

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ НЕФРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИМИКСИНОВ

Лисняк Ю. В.

ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им.
И.И. Мечникова Национальной академии
медицинских наук Украины”

Интерес к полимиксинам, наблюдаемый в мире последнее время, вызван значительным распространением нозокомиальных инфекций, резистентных к широкому спектру современных антимикробных агентов, и отсутствием новых эффективных антибиотиков против грам-отрицательных бактерий [1-4]. По оценкам специалистов, отсутствие таких антимикробных агентов может привести к возвращению в доантибиотиковую эру [5]. В то же время большинство грам-отрицательных бактерий чувствительны к полимиксинам, и формирование резистентности к этим катионным липопептидам происходит медленно и наблюдается гораздо реже по сравнению с другими антибиотиками [6-16]. В 70-х

годах 20-го столетия от полимиксинов отказались из-за случаев нефротоксичности и появления лекарств с меньшими побочными эффектами. Однако, когда применение β -лактамов, аминогликозидов или хинолонов против чрезвычайно полирезистентных штаммов грам-отрицательных бактерий, включая *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, становится не эффективным, полимиксин В и колистин остаются последним средством лечения этих инфекций [11, 13, 15, 16].

Группа полимиксиновых пептидов включает в себя несколько химически различных соединений (полимиксины А-Е, М, S и другие [17]). В клинической практике используются лишь полимиксины В и Е (колистин) [4]. Полимиксин В (polymyxin, PmB) – это циклический липодекапептид (рис. 1), содержащий шесть остатков α, γ -диаминобутановой кислоты (Dab): MOA–Dab1–Thr2–Dab3–cycle[Dab4–Dab5–D–Phe6–Leu7–Dab8–Dab9–Thr10]. Семь аминокислот полимиксина образуют макроцикл (cycle[Dab4–Dab5–D–Phe6–Leu7–Dab8–Dab9–Thr10]), а три аминокислоты (Dab1–Thr2–Dab3) составляют линейный участок, соединяющий макроцикл с концевым остатком метил-октаноиловой кислоты (MOA). Макроцикл образован дополнительной пептидной связью между Thr¹⁰ и γ -аминогруппой остатка Dab4.

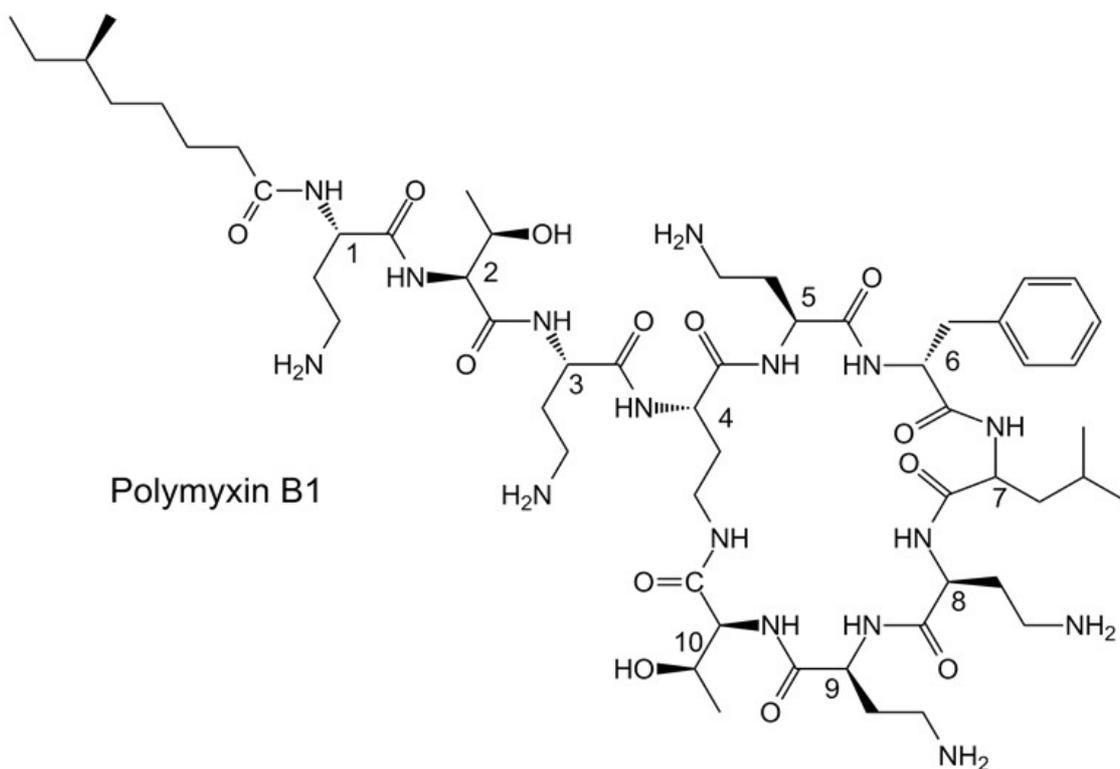


Рис. 1. Химическая структура полимиксина В₁

N-концевой остаток DabI полимиксинов N^α-ацилирован жирной кислотой, такой как 6-метилоктановая кислота (PmB₁) (рис.1), 6-метилгексановая кислота (PmB₂), октановая кислота (PmB₃) и т.д. Единственным структурным отличием колистина (colistin, polymyxin E, PmE) от полимиксина В является аминокислота D-Leu в положении 6 вместо D-Phe в полимиксине В (рис. 2). Полимиксин В и колистин содержат пять свободных аминогрупп (в составе Dab) и, соответственно, пять положительных зарядов при физиологических условиях.

“Возвращение” полимиксинов в клиническую практику стимулировало дальнейшие углубленные

исследования их токсичности. В последнее десятилетие токсичность полимиксина В и колистина была тщательно проверена современными методами (с учетом режимов правильного использования, химической чистоты и гомогенности препаратов) и оказалась не такой высокой, как считалось в прошлом [11, 13, 16, 18-19]. Тем не менее она все еще может значительно усложнять терапию, снижать ее эффективность и даже приводить к ее полному прекращению. Поэтому создание менее токсичных производных полимиксина остается очень актуальной задачей.

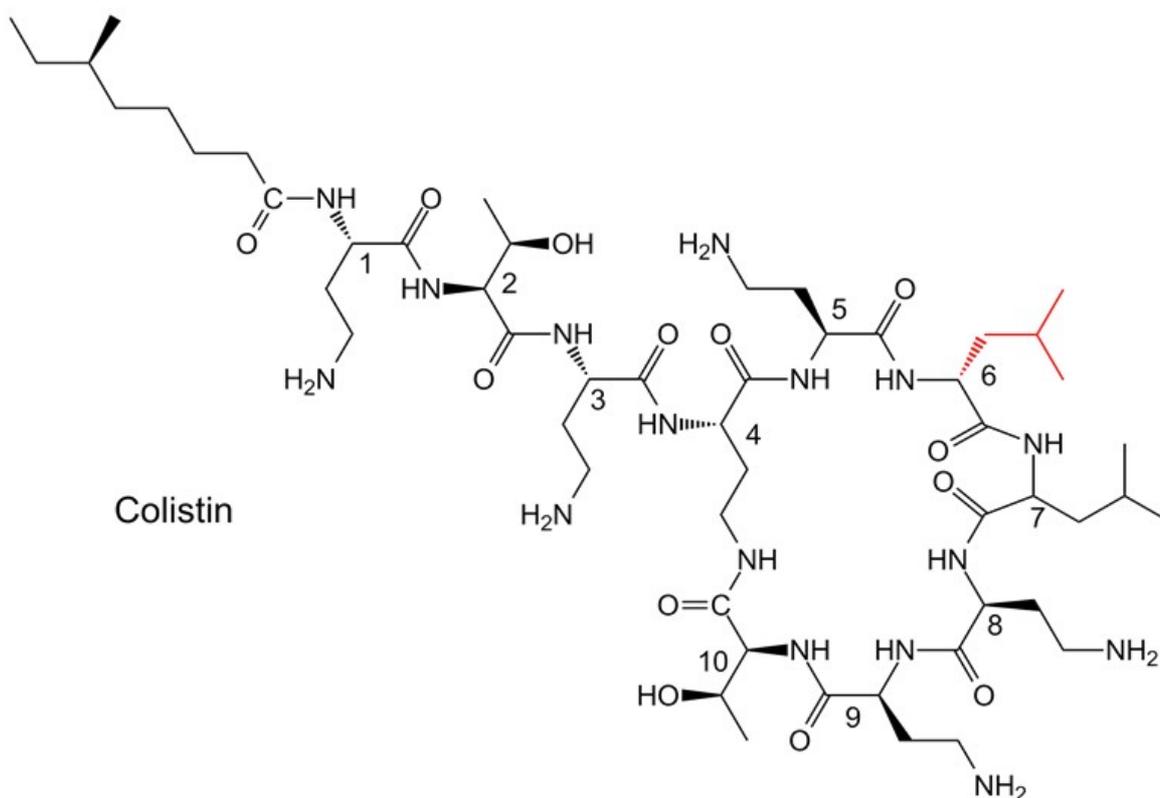


Рис. 2. Химическая структура колистина (полимиксина E₁). Отличия от структуры полимиксина В₁ выделены красным цветом.

