

## БЕЛКИ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КРАБА-СТРИГУНА И КАМЧАТСКОГО КРАБА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. В.Г. Молчанов\*, А.Е. Егоров\*, Д.А. Осетрина\*, В.Ю. Новиков\*\*, Н.М. Новожилов\*\*\*, А.А. Тимченко\*\*\*\*, Е.А. Согорин\*\*\*\*\*, М.А. Тимченко\*.\*#

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

\*\*Полярный филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, ул. Академика Книповича, 6, Мурманск, 183038, Россия

\*\*\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

\*\*\*\*Институт белка РАН, ул. Институтская, 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

\*\*\*\*\*Институт биологического приборостроения РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
ул. Институтская, 7, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: maria\_timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2024 г.

После доработки 07.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

За время своего длительного существования ракообразные, несмотря на отсутствие высокоспецифичной адаптивной иммунной системы, как у позвоночных, успешно адаптировались к выживанию в своей естественной среде обитания, богатой микроорганизмами, в том числе благодаря наличию антимикробных пептидов. Один из ценных источников антимикробных пептидов – гепатопанкреас, представляющий отходы промысла и переработки краба. Методом зимографии и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии нами было обнаружено, что в состав экстракта из гепатопанкреаса краба-стригуна входит небольшой пептид (около 3 кДа), который гидролизует клеточную стенку и полисахарид клеточной стенки *M. lysodeikticus*. Найденный пептид может представлять интерес для практического применения. Из гепатопанкреаса камчатского краба с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе был выделен белок (около 14 кДа), который также проявляет активность в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus*, что было показано методами зимографии и турбидиметрии.

*Ключевые слова:* антимикробные белки и пептиды, гепатопанкреас, камчатский краб, краб-стригун.

DOI: 10.31857/S0006302924040136, EDN: NGFZNR

Рост невосприимчивых к антибиотикам патогенов, имеющих механизмы резистентности к существующим противомикробным препаратам, серьезно ограничивают возможности для лечения распространенных инфекций, поэтому актуальной задачей является поиск новых лекарственных средств с антибактериальной активностью. В качестве перспективных кандидатов для создания таких препаратов могут выступать антимикробные пептиды (АМП). АМП являются одним из основных компонентов врожденной иммунной защиты и встречаются во всех царствах: от бактерий до млекопитающих. Перспективность

вания АМП объясняется их небольшим размером, системным действием, высоким сродством и широким спектром активности, устойчивостью к протеолизу, быстрым подавлением роста бактерий и грибов, ограниченной иммуногенностью и отсутствием резистентности к ним у бактерий [1]. Многообещающим источником для открытия биоактивных пептидов являются морские беспозвоночные, которые представляют собой пойкилотермные организмы, ферменты которых способны функционировать в широком диапазоне температур. На данный момент антимикробная активность была обнаружена у нескольких десятиногих ракообразных, включая омаров, крабов, креветок и пресноводных раков, как в гемолимфе или гемоцитах, так и в других органах [2–5].

*Сокращения:* АМП – антимикробный пептид, ГПК – гепатопанкреас краба, ЯМР – ядерно-магнитный резонанс.

Мощная антимикробная активность у ракообразных объясняется тем, что ракообразные постоянно подвергаются воздействию различных патогенов. Ведущими молекулярными факторами врожденной иммунной системы являются антимикробные белки и пептиды. На данный момент уже выделено несколько семейств антимикробных белков и пептидов (крустины, пенидины, антилипополисахаридные факторы, лизоцимы и др.), а также постоянно появляются новые индивидуальные микробные пептиды ракообразных [6].

Одним из источников новых АМП может выступать гепатопанкреас, пищеварительная железа членистоногих и моллюсков. Важным фактом является то, что гепатопанкреас представляет собой отходы промысла крабов [7]. Надо отметить, что основная доля добычи краба в РФ приходится на крабов из отряда *Decapoda*: краба-стригуна опилио (инфраотряд *Brachyura*) и камчатского краба (инфраотряд *Anomura*). Но к настоящему времени имеется лишь ограниченное число работ, посвященных изучению ферментов из гепатопанкреаса этих видов краба, в основном коллагеназ, хитиназ и протеаз [7–9].

На сегодняшний день АМП камчатского краба мало изучены. Первые шаги к исследованию антибактериальной активности в органах камчатского краба были сделаны в работе [10]. В экстрактах гемолимфы, гемоцитов, а также некоторых тканей камчатского краба была обнаружена и антибактериальная активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов *V. anguillarum*, *E. coli* и грамположительных бактерий *S. glutamicum*, а также слабая активность в отношении грамположительного микроорганизма *S. aureus*. Исследования термостабильности и устойчивости к протеиназам показали, что антибактериальные факторы из камчатского краба имеют белковую природу, а также обладают лизоцимподобной и гемолитической активностью.

Кроме того, в гемоцитах удалось найти и охарактеризовать три катионных пептида, богатых цистеином (Cys), названных паралитоцинами 1–3 [11], и хотя они не проявляли антимикробной активности в отношении целевых штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa* или *S. aureus*, была обнаружена умеренная антимикробная активность в отношении нескольких штаммов морских микроорганизмов. Кроме того, скрининг библиотеки кДНК выявил последовательность крустина, катионного Cys-богатого белка, в гемоцитах камчатского краба, кодирующую зрелый пептид из 98 аминокислот. Крустин камчатского краба был отнесен к группе крустинов II типа [12].

