

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПЕПТИД
ИЗ НАСЕКОМОГО *Sphodromantis viridis*, ОБЛАДАЮЩИЙ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ И АНТИГРИБКОВЫМ
ДЕЙСТВИЕМ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ
И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА***

© 2015 Хади Заре-Зардини^{1,2,3}, Асха Тахери-Кафрани³,
Махтаб Ордуей^{4**}, Дейла Эбрахими⁵, Бехназ Толуейни⁶

¹ Young Researchers Club, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran

² Department of Pediatric, Hematology, Oncology and Genetics Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran

³ Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

⁴ Pediatric Endocrinologist, Yazd Diabetes Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran; fax: +98(351)822-9104, E-mail: mahtab.ordooei@gmail.com

⁵ Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion, Medicine, Tehran, Iran

⁶ Department of Biology, Faculty of Sciences, Iranshahr Branch, Payam Noor University of Sistan and Baluchestan, Iranshahr, Iran

⁷ Biotechnology Department, Agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Поступила в редакцию 19.09.14

После доработки 26.11.14

Антимикробные пептиды (АМП) являются компонентами иммунной системы, предохраняющей организм хозяина от инфекции. В данной работе был выделен и охарактеризован новый высокоэффективный АМП из тела богомола *Sphodromantis viridis*. Этот пептид был очищен методом ЖХВД на обращенной фазе. Последующая масс-спектрометрия показала, что он состоит из 14 аминокислотных остатков (а.о.) и относится к семейству мастопаранов. Пептид был назван мастопаран-S (от лат. *Sphodromantis*). Продемонстрировано, что мастопаран-S обладает противомикробной активностью по отношению к широкому спектру микроорганизмов (грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов) и является более активным, чем известные антибиотики, например, канамицин. Активность мастопарана-S против грамотрицательных бактерий была выше, чем в отношении грамположительных бактерий. Значения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) мастопарана-S по отношению к различным бактериям находились в диапазоне 15,1–28,3 мкг/мл, к грибкам – 19,3–24,6 мкг/мл. Помимо противомикробного действия, мастопаран-S обладает и гемолитической активностью, но ее величина по отношению к эритроцитам человека была крайне незначительной. Методом МТТ-тестирования на клетках человека (HeLa) показано, что мастопаран-S обладал цитотоксической активностью *in vitro* в концентрации >40 мкг/мл, но был неактивен в концентрации <30 мкг/мл. Представленные данные указывают на то, что новый пептид может быть использован в качестве медицинского противомикробного средства для лечения местных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антимикробные пептиды, цитотоксичность, *Sphodromantis viridis*, иммунная система, гемолитическая активность.

Врожденный иммунитет у позвоночных и беспозвоночных животных является важной линией защиты от патогенных микроорганизмов

(бактерий, грибов и вирусов) [1]. В связи с отсутствием адаптивной иммунной системы у насекомых, антимикробные пептиды (АМП) играют решающую роль в борьбе с патогенами и, следовательно, являются важными факторами врожденного иммунитета у этого класса животных. АМП продуцируются клетками жирового тела и крови насекомых в ответ на микробное

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM14-255, 15.02.2015.

** Адресат для корреспонденции.

инфицирование организма, а затем попадают в гемолимфу.

АМП обладают широким спектром противомикробного действия [2–4]. Как правило, это короткие пептиды и олигопептиды (<100 а.о.), обычно являющиеся катионами [5–7]. Некоторые виды этих пептидов были выделены из амфибий, рептилий, птиц, млекопитающих и пр. [8–12]. Впервые они были получены в лаборатории Бомана из гемолимфы насекомого *Hyalophora cecropia* [13]. Из более чем 1,7 млн известных к 2010 г. видов живых существ на планете, включающих животных, наземных растений и водорослей, 1 млн – это насекомые [14]. Подобно другим животным, насекомые обладают врожденной иммунной системой, представленной большим набором антимикробных пептидов [15–17], которые были идентифицированы у различных представителей этого класса [18–21]. Большинство представителей отряда Mantodea, включающего в себя 15 семейств и 2200 видов насекомых [22, 23], относятся к семейству Mantidae, к которому принадлежит и богомол *Sphodromantis viridis* [24–26]. Есть лишь несколько исследований, посвященных выделению и характеристике антимикробных пептидов из представителей семейства Mantidae [27]. Проведенная работа является попыткой выделить и охарактеризовать новые АМП из богомола *Sphodromantis viridis*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экстракция пептидов. Использовали 100 взрослых особей *Sphodromantis viridis*, отловленных в различных областях Ирана. Перед экстракцией пептидов, насекомые, содержащиеся в небольших садках, были заморожены в жидком N₂ и затем размолоты в порошок. Порошок экстрагировали 1%-ным ТХУ в течение 30 мин на льду, центрифугировали 30 мин при 15 000 g, полученный экстракт лиофилизировали.

