

## ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДА С3f СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

© 2024 И.А. Кренев<sup>1</sup>, Е.В. Егорова<sup>1,2</sup>, М.М. Хайдукова<sup>1,3</sup>, А.Д. Микушина<sup>1,4</sup>,  
Я.А. Забродская<sup>1,5,6</sup>, А.С. Комлев<sup>1</sup>, И.Е. Елисеев<sup>1,4</sup>, О.В. Шамова<sup>1,2</sup>, М.Н. Берлов<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
197022 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: berlov.mn@iemspb.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»,  
192019 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский  
Академический университет имени Ж.И. Алфера, 194021 Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева», 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
195251 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.02.2024

После доработки 01.10.2024

Принята к публикации 08.10.2024

Пептид С3f является побочным продуктом регуляции активированной системы комплемента, не имеющим собственной твердо установленной функции. Ранее мы показали, что в условиях *in vitro* С3f проявляет умеренную антимикробную активность против некоторых грамположительных бактерий. Наличие двух остатков гистидина в аминокислотной последовательности пептида позволило предположить усиление его антимикробной активности при понижении pH и в присутствии катионов металлов, в частности цинка. Поскольку такие условия могут реализовываться в очагах воспаления, исследование зависимости активности С3f от pH и присутствия катионов металлов дает возможность оценить биологическую значимость антимикробных свойств пептида. Пептид С3f и его аналоги с заменами гистидинов лизинами или серинами, С3f[H/K] и С3f[H/S], получили методом твердофазного синтеза. С помощью спектроскопии КД мы установили, что С3f содержит β-шпильку и неструктурные регионы; присутствие Zn<sup>2+</sup> не сказывалось на конформации пептида. В настоящей работе показано, что С3f может проявлять антимикробную активность и в отношении грамотрицательных бактерий, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. Действие пептида на *Ps. aeruginosa* и *Listeria monocytogenes* EGD сопровождается нарушением барьерной функции бактериальных мембран. Ионы Zn<sup>2+</sup>, но не Cu<sup>2+</sup>, повышали антимикробную активность С3f в отношении *L. monocytogenes*, причем 4-кратный и 8-кратный молярный избыток Zn<sup>2+</sup> был не более эффективен, чем 20%-ный. Активность аналогов С3f также в некоторой степени усиливалась ионами цинка. Таким образом, мы предполагаем гистидин-независимое формирование комплексов С3f-Zn<sup>2+</sup>, приводящее к повышению суммарного заряда и антимикробной активности пептида. В присутствии 0,15 M NaCl С3f терял активность независимо от наличия Zn<sup>2+</sup>, что свидетельствует о незначительной роли С3f как эндогенного антимикробного пептида. Присутствие С3f отменило бактерицидный эффект Zn<sup>2+</sup> в отношении цинк-чувствительного штамма *Escherichia coli* ESBL 521/17, что косвенно подтверждает взаимодействие пептида с Zn<sup>2+</sup>. При снижении pH возрастила активность С3f против *Micrococcus luteus* A270, но не против *L. monocytogenes*. В данной работе на примере С3f мы показываем значимость таких факторов, как pH и катионы металлов, в реализации активности антимикробных пептидов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** врожденный иммунитет, комплемент, антимикробные пептиды, С3f, круговой дихроизм, Zn<sup>2+</sup>, зависимость активности от pH.

DOI: 10.31857/S0320972524110186 EDN: IJRSR

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Комплément, центральное гуморальное звено врожденного иммунитета, участвует в опсонизации патогенов, стимуляции клеточного ответа, оказывает прямой бактерицидный эффект. Хотя последний обычно связывают с действием мембраноатакующего комплекса [1–3], возрастает объем сведений о том, что антимикробной активностью могут обладать и другие продукты активации комплемента. Ввиду локального характера их генерации вблизи таргетных клеток их эффекты могут вносить вклад в инактивацию патогенов [4].

Наряду с системой комплемента важными эффекторными молекулярными факторами врожденного иммунитета являются антимикробные пептиды (АМП) [5, 6]. АМП привлекают внимание как перспективные противоинфекционные агенты в условиях неуклонно растущей антибиотикорезистентности. Большинство АМП характеризуется положительным зарядом и пространственным разобщением катионных и гидрофобных аминокислотных остатков. Наиболее распространенный механизм действия АМП состоит во взаимодействии с отрицательно заряженными мембранами патогенов, приводящем к повышению их проницаемости и утечке жизненно важных компонентов из клетки [7, 8]. Представителями основных АМП человека являются  $\alpha$ -дефенсины (HNP; human neutrophil peptides),  $\beta$ -дефенсины, гистатины, кателицидин LL-37, дермцидин, а также пептиды, известные в первую очередь по другим функциональным активностям (например, хемокины и гепсидин). В роли АМП могут также выступать производные некоторых из этих и других пептидов и белков [9]. Среди подходов к классификации АМП целесообразно подчеркнуть разделение на классы  $\alpha$ -спиральных,  $\beta$ -структурных, включающих и  $\alpha$ - и  $\beta$ -структуры, неструктурированных АМП, а также выделение АМП, обогащенных той или иной аминокислотой [10].

В литературе отмечен функциональный параллелизм комплемента и АМП [11]. Система комплемента сама по себе является продуcentом АМП, в качестве которых могут функционировать С3a и С4a [12, 13]. В настоящей работе мы стремимся уточнить это представление. Ключевой этап в развертывании каскада комплемента – конвертация белка С3 с образованием анафилатоксина С3a и белка С3b. После ковалентной фиксации к поверхностным молекулам клеток за счет содержащейся в белке высокореактивной тиоэфирной связи С3b может участвовать в дальнейшей деятельности комплемента. Однако, связавшись с хозяйской клеткой, содержащей CD35, CD46

или привлекающей циркулирующий фактор Н, С3b инактивируется фактором I. Эта протеаза при участии названных кофакторов вносит два разрыва в полипептидную цепь белка, образуя iC3b и высвобождая пептид С3f (SSKITHRIHWESASLLR; ~2 кДа) [14, 15]. В аминокислотной последовательности С3f обращает на себя внимание наличие двух остатков гистидина (11,8% от общего числа аминокислотных остатков), что потенциально может быть важным для реализации его функциональной активности. Хотя некоторые эффекты, оказываемые пептидом С3f, были описаны [16–19], его собственная физиологическая роль остается неясной. Аминокислотный состав и физико-химические свойства С3f в целом соответствуют характеристикам типичных АМП. Ранее методом радиальной диффузии мы впервые показали умеренную антимикробную активность С3f в отношении некоторых грамположительных бактерий. Самым чувствительным объектом оказалась *Listeria monocytogenes* (минимальная ингибирующая концентрация – 70 мкМ) [20]. Активность пептида исследовалась в среде с низкой ионной силой и нейтральным pH, что не соответствует условиям *in vivo*, в частности, в очаге воспаления. Среди факторов, которые могут влиять на активность АМП в очагах воспаления, можно отметить слабокислые значения pH [21, 22]. Также важную роль может играть и наличие в среде катионов металлов, в частности цинка. Изменение концентрации ионов цинка может быть разнонаправленным. Хотя воспаление инфекционной природы сопровождается снижением уровня ионов цинка в циркуляции на 30–40% [23, 24], некоторые данные свидетельствуют о том, что возможно, напротив, повышение концентрации цинка в сайтах локализации патогенных бактерий [25].

С учетом значимости электростатических взаимодействий в реализации антимикробных свойств АМП ионная сила способна существенно влиять на их активность [26]. Кроме того, значение pH среды модулирует активность АМП за счет протонирования/депротонирования  $\alpha$ -аминогруппы,  $\alpha$ -карбоксильной группы, боковых групп аминокислотных остатков [27]. Важная роль принадлежит остаткам гистидина, значение  $pK_a$  боковой группы которого сопоставимо с pH внутренней среды организма [28]. Повышение антимикробной активности при снижении pH было описано для таких гистидин-содержащих АМП, как гистатины слюны человека [29, 30], гепсидин человека и его укороченная изоформа [31], фрагменты тромбина [32], пептиды Gad-1 и Gad-2 из атлантической трески *Gadus morhua* [33], ченсинин-1 из дальневосточной лягушки *Rana chensinensis* [34] и др.

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; ННР –  $\alpha$ -дефенсины человека.

