

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального
медико-биологического агентства»

На правах рукописи

Графская Екатерина Николаевна

**АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК
МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS***

03.01.04 — Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории генной инженерии отдела клеточной биологии.

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Лазарев Василий Николаевич

Официальные оппоненты **Шмаров Максим Михайлович**
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии

Рогожин Евгений Александрович
кандидат химических наук,
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук

Защита состоится «17» июня 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета
Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Первые антибактериальные препараты для лечения и профилактики инфекций были разработаны в начале XX века. С течением времени, массовое бесконтрольное использование антибиотиков, в том числе и в сельском хозяйстве, привело к возникновению и широкому распространению резистентных к ним патогенных микроорганизмов. Инфекционные заболевания, вызванные такими бактериями, часто становятся причиной смерти пациентов, что представляет собой серьёзную проблему для здравоохранения во всем мире. Разработка новых антибиотиков является временным решением проблемы вследствие того, что устойчивость в отношении большинства антибиотиков у бактерий развивается в течение нескольких лет. Новые стратегии борьбы с резистентными микроорганизмами требуют поиска эффективных препаратов, принципиально отличающихся по механизму действия от используемых в настоящее время антибактериальных средств. Альтернативой синтетическим антибиотикам могут служить соединения природного происхождения, а именно, компоненты системы врождённого иммунитета многих организмов - антимикробные пептиды (АМП).

АМП ингибируют рост бактерий, обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными антибиотиками и рассматриваются как новый класс противомикробных средств. На данный момент описано несколько тысяч АМП, синтетического или природного происхождения. Тем не менее, только несколько пептидов зарегистрированы в качестве лекарственных препаратов, и почти три десятка проходят разные стадии клинических исследований. Основным препятствием для использования АМП в медицинской практике является их цитотоксичность по отношению к клеткам млекопитающих. В то же время, секреты животных могут служить источником АПМ природного происхождения, обладающих пониженной токсичностью в отношении клеток млекопитающих.

Медицинская пиявка *Hirudo medicinalis*, в течении нескольких тысячелетий применяемая для лечения различных заболеваний, является гематофагом - организмом, приспособившимся к питанию кровью животных. Секрет слюнных клеток (ССК) *H. medicinalis* является источником соединений, разнообразных по структуре и биологической активности, и имеющих большой потенциал для разработки лекарственных препаратов на их основе. Известно, что ССК *H. medicinalis*, помимо тромболитического, антикоагуляционного, сосудорасширяющего, антигипоксического и противовоспалительного действия, обладает антибактериальным эффектом. Кроме того, медицинская пиявка способна долгое время хранить кровь интактной в собственной пищеварительной системе, что говорит о наличии в её секрете противомикробных соединений с низким гемолитическим действием.

Системных исследований ССК *H. medicinalis* ранее не проводилось, данные о белковом составе ССК скудны и фрагментарны. Хорошо изучены лишь белки, присутствующие в высоких концентрациях в секрете *H. medicinalis*, такие как гирудин, бделлины, калин, дестабилаза. На данный момент получены транскрипты нескольких пиявок [Amorim и др., 2015; Hibsh и др., 2015; Khan и др., 2019; Kvist и др., 2014; Lu и др., 2018; Min и др., 2010; Northcutt и др., 2018]. В 2016 году был проведён сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей митогеномов (митохондриальных геномов) трёх кровососущих пиявок *Haementeria officinalis*, *Placobdella lamothei* и *Placobdella parasitica* [Oceguera-Figueroa и др., 2016]. В этом же году, нами впервые была получена нуклеотидная последовательность митохондриального генома *H. verbana* и *H. medicinalis* [Nikitina и др., 2016]. Определена нуклеотидная последовательность генома пресноводной пиявки *Helobdella robusta* без аннотации данных [Simakov и др., 2013]. Наиболее изученной остаётся лишь микробиота медицинских пиявок *H. verbana* [Maltz и др., 2014; Ott и др., 2014; Worthen и др., 2006]. Таким образом, исчерпывающий анализ генома и белкового состава ССК *H. medicinalis* является важным и актуальным исследованием в области поиска и изучения новых антимикробных соединений белковой природы.

Цель и задачи

Цель данной работы заключалась в идентификация новых антимикробных пептидов ССК *H. medicinalis* и изучении их структурно-функциональных свойств. В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Определить нуклеотидную последовательность генома *H. medicinalis*, провести аннотацию генов *H. medicinalis*, проанализировать протеом ССК *H. medicinalis*.
2. Оптимизировать алгоритм идентификации антимикробных пептидов в геноме и применить его для поиска новых АМП в геноме и протеоме ССК *H. medicinalis*.
3. Химически синтезировать и определить антимикробную активность найденных АМП в отношении *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, внутриклеточного патогена *Chlamydia trachomatis*, оценить их гемолитическое действие и цитотоксичность.
4. Изучить вторичную структуру активных АМП методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.
5. Исследовать мембранолитическую активность АМП с использованием сканирующей электронной микроскопии и модельных липосом.

Научная новизна

В ходе исследования впервые была определена нуклеотидная последовательность генома *H. medicinalis*, была проведена его аннотация. Впервые был проанализирован протеом

нативного секрета слюнных клеток *H. medicinalis*. Проведенная оптимизация биоинформатического алгоритма поиска АМП, применённого к аннотации генома и протеома ССК *H. medicinalis*, позволила найти новые антимикробные пептиды. Идентифицированные пептиды обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, низкой гемолитической активностью и не проявляют цитотоксического эффекта по отношению к клеткам млекопитающих. Впервые методом ЯМР-спектроскопии было продемонстрировано, что обнаруженные антимикробные пептиды принимают α -спиральную конформацию в мембранном окружении. Было показано, что пептиды *H. medicinalis* ингибируют рост бактерий путём дезинтеграции их клеточной мембраны.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость данной работы состоит в том, что аннотация генома *H. medicinalis* и анализ белкового состава ССК *H. medicinalis* представляют собой базу новых белков, которые могут послужить основой для разработки новых лекарственных препаратов. Алгоритм поиска АМП, применённый в работе, позволил идентифицировать АМП широкого спектра действия со сниженной цитотоксической активностью по отношению к клеткам млекопитающих. Новые АМП в дальнейшем могут рассматриваться в качестве потенциальных антибактериальных препаратов. Биоинформатический алгоритм для анализа геномных данных с целью поиска новых АМП может быть применён для поиска АМП в других организмах.

Методология и методы исследования

В данной работе определение нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis* и его сборка выполнены на современном оборудовании согласно стандартным методикам с использованием готовых компьютерных приложений, электронных баз данных. Все данные, полученные в ходе исследования, были депонированы в базе данных NCBI под регистрационными номерами BioProject acc. num. PRJNA257563 и PRJNA256119 и доступны другим исследователям для проверки и использования. Аннотация генома *H. medicinalis* и протеома ССК *H. medicinalis* проведена с использованием готового программного обеспечения и самостоятельно написанных скриптов на двух языках программирования (R, Python). Аналитические методы исследования вторичной структуры пептидов (ЯМР-спектроскопия), биохимические (определение антибактериальной, гемолитической, цитотоксической активностей) и физико-химические методы исследования пептидов (изучение механизма действия пептидов) выполнены на современном оборудовании и с использованием актуальных методик.

Положения, выносимые на защиту

1. Размер генома *H. medicinalis* составляет 187,5 Мп.н. и включает в себя 14596 белок-кодирующих генов. Анализ протеома ССК *H. medicinalis* позволил идентифицировать в секрете слюнных клеток 189 белковых молекул.
2. Оптимизированный биоинформатический алгоритм идентификации АМП в геноме, нацеленный на поиск последовательностей, кодирующих короткие положительно заряженные пептиды с тенденцией к образованию α -спиральных структур, позволяет находить антимикробные пептиды.
3. Восемь из двенадцати идентифицированных пептидов *H. medicinalis* обладают антимикробной активностью в отношении *E. coli*, *B. subtilis* и *C. thrachomatis*. Исследуемые пептиды не обладают цитотоксической активностью в отношении клеток эукариот и вызывают слабый или умеренный гемолиз эритроцитов при концентрации 100 мкМ.
4. Антимикробные пептиды 3967, 536_2 и 12530 принимают α -спиральную конформацию в растворе, содержащем додецилфосфохолиновые мицеллы.
5. Антимикробные пептиды 536_1 и 3967 обладают литической активностью в отношении бактериальных мембран.