Получение пептидов. Для очистки пептидов лиофилизированный экстракт растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и проводили хроматографию методом ЖХВД на полупрепаративной колонке C₁₈ с обращенной фазой. Хроматографию выполняли несколько раз (инжектируемый объем составлял 0,4 мл). Элюцию проводили с помощью комбинации растворов А (0,1%-ный водный раствор ТФУ) и В (0,098%-ный ТФУ в ацетонитриле) (со скоростью 1 мл/мин в течение 70 мин), постепенно увеличивая долю раствора В с 5 до 65% (скорость нарастания градиента раствора В – 0,86% в мин. Поглощение в элюате регистрировали при 220 нм.

Пептидный состав фракций, соответствующих пикам поглощения, определяли в аликвотах путем их повторной хроматографии на аналитической колонке C₁₈. В каждой фракции определяли антимикробную активность. Все фракции лиофилизировали. Самую крупную фракцию, содержащую антимикробные пептиды, повторно очищали указанным выше методом с той лишь разницей, что скорость нарастания градиента раствором В составила 0,5% в мин.

Антимикробный тест выполняли как было описано в наших предыдущих работах [28, 29]. Микроорганизмы выращивали в 3%-ном (w/v) триптоновом соевом бульоне (TSB) при 37° в течение ночи и определяли концентрацию клеток по поглощению при 620 нм. Для определения антибактериальной активности суспензию бактерий добавляли к 6 мл подстилающей агаровой среды (10 мМ Na-фосфат, 1% (v/v) TSB, 1%-ная агароза, рН 6,5) и помещали в чашки Петри. После застывания агарового слоя в нем формировали лунки диаметром 3 мм, вносили в них образцы тестируемых пептидов и инкубировали в течение 3 ч при 37°. Затем подстилающий агар покрывали слоем покровного агара, обогащенного питательными веществами, и инкубировали в течение ночи при 37°. Антибактериальную активность тестировали, наблюдая за ростом бактерий вокруг сформированных лунок.

Для определения противогрибковой активности суспензию грибка добавляли к 20 мл агаровой среды, содержащей картофельную декстрозу, и помещали в чашки для культивирования микроорганизмов. В застывшей среде формировали 3 мм лунки и заполняли их образцами тестируемых фракций пептидов. Чашки помещали в термостат при 30–35° и наблюдали за ростом грибковой культуры в течение 7 сут.

Минимальную ингибирующую концентрацию пептидов (MIC) определяли следующим образом. Сначала готовили серию разведений тестируемого пептида с концентрациями 0,1–1 мг/мл. Аликвоты по 20 мкл из каждого разведения смешивали с бактериальной суспензией с концентрацией клеток 10⁶ КОЕ/мл. Конечные концентрации пептидов составляли 10, 20, 40, 80 и 100 мкг/мл. Полученную смесь раскапывали в 96-луночные микропланшеты для иммуноферментного анализа и инкубировали 18 ч при 37°. Затем определяли поглощение в лунках при 630 нм с помощью ридера для ИФА и сравнивали с поглощением контрольных образцов, не содержащих пептиды.

Для определения MIC пептидов по отношению к грибкам на каждые 180 мкл декстрозо-агаровой среды Сабуро в лунках 96-луночных микропланшетов добавляли по 10 мкл грибко-

вой суспензии с концентрацией 10^6 КОЕ/мл и по 10 мкл раствора пептида. Планшеты инкубировали 24 ч при 37° . Значения МИС определяли как минимальную концентрацию пептида, при которой рост бактериальной или грибковой культуры полностью подавлялся. В качестве объектов для исследования были использованы культуры следующих микроорганизмов: *Escherichia coli* PTCC2433, *Klebsiella pneumoniae* PTCC4231, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC2834, *Bacillus subtilis* PTCC4533, *Leuconostoc mesenteroides* PTCC1445, *Bacillus cereus* PTCC1435, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates* и *Candida albicans*.

Определение гемолитической активности АМП проводили в соответствии с описанным нами ранее методом [28] с использованием свежely-деленных эритроцитов крови человека.

Определение жизнеспособности клеток. Цитотоксическую активность пептидов по отношению к клеткам HeLa определяли с помощью МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид)-теста. До начала эксперимента клетки культивировали в 96-луночных планшетах в течение 24 ч. Затем среду сливали и заменяли на свежую, содержащую тестируемый пептид в концентрациях 10–100 мкг/мл, т.е. в таких же количествах, которые были использованы для определения антимикробной активности. (Клетки, культивируемые в отсутствие АМП, были использованы в качестве контроля.) Планшеты инкубировали 30 мин, 3 и 6 ч, а затем в каждую лунку добавляли МТТ в фосфатном буфере PBS в конечной концентрации 5 мкг/мл. Реакцию проводили 4 ч при 37° , жидкость удаляли, а для растворения образовавшихся кристаллов формазана добавляли смесь, содержащую ДМСО (по 200 мкл в лунку). После инкубации в течение ночи при 37° определяли поглощение в лунках при 540 нм на сканере для микропланшетов. Выживаемость клеток рассчитывали как отношение D_{540} в эксперименте/ D_{540} в контроле и выражали в процентах [30].

MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрия была использована для определения Мг, заряда и первичной последовательности антимикробного пептида. Очищенный лиофилизированный пептид растворяли в 10 мкл 0,1%-ном ТФУ и 1 мкл этого раствора наносили на подложку-мишень масс-спектрометра. Вслед за этим добавляли 1 мкл свежеприготовленной 4-гидрокси- α -коричной кислоты 5 мг/мл («Sigma»), в 50%-ном ацетонитриле, 0,1%-ном ТФУ. MS и MS/MS масс-спектры получали с использованием программы Bruker flex analysis Ver. 3.3. Определение последовательности пептида проводили вручную с ошибкой не более 0,5 Да для каждого иона, полученного в результате фрагментации целого пептида. Для

этого предполагаемые ионы b- и y-серий сравнивали с их реальными MS/MS-спектрами с помощью вышеупомянутой программы.

Структурный анализ пептидов. Изучение сходных по последовательности антимикробных пептидов проводили с использованием пептидной базы данных на сайте (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Для поиска пептидов с аналогичной или похожей первичной структурой использовали программу CLC main workbench Ver. 5.5. Филогенетическое древо сходных между собой АМП было построено с помощью этой же программы с использованием метода объединения ближайших соседей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Очистка антимикробных пептидов. Лиофилизированный экстракт из насекомых фракционировали на колонке C_{18} методом ЖХВД и определяли антимикробную активность во всех крупных пептидных фракциях. Профиль элюции пептидов с колонки представлен на рис. 1. Фракция F13, обладающая наибольшей активностью, была повторно очищена на аналитической колонке C_{18} , как описано в разделе Методы исследования (смотри панель внутри рис. 1). Результатом этой очистки явилось обнаружение двух главных пептидных фракций (пики S1 и S2), обладавших наибольшей антимикробной активностью по отношению к тестируемым микроорганизмам.

Антибактериальная активность пептидов. Результаты определения антибактериальной активности пептидных фракций S1 и S2 и антибиотика канамицина представлены на рис. 2. Как видно на рисунке, пептиды фракций S1 и S2 в концентрации 5 мкг/мл эффективно ингибировали рост всех тестируемых микроорганизмов, причем, диаметры зон ингибирования для S1 и S2 были больше, чем зона ингибирования для канамицина, а зона для S1 была больше, чем для S2 (фото внутри гистограммы на рис. 2). Определение значений МИС показало, что из всех тестируемых видов бактерий и грибов наиболее чувствительными к ингибирующему действию пептидной фракции S1 оказались бактерии *B. cereus* (15,1 мкг/мл) и грибок *A. fumigates* (19,3 мкг/мл) (табл. 1).

Гемолитическая активность пептидов. Для определения гемолитической активности АМП фракции S1 были использованы эритроциты человека, а результаты представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, фракция S1 дозозависимо вызывала гемолиз эритроцитов, однако ее гемолитическая активность была незначительной и составляла всего ~3% при концентрации 100 мкг/мл.

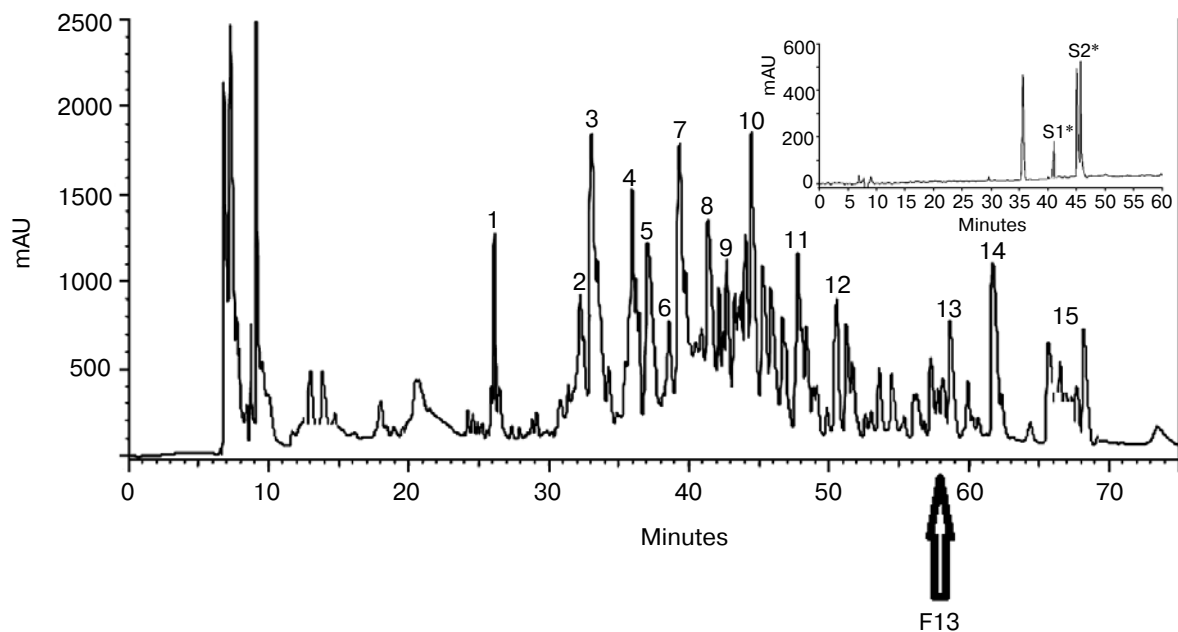


Рис. 1. Хроматография лиофилизованного пептидного экстракта из *Sphodromantis viridis* методом ЖХВД на колонке C_{18} . Фракция, обладающая наибольшей антимикробной активностью (F13, отмечена стрелкой), была подвергнута дополнительной очистке (панель внутри рисунка). Пики, содержащие пептидные фракции с наибольшей антимикробной активностью (S1 и S2) помечены *

