

УДК 636.03

Е. А. Улитина, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова

КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА

Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

Принята к публикации 18.02.2024 г.

doi: 10.5922/gikbfu-2024-1-7

104

Для цитирования: Улитина Е. А., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В. Классификация и характеристика нового антимикробного пептида // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер. Естественные и медицинские науки. 2024. №1. С. 104–114. doi: 10.5922/gikbfu-2024-1-7.

В последние годы в исследованиях антимикробных пептидов (АМП) наблюдается значительный прогресс, раскрывающий потенциал этих соединений в качестве альтернатив традиционным антибиотикам. Благодаря разнообразным механизмам действия и широкому спектру противобактериальной активности АМП предоставляют новые возможности для профилактики и лечения инфекций с множественной лекарственной устойчивостью путем создания продуктов питания с антимикробными свойствами, новых противомикробных биологически активных добавок и лекарственных препаратов. Цель работы – создание, характеристика и классификация нового АМП. Для проектирования нового АМП использована протеомная база данных DRAMP, для прогнозирования биологической активности – Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>), идентификацию пептида проводили по базе данных EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/index.html>), исследование физико-химических свойств – по базам данных APD, DRAMP и PepCalc (<http://pepcalc.com>). В результате исследований спроектирован новый АМП, состоящий из 11 аминокислотных остатков со следующим процентным содержанием: Val, Ala, Trp, Gly, Pro, Tyr, Glu, His, Lys – по 9% и Arg – 18%. Общее гидрофобное соотношение в пептиде, определяемое APD, составляет 27%, общий чистый заряд равен +2,25, молекулярная формула – C₆₄H₉₆N₂₁O₁₅S₀, потенциал связывания с белками (индекс Бомана) – на уровне 3,44 ккал/моль, пептид может образовывать альфа-спираль. Полученный пептид можно классифицировать как синтезированный катионный гидрофобный альфа-спиральный противомикробный полипептид.

Ключевые слова: пептиды, последовательность аминокислот, заряд, молекулярная масса, спираль, потенциал связывания с белками, антимикробные свойства

Введение

Антимикробные пептиды (АМП) являются важными компонентами врожденной иммунной защиты многоклеточных организмов, включая человека, животных и растения. Большинство пептидов имеют не-



большой размер (до 50 аминокислот), являются катионными и характеризуются гидрофобными и гидрофильными доменами. Они могут быть обнаружены в различных типах клеток, индуцируемых в ответ на инфекционные и / или воспалительные стимулы [1; 2].

Первые исследования АМП были сосредоточены на изучении их бактерицидной активности; однако за последние два десятилетия было показано, что эти пептиды могут модулировать врожденный и адаптивный иммунный ответ [3].

АМП являются важными молекулами врожденного иммунного ответа, которые первоначально изучались на предмет их прямой антимикробной активности. Эти молекулы эволюционировали, чтобы обеспечивать широкий спектр защиты от различных патогенных микробов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, археи, грибы и паразиты. Важно подчеркнуть, что эти пептиды активны в отношении микробов, устойчивых к обычным антибиотикам [4].

АМП – широко распространенное семейство в различных формах жизни, от микроорганизмов до человека. Идентифицировано более 3500 катионных пептидов из шести царств жизни [5], такие пептиды характеризуются разнообразием структуры и последовательности; однако большинство из этих пептидов имеет общие характеристики, в частности они обычно короче 50 аминокислот, имеют катионный суммарный заряд, обеспечиваемый остатками Arg и Lys, и амфипатическую структуру. В настоящее время существуют различные способы классификации АМП, например в зависимости от происхождения, функции или структуры; обычно большинство пептидов можно разделить на четыре структурные категории на основе их вторичной структуры: (1) амфипатические α -спиральные пептиды, которые включают кателицидин LL-37, (2) β -нити, стабилизированные переменным количеством дисульфидных связей, в которые включены дефензины, (3) пептиды, обогащенные одной или двумя аминокислотами, включая богатые триптофаном пептиды, такие как индолицидин, и (4) петлевые пептиды с одним дисульфидным мостиком, такие как бактенецин [6].

На рисунке 1 представлена статистика, показывающая количество АМП из разных источников, занесенных в базу данных антимикробных пептидов (APD: <https://aps.unmc.edu/AP/>) по состоянию на 2023 г., и классификация АМП по [7].

