

©Коллектив авторов

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1

С.Р. Курпе¹, С.Ю. Гришин¹, А.В. Глякина^{1,2}, М.В. Слизень¹, А.В. Панфилов¹,
А.П. Кочетов³, А.К. Сурин^{3,4}, М.И. Кобякова⁵, Р.С. Фадеев⁵, О.В. Галзитская^{1,5*}

¹Институт белка РАН,
142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 4; *эл. почта: ogalzit@vega.protres.ru

²Филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН,
142290, Пушкино, Московская обл.

³Пушинский филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, Пушкино, Московская обл.

⁴Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279 Оболенск, Московская обл.

⁵Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино, Московская обл.

Антибиотикорезистентность бактерий является злободневной проблемой мирового масштаба. Подчас активная человеческая деятельность приводит к увеличению представленности в окружающей среде бактерий, устойчивых к действию антибиотиков. Антимикробные пептиды (АМП) являются потенциальными лекарственными кандидатами для борьбы с такими микроорганизмами. Ранее нами был предложен и успешно апробирован на примере *Thermus thermophilus* новый механизм действия АМП, основанный на направленной коагрегации (взаимодействии пептида, способного формировать фибриллы с белком-мишенью). В настоящей работе рассмотрены критерии выбора мишени для направленного действия АМП, описаны особенности “родительских” S1 рибосомных белков *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli* и исследуемых пептидов с применением методов биоинформатического анализа, проведена оценка антимикробного действия синтезированных пептидов на модельном организме *Escherichia coli* и цитотоксичности на клетках фибробластов человека.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; АМП; фибриллы; антибиотикорезистентность; амилоиды

DOI: 10.18097/PBMC20216703231

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность бактерий является серьёзной проблемой для здравоохранения во всем мире [1]. Широкое и подчас неконтролируемое использование антибиотиков в медицинской практике и сельском хозяйстве увеличивает представленность антибиотикорезистентных бактерий в окружающей среде [2]. В частности, это происходит за счёт поступления в окружающую среду фармацевтических препаратов, обладающих широким спектром биологической активности, включая антимикробную. Эта проблема особенно актуальна в регионах с высокой плотностью фармацевтических предприятий [3].

Темпы разработки и внедрения новых антибиотиков в клиническую практику существенно уступают скорости распространения антибиотикорезистентности [4]. Это обусловлено сложностью открытия новых классов антибиотиков и недостаточной рентабельностью их производства. В последние несколько лет Федеральное агентство по контролю качества лекарств и пищевых продуктов США (FDA) одобрило несколько новых препаратов для борьбы с патогенными бактериями. Однако эти вещества принадлежат к известным классам антибиотиков, а возможности их применения ограничены (“по жизненным показаниям”).

Таким образом, распространение антибиотикорезистентности и недостаточные темпы создания новых антимикробных препаратов заставляют научное сообщество искать новые пути противодействия патогенным микроорганизмам. Одним из возможных решений проблемы является использование антимикробных пептидов (АМП).

АМП — это группа фармакологических веществ, разнообразных по структуре, физико-химическим свойствам, механизмам действия, что, вероятно, определяет низкий потенциал развития антибиотикорезистентности к этим соединениям [5]. Установлено, что совместное использование антибиотиков и АМП увеличивает эффективность их действия и снижает шанс развития антибиотикорезистентности [6]. Поэтому АМП являются потенциальными кандидатами для борьбы с существующими и профилактики появления новых антибиотикорезистентных микроорганизмов. В настоящее время разрешено к медицинскому применению всего лишь семь антибиотиков пептидной природы, а из более чем 10000 АМП только 61 находится на доклинических и клинических испытаниях [7]. Несомненно, разработка АМП, как и других лекарств, сложна и дорога. Однако в долгосрочной перспективе применение АМП для борьбы с патогенными бактериями более привлекательно.



Несмотря на то, что механизм антимикробного действия большей части АМП связан с нарушением мембраны или клеточной стенки бактерий [6], перспективными выглядят пептиды с альтернативными механизмами действия. Было замечено, что АР пептид, связанный с развитием болезни Альцгеймера, обладает антимикробными свойствами и, возможно, является компонентом естественной защиты от инфекций [8]. Ещё одним интересным механизмом действия обладает человеческий АМП α -дефенсин, который способен сдерживать распространение бактерий на слизистой оболочке путём формирования наносетей [9].

Несмотря на то, что пептиды, проявляющие антимикробные свойства, уже несколько десятилетий находятся в фокусе внимания исследователей, до сих пор не решена проблема предсказания первичной структуры АМП. В последние годы разработано множество алгоритмов-классификаторов, позволяющих предсказывать антибактериальные свойства пептидов с точностью более 90% [10]. Однако эти алгоритмы имеют ряд серьёзных ограничений [11]. Прежде всего, точность этих алгоритмов ограничена малым размером баз данных исследованных АМП, которые могут быть использованы при формировании обучающих выборок: крупнейшие базы данных содержат около сорока тысяч последовательностей, причём из них подробно исследованы и аннотированы всего несколько тысяч. Кроме того, при попытке исследовать более узкие группы АМП размер обучающих выборок оказывается ещё меньше, что ещё более снижает точность предсказаний. Очевидна необходимость лабораторной проверки эффективности предсказанных АМП, в том числе и для дальнейшего уточнения и улучшения результатов работы прогностических методов и созданных на их основе компьютерных программ [12].

Оценку антимикробных свойств пептидов часто проводят на модельных организмах: *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [13]. Однако эти бактерии являются опасными патогенами, работа с которыми требует осторожности и специальной подготовки. Во многих исследованиях для проверки работоспособности АМП используют *Escherichia coli* [14]. Несмотря на то, что *E. coli* является условно-патогенным организмом, для её культивирования не требуется создание специальных условий для безопасной работы; кроме того, она удобна для культивирования и является хорошо изученной бактерией [15]. Ранее мы использовали в работе *Thermus thermophilus* — термофильную граммотрицательную бактерию, которую применяют для исследования структурного взаимодействия АМП с аппаратом биосинтеза белка клетки [16].

Нами была выдвинута гипотеза о направленной коагрегации белка-мишени и антимикробного пептида, представленная ранее в работе [17]. Механизм направленной коагрегации основан на взаимодействии пептида, способного формировать фибриллы, с белком-мишенью. Успешно апробировав данный подход на бактериальной культуре *T. thermophilus*,

в этой работе мы решили оценить антибактериальное действие склонных к агрегации и формированию фибрилл пептидов, синтезированных на основе аминокислотной последовательности рибосомального белка S1 *E. coli*.

МЕТОДИКА

Определение антибактериальной активности

Определение чувствительности бактериальной культуры к исследуемым пептидам проводили диффузионным методом на твёрдой питательной среде и методом разведения в жидкой питательной среде.

Антибактериальный эффект, исследуемый с помощью диффузионного метода, оценивали по появлению зон лизиса клеток в местах внесения антибактериального препарата, а также по изменению количества и формы колоний. Посев “газоном” бактериальной культуры *E. coli* осуществляли на чашки Петри с агаризованной средой LB (“Amresco”, США), после чего чашку делили на 4 равные части и капельно вносили 1 мг/мл канамицина с 1 мкг/мл Кумасси R250, 100 мкг/мл пептида с 100 мкг/мл Кумасси R250, 1 мг/мл пептида с 100 мкг/мл Кумасси R250 и 1 мг/мл пептида без 100 мкг/мл Кумасси R250.

Антибактериальный эффект, исследованный методом разведения в жидкой питательной среде, оценивали по уменьшению скорости роста бактерий. *E. coli* выращивали в жидкой питательной среде LB (“Amresco”) с перемешиванием 230 об/мин при 37°C в течение ночи. Ночную культуру пересевали в свежеприготовленную питательную среду LB с добавлением исследуемых пептидов и инкубировали сутки. Рост культуры в образцах с добавлением пептидов I10D, D10F и V10V (опыт) и без добавления (контроль) анализировали с помощью спектрофотометра СФ-102 в кюветках с длиной оптического пути 3,3 мм на длине волны 600 нм.