Взаимодействие с ионами металлов также способно модулировать активность АМП [35]. Особенно часто встречаются примеры усиления активности АМП в присутствии ионов цинка. Взаимоотношения между АМП и  $Zn^{2+}$  могут реализовываться посредством образования комплекса либо взаимодействия без образования координационных связей [36]. В ряде случаев ключевую роль в координации ионов  $Zn^{2+}$  играют остатки гистидина [37, 38]. Повышение антимикробной активности в присутствии ионов цинка было показано для гистатина-5 [39], фрагментов кининогена [39] и семеногелинов [40] человека, клаванина А из асцидии *Styela clava* [41] и других гистидин-содержащих пептидов. Наличие двух остатков гистидина в структуре C3f позволяет предположить влияние pH и  $Zn^{2+}$  на его антимикробную активность.

Поскольку пространственная структура пептида C3f и его физиологическая роль остаются не исследованными, целью настоящей работы было охарактеризовать структурные свойства и антимикробную активность C3f в различных условиях. В ходе работы антимикробную активность пептида исследовали в условиях, которые могут соответствовать условиям очага воспаления (значения pH в слабокислой области, присутствие катионов двухвалентных металлов), где происходит активация комплемента и образуется C3f. Чтобы оценить роль остатков гистидина в антимикробной активности C3f, наряду с этим пептидом были исследованы также его аналоги с заменами гистидинов лизинами или серинами. Поскольку при различных значениях pH боковая группа гистидина может быть положительно заряженной или незаряженной, в качестве замещающих аминокислот были использованы лизин (катионная боковая группа) и серин (незаряженная гидрофильная боковая группа). Включение в работу аналогов пептида с замененными остатками гистидинов позволяло оценить их функциональную роль, в частности, в предполагаемом взаимодействии C3f с ионами цинка и зависимости его антимикробной активности от pH.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Пептиды.** Пептид C3f и его аналоги с замененными остатками гистидина, C3f[H/K] и C3f[H/S], получали методом твердофазного синтеза по ортогональной Fmoc/tBu (флуоренилметилоксикарбонил/трем-бутил) стратегии по стандартному протоколу [42]. Для синтеза использовали смолу Ванга с предварительно связанной C-концевой аминокислотой («Iris Biotec», Германия) и Fmoc-производные аминокислот («Iris Biotec»).

Удаление примесей и аналитический контроль чистоты пептидов проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) в градиенте ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Препаративную ОФ ВЭЖХ проводили на колонке Waters Symmetry C-18, 300 × 19 мм, 7 мкм («Waters Corp», США), аналитическую – на колонке Luna C-18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм («Phenomenex Inc.», США). Соответствие расчетной и фактической молекулярной массы пептидов подтверждали с помощью масс-спектрометрии с времяпролетным детектором на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI TOF; matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) на приборе Ultraflex («Bruker», Германия).

Тотальную фракцию HNP получали из лейкоцитов человека, как описано ранее [20].

**Спектроскопия кругового дихроизма (КД).** Для определения вторичной структуры пептида C3f при отсутствии и в присутствии  $ZnCl_2$  изменили спектры КД на приборе Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Концентрация C3f в пробах была 0,19 мг/мл (94 мкМ); концентрация  $ZnCl_2$  – 113 мкМ (соответствует 20%-ному молярному избытку ионов цинка по отношению к пептиду); в качестве растворителя использовали деионизованную воду. В ходе оптимизации условий измерения выбрали следующие параметры: кювета с длиной оптического пути 0,5 мм; диапазон измерений – 180–260 нм с шагом 1,0 нм; усреднение по 5 спектрам для каждого образца; время накопления – 1,0 с на точку; ширина спектральной щели – 1,0 нм. После регистрации спектры усредняли, фон вычитали, спектры конвертировали в единицы молярного коэффициента экстинкции  $\Delta\epsilon$  ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Для деконволюции спектров применяли алгоритм BeStSel, имплементированный на одноименном сервере (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) [43].

**Определение антимикробной активности.** Антимикробную активность пептидов и катионов металлов исследовали в отношении следующих микроорганизмов: грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes* EGD, *Micrococcus luteus* A270, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583, *Escherichia coli* ESBL 521/17 (клинический изолят из мочи). В работе использовали штаммы *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* из коллекции отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; культуры остальных микроорганизмов были любезно предоставлены проф. Р. Лерером, Калифорнийский университет, Лос-Анджелес, США (*L. monocytogenes*), д.б.н. С.И. Чернышом, Санкт-

Петербургский государственный университет (*M. luteus*), д.б.н. А.Г. Афиногеновой, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург (*E. coli*).

Для определения antimикробной активности использовали метод подсчета колоний [44]. Инокулят объемом 20 мкл содержал суспензию бактерий в логарифмической (*L. monocytogenes*, *M. luteus*, *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*) или стационарной (*E. coli*) фазе роста (конечная концентрация –  $\sim 1 \times 10^4$  колониеобразующих единиц на 1 мл) и исследуемые вещества в рабочем буфере. При изучении зависимости antimикробной активности от pH в качестве рабочего буфера использовали 10 мМ натрий-фосфатный буфер с различными значениями pH в диапазоне 4,5–8,0; в остальных экспериментах – 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Если не указано иное, концентрация ионов металлов в пробах превосходила концентрацию пептидов в 1,2 раза. Инкубацию проводили в круглодонном 96-луночном планшете («Sarstedt», Германия) при +37 °C в течение часа с перемешиванием на шейкере. По окончании инкубации по 10 мкл содержимого лунок смешивали с 2 мл расплавленной среды Trypticase soy agar («Himedia», Индия), термостатированной при +45 °C, в чашках Петри диаметром 40 мм. Чашки инкубировали в течение ночи (+37 °C), затем подсчитывали число выросших колоний. Выживаемость бактерий выражали в % от числа колоний, соответствующих контрольным пробам без добавления пептидов и ионов металлов.

Нарушение структурной целостности бактериальной оболочки в присутствии пептидов оценивали с помощью окрашивания клеток йодидом пропидия, образующего флуоресцирующий комплекс с нуклеиновыми кислотами, но не способного проникать через интактные мембранны [45, 46]. В лунки плоскодонного планшета («Jet Bio-Filtration», Китай) вносили суспензию бактериальных клеток (*L. monocytogenes* или *Ps. aeruginosa* в логарифмической фазе роста; конечная концентрация –  $\sim 2,5 \times 10^7$  колониеобразующих единиц на 1 мл) и раствор пептида в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4); общий объем – 100 мкл. Планшет инкубировали при +37 °C в течение часа с перемешиванием на шейкере, затем добавляли 2 мкл 750 мКМ раствора йодида пропидия и инкубировали при комнатной температуре еще 15 мин. Флуоресценцию измеряли на приборе SpectraMax Gemini EM («Molecular Devices», США), длина волны возбуждения – 535 нм, эмиссии – 615 нм. Из полученных значений интенсивности флуоресценции вычитали значение фоновой флуоресценции йодида пропидия в буфере и выражали их в процентах по отношению к пробе с положительным контролем. Для получения

этой пробы к бактериальным клеткам добавляли изопропанол до конечной концентрации 50% и инкубировали в течение часа. Перед внесением в планшет и добавлением йодида пропидия контрольную пробу центрифугировали и ресуспендировали осадок в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4).

**Обработка данных и программное обеспечение.** При определении antimикробной активности в каждой серии экспериментов проводили не менее трех независимых опытов. Данные обрабатывали с помощью языка R v4.3.0 в интегрированной среде разработки RStudio v2023.03.0. Для визуализации данных использовали пакеты ggplot2 v3.4.2 и ggrepel v0.6.0. На рисунках результаты представлены в виде экспериментальных точек и среднего арифметического.

Теоретическую мономолекулярную массу пептидов рассчитывали при помощи сервера Peptide Mass Calculator (<https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>). Для расчета заряда пептидов при различных значениях pH использовали пакет Peptides v2.4.5 [47]. Трехмерную структуру белка С3 [48] визуализировали с помощью программы Visual Molecular Dynamics v1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) [49]. Предсказание наличия и положения β-поворота в молекуле пептида осуществляли при помощи сервера NetTurnP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetTurnP-1.0/>) [50].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Синтез пептидов.** Перечень синтезированных пептидов, их первичные структуры и характеристики приведены в табл. 1. Результаты аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа приведены на рис. П1 и П2 в Приложении.

**Структурная характеристика С3f.** Результаты спектроскопии КД показали, что спектры образцов С3f при отсутствии и в присутствии ZnCl<sub>2</sub> имеют одинаковую форму (рис. 1).