АМП представляют собой альтернативу для использования в качестве противомикробных средств. Этот факт во многом обусловлен их антибактериальными свойствами, способностью регулировать иммунный ответ. Несколько недавних исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что природные и синтетические АМП могут быть использованы для профилактики и устранения инфекций. Они также показали, что механизмы действия и вовлеченные клетки могут варьироваться. Так, пептид микроцин C7 подавляет рост *Shigella flexneri in vitro* и *in vivo* [8]. Пептид педиоцин PA-1 эффективен при внутрижелудочном введении животным, инфицированным *Listeria monocytogenes* [9].

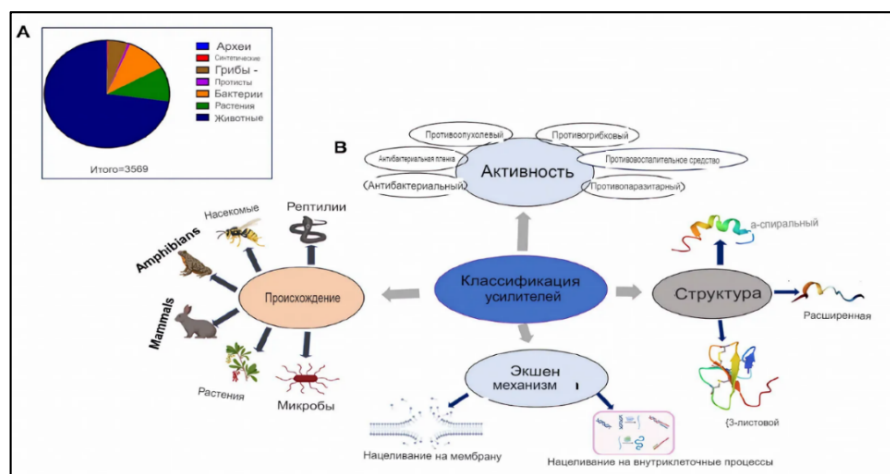


Рис. 1. Происхождение и классификации антимикробных пептидов

Примечание. А – статистика, показывающая количество АМП из разных источников, занесенных в каталог базы данных антимикробных пептидов (APD: <https://aps.unmc.edu/AP/>) по состоянию на 2023 г.; Б – схематическое представление, обобщающее различные характеристики, используемые для классификации АМП по [7].

Есть исследования, в которых различные соединения используются для стимулирования индукции специфических АМП, усиливающих иммунный ответ против инфекций [10]. Хотя существует несколько исследований *in vitro* и *in vivo*, демонстрирующих потенциал определенных АМП модулировать иммунный ответ и помогать подавлять различные типы инфекций, клинических исследований с этой целью очень мало. Среди них применение человеческого кателицидина LL-37 для ускорения заживления труднозаживающих венозных язв на ногах и синтетического пептида Mel4 в контактных линзах для уменьшения инфекций глаз [11].

Авторы [12] обнаружили пептиды, нацеленные на борьбу с инфекциями дыхательных путей, кожными инфекциями, кандидозом и др.

К сожалению, многие клинические испытания с использованием АМП были прекращены по разным причинам. Одна из них – побочные эффекты. Таков случай пептида мурепавадина в III фазе клинических испытаний, который, как было обнаружено, приводит к большому числу случаев острого повреждения почек у пациентов с внутрибольничной пневмонией. Другая причина – то, что клинические испытания показывают низкую эффективность или результативность, не превосходящую эффективность используемых антибиотиков; одним из примеров является пептид изеганан, который применялся местно в ротоглотке пациентам с длительной искусственной вентиляцией легких и не показал значительного снижения частоты пневмонии [13].



Хотя научно доказано, что АМП обладают рядом желаемых характеристик антибиотика, также хорошо известно, что они часто приводят к нежелательным эффектам, таким как цитотоксичность по отношению к клеткам млекопитающих, активация комплемента и повышенная продукция провоспалительных цитокинов. Кроме того, необходимо рассмотреть желаемый способ введения, поскольку было замечено, что эти пептиды могут легко разрушаться присутствующими в крови протеазами или связываться с белками, снижая ожидаемый эффект. Также в физиологических условиях некоторые АМП снижают или полностью теряют свою бактерицидную активность. Эти ограничения и препятствуют использованию АМП в клинической практике [14].