Исследуемые пептиды растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (“Sigma”, США) для получения концентрированного раствора (100 мг/мл). Растворы пептидов для внесения в среду с бактериями готовили путём разбавления концентрированного раствора. Опытная проба содержала 392 мкл питательной среды LB, 4 мкл инокулята ночной культуры, 4 мкл стокового раствора пептида для получения требуемой концентрации: 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл. В контрольные пробы добавляли 4 мкл ДМСО вместо раствора пептида. До инкубации (0 ч) 200 мкл пробы переносили в чистые стерилизованные пробирки и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре. По завершении инкубации в течение 24 ч также измеряли оптическую плотность суспензии клеток.

Способность пептида угнетать рост клеточной культуры оценивали по следующей формуле (1):

$$\mathcal{E} = 1 - (A(\text{опыт})) / (A(\text{Контроль})) \quad (1),$$

где \mathcal{E} — эффективность, A — оптическое поглощение после 24 ч инкубации в опыте и контроле.

Об эффективности пептида судили по его свойству снижать способность клеточной культуры к увеличению оптической плотности. О значимой эффективности пептида судили при $\Delta > 0,5$.

Определение токсичности изучаемых пептидов

Определение количества живых и погибших клеток линии фибробластов кожи человека проводили согласно методике, описанной в работе [18], без изменений. Окрашенные кальцеином AM и йодидом пропидия (все “Sigma-Aldrich”, США) клетки подсчитывали с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (“BD Bioscience”, США).

Для трёх повторов опытов статистическую значимость отличия определяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA). Визуализацию графиков и представление данных в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) осуществляли с помощью программы SigmaPlot 14.0 (“Systat Software, Inc.”, США).

Биоинформатический анализ белков

Встречаемость различных типов аминокислотных остатков для S1 белков из организмов *E. coli* и *T. thermophilus* определяли как отношение числа остатков каждого типа к общему числу аминокислотных остатков. Аминокислотный состав S1 доменов сравнивали с соответствующими протеомными значениями для *E. coli* и *T. thermophilus* (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000625> и <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000532>).

Идентичность доменов S1 рибосомных белков из *E. coli* и *T. thermophilus* была рассчитана с помощью программы BLAST с опцией Align two or more sequences (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Процент идентичности считали как отношение числа совпавших остатков к длине выровненного участка, умноженное на 100%.

Для предсказания участков первичной структуры рибосомного белка S1, склонных к агрегации, использовали предустановленные разработчиками

настройки для четырёх программ. Список программ вместе с их кратким описанием и ссылками на ресурсы представлен в таблице 1.

Использованные компьютерные программы отличаются по базовым алгоритмам, поэтому предсказанные участки аминокислотной последовательности сравнивали и выбирали те, которые находятся в пределах домена и предсказываются несколькими программами.

Предсказание антимикробных свойств исследуемых пептидов осуществляли встроенными инструментами баз данных CAMP R3 [23] и DBAASP v3 [24], а также программой amPEPpy v1 [25]. Для расчёта физико-химических свойств пептидов (заряд (Q), гидрофобность (H), гидрофобный момент (M_H), амфипатичность (A)) использовали веб-сервер DBAASP v3.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск уникальных и отличительных характеристик для S1 доменов *E. coli* и *T. thermophilus*

S1 рибосомный белок является эссенциальным, мультифункциональным и уникальным компонентом бактериальной клетки. Во-первых, S1 белок участвует в инициации трансляции и её регуляции. Во-вторых, мутантные по S1 белку клетки не жизнеспособны. В-третьих, уникальность этого белка состоит в том, что S1 присутствует только в бактериальных клетках. Мы считаем, что для разработки пептида с антибактериальной и амилоидогенной активностью важно, чтобы родительский белок имел такие свойства. Перечисленные выше особенности делают S1 белок важной мишенью для разработки антибактериальных препаратов [26].

Для выбора участков аминокислотной последовательности белка, потенциально обладающих амилоидогенными и антимикробными свойствами, были проанализированы домены рибосомного белка S1 из организмов *T. thermophilus* (5 доменов — 536 аминокислотных остатков (а.о.)) и *E. coli* (6 доменов — 557 а.о.). Идентичность доменов S1

Таблица 1. Биоинформатические инструменты для предсказания в аминокислотной последовательности участков, склонных к агрегации

Название	Описание	Публикация	Ссылка на ресурс в интернете
FoldAmyloid (размер окна 5)	Использует ожидаемую плотность упаковки аминокислотных остатков и вероятность образования водородных связей.	[19]	http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/
PASTA2.0	Сравнивает известные β -структуры с последовательностью аминокислотных остатков.	[20]	http://protein.bio.unipd.it/pasta2/
GAP	Используются дифференциальные потенциалы для пар аминокислот в амилоидоподобных или β -аморфных гексапептидах, полученные на основе частотно-зависимых пар с установлением различия их относительной ориентации вдоль β -тяжа.	[21]	https://www.iitm.ac.in/bioinfo/GAP/
AGGRESCAN	Выявляет склонность к агрегации отдельных аминокислотных остатков в последовательности.	[22]	http://bioinf.uab.es/AGGRESCAN/

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ ИЗ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1

Таблица 2. Идентичность доменов белка S1 *T. thermophilus* и *E. coli*, рассчитанная с помощью программы BLAST

<i>T. thermophilus</i>						<i>E. coli</i>						
	d1	d2	d3	d4	d5		d1	d2	d3	d4	d5	d6
d1	100	25	0	35	39	d1	100	67	29	35	0	29
d2		100	0	0	32	d2		100	26	0	0	35
d3			100	46	46	d3			100	54	44	33
d4				100	56	d4				100	37	35
d5					100	d5					100	29
						d6						100

рибосомных белков из двух организмов, рассчитанная программой BLAST, показывает, что наиболее идентичными по аминокислотной последовательности являются домены d4 и d5 для *T. thermophilus*, а для *E. coli* — пара доменов d1, d2 и пара d3, d4 (табл. 2). Интересно отметить, что домены S1 белка *T. thermophilus* d1 и d2 обладают наименьшей идентичностью к d3, а d2 к d3 и d4. В последовательности S1 белка *E. coli* наблюдается наименьшая идентичность домена d2 к доменам d4 и d5, а домена d5 к d1 и d2. Последний домен S1 рибосомного белка имеет сходство ко всем доменам в составе молекулы. Доля идентичности d5 S1 *T. thermophilus* для доменов d1-d4 в среднем составляет 43%, а d6 S1 *E. coli* для доменов d1-d5 — 32%. Домены в составе белка могут взаимодействовать независимо от их сходства друг с другом. Однако мы считаем, что гомология последнего домена S1 рибосомного белка *T. thermophilus* и *E. coli* к другим участкам собственного белка, вероятно, важна для взаимодействия доменов. В более ранней нашей работе по исследованию амилоидогенных пептидов было показано, что сходная аминокислотная последовательность пептида и белка может приводить к формированию фибриллярных структур [18].

Сравнение аминокислотных последовательностей доменов S1 рибосомного белка двух видов *T. thermophilus* и *E. coli* показало, что наиболее сходны домены d2 *T. thermophilus* и d1 *E. coli*, d4 *T. thermophilus* и d4 *E. coli*, d4 *T. thermophilus* и d3 *E. coli*, d5 *T. thermophilus* и d4 *E. coli* (табл. 2). Интересно отметить, что d4 и d5 *T. thermophilus* обладают наибольшим сходством к доменам d1-d6 *E. coli*, а в аминокислотной последовательности S1 *E. coli* домены d3, d4 и d5 наиболее схожи с 1-5 доменами *T. thermophilus* (см. Σ в табл. 3). Домены рибосомного белка S1 имеют ОБ-укладку. ОБ-укладка (ОБ-fold: oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold) представляет собой замкнутый β -цилиндр или β -баррель из антипараллельных β -тяжей и одной α -спирали. Несмотря на то, что идентичность выше 50% была найдена только для 4 пар доменов S1 *E. coli* и S1 *T. thermophilus* (табл. 3), структуры доменов этих белков сохраняют ОБ-укладку [27]. Каждый домен рибосомного белка S1 имеет свою функцию, пока неизвестную для других видов бактерий, кроме *E. coli*.