Оценка компонентов вторичной структуры С3f по спектральным данным алгоритмом BeStSel показала, что пептид содержит антипараллельный β-складчатый слой, но значительная часть молекулы представлена неупорядоченной структурой. При сравнении спектров пептида при отсутствии и в присутствии ионов цинка изменения содержания структурных элементов не наблюдается (табл. 2). С учетом длины пептида (17 а.о.) можно утверждать, что молекула С3f содержит антипараллельную β-шпильку, включающую по 3 а.о. в каждом из тяжей, соединенных β-поворотом из 4 а.о.; остальные 7 а.о. участвуют в формировании неупорядоченных структур.

**Таблица 1.** Синтезированные пептиды и их характеристики

Пептид	Первичная структура	Молярная масса, г/моль	Молярная масса, MALDI, г/моль	Чистота, %
C3f	SSKITHRIHWESASLLR	2020,09	2021,06	97,34
C3f[H/K]	SSKITKRIKWESASLLR	2002,16	2003,22	97,18
C3f[H/S]	SSKITSRISWESASLLR	1920,03	1920,99	98,95

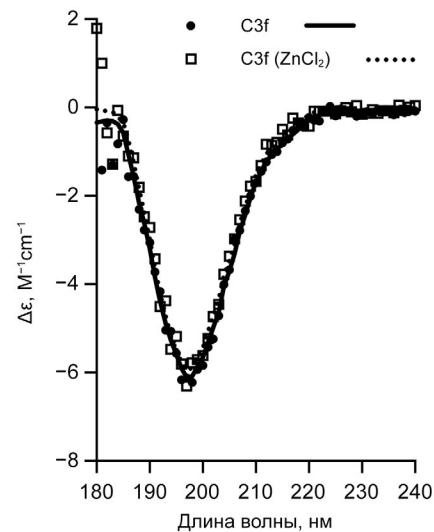
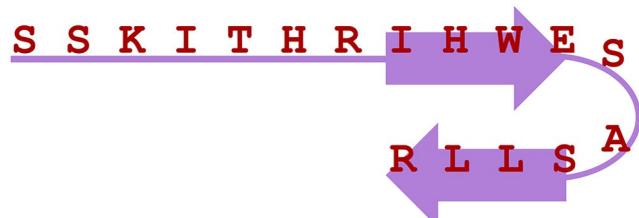
Примечание. Молярная масса – теоретическая моноизотопная молярная масса пептида; молярная масса, MALDI – моноизотопная молярная масса однозарядного иона  $(M + H)^+$ , экспериментально определенная масс-спектрометрией. Чистоту препаратов пептидов определяли с помощью ОФ ВЭЖХ.

**Таблица 2.** Количественная оценка содержания элементов вторичной структуры C3f (в %) при отсутствии и в присутствии  $ZnCl_2$  с помощью алгоритма BeStSel

Тип вторичной структуры	C3f без $ZnCl_2$	C3f в присутствии $ZnCl_2$
α-Спираль	0	0
Антипараллельный $\beta$ -лист	33,8	35,5
Параллельный $\beta$ -лист	0	0
$\beta$ -Изгиб	22,1	22,1
Неупорядоченные структуры	44,1	42,5

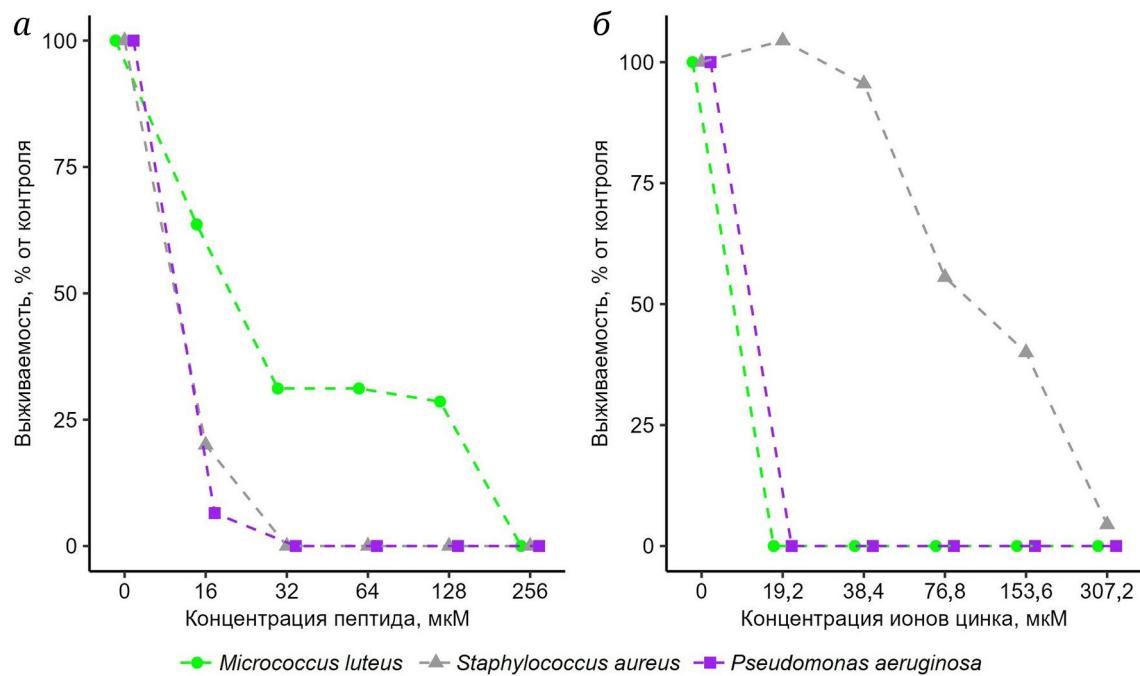
По результатам предсказания  $\beta$ -изгиба сервером NetTurnP можно предположить, что антипараллельная  $\beta$ -шпилька локализуется в C-концевом участке пептида, а  $\beta$ -поворот с наибольшей вероятностью приходится на область WESAS (табл. П1 в Приложении). N-Концевой участок пептида образует неупорядоченные структуры. Предположительное расположение элементов вторичной структуры в полипептидной цепи C3f представлено на рис. 2.

**Антибиотическая активность пептидов в различных условиях.** В предшествующей работе наиболее чувствительными к антибиотическому действию C3f бактериями оказались *L. monocytogenes* и *M. luteus* [20]. В настоящем исследовании мы расширили спектр исследованных микробов и обнаружили активность C3f против *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*, как минимум не уступающую активности против *L. monocytogenes* (рис. 3, а; рис. 4, б). Тем не менее из четырех перечисленных видов бактерий только *L. monocytogenes* оказалась устойчивой к действию ионов  $Zn^{2+}$ , а также ионов  $Cu^{2+}$  (рис. 3, б; рис. 4, а). Поэтому именно *L. monocytogenes* была выбрана в качестве основного объекта для исследования антибиотической активности пеп-

**Рис. 1.** Спектры КД пептида C3f при отсутствии и в присутствии  $ZnCl_2$ **Рис. 2.** Предполагаемая вторичная структура C3f

тида в различных условиях, включая присутствие ионов металлов.

При отсутствии ионов цинка пептид C3f проявлял антибиотическую активность в отношении *L. monocytogenes*, зависящую от концентрации, причем в присутствии 16 мкМ пептида выживаемость бактерии составляла около половины от контрольного уровня, а в присутствии 32 мкМ она была близка к нулю. Активность C3f в присутствии 20%-ного молярного избытка  $Zn^{2+}$  заметно усиливалась: 2-кратное снижение выживаемости достигалось уже в присутствии 4 мкМ пептида, а при 16 мкМ наблюдалась почти полная утрата



**Рис. 3.** Антимикробная активность пептида С3f и ионов цинка в отношении *M. luteus*, *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*. *а* – Выживаемость бактерий в присутствии С3f; *б* – выживаемость бактерий в присутствии  $Zn^{2+}$