Гепатопанкреас (ГПК) камчатского краба, содержащий огромное количество еще не исследованных белков и пептидов, может представлять

огромный интерес как источник АМП. Первое упоминание об антибактериальных свойствах экстракта из гепатопанкреаса камчатского краба приводится в работе [10]. Нами в экстракте ГПК камчатского краба был обнаружен пептид (около 5 кДа) [13], гидролизующий как клеточную стенку *M. lysodeikticus*, так и полисахарид, входящий в состав пептидогликана клеточной стенки *M. lysodeikticus*. Расщепление полисахарида подтверждалось также методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. Анализ антибактериальной активности полученных экстрактов в отношении грамотрицательного микроорганизма *E. coli* и грамположительного *B. cereus* показал, что в присутствии экстракта пептидов прекращался рост клеток *B. cereus*, и на начальном этапе роста сильно замедлялся рост *E. coli*. Эффективность в отношении грамположительных бактерий был немного выше по сравнению с лизоцимом.

Работы, посвященные исследованию АМП краба-стригуна также немногочисленны. В отдельных работах показано, что обработка протеазами гомогенатов отходов краба-стригуна опилио, таких, как цефалоторакс, органы пищеварительной системы, приводит к появлению пептидных фракций с высокой антибактериальной активностью, особенно в случае гепатопанкреаса [14, 15].

Авторы работы [16] провели тестирование на антибактериальную активность фракций из гепатопанкреаса краба-стригуна, полученных после его гидролиза с помощью эндопротеазы «Протамекс» и концентрирования твердофазной экстракцией. Было обнаружено, что полученные фракции проявляли антибактериальную активность в отношении грамположительной *L. innocua*. С помощью масс-спектрометрии были идентифицированы одиннадцать пептидов (1.0–2.2 кДа), имеющих по меньшей мере 80% аминокислотной гомологии с четырьмя антимикробными пептидами. Два пептида имели гомологию с крустин-подобным пептидом черной тигровой креветки и антимикробным пептидом GAPDH желтоперого тунца. Также были идентифицированы пептиды, имеющие гомологию с антибактериальным пептидом Одорранаин-С7 из лягушки *Odorrana grahami* и предполагаемым антибактериальным пептидом азиатской божьей коровки *Harmonia axyridis*.

В данной работе были выделены экстракты низкомолекулярных белковых фракций из ацетонового порошка гепатопанкреаса краба-стригуна и гепатопанкреаса камчатского краба, получение которого включало стадию водной экстракции, которая, по нашим предположениям, позволила бы сохранить максимальное количество низкомолекулярных белков. Было проведено исследование их активности в отношении

клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus* и полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* методами зимографии и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. Методом аффинной хроматографии экстракта из гепатопанкреаса камчатского краба на гепарин-сефарозе была получена фракция белка, для которого также была оценена антибактериальная активность в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Для экстракции веществ липидной природы при получении ацетонового порошка гепатопанкреаса использовали ацетон квалификации «осч» и н-бутиловый спирт квалификации «ч».

Для экстракции пептидов использовали ацетонитрил квалификации «осч», трифторуксусную кислоту квалификации «ч», дитиотреитол (ДТТ) (Sigma, США) и муравьиную кислоту квалификации «ч».

Реактивы для электрофореза: акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид, аммоний надсерноокислый, глицин, глицерин – фирмы Amresco (США); додецилсульфат натрия – Fluka (Швейцария); тетраметилэтилендиамин, бромфеноловый синий, Кумасси R-250 – Serva (Германия);  $\beta$ -меркаптоэтанол, трис(гидроксиэтил)аминометан – Sigma (США).

В качестве ЯМР-стандарта использовали 3-триметилсилил-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ ] пропионат натрия (Sigma, США). Тяжелая вода ( $\text{D}_2\text{O}$ , 99.9% дейтерирования) была фирмы Sigma (США).

Остальные химические вещества, используемые в эксперименте, такие как  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$ , гидроксид натрия, хлорид натрия, ацетат натрия, имели квалификацию «чда».

**Получение ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба.** Перед использованием мороженный гепатопанкреас без размораживания измельчали на куттере, заливали охлажденным до  $-20^\circ\text{C}$  ацетоном (соотношение по массе ГПК : ацетон = 1 : 8 – на 1 кг ГПК 10 л ацетона), выдерживали 15–20 ч в морозильной камере при  $-20^\circ\text{C}$  и периодическом перемешивании. Затем суспензию фильтровали на нутч-филт্রে через слой фильтровальной бумаги. Осадок собирали и повторяли экстракцию охлажденным ацетоном 2–3 раза по 1 ч до полного обесцвечивания филтратата.

Далее осадок заливали охлажденным до  $-20^\circ\text{C}$  н-бутанолом (1 : 10) и оставляли при периодическом перемешивании в морозильной камере на 15–20 ч. Суспензию отделяли от раствора филь-

трованием и промывали охлажденным н-бутанолом аналогично обработке ацетоном.

После экстракции н-бутанолом повторяли обработку охлажденным ацетоном до полного удаления следов н-бутанола.

Промытый обезжиренный осадок белков сушили. Сушку выполняли предварительно в вакуумном сушильном шкафу ШСВ-45к (Медфизприбор, СССР) для удаления ацетона и окончательно в лиофильной сушилке Heto FD 8 (Heto-holten A/s, Дания) в течение 20 ч. Получали лиофилизированный комплексный ферментный препарат.

Для экстракции веществ липидной природы использовали ацетон квалификации «х.ч.» (ТУ 2633-018-44493179-98) и н-бутиловый спирт квалификации «ч» (ГОСТ 6006-78).

**Получение ацетонового порошка гепатопанкреаса со стадией водной экстракции.** 500 г гепатопанкреаса краба были разморожены до температуры около  $0^\circ\text{C}$  и гомогенизированы. Затем к гомогенату был добавлен 1 л дистиллированной воды (соотношение по массе ГПК и воды = 1 : 2). Смесь перемешивали в течение 30 мин, переносили в центрифужные пробирки приблизительно по 250–300 г в каждую и центрифугировали при температуре  $2-4^\circ\text{C}$  в течение 60 мин при 25000 об/мин. Водную фракцию собирали и сушили в сублиматоре при температуре от  $-25^\circ\text{C}$  постепенным повышением до  $25^\circ\text{C}$  в течение 20 ч при вакууме не более 0.6 гПа. Сухой препарат промывали холодным ацетоном небольшими порциями 3–4 раза. Промытый препарат сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре в течение 3 ч.