Таблица 3. Сравнение идентичности между доменами для белков S1 *T. thermophilus* и *E. coli*, рассчитанной с помощью программы BLAST (Σ обозначает общую сумму идентичности между доменами по столбцам и строкам)

Домены		<i>T. thermophilus</i>					
		d1	d2	d3	d4	d5	Σ
<i>E. coli</i>	d1	38	71	0	0	35	144
	d2	0	36	0	37	32	105
	d3	0	24	44	52	41	161
	d4	32	0	42	56	52	182
	d5	26	0	47	44	41	158
	d6	29	35	0	37	35	136
	Σ	125	166	133	226	236	

При этом мы наблюдаем не полную идентичность в аминокислотной последовательности доменов, что может указывать на разную функцию доменов.

Сравнение представленности аминокислот в S1 рибосомном белке *T. thermophilus* и *E. coli* указывает на некоторые различия (рис. 1). Обращает внимание увеличение доли таких аминокислот в белке S1 *T. thermophilus*, как P, E, Q, R, L, а в белке *E. coli* наблюдается увеличение A, D, N. Мы также проанализировали различие встречаемости типов аминокислот в последовательности S1 рибосомного белка и в протеоме исследуемого организма (рис. 2). Было показано, что в S1 белке *T. thermophilus* чаще, чем во всей совокупности белков протеома этой бактерии, встречаются следующие аминокислоты: E, Q, D, S, K, T, V и I; а в S1 белке *E. coli* по сравнению с протеомом *E. coli* — E, D, N, K, V. Согласно базе данных dbAMP и APD3, в антибактериальных пептидах часто встречаются такие аминокислоты, как F, C, W, G, R, K, и редко — D, E, Q, T, V, S, M [29, 30]. Вызывает интерес тот факт, что доля аминокислот D, E, Q, T, V, S разительно отличается для антимикробных пептидов и в S1 рибосомном белке *T. thermophilus* и в *E. coli*.

С помощью четырёх биоинформатических программ FoldAmyloid, GAP, AGGRESCAN, PASTA2.0 мы сравнили амилоидогенность каждого домена

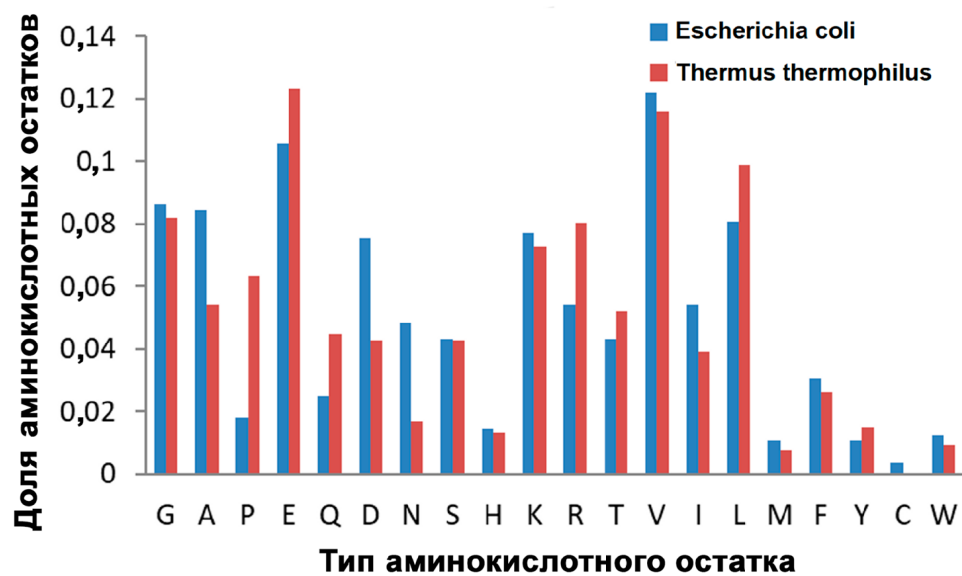


Рисунок 1. Аминокислотный состав S1 доменов из организмов *E. coli* и *T. thermophilus*.

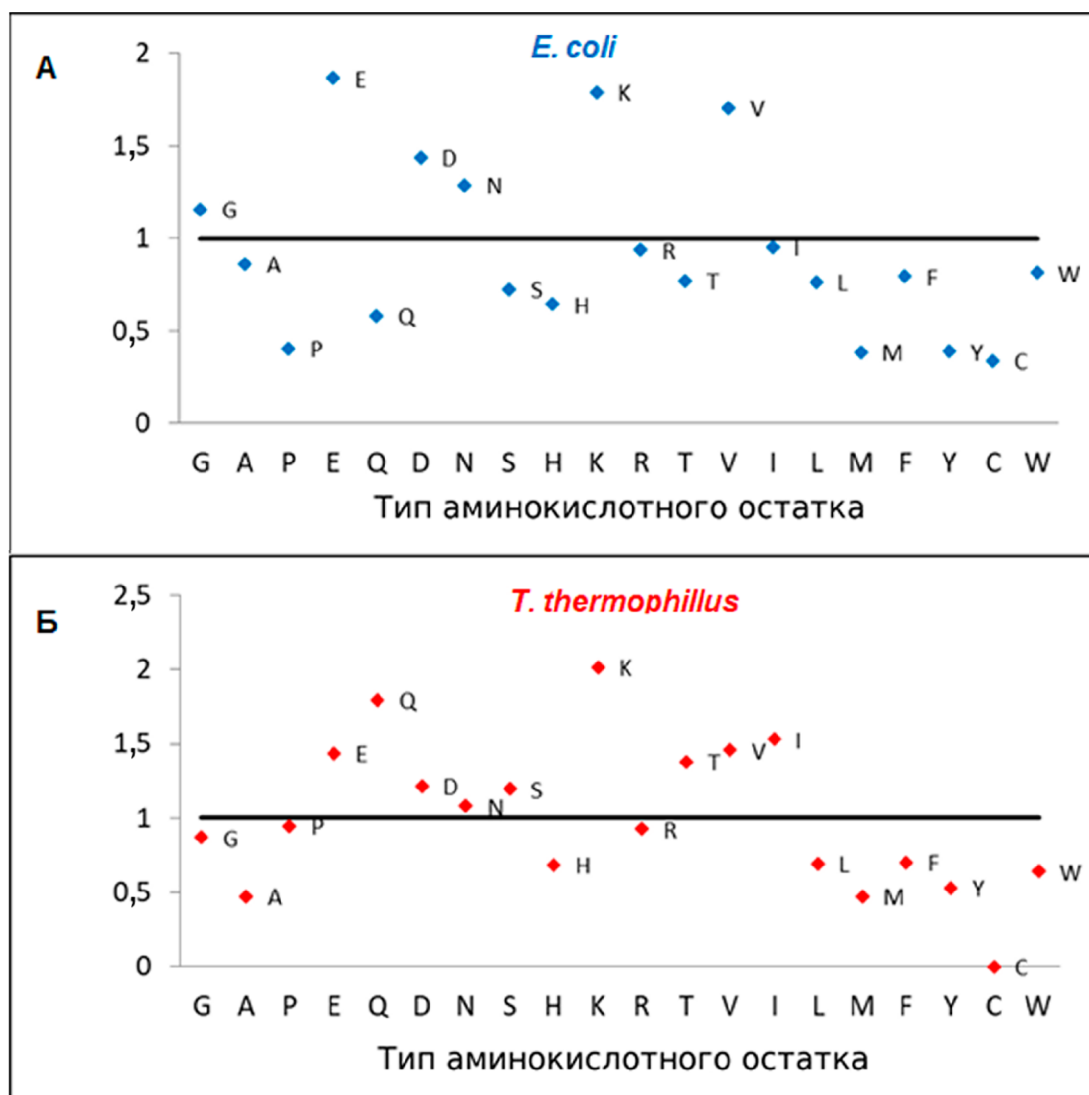


Рисунок 2. Аминокислотный состав S1 доменов из организмов *E. coli* и *T. thermophilus* и их протеомов. За единицу приняты значения встречаемости аминокислот во всем протеоме.