Личный вклад автора

Автором был выполнен поиск и анализ научной литературы по теме исследования, проведено планирование экспериментов, оптимизирован биоинформатический алгоритм анализа нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis* для идентификации АМП, были проведены работы по сбору данных, создание референсных баз АМП. Автором были выполнены работы с использованием микробиологических, биохимических (определение антибактериальной, гемолитической активностей) и физико-химических методов исследования активности пептидов (изучение механизма действия пептидов), был проведен анализ и интерпретация результатов, подготовка публикаций. Работа была выполнена в лаборатории генной инженерии ФНКЦ ФХМ ФМБА России в период с 2016 по 2020 год.

Степень достоверности и апробация работы

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных биологической и медицинской наук. Научные положения и выводы, изложенные в работе, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях таких, как 8-я Школа Молодых Ученых "Системная Биология и Биоинформатика" - SBB-2016 (Новосибирск, 2016); 43rd FEBS Congress (Прага, 2018); 7-ая Ежегодная Конференция по Медицинской химии (Ноттингем, 2019)

и других.

Сведения о публикациях по теме диссертации

Результаты исследований опубликованы в 26 печатных работах, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международную базу данных Web of Science, 21 тезис в материалах российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах печатного текста, содержит 16 таблиц и 24 рисунка и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Библиографический указатель включает 293 литературных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Определение полной нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis*¹

Расшифровка нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis* является платформой для исследования разнообразия белков медицинской пиявки. На первом этапе работы была выделена и очищена геномная ДНК *H. medicinalis*, из которой были получены ДНК-библиотека коротких прочтений (Ion Proton, #SRR6926478²) и две парных ДНК-библиотеки с длиной прочтений 3-6 т.п.н. (Ion TrueMate, #SRR6926477²) и 8-12 т.п.н. (Illumina TruSeq, #SRR6926477²). Затем геном *H. medicinalis* был собран методом гибридной сборки на основе секвенирования этих трех библиотек с использованием геномного сборщика SPAdes [Bankevich и др., 2012]. В результате было получено 168,624 контига с параметром качества сборки N50 равному 12,9 т.п.н. С целью идентификации и разделения прокариотических и эукариотических контигов, была проведена процедура биннинга, которая также позволяет разделить и кластеризовать метагеномные последовательности [Sedlar и др., 2017]. Алгоритм BLASTN и базу данных «nr» использовали для определения таксономической принадлежности контигов с применением программы MEGAN6 [Huson и др., 2007] (Рисунок 1).

В результате, оказалось, что контиги с наибольшим покрытием, принадлежат геному *H. medicinalis*. Контиги с более высоким уровнем ошибок относились к последовательностям ДНК прокариот и были исключены из дальнейшего исследования. Отобранные контиги далее подверглись процедуре скаффолдинга [Boetzer и др., 2011]. В результате сборка генома *H.*

¹ – Работа по типированию пиявок, выделению и очистке геномной ДНК, пробоподготовке, секвенированию и анализу ДНК библиотек медицинской пиявки проводилась в сотрудничестве с н.с. лаборатории геномных исследований и вычислительной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России В.В. Бабенко.

² – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в Архиве последовательностей прочтений (Sequence Read Archive, SRA).

medicinalis состояла из 14,042 скаффолдов с параметром качества сборки N50 равному 98 т.п.н.. Размер собранного генома *H. medicinalis* (BioProject асс. num. PRJNA257563 и PRJNA256119) составил 187,5 Мп.н., что составляет 85% от теоретически предсказанного (http://www.genomesize.com/result_species.php?id=1061). Сравнительный анализ генома *H. medicinalis* с геномами гематофагов и других спиральнодробящихся животных показал, что

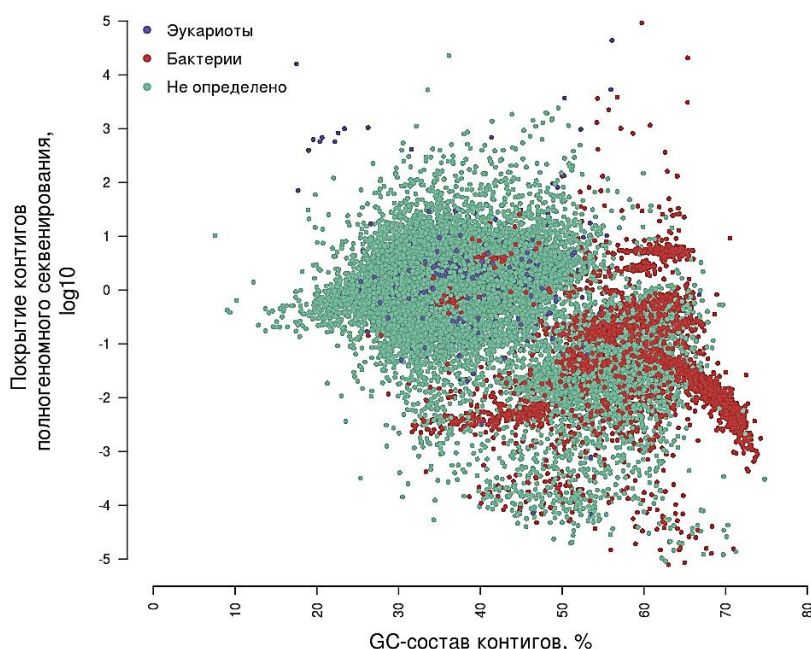


Рисунок 1 - Двумерная диаграмма распределения контигов, полученных в ходе полногеномного секвенирования *H. medicinalis*

Контиги обозначены кругами, окрашенными в соответствии с таксономической принадлежностью, определенной по базе данных NCBI (зелёный - бактерии, синий - эукариоты, чёрный — не определено). Контиги представлены в осях GC-состава (ось абсцисс) и покрытия (ось ординат) контигов.

геном *H. medicinalis* меньше по размеру и количеству генов. Экзон-интронная структура схожа со структурой других пиявок и в целом размер генома полностью коррелирует со средней длиной интронов в геноме, что согласуется с литературными данными [McLysaght и др., 2000; Vinogradov, 1999].

Аннотация генома *H. medicinalis*

Перед аннотацией генома *H. medicinalis* скаффолды были проверены на наличие мобильных генетических элементов с помощью программы RepeatMasker и с использованием базы данных ДНК-повторов беспозвоночных Repbase-GIRI [Bao и др., 2015; Smit и др., 2015]. Было замаскировано 12% нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis*, из которых ретротранспозоны и ДНК-транспозоны составляют 4,8% практически в равной пропорции. В литературе мало информации о мобильных элементах в геномах аннелид [Simakov и др., 2013], однако, полученные данные согласуются с результатами исследований геномов представителей спиральнодробящихся животных.

На следующем этапе анализа была проведена аннотация генома *H. medicinalis*. Были выбраны три шаблона: 1) набор последовательностей генов, кодирующих белки пиявки *H. robusta* (GenBank acc. Num. AMQM01000000, BioProject acc. num. PRJNA175704) [Simakov O. и др., 2013] 2) контиги, соответствующие *de novo* сборке транскриптома *H. medicinalis* [Grabherr M.G. и др., 2013] 3) прочтения кДНК *H. medicinalis*, полученные нами в ходе исследования трех медицинских пиявок [Babenko V.V. и др., 2019]. Референсные последовательности для каждого шаблона картировали на последовательности скаффолдов сборки генома *H. medicinalis* с использованием программного обеспечения BLAT (версия 34x13) [Kent и др., 2002]. Затем все три шаблона объединяли и с помощью программного обеспечения AUGUSTUS 125 (версия 3.7.1) выполняли аннотацию генов *H. medicinalis* [Stanke и др., 2005]. В результате было предсказано 14596 белок-кодирующих генов. Помимо генов, кодирующих консервативные белки, были идентифицированы новые гены, кодирующие известные антикоагулянты и белки, связанные с перевариванием и хранением крови. В результате аннотации генома *H. medicinalis* получены нуклеотидные последовательности генов, кодирующие ранее не изученные белки.