В последнее десятилетие несколько исследовательских групп сосредоточили свои усилия на разработке менее токсичных производных полимиксина [17, 20-31]. В частности, Сакура Н. и др. создали производные полимиксина Ser2-Dap3-PmB(2-10) (рис. 3), Dap3-PmB(3-10) (рис.4) и Ser3-PmB(3-10) (рис. 5), острая токсичность которых (ЛД₅₀) примерно в 10 раз ниже, чем у полимиксина В₁, а активность в отношении синегнойной палочки сохраняется примерно на уровне полимиксина В [31]. Vaara М. и др. синтезировали менее нефротоксичные

производные полимиксина NAB7061 (рис. 6), NAB739 (рис. 7) и NAB740 (рис. 8), почечный клиренс которых был, соответственно, в 28, 53 и 378 раз выше, чем у колистина, а аффинность к мембране щеточной полоски эпителия почки крысы была в 2-3 ниже, чем у гентамицина, и в 5-6 раз ниже, чем у полимиксина В₁ [21]. Поиски нетоксичных производных полимиксина в целом ведутся эмпирически, без привлечения каких-либо молекулярных механизмов его нефротоксического действия и/или структурных моделей взаимодействия полимиксин-мишень.

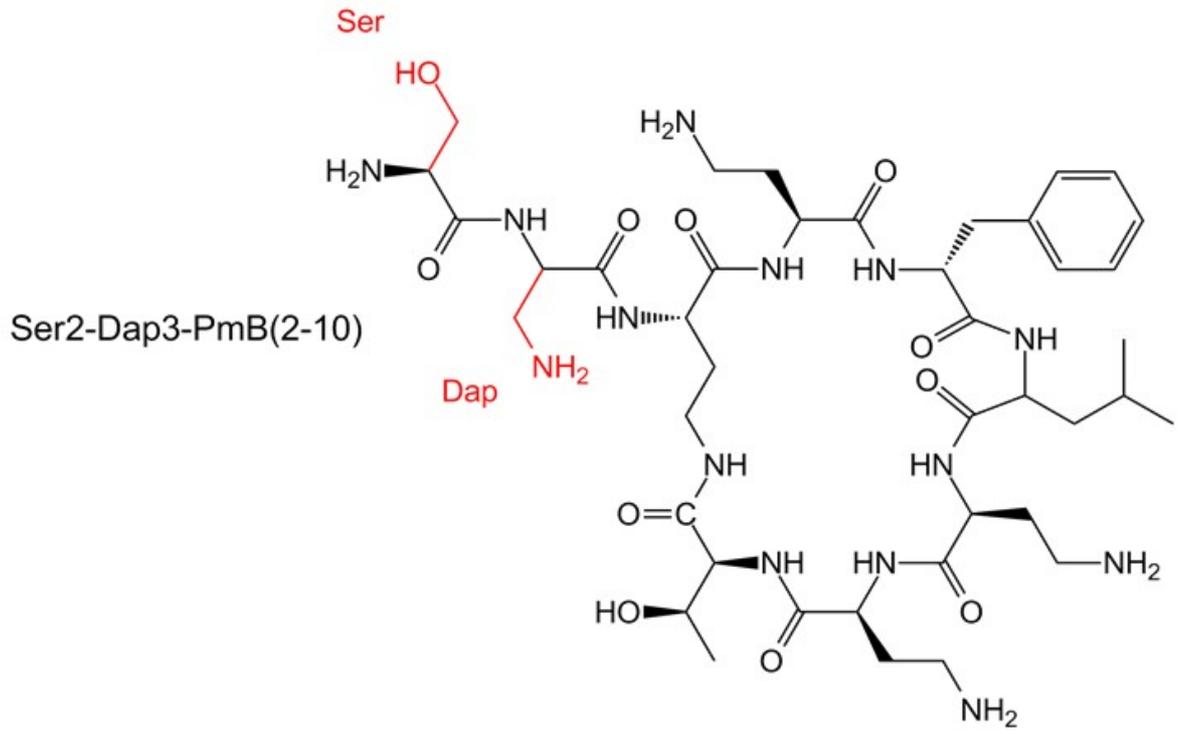


Рис. 3. Химическая структура производного полимиксина Ser2-Dap3-PmB(2-10).

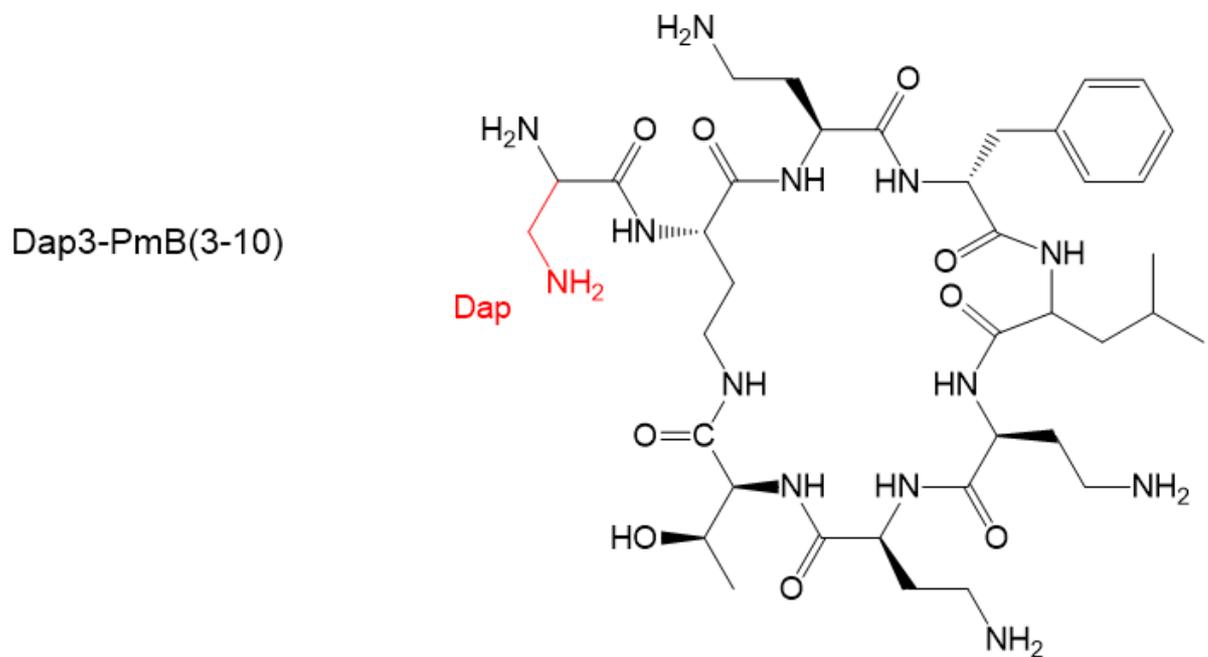


Рис. 4. Химическая структура производного полимиксина Dap3-PmB(3-10).

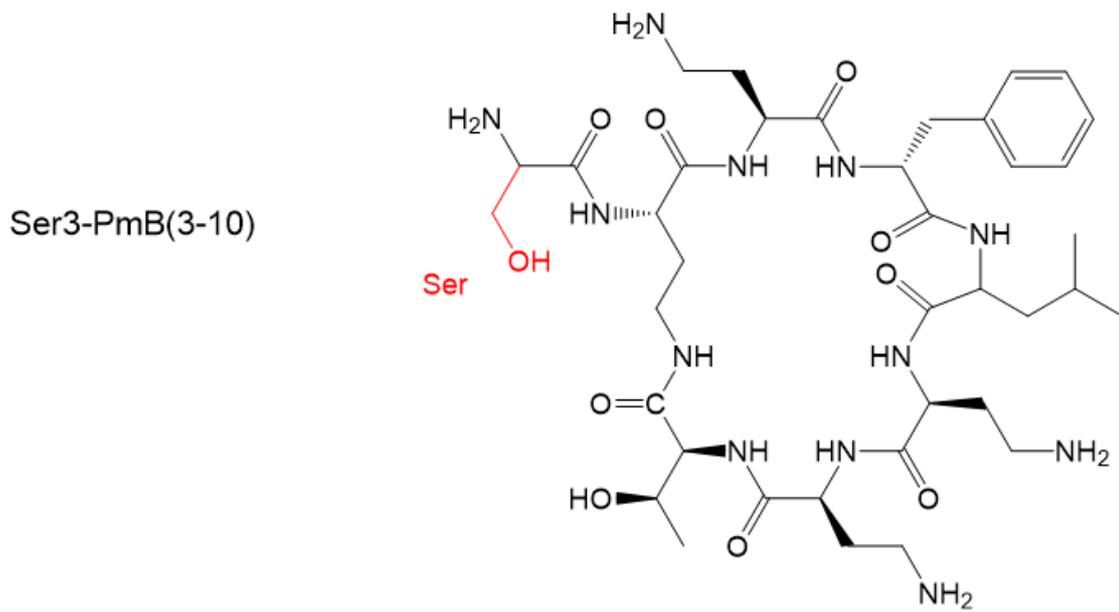


Рис. 5. Химическая структура производного полимиксина Ser3-PmB(3-10).

