

УДК 612.398.1:547.964.4

**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.
ГУНИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург

Из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser guldenstadti* было выделено несколько катионных пептидов, обладающих антимикробной активностью. С помощью набора методов, включающих ультрафильтрацию, препаративный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию, были получены пептиды с молекулярными массами 5174 Да, 5336 Да, 5446 Да, 3648 Да, 3807 Да, 3540 Да, 2550 Да, 2742 Да (молекулярные массы определяли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии). Пептиды с массами 5336 Да, 3807 Да и 2742 Да представляли преобладающие пептидные фракции лейкоцитов осетра. Все восемь пептидов оказались линейными молекулами. Шесть пептидов: 5174 Да, 5336 Да, 5446 Да, 3648 Да, 3807 Да, 3540 Да демонстрировали антимикробную активность против грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* и грибка *Candida albicans*, в то время как пептиды 2550 Да, 2742 Да ингибировали рост лишь *Escherichia coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды являются одними из ключевых эффекторных молекул системы врожденного иммунитета, которая обеспечивает первую линию защиты от инфекций человека и животных. У рыб и других пойкилотермных животных эта система играет особенно важную роль, так как обеспечивает быстрый и относительно независимый от температурных условий ответ на вторжение микробных агентов, в то время как при низкой температуре окружающей среды система приобретенного иммунитета не может функционировать достаточно эффективно, так как для продукции антител в таких условиях могут потребоваться недели. Однако до настоящего времени антимикробные пептиды рыб остаются малоизученными, и полностью отсутствуют сведения о пептидах, содержащихся в лейкоцитах крови рыб, хотя именно эти клетки являются основными эффекторными клетками системы приобретенного иммунитета. Объектом настоящего исследования стали антимикробные пептиды лейкоцитов крови русского осетра (*Acipenser guldenstadti*), принадлежащего к классу костных рыб (Osteichthyes). Осетровые рыбы являются наиболее древними представителями этого класса и сохраняют многие морфологические и анатомические признаки (например, хрящевой скелет), характерные для самых древних и примитивных - хрящевых рыб, к которым относятся акулы и скаты. Давно замечено, что осетровые рыбы отличаются высокой устойчивостью

к различным инфекционным агентам, но попыток изучить факторы, обеспечивающие эту резистентность практически не предпринималось. В данном исследовании впервые из лейкоцитов крови осетров получены пептиды, обладающие антимикробной активностью широкого спектра действия, и которые могут играть ключевую роль в обеспечении высокой устойчивости осетровых рыб к различным патогенным микроорганизмам.

МЕТОДЫ

Выделение и очистка антимикробных пептидов из лейкоцитов русского осетра: кровь рыб, отловленных в дельте Волги (Александровский осетровый завод), стабилизировали гепарином и оставляли на 6 часов в сосудах для расслаивания; после чего лейкоцитарную пленку отбирали пипеткой и промывали дважды физиологическим раствором с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 400g; полученный осадок гомогенизировали. Экстракцию белков из лейкоцитарной массы проводили в 10% уксусной кислоте в течение 20 часов при 4°C при перемешивании на магнитной мешалке. Затем гомогенат центрифугировали при 15 000 g в течение часа. Супернатант отбирали и подвергали ультрафильтрации через мембрану YM-10 (Amicon, США) для отделения высокомолекулярных компонентов. Прошедший через мембрану ультрафильтрат затем концентрировали с помощью центрифугирования под вакуумом на установке Speed Vak (Savant, США); обессоливали, исполь-

зую картридж Sep Pak C-18 (Walters, США), и подвергали препаративному электрофорезу в полиакриламидном геле в кислой среде при непрерывной элюции белков из геля по методу Harwig [6] на установке фирмы Bio Rad (США). Фракции после препаративного электрофореза, в которых была обнаружена наиболее высокая антимикробная активность, подвергали дальнейшей очистке с помощью обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке (25 x 0.46 см) Vydac C-18 (США).

Электрофоретические методы: для анализа белковых фракций, полученных на каждой стадии очистки антимикробных пептидов, использовали электрофорез в пластинах полиакриламидного геля (ПААГ) в кислой среде в присутствии мочевины по методу Paniym, Chakley [10] на приборе фирмы Hoeffer (США), а также электрофореза, а ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

Масс-спектрометрический анализ: молекулярные массы пептидов определяли на время-пролетном масс-спектрометре с ионизацией посредством лазерной десорбции с помощью матрицы (Matrix Assisted Laser Desorbition/Ionisation Time-of-Flight MS, MALDI TOF), Voyager-DE ("Perseptive Biosystem Inc", USA) с источником ионов замедленной экстракции (работа проводилась на оборудовании ЦКП «Аналитическая спектрометрия»).

О присутствии или отсутствии дисульфидных мостиков в молекулах пептидов судили, оценивая их электрофоретическую подвижность после окисления перформной кислотой [2].

