



Авторы посвящают статью памяти своего учителя, профессора
Владимира Николаевича Кокрякова (1944–2020) — удивительного человека
и выдающегося ученого, основателя отечественной школы по изучению
антимикробных пептидов животного происхождения.

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДА C3f — ПРОИЗВОДНОГО БЕЛКА C3 ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. В. А. Позолотин*, **, Е. С. Умнякова*, П. М. Копейкин*, А. С. Комлев*,
Я. А. Дубровский**, ***, И. А. Кренев*, **, О. В. Шамова*, М. Н. Берлов*, #

*ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12

**Санкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9

***ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова” Минздрава России,
Россия, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Поступила в редакцию 12.07.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 29.07.2020 г.

Система комплемента играет важную роль в защите организма от инфекции. Ключевой этап активации комплемента — протеолитическое расщепление белка C3 с образованием растворимого пептида анафилатоксина C3a и белка C3b, способного к формированию ковалентной связи с поверхностными молекулами микробных клеток. Активность C3b регулируется его дальнейшим ограниченным протеолизом с высвобождением пептида C3f, который, как считается, не обладает собственной функциональной активностью. На основании физико-химических свойств C3f мы предположили, что этот пептид может проявлять антимикробную активность. Активация комплемента, как правило, осуществляется на поверхности патогенов, в частности бактериальных клеток, и локальная генерация антимикробных пептидов может вносить существенный вклад в их нейтрализацию. Из литературы уже известна антимикробная активность производных комплемента — пептидов C3a и C4a. Для исследования антимикробных свойств C3f данный пептид был получен методом твердофазного синтеза. Показано, что пептид C3f человека обладает умеренной антимикробной активностью *in vitro* в отношении некоторых грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*) с минимальными ингибирующими концентрациями 70 мкМ (для *L. monocytogenes*) и выше. Выявленная антимикробная активность пептида C3f существенно уступает описанной в литературе активности C3a. Ряд микроорганизмов (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) оказался устойчив к действию пептида C3f.

Ключевые слова: система комплемента, C3f, антимикробные пептиды, твердофазный синтез

DOI: 10.31857/S0132342321030155

ВВЕДЕНИЕ

Система комплемента представляет собой важный компонент врожденного иммунитета позвоночных животных. Следствиями активации комплемента на поверхности микроорганизмов

становятся продукция анафилатоксинов (C3a, C5a), привлекающих и активирующих различные виды лейкоцитов, опсонизация микробных клеток, способствующая их последующему фагоцитозу (C3b, C4b и продукты их деградации), а также непосредственный лизис клеток грамотрицательных бактерий в результате формирования на их поверхности мембраноатакующего комплекса (МАК) (C5b, C6, C7, C8, C9) [1–4]. Имеются данные, что гуморальная инактивация микроорганизмов в результате функционирования системы комплемента может осуществляться не только

Сокращения: МАК — мембраноатакующий комплекс; МИК — минимальная ингибирующая концентрация; Fmoc — флуоренилметилоксикарбонильная защитная группа; MALDI — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация.

Автор для связи: (тел.: +7 (812) 234-07-64; эл. почта: berlov.mn@iems.spb.ru).

благодаря действию МАК, но и за счет продукции антимикробных пептидов — производных белков комплемента. Было показано, что пептид С3а, образующийся из белка С3 при активации комплемента, проявляет свойства не только анафилатоксина, но и антимикробного пептида, активного против широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также дрожжевой гриб *Candida albicans* [5, 6]. Более слабая антимикробная активность была показана и для пептида С4а [7]. Мы предположили, что пептид С3f, являющийся, как и С3а, производным белка С3, тоже может обладать антимикробными свойствами.

Белок С3 представляет собой ключевой компонент системы комплемента, на котором сходятся все три пути активации (классический, лектиновый и альтернативный) [2, 3, 8]. В результате расщепления белка С3-конвертазами, формирующимися в ходе активации комплемента, образуются растворимый пептид С3а и белок С3b, который способен к формированию ковалентной связи с молекулами, содержащими гидроксильную группу и, в меньшей степени, аминокгруппу, за счет своей тиозифирной группировки. В случае связывания С3b с поверхностными молекулами микробных клеток он функционирует как регуляторная субъединица С3- и С5-конвертаз, а также как опсонин. Функционирование С3b регулируется его дальнейшим протеолитическим расщеплением фактором I с образованием связанного с поверхностью iC3b (инактивированный С3b) и высвобождаемого в циркуляцию пептида С3f с молекулярной массой ~2 кДа. Хотя iC3b более не способен поддерживать работу С3- и С5-конвертаз, он, вопреки своему названию, сохраняет и даже усиливает присущую С3b опсоническую активность.