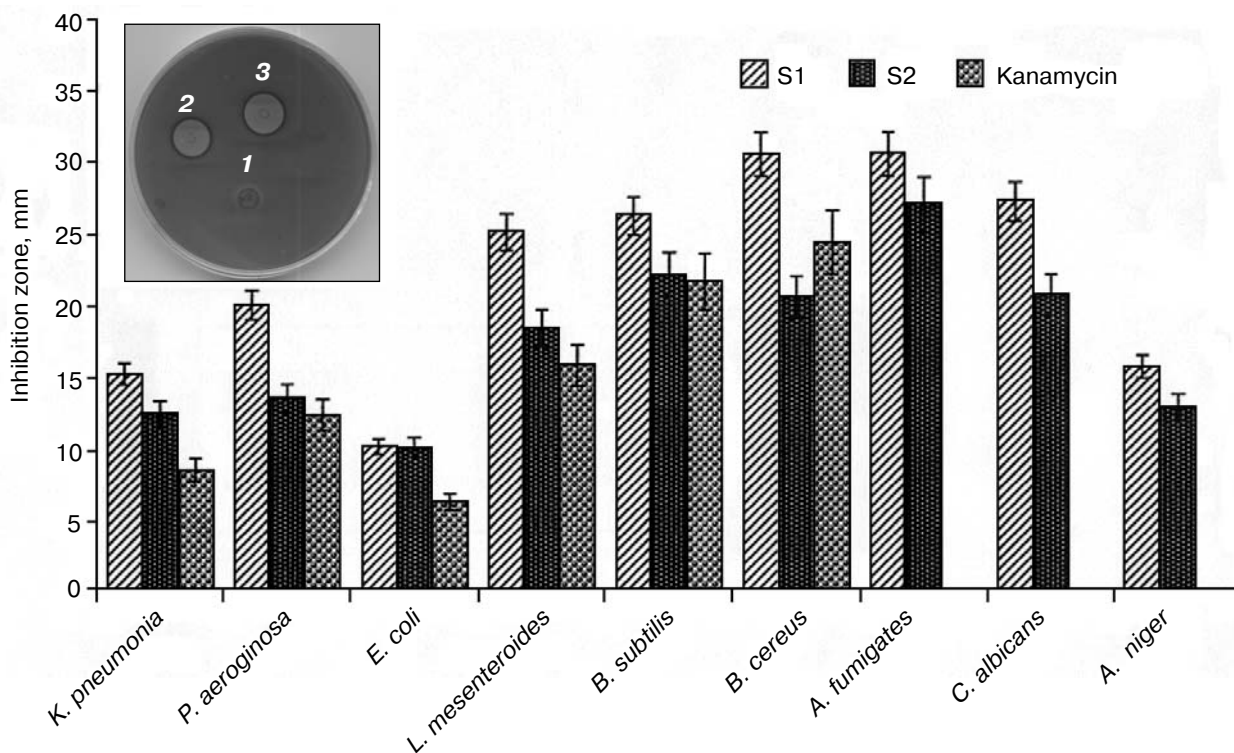


Рис. 2. Антимикробная активность очищенных пептидов фракций S1 и S2 по отношению к различным микроорганизмам. В качестве положительного контроля использовали антибиотик канамицин. Активность оценивали количественно по величине диаметра зон отсутствия клеточного роста. Внутри гистограммы приведено фото зон ингибирования с культурой *B. subtilis*. 1 – канамицин, 2 – пик S1, 3 – пик S2. Концентрация соединений – 5 мкг/мл

Таблица 1. Значения МИС и гемолитической активности для фракции S1

Вид микроорганизма	МИС, мкг/мл*
<i>Escherichia coli</i>	28,3
<i>Klebsiella pneumonia</i>	26,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,2
<i>Bacillus subtilis</i>	17,6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	19,8
<i>Bacillus cereus</i>	15,1
<i>Aspergillus niger</i>	24,6
<i>Aspergillus fumigates</i>	19,3
<i>Candida albicans</i>	20,4

Концентрация фракции S1, мкг/мл	Гемолитическая активность, %*
10	0,2
20	0,25
40	0,46
60	1,2
80	2,3
100	2,9

* Каждый эксперимент выполняли 3 раза.

Цитотоксическая активность пептидов по отношению к клеткам человека. Результаты определения цитотоксической активности АМП фракции S1 на клетках HeLa представлены на рис. 3. Из рисунка следует, что фракция S1 обладала значительной цитотоксичностью и ингибировала рост культуры HeLa дозозависимо при концентрациях пептида >40 мкг/мл. Таким образом, при использовании в минимальной концентрации, когда этот пептид полностью подавлял рост микроорганизмов, он практически не влиял бы на рост клеток человека (цитотоксический эффект при концентрации <40 мкг/мл составлял <5%).