Антимикробную активность пептидов определяли с помощью метода радиальной диффузии пептидов в агарозных гелях, содержащих микроорганизмы (4×10^6 колониеобразующих единиц/гель) [8]. Антимикробную активность выражали в условных единицах и рассчитывали по формуле: (диаметр зоны ингибирования роста (в мм) - диаметр лунки, в которую вносили пептид (в мм)) x 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительный анализ показал, что в кислотных экстрактах из лейкоцитов русского осетра содержатся компоненты, обладающие антимикробной активностью против грамположительных,

грамотрицательных бактерий и низших грибов. Чтобы выделить, очистить и охарактеризовать эти компоненты нами была использована процедура очистки, включающая ультрафильтрацию, препаративный электрофорез и обратно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию. Полученный в результате ультрафильтрации через мембрану YM-10 материал, содержащий белки с молекулярной массой ниже 10 кДа, был подвергнут препаративному электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ) в кислой среде в присутствии мочевины, проводимому при непрерывной элюции белков из ПААГ. Белковые фракции собирали и анализировали: измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм и определяли антимикробную активность в каждой пробе. Результаты представлены на рисунке 1.

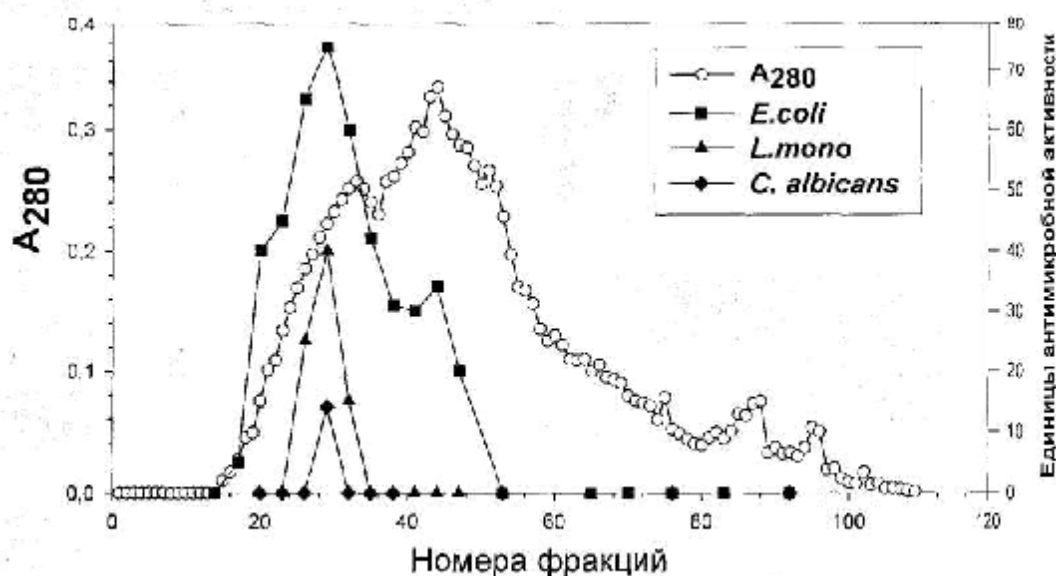


Рисунок 1. Препаративный электрофорез в ПААГ в кислой буферной системе низкомолекулярной фракции кислоторастворимых белков из лейкоцитов осетра. Сила тока 30 мА, скорость элюции - 36 мл/час, объем фракций 3 мл. По оси абсцисс - номера фракций; по оси ординат: слева - поглощение при длине волны 280 нм; справа - условные единицы антимикробной активности анализируемых фракций.

Как отображено на рисунке 1, во фракциях 26-45 содержатся компоненты, демонстрирующие высокую активность в отношении всех трех тестируемых микроорганизмов. Для разделения этих компонентов и получения индивидуальных фракций антимикробных пептидов использовали обращеннофазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ). Проводили несколько циклов хроматографии с различными ионными парами, применяя в первом цикле хроматографии в качестве ионной пары 0.1% трифторуксусную кислоту, во втором цикле 0.13% гептофтормасляную кислоту. В результате хроматографического разделения был получен ряд высокоочищенных препаратов пептидов, обладающих антимикробной активностью. Чистоту этих препаратов антимикробных пептидов оценивали с помощью электрофореза в присутствии додецил-сульфата натрия, а также масс-спектрометрии MALDI-TOF. Масс-спектрометрический анализ позволил установить молекулярные массы полученных пептидов: 5174 Да, 5336 Да, 5446 Да, 3648 Да, 3807 Да, 3540 Да, 2550 Да, 2742 Да, причем три пептида - 5336 Да, 3807 Да и 2742 Да являлись преобладающими пептидными фракциями. Далее было проведено изучение некоторых физико-химических свойств выделенных пептидов. Как уже было установлено ранее, эти пептиды представляли собой катионные соединения, по электрофоретической подвижности в кислой среде по направлению к катоду все они отличались незначительно и имели подвижность, близкую к таковой для известных антимикробных пептидов - бактенецинов 5 козы и коровы. Ни для одного из исследуемых пептидов не было выявлено дисульфидных мостиков, то есть все восемь пептидов представляли собой линейные молекулы.