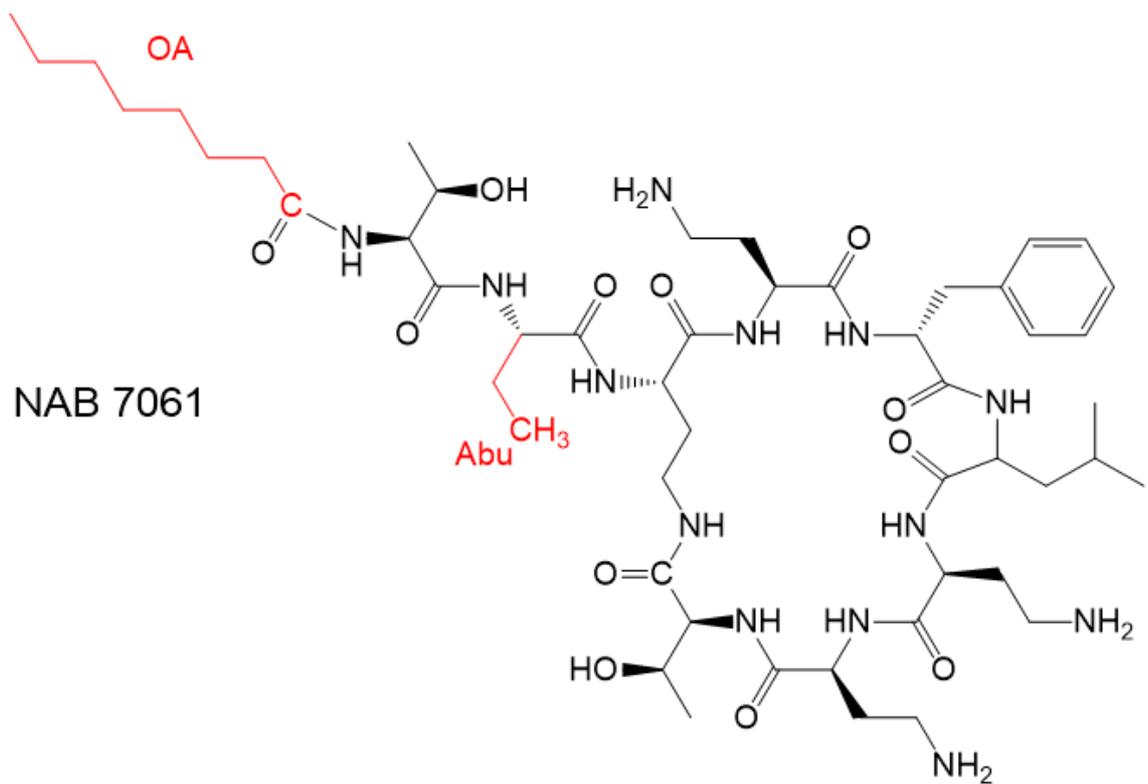


Рис. 6. Химическая структура производного полимиксина NAB 7061.

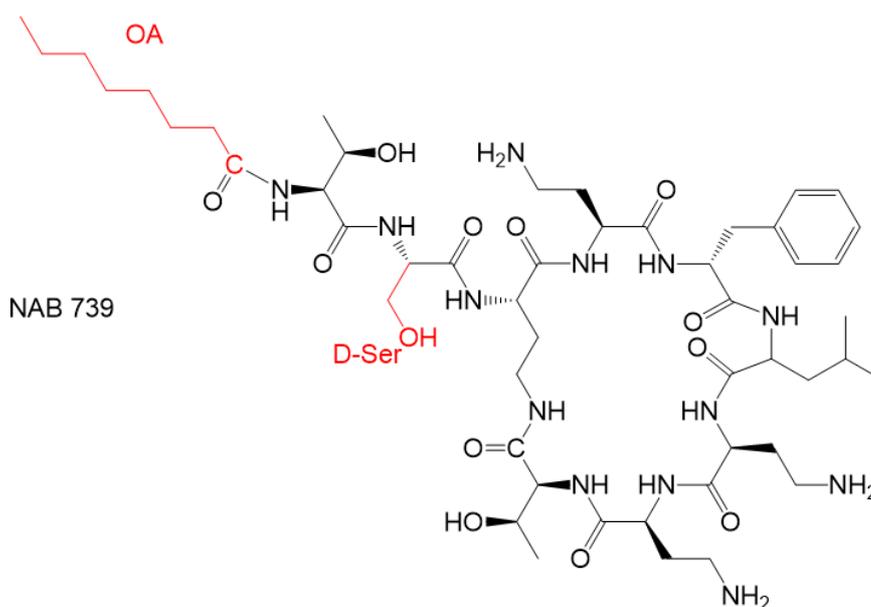


Рис. 7. Химическая структура производного полимиксина NAB 739

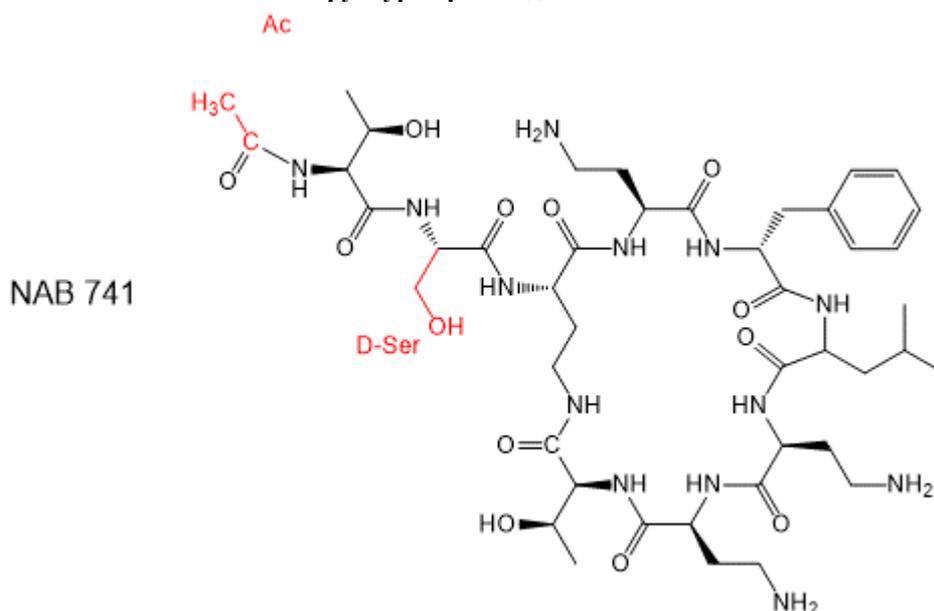


Рис. 8. Химическая структура производного полимиксина NAB 741

Предпосылкой направленного поиска таких производных является знание молекулярных механизмов нефротоксичности полимиксинов, основанное на детальных сведениях об особенностях межмолекулярных взаимодействий полимиксинов со своими мишенями нефротоксического действия.

Известно, что нефротоксический эффект полимиксинов обусловлен их аккумуляцией в клетках эпителия проксимальных канальцев почки, где они персистируют долгое время, вызывая повреждение почки: их аккумуляция в возрастающих количествах в лизосомах приводит к набуханию и, в итоге, - к разрыву последних и высвобождению полимиксинов в цитозоль, где их неспецифическое связывание вызывает острый тубулярный некроз [32-37]. При этом главным фактором аккумуляции этих антибиотиков в почке считается их взаимодействие с

мегалином (ранее его называли гликопротеином gp330) [33, 37-44], гигантским рецептором клеточной поверхности, который наиболее обильно представлен в апикальной мембране проксимальных канальцев почки [37, 43-46]. Таким образом, этот рецептор может представлять собой уникальную мишень для создания полимиксиновых антибиотиков с минимизированной нефротоксичностью. Ослабление связывания полимиксинов мегалином может стать новой превентивной мерой против полимиксин-индуцированной нефротоксичности [33, 47].

Мегалин - это транс-мембранный гликопротеин, играющий центральную роль в эндоцитозной функции клеток эпителия проксимальных канальцев почки [48]; он также участвует и в сигнальной трансдукции в этих клетках [49]. Мегалин локализуется в клатриновых кавеолах

эпителия проксимальных канальцев почки и функционирует как эндоцитозный рецептор, связывающий очень широкий спектр веществ. Лиганды, связывающиеся с мегалином (их насчитывается более 30), представлены несколькими группами соединений: протеинами, включенными в липопротеиновый метаболизм; протеазами и протеаза-ингибиторными комплексами; матриксными протеинами; внутриклеточными протеинами; факторами роста и другими группами (включая лактоферрин, риновирус, комплемент С3, гентамицин, полимиксин и др.) [36-42]. Мегалин является представителем семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDLR) (LDLR gene family) [49-53]. LDLR семейство - это класс структурно гомологичных мембранных рецепторов, состоящих из модульных структур (доменов) и представленных у млекопитающих семью

основными гликопротеинами [42, 43, 45, 48, 51]: рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR); рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR); аполипопротеин-Е рецептор 2 (ApoER2 или LRP8); множественный фактор эпидермального роста (MEGF7); LDLR-связанный протеин 1 (LRP1); LDLR-связанный протеин 1b (LRP1b) и LDLR-связанный протеин 2 (LRP2) или мегалин (Megalin) (рис. 9). Мегалин – самый крупный представитель этого семейства, его масса составляет около 600 кДа. Аминокислотная последовательность мегалина крысы насчитывает 4460 аминокислот и содержит 25-аминокислотную N-концевую сигнальную пептидную последовательность, 4400-аминокислотный внешклеточный участок, 22-аминокислотный однопроходный транс-мембранный домен и 213-аминокислотный C-концевой цитоплазматический хвост [47].