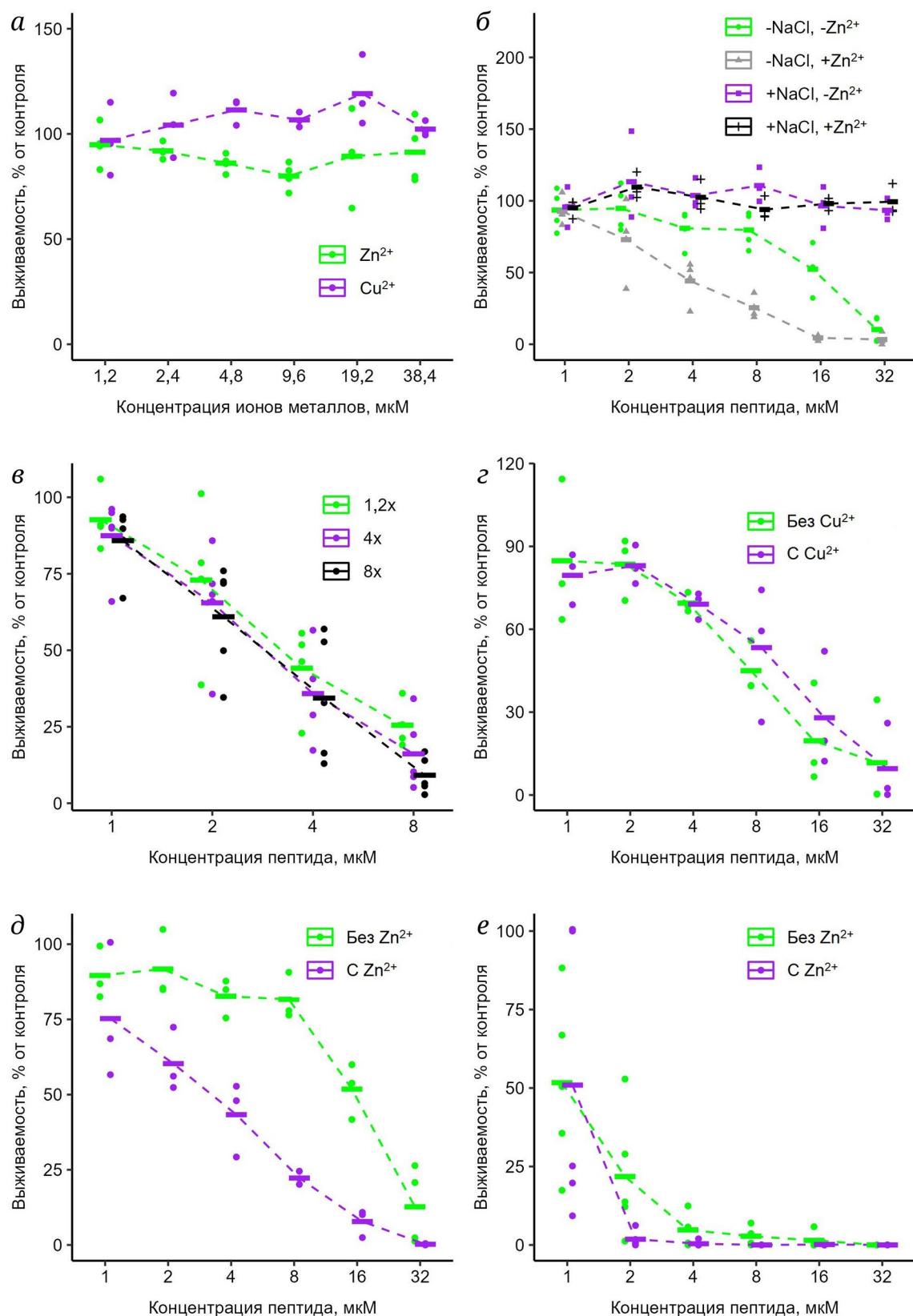
жизнеспособности бактерии. Добавление в буфер 0,15 М NaCl полностью ингибирировало антимикробную активность С3f независимо от присутствия  $Zn^{2+}$  (рис. 4, *б*). Увеличение концентрации  $Zn^{2+}$  до 4-кратного и 8-кратного молярного избытка по отношению к пептиду не приводило к усилению антимикробной активности С3f в большей степени, чем в присутствии 20%-ного избытка ионов цинка (рис. 4, *в*). В отличие от  $Zn^{2+}$ , ионы  $Cu^{2+}$  влияния на антимикробное действие С3f не оказывали (рис. 4, *г*).

Пептид С3f[H/S] обладал сопоставимой с исходным пептидом активностью в отношении *L. monocytogenes*. Несмотря на отсутствие остатков гистидина в структуре пептида, ионы  $Zn^{2+}$  заметно усиливали его активность (рис. 4, *д*). Пептид С3f[H/K] проявлял более выраженное антимикробное действие: почти полное ингибирование роста бактерий достигалось уже при 8 мкМ пептида. Ионы  $Zn^{2+}$  также в некоторой степени усиливали его действие (рис. 4, *е*).

Бактерия *E. coli* ESBL 521/17, так же как *M. luteus*, *St. aureus* и *Ps. aeruginosa*, проявляет чувствительность к ионам цинка, но при этом она устойчива к действию самого С3f.  $ZnCl_2$  в концентрациях 20–80 мкМ приводил к выраженному снижению выживаемости бактерии, однако присутствие С3f противостояло этому эффекту (рис. 5).

Зависимость антимикробной активности пептидов в отношении *L. monocytogenes* от pH исследовали в диапазоне значений pH 4,5–8,0. По результатам предварительных экспериментов

в этих условиях бактерия обладает одинаковой выживаемостью (данные не показаны). Характер зависимости антимикробной активности С3f в отношении *L. monocytogenes* от значения pH буферного раствора оказался противоположным ожидаемому. В концентрации 16 мкМ пептид не проявлял усиления антимикробной активности при снижении pH от 8,0 до 6,0. В более высоких концентрациях (32 и 64 мкМ) пептид приводил к почти полному ингибированию роста бактерии в диапазоне pH 5,5–8,0, однако при pH 5,0 бактерия оказалась резистентной к действию С3f; некоторое снижение устойчивости наблюдали при pH 4,5 (рис. 6, *а*). Предположив, что такой результат принципиально может быть обусловлен особенностями либо антимикробного действия пептида, либо *L. monocytogenes* как модельного объекта, провели две серии опытов. В первой серии (рис. 6, *б*) протестировали действие АМП, отличающихся от С3f по структуре, а именно HNP. Во второй – протестировали действие С3f против другого объекта – *M. luteus* (рис. 6, *в*). Оказалось, что *L. monocytogenes* похожим образом обладает устойчивостью к действию HNP при pH 6,0 с дальнейшим снижением устойчивости при pH 5,0. *M. luteus* оказался более чувствительным к кислотности среди сам по себе, из-за чего не проводили эксперименты с ним при pH ниже 6,0. Против *M. luteus* С3f действовал ожидаемым образом, то есть его активность была заметно выше при более низких значениях pH, чем при более высоких. Такую закономерность четко наблюдали



**Рис. 4.** Антимикробная активность C3f и его аналогов в отношении *L. monocytogenes* при отсутствии и в присутствии ионов металлов. *a* – Выживаемость бактерий в присутствии  $Zn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ ; *б* – действие C3f в зависимости от присутствия  $Zn^{2+}$  и 0,15 M  $NaCl$ ; *в* – действие C3f при различном молярном избытке  $Zn^{2+}$ ; *г* – действие C3f в зависимости от присутствия  $Cu^{2+}$ ; *д* и *е* – действие C3f[H/S] и C3f[H/K] при отсутствии и в присутствии  $Zn^{2+}$

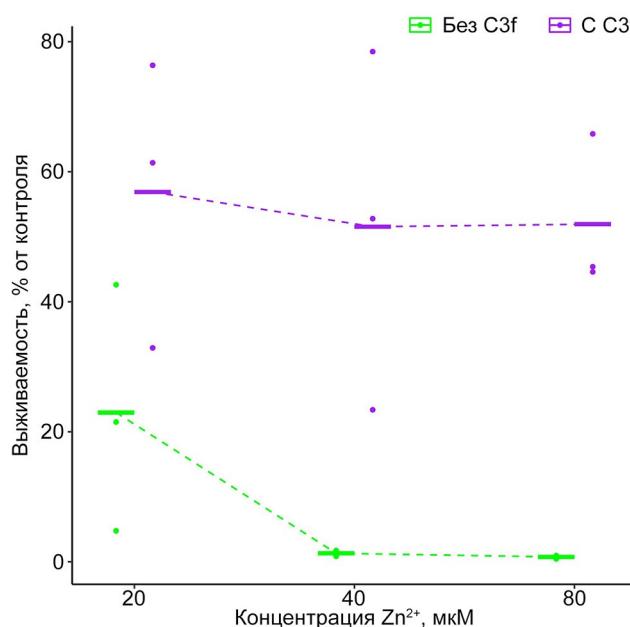


Рис. 5. Антимикробное действие  $ZnCl_2$  в отношении *E. coli* ESBL 521/17 при отсутствии и в присутствии 20%-ного молярного избытка C3f

для концентраций 16–64 мкМ, а для 128 мкМ пептида выявили почти полное ингибиование роста при всех трех значениях pH, хотя и в этой концентрации активность была несколько снижена при pH 8,0.