В результате изучения антимикробной активности пептидов осетра было показано, что пептиды с молекулярными массами 5174 Да, 5336 Да, 5446 Да, 3648 Да, 3807 Да, 3540 Да обладают выраженной способностью ингибировать рост грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p, грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD, а также грибка *Candida albicans* 820; в то время как пептиды с массами 2550 Да и 2742 Да проявляли антимикробную активность лишь в отношении грамотрицательной бактерии *E.coli*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени охарактеризовано большое число катионных антимикробных пептидов, являющихся важнейшими эффекторными молекулами системы врожденного иммунитета животных, стоящих на различных ступенях эволюционного развития - от простейших до млеко-

питающих [1, 4, 7, 9]. Однако всего несколько таких пептидов было описано для представителей классов рыб, причем эти пептиды были выделены из кожи, кожных слизистых секретов и слизистой оболочки кишечника рыб [2, 5, 11], но ни одного пептида не было получено из клеток крови рыб. Учитывая, что для пойкилотермных животных, к которым относятся рыбы, именно система врожденного иммунитета играет ключевую роль в защите от различных инфекций, изучение пептидных факторов, обеспечивающих антимикробную функцию фагоцитов рыб, представляет несомненный интерес. Нами впервые из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser guldenstadti* были выделены и очищены катионные линейные пептиды, обладающие антимикробной активностью против грамотрицательных, грамположительных бактерий, а также грибов. К какой группе известных ныне антимикробных пептидов принадлежат полученные нами пептиды осетра, покажет анализ их первичной структуры. Несомненно, полученные из лейкоцитов русского осетра катионные пептиды, обладающие антимикробной активностью, являются перспективными объектами для дальнейшего исследования, так как, изучая молекулярные факторы системы врожденного иммунитета рыб, можно получить информацию, важную для понимания эволюции защитных механизмов в животном мире, а также получить новые эффективные антимикробные вещества, которые в перспективе смогут послужить моделями для создания новых лекарственных препаратов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов РФФИ № 03-04-49-747; 03-04-49-576; 03-04-346; INTAS 03-51-4984 СПИСОК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб. Издательство «Наука». 1999. 162с.
2. Торчинский Ю.М. Сера в белках.. М. 1977. 123 с.
3. Birkemo G. A. //Biochimica et Biophysica Acta. 2003. V. 1646. P. 207-215.
4. Boman H.G. //Annu. Rev. Immunol. 1995. V. 13. P. 61.
5. Cole A.M., Weis P., Diamond G.//American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 1997. V. 272. P. 12008.
6. Harwig S.S., Swiderek K.M. //FEBSLett. 1994. V. 342. P. 281-85.
7. Hancock RE, Rozek A. //FEMS Microbiol Lett. 2002. V. 206. P. 143.
8. Lehrer R.L, Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. //J.Immunol.Methods. 1991. V. 137. P.167.

9. Lehrer RI, Ganz T. // *Cur Opin Immun. Biophys.* 1969. V. 130. №2. P.337.
2002. V. 14. P.96.
10. Panyim S., Chalkley R. // *Arch Biochem Lett.* 1998. V. 437. P. 258.
11. Park I., Park C, Kim M., Kim S. // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 258.

**ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF LEUKOCYTES OF RUSSIAN STURGEON
(*ACIPENSER GULDENSTADTI*)**

Shamova O.V., Orlov D.S., Ovchinnikova T.V., Sahl H.-G.,
Tveryanovich I.A., Popova V.A, Orlov S.B., Dyubin V.Y, Kokryakov V.N.

Several cationic antimicrobial peptides were isolated from leukocytes of blood of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadti*). By using a purification procedure containing acid extraction followed by continuous elution electrophoresis and reverse-phase HPLC we have isolated the peptides with molecular masses 5174 Da, 5336 Da, 5446 Da, 3648 Da, 3807 Da, 3540Da, 2550 Da, 2742 Da (determined by MALDI-TOF mass spectrometry). The peptides with molecular masses 5336 Da, 3807 Da and 2742 Da were the most abundant in sturgeon leukocytes. All eight obtained peptides appeared to be linear. Six peptides (5174 Da, 5336 Da, 5446 Da, 3648 Da, 3807 Da, 3540Da) showed antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli*, gram-positive bacteria, *Listeria monocytogenes* and fungi *Candida albicans*; while the peptides 2550 Da, 2742 Da inhibited growth of *Escherichia coli* only.