Получали около 60 г сухого препарата из ГПК камчатского краба и около 50 г из ГПК краба-стригуна.

**Экстракция низкомолекулярных белковых фракций из ацетонового порошка гепатопанкреаса.** Образцы экстрактов пептидов из ацетонового порошка гепатопанкреаса крабов получали двумя способами.

Первый способ был описан в работе [10]. Лиофилизированные образцы ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба (~100 мг) экстрагировали 10 объемами (об./об.) 60% (об./об.) ацетонитрила, содержащего 0.1% трифторуксусной кислоты, в течение 24 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Супернатант собирали, хранили при  $4^\circ\text{C}$  и остаток еще раз экстрагировали в тех же условиях. Объединенные супернатанты инкубировали при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 1–2 ч, чтобы образовались две жидкие фазы – фаза, богатая ацетонитрилом, и фаза, богатая водой. Две фазы разделяли и хранили в замороженном виде при  $-20^\circ\text{C}$ . Водный экстракт (нижняя фаза) лиофилизировали и для зи-

мографии растворяли в 50 мкл натрий-фосфатного буфера (25 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.5).

Второй способ основан на методе получения пептидов для масс-спектрометрического анализа, описанного в работе [17].

Лиофилизат ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба растворяли при перемешивании в 2 мМ дитиотреитоле, содержащем 0.1% муравьиной кислоты. Раствор центрифугировали при 10000  $g$  в течение 15 мин при 4°C и отбирали супернатант, обогащенный пептидами, поскольку низкомолекулярные пептиды и белки более растворимы в 2 мМ дитиотреитоле, чем высокомолекулярные. Обогащенный пептидами супернатант лиофилизировали и для зимографии растворяли в 50 мкл натрий-фосфатного буфера, pH 5.5.

**Зимография в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.** Зимографию для обнаружения гидролазной активности в отношении клеточной стенки проводили согласно протоколу [18]. Клеточная стенка *M. lysodeikticus* была предоставлена Опытным биотехнологическим производством ИБХ РАН. Препарат клеточной стенки *M. lysodeikticus* получали путем механического разрушения клеток, отделения клеточной стенки на центрифуге, ее промывки и сушки. Проводили электрофорез [19] полученных экстрактов ГПК в 16%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, который был сополимеризован с клеточной стенкой (1 мг/мл). В качестве положительного контроля использовали лизоцим куриного белка HEWL (0.5 мг/мл) (Amresco, США). Ренатурацию проводили в буфере (25 мМ Трис- $\text{HCl}$ , pH 7.2), содержащем 1% (об./об.) Тритона X-100, в течение двух часов при 37°C, последующее окрашивание раствором 0.01%-го метиленового синего с 0.01%-м КОН проводили в течение 20 мин с последующей отмывкой дистиллированной водой в течение 12 ч. При необходимости гель делили на две части, и вторую часть окрашивали красителем Кумасси R-250. Окраску осуществляли согласно процедуре, описанной в работе [18]. Для выявления активности при других значениях pH в качестве ренатурирующего буфера использовали 25 мМ натрий фосфатный буфер (pH 5.5) и 25 мМ Трис- $\text{HCl}$  (pH 9.0), содержащие 1% (об./об.) Тритона X-100. О наличии гидролазной активности судили по отсутствию окраски фона.

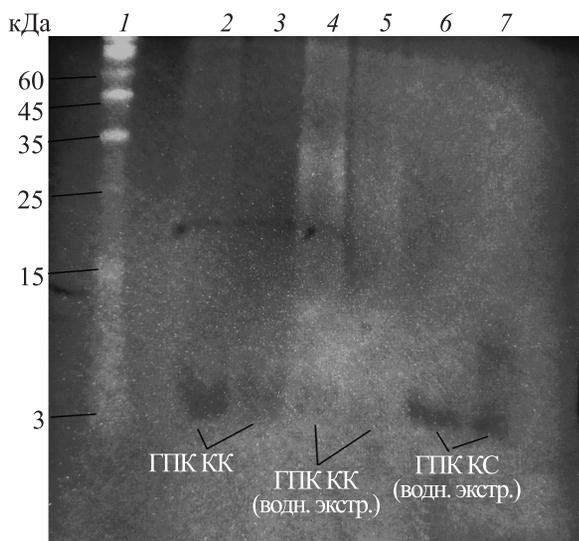
**Анализ гидролазной активности образцов пептидов в отношении полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии.** Полисахарид клеточной стенки был предоставлен Опытным биотехнологическим производством ИБХ РАН. Раствор полисахарида клеточной стенки получали из препарата клеточной стенки *M. lysodeikticus* путем его ферментативной

обработки амидазой и одной стадии хроматографической очистки. Количество полисахарида измеряли антроновым методом определения восстанавливающих углеводов (по глюкозе) [20]. Образец содержал полисахарид в концентрации 3.3 мг/мл в буфере, содержащем 20 мМ ацетата натрия, 0.5 М  $\text{NaCl}$ , pH 5.5.

Для оценки гидролазной активности готовили следующие образцы (общий объем образца – 570 мкл): контроли – полисахарид (180 мкл полисахарида (3.3 мг/мл), 390 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера pH 5.5), экстракт ГПК краба-стригуна, полученный с помощью ацетонитрила (10 мкл экстракта пептида, 560 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера, pH 5.5), и реакционную смесь, содержащую 50 мкл полисахарида (3.3 мг/мл), 10 мкл экстракта ГПК краба-стригуна и 510 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера, pH 5.5. Контроли и реакционная смесь инкубировались при 37°C в течение двух суток. Перед ЯМР-анализом к 570 мкл образцов добавляли 30 мкл стандарта – 4 мМ раствор 3-триметилсиллил-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ ] пропионата натрия в 1 М фосфатном буфере (pH 7.2), содержащем  $\text{D}_2\text{O}$ .