Таблица 4. Доля аминокислотных остатков в амилоидогенных участках, предсказанных с помощью четырёх программ (в скобках указано число амилоидогенных участков)

Домен	FoldAmyloid		GAP		AGGRESCAN		PASTA 2.0	
	<i>T. thermophilus</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. thermophilus</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. thermophilus</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. thermophilus</i>	<i>E. coli</i>
d1	0,21 (3)	0,09 (1)	0,36 (3)	0,17 (3)	0,21 (1)	0,28 (1)	0,13 (1)	0,33 (1)
d2	0,07 (1)	0,07 (1)	0,21 (6)	0,37 (4)	0,25 (2)	0,45 (3)	0	0
d3	0,14 (2)	0,23 (2)	0,22 (4)	0,35 (4)	0,33 (2)	0,41 (2)	0,26 (1)	0
d4	0,15 (2)	0,15 (2)	0,15 (4)	0,38 (4)	0,39 (2)	0,45 (3)	0	0,24 (1)
d5	0,16 (2)	0,25 (3)	0,17 (4)	0,45 (6)	0,46 (4)	0,41 (3)	0,36 (2)	0
d6		0		0,5 (3)		0		0

для двух белков (табл. 4). Амилоидогенность — это доля остатков в амилоидогенных участках (фрагментах аминокислотной последовательности пептида или белка, ответственных за формирование упорядоченных структур, таких как амилоидные фибриллы). Количество амилоидогенных участков в S1 белке *T. thermophilus* и *E. coli* и соотношение амилоидогенных остатков к длине домена в целом не отличается, за исключением d2 и d4 доменов S1 *E. coli*. В этих доменах S1 *E. coli* наблюдается большее соотношение аминокислотных остатков в последовательности, склонных к агрегации. Интересной особенностью d6 домена S1 *E. coli* является отсутствие предсказания амилоидогенных участков по трём компьютерным программам.

Подводя итог биоинформатического исследования, важно отметить, как свойства пептида могут повлиять на его активность. Исследование особенностей S1 рибосомного белка *T. thermophilus* и *E. coli* показало наличие гомологичных участков между доменами S1 белка *T. thermophilus* и *E. coli* как внутри молекулы, так и между двумя белками, что может привести к неспецифическому действию на *T. thermophilus* пептида из последовательности белка S1 *E. coli*. В аминокислотной последовательности S1 белка выше частота аминокислот, которые обычно мало представлены в АМП, что может оказать негативное влияние на антимикробную активность или эффективность пептида (высокие минимальные ингибирующие концентрации (МИК)). S1 рибосомный белок *T. thermophilus* и *E. coli* содержит предсказанные амилоидогенные последовательности, что может приводить к агрегации молекул пептида с другими белками, имеющими сайты агрегации (механизм направленной коагрегации). Домены, родственные S1 белку, содержатся в других бактериальных белках, что может увеличивать число мишеней для пептида.

На основании результатов предсказания амилоидогенных участков в пределах доменов S1 рибосомного белка нами был осуществлён дизайн и заказан синтез в Филиале Института биоорганической химии РАН (Россия), “IQChemical” (Россия) и “ELABSCIENCE” (Китай) для 7 амилоидогенных пептидов из *E. coli*: 1) I10D (IVRGVVVAID) из первого домена; 2) D10F (DEITVKVLKF) из третьего домена;

3) T10E (TDYGCFVEIE) из четвёртого домена; 4) V10V (VVNVGDVVEV) из четвёртого домена; 5) D10G (DFGIFIGLDG) из пятого домена; 6) V10NV (VHLSDISWNV) из пятого домена; 7) E10D (EIAAVVLQVD) из пятого домена. И для 4 пептида из *T. thermophilus*: 1) D9G (DFGVFVNLG) из третьего домена; 2) V10T (VVEGTVVEVT) из третьего домена; 3) V10I (VTDFGVFVEI) из пятого домена; 4) EM9D (EMEVVVLNID) из пятого домена.

Все пептиды, кроме D9G, длиной 10 аминокислотных остатков. На рисунке 3 пептиды с аминокислотной последовательностью, синтез которых был заказан, выделены шестиугольниками. Нами было показано, что практически все синтезированные пептиды образуют амилоидные фибриллы [30].

Для второго и третьего пептидов из *T. thermophilus* мы заказали по два конъюгата: конъюгат линкерной последовательности и фрагмента цитозольного белка S1 GGSarGVTDFGVFVEI (где Sar — это саркозин) и GGSarGVVEGTVVEVT; и конъюгат фрагмента белка Tat-HIV-1 (49-57), линкерной последовательности и фрагмента цитозольного белка S1 RKKRRQRRGGSarGVTDFGVFVEI и RKKRRQRRGGSarGVVEGTVVEVT. Фрагмент Tat-HIV-1 (49-57) был добавлен к последовательностям выбранных пептидов для увеличения антимикробной активности, способности проникать через мембрану, повышения жёсткости и механической стойкости комплексов агрегатов [31].

Среди пептидов, выбранных для синтеза, наиболее сходны следующие пары пептидов из *E. coli* и *T. thermophilus* соответственно: I10D и E10D, T10E и V10I, V10V и V10T, D10G и D9G, D10G и V10I (табл. 5). Процент идентичности аминокислотной последовательности для этих пар составил более 60%. Высокое сходство первичной структуры пептидов может указывать на сходные структурные особенности и близкие механизмы их действия.

Согласно информации из баз данных антимикробных пептидов CAMPR3 и APD3, с учётом особенностей вторичной структуры АМП делятся на следующие классы: только α -спиральные, преимущественно α -спиральные, только β -структурные, преимущественно β -структурные, α -спиральные и β -структурные, неструктурированные. Большая часть

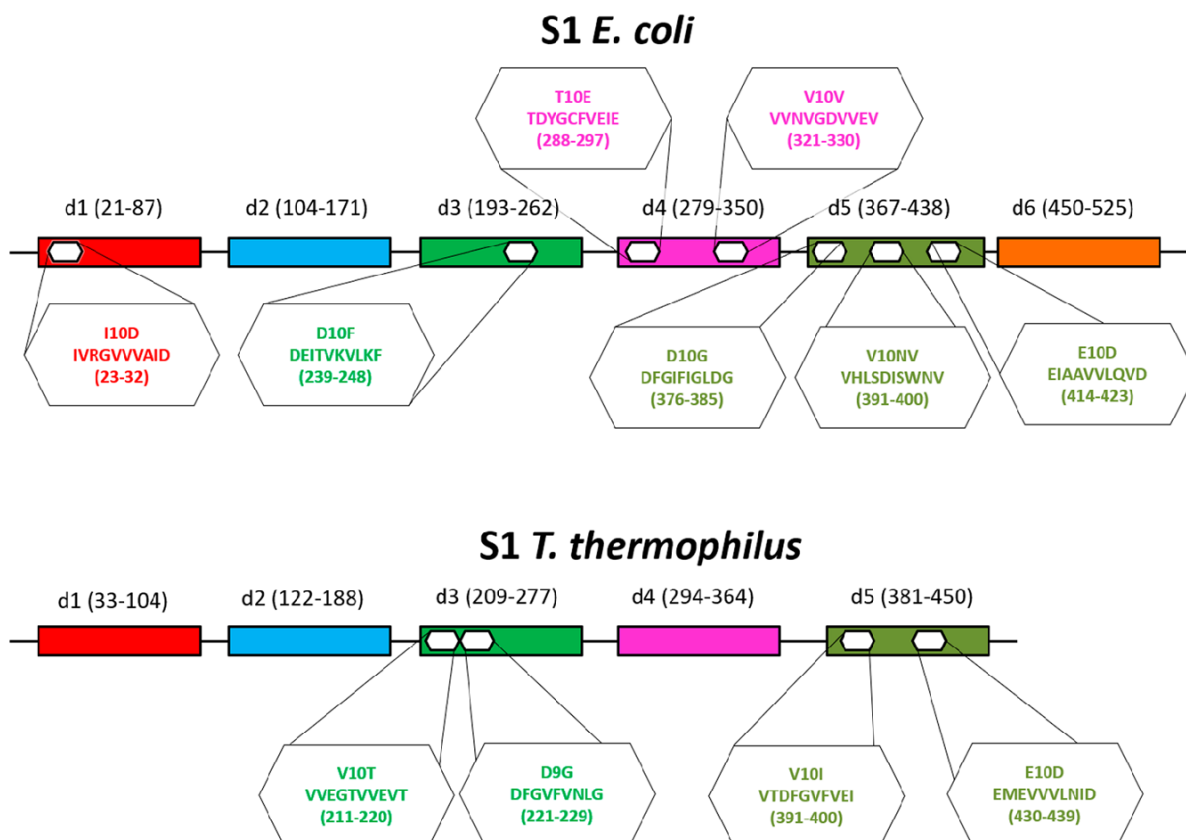


Рисунок 3. Домены рибосомного белка S1 из *E. coli* и *T. thermophilus*, а также синтезированные пептиды.