АМП могут использоваться в составе пищевой продукции для увеличения ее срока хранения, а также в продуктах питания функционального назначения, в частности с бактерицидными свойствами. В связи с этим поиск или создание новых АМП с их последующей классификацией являются актуальным направлением научных исследований в области пищевой биотехнологии. Возможность разрабатывать, производить и совершенствовать АМП открывает новые возможности для разработки продуктов питания с антимикробным действием, особенно в эпоху, когда резистентность патогенных бактерий к антибиотикам стала серьезной глобальной угрозой.

Как утверждают авторы [15], понимание взаимосвязи физико-химических характеристик пептидов с антимикробным действием приводит к быстрому развитию пептидомиметиков, группы синтетических соединений, которые имитируют как структурные, так и функциональные характеристики природных АМП, чему и посвящено наше исследование.

Цель работы — создание, характеристика и классификация нового АМП.

Материал и методы исследования

Для проектирования нового АМП использована протеомная база данных DRAMP, для прогнозирования биологической активности — Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>), идентификацию пептида проводили по базе данных пептидов EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/index.html>), исследование физико-химических свойств осуществлялось по базам данных APD, DRAMP и PepCalc (<http://pepcalc.com>).

Результаты

Спроектирован АМП, состоящий из 11 аминокислотных остатков в следующей последовательности: глицин (гли, G) — валин (вал, V) — аланин (ала, A) — пролин (про, P) — тирозин (тир, Y) — триптофан (три, трп, W) — глутаминовая кислота (глу, E) — аргинин (арг, R) — гистидин (гис, H) — лизин (лиз, K) — аргинин (арг, R).

При проектировании пептида учитывали, что он должен быть катионным, так как катионная природа многих АМП из-за присутствия положительно заряженных аминокислот с основными боковыми цепя-

ми облегчает их первоначальное электростатическое притяжение к отрицательно заряженным поверхностям микробных клеток, что приводит к разрушению бактериальной мембраны и последующей гибели клеток [16]. Таким образом, включение положительно заряженных аминокислот, таких как лизин (Lys) и аргинин (Arg), может обеспечить катионность АМП, тем самым повышая их селективность по отношению к микробным мембранам [17].

При исследовании по базе данных антимикробных пептидов DRAMP спроектированного нами пептида установлено, что уровень вероятности его бактериальной активности составляет 0,528 (рис. 2). Согласно вышеуказанной базе, пептиды, имеющие активность 0,5 и более, являются антимикробными.

108

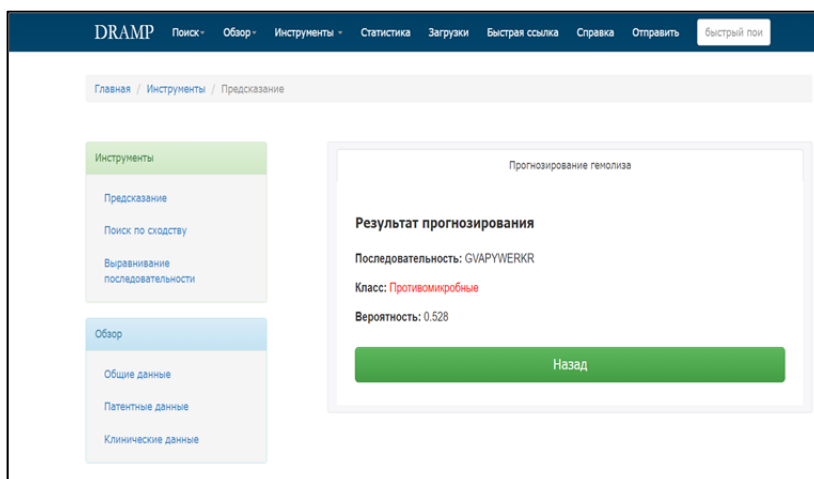


Рис. 2. Результаты исследования пептида GVAPYWERHKK по базе данных антимикробных пептидов DRAMP

На рисунке 3 представлены результаты исследований прогнозирования биологической активности спроектированного пептида по предсказателю биоактивности Peptide Ranker.