Образцы (600 мкл) помещали в ЯМР-ампулу диаметром 5 мм. 1D-спектры регистрировали в ЦКП ИТЭБ РАН на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой по протонам 598.95 МГц с использованием стандартных импульсных последовательностей из библиотеки импульсных последовательностей фирмы Bruker. Все измерения проводили при температуре 298 К (25°C). Для подавления сигнала от протонов воды использовали метод предварительного насыщения с применением 1D-импульсной последовательности ZGPR. Число накоплений составляло от 64 до 1024 сканов, интервал между сканами – 10 с, этого было достаточно для релаксации протонов. Для исследования кинетики гидролиза спектры регистрировали через определенные промежутки времени. Отнесение химических сдвигов проводили по сигналу стандарта при 0.00 м.д., выступающего в качестве внутреннего образца сравнения. Обработку спектров и вычисление интегралов проводили в программе TOPSPIN (Bruker). Для подтверждения результатов использовали спектральную базу данных программного обеспечения AMIX (Bruker).

**Аффинная хроматография на гепарин-сефарозе экстракта низкомолекулярной белковой фракции из гепатопанкреаса камчатского краба.** Для хроматографии использовали экстракт ГПК камчатского краба, полученный способом без стадии водной экстракции ГПК и выделенный из ацетонового порошка с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты. К лиофильно высушенному образцу добавляли 25 мМ натрий фосфатный буфер



**Рис. 1.** Исследование активности экстрактов ГПК крабов в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus* с помощью зимографии (инвертированное фото). Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы; 2 и 3 – экстракты ГПК камчатского краба, полученные соответственно с помощью ацетонитрила и дитиотреитола, как описано в работе [13]; 4 и 5 – экстракты ГПК камчатского краба, полученные соответственно с помощью ацетонитрила и дитиотреитола, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции; 6 и 7 – экстракты ГПК краба-стригуна, полученные соответственно с помощью ацетонитрила и дитиотреитола, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции.

(рН 7.0), центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, супернатант пропускали через фильтр 0.45 мкм и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (1 мл Heparin SepFast HighRes Column, BioToolomics, Великобритания), уравновешенной 25 мМ натрий фосфатным буфером (рН 7.0), промывали этим же буфером. Элюцию осуществляли градиентом хлорида натрия от 0 до 2 М NaCl. Хроматографические фракции анализировали на наличие белка в 16%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, активность белка в отношении клеточной стенки детектировали методом зимографии [18]. Белковые фракции сходили с колонки при концентрации NaCl 1.2–1.7 М. Концентрация очищенного белка была оценена спектрофотометрически и составила 1.41 о.е./мл.

**Турбидиметрический анализ активности в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus*.** Поглощение суспензии клеточной стенки при 540 нм ( $A_{540} = 1$ ) указывает примерно на 1 мг клеточной стенки/мл [18]. Очищенную клеточную стенку 0.99  $OD_{540}$  ресуспендировали в 3 мл буфера, необходимого для исследования. Конечное поглощение суспензии при 540 нм составляло 0.33.

К 690 мкл суспензии клеточной стенки добавляли 10 мкл фракции белка, полученной с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе (1.41 о.е./мл). В качестве контроля использовали лизоцим (1 мг/мл), образец которого готовили таким же способом. Препараты инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени измеряли поглощение при 540 нм во время инкубации. Турбидиметрический анализ проводили на спектрофотометре UV-2401 (Shimadzu, Япония).

**Статистический анализ.** Эксперименты повторяли, самостоятельно осуществляя процесс получения экстрактов и дальнейший их анализ, более трех раз.

Статистический анализ и построение графиков проводили в программе Sigma Plot 12.5 (Systat Software, Германия). Представленные данные турбидиметрического анализа были получены путем усреднения результатов трех отдельных экспериментов. Погрешности представляют собой стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было обнаружено, что в состав экстракта низкомолекулярной фракции белков, выделенного из ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба, получение которого не включало стадию водной экстракции, входит небольшой пептид (около 5 кДа), который гидролизует как клеточную стенку *M. lysodeikticus*, так и полисахарид клеточной стенки *M. lysodeikticus*, но не активен в отношении желатина [13].

В данной работе была проведена модификация метода получения лиофильно высушенного порошка гепатопанкреаса краба и добавлена стадия водной экстракции, что, исходя из наших предположений, позволило бы сохранить максимальное количество низкомолекулярных белков, так как после их экстракции сразу следовала сублимационная сушка, а затем промывка безводным ацетоном уже высушенного остатка, что исключало бы возможное растворение низкомолекулярных пептидов в водно-ацетоновом растворе при обработке влажного ГПК, как осуществлялось нами ранее.

С помощью этого метода были получены образцы ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Методом зимографии был проведен анализ активности в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus* экстрактов, выделенных из этих образцов с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты, а также с помощью дитиотреитола и муравьиной кислоты. В качестве контроля активности использо-

вали экстракты ГПК камчатского краба, полученные без стадии водной экстракции, как описано нами ранее [13].

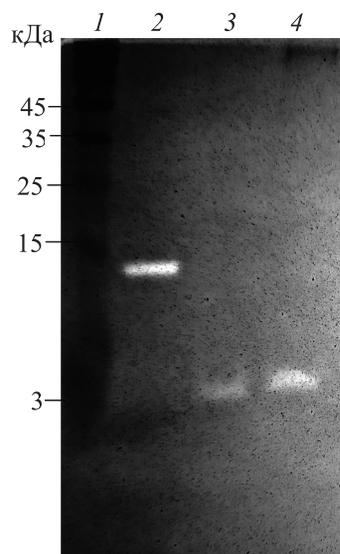
На рис. 1 представлена зимограмма, полученная для препаратов ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Электрофорезный гель содержал в своем составе клеточную стенку (~1 мг/мл), а активность определяли по появлению белых полос в месте расщепления субстрата на зимограмме после ренатурации нанесенных белков при прокрашивании метиленовым синим. Для определения молекулярного веса использовали белковые маркеры с известными значениями молекулярных весов.