Принято считать, что второй продукт расщепления С3b — пептид С3f — не обладает собственной функциональной активностью [9]. Тем не менее опубликованы единичные работы, посвященные возможной биологической роли С3f. Было показано, что С3f человека частично напоминает пептид С3а по своим свойствам: он проявляет спазмогенную активность, стимулируя сокращение гладких мышц подвздошной кишки морской свинки, а также увеличивает проницаемость сосудов в коже. Однако пептид С3f оказался значительно менее активным, чем С3а. Так, сравнивая с С3а спазмогенная активность наблюдалась только при достижении молярного избытка С3f на три порядка [10]. Было показано, что продукт деградации С3f — гексапептид HWESAS — может функционировать в качестве кофактора инсулиноподобных факторов роста I и II [11]. Также С3f стимулирует продукцию трансформирующего фактора роста $\beta 1$ эндотелиальными клетками микрососудов кожи и пролиферацию этих клеток [12].

Учитывая наблюдения Ganu et al. о перекрывании функциональной активности С3а и С3f [10], мы предположили, что оно может распространяться и на антимикробную активность. Активация комплемента, как правило, осуществляется на поверхности патогенов, в частности бактериальных клеток, и локальная генерация антимикробных пептидов может вносить существенный вклад в их нейтрализацию.

Цель данной работы — исследование антимикробных свойств синтетического пептида С3f человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования антимикробной активности С3f данный пептид (17 а.о.) был получен методом твердофазного синтеза на 2-хлортритилхлоридной смоле по Fmoc/tBu-стратегии путем наращивания пептидной цепи карбодиимидным методом, начиная с C-конца. Очистку полученного после синтеза пептида от побочных продуктов производили методом офВЭЖХ. В результате был получен электрофоретически гомогенный пептид, соответствующий С3f по молекулярной массе по данным масс-спектрометрии (рис. 1).

Методами *in silico* были оценены некоторые физико-химические свойства пептида (табл. 1). По расчетным данным, изоэлектрическая точка С3f составляет 10.83. Заряд пептида при нейтральном pH равен +2.4, в связи с наличием в молекуле двух остатков гистидина он может заметно увеличиваться при незначительном закислении. Доля остатков с неполярными боковыми группами в аминокислотной последовательности С3f составляет 35%. Известно, что основная мишень действия антимикробных пептидов — цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток. Большинство изученных антимикробных пептидов характеризуется высоким содержанием и положительно заряженных, и гидрофобных аминокислот, что позволяет им взаимодействовать как с анионными головками, так и с жирнокислотными хвостами фосфолипидов бактериальной мембраны [13–17]. Таким образом, по своему аминокислотному составу пептид С3f соответствует типичному антимикробному пептиду.

Многие антимикробные пептиды, не содержащие дисульфидных связей или значительного количества остатков пролина, формируют структуру амфипатической α -спирали, в которой пространственно разобщены остатки катионных и гидрофобных аминокислот. Часто α -спиральная конформация антимикробных пептидов стабилизируется при их взаимодействии с цитоплазматической мембраной бактерий [15, 16]. С помощью программы PEP-FOLD-3 были построены десять наиболее вероятных моделей трехмерной