Таблица 5. Гомология исследуемых пептидов, рассчитанная с помощью программы BLAST

Пептиды			<i>T. thermophilus</i>			
			V10T (d3)	D9G (d3)	V10I (d5)	E10D (d5)
			VVEGTVVEVT	DFGVFVNLG	VTDFGVFVEI	EMEVLNID
<i>E. coli</i>	I10D (d1)	IVRGVVVAID	0	0	0	67
	D10F (d3)	DEITVKVLKF	0	0	0	0
	T10E (d4)	TDYGCFVEIE	0	0	78	0
	V10V (d4)	VVNVDVVEV	70	0	0	0
	D10G (d5)	DFGIFGLDG	0	63	67	0
	V10NV (d5)	VHLSISWNV	0	0	0	0
	E10D (d5)	EIAAVVLQVD	0	0	0	0

синтезированных пептидов, в основном в доменах S1 рибосомного белка, формируют β -структурные участки с примыкающими к нему одним или двумя неструктурированными петлевыми участками (рис. 4). В основном к таким пептидам можно отнести все пептиды на основе S1 *T. thermophilus* (V10T, D9G, V10I, E10D) и четыре пептида из S1 *E. coli* (I10D, D10F, T10E, V10V, E10D). Пептид D10G из S1 *E. coli* неструктурирован, а V10NV представлен поворотом α -спирали.

Структурные особенности пептидов можно описать с помощью физико-химических параметров. С помощью веб-сервера DBAASP v3.0 были рассчитаны такие физико-химические свойства

пептидов, как заряд (Q), гидрофобность (H), гидрофобный момент (M_H), амфипатичность (A) [24]. Суммарный заряд АМП играет существенную роль для первоначального электростатического притяжения молекул к мембране и клеточной стенке бактерий. В целом для АМП характерен суммарный положительный заряд. Согласно выборке DBAASP, основная масса (4844 из 7164) пептидов имеет заряд от 2 до 7. Однако обнаружено 1005 последовательностей, которые имеют заряд от -3 до -2. Исследуемые нами пептиды имеют суммарный заряд в основном от -3 до -2, за исключением пептидов, синтезированных на основе последовательности S1 *E. coli* V10NV (Q=-1),

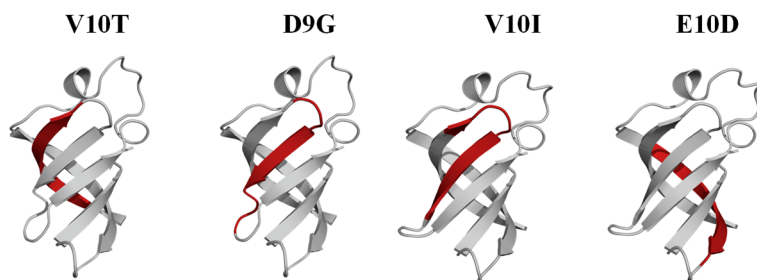
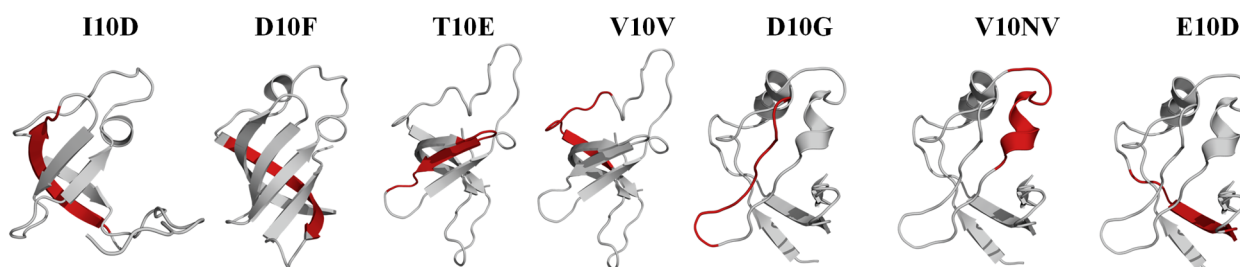
T. thermophilus*E. coli*

Рисунок 4. Локализация исследуемых пептидов в структурах доменов белка S1. Красным цветом выделены экспериментально изученные амилоидогенные участки. Для доменов S1 *T. thermophilus* 3D структуры 3 и 5 доменов были предсказаны с помощью сервера Robetta (<https://robetta.bakerlab.org>). Для *E. coli* структура 1 домена взята из банка белковых структур (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>), код: 2MFI; для 4 домена — код PDB: 2 KHI; для 5 домена — код PDB: 5XQ5. 3D структура 3 домена была предсказана с помощью сервера Robetta.

I10D ($Q=0$), D10F ($Q=0$) и модифицированных пептидов *T. thermophilus* R23I ($Q=6$) и R23T ($Q=6$). Амфипатичность и гидрофобный момент — это характеристики, которые отражают способность пептида проникать через мембрану и проявлять гемолитическую активность. Показано, что увеличение гидрофобного момента повышает гемолитическую активность пептида [32]. Гидрофобный момент (M_H) — количественная характеристика амфипатичности, рассчитываемая как векторная сумма гидрофобности отдельных аминокислот, нормализованная к идеальной спирали. Пептиды из базы данных DBAASP в среднем имеют гидрофобный момент в диапазоне от 0,3 до 2,4, что соответствует исследуемым нами пептидам, за исключением R23I ($M_H=0,17$). Амфипатичность исследуемых пептидов варьирует от 0 до 1,12, что является левой границей распределения амфипатичности среди пептидов DBAASP. Особенно выделяются пептиды R23I и R23T, для которых амфипатичность выше 1. Гидрофобность определяет степень, с которой пептид может внедряться в липидный бислой. Для исследуемых пептидов этот показатель не отличается от референсных значений пептидов из базы данных DBAASP. Подводя итог сравнения физико-химических показателей исследуемых и референсных пептидов можно сделать вывод, что синтезированные пептиды не отличаются от известных АМП. Все эти свойства сведены в таблицу, которая представлена в дополнительных материалах (табл. 1С).

Проверка пептидов на антибактериальную активность

Пептиды, выбранные для синтеза на основе S1 белка *E. coli*, были проверены на антибактериальную активность на клеточной культуре *E. coli* двумя методами. В рамках этой работы мы не оценивали влияние пептидов на основе S1 рибосомного белка *T. thermophilus* на *E. coli*.

Антибактериальные свойства пептидов оценивали на основе диффузионного метода исследования эффективности действия антибактериальных препаратов. По сравнению с антибиотиком (канамицином) в той же концентрации, пептиды не формируют зон лизиса на бактериальных газонах (дополнительные материалы, табл. 2С). Действие пептидов (для концентраций 0,1 и 1 мг/мл) проявляется в виде угнетения роста и деформации формы колоний. Для всех пептидов, кроме D10F, в местах внесения после 16 ч инкубации заметны формирования пятен в виде плёнок. Минимальная подавляющая концентрация пептидов, при которой замечен бактериостатический эффект, составила 100 мкг/мл.