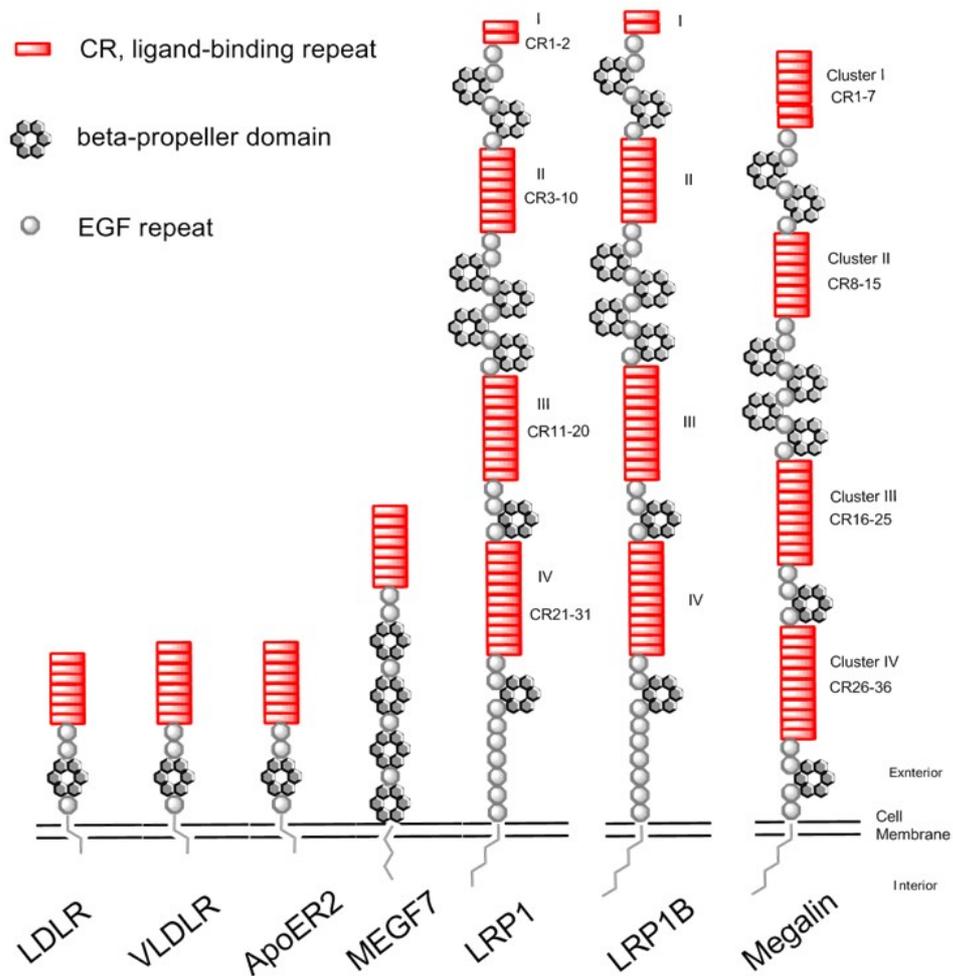


Рис. 9. Модульная доменная организация семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDLR рецепторов). Кластеры лиганд-связывающих повторов пронумерованы I-IV.

Аминокислотные последовательности мегалина человека и крысы сходны на 77% [42].

Внешклеточный участок мегалина содержит структурные модули, характерные для всех членов

LDLR-семейства (рис. 9), - обогащенные цистеином лиганд-связывающие повторы (в литературе их называют также комплемент-подобными повторами (или доменами) и обозначают CR (Complement-type Repeat) (рис. 10), повторы фактора роста (EGF-повторы) (рис. 11) и β -пропеллерные домены (рис. 12). Как показывают исследования по направленному мутагенезу, участками связывания большинства лигандов LDL-рецепторами являются лиганд-связывающие CR повторы [54, 55]. Внешнеклеточный

участок LDLR (наименьшего представителя LDLR-семейства) содержит 7 лиганд-связывающих повторов, которые образуют один кластер (рис. 9 и 13), тогда как внешнеклеточные участки LRP и мегалина содержат, соответственно, 31 и 36 лиганд-связывающих повторов, распределенных в четырех кластерах (кластеры I-IV) (рис. 9). Каждый из CR доменов состоит из примерно 40 аминокислотных остатков.

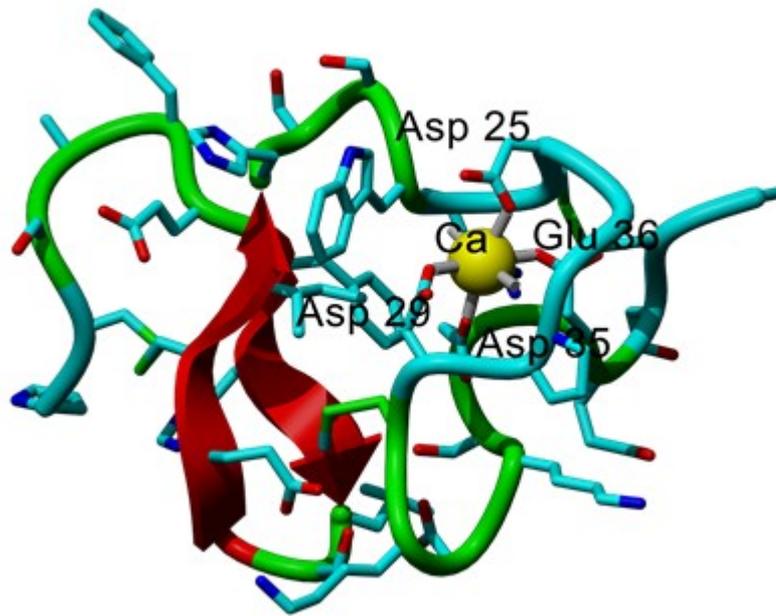


Рис. 10. Структура CR5 модуля LDLR человека [56] (PDB код 1AJJ).



Рис. 11. Структура двух EGF-доменов LDLR человека [57] (PDB код 1HJ7).

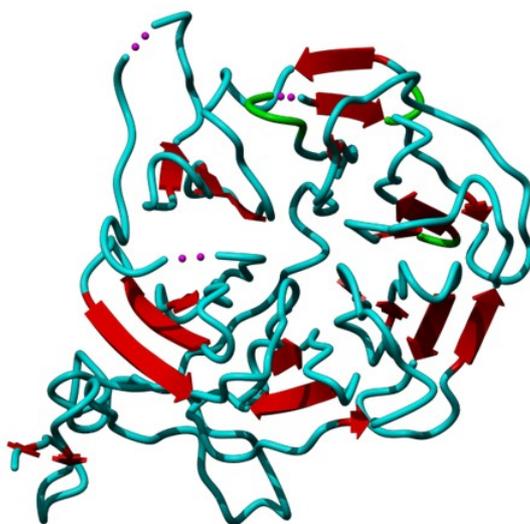


Рис. 12. Структура β -пропеллерного домена LDLR человека [58] (PDB код 1HJQ).

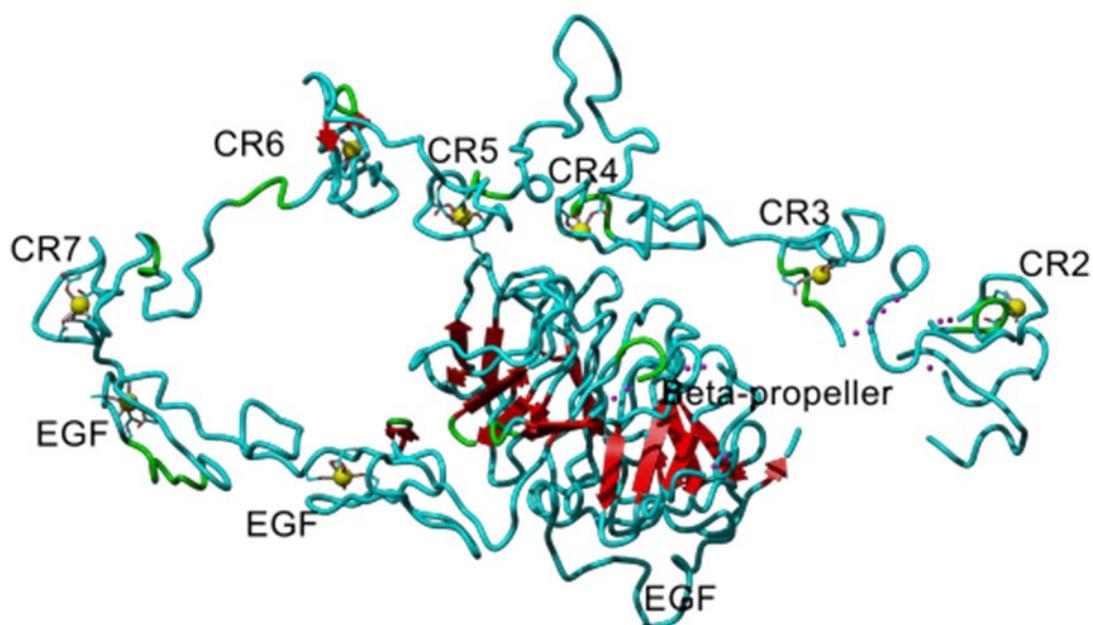


Рис. 13. Структурные модули LDLR человека [59] (PDB код 1N7D)

Первые данные о трехмерной организации CR повторов были получены N. L. Daly и др. с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР спектроскопии) для повтора CR1 [60], а затем и CR2 из LDLR человека [61] (PDB коды 1LDL и 1LDR, соответственно). Было выявлено, что эти модули содержат по 3 дисульфидных связи, а также - такие базовые элементы вторичной структуры белка, как β -шпильки и β -изгибы. Далее была определена кристаллическая структура CR5 домена из LDLR человека с разрешением 1.7 Å [56] (PDB код 1AJJ), впервые показавшая, что модуль содержит ион Ca^{2+} ,

который октаэдрически координирован отрицательно заряженными остатками аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот и карбонильными группами остова, образующими карман вокруг иона кальция (рис. 10 и 14). Позже было показано, что ион Ca^{2+} необходим для правильного сворачивания полипептидной цепи и поддержки структурной целостности модуля [62]. Структурные данные для мегалина в настоящее время довольно ограничены: известна лишь одна структура 12-го CR домена мегалина крысы и одна структура 10-го CR домена мегалина человека (а также его комплекса с

гентамицином), определенные в растворе методом ЯМР [63, 64].

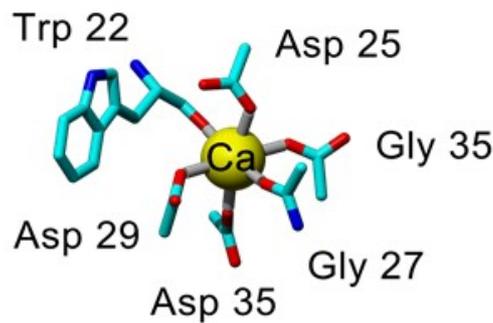


Рис. 14. Ион Ca^{2+} и координированные им отрицательно заряженные аминокислотные остатки и карбонильные группы остова CR5 домена LDLR человека [56].