Пептид C3f[H/K] также был более активен в отношении *M. luteus* при более низких значениях pH (рис. 6, г). Вместе с тем зависимость его активности от pH оказалась менее выраженной по сравнению с исходным пептидом. В частности, C3f в концентрации 32 мкМ приводил к почти полному ингибиованию роста бактерий при pH 6,0 и к выживаемости ~70% бактерий при pH 8,0, в то время как для 16 мкМ более активного C3f[H/K] при тех же значениях pH наблюдали 10%-ную и 50%-ную выживаемость бактерий (рис. 6, в и г).

При действии C3f на *L. monocytogenes* и *Ps. aeruginosa* происходит дезинтеграция бактериальных мембран, поскольку в экспериментах с использованием йодида пропиония наблюдалось зависящее от концентрации повышение интенсивности флуоресценции в пробах, содержащих

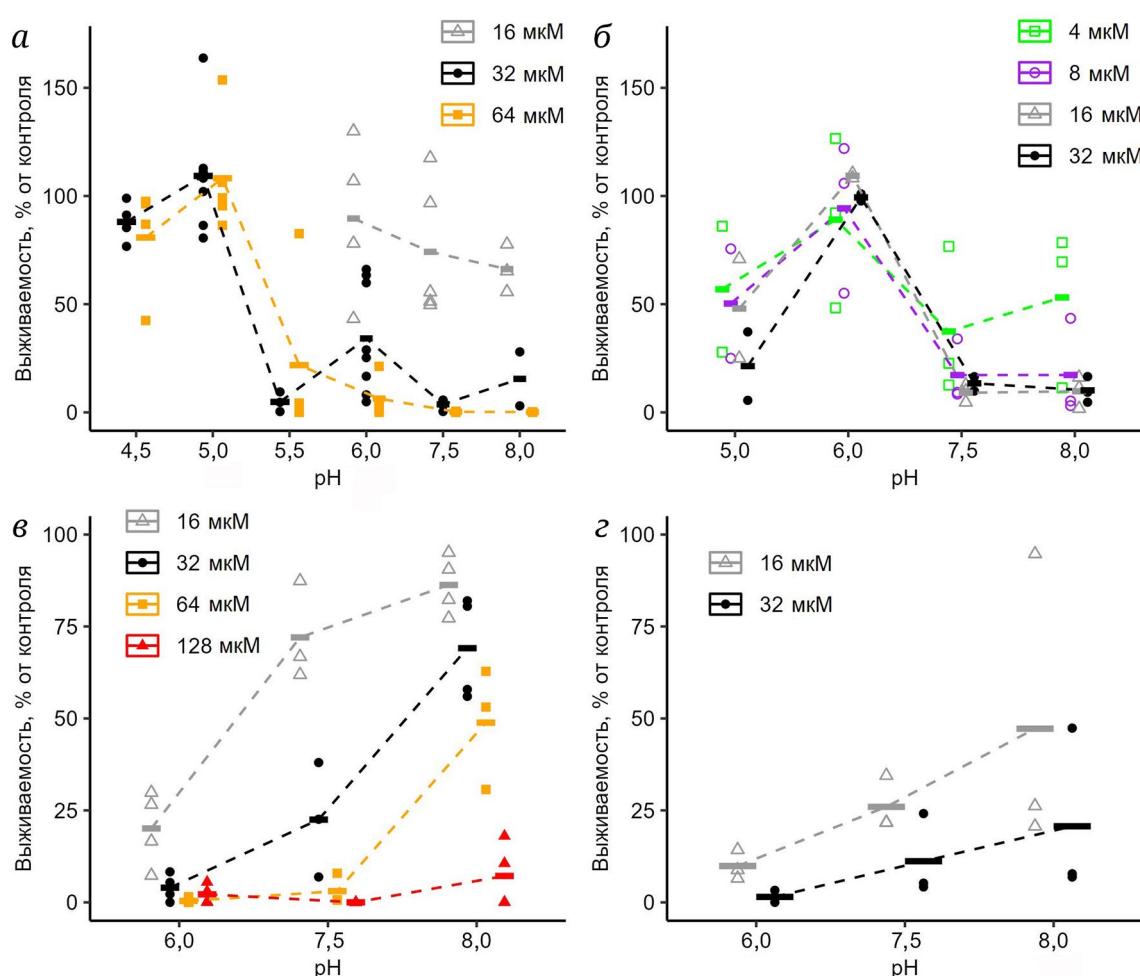
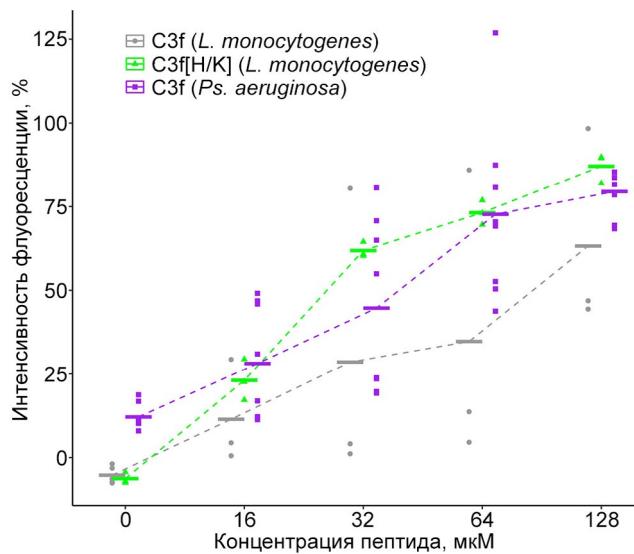


Рис. 6. Антимикробная активность пептидов при различных значениях pH. а – Действие C3f в отношении *L. monocytogenes*; б – действие HNP в отношении *L. monocytogenes*; в и г – действие C3f и C3f[H/K] в отношении *M. luteus*



**Рис. 7.** Действие пептидов на проницаемость мембран бактериальных клеток, выявляемое по флуоресценции комплекса йодида пропиdia с нуклеиновыми кислотами

16–128 мкМ пептида (рис. 7). Пептид C3f[H/K] при водил к более выраженному увеличению флуоресценции в пробах с *L. monocytogenes* по сравнению с C3f. При отсутствии бактериальных клеток пептиды, взятые в максимальных концентрациях, не приводили к увеличению сигнала (данные не показаны).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пептид C3f не обладает однозначно установленными физиологическими функциями, и, вероятно, по этой причине не привлекает большого внимания исследователей. Несколько нам известно, в настоящей работе пространственная структура C3f была экспериментально исследована впервые. В предшествующей работе, основываясь на предсказании *in silico*, мы предположили  $\alpha$ -спиральную конформацию C3f [20], однако анализ структуры пептида методом спектроскопии КД не выявил участков  $\alpha$ -спирали в молекуле. Результаты показывают, что пептид содержит участок с неупорядоченной структурой и антипараллельную  $\beta$ -шпильку (табл. 2), локализованные, по всей видимости, в *N*- и *C*-концевых частях молекулы соответственно (рис. 2). Нельзя исключать, что расхождения между данными моделирования и спектроскопии КД объясняются зависимостью структуры пептида от условий (растворитель, липидное окружение, концентрация, олигомеризация). Известно, что многие АМП, имеющие неупорядоченную структуру в водных растворах, приобретают конформа-

цию  $\alpha$ -спирали при контакте с липидными мембранами [51].

Склонность аминокислотной последовательности C3f к формированию  $\beta$ -складчатой структуры косвенно подтверждается конформацией участка полипептидной цепи белка C3, соответствующего пептиду. Этот участок занимает позиции 1282–1298 в пределах преимущественно  $\beta$ -структурного домена CUB<sup>f</sup>  $\alpha$ -цепи молекулы C3. Остатки SSK переходят в тяж ITHRIH поверхностного антипараллельного  $\beta$ -слоя, за которыми следует линкерная последовательность WESASL, а остатки LR, соответствующие *C*-концу C3f, входят в состав тяжа, принадлежащего другому, более глубокому, антипараллельному  $\beta$ -слою. Таким образом, в составе C3  $\beta$ -складчатая структура не формируется за счет водородных связей между остатками, составляющими сам фрагмент C3f (рис. П3 в Приложении).