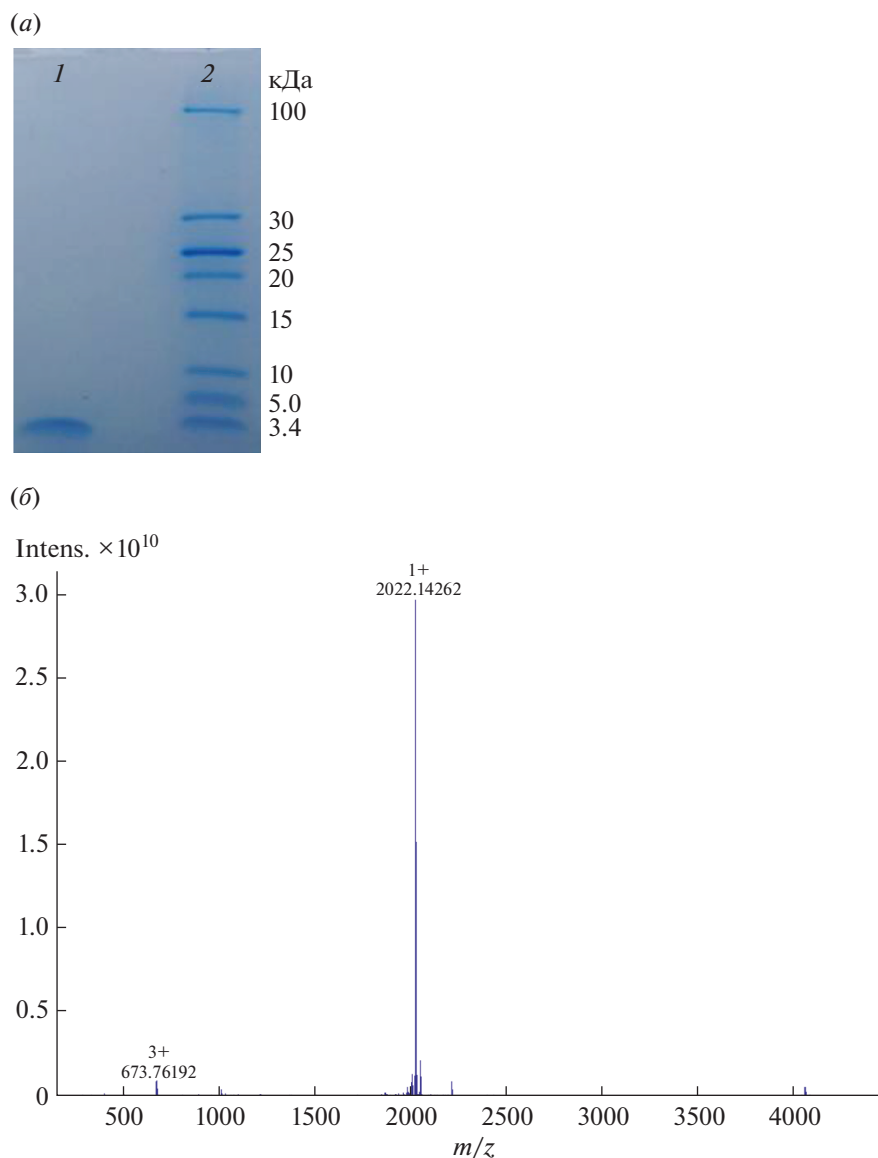


Рис. 1. Анализ качества препарата синтетического пептида C3f. (а) – Анализ пептида C3f методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (1 – C3f, 2 – стандарты молекулярной массы); (б) – MALDI-масс-спектр пептида C3f. Указан наиболее интенсивный сигнал с m/z 2022.14262, соответствующий второму сигналу в изотопном распределении. Расчетная моноизотопная масса однозарядного иона пептида $[M + H]^+$ – 2021.10; найденная экспериментально $[M + H]^+$ – 2021.14.

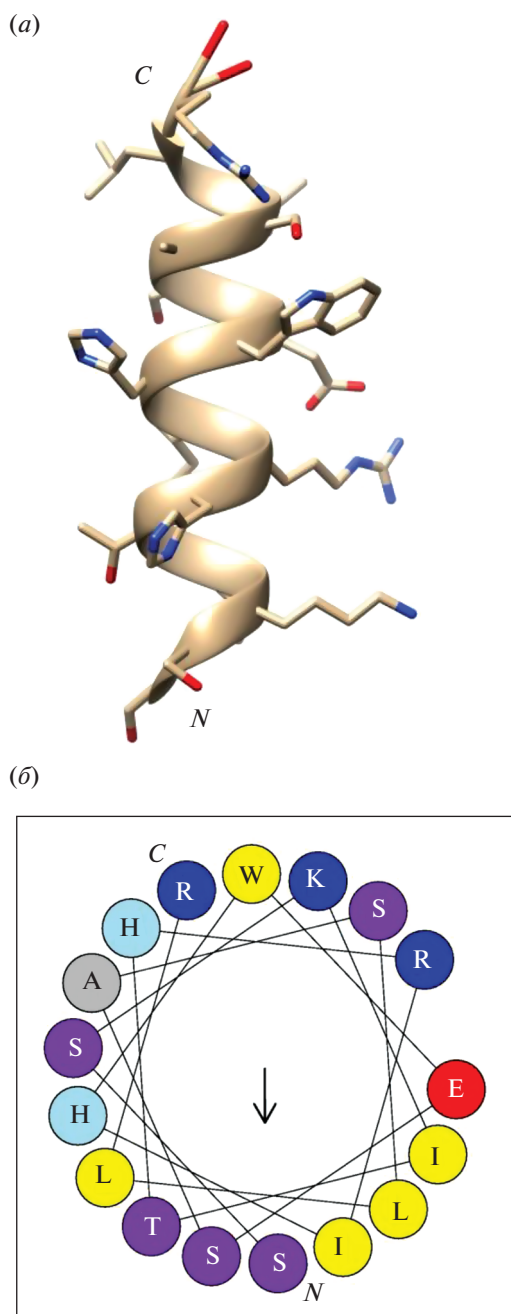
структуры C3f, все они содержат α -спиральный участок (в одной из моделей – два участка). Модель с максимальной протяженностью спирали представлена на рис. 2а. Визуализация ориентации аминокислотных остатков пептида C3f при формировании α -спиральной конформации по всей длине полипептидной цепи (проекция Эдмундсона [18]) (рис. 2б) показывает, что в этом случае все три остатка с положительно заряженными радикалами (два аргинина и лизин) локализуются на одной стороне спирали. Это свидетельствует в пользу потенциальной антимикробной активности пептида. В то же время остатки гидрофобных аминокислот не формируют единого кластера на поверхности молекулы, а остаток