Протеомный анализ секрета слюнных клеток *H. medicinalis*³

Компоненты ССК *H. medicinalis* выполняют важные функции по обеспечению и поддержанию жизнедеятельности пиявок [Павлова и др., 2015; Hildebrandt и др., 2011; Sig и др., 2017]. На данный момент в ССК *H. medicinalis* идентифицировано лишь несколько белков [Baskova и др., 2008], поэтому нами был проведен комплексный анализ протеома ССК *H. medicinalis*. Ввиду сложного состава ССК и наличия ингибиторов сериновых протеаз было использовано три протокола пробоподготовки и различные типы ВЭЖХ масс-спектрометров. Анализ масс-спектров проводили с использованием программы ProteinPilot 4.5, ревизия 1656 [Seymour и др., 2017].

Выходные данные результатов масс-спектрометрического анализа образцов ССК *H. medicinalis* были объединены в спектральную библиотеку идентифицированных белков. В результате было обнаружено 189 белков: белки-регуляторы системы гемостаза; ингибиторы протеаз; цистеин-богатые секреторные белки; белки, участвующие в переваривании крови; протеазы; секретируемые белки с неизвестными функциями и прочие. Большинство детектированных белков играют важную роль во взаимодействиях с жертвой [Kvist и др., 2013; Tessler и др., 2018].

³ – Пробоподготовку и масс-спектрометрический анализ ССК медицинской пиявки проводили в сотрудничестве с лабораторией системной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) и лабораторией протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

Биоинформатический алгоритм поиска новых антимикробных пептидов *H. medicinalis*

На следующем этапе работы был выполнен целенаправленный поиск новых АМП с использованием аннотации генома *H. medicinalis*. Анализ данных проводили по алгоритму, который является модификацией метода, описанного в работах по поиску антимикробных молекул в транскриптомах таракана *Periplaneta americana* и многоножки *Scolopendra subspinipes mutilans* [Kim и др., 2016; Yoo и др., 2014] (Рисунок 2). Поиск заключался в идентификации катионных амфифильных молекул, физико-химические свойства которых соответствуют таковым известных АМП. Нами было предположено, что кандидатные α -спиральные АМП *H. medicinalis*, в отличие от других организмов, могут быть менее токсичными из-за эволюционной приспособленности пиявки к питанию кровью. В работе использовались он-лайн серверы для расчета структурных особенностей пептидов и их склонности к агрегации (TANGO, AGGREGSCAN), а также несколько он-лайн предикторов, направленных на определение антимикробного потенциала пептида (AMPA, ADAM, CAMP_{R3}) [Conchillo-Solé и др., 2007; Fernandez-Escamilla и др., 2004; Lee и др., 2015; Torrent и др., 2012; Waghu и др., 2015]. Алгоритм был дополнен созданным нами методом расчета физико-химических свойств аминокислотных последовательностей, написанным с использованием пакетов языка программирования R: *protr*, *seqinr*, *Peptides* [Charif и др., 2007; Torres и др., 2020; Xiao и др., 2015]. Для разбиения аминокислотных последовательности на пептиды определенной длины со сдвигом на один аминокислотный остаток была написана функция на языке программирования Python.

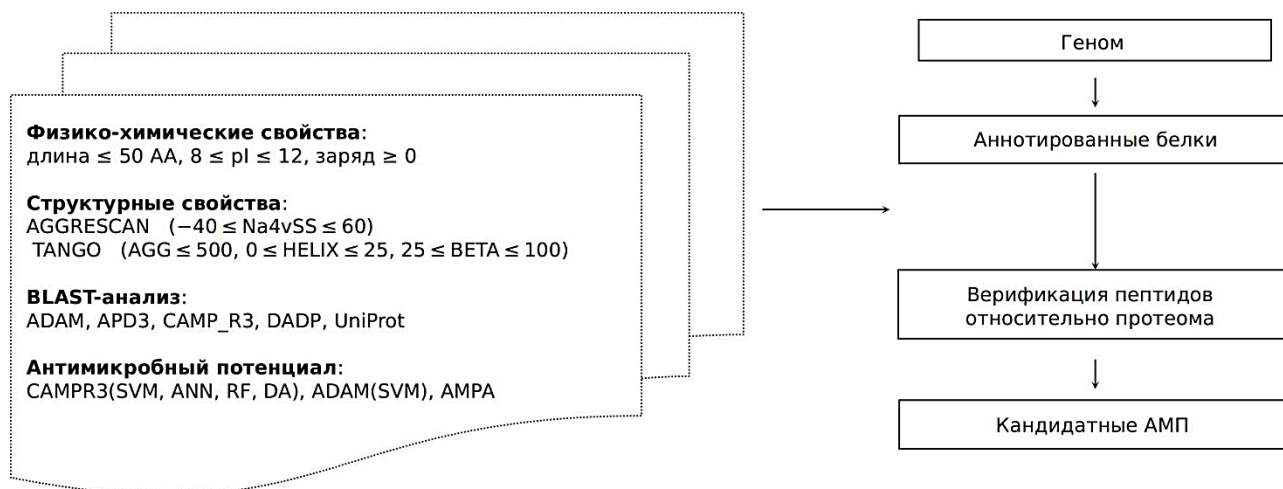


Рисунок 2 - Схематичное описание биоинформатического анализа нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis* с целью поиска новых АМП

Сначала из генома *H. medicinalis* были получены все кодирующие нуклеотидные последовательности. Все транслированные аминокислотные последовательности были разделены на пептиды длиной 50 а.а. со сдвигом на один аминокислотный остаток. Таким

образом, было получено 7891765 пептидов. Затем для каждого пептида были определены их физико-химические свойства (суммарный заряд, значения изоэлектрической точки, индекс гидрофобности, способность к формированию вторичной структуры) с помощью алгоритма, написанного нами на языке программирования R. Для дальнейшего анализа были выбраны последовательности, по физико-химическим характеристикам соответствующие известным АМП, а именно 370807 молекул. Затем, применяя он-лайн предикторы для идентификации последовательностей, обладающих антимикробным потенциалом, были отобраны потенциальные АМП. Далее пептиды были верифицированы относительно протеома ССК медицинской пиявки. В анализе были оставлены только те последовательности, для которых в протеоме были обнаружены пептиды. На заключительном этапе биоинформатического анализа, для последующего химического синтеза были отобраны двенадцать потенциальных АМП с самым высоким противомикробным потенциалом, согласно примененным в алгоритме фильтрам (Таблица 1).

Таблица 1 - Пептиды, идентифицированные при анализе нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis*

Название пептида	Аминокислотная последовательность	Длина, а.о.	Заряд	Молекулярный вес, Да
756	IKIVAPKKIKL	11	+4	1250,7
3063	WKKLVPYKIHAGI	13	+3	1552,9
3967	FRIMRILRVLKL	12	+4	1558,1
8557	WKIFKLKLRMLW	12	+4	1662,2
9332	LRWLGTKVGILK	12	+3	1383,7
12530	KFKKVIWKSFL	11	+4	1423,8
19347_1	LIVLTCRKKKKPF	13	+5	1574,1
19347_2	RPILIRVRRIRVI	13	+5	1660,1
536_1	RWRLVCFLCRRKKV	14	+6	1863,4
536_2	GFIVKRFKILV	11	+3	1319,7
8361_1	CLIMKVRRKK	10	+5	1274,7
8361_2	ISRACLIMKVRRKK	14	+6	1702,2

Характеристика функциональных свойств пептидов *H. medicinalis*

На следующем этапе работы была исследована антимикробная, гемолитическая и цитотоксическая активности найденных АМП *H. medicinalis*. Пептиды были синтезированы химически с применением F-мос стратегии на микроволновом пептидном синтезаторе Liberty Blue (CEM, США). Антимикробную активность пептидов определяли в отношении *E. coli* K-12 substr. MG1655 (ATCC[®] 700926[™]), *B. subtilis* 168HT (ATCC[®] 23857[™]) и *C. trachomatis* D/UW-