Наше предположение о способности пептида C3f связывать ионы цинка не получило экспериментального подтверждения методом спектроскопии КД: присутствие Zn<sup>2+</sup> не оказывало заметного влияния на конформацию пептида (рис. 1). Тем не менее такой результат не опровергает возможность взаимодействия C3f с Zn<sup>2+</sup>. Пептид может изначально находиться в благоприятной для связывания Zn<sup>2+</sup> конформации, либо индуцируемые конформационные изменения могут затрагивать только *N*-концевой участок, не содержащий элементов упорядоченной вторичной структуры, и не отражаться в спектре КД.

В данной работе мы подтвердили бактерицидное действие C3f в отношении *L. monocytogenes* и *M. luteus* с хорошим соответствием данным, полученным ранее другим методом [20]. Кроме того, мы впервые показали антимикробную активность C3f против *St. aureus* и *Ps. aeruginosa* (рис. 3, а). Стоит отметить, что ранее была описана активность C3f только в отношении грамположительных бактерий, но в настоящей работе именно грамотрицательная *Ps. aeruginosa* проявила наибольшую чувствительность.

Мы уточнили характер антимикробного действия C3f в отношении *L. monocytogenes*, прилизив условия к реализующимся в очаге воспаления. Добавление 0,15 М NaCl полностью ингибировало бактерицидный эффект пептида (рис. 4, б), что указывает на важность электростатических взаимодействий с компонентами бактериальной оболочки в реализации действия C3f. Ингибирование антимикробной активности физиологическими значениями ионной силы характерно для многих умеренно катионных АМП, например, некоторых  $\alpha$ -дефенсивов [52]. Значимость электростатических взаимодействий также согласуется с уровнем антимикробной активности исходного

пептида С3f в сравнении с его аналогами. Антимикробная активность более катионного С3f[Н/К] была значительно более выраженной, чем исходного С3f и С3f[Н/С] (рис. 4, б, д и е).

В присутствии 20%-ного молярного избытка  $Zn^{2+}$  активность С3f возрастила. В то же время добавление ионов  $Cu^{2+}$ , уровень которых повышается при воспалении, не влияло на активность пептида, что показывает специфичность эффекта по отношению к природе двухвалентного катиона металла (рис. 4, б и г). Важно отметить, что повышенная активность С3f наблюдалась при концентрациях ионов цинка, не превышающих его уровень в плазме крови человека, который составляет  $\sim 20$  мкМ [24]. В соответствии с предложенным ранее механизмом для связывающих цинк АМП [39] можно предположить, что возрастание антимикробной активности С3f в присутствии  $Zn^{2+}$  вызвано образованием комплекса пептида с ионами, что повышает суммарный заряд пептида и аффинность к бактериальной мембране. Поскольку увеличение концентрации ионов цинка не приводило к дальнейшему возрастанию активности С3f (рис. 4, в), комплекс пептида с  $Zn^{2+}$ , вероятно, формируется в стехиометрическом соотношении 1/1 подобно тому, как это было показано для гистатинов и клаванинов [37, 38]. Также эти данные свидетельствуют об относительно высокой аффинности предполагаемого взаимодействия С3f и  $Zn^{2+}$ . Для оценки роли остатков гистидина во взаимодействии пептида с ионами цинка исследовали также антимикробную активность синтетических аналогов С3f. Ионы цинка усиливали антимикробную активность не только исходного пептида, но и его аналогов с замещенными остатками гистидина (рис. 4, д и е). Это позволяет предположить основной вклад в связывание  $Zn^{2+}$  не столько гистидинов, сколько других остатков С3f, в первую очередь глутаминовой кислоты, боковая группа которой участвует в координации ионов цинка у многих белков [53], или  $\alpha$ -карбоксильной группы С-концевого аргинина. Усиливающее действие  $Zn^{2+}$  на активность С3f[Н/К] оказалось менее выраженным, чем на активность исходного пептида и С3f[Н/С], однако это может быть связано с более высокой собственной активностью С3f[Н/К].

Несмотря на показанную нами ранее устойчивость *E. coli* к антимикробному действию С3f [20], токсичность ионов цинка для некоторых штаммов *E. coli* [54, 55] дала возможность исследования совместного действия С3f и  $Zn^{2+}$  в отношении и этого вида бактерий. Действительно, *E. coli* ESBL 521/17 была чувствительна к  $Zn^{2+}$ , но присутствие С3f повышало выживаемость бактерии (рис. 5), что может объясняться нейтрализацией антимикробных свойств  $Zn^{2+}$  вследствие его связывания пептидом.

Протонирование АМП при снижении рН среды способно усилить их действие (теоретические значения зарядов С3f, С3f[Н/К], С3f[Н/С] и НПР1 при разных значениях рН приведены в табл. П2 в Приложении). Исследуя активность С3f в отношении *L. monocytogenes*, против ожиданий мы выявили выраженное возрастание устойчивости бактерии при снижении рН с 8,0 до 5,0 с некоторой потерей устойчивости при рН 4,5 (рис. 6, а). Для НПР, структурно отличающихся от С3f АМП, паттерн зависимости их антимикробной активности от рН в отношении *L. monocytogenes* выглядел сходным образом (рис. 6, б). Ранее были опубликованы аналогичные результаты о действии АМП Css54 из яда скорпиона *Centruroides suffuses*, активность которого против *L. monocytogenes* слабо падает при снижении рН с 10 до 6 и затем несколько возрастает при рН 4 [56]. Эти данные указывают на уникальность *L. monocytogenes* как модельного объекта для такого рода исследований. Действительно, на протяжении жизненного цикла эта бактерия существует в широком диапазоне рН и после кислотной адаптации проявляет устойчивость к действию лантибиотика низина [57–60]. На другом объекте, *M. luteus*, мы наблюдали закономерное возрастание антимикробной активности С3f при снижении рН (рис. 6, в). Сходную, но менее выраженную зависимость от рН продемонстрировал и пептид С3f[Н/К] (рис. 6, г). Разница между двумя пептидами может объясняться более сильным возрастанием заряда С3f по сравнению с С3f[Н/К] при снижении рН с 8,0 до 6,0 (табл. П2 в Приложении), что обусловлено наличием двух остатков гистидина в молекуле С3f.

Мы изучили механизм антимикробного действия С3f и С3f[Н/К] против грамположительной бактерии *L. monocytogenes*, а также С3f против грамотрицательной *Ps. aeruginosa*. Увеличение сигнала флуоресценции в экспериментах с йодидом пропидия (рис. 7) свидетельствует о нарушении структурной целостности бактериальных мембран и находится в соответствии с данными об ингибирующей роли  $NaCl$  (рис. 4, б). Поскольку для проникновения красителя в цитоплазму грамотрицательной бактерии ему необходимо последовательно преодолеть и наружную, и внутреннюю мембранны, можно заключить, что С3f нарушает барьерные свойства обеих мембран *Ps. aeruginosa*. В опытах по оценке структурной целостности бактериальных мембран использовали более высокие концентрации пептидов, чем в опытах по определению антимикробной активности методом подсчета колоний, что отражает различную концентрацию бактериальных клеток. При этом в экспериментах обоих типов более катионный пептид С3f[Н/К] оказался более эффективным по сравнению с С3f (рис. 4, б и е; рис. 7).

Таким образом, электростатические взаимодействия пептида с мембраной и последующий ее лизис лежат в основе механизма антимикробного действия C3f.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые охарактеризована пространственная структура пептида C3f, производного белка C3 системы комплемента. Наряду с неупорядоченной структурой молекула пептида включает антипараллельную  $\beta$ -шпильку, локализованную, по-видимому, в C-концевой области.

Ранее мы показали наличие у C3f антимикробных свойств [20]. В настоящей работе установлен мембранолитический механизм антимикробного действия C3f. В то же время можно сделать вывод о слабой физиологической значимости C3f как эндогенного АМП. Несмотря на то что ряд факторов, которые могут действовать в условиях воспаления (пониженные значения pH, присутствие ионов цинка), повышают активность пептида, физиологические значения ионной силы ее ингибируют. Если а-дефенсины, которые также инактивируются солью, вероятно, выполняют антимикробную функцию в фагосомной вакуоли нейтрофилов [26], то C3f вряд ли достигает достаточно высоких локальных концентраций в организме, чтобы преодолевать ингибирующее действие ионной силы.