Анализ структуры пептидов. Структура АМП фракции S1 была проанализирована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (матриксная лазер-ионизационная масс-спектрометрия с определением времени пролета ионов). Результаты анализа структуры и расчета физико-химических параметров пептида представлены в табл. 2. Сравнение этого пептида с другими известными АМП по первичной структуре показало, что полученный нами антимикробный пептид является уникальным (рис. 4, а). Он был назван мастопараном-S (от лат. *Sphodromantis*) в соответствии

с принятой номенклатурой для АМП [34]. Мастопаран-S состоит из 14 а.о.: LRLKSIVSYAKKVL. Его M_r и pI, рассчитанные по программе ExPASy MW/pI tool (<http://www.expasy.ch/tools/pi-tool.html>), были равны 1618,03 и 10,46 Да соответственно.

Структура мастопарана-S1 была сравнена со структурами 10-ти известных АМП путем анализа выровненных последовательностей с использованием пептидной базы данных (рис. 4, а). С помощью программы BLAST было установлено, что мастопаран-S имеет высокую степень подобия с мастопараном-B, некоторые свойства которого представлены в табл. 3. Полученные сравнительные данные были представлены также и в виде филогенетического древа (рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время выделено большое количество разнообразных АМП, являющихся важными компонентами врожденной антимикробной системы растений и животных [31–33]. АМП насекомых характеризуются большой вариабельностью [15, 34]. В данной работе был выделен новый пептид из тела богомола *Sphodromantis viridis* и установлено, что он очень эффективно подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий и некоторых патогенных грибков. Этот пептид, названный нами мастопаран-S, не имел аналогов среди всех известных АМП, но был высоко гомологичен мастопарану-B, пептидному токсину из яда шершня *Vespa basalis* [35]. Мастопараны – это семейство антимикробных пептидов, обна-

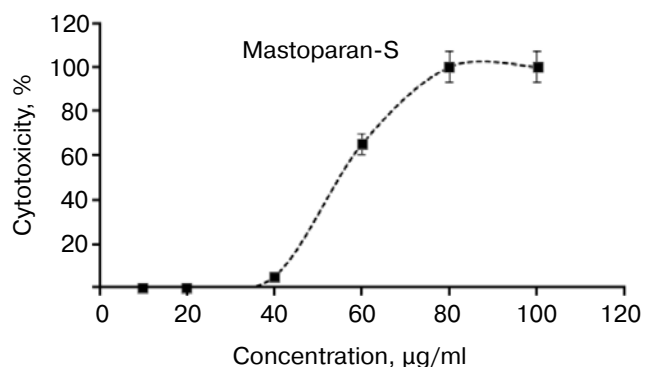


Рис. 3. Зависимость цитотоксического действия мастопарана-S на клетки HeLa от его концентрации. Клетки инкубировали в течение 24 ч с мастопараном-S в различных концентрациях и определяли их выживаемость с использованием МТТ-теста. Все данные представлены как средние значения ± s.d. по 3 независимым экспериментам

Таблица 2. Физико-химические свойства фракции S1

Фракция	Последовательность	Мг, Да	pI	Гидрофобное соотношение	Заряд нетто	Гомологичные пептиды
S1	LRLKSIVSYAKKVL	1618,03	10,46	50%	+4	не найдено

руженных у насекомых отряда перепончатокрылых Hymenoptera [36]. АМП этого семейства обладают различными биологическими активностями [37–41]. Мы установили, что мастопаран-S даже в малых дозах существенно подавлял рост различных бактерий и патогенных грибов. Однако, в отличие от других АМП этого семейства, он не проявлял значительной гемолитической активности по отношению к эритроцитам человека [42, 43]. Известно, что степень гидрофобности и величина положительного заряда явля-

ются важными факторами, отвечающими за антимикробную активность АМП [44, 45]. Положительный нетто заряд мастопарана-S был равен или превышал заряды других АМП семейства мастопаранов, а его антимикробная активность: 15,1–28,3 мкг/мл – для бактериальных и 19,3–24,6 мкг/мл – для грибковых патогенов, была выше, чем у других представителей этого семейства [46–48].