Однако, известны структуры всех семи CR доменов LDLR и нескольких CR доменов LRP рецепторов, которые были получены как для отдельных модулей с помощью ЯМР спектроскопии [60, 61, 65-67] или рентгеновской кристаллографии [56, 68], так и для их пар [69, 71-75]. Все структуры этих CR доменов имеют один и тот же тип сворачивания полипептидной цепи: короткий антипараллельный β -лист, две петли, стабилизированные дисульфидными связями между цистеинами CysI-CysIII, CysIV-CysVI и связанные дисульфидным мостиком CysII-CysV (рис. 15). N-концевая петля дополнительно стабилизирована антипараллельным β -листом (см. красные широкие антипараллельные стрелки на рис.9), а C-концевая петля дополнительно стабилизирована взаимодействиями остатков, скоординированных вокруг иона Ca^{2+} (рис. 10, 14 и

15). Сходный характер сворачивания полипептидной цепи и сходная трехмерная организация CR доменов является следствием гомологии их аминокислотных последовательностей, содержащих консервативные остатки аспарагиновой (D) и глутаминовой (E) кислот и консервативное расположение шести остатков цистеина (C) (см., например, рис. 16). Преимущественными местами связывания многих важных лигандов представителями LDLR-семейства являются лиганд-связывающие повторы [38, 50, 54, 55, 73-80] (рис. 9 и 15). Как показывает анализ имеющихся структурных данных о взаимодействии членов LDLR-семейства со своими катионными лигандами [56, 64, 66, 72, 73, 75, 78, 81-84], участок

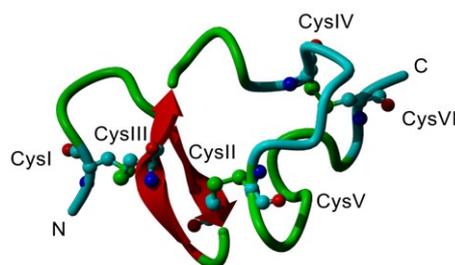


Рис. 15. Характерная трехмерная организация CR повторов. Цистеиновые остатки, образующие дисульфидные связи, показаны с помощью шаро-стержневой модели.

узнавания на рецепторе является общим (универсальным) структурным мотивом и содержит координированные ионом Ca^{2+} три кислотных (несущих отрицательный заряд) остатка аспарагиновой кислоты (так называемый DXDXD мотив) и один гидрофобный остаток (рис. 17). Участком узнавания/связывания на лиганде являются положительно заряженные остатки лизина. Связывание осуществляется в основном за счет электростатических взаимодействий между

положительно заряженными остатками лиганда и отрицательно заряженными остатками аспарагиновой кислоты, участвующих в координации иона Ca^{2+} . Это связывание лизина усиливается гидрофобным взаимодействием между ароматическим остатком CR модуля (триптофаном или фенилаланином) и алифатическим фрагментом лизина. Таким образом, ключевые характеристики участка связывания включают: (1) координацию иона кальция (серые штриховые линии), (2) солевые мостики и водородные

связи между остатками аспарагиновой кислоты CR повтора и катионными остатками лиганда (голубые штриховые линии) и (3) гидрофобные взаимодействия между ароматическим остатком лиганд-связывающего повтора и алифатическим участком лизина (коричневые штриховые линии) (рис. 17) [75].

Участок связывания полимиксина на его молекулярной мишени, мегалине, пока экспериментально не установлен, отсутствуют также и какие-либо структурные модели взаимодействия полимиксина с мегалином на атомном уровне. Однако, известно, что полимиксин В (как и гентамицин) является эффективным конкурентным ингибитором связывания мегалином крысы протеина RAP (Receptor-Associated Protein, рецептор-связанный протеин) [38]. RAP – это шаперон, который связывается с представителями семейства LDL-рецепторов и действует как универсальный антагонист их преждевременного связывания со своими лигандами в эндоплазматическом ретикулуме (ведущего к их агрегации и деградации), обеспечивая нормальную экспрессию этих рецепторов на поверхности клетки для осуществления ими эндоцитозной функции [51]. Конкурентное ингибирование предполагает как структурное сходство ингибитора и субстрата (по крайней мере, - структурное сходство их молекулярных фрагментов, которые взаимодействуют с рецептором), так и один и тот же участок связывания на рецепторе. А структурные модели взаимодействия RAP протеина с LDL-рецепторами на атомном уровне известны [72, 75, 78, 82, 83] (рис.18).

И в этих комплексах также положительно заряженные NH_3 -группы гентамицина взаимодействуют с тремя отрицательно заряженными остатками аспарагиновой кислоты домена CR10, т. е. со структурным DXDXD мотивом, обнаруженным и для других CR модулей [56, 66, 72, 73, 75, 78, 81-84]. Таким образом, есть основания предполагать, что участком связывания полимиксинов также являются структурные DXDXD мотивы лиганд-связывающих CR доменов мегалина (рис. 17), и молекулярными фрагментами полимиксинов, которые взаимодействуют с

рецептором, являются их катионные Dab группы (аналоги лизиновых остатков) (рис. 1-7).

Как показали исследования Ваара М. и др. [21] (см. выше), NAB-производные полимиксина, имеющие только три положительных заряда, расположенных в пределах макроцикла молекулы (заряженные остатки Dab5, Dab8 и Dab9) (рис. 6-8), являются не только эффективными антибактериальными агентами, но и обладают существенно более низкой нефротоксичностью, чем исходный полимиксин, содержащий пять положительных зарядов (заряженные остатки Dab1, Dab3, Dab5, Dab8 и Dab9) (рис. 1-2). При этом их почечный клиренс был в десятки и сотни раз выше, чем у колистина, а их аффинность к мембране щеточной полоски эпителия почки крысы в 5-6 раз ниже, чем у полимиксина В₁ [21], то есть производные полимиксина с ослабленным взаимодействием с мишенью имели лучшие фармакокинетические показатели. Таким образом, уровень нефротоксичности полимиксина и его производных коррелирует с особенностями их молекулярного строения и, как следствие, с особенностями их межмолекулярных взаимодействий с мегалином. Новое производное полимиксина/колистина, которая не будет узнаваться мегалином, предположительно, должна иметь существенно меньшую нефротоксичность. Каковы особенности межмолекулярных взаимодействий полимиксина с мегалином? Каковы структурные предпосылки различий во взаимодействии полимиксина и его NAB-производных с мегалином? Ответы на эти вопросы дадут продолжающиеся исследования структурно-функциональных отношений полимиксинов и их молекулярных мишеней нефротоксического действия. Недавно методами ЯМР спектроскопии и молекулярного моделирования (докинга) были определены структуры комплексов лиганд-связывающего домена CR10 мегалина человека с еще одним катионным антибиотиком, гентамицином, который также обладает побочным нефротоксическим действием [64] (рис.19).

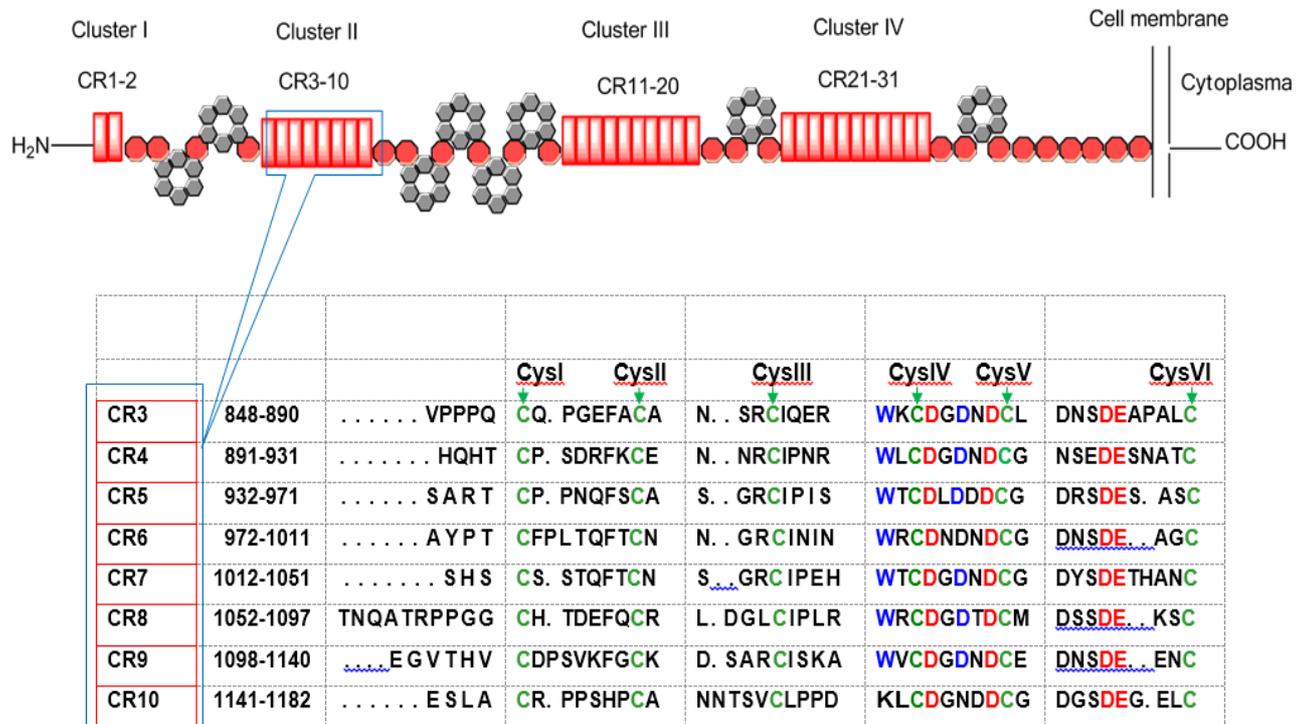


Рис. 16. Схематическое строение LRP (вверху) и выравнивание аминокислотных последовательностей доменов CR3-CR10 второго кластера LRP (внизу) [73]. Шесть консервативных остатков цистеина (выделены зеленым цветом) образуют 3 дисульфидные связи (показаны зелеными стрелками). Консервативные остатки, координирующие Ca^{2+} посредством карбоксильных групп своих боковых цепей, выделены красным, а консервативные остатки, координирующие Ca^{2+} посредством карбонильных групп остова, - синим цветом.