Рис. 3. Определение биологической активности пептида GVAPYWERHKK по предсказателю биоактивности Peptide Ranker



Показатель биологической активности пептида GVAPYWERHKR по базе Peptide Ranker составляет 0,709974, что свидетельствует о его высокой биоактивности (пептиды считаются биоактивными с реакцией более 0,5). Полученные данные согласуются с исследованиями, проведенными в базе данных DRAMP. Возможно, высокая биологическая активность у спроектированного пептида может объясняться и наличием у него противоопухолевых свойств. Так, в исследованиях [18; 19] АМП также продемонстрировали противоопухолевую активность. Многие АМП, известные как противоопухолевые пептиды (АСР), могут разрушать структуру опухолевых клеток или ингибировать пролиферацию, метастазирование опухолевых клеток и наносить незначительный ущерб нормальным клеткам [20; 21].

По базам данных пептидов EROP-Moscow и APD, установлено, что пептид GVAPYWERHKR индивидуален и не имеет аналогов (рис. 4, 5).

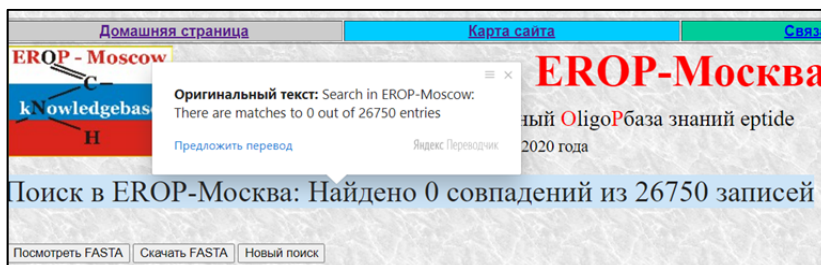


Рис. 4. Результаты идентификации пептида в базе данных EROP-Moscow

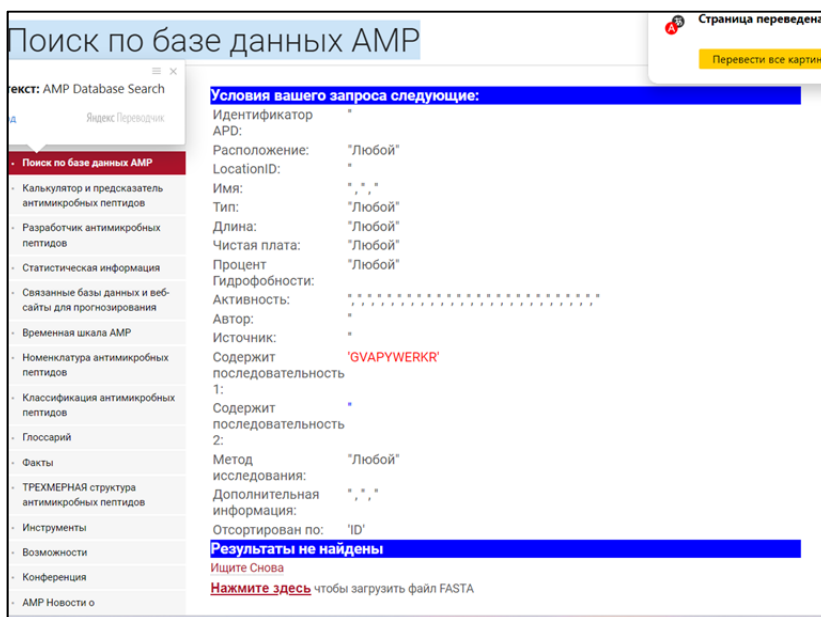


Рис. 5. Результаты идентификации пептида GVAPYWERHKR в базе данных APD

Проведено прогнозирование физико-химических свойств пептида GVAPYWERHKR с помощью пептидного калькулятора PepCalc (рис. 6).