Таблица 1. Аминокислотная последовательность и расчетные физико-химические свойства пептида C3f

Аминокислотная последовательность		SSKITHRIHWESASLLR
Число аминокислотных остатков		17
Молекулярная масса, Да		2021
pI		10.83
Заряд при различных значениях pH	7.0	+2.4
	6.5	+3.0
	6.0	+3.5
Доля неполярных остатков, %		35

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) пептида С3f в отношении различных микроорганизмов

Вид	Штамм	Принадлежность	МИК, мкМ
<i>Escherichia coli</i>	ML-35p	Грам (–)	>1024
<i>Listeria monocytogenes</i>	EGD	Грам (+)	70
<i>Micrococcus luteus</i>	A270	Грам (+)	161
<i>Enterococcus faecium</i>	L3	Грам (+)	192
<i>Bacillus cereus</i>	10702	Грам (+)	>1024
<i>Candida albicans</i>	820	Дрожжевой гриб	>1024

**Рис. 2.** Третичная структура пептида С3f. (а) – Модель трехмерной структуры пептида С3f; (б) – предсказанное расположение аминокислотных остатков пептида С3f при формировании α -спиральной конформации.

триптофана располагается в непосредственном соседстве с катионными остатками.

Хотя линейные антимикробные пептиды обычно превышают по размеру С3f (17 а.о.), известны и обратные примеры. Так, триптофан-богатые антимикробные пептиды – индолицидин коровы и тритрптицин свиньи – содержат по 13 а.о. [19, 20]. Многие изоформы таких пептидов амфибий, как темпорины и ауреины, содержат по 13–17 и даже 10 а.о. Примечательно, что для темпоринов и ауреинов (как, вероятно, и для С3f) характерна α -спиральная конформация [21–23].

Таким образом, совокупность физико-химических свойств пептида С3f позволила ожидать проявление им антимикробных свойств.

Экспериментальную оценку антимикробной активности синтетического пептида С3f проводили методом радиальной диффузии. Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовали серии двукратных разведений пептида, начиная с максимальной концентрации 1024 мкМ. В табл. 2 приведены полученные значения МИК пептида С3f в отношении различных микроорганизмов. Согласно нашим результатам, пептид С3f человека обладает антимикробной активностью в отношении некоторых грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*). На рис. 3 в качестве примера приведена фотография участка чашки Петри с *L. monocytogenes*, в отношении которой пептид С3f проявляет наибольшую антимикробную активность (МИК 70 мкМ). Грамотрицательная бактерия *Escherichia coli* и грибок *Candida albicans* оказались нечувствительны к антимикробному действию С3f, так же как и еще один грамположительный микроорганизм – *Bacillus cereus*. Следует отметить, что выявленная нами антимикробная активность пептида С3f существенно уступает описанной в литературе активности другого производного компонента – пептида С3а. С использованием того же метода радиальной диффузии была показана выраженная антимикробная активность С3а против ряда микроорганизмов, включая резистентные к действию пептида С3f виды (*E. coli*, *C. albicans*), при этом значения МИК в отношении бактерий не превышали 1 мкМ [5, 6]. Подобные различия по степе-

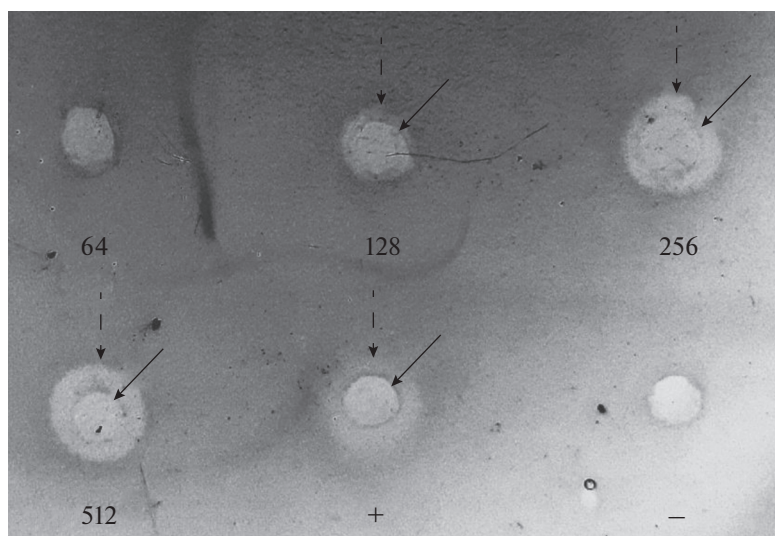


Рис. 3. Антимикробная активность пептида C3f в отношении *L. monocytogenes*, определенная методом радиальной диффузии. Цифры – концентрации (мкМ) пептида C3f в пробах; “+” – положительный контроль (дефенсины человека HNP-1–3); “–” – отрицательный контроль. Сплошными стрелками обозначены границы лунок, пунктирными – границы зон ингибирования роста.