Некоторые полученные данные (повышение антимикробной активности C3f в отношении *L. monocytogenes* в присутствии  $Zn^{2+}$ , ингибирование пептидом активности  $Zn^{2+}$  в отношении *E. coli*) косвенно свидетельствуют о взаимодействии C3f с ионами цинка. С другой стороны, присутствие  $Zn^{2+}$  не приводило к изменению спектра КД пептида, а усиление антимикробной активности имело

место не только для C3f, но и для его аналогов, лишенных гистидина. На основании полученных результатов мы предполагаем гистидин-независимое формирование комплексов C3f- $Zn^{2+}$  в стехиометрическом соотношении 1/1, приводящее к повышению суммарного заряда и активности пептида. Необходимо проведение дальнейших исследований, например, методом ЯМР-спектроскопии, чтобы сделать однозначный вывод о возможности связывания ионов цинка пептидом C3f.

**Вклад авторов.** И.А. Кренев – дизайн исследования, исследование антимикробной активности, написание статьи; Е.В. Егорова – исследование антимикробной активности, написание статьи; М.М. Хайдукова – синтез и очистка пептидов; А.Д. Микушина – проведение КД-спектроскопии; Я.А. Забродская – проведение масс-спектрометрии; А.С. Комлев – методология; И.Е. Елисеев – методология, обсуждение результатов; О.В. Шамова – координация работы, обсуждение результатов; М.Н. Берлов – дизайн исследования, координация работы, обсуждение результатов, написание статьи. Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 122020300189-6).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement system Part I – Molecular mechanisms of activation and regulation, *Front. Immunol.*, **6**, 262, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.
2. Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement system Part II: role in immunity, *Front. Immunol.*, **6**, 257, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
3. Xie, C. B., Jane-Wit, D., and Pober, J. S. (2020) Complement membrane attack complex: new roles, mechanisms of action, and therapeutic targets, *Am. J. Pathol.*, **190**, 1138-1150, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.02.006>.
4. Егорова Е. В., Кренев И. А., Оборин Н. Н., Берлов М. Н. (2023) Антимикробная активность системы комплемента, *Мед. Акад. Журн.*, **23**, 31-45, <https://doi.org/10.17816/MAJ322841>.
5. Radek, K., and Gallo, R. (2007) Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system, *Semin. Immunopathol.*, **29**, 27-43, <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0064-5>.
6. Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., and Mirnejad, R. (2018) Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria, *Microb. Drug Resist.*, **24**, 747-767, <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.

7. Zhang, Q. Y., Yan, Z. B., Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., and Fu, C. Y. (2021) Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential, *Mil. Med. Res.*, **8**, 48, <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.
8. Safranova, V. N., Bolosov, I. A., Panteleev, P. V., Balandin, S. V., and Ovchinnikova, T. V. (2023) Therapeutic potential and prospects of application of peptides in the era of the global spread of antibiotic resistance, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **49**, 435-447, <https://doi.org/10.1134/S1068162023030172>.
9. Wang, G. (2014) Human antimicrobial peptides and proteins, *Pharmaceuticals*, **7**, 545-594, <https://doi.org/10.3390/ph7050545>.
10. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., and Yi, H. (2020) Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields, *Front. Microbiol.*, **11**, 582779, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
11. Zimmer, J., Hobkirk, J., Mohamed, F., Browning, M. J., and Stover, C. M. (2015) On the functional overlap between complement and anti-microbial peptides, *Front. Immunol.*, **5**, 689, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00689>.
12. Nordahl, E. A., Rydengård, V., Nyberg, P., Nitsche, D. P., Mörgelin, M., Malmsten, M., Björck, L., and Schmidtchen, A. (2004) Activation of the complement system generates antibacterial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 16879-16884, <https://doi.org/10.1073/pnas.0406678101>.
13. Pasupuleti, M., Walse, B., Nordahl E., Mörgelin, M., Malmsten, M., and Schmidtchen A. (2007) Preservation of antimicrobial properties of complement peptide C3a, from Invertebrates to Humans, *J. Biol. Chem.*, **282**, 2520-2528, <https://doi.org/10.1074/jbc.M607848200>.
14. Lachmann, P. J. (2019) The story of complement factor I, *Immunobiology*, **224**, 511-517, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.003>.
15. Harrison, R. A., Farries, T. C., Northrop, F. D., Lachmann, P. J., and Davis, A. E. (1988) Structure of C3f, a small peptide specifically released during inactivation of the third component of complement, *Complement*, **5**, 27-32, <https://doi.org/10.1159/000463028>.
16. Ganu, V. S., Müller-Eberhard, H. J., and Hugli, T. E. (1989) Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized, *Mol. Immunol.*, **10**, 939-948, [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90112-0).
17. Dousset, B., Straczek, J., Maachi, F., Nguyen, D. L., Jacob, C., Capiaumont, J., Nabet, P., and Belleville, F. (1998) Purification from human plasma of a hexapeptide that potentiates the sulfation and mitogenic activities of insulin-like growth factors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 587-591, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8834>.
18. Xiang, Y., Matsui, T., Matsu, K., Shimada, K., Tohma, S., Nakamura, H., Masuko, K., Yudoh, K., Nishioka, K., and Kato, T. (2007) Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells, *Arthritis Rheum.*, **56**, 2018-2030, <https://doi.org/10.1002/art.22645>.
19. Ourradi, K., Xu, Y., de Seny, D., Kirwan, J., Blom, A., and Sharif, M. (2017) Development and validation of novel biomarker assays for osteoarthritis. *PLoS One*, **12**, e0181334, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181334>.
20. Pozolotin, V. A., Umnyakova, E. S., Kopeykin, P. M., Komlev, A. S., Dubrovskii, Y. A., Krenev, I. A., Shamova, O. V., and Berlov, M. N. (2021) Evaluation of antimicrobial activity of the C3f peptide, a derivative of human C3 protein, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47**, 741-748, <https://doi.org/10.1134/S1068162021030158>.
21. Dubos, R. J. (1955) The micro-environment of inflammation or Metchnikoff revisited, *Lancet*, **266**, 1-5, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(55\)93374-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(55)93374-2).
22. Lardner, A. (2001) The effects of extracellular pH on immune function, *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 522-530, <https://doi.org/10.1189/jlb.69.4.522>.
23. Milanino, R., Marrella, M., Gasperini, R., Pasqualicchio, M., and Velo, G. (1993) Copper and zinc body levels in inflammation: an overview of the data obtained from animal and human studies, *Agents Actions*, **39**, 195-209, <https://doi.org/10.1007/bf01998974>.
24. Sugarman, B. (1983) Zinc and infection, *Rev. Infect. Dis.*, **5**, 137-147, <https://doi.org/10.1093/clinids/5.1.137>.
25. Eijkelpamp, B. A., Morey, J. R., Neville, S. L., Tan, A., Pederick, V. G., Cole, N., Singh, P. P., Ong, C. Y., Gonzalez de Vega, R., Clases, D., Cunningham, B. A., Hughes, C. E., Comerford, I., Brazel, E. B., Whittall, J. J., Plumptre, C. D., McColl, S. R., Paton, J. C., McEwan, A. G., Doble, P. A., and McDevitt, C. A. (2019) Dietary zinc and the control of *Streptococcus pneumoniae* infection, *PLoS Pathog.*, **15**, e1007957, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007957>.
26. Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., and Hancock, R. E. W. (2005) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **6**, 35-51, <https://doi.org/10.2174/1389203053027494>.
27. Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., and Phoenix, D. A. (2016) pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents, *Pharmaceuticals*, **9**, 67, <https://doi.org/10.3390/ph9040067>.