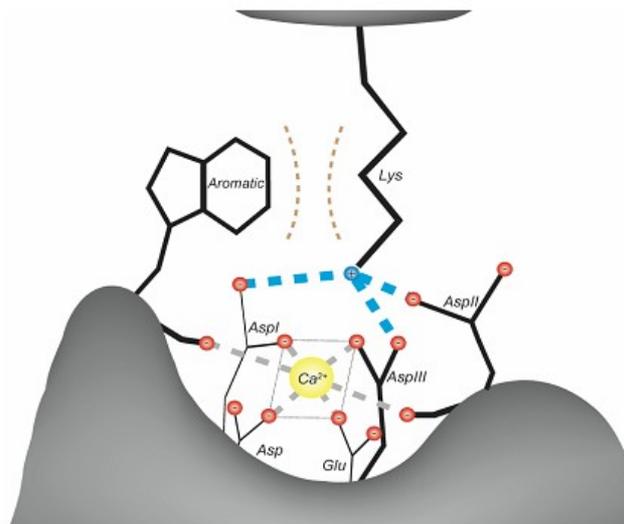


Рис. 17. Универсальный механизм связывания катионных лигандов лиганд-связывающими повторами рецепторов LDLR-семейства [75]. Положительно заряженный атом азота лизинового остатка (Lys) катионного лиганда выделен синим цветом, атомы кислорода кислотных остатков (Asp, Glu) лиганд-связывающих повторов – красным, а связанный кальций в лиганд-связывающем повторе – желтым цветом.

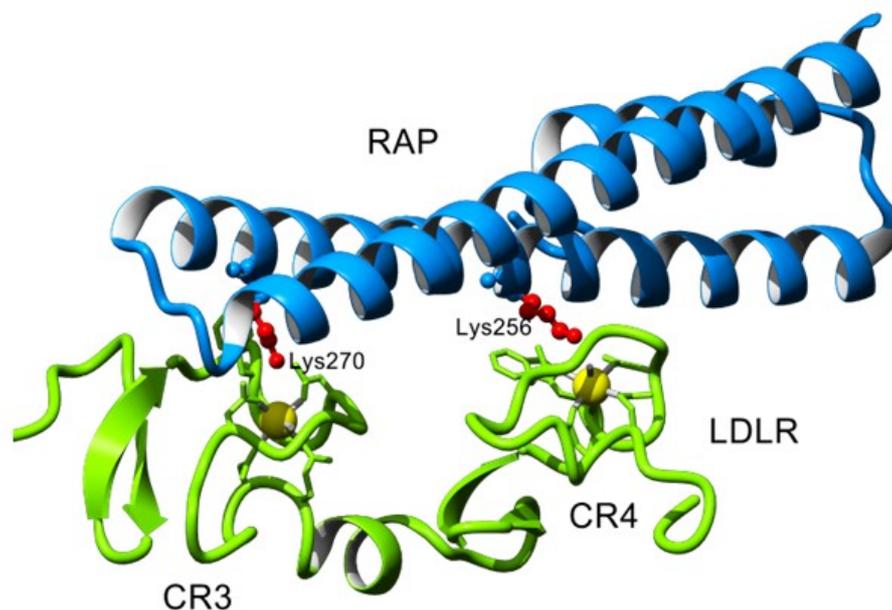


Рис. 18. Структура комплекса RAP протеина с LDL-рецептором [75]. Катионные остатки лизина выделены красным цветом. Атомы водорода не показаны.

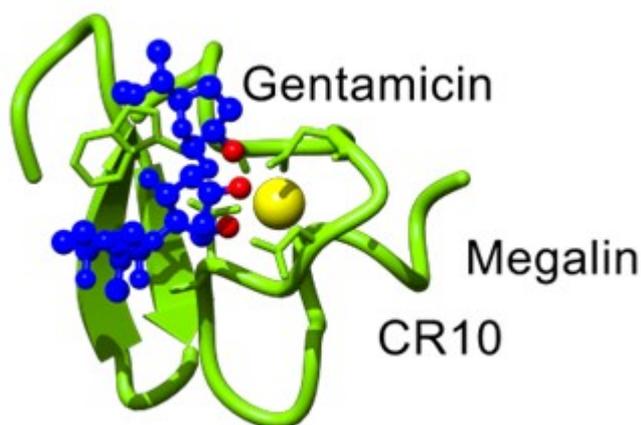


Рис. 19. Структура комплекса гентамицина с лиганд-связывающим доменом CR10 мегалина человека. Гентамицин выделен синим цветом, а его катионные аминогруппы – красным цветом. Атомы водорода не показаны.

Выводы

Мегалин является уникальной мишенью для создания полимиксиновых антибиотиков с минимизированной нефротоксичностью.

Ослабление связывания полимиксинов мегалином может стать новой превентивной мерой против полимиксин-индуцированной нефротоксичности.

References

1. Gales, A. C. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin

America, 2008–2010) [Text] / A. C. Gales, M. Castanheira, R. N. Jones, H. S. Sader // *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. – 2012. – Vol. 73, N 4. – P. 354-360.

2. Gales, A. C. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004) [Text] / A. C. Gales, R. N. Jones, H. S. Sader // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12. – P. 312-321.

2. Nicasio, A. M. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. Insight from the Society of Infectious Diseases Pharmacists [Text] / A. M.

- Nicasio, J. L. Kuti, D. P. Nicolau // *Pharmacotherapy*. – 2008. – Vol. 28, N 2. – P. 235-249.
3. McGowan, J. E. Resistance in non-fermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum [Text] / J. E. McGowan // *Am. J. Infect. Control*. – 2006. – Vol. 34, N 5 Suppl. 1. – P. S29-37.
4. Vlieghe, P. Synthetic therapeutic peptides: science and market [Text] / P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatskiy // *Drug Discovery Today*. – 2010. – Vol. 15, N 1/2. – P. 40-56.
5. Spellberg, B. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious diseases society of America [Text] / B. Spellberg, R. Gidycz, D. Gilbert, J. Bradley, H. W. Boucher, W. M. Scheld, J. G. Bartlett, J. Edwards, Jr. // *Clin. Infect. Diseases*. – 2008. – Vol. 46, N 2. – P. 155–641.
6. Yahav, B. Colistin: new lessons on an old antibiotic [Text] / D. Yahav, L. Farbman, L. Leibovici, M. Paul // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18. – P. 18–29.
7. Li, J. Colistin: re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections [Text] / J. Li, R. L. Nation, J. D. Turnidge, et al. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 6, N 9. – P. 589-601.
8. Zavascki, A. P. Polymyxin B treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review [Text] / A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 60. – P. 1206-1215.
9. Conly, J. M. Colistin: the phoenix arises [Text] / J. M. Conly, B. J. // *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 17, N 5. – P. 267-269.
10. Landman, D. Polymyxin revisited [Text] / D. Landman, C. Georgescu, A. M. Martin, J. Quale // *Clin. Microbiol. Reviews*. – 2008. – Vol. 21, N 3. – P. 449-465.
11. Arnold, T. M. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections [Text] / T. M. Arnold, G. N. Forrest, K. J. Messmer // *Am. J. Health-System Pharmacy*. – 2007. – Vol. 64, N 8. – P. 819-826.
12. Kwa, A. I. Polymyxins: a critical review of the current status including recent developments [Text] / A. L. Kwa, V. H. Tam, M. E. Falagas // *Ann. Acad. Med. Singapore*. – 2008. – Vol. 37. – P. 870-883.
13. Falagas, M. E. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections [Text] / M. E. Falagas, S. K. Kasiakou // *Clinical Infection Diseases*. – 2005. – Vol. 40. – P. 1333-1341.
14. Bergen, P. J. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / P. J. Bergen, J. Li., C. R. Rayner, R. L. Nation // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50, N 6. – P. 1953-1958.
15. Li, J. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria [Text] / J. Li, R. L. Nation, R. W. Milne, J. D. Turnidge, K. Coulthard // *Int. J. Antimicrobial Agents*. – 2005. – Vol. 25. – P. 11-25.
16. Huang, J. Intravenous colistine sulfate: a rarely used form of polymyxin E for the treatment of severe multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections [Text] / J. Huang, Y.-Q. Tang, J.-Y. Sun // *Scandinavian J. Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 42, N 4. – P. 260-265.
17. Velkov, T. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics [Text] / T. Velkov, P. E. Thompson, R. L. Nation, J. Li // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, N 5. – P. 1898–1916.
18. Falagas, M. E. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies [Text] / M. E. Falagas, S. K. Kasiakou // *Critical Care*. – 2006. – Vol. 10, N 1. – P. 1-13.
19. Ouderkerk, J. P. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infections caused by multiresistant gram-negative bacteria [Text] / J. P. Ouderkerk, J. A. Nord, G. S. Turett, J. W. Kislak // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47, N 8. – P. 2659-2662.
20. Mingeot-Leclercq, M.-P. Novel polymyxin derivatives are less cytotoxic than polymyxin B to renal proximal tubular cells [Text] / M.-P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, S. Denamur, T. Vaara, M. Vaara // *Peptides*. – 2012. – Vol. 35. – P. 248-252.
21. Vaara, M. Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents / [Text] M. Vaara, J. Fox, G. Loidl, O. Siikanen, J. Apajalahti, F. Hansen, N. Frimodt-Moller, J. Nagai, M. Takano, T. Vaara // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 52, N 9. – P. 3229-3236.
22. Vaara, M. Structure-activity studies on novel polymyxin derivatives that carry only three positive charges [Text] / M. Vaara, T. Vaara // *Peptides*. – 2010. – Vol. 31, N 12. – P. 2318-2321.
23. Vaara, M. A novel polymyxin derivative that lacks fatty acid tail and carries only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane / [Text] M. Vaara, O. Silikanen, J. Apajalahti, J. Fox, N. Frimodt-Moller, H. He, A. Poudyal, J. Li, R. L. Nation, T. Vaara // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54, N 8. – P. 3341-3246.
24. Ali, F. E. A. Pharmacokinetics of novel antimicrobial cationic peptides NAB 7061 and NAB 739 in rats following intravenous administration [Text] / F. E. A. Ali, G. Cao, A. Poudyal, T. Vaara, R. L. Nation, M. Vaara, J. Li // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 64. – P. 1061-1064.
25. Lundberg, C. V. Novel polymyxin derivatives are effective in treating experimental *Escherichia coli* peritoneal infection in mice [Text] / C. V. Lundberg, T. Vaara, N. Frimodt-Moller, M. Vaara // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65. – P. 981-985.
26. Vaara, M. Susceptibility of carbapenem-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* to the direct antimicrobial activity and to the synergistic activity of NAB7061 with rifampin and clarithromycin [Text] / M. Vaara, O. Silikanen, J. Apajalahti, N. Frimodt-Moller, T. Vaara // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65. – P. 942-945.
27. Kanazawa, K. Contribution of each amino acid residue in polymyxin B₃ to antimicrobial and