Как видно из рис. 1, модификация метода получения ГПК камчатского краба с включением дополнительного этапа водной экстракции приводит к исчезновению полос с ферментативной активностью в области 5 кДа, которые нами детектировались ранее [13], что может быть связано с их ферментативным гидролизом на стадии водной экстракции присутствующими в ГПК ферментами. В то же время, в экстракте краба-стригуна, полученном таким способом, обнаруживается активность в этой же области, что свидетельствует о том, что экстракты краба-стригуна обладают активностью в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus*. Из рис. 2 можно видеть, что пептид из экстракта ГПК краба-стригуна немного меньше по размеру пептида с такой же активностью из ГПК камчатского краба.

Для того чтобы убедиться, что расщепление клеточной стенки пептидом, входящим в состав ГПК краба-стригуна, происходит по полисахаридным цепям пептидогликана, как и в случае камчатского краба [13], было проведено исследование его активности в отношении полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* (NAM-NAG) с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Анализ проводили для экстракта ГПК краба-стригуна, полученного с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты.

Были получены протонные ЯМР-спектры исходного полисахарида, экстракта низкомолекулярной белковой фракции, выделенной ацетонитрильным методом, в отсутствие полисахарида, и полисахарида после инкубации в течение двух дней при 37°C с экстрактом пептидов (рис. 3).

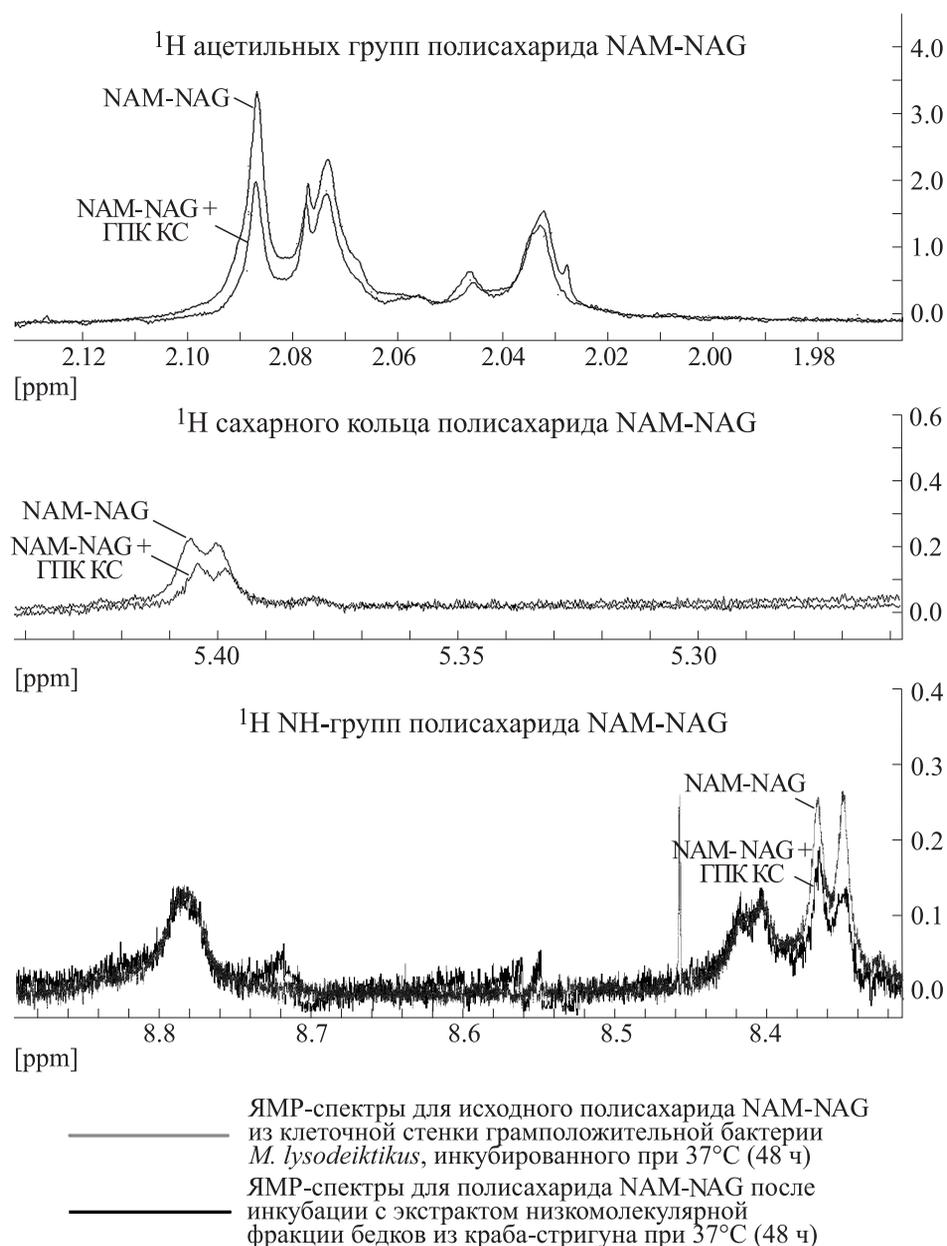
Как видно из приведенных спектров ЯМР (рис. 3), после инкубации с экстрактом ГПК краба-стригуна спектр полисахарида существенно менялся в области связанных ацетильных групп



**Рис. 2.** Анализ активности экстрактов ГПК крабов в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus* с помощью зимографии. Дорожки: 1 – маркеры молекулярного веса; 2 – положительный контроль – лизоцим куриного белка; 3 – экстракт ГПК краба-стригуна, полученный с помощью ацетонитрила, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции; 4 – экстракт ГПК камчатского краба, полученный с помощью ацетонитрила, ГПК получали без стадии водной экстракции, как описано в работе [13]. Гель прокрашен метиленовым синим.