ни биологической активности между пептидами C3a и C3f были описаны ранее и для их спазмогенной активности [10].

Полученные результаты не дают основания оценивать выявленную *in vitro* антимикробную активность пептида C3f человека как физиологически значимую. Таким образом, вопрос о собственной функциональной активности пептида остается открытым. Аргументом в пользу ее наличия могла бы быть консервация в эволюции аминокислотной последовательности или физико-химических свойств пептида. Для оценки консервативности структуры C3f мы провели сравнение аминокислотных последовательностей пептида у разных представителей позвоночных животных (табл. 3).

Видно, что структура пептида C3f проявляет высокую эволюционную вариабельность в аминокислотной последовательности, несмотря на идентичный размер пептида – 17 а.о. у всех видов. Единственным инвариантным остатком выступает С-концевой остаток аргинина, необходимый для взаимодействия с фактором I и катализируемого им ограниченного протеолиза. Еще один высококонсервативный остаток – изолейцин в позиции 8 (в редких случаях заменен лейцином), которому в большинстве последовательностей предшествует аргинин. У плацентарных млекопитающих в первичной структуре C3f можно выделить высококонсервативный С-концевой участок молекулы, представленный в большинстве случаев мотивом A(G)SLLR. Если предположить, что у плацентарных пептид C3f выполняет какую-либо консервативную функцию, следует ожидать участие этого мотива в ее реализации. Между тем,

пептид HWESAS (соответствующий позициям 9–14 в последовательности C3f человека) заметно менее консервативен. Таким образом, описанная для этого гексапептида биологическая активность [11] не отражает, по всей видимости, эволюционно консервативную функцию.

Пептиды C3f различных видов характеризуются в большинстве случаев положительным зарядом, что рассматривается как главная структурная детерминанта антимикробной активности пептидов [14–16]. Тем не менее как минимум у представителей трех видов (собака, опоссум, кобра) C3f имеет изоэлектрическую точку менее 7, т.е. C3f – анионная молекула, что говорит о низкой вероятности его функционирования в качестве антимикробного пептида.

Не исключено, что у разных видов животных биологические свойства C3f могут различаться. У таких животных, как корова и свинья, пептиды C3f имеют более высокую изоэлектрическую точку (11.70 в обоих случаях), нежели C3f человека, и, вероятно, могут проявлять более высокую антимикробную активность. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы проверить эти предположения экспериментально. В то же время выявленная по результатам наших экспериментов антимикробная активность пептида C3f человека недостаточно высока, чтобы иметь физиологическую значимость. Можно предположить, что реализация потенциальных антимикробных свойств пептида C3f возможна в условиях локального закисления среды либо в кооперации с другими антимикробными факторами сыворотки крови.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности пептида C3f у различных представителей позвоночных животных

Вид	UniProt ID	Аминокислотная последовательность	Расчетная pI
Человек (<i>Homo sapiens</i>)	>P01024 1304-1320	SSKITHRIHWESASLLR	10.83
Кролик (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	>P12247 367-383	SSPVKHRIVWDSASLLR	10.83
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	>P01027 1304-1320	SSATTFRLLWENGNNLLR	9.31
Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	>P01026 1304-1320	SSPTVFRLLWESGSLLR	9.31
Морская свинка (<i>Cavia porcellus</i>)	>P12387 1309-1325	SSPSKFRLVWEAGSLLR	10.83
Собака (<i>Canis lupus familiaris</i>)	>F1PIX8 1305-1321	STEIKHHIVWDSPSLQR	6.66
Тихоокеанский морж (<i>Odobenus rosmarus divergens</i>)	>A0A2U3VK97 1303-1319	NSIIKHLILWESASLLR	8.75
Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	>P01025 1302-1318	SAPVRHRILWESASLLR	11.70
Корова (<i>Bos taurus</i>)	>Q2UVX4 1303-1319	NSAVRHRILWESASLLR	11.70
Африканский слон (<i>Loxodonta africana</i>)	>G3T5N8 1284-1300	SSLIKHRIVWESASLLR	10.83
Домовый опоссум (<i>Monodelphis domestica</i>)	>F6ZDV8 1308-1324	SSAINYRINYESDSLLR	5.79
Утконос (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	>F6WUL9 1296-1312	QSIVKFRIDTKNSQLLR	11.00
Китайский аллигатор (<i>Alligator sinensis</i>)	>A0A1U7S0C0 1295-1311	ATPVKIRIENSNAFLSR	10.84
Индийская кобра (<i>Naja naja</i>)	>Q01833 1291-1307	EVPERYSINDRNAVQAR	6.28
Курица (<i>Gallus gallus</i>)	>Q90633 1293-1309	ANAITYRIENNNALVAR	8.79
Когтистая шпорцевая лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>)	>F7CXW4 1298-1314	QQPLTYRINHENALLAR	8.75
Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>)	>P98093 1279-1295	ASVTKWSINNKNQFHTR	11.17

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение пептида C3f. Твердофазный синтез.