28. Li, S., and Hong, M. (2011) Protonation, tautomerization, and rotameric structure of histidine: a comprehensive study by magic-angle-spinning solid-state NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1534-1544, <https://doi.org/10.1021/ja108943n>.
29. Xu, T., Levitz, S. M., Diamond, R. D., and Oppenheim, F. G. (1991) Anticandidal activity of major human salivary histatins, *Infect. Immun.*, **59**, 2549-2554, <https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2549-2554.1991>.
30. Mochon, A. B., and Liu, H. (2008) The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm, *PLoS Pathog.*, **4**, e1000190, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000190>.
31. Maisetta, G., Petruzzelli, R., Brancatisano, F. L., Esin, S., Vitali, A., Campa, M., and Batoni, G. (2010) Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: Effect of copper and acidic pH, *Peptides*, **31**, 1995-2002, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.007>.
32. Holdbrook, D. A., Singh, S., Choong, Y. K., Petrlova, J., Malmsten, M., Bond, P. J., Verma, N. K., Schmidtchen, A., and Saravanan, R. (2018) Influence of pH on the activity of thrombin-derived antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 2374-2384, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.06.002>.
33. McDonald, M., Mannion, M., Pike, D., Lewis, K., Flynn, A., Brannan, A. M., Browne, M. J., Jackman, D., Madera, L., Power Coombs, M. R., Hoskin, D. W., Rise, M. L., and Booth, V. (2015) Structure-function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod, *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 1451-1461, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.030>.
34. Shang, D., Sun, Y., Wang, C., Wei, S., Ma, L., and Sun, L. (2012) Membrane interaction and antibacterial properties of chensinin-1, an antimicrobial peptide with atypical structural features from the skin of *Rana chensinensis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 1551-1560, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4148-3>.
35. Alexander, J. L., Thompson, Z., and Cowan, J. A. (2018) Antimicrobial metallopeptides, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 844-853, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00989>.
36. Donaghy, C., Javellana, J. G., Hong, Y. J., Djoko, K., and Angeles-Boza, A. M. (2023) The synergy between zinc and antimicrobial peptides: an insight into unique bioinorganic interactions, *Molecules*, **28**, 2156, <https://doi.org/10.3390/molecules28052156>.
37. Miller, A., Matera-Witkiewicz, A., Mikołajczyk, A., Wieczorek, R., and Rowińska-Żyrek, M. (2021) Chemical “butterfly effect” explaining the coordination chemistry and antimicrobial properties of clavanin complexes, *Inorg. Chem.*, **60**, 12730-12734, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02101>.
38. McCaslin, T. G., Pagba, C. V., Yohannan, J., and Barry, B. A. (2019) Specific metallo-protein interactions and antimicrobial activity in Histatin-5, an intrinsically disordered salivary peptide, *Sci. Rep.*, **9**, 17303, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52676-7>.
39. Rydengård, V., Andersson, E. N., and Schmidtchen, A. (2006) Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*, *FEBS J.*, **273**, 2399-2406, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05246.x>.
40. Edström, A. M., Malm, J., Frohm, B., Martellini, J. A., Giwercman, A., Mörgelin, M., Cole, A. M., and Sørensen, O. E. (2008) The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins, *J. Immunol.*, **181**, 3413-3421, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3413>.
41. Juliano, S. A., Pierce, S., deMayo, J. A., Balunas, M. J., and Angeles-Boza, A. M. (2017) Exploration of the innate immune system of *Styela clava*: Zn<sup>2+</sup> binding enhances the antimicrobial activity of the tunicate peptide clavanin A, *Biochemistry*, **56**, 1403-1414, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01046>.
42. Fields, G. B., and Noble, R. L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 161-214, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>.
43. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W315-W322, <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
44. Berlov, M. N., Korableva, E. S., Andreeva, Yu. V., Ovchinnikova, T. V., and Kokryakov, V. N. (2007) Lactoferrin from canine neutrophils: isolation and physicochemical and antimicrobial properties, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 445-451, <https://doi.org/10.1134/S0006297907040128>.
45. Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I., and Savidge, G. F. (1993) The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics, *J. Med. Microbiol.*, **39**, 147-154, <https://doi.org/10.1099/00222615-39-2-147>.
46. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., and Ren, Q. (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide, *BMC Microbiol.*, **15**, 36, <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>.
47. Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., and Torres, R. (2015) Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides, *RJ*, **7**, 4-14, <https://doi.org/10.32614/rj-2015-001>.

48. Janssen, B. J., Huizinga, E. G., Raaijmakers, H. C., Roos, A., Daha, M. R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., and Gros, P. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity, *Nature*, **437**, 505-511, <https://doi.org/10.1038/nature04005>.
49. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulter, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
50. Petersen, B., Lundgaard, C., and Petersen, T. N. (2010) NetTurnP – neural network prediction of beta-turns by use of evolutionary information and predicted protein sequence features, *PLoS One*, **5**, e15079, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015079>.
51. Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, **55**, 4-30, [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M).
52. Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A., and Hirata, M. (2000) Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins, *Inflamm. Res.*, **49**, 73-79, <https://doi.org/10.1007/s00110050561>.
53. Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry*, **29**, 5647-5659, <https://doi.org/10.1021/bi00476a001>.
54. Li, J., Ren, X., Fan, B., Huang, Z., Wang, W., Zhou, H., Lou, Z., Ding, H., Lyu, J., and Tan, G. (2019) Zinc toxicity and iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e01967-18, <https://doi.org/10.1128/AEM.01967-18>.
55. Brocklehurst, K. R., and Morby, A. P. (2000) Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology, *Microbiology (Reading)*, **146**, 2277-2282, <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2277>.
56. Park, J., Oh, J. H., Kang, H. K., Choi, M. C., Seo, C. H., and Park, Y. (2020) Scorpion-venom-derived antimicrobial peptide Css54 exerts potent antimicrobial activity by disrupting bacterial membrane of zoonotic bacteria, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 831, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110831>.
57. Dorey, A., Marinho, C., Piveteau, P., and O'Byrne, C. (2019) Role and regulation of the stress activated sigma factor sigma B ( $\sigma^B$ ) in the saprophytic and host-associated life stages of *Listeria monocytogenes*, *Adv. Appl. Microbiol.*, **106**, 1-48, <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.11.001>.
58. Gahan, C. G., O'Driscoll, B., and Hill, C. (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3128-3132, <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3128-3132.1996>.
59. Van Schaik, W., Gahan, C. G., and Hill, C. (1999) Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147, *J. Food Prot.*, **62**, 536-539, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.5.536>.
60. Bonnet, M., and Montville, T. J. (2005) Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**, 237-242, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01661.x>.

## CHARACTERIZATION OF STRUCTURAL PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMPLEMENT SYSTEM C3f PEPTIDE

**I. A. Krenev<sup>1</sup>, E. V. Egorova<sup>1,2</sup>, M. M. Khaydukova<sup>1,3</sup>, A. D. Mikushina<sup>1,4</sup>,  
Y. A. Zabrodskaya<sup>1,5,6</sup>, A. S. Komlev<sup>1</sup>, I. E. Eliseev<sup>1,4</sup>,  
O. V. Shamova<sup>1,2</sup>, and M. N. Berlov<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, 197022 Saint Petersburg, Russia; e-mail: berlov.mn@iemspb.ru

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, 199034 Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,  
192019 Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Alferov University, 194021 Saint Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376 Saint Petersburg, Russia

<sup>6</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia

The C3f peptide is a by-product of the regulation of the activated complement system with no firmly established function of its own. We have previously shown that C3f exhibits moderate antimicrobial

activity against some Gram-positive bacteria *in vitro*. The occurrence of two histidine residues in the amino acid sequence of the peptide suggested an enhancement of its antimicrobial activity at lower pH and in the presence of metal cations, particularly zinc cations. Since such conditions can be realized in inflammatory foci, the study of the dependence of C3f activity on pH and the presence of metal cations provides an opportunity to assess the biological significance of the antimicrobial properties of the peptide. The peptide C3f and its analogs with histidine substitutions by lysines or serines, C3f[H/K] and C3f[H/S], were prepared by solid-phase synthesis. Using CD spectroscopy, we found that C3f contained a  $\beta$ -hairpin and unstructured regions; the presence of  $Zn^{2+}$  did not affect the conformation of the peptide. In the present work, it was shown that C3f can also exhibit antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, in particular, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. The action of the peptide on *Ps. aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* EGD is accompanied by impairment of the barrier function of bacterial membranes.  $Zn^{2+}$  ions, unlike  $Cu^{2+}$  ions, enhanced the antimicrobial activity of C3f against *L. monocytogenes*, with 4- and 8-fold molar excess of  $Zn^{2+}$  being no more effective than a 20% excess. The activity of the C3f analogs was also enhanced to some extent by zinc ions. Thus, we hypothesize a histidine-independent formation of C3f- $Zn^{2+}$  complexes leading to an increase in the total charge and antimicrobial activity of the peptide. In the presence of 0.15 M NaCl, C3f lost its activity regardless of the presence of  $Zn^{2+}$ , indicating a minor role of C3f as an endogenous antimicrobial peptide. The presence of C3f abolished the bactericidal effect of  $Zn^{2+}$  against the zinc-sensitive *Escherichia coli* strain ESBL 521/17, indirectly confirming the interaction of the peptide with  $Zn^{2+}$ . The activity of C3f against *Micrococcus luteus* A270, but not against *L. monocytogenes*, increased with decreasing pH. In this work, we show the significance of factors such as pH and metal cations in realizing the activity of antimicrobial peptides based on the example of C3f.

**Keywords:** innate immunity, complement, antimicrobial peptides, C3f, circular dichroism,  $Zn^{2+}$ , pH-dependent activity