З/Сх (АТСС[®] VR-885[™]) (Таблица 2). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) пептидов в отношении *B. subtilis* и *E. coli* определяли с помощью методики двукратных серийных разведений [Wiegand и др., 2008]. Минимальную концентрацию пептидов, при которой уровень инфекции *C. trachomatis* был меньше на 90% от уровня в контрольных образцах (МПК90), определяли согласно методике, разработанной нами ранее [Bobrovsky и др., 2016]. Пептиды, в целом, были более активными в отношении *B. subtilis* и *C. trachomatis*. Вероятно, такие отличия вызваны структурными особенностями клеточных мембран грамположительных и грамотрицательных бактерий. Два пептида - 3967 и 536_1, продемонстрировали антимикробную активность против всех трех видов бактерий. Значение МИК для пептида 3967 в отношении *B. subtilis*, *E. coli* составило 10,3 мкМ, в отношении *C. trachomatis* 3,1 мкМ. Для пептида 536_1 — 8,6 мкМ, 17,2 мкМ и 6,3 мкМ соответственно. Стоит отметить, что проявленная антимикробная активность пептидов, сравнима с таковой известных АМП. Например, ранатуерин-1, антимикробный пептид лягушки *Rana catesbeiana*, ингибирует рост *E.coli* и *S. aureus* при значениях МИК 48 и 97 мкМ соответственно [Helbing и др., 2019]. Пексиганан, аналог антимикробного пептида магаинина-2 африканской лягушки *Xenopus laevis*, убивает *Klebsiella pneumoniae* при значении МИК 6,5 мкМ, а метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* при 26 мкМ [Cabello и др., 2009].

Таблица 2 - Антимикробная активность АМП *H. medicinalis*

Название пептида	МИК (мкМ)		МПК90 (мкМ)
	<i>B. subtilis</i> 168 НТ	<i>E. coli</i> MG1655	<i>C. trachomatis</i> D/UW-3/Cx
756	>102	>102	>100
3063	>82	>82	>100
3967	10,3	10,3	3,1
8557	38,5	77	50
9332	>92	>92	>100
12530	45	90	12,5
19347_1	40,7	>81	12,5
19347_2	9,7	77,1	>100
536_1	8,6	17,2	6,3
536_2	97	>97	>100
8361_1	12,6	100,4	12,5
8361_2	9,4	37,6	12,5
мелиттин	1,5	5,7	2

Пять других пептидов, 8557, 12530, 19347_1, 8361_1 и 8361_2, ингибировали рост *B.*

subtilis и *C. trachomatis*, а пептид 19347_2 был активен в отношении только *B. subtilis*. У остальных пептидов 756, 3063, 9332 и 536_2 антимикробная активность была незначительной или отсутствовала.

Основным недостатком известных АМП является их токсичность по отношению к клеткам эукариот. Поэтому была изучена гемолитическая и цитотоксическая активности идентифицированных пептидов. Гемолитическую активность пептидов оценивали по степени гемолиза эритроцитов человека после инкубации в течение часа с пептидами в различной концентрации. В целом, пептиды обладают низкой гемолитической активностью, лизируют <10% эритроцитов при обработке пептидами в концентрации 100 мкМ (Таблица 3). Два пептида, 536_1 и 536_2, лизируют приблизительно 30% эритроцитов в концентрации 100 мкМ. Пептиды 8557 и 12530, проявляют высокую гемолитическую активность, лизируя приблизительно 50% эритроцитов в концентрациях 6,25 и 50 мкМ соответственно. Для сравнения мелиттин, токсичный для клеток млекопитающих АМП, вызывал 100%-ый лизис эритроцитов в концентрации 1 мкМ.

Таблица 3 - Гемолитическая активность АМП *H. medicinalis*

Название пептида	Процент гемолиза, %						
	0	3,125 мкМ	6,25 мкМ	12,5 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	100 мкМ
3967	-	2,3±1,2	1,8±3,4	2,7±2,9	2,8±1,7	5,8±4,6*	11,1±5,1*
12530	-	4,1±3*	4,3±4,7*	7,2±2,5*	6,5±3,3*	13,1±5,3*	32,9±6,5*
756	-	1,6±1,1	1,3±1,1	3,5±1,1*	2,8±2,7	4,4±3,1	4,6±4,5*
8361_1	-	1,1±0,8	0,8±1,9	2±1,7	2,6±1,6	2,8±2,8	6±5,9*
3063	-	2,4±2,2	4,8±2,8*	9,3±2,6*	24,2±4,9*	55,8±7,1*	87,3±4,4*
536_1	-	2,1±3,7	6,9±6,6*	6,9±4,4*	7,4±4,5*	13±2,8*	27,6±6,4*
536_2	-	2,3±3,8	2,8±2,6	4,4±2,5*	6,9±2,3*	13,6±4*	35,7±8,6*
8557	-	35,2±3,5*	45,6±3,2*	60,3±3,3*	79,5±12*	94±6,2*	98,4±7,9*
9332	-	1±3,1	1,8±4,3	3,2±4,1*	4,1±2,6*	5,8±3,5*	10,8±6,9*
1X PBS	0,1±2,7	-	-	-	-	-	-
0,1%-ый раствор Triton X-100	99,8±2,4*	-	-	-	-	-	-
мелиттин, 1мкМ	99±3,4*	-	-	-	-	-	-

* — Статистически значимые различия между контрольной и экспериментальной группами, $p < 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ S.D. (n = 3).

Цитотоксичность пептидов по отношению к клеткам млекопитающих оценивали по количеству жизнеспособных мышинных фибробластов линии McCoy (ATCC® CRL-1696™)

после 24-часовой инкубации клеток с пептидами в различной концентрации. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи двойного окрашивания клеток флуоресцентными красителями - кальцеином-АМ и йодистым пропидием с последующей флуоресцентной микроскопией. Пептиды 536_2 и 19347_1 в концентрации 4×МИК проявили токсическое действие в отношении клеток McCoу (Таблица 4). Процент выживших клеток, инкубируемых с пептидами 536_2 и 19347_1, составил 0% и 10,5% соответственно. Остальные пептиды не влияли на жизнеспособность клеток.

Таким образом, два пептида 3967 и 536_1 обладают антимикробным действием в отношении *E. coli*, *B. subtilis* и *C. trachomatis*, низкой гемолитической и цитотоксической активностями.

Таблица 4 - Жизнеспособность мышинных фибробластов McCoу после инкубации с идентифицированными пептидами *H. medicinalis* в течение 24 часов

Название пептида	Процент жизнеспособных клеток, %				
	0	1/2хМИК	1хМИК	2хМИК	4хМИК
3967	-	99,8±0,6	99,7±0,9	99,9±0,4	99,9±0,3
12530	-	99,7±0,7	99,8±0,3	99,9±0,2	99,4±0,8
19347_2	-	99,8±0,4	99,6±0,4	99,4±0,6	99,3±1
8361_1	-	98,9±1,6	99,5±0,7	98,9±1,3	99,1±1
8361_2	-	99,7±0,5	99,8±0,6	99,4±1	99,9±0,3
536_1	-	99,8±0,9	99,7±0,6	99,8±0,7	99,6±0,9
536_2	-	99,9±0,4	99,7±0,8	99,3±1,4	0±0*
19347_1	-	99,7±0,6	99,8±0,4	98,6±1,9*	10,5±17,3*
среда DMEM	99,1±1,7	-	-	-	-

* — Статистически значимые различия между контрольной и экспериментальной группами, $p < 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ S.D. (n = 4).

Определение вторичной структуры новых антимикробных пептидов *H. medicinalis*⁴

На следующем этапе работы была проанализирована вторичная структура пептидов с помощью ЯМР-спектроскопии в водном растворе и растворе с добавлением додецилфосфатидилхолиновых (ДФХ) мицелл для имитации мембранного окружения, схожего с бактериальной клеточной мембраной. Для анализа вторичной структуры были выбраны пять пептидов: 3967, 536_2, 12530, 756 и 9332. Сначала были определены резонансы Ca, Cβ, HN в спектрах ROESY, 1H-13C HSQC и 1H-15N HSQC и вторичная структура исследуемых пептидов определялась с использованием программы TALOS-N [Shen и др., 2013].

⁴ - Исследование пространственной структуры пептидов проводили совместно с с.н.с. лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН к. ф.-м. н. К.Д. Надеждиным, и студенткой И. А. Талызиной.