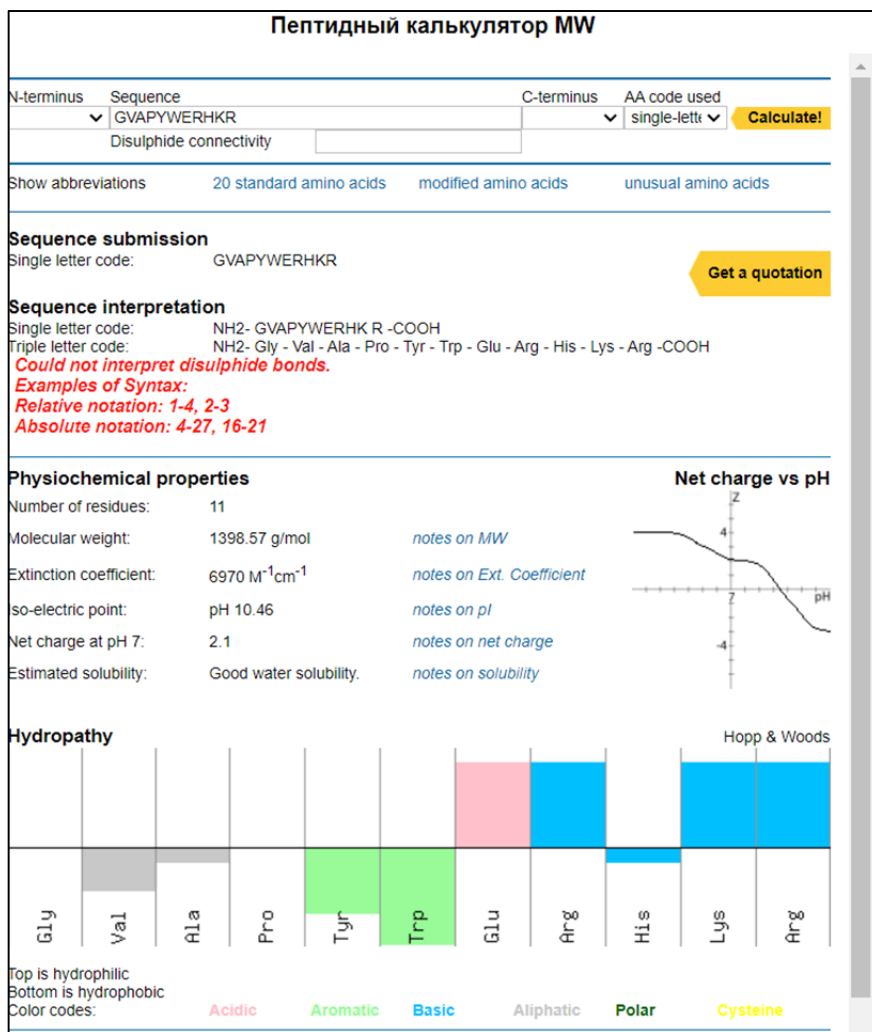


Рис. 6. Прогнозирование физико-химических свойств пептида GVAPYWERHKR с помощью пептидного калькулятора PepCalc

Установлено, что исследуемый пептид имеет молекулярную массу 1398 Да, изоэлектрическую точку 10,48 и высокую гидрофобность. Следует учитывать, что хорошая растворимость в воде пептида GVAPYWERHKR — очень приблизительная оценка, основанная на изоэлектрической точке, количестве заряженных остатков и длине пептида. Что определить фактическую растворимость пептида, необходимо провести эксперимент.

В таблице представлена характеристика аминокислотного состава пептида GVAPYWERHKR.



Характеристика аминокислотного состава пептида GVAPYWERHKKR

Гидрофобная аминокислота	I: 0 V: 1 L: 0 F: 0 C: 0 M: 0 A: 1 W: 1
Количество G и P	G: 1 P: 1
Отрицательно заряженная аминокислота	E: 1 D: 0
Положительно заряженная аминокислота	K: 1 R: 2 H: 1
Другие аминокислоты	T: 0 S: 0 Y: 1 Q: 0 N: 0

По базе данных APD исследуемый пептид имеет следующее процентное содержание аминокислот: Val, Ala, Trp, Gly, Pro, Tyr, Glu, His, Lys по 9 % и Arg — 18 %. Общее гидрофобное соотношение в пептиде, определяемое APD, составляет 27 %, общий чистый заряд равен +2,25, молекулярная формула — C₆₄H₉₆N₂₁O₁₅S₀, потенциал связывания с белками (индекс Бомана) — на уровне 3,44 ккал/моль, пептид может образовывать альфа-спираль.