и области аминогрупп, а также области сахарного кольца. Для экстракта в отсутствие полисахарида в этих областях сигналы не наблюдались. Следовательно, ЯМР-спектроскопия подтвердила расщепление полисахарида клеточной стенки экстрактом из ГПК краба-стригуна.

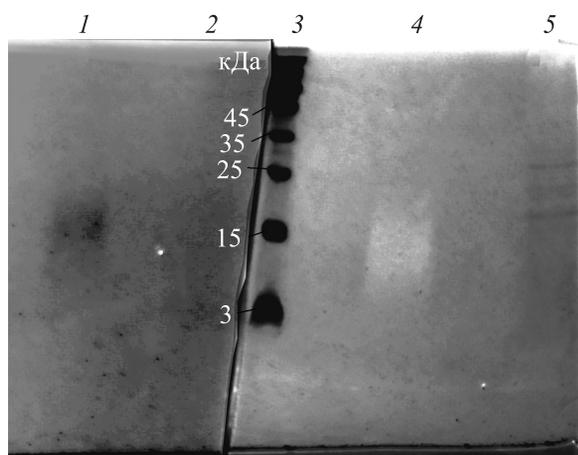
Обнаруженная гидролазная активность у пептидов, входящих в состав ГПК крабов, позволила предположить, что, вероятно, одним из способов их выделения может быть аффинная хроматография на гепарин-сефарозе, благодаря сродству к полисахаридам. Нами было проведено хроматографическое разделение на гепарин-сефарозе образца экстракта ГПК камчатского краба, полученного с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты, как описано нами в работе [13]. Полученные фракции анализировались на активность с помощью зимографии. К сожалению, разделение предполагаемых пептидов на колонке осуществить не удалось, но была обнаружена фракция, содержащая еще один потенциальный антибактериальный белок с молекулярным весом, близким к лизоциму. Данный белок сходил одним пиком и, по всей видимости, также расщеплял клеточную стенку, но по пептидным фрагментам, поскольку расщепление наблюдали только в части зимограммы, окрашенной краси-



**Рис. 3.**  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры гидролиза полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* экстрактом из ацетонового порошка ГПК краба-стригуна при pH 5.5 (представлены разные области спектра, в которых наблюдается изменение сигналов исходного полисахарида при расщеплении). NAM-NAG – полисахарид, состоящий из ковалентно сшитых N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и N-ацетилглюкозамина (NAG).

телем Кумасси (рис. 4). Надо отметить, что сам белок прекрасно прокрашивался метиленовым синим, в то время как не окрашивался Кумасси. Такая особенность была обнаружена и у исследуемых нами пептидов из ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Исходя из того, что метиленовый синий – катионный краситель, можно предположить, что исследуемые нами АМП представляют собой анионные пептиды, не содержащие арги-

нины, с которыми, в основном, реагирует краситель Кумасси, а также содержат в малом количестве или совсем не содержат гистидин, лизин, триптофан, тирозин и фенилаланин, с которыми данная краска также реагирует, хотя и слабее [21]. Следует добавить, что обнаруженный белок с молекулярной массой 14 кДа не относится к лизоцимам, которые хорошо окрашиваются красителем Кумасси.



**Рис. 4.** Исследование активности белковой фракции, выделенной методом аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе из гепатопанкреаса камчатского краба, в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus* с помощью зимографии. Дорожки 1 и 2 – прокрашивание метиленовым синим, дорожки 3–5 – прокрашивание Кумасси. Дорожки: 1 и 4 – белковая фракция с гепарин-сефарозы, 2 и 5 – проскок с колонки с гепарин-сефарозой, 3 – маркеры молекулярной массы.

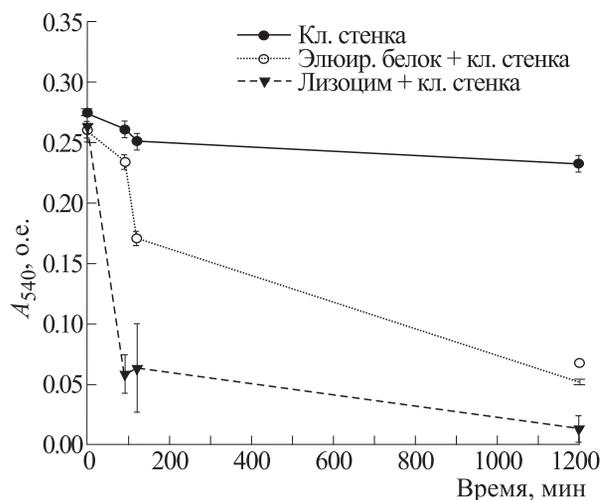
Способность белка, выделенного с помощью гепарин-сефарозы, расщеплять клеточную стенку подтверждали методом турбидиметрии (рис. 5).

Как видно из полученных результатов инкубация клеточной стенки при 37°C с выделенным белком приводит к расщеплению клеточной стенки, о чем свидетельствует снижение мутности образца.

Вероятнее всего, обнаруженный белок относится к эндопептидазам, расщепляющим пептидогликан по пептидным фрагментам.

Таким образом, в гепатопанкреасе как камчатского краба, так и краба стригуна присутствуют пептиды и белки, способные расщеплять клеточную стенку грамположительных бактерий, что может свидетельствовать о наличии у них антибактериальной активности, что было показано нами ранее для пептида из ГПК камчатского краба [13].

Как известно, АМП могут представлять собой нативные биоактивные пептиды или пептиды, полученные из белка-предшественника путем эндогенного протеолиза. Например, в работе [22] описан нативный пептид пенаеидин, который был идентифицирован из гемоцитов морского ракообразного – белоногий креветки *Penaeus vannamei*. У крабов были обнаружены и другие нативные пептиды, богатые гидрофобными аминокислотами и обладающие противомикробной активностью: тахиплезин у мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, гиастатин и аразин 1 у краба-паука



**Рис. 5.** Кинетика расщепления клеточной стенки при pH 7.0 в присутствии белка из ГПК камчатского краба, элюированного с гепарин-сефарозы, и лизоцима куриного белка.