Анализ ЯМР-спектров пептидов в водных растворах показал, что структура пептидов неупорядочена в воде, что соответствует ранее опубликованным данным об известных АМП [Wang и др., 2016; Yeaman и др., 2003]. При добавлении суспензии ДФХ мицелл наблюдались значительные изменения в химических сдвигах для всех пептидов, что указывало на конформационные изменения. Согласно расчётам, в растворе ДФХ мицелл пептид 536_2

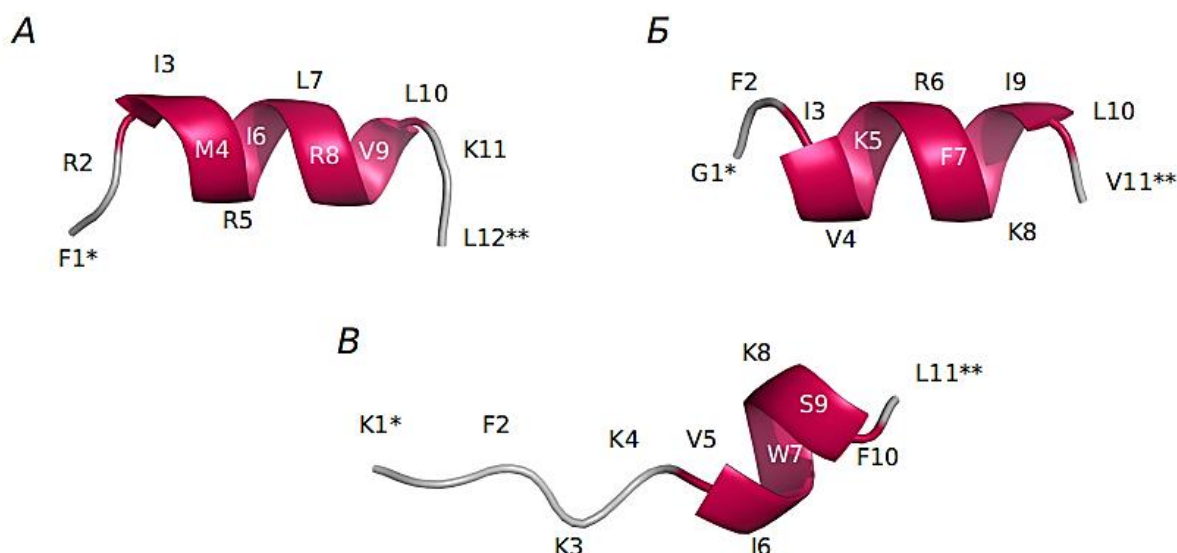


Рисунок 3 - Пространственная структура пептидов в растворе ДФХ мицелл (А) Пространственная структура пептида 3967 (ID PDB: 6RRL) (Б) пептида 536_2 (ID PDB: 6RRO) (В) пептида 12530 (ID PDB: 6RRL). Красным цветом обозначена α -спиральная укладка, серым - неструктурированный остов. * N-концевой аминокислотный остаток пептида; ** С-концевой аминокислотный остаток пептида.

образует α -спираль (остатки Phe2-Leu10), пептид 3967 принимает α -спиральную конформацию (остатки Ile3-Val9), пептид 12530 имеет С-концевой α -виток (Trp7-Phe10), в то время как остальная часть остова не упорядочена (Рисунок 3). Пептиды 756 и 9332 не имеют упорядоченной вторичной структуры как в водном, так и в мицеллярном окружении.

Изучение мембранолитической активности новых антимикробных пептидов *H. medicinalis*⁵

Мы предположили, что идентифицированные пептиды могут обладать мембранолитическим действием. Поэтому были исследованы структурные изменения бактериальных мембран после инкубации с наиболее активными пептидами 3967 и 536_1 с помощью сканирующей электронной микроскопии. Клетки *E.coli* и *B. subtilis* инкубировали с пептидами 3967 и 536_1 в конечной концентрации $1/2 \times \text{МИК}$ и $1 \times \text{МИК}$ в течение 8 ч и 24 ч.

⁵ - Анализ образцов с использованием СЭМ проводили в сотрудничестве с м.н.с. лаборатории медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России Е.Р. Павловой.

Затем клетки отбирали, проводили химическое высушивание образцов с использованием гексаметилдисилазана и анализировали с помощью микроскопа Zeiss Merlin, оснащенного GEMINI II Electron Optics (Zeiss, Германия).

После 8 часов инкубации клеток с пептидами 3967 и 536_1 в концентрации $1/2 \times \text{МИК}$ значительно снижается количество бактерий, наблюдаются существенные морфологические изменения клеток, образуется клеточный дебрис (Рисунок 4). При воздействии пептида 3967 на *B. subtilis* наблюдается резкое снижение количества клеток без видимых морфологических изменений бактерий. При концентрации пептидов, равной $1 \times \text{МИК}$, нет различий между 8 и 24 часами инкубации, зафиксированных бактерий не наблюдается. Анализ с использованием сканирующей электронной микроскопии подтвердил, что пептиды 3967 и 536_1 воздействуют на мембраны бактерий в основном через нарушение ее целостности, что приводит к гибели бактериальных клеток.

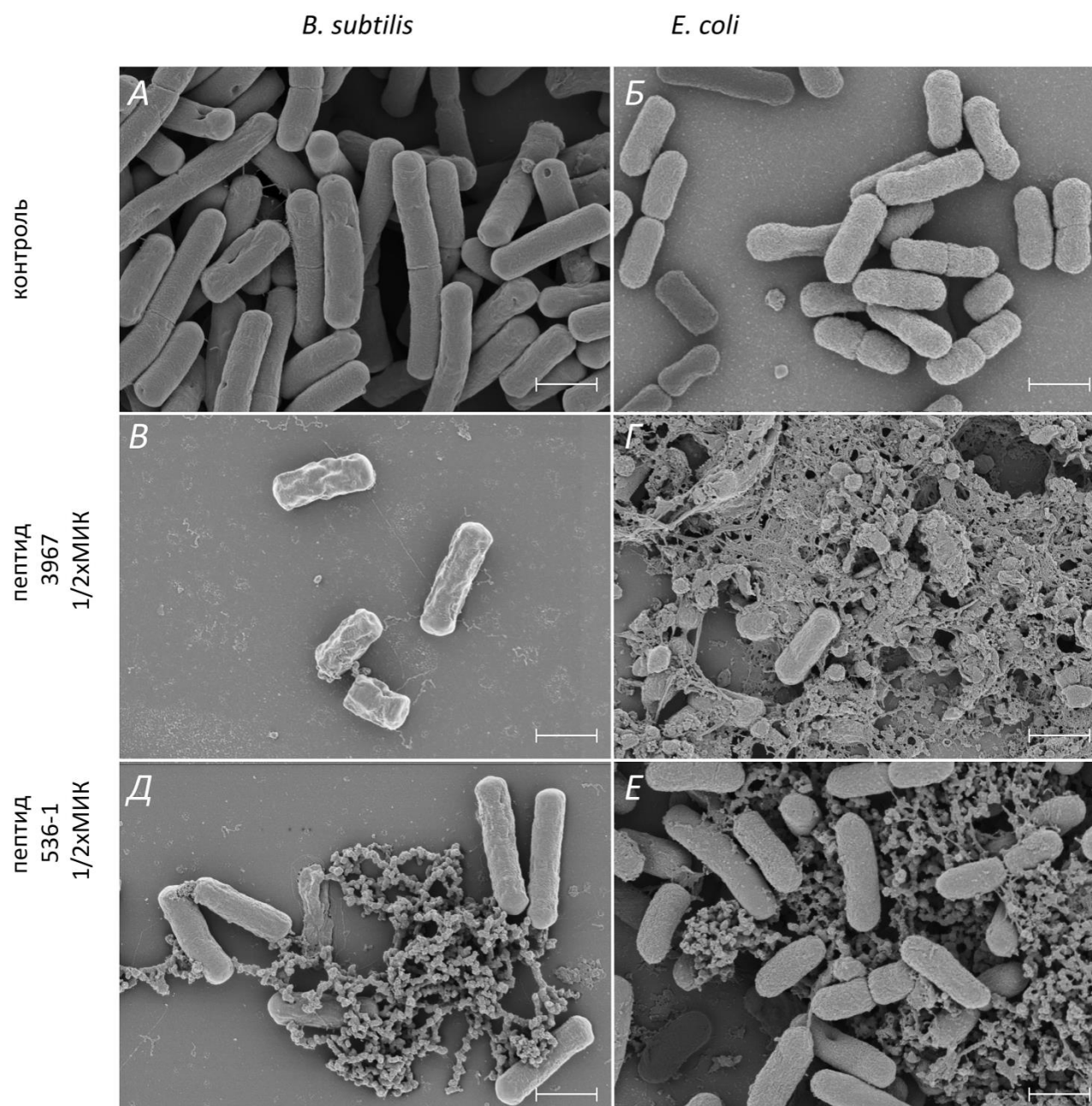


Рисунок 4 - Морфологические изменения бактериальных клеток *E. coli* и *B. subtilis* при инкубации с пептидами 3967 и 536_1

