  $\times$  10<sup>7</sup> клеток в 1 мл.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (Государственные контракты № 02.467.11.3003 от 20.04.2005 г., 02.512.11.2037 от 27.02.2007 г.), а также программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

Авторы выражают глубокую признательность Карпунину Д.В. и Феофанову А.В. (ИБХ РАН) за помощь в обсуждении полученных результатов, а также Краснопольскому Ю.М. и другим сотрудникам Харьковского завода биопрепаратов “Биолек” за любезно предоставленный препарат высокоочищенного холестерина.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brogden K.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 238–250.
2. Tossi A., Sandri L. // Curr. Pharm. Design. 2002. V. 8. P. 743–761.
3. Finlay B.B., Hancock R.E.W. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 497–504.
4. Hancock R.E.W., Lehrer R. // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. P. 82–88.
5. Kuhn-Nentwig L. // Cell. Mol. Life Sci. 2003. V. 60. P. 2651–2668.
6. Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. // Biopolymers. 2000. V. 55. P. 4–30.
7. Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 20983–20992.
8. Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C. // Nat. Immunol. 2001. V. 2. P. 1133–1137.
9. Lee W.H., Li Y., Lai R., Li S., Zhang Y., Wang W. // Eur. J. Immunol. 2005. V. 35. P. 1220–1229.

10. Charpentier S., Amiche M., Mester J., Vouille V., Le Caer J.P., Nicolas P., Delfour A. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 14690–14697.
11. Lehrman S.R., Tuls J.L., Lund M. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 5590–5596.
12. Giangaspero A., Sandri L., Tossi A. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 5589–5600.
13. Orivel J., Redeker V., Le Caer J.P., Krier F., Revol-Junelles A.M., Longeon A., Chaffotte A., Dejean A., Rossier J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 17823–17829.
14. Kuhn-Nentwig L., Muller J., Schaller J., Walz A., Dathe M., Nentwig W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 11208–11216.
15. Provencher S.W., Glockner J. // *Biochemistry.* 1982. V. 20. P. 33–37.
16. Amsterdam D. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4<sup>th</sup> ed. / Ed. Loman V. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. P. 52–111.

## Synthetic Analogues of Antimicrobial Peptides from the Venom of the Central Asian Spider *Lachesana tarabaevi*

A. A. Vassilevski<sup>a#</sup>, S. A. Kozlov<sup>a</sup>, M. N. Zhmak<sup>a</sup>, I. A. Kudelina<sup>a</sup>, P. V. Dubovskii<sup>a</sup>,  
O. Ya. Shaturskii<sup>b</sup>, A. S. Arseniev<sup>a</sup>, and E. V. Grishin<sup>a</sup>

<sup>#</sup>Fax: +7 (495) 330-7301; phone: +7(495) 336-65-40; e-mail: avas@ibch.ru  
<sup>a</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>b</sup> Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Leontovicha 9, Kiev, 01601 Ukraine

Analogues of laticins Ltc1 and Ltc3b, antimicrobial peptides from the venom of the Central Asian spider *Lachesana tarabaevi* capable of formation of amphiphilic structures in membranes without involvement of disulfide bonds, were synthesized. The amino acid sequences of the analogues correspond to immature forms of these peptides, each of them containing an additional C-terminal amino acid residue. It is concluded from the study of the biological activity of the synthesized peptides that the posttranslational C-terminal amidation of Ltc3b is a functionally important modification that ensures a high activity of the mature peptide. The lipid composition was shown to affect the interaction of synthesized peptides with artificial membranes. The analogue of Ltc3b manifested the highest activity on cholesterol-containing membranes. The mechanism of action of the studied antimicrobial peptides on membranes is discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* amphiphilic helix, antimicrobial peptides, bilayer lipid membranes, liposomes, posttranslational modifications