Для химического синтеза пептида C3f использовали аминокислоты, 2-хлортритилхлоридную смолу, диизопропилэтиламин, этил-(гидроксимино)цианоацетат ОхутаPure и 1,3-диизопропилкарбодиимид (Iris Biotech GmbH, Германия). Были использованы аминокислоты с защищенными флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой α -аминогруппами и защищенными функциональными группами боковых радикалов. Боковые цепи аминокислот были защищены 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильной (Arg), *трет*-бутильной (Glu, Ser), *трет*-бутоксикарбонильной (Lys, Trp) и трифенилметильной (His) группами. Синтез проводили твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной смоле по Fmoc/tBu-стратегии путем наращивания пептидной цепи карбодиимидным методом, начиная с C-конца. C-Концевую аминокислоту присоединяли к смоле в реакции с 0.24 мМ диизопропилэтиламином в хлористом метиле, содержащем 5% диметилсульфоксида, в течение 2 ч при комнатной температуре. Деблокирование α -аминогрупп аминокислотных остатков проводили 25%-ным раствором диэтиламина в *N,N*-диметилформамиде. Конденсацию последующих аминокислот производили в *N,N*-диметилформамиде с добавлением 0.4 мМ ОхутаPure и 0.4 мМ 1,3-ди-

изопропилкарбодиимида в течение 2 ч при комнатной температуре. После завершения синтеза для отщепления пептида от полимерного носителя и удаления защитных групп боковых радикалов смолу инкубировали в растворе, содержащем 95% TFA, 2.5% триизопропилсилана и 2.5% H_2O , в течение 60 мин.

Очистка синтетического пептида. Очистку полученного после синтеза пептида от побочных продуктов производили методом оФВЭЖХ на колонке C18 25 $\times$ 1 см (Waters, США) с размером гранул сорбента 10 мкм. Элюцию проводили линейным градиентом ацетонитрила (5–70%) в присутствии 0.1% TFA в течение 60 мин со скоростью 1.5 мл/мин.

Электрофорез. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS проводили по методу Schagger et al. [24].

Масс-спектрометрия. Для проведения масс-спектрометрического анализа на поверхность мишени наносили 0.5 мкл раствора матрицы (5 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50%-ном ацетонитриле с 0.1% TFA) и 0.5 мкл пробы, высушивали при комнатной температуре. Анализ проводили с помощью масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием Solarix XR (Bruker Daltonics, США), оснащенного ячейкой с динамической гармонизацией, сверхпроводящим магнитом на-

пряженностью 7 Т и MALDI-источником. Ионы детектировали в диапазоне m/z от 70 до 5000.

Определение концентрации C3f. Концентрацию C3f в растворах оценивали по поглощению при 280 нм с учетом молярного коэффициента поглощения, равного $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, определенного с помощью программы ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [25] в соответствии с содержанием остатков ароматических аминокислот по формуле Pace et al. [26].

Оценка физико-химических свойств пептида C3f. Расчетные значения молекулярной массы и изоэлектрической точки пептида определяли в программе ProtParam. Заряд пептида при различных значениях pH оценивали в программе Protein Calculator (<http://protcalc.sourceforge.net/>). Расположение аминокислотных остатков пептида C3f при формировании α -спиральной структуры, а также долю неполярных остатков оценивали с помощью программы HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) [27]. Трехмерная структура C3f была предсказана программой PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) [28], визуализацию осуществляли с помощью программы Chimera 1.14 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [29].

Аминокислотные последовательности пептидов C3f разных видов животных находили, используя первичные структуры белка C3, полученные из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Для установления границ последовательности, соответствующей C3f, осуществляли выравнивание аминокислотной последовательности белков C3 разных видов и пептида C3f человека в программе ClustalW [30]. Ключевым критерием установления границ C3f считали наличие остатков аргинина в C-концевом положении пептида и в позиции, непосредственно предшествующей N-концевому остатку, формирующих, таким образом, два сайта протеолитического расщепления R-X. Последовательность C3f была обнаружена во всех проанализированных структурах белка C3 за исключением C3 миноги *Lethenteron camtschaticum* (Q00685).