Клетки инкубировали с пептидами в течение 8 ч при концентрации, соответствующей 1/2×МИК для каждого пептида. В качестве интактного контроля использовались *B. subtilis* и *E. coli*, инкубируемые со средой МНВ в течение 8 часов (А, Б). Характерный масштаб - 1 мкм.

Изучение взаимодействия новых антимикробных пептидов *H. medicinalis* с липосомами⁶

Липосомы, имитирующие биологические мембраны, были применены в качестве модельных объектов для изучения взаимодействия АМП с клетками. Были получены большие моноламеллярные везикулы (БМВ), состоящие из липидных молекул и нагруженные

⁶ - Изучение взаимодействия АМП с липосомами проводили совместно с заведующим лаборатории электрофизиологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России к.ф.-м.н. П.В. Башкировым.

флуоресцентной меткой — карбоксифлуоресцеином (КФ). Полученные БМВ по составу имитировали клеточные мембраны прокариот (ПОФС, ПОФХ: ДОФГ (80:20), ПОФХ: ПОФС (80:20), ПОФХ: ПОФС (50:50), ПОФХ: ПОФС (75:25)) и эукариот (ПОФХ). БМВ инкубировали с пептидами в различных концентрациях и измеряли интенсивность флуоресценции в реальном времени. Мы наблюдали быстрое высвобождение КФ из БМВ, состоящих из ПОФС, но медленное при взаимодействии с цвиттерионными везикулами (ПОФХ, ПОФС). Этот эффект свидетельствует о высокой скорости воздействия АМП на бактериальные клетки и медленном взаимодействии с клетками эукариот.

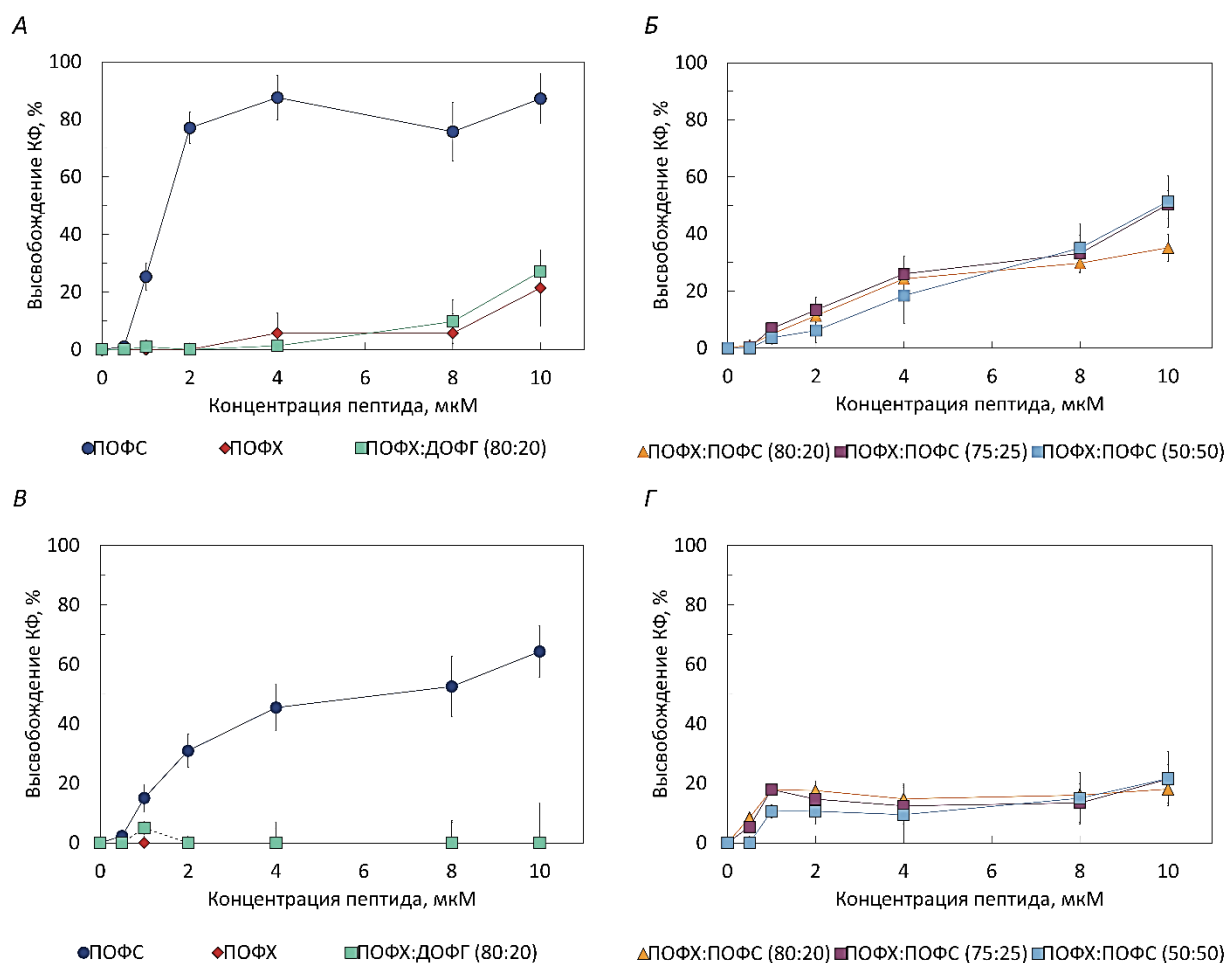


Рисунок 5 - Высвобождение карбоксифлуоресцеина из больших БМВ различного липидного состава, после добавления пептида 3967 (А, Б) и пептида 536_1 (В, Г) (синие кружок: чистый ПОФС; оранжевый ромб: чистый ПОФХ; зеленый квадрат: ПОФХ: ДОФГ (80:20); оранжевый треугольник: ПОФХ: ПОФС (80:20); голубой квадрат: ПОФХ: ПОФС (50:50); фиолетовый квадрат: ПОФХ: ПОФС (75:25)). КФ - карбоксифлуоресцеин.

Пермеабилзирующую активность определяли путем количественной оценки высвобождения КФ через 1 мин после добавления пептида (Рисунок 5). Пептиды 3967 и 536_1 проявляют зависимую от концентрации повреждающую активность в отношении везикул с анионными липидами (ДОФГ, ПОФС), но не взаимодействуют с цвиттерионными везикулами (чистый ПОФХ), которые имитируют мембрану эукариотических клеток. Способность

пептидов лизировать везикулы разного липидного состава сравнима со мембранолитической активностью известных катионных АМП, основанной на внутримолекулярных электростатических взаимодействиях катионных остатков АМП с анионными липидами мембран бактериальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АМП природного происхождения являются перспективными соединениями для разработки лекарственных препаратов для лечения заболеваний, вызванных антибиотикоустойчивыми бактериями. Основным недостатком АМП является их токсичность по отношению к клеткам эукариот. Мы предположили, что медицинская пиявка *H. medicinalis*, ССК которой обладает полифункциональным, в том числе и антимикробным действием, может послужить источником новых АМП с пониженной цитотоксичностью. Для поиска и описания новых биологически активных веществ мы применили системный «омиксный» анализ *H. medicinalis*. Впервые была получена нуклеотидная последовательность генома *H. medicinalis*, была проведена аннотация генома *H. medicinalis*, выполнен анализ белкового состава ССК *H. medicinalis*. Полученные данные представляют собой базу данных нуклеотидных последовательностей, кодирующих уникальные белки, для многих из которых функции еще не изучены. Дальнейшее изучение белков ССК *H. medicinalis* позволит более полно охарактеризовать механизмы с помощью которых гематофаг воздействует на процессы гемостаза и иммунитета жертвы.