Установлено, что в своих минимальных ингибирующих концентрациях по отношению к

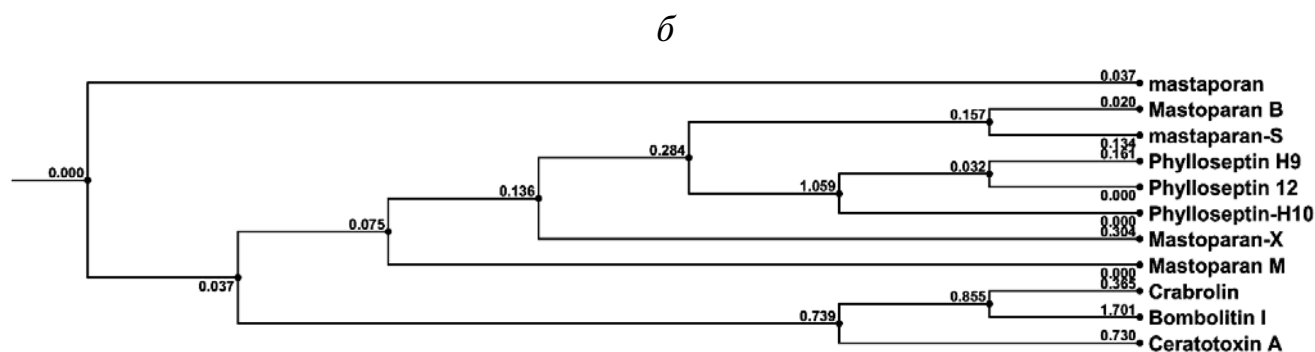


Рис. 4. *a* – Сравнение путем выравнивания последовательности мастопарана-S и других АМП из различных источников. Выравнивание последовательностей выполняли с использованием программы CLC Main Work Bench Ver.5.5; *б* – филогенетическое древо мастопарана-S, построенное путем сравнения 10 АМП из пептидной базы данных методом «объединения ближайших соседей». Справа указаны названия каждой из 10 последовательностей. Достоверность древа была оценена в 100 повторениях. Количество замен на одну аминокислотную позицию указано над каждой ветвью древа

Таблица 3. Физико-химические и биологические свойства мастопаран-С и мастопаран-В

	Мастопаран-С	Мастопаран-В
Первичная структура	LRLKSIVSYAKKVL	LKLKSIVSWAKKVL
Mr, Да	1618,03	1613,04
Фактический заряд нетто	+4	+4
Гемолитическая активность (20 мкМ), %	3	71
Антимикробная активность, мкг/мл		
<i>E. coli</i>	28,3	8
<i>K. pneumonia</i>	26,7	64

патогенам, мастопаран-С не токсичен для клеток человека (HeLa), что выгодно отличало его от большинства других АМП, токсичных по отношению к различным клеткам, например, к клеткам эпителия кишечника [49–52]. Поскольку мастопаран-С обладает высокой антимикробной активностью по отношению к различным

патогенам и нетоксичен по отношению к эритроцитам и другим клеткам человека *in vitro*, он является подходящим кандидатом для использования в качестве лекарственного противомикробного средства. Однако эффективность его антимикробной активности *in vivo* еще предстоит установить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., and Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function, *Dev. Comp. Immunol.*, **23**, 329–344.
- Irving, P., Troxler, L., and Hetru, C. (2004) Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*, *C. R. Biologies*, **327**, 557–570.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., and Amparyup, P. (2015) Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates, *Dev. Comp. Immunol.*, **48**, 324–341.
- Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B. (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions, *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 102–110.
- Yang, J., Furukawa, S., Sagisaka, A., Ishibashi, J., Tanai, K., Shono, T., and Yamakawa, M. (1999) cDNA cloning and gene expression of cecropin D, an antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **122**, 409–414.
- Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K.H., and Sonawane, A. (2014) Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects, *Tuberculosis*, **94**, 363–373.
- Pei, Z., Sun, X., Tang, Y., Zhang, D., Gao, Y., and Ma, H. (2014) Cloning, expression, and purification of a new antimicrobial peptide gene from *Musca domestica* larva, *Gene*, **549**, 41–45.
- Che, Q., Zhou, Y., Yang, H., Li, J., Xu, X., and Lai, R. (2008) A novel antimicrobial peptide from amphibian skin secretions of *Odorrana grahami*, *Peptides*, **29**, 529–535.
- Rollins-Smith, L.A. (2009) The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines, *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*, **1788**, 1593–1599.
- Chen, W., Yang, B., Zhou, H., Sun, L., Dou, J., Qian, H., Huang, W., Mei, Y., and Han, J. (2011) Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15, *Peptides*, **32**, 2497–2503.
- McQuade, R., Roxas, B., Viswanathan, V.K., and Vedantam, G. (2012) *Clostridium difficile* clinical isolates exhibit variable susceptibility and proteome alterations upon exposure to mammalian cationic antimicrobial peptides, *Anaerobe*, **18**, 614–620.
- Nan, Y.H., Lee, S.H., Kim, H.J., and Shin, S.Y. (2010) Mammalian cell toxicity and candidacidal mechanism of Arg- or Lys-containing Trp-rich model antimicrobial peptides and their d-enantiomeric peptides, *Peptides*, **31**, 1826–1831.
- Hetru, C. (1994) *Antimicrobial peptides* (Boman, H., J. Marsh, J., and Goode, J.A., eds), John Wiley & Sons, N.Y.
- Brown, M.J.F. (2010) Parasites and Insects: Aspects of Social Behavior, in *Encyclopedia of Animal Behavior* (Breed, M.D., and Moore, J., eds) Academic Press, Oxford, pp. 632–635.
- Erler, S., Lhomme, P., Rasmont, P., and Lattorff, H.M.G. (2014) Rapid evolution of antimicrobial peptide genes in an insect host-social parasite system, *Infection, Genetics and Evolution*, **23**, 129–137.
- Chesnokova, L.S., Slepnev, S.V., and Witt, S.N. (2004) The insect antimicrobial peptide, l-pyrrolicin, binds to