*Hyas araneus*, а также каллинектин у синего краба *Callinectes sapidus* [23–26].

В то же время, у берегового краба *C. taenias* был найден богатый пролином антибактериальный пептид, полученный путем эндогенного протеолиза [27].

Однако, несмотря на то, что спектр обнаруженных АМП крабов растет, большинство из них мало охарактеризовано. Нами в работе в ГПК краба-стригуна были обнаружены пептиды с молекулярной массой около 3–5 кДа, расщепляющие полисахаридные фрагменты пептидогликана и обладающие антибактериальной активностью. Также в ГПК камчатского краба обнаружен белок с молекулярной массой около 14 кДа, расщепляющий клеточную стенку, вероятно, путем гидролиза пептидных фрагментов пептидогликана. Надо заметить, что обнаруженные пептиды, скорее всего, относятся к анионным АМП.

В работе [15] при масс-спектрометрическом анализе биомассы краба-стригуна были обнаружены гидрофобные АМП, имеющие в своем составе медь и гликозидную часть. Эти пептиды имели отрицательный заряд, низкую молекулярную массу около 800 Да и оказывали антибактериальное действие против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Одна из гипотез происхождения такого типа пептидов состояла в том, что они получались из гликозилированных фрагментов гемоцианина, присутствующего в гемолимфе и/или гемоцитах. Гемоцианины известны как дыхательные белки, которые представляют собой металлопротеины, содержащие два атома меди, обратимо связывающие одну молекулу кислорода (O<sub>2</sub>). Было показано, что некоторые

пептидные фрагменты, образующиеся из С-концевой части гемоцианина ракообразных, обладают противомикробным действием.

Сравнение по молекулярной массе, заряду и активности пока не позволило отнести обнаруженные нами пептиды к ранее известным АМП крабов. Поэтому предстоит еще дальнейшая работа по идентификации обнаруженных пептидов и белка из ГПК камчатского краба, что может иметь большое значение для расширения списка известных АМП и решения проблемы с бактериальной устойчивостью к противомикробным препаратам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными промысловыми видами крабов в России являются камчатский краб (*Paralithodes camtschaticus*) и краб-стригун (*Chionoecetes opilio*). Несмотря на то, что оба относятся к отряду *Decapoda*, краб-стригун является истинным крабом, в то время как камчатский краб относится к крабоидам. К настоящему времени сведения о структуре и функциях бактериолитических ферментов этих крабов немногочисленны, любые исследования в этой области представляют научный интерес, так как вносят вклад в понимание, каким образом реализуется у них иммунная защита и какие белки играют в ней важную роль.

Результаты наших исследований показывают, что в ГПК камчатского краба и краба-стригуна присутствуют пептиды (~3–5 кДа), проявляющие антибактериальную активность благодаря расщеплению полисахарида в пептидогликане клеточной стенки бактерий. Кроме того, с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе был выделен белок (~14 кДа), также расщепляющий клеточную стенку. Идентификация обнаруженных АМП, установление механизма расщепления пептидогликана, подбор оптимальных условий для их активности требуют дальнейших исследований.

Следовательно, гепатопанкреас камчатского краба, представляющий собой отходы промысла крабов, может рассматриваться как источник новых АМП, которые могут стать основой для создания «природных» антибиотиков и помогут в решении проблемы антибиотикорезистентности благодаря иному механизму действия на бактерии. АМП краба могут найти множество применений: в качестве биоконсервантов в пищевых продуктах, в кормах для животных, а также в медицинской сфере.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотруднику группы прикладной энзимологии ИБП ФИЦ ПНЦБИ РАН А.М. Лукину и сотруднику группы экспериментальных исследований и инженерии олигомерных структур ИБ РАН Г.А. Енину за помощь в проведении эксперимента.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00278 (задача, касающаяся обнаружения антибактериальной активности в ГПК камчатского краба и краба-стригуна).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bulet P., Stöcklin R., and Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, **198**, 169–184 (2004). DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x
2. Schwab G. E., Reeves P. R., and Turner K. J. Bactericidal Activity of Serum of the Yabbie (*Parachanna bicarinatus*). *Br. J. Exp. Pathol.*, **47** (3), 266–274 (1966). PMC2093715
3. Stewart J. E. and Zwicker B. M. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. *Canad. J. Microbiol.*, **18** (9), 1499–1509 (1972). DOI: 10.1139/m72-229
4. Chisholm J. R. S. and Smith V. J. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Marine Biol. Association of the United Kingdom*, **72** (3), 529–542 (1992). DOI: 10.1017/S0025315400059324
5. Noga E. J., Arroll T. A., Bullis R. A., and Khoo L. Antibacterial activity in hemolymph of white shrimp *Penaeus setiferus*. *J. Mar. Biotechnol.*, **4** (3), 181–184 (1996).
6. Smith V. J. and Dyrzynda E. A. Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. *Mol. Immunol.*, **68** (2 Pt B), 383–398 (2015). DOI: 10.1016/j.molimm.2015.08.009
7. Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M., Lapaev S., and Sogorin E. Prospects of red king crab hepatopancreas processing: fundamental and applied