В настоящей работе был оптимизирован биоинформатический алгоритм для идентификации АМП в геноме *H. medicinalis*. Алгоритм нацелен на поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих короткие положительно заряженные пептиды со способностью к образованию α -спиральных структур. Вычислительный алгоритм объединяет расчёт физико-химических свойств, вторичной структуры пептида, а также определение его антимикробного потенциала. С помощью алгоритма в геноме *H. medicinalis* были идентифицированы двенадцать последовательностей, кодирующих потенциальные АМП. Они были химически синтезированы, был проведён анализ их антимикробной, гемолитической и цитотоксической активности.

В результате, два пептида, 3967 (FRIMRILRVLKL) и 536_1 (RWRLVCFLCRRKKV), ингибируют рост грамположительных (*B. subtilis*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *C. thrachomatis*) при значении МИК порядка 10 мкМ, обладают низкой гемолитической активностью и не токсичны для клеток линии McCoу. Методом ЯМР-спектроскопии было показано, что пептиды 536_2 и 3967 принимают α -спиральную конформацию в мембрано-миметических мицеллах ДФХ. Для наиболее активных АМП *H. medicinalis* был изучен их

вероятный механизм действия. Показано, что пептиды 3967 и 536_1 проявляют низкое сродство к бислойным мембранам и способны полностью разрушать анионные липосомы, что даёт возможность предположить, что эти пептиды проявляют мембранолитический механизм действия и снижают выживаемость клеток *E. coli* и *B. subtilis*, в основном, за счёт нарушения целостности бактериальных мембран.

Данные исследования активности найденных АМП *H. medicinalis* подтверждают хорошую прогностическую способность биоинформатического алгоритма поиска новых АМП. В дальнейшем, предсказательный алгоритм может быть использован для анализа геномов других организмов. Идентифицированные в ходе работы пептиды 3967 и 536_1, благодаря широкому спектру действия и отсутствию токсических эффектов на клетки эукариот, являются перспективной основой для разработки антимикробного препарата широкого спектра действия.

ВЫВОДЫ

1. Определена нуклеотидная последовательность генома *H. medicinalis*, размер которого составляет 187,5 Мп.н. и включает в себя 14596 белок-кодирующих генов. Анализ состава ССК *H. medicinalis* позволил идентифицировать в секрете 189 белковых молекул.
2. Оптимизирован алгоритм поиска АМП в геномных данных, заключающийся в идентификации коротких положительно заряженных пептидов с тенденцией к образованию α -спиральных структур. С использованием алгоритма было отобрано 12 потенциальных антимикробных пептидов.
3. Анализ антимикробной активности пептидов показал, что восемь из двенадцати обладают различной антимикробной активностью в отношении *E. coli*, *B. subtilis* и *C. thrachomatis*. Пептиды 3967 и 536_1 обладали наибольшей антимикробной активностью. Все пептиды не цитотоксичны и проявили низкую гемолитическую активность, за исключением пептидов 8557 и 3063.
4. Методом ЯМР-спектроскопии α -спиральная структура подтверждена для пептидов 3967, 536_2 и 12530. Пептиды 756 и 9332 не структурированы.
5. Пептиды 536_1 и 3967 вызывают дезинтеграцию бактериальных клеточных стенок и проявляют низкое сродство к цвиттерионным везикулам, но полностью разрушают анионные везикулы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Grafkskaia E.N.** The *Hirudo medicinalis* microbiome is a source of new antimicrobial peptides / **E.N. Grafkskaia**, E.R. Pavlova, V.V. Babenko, I.A. Latsis, M.V. Malakhova, V.N. Lavrenova, P.V. Bashkirov, D.M. Belousov, D.V. Klinov, V.N. Lazarev // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. - T. 21., № 19. - C. 1–14.
2. Babenko V.V. Draft genome sequences of *Hirudo medicinalis* and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches / V.V. Babenko, O.V. Podgorny, V.A. Manuvera, A.S. Kasianov, A.I. Manolov, **E.N. Grafkskaia**, D.A. Shirokov, A.S. Kurdyumov, D.V. Vinogradov, A.S. Nikitina, S.I. Kovalchuk, N.A. Anikanov, I.O. Butenko, O.V. Pobeguts, D.S. Matyushkina, D.V. Rakitina, E.S. Kostyukova, V.G. Zgoda, I.P. Baskova, V.M. Trukhan, M.S. Gelfand, V.M. Govorun, H.B. Schiöth, V.N. Lazarev // *BMC Genomics*. - 2020. - T. 21., № 331. - C. 357681.
3. Fesenko I. Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with antimicrobial activity in the Moss *Physcomitrella patens* / I. Fesenko, R. Azarkina, I. Kirov, A. Kniazev, A. Filippova, **E.N. Grafkskaia**, V.N. Lazarev, V. Zgoda, I. Butenko, O. Bukato, I. Lyapina, D. Nazarenko, S. Elansky, A. Mamaeva, V. Ivanov, V. Govorun // *BMC Plant Biology*. - 2019. - T. 19., № 1. - C. 1–16.
4. **Grafkskaia E.N.** Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens / **E.N. Grafkskaia**, K.D. Nadezhdin, I.A. Talyzina, N.F. Polina, O.V. Podgorny, E.R. Pavlova, P.V. Bashkirov, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, I.A. Latsis, V.A. Manuvera, V.V. Babenko, V.M. Trukhan, A.S. Arseniev, D.V. Klinov, V.N. Lazarev // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2019. - T. 180. - C. 143–153.
5. **Grafkskaia E.N.** Discovery of novel antimicrobial peptides: A transcriptomic study of the sea anemone *Cnidopus japonicus* / **E.N. Grafkskaia**, N.F. Polina, V.V. Babenko, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, V.A. Manuvera, T.E. Farafonova, N.A. Anikanov, V.N. Lazarev // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. - 2018. - T. 16., № 2. - C. S0219720018400061.

Материалы конференций:

6. **Графская Е.Н.** Анализ структуры антимикробных пептидов микробиоты медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* методом спектроскопии кругового дихроизма / **Е.Н. Графская**, Е.Р. Павлова, П.В. Башкиров, И.А. Лацис, В.Н. Лазарев // IV Всероссийская научная конференция молодых ученых «МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ». Санкт-Петербург, 2020. - С.
7. Лавренова В.Н. Антимикробные пептиды микробиоты медицинской пиявки *hirudo medicinalis* / В.Н. Лавренова, **Е.Н. Графская**, В.В. Бабенко, М.В. Малахова, И.А. Лацис, В.Н. Лазарев // IV Всероссийская научная конференция молодых ученых «МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ». Санкт-Петербург, 2020. - С.
8. Вахрушева Т.В. Оценка влияния новых, синтезированных катионных антимикробных пептидов медицинской пиявки на нейтрофилы человека / Т.В. Вахрушева, С.А. Гусев, Л.Ю. Басырева, **Е.Н. Графская**, И.А. Лацис, О.М. Панасенко, В.Н. Лазарев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов международной научной конференции, Четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 2020. – С. 107.
9. Вахрушева Т.В. Возможное взаимодействие между катионными антимикробными пептидами и нейтрофильной миелопероксидазой / Т.В. Вахрушева, О.М. Панасенко, Д.С. Матюшкина, **Е.Н. Графская**, И.А. Лацис, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.А. Иванов, В.Н. Лазарев, А.В. Соколов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов международной научной конференции, Четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 2020. – С. 108.
10. **Grafkskaia E.N.** Promising biologically active peptides of *Hirudo medicinalis* / **E.N. Grafkskaia**, K.D. Nadezhdin, I.A. Talyzina, N.F. Polina, O.V. Podgorny, P.A. Bobrovsky, I.A. Latsis, V.A. Manuvera, V.N. Lazarev // 27 th Annual GP2A Conference 21 st -23 rd August 2019 International Conference on Medicinal Chemistry. Conference Handbook. Nottingham, UK, 2019. - C. 50.
11. Vakhrusheva T.V. Some effects of three new cationic antimicrobial peptides of *hirudo medicinalis* on human neutrophils / T.V. Vakhrusheva, D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, **E.N. Grafkskaia**, I.A. Latsis, V.N. Lazarev, O.M. Panasencko // Тезисы докладов III Международной конференции "Свободные радикалы в химии и жизни/ Free radicals in chemistry and life". – Минск, 2019. – С. 40.
12. Талызина И.А. Установление структуры антимикробного пептида pep12530 методом ямр-спектроскопии / И.А. Талызина, К.Д. Надеждин, **Е.Н. Графская**, Н.Ф. Полина, О.В. Подгорный, П.А. Бобровский, В.В. Бабенко, В.Н. Лазарев, А.С. Арсеньев // Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXXI зимней молодежной научной школы. – Москва, 2019. – С. 58.
13. Menyaylo E.A. Novel cationic antimicrobial peptides of *Hirudo medicinalis* and their Initial evaluation as potential medicinal agents / E.A. Menyaylo, **E.N. Grafkskaia**, L.Y. Basyreva, S.A. Gusev, D.S. Matyushkina, I.A. Latsis, A.V. Sokolov, V.N. Lazarev, T.V. Vakhrusheva // III Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит (SIBS-2019). Москва, 2019. - С. 38-39.
14. **Графская Е.Н.** Исследование механизма действия противомикробных агентов медицинской пиявки *Hirudo*