Индекс Бомана свидетельствует о высокой способности пептида связываться с мембранами или другими белками, выполняющих функцию рецепторов. Пептид обладает высоким потенциалом связывания, если значение индекса выше 2,48.

Из представленных физико-химических характеристик пептида его можно классифицировать как синтезированный, катионный, гидрофобный, альфа-спиральный противомикробный полипептид. Полученные данные с согласуются с результатами исследований [22] в которых доказано, что АМП представляют собой короткие аминокислотные последовательности, обычно содержащие от 10 до 50 аминокислот, с суммарным положительным зарядом от +2 до +9 при нейтральном pH и с результатами исследований [23], в которых установлено, что АМП обладают общими характеристиками, включая гидрофобность, катионные свойства и амфифильные структуры, которые определяют их антимикробную активность широкого спектра действия в отношении бактерий, грибов, простейших и вирусов.

Заключение

На основании нескольких ключевых характеристик, в частности аминокислотного состава, длины цепи, гидрофобности, суммарного положительного заряда, вторичной структуры, спроектирован новый АМП. Полученный пептид можно классифицировать как синтезированный катионный гидрофобный альфа-спиральный противомикробный полипептид.

Список литературы

1. Yount N. Y., Weaver D. C., Lee E. Y. et al. Unifying structural signature of eukaryotic α -helical host defense peptides // Proc Natl Acad Sci. 2019. 116(14):6944–53. doi: 10.1073/pnas.1819250116.
2. Lazzaro B. P., Zasloff M., Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution // Science. 2020. 368(6490):eaau5480. doi: 10.1126/science.aau54805.

3. Buccini D.F., Cardoso M.H., Franco O.L. Antimicrobial peptides and cellpenetrating peptides for treating intracellular bacterial infections // *Front Cell Infect Microbiol.* 2021. 10:612931. doi: 10.3389/fcimb.2020.612931.
4. Sørensen O.E., Borregaard N., Cole A.M. Antimicrobial peptides in innate immune responses // *Contributions to microbiology.* Basel, 2008. URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/136315> (дата обращения: 26.05.2022).
5. Hemshekhar M., Anaparti V., Mookherjee N. Functions of cationic host defense peptides in immunity // *Pharmaceuticals.* 2016. 9(3):40. doi: 10.3390/ph9030040.
6. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity: AMPs, the small yet big players of immunity // *FEBS J.* 2009. 276(22):6497–508. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x.
7. Wang G.S., Li X., Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide databases a tool for research and education // *Nucleic Acids Research.* 2016. 44(D1): D1087-D1093.
8. Cursino L., Smajs D., Smarda J. et al. Exoproducts of the escherichia coli strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo // *J Appl Microbiol.* 2006. 100(4):821–9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02834.x.
9. Dabour N., Zihler A., Kheadr E. et al. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and pediococcus acidilactici UL5 at inhibiting listeria monocytogenes // *Int J Food Microbiol.* 2009. 225–233, 133(3). doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.005.
10. Bekele A., Gebreselassie N., Ashenafi S. et al. Daily adjunctive tuberculosis: a randomized controlled trial in Ethiopia // *J Intern Med.* 2018. 284(3):292–306. doi: 10.1111/joim.12767.
11. Dutta D., Kamphuis B., Ozelik B. et al. Development of silicone hydrogel antimicrobial contact lenses with Mel4 peptide coating // *Optom Vis Sci.* 2018. 95(10):937–46. doi: 10.1097/OPX.0000000000001282.
12. Dijksteel G.S., Ulrich M., Middelkoop E., Boekema B. Review: Lessons learned from clinical trials using antimicrobial peptides (AMPs) // *Front Microbiol.* 2021. 12:616979. doi: 10.3389/fmicb.2021.616979.
13. Kollef M., Pittet D., Sánchez Garcia M. et al. A randomized double-blind trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia // *Am J Respir Crit Care Med.* 2006. 173(1):91–7. doi: 10.1164/rccm.200504-656OC.
14. Mohamed M.F., Abdelkhalek A., Seleem M.N. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular staphylococcus aureus // *Sci Rep.* 2016. 6(1):29707. doi: 10.1038/srep29707.
15. Lachowicz J., Szczepski K., Scano A. et al. The best peptidomimetic strategies to undercover antibacterial peptides // *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. 21 (19). 7349.
16. Mwangi J., Yin Y.Z., Wang G. et al. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2019. 116(52): 26516–26522.
17. Jin L., Bai X.W., Luan N. et al. A designed tryptophan- and lysine/arginine-rich antimicrobial peptide with therapeutic potential for clinical antibiotic-resistant *Candida albicans* vaginitis // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016. 59(5): 1791–1799.
18. Baindara P., Korpole S., Grover V. Bacteriocins: Perspective for the development of novel anticancer drugs // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. 102:10393–10408.
19. Sledge G.W., Mamounas E.P., Hortobagyi G.N. et al. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2014. 32: 1979–1986.
20. Tornesello A.L., Borrelli A., Buonaguro L. et al. Antimicrobial Peptides as Anti-cancer Agents: Functional Properties and Biological Activities // *Molecules.* 2020. 25: 2850.