Оценка антибактериального действия 3 пептидов (D10F, I10D и V10NV) из S1 *E. coli* методом разведения в жидкой питательной среде показана на диаграмме (рис. 5). По оси абсцисс расположены пептиды, по оси ординат — эффект действия. Доверительный интервал показан верхней и нижней

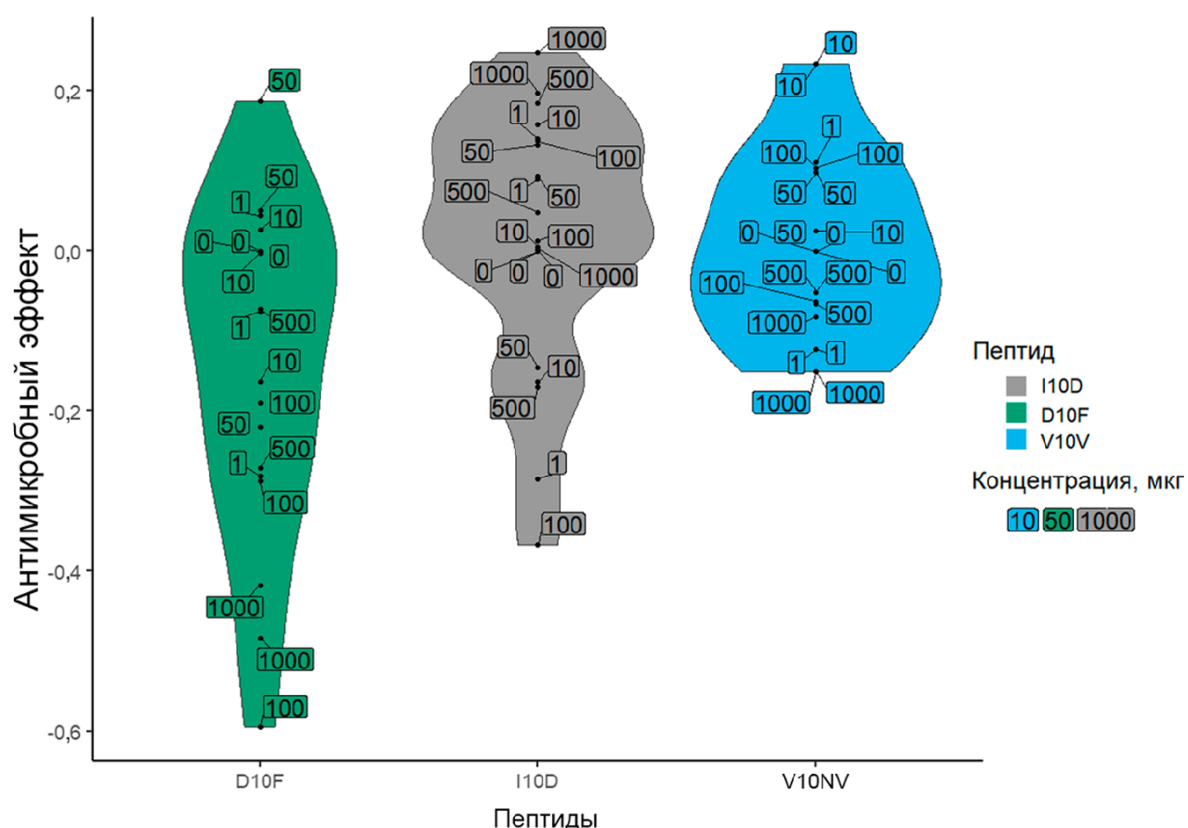


Рисунок 5. Диаграмма распределения эффекта в зависимости от концентрации пептида. Верхняя и нижняя границы каждой фигуры показывают 95% доверительный интервал. Ширина фигуры демонстрирует плотность точек. Действующая концентрация пептида (мкг/мл) показана цифрами с чёрными точками.

границами фигуры. Ширина фигуры показывает частоту наблюдения точек (чем выше плотность точек, тем шире фигура). Цифровые метки с чёрными точками в области каждой фигуры отражают действующую концентрацию пептида (мкг/мл). На диаграмме заметно, что пептиды не угнетают рост *E. coli*, поскольку расположение экспериментальных точек не зависит от концентрации пептида. Кроме того, рассчитанная эффективность пептида (1) не превышает 0,5 ($\Sigma = \pm 0,2$). Поэтому можно считать, что пептиды D10F, I10D и V10NV не обладают антимикробным действием. К сожалению, из-за сложности синтеза амилонидогенных участков и небольшого количества синтезированных пептидов нам не удалось достоверно оценить антибактериальный эффект для пептидов T10E, V10V, D10G, E10D этим методом.

Несмотря на то, что используемые нами методы не показали достоверное проявление антибактериального эффекта, наблюдение деформации и уменьшение размера колоний, а также формирование плёнок при росте на твёрдой питательной среде может свидетельствовать о реакции бактериальных клеток на присутствие пептидов. Исследование штамма *E. coli*, устойчивого к антибиотикам и АМП, показало, что устойчивость возникает частично за счёт регуляторных изменений, формирующих липополисахаридный состав внешней мембраны бактерий [33]. Авторы этой работы показали, что комбинация антибиотика

и антимикробного пептида может не только повысить чувствительность бактерии, уменьшить МИК антимикробных компонентов, но и замедлить эволюцию резистентности *de novo*.

В настоящее время существует множество программ предсказания антимикробной активности пептидов. Несмотря на большое разнообразие подходов к оценке антибактериальной активности, не удаётся создать универсальный шаблон, по которому можно различить антимикробные и не антимикробные пептиды, что является существенным ограничением при разработке новых АМП. Таблица 6 с предсказанием антимикробной активности исследуемых нами пептидов подтверждает это ограничение. Такие пептиды из S1 *E. coli* как D10F, T10E, D10G ложно предсказываются как антимикробные, а пептиды из S1 *T. thermophilus* V10I, R23I, R23T предсказываются как АМП только некоторыми программами. Необходимо отметить, что обучающие выборки для программ, предсказывающих АМП, в большей степени содержат положительно заряженные пептиды. Предположительно, это может снижать вероятность предсказания отрицательно заряженных АМП.

Интересно, что все исследуемые пептиды (проявляющие и не проявляющие антимикробную активность) содержат полностью или частично аминокислотные остатки с высоким антимикробным индексом, который был получен с использованием веб-сервера AMPA (tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do),

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ ИЗ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1

Таблица 6. Предсказание антимикробной активности исследуемых пептидов с помощью программ CAMPR3, DBAASP и amPEPpy. Жирным шрифтом выделены пептиды, предсказывающиеся как антимикробные. Жирным шрифтом с подчёркиванием выделены пептиды, для которых экспериментально доказано проявление антимикробной активности

Пептид		Доказанная антимикробная активность	CAMPR3							DBAASP	amPEPpy
№	Название		Метод опорных векторов (SVM)		Метод случайных деревьев (RF)		Искусственная нейронная сеть (ANN)	Дискриминантный анализ (DA)			
E. coli											
1	I10D	Нет	Нет	0,1	Нет	0,4	Нет	Нет	0,1	Нет	Нет
2	D10F	Нет	Нет	0	Нет	0,4	АМП	Нет	0,1	Нет	Нет
3	T10E	Нет	АМП	0,9	Нет	0,4	Нет	Нет	0	Нет	Нет
4	V10V	Нет	Нет	0,5	Нет	0,5	Нет	Нет	0	Нет	Нет
5	D10G	Нет	Нет	0,4	Нет	0,4	АМП	Нет	0,1	Нет	Нет
6	V10NV	Нет	Нет	0,1	Нет	0,3	Нет	Нет	0	Нет	Нет
7	E10D	Нет	Нет	0,1	Нет	0,5	Нет	Нет	0	Нет	Нет
T. thermophilus											
1	D9G	Нет	Нет	0	Нет	0,4	АМП	Нет	0	Нет	Нет
2	E10D	Нет	Нет	0,1	Нет	0,5	Нет	Нет	0	Нет	Нет
3	V10I	Да	АМП	0,8	Нет	0,4	Нет	Нет	0	Нет	Нет
4	V10T	Нет	Нет	0,1	Нет	0,5	Нет	Нет	0	Нет	Нет
5	G14I	Нет	Нет	0	Нет	0,4	Нет	Нет	0,4	Нет	Нет
6	G14T	Нет	Нет	0	Нет	0,4	Нет	Нет	0	Нет	Нет
7	R23I	Да	Нет	0	АМП	0,5	Нет	АМП	0,9	Нет	АМП
8	R23T	Да	Нет	0	Нет	0,4	Нет	АМП	0,6	Нет	АМП
9	Tat-пептид	Нет	АМП	0,9	АМП	0,5	Нет	АМП	0,9	Нет	АМП

что является признаком малоэффективных АМП. Возможно, для увеличения активности пептидов необходимо уменьшить этот показатель и таким образом понизить МИК пептидов.