- and stimulates the ATPase activity of both wild-type and lidless DnaK, *FEBS Lett.*, **565**, 65–69.
17. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., and Su, Z. (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application, *Peptides*, **37**, 207–215.
 18. Dassanayake, R.S., Silva Gunawardene, Y.I.N., and Tobe, S.S. (2007) Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized α/β motifs, *Peptides*, **28**, 62–75.
 19. Ahn, H.-S., Cho, W., Kang, S.-H., Ko, S.-S., Park, M.-S., Cho, H., and Lee, K.H. (2006) Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of α helical domain of Tenecin I, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study, *Peptides*, **27**, 640–648.
 20. Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., and Cyttrynska, M. (2010) A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi, *Dev. Comp. Immunol.*, **34**, 1129–1136.
 21. Lehrer, R.I., and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence, *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 23–27.
 22. Wipfler, B., Wieland, F., DeCarlo, F., and Hornschemeyer, T. (2012) Cephalic morphology of *Hymenopus coronatus* (Insecta: Mantodea) and its phylogenetic implications, *Arthropod Struct. Dev.*, **41**, 87–100.
 23. Hurd, L.E. (2009) Mantodea: (Praying Mantids), in *Encyclopedia of Insects* (Resh, V.H., and Carde, R.T., ed.), 2nd ed., Academic Press, San Diego, pp. 597–599.
 24. Matsuda, R. (1976) The Mantodea, in *Morphology and Evolution of the Insect Abdomen* (Matsuda, R., ed.), Pergamon, pp. 187–191.
 25. Carle, T., Toh, Y., Yamawaki, Y., Watanabe, H., and Yokohari, F. (2014) The antennal sensilla of the praying mantis *Tenodera aridifolia*: A new flagellar partition based on the antennal macro-, micro- and ultrastructures, *Arthropod Struct. Dev.*, **43**, 103–116.
 26. Popkiewicz, B., and Prete, F.R. (2013) Macroscopic characteristics of the praying mantis electroretinogram, *J. Insect Physiol.*, **59**, 812–823.
 27. Koehler, R., and Predel, R. (2010) CAPA-peptides of praying mantids (Mantodea), *Peptides*, **31**, 377–383.
 28. Memarpoor-Yazdi, M., Zare-Zardini, H., and Asoodeh, A. (2013) A Novel Antimicrobial Peptide Derived from the Insect *Paederus dermatitis*, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **19**, 99–108.
 29. Zardini, H.Z., Amiri, A., Shanbedi, M., Maghrebi, M., and Baniadam, M. (2012) Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **92**, 196–202.
 30. Lupu, A.R., and Popescu, T. (2013) The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays, *Toxicol. In vitro*, **27**, 1445–1450.
 31. Simmaco, M., Mignogna, G., and Barra, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolimers*, **47**, 435–450.
 32. McGillivray, G., Ray, W.C., Bevins, C.L., Munson Jr., R.S., Bakaletz, L.O. (2007) A member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides is produced in the upper airway of the chinchilla and its mRNA expression is altered by common viral and bacterial co-pathogens of otitis media, *Mol. Immunol.*, **44**, 2446–2458.
 33. Boman, H.G. (1991) Antibacterial peptides: Key components needed in immunity, *Cell*, **65**, 205–207.
 34. Saido-Sakanaka, H., Ishibashi, J., Momotani, E., Amano, F., and Yamakawa, M. (2004) *In vitro* and *in vivo* activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin, *Peptides*, **25**, 19–27.
 35. Ho, C.L., and Hwang, L.L. (1991) Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*, *Biochem. J.*, **274**, 453–450.
 36. Nakajima, T., Yasuhara, T., Uzu, S., Wakamatsu, K., Miyazawa, T., Fukuda, K., and Tsukamoto, Y. (1985) Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties, *Peptides*, **6**, 425–430.
 37. Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Ozawa, S., Katsuta, H., Ishida, H., and Nagamatsu, S. (2001) Mastoparan stimulates GABA release from MIN6 cells: relationship between SNARE proteins and mastoparan action, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 1025–1030.
 38. Wu, T.-M., Chou, T.-C., Ding, Y.-A., and Li, M.-L. (1999) Stimulation of TNF-[agr], IL-1[bgr] and nitrite release from mouse cultured spleen cells and lavaged peritoneal cells by mastoparan-M, *Immunol. Cell. Biol.*, **77**, 476–482.
 39. Amin, R.H., Chen, H.Q., Veluthakal, R., Silver, R.B., Li, J., Li, G., and Kowluru, A. (2003) Mastoparan-induced insulin secretion from insulin-secreting β TC3 and INS-1 Cells: Evidence for its regulation by Rho subfamily of G proteins, *Endocrinology*, **144**, 4508–4518.
 40. Straub, S.G., James, R.F., Dunne, M.J., and Sharp, G.W. (1998) Glucose augmentation of mastoparan-stimulated insulin secretion in rat and human pancreatic islets, *Diabetes*, **47**, 1053–1057.
 41. Yang, M.J., Lin, W.-Y., Lu, K.-H., and Tu, W.-C. (2011) Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B, *Peptides*, **32**, 2037–2043.
 42. Mendes, M.A., de Souza, B.M., and Palma, M.S. (2005) Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure), *Toxicon*, **45**, 101–106.
 43. Ho, C.L., and Hwang, L.L. (1991) Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*, *Biochem. J.*, **274**, 453–456.
 44. Lee, S.Y., Park, N.G., and Choi, M.-U. (1998) Effects of mastoparan B and its analogs on the phospholipase D activity in L1210 cells, *FEBS Lett.*, **432**, 50–54.
 45. Russell, A.L., Kennedy, A.M., Spuches, A.M., Venugopal, D., Bhonsle, J.B., and Hicks, R.P. (2010) Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity, *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 488–497.
 46. Sample, C.J., Hudak, K.E., Barefoot, B.E., Koci, M.D., Wanyonyi, M.S., Abraham, S., Staats, H.F., and Ramsburg, E.A. (2013) A mastoparan-derived peptide has broad-spectrum antiviral activity against enveloped viruses, *Peptides*, **48**, 96–105.
 47. Leal Denis, M.F., Incicco, J.J., Espelt, M.V., Verstraeten, S.V., Pignataro, O.P., Lazarowski, E.R., and Schwarzbaum, P.J. (2013) Kinetics of extracellular ATP in mastoparan 7-activated human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)*, **1830**, 4692–4707.
 48. Zhang, P., Ray, R., Singh, B.R., and Ray, P. (2013) Mastoparan-7 rescues botulinum toxin-A poisoned neurons in a mouse spinal cord cell culture model, *Toxicon*, **76**, 37–43.
 49. Walsh, E.G., Maher, S., Devocelle, M., O'Brien, P.J., Baird, A.W., and Brayden, D.J. (2011) High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs, *Peptides*, **32**, 1764–1773.
 50. Koyama, Y., Motobu, M., Hikosaka, K., Yamada, M., Nakamura, K., Saido-Sakanaka, H., Asaoka, A., Yamakawa, M., Isobe, T., Shimura, K., Kong, C.B., Hayashidani, H., Nakai, Y., and Hirota, Y. (2006) Cytotoxicity and antigenicity of antimicrobial synthesized