21. Raheem N., Straus S.K. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions // *Front. Microbiol.* 2019. 10:2866.

22. Zhang G., Sunkara L. T. Avian antimicrobial host defense peptides: From biology to therapeutic applications // *Pharmaceuticals.* 2014. 7:220–247.

Об авторах

Елизавета Андреевна Улитина – аспирант, Уральский государственный аграрный университет, Россия.

E-mail: egorulitin@inbox.ru

ORCID: 0009-0006-8660-4527

Сергей Леонидович Тихонов – д-р техн. наук, проф., Уральский государственный аграрный университет, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0003-4863-9834

Наталья Валерьевна Тихонова – д-р техн. наук, проф., зав. кафедрой пищевой инженерии аграрного производства, Уральский государственный аграрный университет, Россия.

E-mail: tihonov75@bk.ru

ORCID: 0000-0001-5841-1791

E. A. Ulitina, S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova

CLASSIFICATION AND CHARACTERISATION OF A NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDE

Ural State Agrarian University

Received 17 January 2024

Accepted 18 February 2024

doi: 10.5922/gikbfu-2024-1-7

To cite this article: Ulitina E. A., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., 2024, Classification and characterisation of a new antimicrobial peptide, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №1. P. 104–114. doi: 10.5922/gikbfu-2024-1-7.

In recent years, significant progress has been achieved in AMP research, revealing the potential of these compounds as alternatives to traditional antibiotics. Due to the diverse mechanisms of action and a wide range of antibacterial activity, AMP provides new opportunities for preventing and treating multidrug-resistant infections by creating foods with antimicrobial properties, new antimicrobial biologically active additives and medicines.

This study aimed to create, characterise and classify a new AMP. The DRAMP proteomic database was used to design the AMP, and the Peptide Ranker was utilised to predict biological activity (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker>). The peptide was identified with the help of the EROP-Moscow database (<http://erop.inbi.ras.ru/index.html>), and its physicochemical properties were studied using the APD, DRAMP and PepCalc databases (<http://pepcalc.com>). The research resulted in the design of a new AMP consisting of 11 amino acid residues with the following percentages: Val, Ala, Trp, Gly, Pro, Tyr, Glu, His, Lys



by 9 % and Arg by 18 %. The total hydrophobic ratio in the peptide, determined by APD, is 27 %; the total net charge is +2.25. Its molecular formula is C₆₄H₉₆N₂₁O₁₅S₀, with protein binding potential (Boman index) at 3.44 kcal/mol. The peptide can form an alpha helix. The resulting peptide can be classified as a synthesised cationic hydrophobic alpha-helical antimicrobial polypeptide.

Keywords: peptides, amino acid sequence, charge, molecular weight, helix, protein binding potential, antimicrobial properties

The authors

Elizaveta A. Ulitina, Postgraduate Student, Ural State Agrarian University, Russia.
E-mail: egorulitin@inbox.ru
ORCID: 0009-0006-8660-4527

Prof. Sergey L. Tikhonov, Ural State Agrarian University, Russia.
E-mail: tihonov75@bk.ru
ORCID: 0000-0003-4863-9834

Prof. Natalya V. Tikhonova, Ural State Agrarian University, Russia.
E-mail: tihonov75@bk.ru
ORCID: 0000-0001-5841-1791