Изучение цитотоксического действия пептидов

Важной характеристикой АМП является проявление цитотоксического действия. Пептиды, проявляющие цитотоксичность в отношении эукариотических клеток, не могут быть использованы для борьбы с антибиотикорезистентными бактериями. На рисунке 6 представлены результаты исследования жизнеспособности эукариотических клеток после инкубации с пептидами в течение 24 ч. Значимые изменения жизнеспособности клеток были выявлены для всех пептидов только при использовании максимальной концентрации 20 мкг/мл. Исследуемые нами пептиды обладают высокими МИК, самым эффективным является R23I из S1 *T. thermophilus* (МИК=50 мкг/мл). В свете этих фактов требуется модификация пептидов с целью уменьшения их цитотоксического действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Выявленные амилоидогенные и антимикробные свойства пептидов вызывают исследовательский интерес. Остаётся неясным, как связаны и связаны ли вообще эти свойства пептидов. Понимание структурных особенностей и связанных с ними биологических эффектов может позволить конструировать пептиды для борьбы с антибиотикорезистентностью бактерий.

Ранее нам удалось оценить антимикробную активность пептидов, синтезированных на основе аминокислотной последовательности S1 рибосомного белка *T. thermophilus*, действие которых угнетало рост клеточной культуры *T. thermophilus*. Было показано, что модификация пептида приводила к снижению способности удлинённых пептидов формировать вытянутые структурированные агрегаты/фибриллы, однако усиливала их способность подавлять рост клеточной культуры *T. thermophilus* [18]. Используя этот подход при конструировании пептидов на основе рибосомного белка S1 *E. coli* для подавления

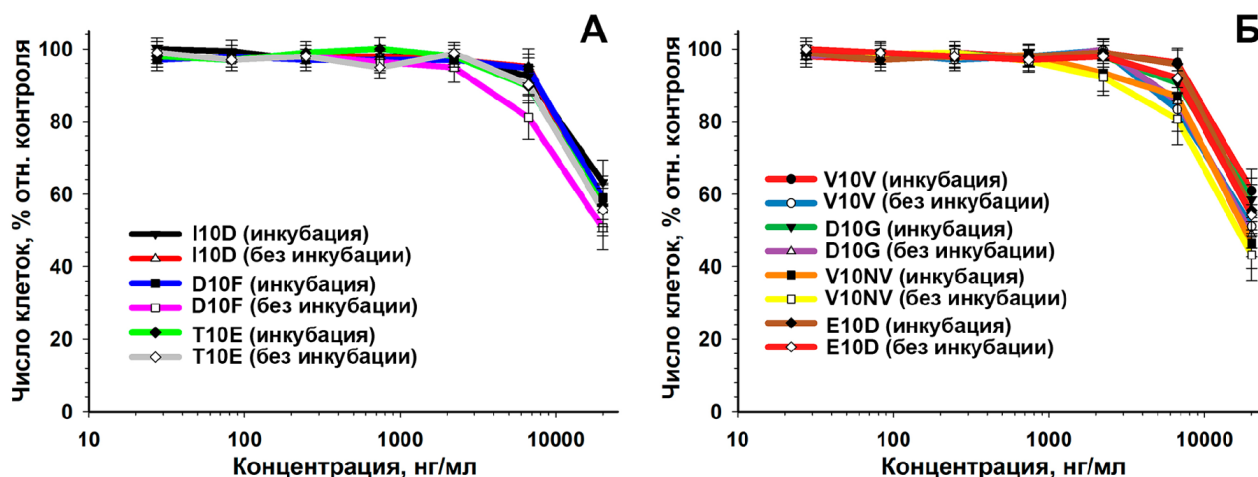


Рисунок 6. Определение токсичности изучаемых пептидов на клетках фибробластов кожи человека после инкубации с пептидами в течение 24 ч. Представлен процент выживших клеток. **А** — пептиды I10D, D10F и T10E из S1 *E. coli*, **Б** — пептиды V10V, D10G, V10NV и E10D из S1 *E. coli*

роста клеток *E. coli*, мы наблюдаем при действии исследуемых пептидов отсутствие угнетения роста культуры клеток, несмотря на проявление признаков деформации и уменьшения размера колоний. Вероятно, условно-патогенная бактерия *E. coli* обладает механизмами устойчивости к исследуемым пептидам. Преадаптация патогенных бактерий является серьёзной проблемой для создания антимикробных веществ. Известны как пассивные механизмы защиты грамотрицательных бактерий, которые препятствуют проникновению АМП внутрь клетки путём связывания с липополисахаридами клеточной стенки [34], так и активные, путём изменения компонентов клеточной стенки бактерии [35].

Результаты данной работы указывают на необходимость снижения МИК исследуемых пептидов и уровня токсичности путём оптимизации последовательности с учётом антимикробного индекса аминокислот, использования комбинации нескольких пептидов, либо изменения активной формы пептидов. Двухвалентные ионы металлов увеличивают активность отрицательно заряженных АМП [36], использование Zn^{2+} или Mg^{2+} в качестве кофакторов может повысить эффективность пептидов.

Таким образом, с применением биоинформатических инструментов были исследованы последовательности S1 рибосомных белков *E. coli* и *T. thermophilus*. Показано наличие гомологичных участков аминокислотной последовательности S1 белка как между доменами одной бактерии, так и между доменами двух неродственных организмов *T. thermophilus* и *E. coli*. Замечено, что доля аминокислот D, E, Q, T, V, S в аминокислотной последовательности S1 рибосомного белка *E. coli* и *T. thermophilus* и в базах данных антимикробных пептидов dbAMP и APD3 имеют разную представленность. Первичная структура S1 рибосомных белков *E. coli* и *T. thermophilus* содержит участки, склонные к агрегации и образованию амилоидов. Пептиды, предсказанные с помощью