Антимикробная активность. Для оценки антимикробных свойств синтетического пептида C3f использовали культуры следующих микроорганизмов: грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* (штамм ML-35p); грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* (штамм EGD), *Micrococcus luteus* (штамм A270), *Enterococcus faecium* (штамм L3), *Bacillus cereus* (штамм 10702); гриба *Candida albicans* (штамм 820). Для анализа антимикробной активности пептида применяли метод радиальной диффузии [31]. К аликвотам суспензий, содержащих по 4×10^6 бактериальных клеток в логарифмической (экспоненциальной) фазе роста или клеток ночной культуры *C. albicans*, добавляли по 12 мл расплавленной 1%-ной

агарозы в 0.01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.4), термостатированной при 42°C. Полученные смеси наносили на чашки Петри диаметром 90 мм, оставляли до застывания агарозы. Затем в агарозе делали лунки диаметром 2–3 мм и вносили в них анализируемые пробы в 5 мкл 0.01%-ной уксусной кислоты. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель (0.01%-ная уксусная кислота), а в качестве положительного контроля — α -дефенсин человека HNP-1–3 в концентрации 60 мкМ. Чашки Петри с внесенными пробами инкубировали при 37°C в течение 2.5 ч, после чего добавляли по 12 мл термостатированной при 42°C расплавленной 1%-ной агарозы, содержавшей 6% питательной среды Soyabean Casein Digest Medium — Tryptone Soya Broth (для чашек с *C. albicans* — 6% Sabouraud Dextrose Broth), и инкубировали 15–18 ч при 37°C. Рост микроорганизмов останавливали добавлением 5%-ной уксусной кислоты.

Антимикробную активность пробы определяли как разность диаметра зоны ингибирования роста и диаметра лунки. Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) пептида строили график зависимости антимикробной активности от десятичного логарифма его концентрации (без учета проб с нулевой активностью). Методом линейной регрессии проводили прямую линию, соответствующую экспериментальным точкам, и определяли точку ее пересечения с осью абсцисс. Значение концентрации для этой точки принимали за МИК [32]. Значения МИК пептида C3f в отношении различных микроорганизмов были получены как медианы по результатам трех независимых экспериментов.

В качестве положительного контроля в антимикробных тестах использовали тотальный дефенсин из нейтрофилов человека (HNP-1–3). Для получения препарата дефенсинов из нейтрофилов экстрагировали катионные белки и пептиды с помощью бромистого цетилтриметиламмония путем последовательной экстракции, как описано ранее [33, 34]. Экстракты, содержавшие дефенсины согласно данным аналитического электрофореза, фракционировали методами твердофазной экстракции на картридже C-18 (дефенсины элюировали 13%-ным раствором ацетонитрила в отсутствие TFA) и оФВЭЖХ на колонке C-18 с помощью изократической элюции раствором, содержавшим 0.1% TFA и 23% ацетонитрила.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были исследованы антимикробные свойства синтетического пептида C3f человека — производного белка компонента C3. Мы показали, что C3f обладает антимикробной активностью в условиях *in vitro* в отношении некоторых грамположительных бактерий, однако она существенно уступа-

ет описанной в литературе антимикробной активности другого производного белка СЗ — пептида СЗа. Низкий уровень антимикробной активности пептида СЗf не позволяет сделать вывод о ее физиологической значимости, хотя нельзя исключать участие СЗf в противомикробной защите организма в кооперации с другими факторами сыворотки крови. Вопрос о собственной биологической активности пептида СЗf остается открытым, а его решение требует дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ проводили на оборудовании ФГУП “НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека” ФМБА России.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 0557-2019-0010).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. P. 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
2. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. Article 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
3. Barnum S.R. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 172. P. 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.014>
4. Умнякова Е.С., Пашинская Л.Д., Кренин И.А., Легковой С.В., Кокряков В.Н., Берлов М.Н. // *Мед. акад. журн.* 2018. Т. 18. С. 7–16. <https://doi.org/10.17816/MAJ1837-16>
5. Nordahl E.A., Rydengård V., Nyberg P., Nitsche D.P., Mörgelin M., Malmsten M., Björck L., Schmidtchen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 48. P. 16879–16884. <https://doi.org/10.1073/pnas.040667810>
6. Sonesson A., Ringstad L., Nordahl E.A., Malmsten M., Mörgelin M., Schmidtchen A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. P. 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.10.017>
7. Pasupuleti M., Walse B., Nordahl E., Mörgelin M., Malmsten M., Schmidtchen A. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 2520–2528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607848200>
8. Ricklin D., Reis E.S., Mastellos D.C., Gros P., Lambris J.D. // *Immunol. Rev.* 2016. V. 274. P. 33–58. <https://doi.org/10.1111/imr.12500>
9. Barnum S.R. // *The Complement FactsBook*. 2nd ed. / Eds. Barnum S., Schein T. Acad. Press, 2018. P. 157–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810420-0.00016-X>
10. Ganu V.S., Müller-Eberhard H.J., Hugli T.E. // *Mol. Immunol.* 1989. V. 10. P. 939–948. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90112-0)
11. Doussset B., Straczek J., Maachi F., Nguyen D.L., Jacob C., Capiaumont J., Nabet P., Belleville F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 247. P. 587–591. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8834>
12. Xiang Y., Matsui T., Matsuo K., Shimada K., Tohma S., Nakamura H., Masuko K., Yudo K., Nishioka K., Kato T. // *Arthritis Rheum.* 2007. V. 56. P. 2018–2030. <https://doi.org/10.1002/art.22645>
13. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. // *Prog. Lipid Res.* 2012. V. 51. P. 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
14. Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Берлов М.Н., Янкевич И.А., Умнякова Е.С., Леонова Л.Е., Цветкова Е.В., Колобов А.А., мл., Меньшенин А.В., Курдюмова И.В. // *Росс. иммун. журн.* 2014. Т. 8. С. 325–328.
15. Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K. // *Biomolecules.* 2018. V. 8. Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
16. Rončević T., Puizina J., Tossi A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. Article 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
17. Ajingi Y.S., Jongruja N. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 339. [Ajingi Y.S., Jongruja N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 463–479.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020040044>
18. Schiffer M., Edmundson A.B. // *Biophys. J.* 1967. V. 7. P. 121–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
19. Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 4292–4295.
20. Lawyer C., Pai S., Watabe M., Borgia P., Mashimo T., Eagleton L., Watabe K. // *FEBS Lett.* 1996. V. 390. P. 95–98. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00637-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00637-0)
21. Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S., Miele R., Mangoni M.L., Barra D. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 242. P. 788–792. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0788r.x>
22. Rozek T., Wegener K.L., Bowie J.H., Olver I.N., Carver J.A., Wallace J.C., Tyler M.J. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 5330–5341. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01536.x>
23. Manzo G., Ferguson P.M., Gustilo V.B., Hind C.K., Clifford M., Bui T.T., Drake A.F., Atkinson R.A., Sutton J.M., Batoni G., Lorenz C.D., Phoenix D.A., Mason A.J. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Article 1385. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37630-3>
24. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
25. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. // *Proteomics Protocols Handbook* / Ed. Walker J.M. Totowa. NJ: Humana Press, 2005. P. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

26. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Gimsley G., Gray T. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 2411–2423.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>
27. Gautier R., Douguet D., Antonny B., Drin G. // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. P. 2101–2102.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
28. Lamiable A., Thévenet P., Rey J., Vavrusa M., Derreumaux P., Tufféry P. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. W449–W454.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>
29. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1605–1612.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
30. Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. Article 539.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
31. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. V. 137. P. 167–173.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7)
32. Qu X.-D., Harwig S.S.L., Oren A., Shafer W.M., Lehrer R.I. // *Infect. Immun.* 1996. V. 64. P. 1240–1245.
33. Берлов М.Н., Лодыгин П.А., Андреева Ю.В., Кокряков В.Н. // *Биохимия.* 2001. Т. 66. С. 1238–1244. [Berlov M.N., Lodygin P.A., Andreeva Yu.V., Kokryakov V.N. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2001. V. 66. P. 1008–1013.]
<https://doi.org/10.1023/a:1012325810788>
34. Берлов М.Н., Кorableва Е.С., Андреева Ю.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. С. 551–559. [Berlov M.N., Korableva E.S., Andreeva Yu.V., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2007. V. 72. P. 445–451.]
<https://doi.org/10.1134/S0006297907040128>

Evaluation of the Antimicrobial Activity of C3f Peptide, a Derivative of Human C3 Protein

V. A. Pozolotin*, **, E. S. Umnyakova*, P. M. Kopeykin*, A. S. Komlev*, Y. A. Dubrovskii**, ***,
I. A. Krenev*, **, O. V. Shamova*, and M. N. Berlov*, #

*Phone: +7 (812) 234-07-64; e-mail: berlov.mn@iemspb.ru

*Institute of Experimental Medicine, ul. Akad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

**Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

***Almazov National Medical Research Centre, ul. Akkuratova 2, St. Petersburg, 197341 Russia

The complement system plays an important role in the protection of the organism from infection. A key step in complement activation is the proteolytic cleavage of C3 protein resulting in a soluble anaphylatoxin C3a peptide and C3b protein that is able to form a covalent bond with surface molecules of microbial cells. The activity of C3b is regulated by its subsequent limited proteolysis with the release of the C3f peptide, which is believed to have no functional activity itself. Based on the physicochemical properties of C3f, we hypothesized that this peptide may exhibit antimicrobial activity. Complement activation usually takes place on the surface of pathogens, in particular, bacterial cells, and local generation of antimicrobial peptides can contribute significantly to their neutralization. The antimicrobial activity of complement derivatives, C3a and C4a peptides, is already known from the literature. To study the antimicrobial properties of C3f, we obtained this peptide by the method of solid-phase synthesis. It has been shown that human C3f exhibits moderate antimicrobial activity *in vitro* against certain gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*) with minimal inhibitory concentrations of 70 μ M (for *L. monocytogenes*) or higher. The revealed antimicrobial activity of C3f is much lower than the activity of C3a described in the literature. Several microorganisms (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) were resistant to C3f.

Keywords: complement system, C3f, antimicrobial peptides, solid-phase synthesis