medicinalis / **Е.Н. Графская**, К.Д. Надеждин, Е.Р. Павлова, П.В. Башкиров, В.Н. Лазарев // VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика». Ялта, 2019. - С.

15. **Графская Е.Н.** Поиск и изучение новых противомикробных препаратов на примере исследования генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* / **Е.Н. Графская**, Н.Ф. Полина, О.В. Подгорный, П.А. Бобровский, В.В. Бабенко, В.Н. Лазарев // V Международная конференция "Постгеном'2018". - Казань, 2018.- С. 159.
16. **Графская Е.Н.** Алгоритм поиска проникающих пептидов, обладающих антимикробными свойствами / **Е.Н. Графская**, В. В. Бабенко, Н. Ф. Полина, Д. Д. Харлампиева, П. А. Бобровский, Н. А. Аниканов, Т. Е. Фарафонова // Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА. Москва, 2018. - С. 12.
17. Kharlampieva D.D. A draft of the *Hirudo medicinalis* genome provides information about potential anticoagulant and thrombolytic proteins / D.D. Kharlampieva, V.V. Babenko, V.A. Manuvera, **E.N. Grafkskaia**, N.F. Polina, O.V. Podgorny, P.A. Bobrovsky, A.M. Belova, O.A. Miroshina, D.A. Shirokov, V.N. Lazarev // FEBS OPEN BIO. - 2018. - Т. 8., № S1. - С. 462.
18. Polina N.F. A digestive system microbiota of medicinal leech *Hirudo medicinalis* / N.F. Polina, V.V. Babenko, **E.N. Grafkskaia**, O.V. Podgorny, P.A. Bobrovsky, D.D. Kharlampieva, A.M. Belova, D.A. Shirokov, O.A. Miroshina, V.A. Manuvera // FEBS Open Bio. - 2018. - Т. 8., № S1. - С. 462.
19. **Grafkskaia E.N.** New biologically active peptides from medicinal leech *Hirudo medicinalis* / **E.N. Grafkskaia**, N.F. Polina, V.V. Babenko, P.A. Bobrovsky, D.D. Kharlampieva, A.M. Belova, D.A. Shirokov, O.A. Miroshina, T.E. Farafonova, N.A. Anikanov, Manuvera, V.N. Lazarev // FEBS OPEN BIO. - 2018. - Т. 8., № S1. - С. 235.
20. **Grafkskaia E.N.** In pursuit of cell-penetrating antimicrobial peptides: the transcriptome robust analysis / **E.N. Grafkskaia**, V.V. Babenko, N.A. Anikanov, N.F. Polina, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, V.N. Lazarev // Febs Journal. - 2017. - Т. 284., № S1. - С. 331.
21. **Графская Е.Н.** Антимикробные пептиды и белки медицинской пиявки *hirudo medicinalis* / **Е.Н. Графская**, В.В. Бабенко, Н.А. Аниканов, Т.Е. Фарафонова, В.А. Манувера, Д.Д. Харлампиева, Н.Ф. Полина, П.А. Бобровский, В.Н. Лазарев // III Всероссийский Научный Форум "Наука будущего - наука молодых". Сборник тезисов участников форума "Наука будущего - наука молодых". – Нижний Новгород, 2017. – С. 252-254.
22. **Grafkskaia E.N.** Discovery of novel cell-penetrating antimicrobial peptides by transcriptome deep analysis / **E.N. Grafkskaia**, V.V. Babenko, N.A. Anikanov, N.F. Polina, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, V.N. Lazarev // Proceedings of 8-th International Moscow Conference (MCCMB 2017). - Moscow, 2017. - С. 89.
23. **Grafkskaia E.N.** Prediction of antimicrobial peptides based on feature selection methods / **E.N. Grafkskaia** // Systems Biology and Bioinformatics. The Ninth International Young Scientists School SBB-2017. Abstracts. – Ялта, 2017. – С. 37-38.
24. **Графская Е.Н.** Поиск антимикробных белков и пептидов в секрете слюнных желез медицинской пиявки / **Е.Н. Графская**, В.В. Бабенко // 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов. - Пущино, 2016. - С. 72
25. **Графская Е.Н.** Поиск новых проникающих антимикробных пептидов морской анемоны *Cnidopus japonicus* / **Е.Н. Графская**, В.В. Бабенко, Н.А. Аниканов, П.А. Бобровский, Д.Д. Харлампиева, Н.Ф. Полина // VII Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем». Тезисы докладов. – Звенигород, 2016. - С. 65.
26. **Grafkskaia E.N.** In silico searching strategy of new antimicrobial proteins and peptides: the case of transcriptome study of the medicinal leech / **E.N. Grafkskaia**, V.V. Babenko // The 8th International Young Scientist School «Systems Biology And Bioinformatics — SBB-2016. Новосибирск, 2016. – С. 31.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП - антимикробный пептид
БМВ - большие моноламеллярные везикулы
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФГ - 1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфоглицерол
ДФХ - додецилфосфатидилхолин
КФ - (англ. *carboxyfluorescein*) карбоксифлуоресцеин
МИК - минимальная ингибирующая концентрация
МПК90 - минимальная концентрация пептидов, при которой уровень инфекции был меньше 90% от уровня в контрольных образцах
ПОФС - 1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфо-L-серин
ПОФХ - 1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфохолин
РНК - рибонуклеиновая кислота
ССК - секрет слюнных клеток
ЯМР - ядерный магнитный резонанс
ADAM - (англ. *A Database of Anti-Microbial peptides*) обширная база данных антимикробных пептидов (<http://bioinformatics.cs.ntou.edu.tw/ADAM/>)
APD - (англ. *Antimicrobial Peptide Database*) база данных антимикробных пептидов (<http://aps.unmc.edu/AP/>)
BLAST - (англ. *Basic Local Alignment Search Tool*) семейство компьютерных программ для поиска локальных соответствий между последовательностями (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
BLAT - (англ. *BLAST-like alignment tool*) алгоритм парного выравнивания последовательностей, разработанный для сборки и аннотации генома человека
CAMP_{R3} - (англ. *Collection of Anti-Microbial Peptides*) коллекция антимикробных пептидов (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>)
DADP - (англ. *Database of Anuran Defense Peptides*) база данных антимикробных пептидов земноводных (<http://split4.pmfst.hr/dadp/>)
Fmoc - (англ. *9-fluorenylmethyloxycarbonyl*) 9-флуоренилметилоксикарбонил
NCBI - (англ. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*) Национальный центр биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
PBS - (англ. *phosphate-buffered saline*) фосфатно-солевой раствор
PDB - (англ. *Protein Database*) база данных структуры белков (<https://www.rcsb.org/>)