биоинформатических инструментов как склонные к агрегации и формированию амилоидных фибрилл, были синтезированы и проверены на антимикробное и цитотоксическое действие. Оценка биологической активности и цитотоксичности синтезированных пептидов показала низкую антимикробную эффективность изучаемых пептидов и выраженное цитотоксическое действие. Можно сделать вывод о том, что предрасположенность синтезированных пептидов к образованию белковых агрегатов и фибрилл (самоорганизации) не является основной характеристикой для проявления их антибактериальных свойств, и выбор фрагментов аминокислотной последовательности пептидов с потенциальными антимикробными свойствами должен также учитывать другие характеристики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны Е.И. Дерюшевой и А.В. Мачулину за помощь в предсказании трёхмерных структур и подготовку рисунка 4.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 18-14-00321).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. McEwen S.A., Collignon P.J. (2018) in: Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals: Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective (Schwarz S., Cavaco L.M., Shen J., eds.), ASM Press, Washington, pp. 521-547. DOI: 10.1128/9781555819804.ch25.
2. Chokshi A., Sifri Z., Cennimo D., Horng H. (2019) J. Glob. Infect. Dis., **11**(1), 36-42.
3. Larsson D.G.J., de Pedro C., Paxeus N. (2007) J. Hazard. Mater., **148**, 751-755.
4. Theuretzbacher U., Outterson K., Engel A., Karlén A. (2020) Nat. Rev. Microbiol., **18**, 275-285.
5. Yu G., Baeder D.Y., Regoes R.R., Rolff J. (2018) Proc. R. Soc. B Biol. Sci., **285**, 20172687. DOI:10.1098/rspb.2017.2687.
6. Lewies A., Du Plessis L.H., Wentzel J.F. (2019) Probiotics Antimicrob. Proteins, **11**, 370-381.
7. Koo H.B., Seo J. (2019) Pept. Sci., **111**(5), e24122. DOI: 10.1002/pep2.24122.
8. Gosztyla M.L., Brothers H.M., Robinson S.R. (2018) J. Alzheimer's Disease, **62**, 1495-1506.
9. Chu H., Pazgier M., Jung G., Nuccio S.P., Castillo P.A., de Jong M.F., Winter M.G., Winter S.E., Wehkamp J., Shen B. et al. (2012) Science, **337**, 477-481.
10. Gabere M.N., Noble W.S. (2017) Bioinformatics, **33**, 1921-1929.
11. Wu Q., Ke H., Li D., Wang Q., Fang J., Zhou J. (2019) Curr. Top. Med. Chem., **19**, 4-16.
12. Fields F.R., Freed S.D., Carothers K.E., Hamid M.N., Hammers D.E., Ross J.N., Kalwajys V.R., Gonzalez A.J., Hildreth A.D., Friedberg I. et al. (2020) Drug Dev. Res., **81**, 43-51.
13. Rajkumari J., Dyavaiah M., Syed A., Siddhardha B. (2020) in: Model Organisms for Microbial Pathogenesis, Biofilm Formation and Antimicrobial Drug Discovery: Model Organisms and Antimicrobial Drug Discovery (Siddhardha B., Dyavaiah M., Syed A., eds.), Springer Singapore, Singapore, pp. 527-543. DOI: 10.1007/978-981-15-1695-5_27.
14. Ebbensgaard A., Mordhorst H., Aarestrup F.M., Hansen E.B. (2018) Front. Microbiol., **9**, 2153. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02153.
15. Manges A.R., Geum H.M., Guo A., Edens T.J., Fibke C.D., Pitout J.D.D. (2019) Clin. Microbiol. Rev., **32**(3), e00135-18. DOI: 10.1128/CMR.00135-18.
16. Mardirossian M., Pérébasquine N., Benincasa M., Gambato S., Hofmann S., Huter P., Müller C., Hilpert K., Innis C.A., Tossi A. et al. (2018) Cell Chem. Biol., **25**, 530-539.
17. Kurpe S., Grishin S.Y., Surin A.K., Panfilov A.V., Slizen M.V., Chowdhury S.D., Galzitskaya O.V. (2020) Int. J. Mol. Sci., **21**, 9552. DOI: 10.3390/ijms21249552.
18. Kurpe S., Grishin S., Surin A., Selivanova O., Fadeev R., Dzhus U., Gorbunova E., Mustaeva L., Azev V., Galzitskaya O. (2020) Int. J. Mol. Sci., **21**, 6382. DOI: 10.3390/ijms21176382.
19. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2010) Bioinformatics, **26**, 326-332.
20. Trovato A., Seno F., Tosatto S.C.E. (2007) Protein Eng. Des. Sel., **20**, 521-523.
21. Thangakani A.M., Kumar S., Nagarajan R., Velmurugan D., Gromiha M.M. (2014) Bioinformatics, **30**, 1983-1990.
22. Conchillo-Solé O., de Groot N.S., Avilés F.X., Vendrell J., Daura X., Ventura S. (2007) BMC Bioinformatics, **8**, 65. DOI: 10.1186/1471-2105-8-65.
23. Waghv F.H., Idicula-Thomas S. (2020) Protein Sci., **29**, 36-42.
24. Pirtskhalava M., Armstrong A.A., Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D.E., Tartakovsky M. (2021) Nucleic Acids Res., **49**, D288-D297.
25. Lawrence T.J., Carper D.L., Spangler M.K., Carrell A.A., Rush T.A., Minter S.J., Weston D.J., Labbé J.L. (2020) Bioinformatics, btaa917. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa917.
26. Zhi Y., Dai Y., Yang J., Tan S., Lin D., Lin K. (2019) Bioorg. Chem., **82**, 58-67.
27. Deryusheva E., Machulin A., Matyunin M., Galzitskaya O. (2021) Proteins, DOI: 10.1002/prot.2608.
28. Wang G., Li X., Wang Z. (2016) Nucleic Acids Res., **44**, D1087-D1093.
29. Grishin S., Deryusheva E., Machulin A., Selivanova O., Glyakina A., Gorbunova E., Mustaeva L., Azev V., Rektina V., Kalebina T., Surin A., Galzitskaya O. (2020) Int. J. Mol. Sci., **21**(15), 5199. DOI: 10.3390/ijms21155199.
30. Zhong J.H., Chi Y.H., Li W.C., Lin T.H., Huang K.Y., Lee T.Y. (2019) Nucleic Acids Res., **47**, D285-D297.
31. Console S., Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R., Ballmer-Hofer K. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 35109-35114.
32. Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Bienert M. (1997) FEBS Lett., **403**, 208-212.
33. Lázár V., Martins A., Spohn R., Daruka L., Grézel G., Fekete G., Számel M., Jangir P.K., Kintsés B., Csörgő B. et al. (2018) Nat. Microbiol., **3**, 718-731.
34. Papo N., Shai Y. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 10378-10387.
35. Liu Y.-Y., Chandler C.E., Leung L.M., McElheny C.L., Mettus R.T., Shanks R.M.Q., Liu J.-H., Goodlett D.R., Ernst R.K., Doi Y. (2017) Antimicrob. Agents Chemother., **61**(6), e00580-17. DOI: 10.1128/AAC.00580-17.
36. Harris F., Dennison S., Phoenix D. (2009) Curr. Protein Peptide Sci., **10**(6), 585-606.

Поступила в редакцию: 15. 04. 2021.

После доработки: 28. 04. 2021.

Принята к печати: 09. 05. 2021.

**ANTIBACTERIAL EFFECTS OF PEPTIDES SYNTHESIZED
BASED ON THE SEQUENCE OF RIBOSOME PROTEIN S1**

***S.R. Kurpe¹, S.Yu. Grishin¹, A.V. Glyakina^{1,2}, M.V. Slizen¹, A.V. Panfilov¹,
A.P. Kochetov³, A.K. Surin^{3,4}, M.I. Kobyakova⁵, R.S. Fadeev⁵, O.V. Galzitskaya^{1,5*}***

¹Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,

4 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; *e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

²Institute of Mathematical Problems of Biology, Russian Academy of Sciences,

Keldysh Institute of Applied Mathematics, Russian Academy of Sciences,

Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

³The Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,

Obolensk, Moscow region, 142279 Russia

⁵Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,

Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

Antibiotic resistance of bacteria is a topical problem on a global scale. Sometimes vigorous human activity leads to an increase in the number of bacteria carrying resistance genes in the environment. Antimicrobial peptides (AMPs) and similar compounds are potential candidates for combating antibiotic-resistant bacteria. Previously, we proposed and successfully tested on *Thermus thermophilus* a new mechanism of AMP action. This mechanism of directed coaggregation is based on the interaction of a peptide capable of forming fibrils with a target protein. In this work, we discuss the criteria for choosing a target for the targeted action of AMP, describe the features of the “parental” S1 ribosomal proteins *T. thermophilus* and *Escherichia coli* and the studied peptides using bioinformatic analysis methods, assess the antimicrobial effect of the synthesized peptides on a model organism of *E. coli* and cytotoxicity on cells of human fibroblasts. The obtained results will be important for the creation of new AMPs for pathogenic organisms.

Key words: antimicrobial peptides; AMPs; fibrils; antimicrobial resistance; amyloid

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-14-00321).

Received: 15.04.2021, revised: 28.04.2021, accepted: 09.05.2021.