- lipopolysaccharide binding activity [Text] / K. Kanazawa, Y. Sato, K. Ohki, K. Okimura, Y. Uchida, M. Shindo, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 57, N 3. – P. 240-244.
28. Kasuma, N. Development of des-fatty acyl-polymyxin decapeptide analogs with pseudomonas aeruginosa-specific antimicrobial activity [Text] / N. Kasuma, Y. Sato, K. Ohki, K. Okimura, K. Ohnishi, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 57, N 4. – P. 332-336.
29. Okimura, K. Semi-synthesis of polymyxin B (2-10) and colistin (2-10) analogs employing the trichloroethoxycarbonyl (Troc) group for side chain protection of α,γ -diaminobutyric acid residues [Text] / K. Okimura, K. Ohki, Y. Sato, K. Ohnishi, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2007. – Vol. 55, N 12. – P. 1724-1730.
30. Sakura, N. The contribution of the N-terminal structure of polymyxin B peptides to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity [Text] / N. Sakura, T. Itoh, Y. Uchida, K. Ohki, K. Okimura, K. Chiba, Y. Sato, H. Sawanishi // *Bull. Chem. Soc. Jap.* – 2004. – 77, N 10. – P. 1915-1924.
31. Sato, Y. Novel des-fatty acyl-polymyxin B derivatives with *Pseudomonas aeruginosa*-specific antimicrobial activity [Text] / Y. Sato, M. Shindo, N. Sakura, Y. Uchida, I. Kato // *Chem. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 59, N 5. – P. 597-602.
32. Abdelraouf, K. Uptake of polymyxin B into renal cell [Text] / K. Abdelraouf, K.-T. Chang, T. Yin, M. Hu, Tam V. H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58, N 7. – P. 4200-4202.
33. Suzuki, T. Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin [Text] / T. Suzuki, H. Yamaguchi, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Yamada, K. Iseki // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, N 12. – P. 6318-6324.
34. Berg, J. R. Effect of polymyxin on mammalian urinary bladder [Text] / J. R. Berg, C. M. Spillker, S. A. Lewis // *J. Membrane Biol.* – 1996. – Vol. 154. – P. 119-130.
35. Lewis, J. R. Colistin interactions with mammalian urothelium [Text] / J. R. Lewis, S. A. Lewis // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. C913-C922.
36. Christensen, E. I. Protein reabsorption in renal proximal tubule – function and dysfunction in kidney pathophysiology [Text] / E. I. Christensen, J. Gburek // *Pediatric nephrology.* – 2004. – Vol. 19. – P. 714-721.
37. Nielsen, R. Proteinuria and events beyond the slit [Text] / R. Nielsen, E. I. Christensen // *Pediatric nephrology.* – 2010. – Vol. 25, N 5. – P. 813-822.
38. Moestrup, S. K. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs [Text] / S. K. Moestrup, S. Cui, H. Vorum, C. Bregengard, S. E. Bjorn, K. Norris, J. Gliemann, E. I. Christensen // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 96. – P. 1404-1413.
39. Farquhar, M. G. The unfolding story of megalin (gp330): now recognized as a drug receptor [Text] / M. G. Farquhar // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 96. – P. 1184.
40. Farquhar, M. G. Molecular analysis of the pathological autoimmune antigens of Heymann nephritis [Text] / M. G. Farquhar // *American J. Pathology.* – 1996. – Vol. 148, N 5. – P. 1331-1337.
41. Schmitz, C. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation [Text] / C. Schmitz, J. Hilpert, C. Jacobsen, C. Boensch, E. I. Christensen, F. C. Luft, T. E. Willnow // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 1. – P. 618-622.
42. Nagai, J. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategy for preventing nephrotoxicity [Text] / J. Nagai, M. Takano // *Drug Metab. Pharmacokin.* – 2004. – Vol. 19, N 3. – P. 159-170.
43. Verroust, P. J. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology [Text] / P. J. Verroust, H. Birn, R. Nielsen, R. Kozyraki, E. I. Christensen // *Kidney International.* – 2002. – Vol. 62. – P. 745-756.
44. Christensen, E. I. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule [Text] / E. I. Christensen, P. J. Verroust, R. Nielsen // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* – 2009. – Vol. 458, N 6. – P. 1039-1048.
45. Hussain, M. M. The mammalian low-density lipoprotein receptor family [Text] / M. M. Hussain, D. K. Strickland, A. Bakillah // *Annu. Rev. Nutr.* – 1999. – Vol. 19. – P. 141-172.
46. Lundgren, S. Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative Ca^{2+} sensing protein [Text] / S. Lundgren, T. Carling, G. Hjalm, C. Juhin et al. // *J. Histochem. Cytochem.* – 1997. – Vol. 45, N 3. – P. 383-392.
47. Nagai, J. Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs [Text] / J. Nagai, M. Takano // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* – 2010. – Vol. 6, N 9. – P. 1125-1138.
48. Saito, A. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium [Text] / A. Saito, H. Sato, N. Iino, T. Takeda // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-7.
49. Hertz, J. Expanding functions of lipoprotein receptors [Text] / J. Hertz, Y. Chen, I. Masiulis, L. Zhou // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. S287-S292.
50. Saito, A. Complete cloning and sequencing of rat "megalin", a distinctive member of low density lipoprotein receptor gene family [Text] / A. Saito, S. Pietromonaco, A. K.-C. Loo, M. G. Farquhar // *Proc. Nat. Acad. Ssi.* – 1994. – Vol. 91. – P. 9725-9729.
51. Lillis, A. P. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies [Text] / A. P. Lillis, L. B. van Duyn, J. E. Murphy-Ullrich, D. K. Strickland // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88. – P. 887-918.
52. Jeon, H. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor [Text] / H. Jeon, S. C.