- biochemistry. *Recycling*, **6** (1), 3 (2021). DOI: 10.3390/recycling6010003T
8. Рысакова К. С., Новиков В. Ю., Шумская Н. В. и Мухортова А. М. Выделение хитиназ из гепатопанкреаса камчатского краба и краба-стригуна опилио. В сб. *Матер. 16-й Всерос. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана (Росхит-23)»* (Изд-во Дальневосточного федерального университета, Владивосток, 2023), сс. 55–59. DOI: 10.24866/7444-5553-8, EDN: YHTJSV
  9. Glyantsev S. P., Adamyan A. A., Vishnevsky A. V., and Sakharov Yu. Crab collagenase in wound debridement. *J. Wound Care*, **6** (1), 13–16 (1997). DOI: 10.12968/jowc.1997.6.1.13, EDN: SGNGPV
  10. Haug T., Kjuul A. K., Stensvåg K., Sandsdalen E., and Styrvold O. B. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunol.*, **12** (5), 371–385 (2002). DOI: 10.1006/fsim.2001.0378
  11. Мое М. К., Haug T., Sydnes M. O., Sperstad S. V., Li C., Vaagsfjord L. C., de la Vega E., and Stensvåg K. Paralithocins, antimicrobial peptides with unusual disulfide connectivity from the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *J. Natural Products*, **81** (1), 140–150 (2018). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00780
  12. Sperstad S. V., Haug T., Paulsen V., Rode T. M., Strandskog G., Solem S. T., Styrvold O. B., and Stensvåg K. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Devel. Compar. Immunol.*, **33** (4), 583–591 (2009). DOI: 10.1016/j.dci.2008.10.010
  13. Molchanov V., Yegorov A., Molchanov M., Timchenko A., Novikov V., Novojilov N., and Timchenko M. Novel Antimicrobial peptide from the hepatopancreas of the red king crab. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (21), 15607 (2023). DOI: 10.3390/ijms242115607
  14. Beaulieu L., Thibodeau J., Bryl P., and Carbonneau M. E. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: a source of high-valued biomolecules. *Biore-source Technol.*, **100** (13), 3332–3342 (2009). DOI: 10.1016/j.biortech.2009.01.073
  15. Beaulieu L., Thibodeau J., Desbiens M., Saint-Louis R., Zatylny-Gaudin C., and Thibault S. Evidence of antibacterial activities in peptide fractions originating from snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **2** (3), 197–209 (2010). DOI: 10.1007/s12602-010-9043-6
  16. El Menif E., Offret C., Labrie S., and Beaulieu L. Identification of peptides implicated in antibacterial activity of snow crab hepatopancreas hydrolysates by a bioassay-guided fractionation approach combined with mass spectrometry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **11** (3), 1023–1033 (2019). DOI: 10.1007/s12602-018-9484-x
  17. Fukutomi T., Kodera Y., Kogo T., Furudate S.-I., Omori A., and Maeda T. A simple method for peptide purification as a basis for peptidome analysis. *J. Electrophoresis*, **49** (1), 15–21 (2005). DOI: 10.2198/jelectroph.49.15
  18. Fukushima T. and Sekiguchi J. Zymographic techniques for the analysis of bacterial cell wall in bacillus. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J., 2016), vol. 1440, pp. 87–98. DOI: 10.1007/978-1-4939-3676-2\_7
  19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680–685 (1970). DOI:10.1038/227680a0
  20. Fales F. W., Russell J. A., and Fain J. N. Some applications and limitations of the enzymic, reducing (Somogyi), and anthrone methods for estimating sugars. *Clin. Chem.*, **7**, 389–403 (1961).
  21. Compton S. J. and Jones C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.*, **151** (2), 369–374 (1985). DOI: 10.1016/0003-2697(85)90190-3
  22. Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorselaer A., Rodriguez J., and Bachère E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, **272** (45), 28398–28406 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.45.28398
  23. Stensvåg K., Haug T., Sperstad S. V., Rekdal O., Indrevoll B., and Styrvold O. B. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Devel. Compar. Immunol.*, **32** (3), 275–285 (2008). DOI: 10.1016/j.dci.2007.06.002
  24. Sperstad S. V., Haug T., Vasskog T., and Stensvåg K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Molecular Immunol.*, **46** (13), 2604–2612 (2009). DOI: 10.1016/j.molimm.2009.05.002
  25. Noga E. J., Stone K. L., Wood A., Gordon W. L., and Robinette D. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab. *Devel. Compar. Immunol.*, **35** (4), 409–415 (2011). DOI: 10.1016/j.dci.2010.11.015
  26. Kushibiki T., Kamiya M., Aizawa T., Kumaki Y., Kikukawa T., Mizuguchi M., Demura M., Kawabata S. I., and Kawano K. Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics*, **1844** (3), 527–534 (2014). DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.12.017
  27. Schnapp D., Kemp G. D., and Smith V. J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, **240** (3), 532–539 (1996). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0532h.x

## Hepatopancreatic Proteins of Snow Crab and Red King Crab with Antibacterial Activity

V.G. Molchanov\*, A.Y. Yegorov\*, D.A. Osetrina\*, V.Yu. Novikov\*\*, N.M. Novojilov\*\*\*, A.A. Timchenko\*\*\*\*, E.A. Sogorin\*\*\*\*\*, and M.A. Timchenko\*

\**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\**Polar Branch of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, ul. Akademika Knipovicha 6, Murmansk, 183038 Russia*

\*\*\**M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

\*\*\*\**Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\*\*\*\**Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 7, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Troughout their long history, crustaceans, despite lacking a highly specific vertebrate-like adaptive immune system, have successfully adapted to living within their environment rich in microorganisms, in part due to the presence of antimicrobial peptides. One valuable source of antimicrobial peptides is hepatopancreas, a waste product from crab fishery and its processing. Data from zymogram and  $^1\text{H}$  NMR spectra showed that the extract of snow crab hepatopancreas contains a small peptide (about 3 kDa) that hydrolyzes the cell wall and the cell wall polysaccharide of *M. lysodeikticus*. The discovered peptide may be of interest for practical application. A protein (about 14 kDa), isolated from the red king crab hepatopancreas using affinity chromatography on heparin-Sepharose, is also active against the cell wall of the gram-positive bacterium *M. lysodeikticus*, as it was demonstrated with zymography and turbidimetric methods.

*Keywords: antimicrobial proteins and peptides, hepatopancreas, king crab, snow crab*