- peptides derived from the beetle *Allomyrina dichotoma* defensin in mice, *Int. Immunopharmacol.*, **6**, 748–753.
51. Maher, S., and McClean, S. (2006) Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1289–1298.
52. Dawson, R.M., and Liu, C.-Q. (2011) Analogues of peptide SMAP-29 with comparable antimicrobial potency and reduced cytotoxicity, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **37**, 432–437.

IDENTIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL PEPTIDE DERIVED FROM THE INSECT *Sphodromantis viridis*

**Hadi Zare-Zardini^{1,2,3}, Asghar Taheri-Kafrani³, Mahtab Ordooei^{4*},
Leila Ebrahimi⁵, Behnaz Tolueinia⁶**

¹ *Young Researchers Club, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran*

² *Department of Pediatric, Hematology, Oncology, and Genetics Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran*

³ *Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran*

⁴ *Pediatric Endocrinologist, Yazd Diabetes Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran; fax: +98(351)822-9104, E-mail: mahtab.ordooei@gmail.com*

⁵ *Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

⁶ *Department of Biology, Faculty of Sciences, Iranshahr Branch, Payam Noor University of Sistan and Baluchestan, Iranshahr, Iran*

⁷ *Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

Received September 19, 2014

Revision received November 26, 2014

Antimicrobial peptides (AMPs) are members of the immune system that protect the host from infection. In this study, a potent and structurally novel antimicrobial peptide was isolated and characterized from *Sphodromantis viridis*. This 14-amino acid peptide was purified by reverse-phase HPLC (RP-HPLC). Tandem mass spectrometry was used for sequencing the peptide, and the results showed that the peptide belongs to the Mastoparan family. The peptide was named Mastoparan-S. Mastoparan-S demonstrated antimicrobial activities against a broad spectrum of microorganisms (Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi), and it was found to be more potent than common antibiotics such as kanamycin. Mastoparan-S showed more antimicrobial activity against the Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria and fungi. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for Mastoparan-S are significant (15.1 to 28.3 µg/ml for bacterial and 19.3 to 24.6 µg/ml for fungal pathogens). In addition, this novel peptide showed low hemolytic activity against human erythrocytes, but the hemolytic activity against human erythrocytes of this new peptide was relatively weak. The *in vitro* cytotoxicity of Mastoparan-S was also evaluated on a monolayer of normal human cells (HeLa) by the MTT assay, and the results illustrated that Mastoparan-S has significant cytotoxicity at concentrations higher than 40 µg/ml and has no cytotoxicity at the MIC. The findings of this study reveal that this novel peptide can be introduced as an appropriate candidate for treatment of topical infection.

Key words: antimicrobial peptides, cytotoxicity, *Sphodromantis viridis*, immune system, hemolytic activity