- Blacklow // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – Vol. 74. – P. 535-562.
53. Gent, J. Low-density lipoprotein receptor structure and folding [Text] / J. Gent, I. Braakman // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61, N 19-20. – P. 2461-2470.
54. Russell, D. W. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins [Text] / D. W. Russell, M. S. Brown, J. L. Goldstein // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P.21682-21688.
55. Esser, V. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor [Text] / V. Esser, L. E. Limbird, M. S. Brown, J. L. Goldstein, D. W. Russell // *J. Biol. Chem.* – 1988. Vol. 263. – P. 13282-13290.
56. Fass, D. Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module [Text] / D. Fass, S. Blacklow, P. S. Kim, J. M. Berger // *Nature.* – 1997. – Vol. 388. – P. 691-693.
57. Saha, S. Solution structure of the LDL receptor EGF-AB pair: a paradigm for the assembly of tandem calcium binding EGF domains [Text] / S. Saha, J. Boyd, J. M. Werner, V. Knott, P. A. Handford, I. D. Campbell, A. K. Downing // *Structure.* – 2001. - Vol. 9, N 6. - P.451-456.
58. Jeon H. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair [Text] / H. Jeon, W. Meng, J. Takagi, M. J. Eck, T. A. Springer, S. C. Blacklow // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 8, N 6. – P.
59. Rudenko, G. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH [Text] / G. Rudenko, L. Henry, K. Henderson, K. Ichtchenko, M. S. Brown, J. L. Goldstein, J. Deisenhofer // *Science.* – 2002. – Vol. 298. – P. 2353-2358.
60. Daly, N. L. Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor [Text] / N. L. Daly, M. J. Scanlon, J. T. Djordjevic, P. A. Kroon, R. Smith // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92, N 14. – P. 6334-6338.
61. Daly, N. L. Three-dimensional structure of the second cysteine-rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor [Text] / N. L. Daly, J. T. Djordjevic, P. A. Kroon, R. Smith // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34, N 44. – P. 14474-14481.
62. Pena, F. Calcium as a crucial cofactor for low density lipoprotein receptor folding in the endoplasmic reticulum [Text] / F. Pena, A. Jansens, G. van Zadelhoff, I. Braakman // *J. Biol Chem.* -2010. – Vol. 285, N 12. – P. 8656-8664.
63. Wolf, C. A. Solution structure of the twelfth cysteine-rich ligand-binding repeat in rat megalin [Text] / C. A. Wolf, F. Dancea, M. Shi, V. Bade-Noskova, H. Ruterjans, D. Kerjaschki, C. Lucke // *J. Biomol. NMR.* – 2007. – Vol. 37. – P. 321-328.
64. Dagil, R. Gentamicin binds to the megalin receptor as a competitive inhibitor using the common ligand binding motif of complement type repeats. Insight from the NMR structure of the 10th complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin [Text] / R. Dagil, C. O'Shea, A. Nykjær, A. M. J. J. Bonvin, B. B. Kragelund // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 6. – P. 4424-4435.
65. North, C. L. Solution structure of the sixth LDL-A module of the LDL receptor [Text] / C. L. North, S. C. Blacklow // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 2564-2571.
66. Dolmer, K. NMR solution structure of complement-like repeat CR3 from the low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence for specific binding to the receptor binding domain of human alpha(2)-macroglobulin [Text] / K. Dolmer, W. Huang, P. G. Gettins // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 3264-3269.
67. Huang, W. NMR solution structure of complement-like repeat CR8 from the low density lipoprotein receptor-related protein // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 14130-14136.
68. Simonovic, M. Calcium coordination and pH dependence of the calcium affinity of ligand-binding repeat CR7 from LRP. Comparison with related domains from the LRP and LDL receptor [Text] / *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40. – P. 15127-15134.
69. Kurniawan, N. D. NMR structure of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the human low-density lipoprotein receptor [Text] / N. D. Kurniawan, A. R. Atkins, S. Bieri, C. J. Brown, I. M. Brereton, P. A. Kroon, R. Smith // *Protein Sci.* – 2000. – Vol. 9. – P. 1282-1293.
70. North, C. L. Structure independence of ligand-binding modules five and six of the LDL receptor [Text] / C. L. North, S. C. Blacklow // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 3926-3935.
71. Guttman, M. The structure, dynamics, and binding of the LA45 module pair of the low-density lipoprotein receptor suggest an important role for LA4 in ligand release [text] / M. Guttman, E. A. Komives // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, N 51. – P. 11001-11008.
72. Jensen, G. A. Binding site structure of one LRP-RAP complex: implications for a common ligand-receptor binding motif [Text] / G. A. Jensen, O. M. Andersen, A. M. J. J. Bonvin, I. Bjerrum-Bohr, M. Etzerodt, H. C. Thogersen, C. O'Shea, F. M. Poulsen, B. B. Kragelund // *J. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 362, N 4. – P. 700-716.
73. Andersen, O. M. Analysis of a two-domain binding site for the urokinase-type plasminogen activator inhibitor-1 complex in low-density-lipoprotein-receptor-related protein [Text] / O. M. Andersen, H. H. Petersen, C. Jacobsen, S. K. Moestrup, M. Etzeroot, P. A. Andreasen, H. C. Thogersen // *Biochem J.* – 2001. – Vol. 357. – P. 289-296.
74. Andersen, O. M. Ca²⁺ binding to complement-type repeat domains 5 and 6 from low-density lipoprotein receptor-related protein [Text] / O. M. Andersen, H. Vorum, H. C. Thogersen // *BMC Biochemistry.* – 2003. – Vol. 4. – P. 1-7.
75. Fisher, C. Structure of an LDLR-RAP complex reveals a general mode for ligand recognition by lipoprotein receptors [Text] / C. Fisher, N. Beglova, S. C.

Blacklow // *Molecular Cell*. – 2006. – Vol. 22. – P. 277–283.

76. Orlando, R. A. Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as a site for receptor-ligand interactions [Text] / R. A. Orlando, M. Exner, R.-P. Czekay, H. Yamazaki, A. Saito, R. Ulrich, D. Kerjaschki, M. G. Farquhar // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 2368-2373.

77. Neels, J. G. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties [Text] / J. G. Neels, B. M. M. van den Berg, A. Lookene, G. Olivecrona, H. Pannekoek, A.-J. van Zonneveld // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 44. – P. 31305-31311.

78. Lazic, A. Dissection of RAP-LRP interactions: binding of RAP and Rap fragments to complement-like repeats 7 and 8 from ligand binding cluster II LRP [Text] / A. Lazic, K. Dolmer, D. K. Strickland, P. G. W. Gettins // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – Vol. 450, N 2. – P. 167-175.

79. Russell, D. W. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins [Text] / D. W. Russell, M. S. Brown, J. L. Goldstein // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 21682-21688.

80. Kurasawa, J. H. Mapping the binding region on the low density lipoprotein receptor for blood coagulation factor VIII [Text] / J. H. Kurasawa, S. A. Shestopal, E. Karnaukhova, E. B. Struble, T. K. Lee // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 30. – P. 22033-22041.

81. Dolmer, K. Three complement-like repeats compose the complete α_2 -macroglobulin binding site in the second ligand binding cluster of the low density lipoprotein receptor-related protein [Text] / K. Dolmer, P. G. W. Gettins // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, N 45. – P. 34189-34196.

82. Dolmer, K. Quantitative dissection of the binding contributions of ligand lysines of the receptor-associated protein (RAP) to low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) [Text] / K. Dolmer, A. Campos, P.G.W. Gettins // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 33. – P. 24081-24090.

83. Gettins, P. G. W. A proximal pairs of positive charges provides the dominant ligand-binding contribution to complement-like domains from the LRP (low-density receptor-related protein) [Text] / P. G. W. Gettins, K. Dolmer // *Biochem.J.* – 2012. – Vol. 443. – P. 65-73.

84. van den Biggelaar, M. A single lysine of the two-lysine recognition motif of the D3 domain of receptor-associated protein is sufficient to mediate endocytosis by low-density lipoprotein receptor-related protein [Text] / M. van den Biggelaar, E. Sellink, J. W. T. M. K. Gebbinck, K. Mertens, A. B. Meijer // *The Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2011. – Vol. 43, N 3. – P. 431-440.

UDC 577.32

MOLECULAR TARGETS OF NEPHROTOXIC ACTION OF POLYMYXINS

Lisnyak Yu. V.

The rapid spread of multidrug-resistant gram-negative bacterial strains has necessitated the search for the more efficient antimicrobial agents and prompted a renewed interest in polymyxins which have been invaluable for the therapy of serious nosocomial pathogens but withdrawn due to their nephrotoxicity. Polymyxins are nonribosomal cyclic lipopeptides isolated from *Paenibacillus polymyxa*. Several distinct groups of polymyxins have been structurally identified, each group is characterized by the unique amino acid sequence and the chemical structure of the fatty acyl group. But, only two polymyxins, polymyxin B and colistin (polymyxin E), have been clinically used. The revival of polymyxins into clinical practice has stimulated further thorough investigations of their toxicity. During the last decade, the toxicity of polymyxin B and colistin has been thoroughly studied (taking into account the chemical purity, homogeneity, dosing regimens and other factors) and appeared to be not as high as reported earlier. Nevertheless, it still may substantially complicate therapy and even result in its stoppage. Thus, the development of less toxic polymyxin derivatives remains to be a topical problem. Understanding of molecular mechanism(s) of polymyxin's toxicity based on detailed knowledge of the peculiarities of their intermolecular interactions with the targets of their toxic action is a prerequisite of a purposeful search for such polymyxin-based compounds. Nephrotoxic effect of polymyxins is determined by their accumulation in the epithelial cells of the kidney proximal tubules. The main factor of the accumulation of these antibiotics considered to be their interaction with megalin, the giant receptor of cell surface, which is the most abundant in the apical membrane of renal proximal tubules. Megalin is a representative of the low-density lipoprotein receptor (LDL-receptor) family which contains several structurally homologous receptors. Megalin is the largest member of the family; molecular weight of rat megalin is about 600 kDa. Its amino acid sequence involves about 4660 amino acid residues and is identical to one of human megalin by approximately 77%. All members of this receptor family have a modular structure, in particular, they contain clusters of two or more cysteine-rich complement-type repeats (CR modules) which are the binding sites of the most ligands of LDL-receptors. Each of CR domains consists of approximately 40 amino acid residues. The binding site of the cationic ligands on the LDL-receptors shown to contain a common structure motif, so called DXDXD motif, which consists of three negatively charged aspartic acid residues coordinated by Ca^{2+} ion and a hydrophobic residue. As a rule, the cationic part of a ligand is represented by lysine residue. The binding occurs mainly due to electrostatic interactions between positively charged lysine residue and negatively charged residues of aspartic acid. The binding is enhanced by hydrophobic interactions between aromatic residue of CR module and aliphatic region of lysine. Structural data on megalin are rather limited now: there is known a structure of CR12

domain of rat megalin and a structure of CR10 domain of human megalin (as well as its complexes with gentamicin) both solved by NMR in solution. Polymyxin binding site on the megalin is not yet determined experimentally, there are absent as well any structural models at atomic level for polymyxin interaction with megalin. However, based on an analysis of available data on the structure of ligand-target complexes for the members of LDL-receptors family, there are reasons to suppose that polymyxin's molecular fragment which binds to megalin is represented by cationic residues of diamino-butanoic acid (an analogue of lysine), and the

structural DXDXD motifs of CR domains of megalin compose binding sites for polymyxin as well. In the review, the available data on the structure and three-dimensional organization of megalin and other members of LDL-receptors family are represented; the peculiarities of their ligand-target intermolecular interactions are considered. It is concluded that the weakening of polymyxins binding with megalin may be an effective preventive measure against polymyxin-induced nephrotoxicity.

Key words: polymyxins, megalin, nephrotoxicity, molecular target, LDL-receptors.