

УДК 577.112, 577.181

Строение и биологические функции β -шпилечных антимикробных пептидов

П. В. Пантелеев, И. А. Болосов, С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова*

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

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 12.11.2014

РЕФЕРАТ В настоящее время сформировано представление об антимикробных пептидах (АМП) как о молекулярных факторах системы врожденного иммунитета, обеспечивающих универсальный и эволюционно древний способ защиты человека, животных и высших растений от инфекции. Обзор посвящен рассмотрению особенностей строения, биосинтеза и биологических функций АМП, пространственная структура которых представляет собой β -шпильку. Представители данного семейства АМП относятся к числу наиболее активных молекул животного происхождения с антибиотическими свойствами. Благодаря широкому спектру активности и устойчивости к факторам внутренней среды организма природные β -шпилечные АМП и их аналоги могут стать основой для создания лекарственных препаратов, способных найти применение в различных областях медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, β -шпилечная структура.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; ЛПС – липополисахарид; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide) – экспрессирующийся в печени антимикробный пептид-1, гепцидин; MRSA – метициллин-устойчивый золотистый стафилококк.

ВВЕДЕНИЕ

Система врожденного иммунитета обеспечивает немедленную защиту организма в ответ на внедрение патогена благодаря большому числу молекулярных факторов, реализующих рекогносцировочные и эффекторные механизмы ее функционирования, к которым относятся молекулы клеточной адгезии, паттернраспознающие, в том числе Toll-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы, пептидогликан-распознающие белки, лектины, пентраксины, компоненты системы комплемента, липополисахаридсвязывающий белок, лизоцим, лактоферрин, цитокины, хемокины и многие другие, регулирующие инициацию и течение защитных реакций [1]. Наряду с перечисленными белковыми факторами врожденного иммунитета особую роль в защите организма от инфекции играют эндогенные антимикробные пептиды (АМП), продуцируемые позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями. АМП в основном синтезируются на рибосомах в составе белков-предшественников и в процессе созревания могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Зрелые АМП, содержащие от нескольких единиц до нескольких десятков аминокислотных остатков, обладают, как правило, основными свойствами благодаря высокому содержанию ар-

гинина и лизина [2]. Изначально АМП, выделенные из гемолимфы насекомых, кожных секретов амфибий и фагоцитов млекопитающих, обратили на себя внимание благодаря способности подавлять рост различных микроорганизмов. По мере обнаружения все новых и новых АМП стало очевидным, что это универсальные и эволюционно древние элементы системы врожденного иммунитета. Позднее, наряду с фактами, свидетельствующими о прямом эффекторном (антибиотическом) действии, была обнаружена способность многих АМП проявлять регуляторную (иммуномодулирующую) функцию и участвовать в функционировании не только врожденного, но и приобретенного иммунитета [3]. В связи с этим в литературе сосуществуют два термина: «антимикробные пептиды» («antimicrobial peptides») и «защитные пептиды» («host defense peptides»), последний из которых чаще применяют в отношении пептидов, координирующих работу иммунных процессов организма-хозяина.

Приобретенный иммунитет в процессе эволюции возник лишь с появлением челюстных рыб около 500 млн лет назад. Так как беспозвоночные организмы лишены приобретенного иммунитета, при контакте с патогенами они могут полагаться только на систему врожденного ответа. Стоит отметить, что к беспозво-

ночным относится подавляющее число (более 98%) видов животных на Земле, причем жизненный цикл некоторых представителей превышает 100 лет [4]. Учитывая «эволюционный успех» беспозвоночных, можно говорить о высокой эффективности сформировавшихся у них систем защиты. В многоклеточных организмах АМП могут распределяться системно, например, поступая в гемолимфу насекомых или экспрессируясь в иммунных клетках крови позвоночных, либо локализоваться в эпителиальных тканях, которые чаще других контактируют с патогенами (слизистые оболочки, кожа). Широкий спектр антибиотического действия АМП, в том числе в отношении резистентных штаммов патогенов, относительно малая вероятность селекции устойчивых к АМП возбудителей инфекционных заболеваний, быстрое и эффективное уничтожение клеток-мишеней позволяют рассматривать эти пептидные соединения как основу для разработки лекарственных средств нового поколения [5].

К настоящему времени выделено и охарактеризовано около 4000 природных АМП [6]. Основой для классификации АМП могут служить такие физико-химические и биологические характеристики, как источник происхождения, размер молекулы, первичная структура, тип биологической активности, механизм действия и т.д., однако наиболее удобным критерием оказалась пространственная структура пептидов. Впервые классификация на основе особенностей пространственной структуры АМП была предложена в 1995 году [7]. Большое значение в этой системе придается наличию дисульфидных связей в молекуле пептида и их числу. Наибольшее распространение получила классификация, в соответствии с которой все АМП подразделяются на три структурных класса. К первому относят пептиды, обладающие α -спиральной конформацией. Во второй класс объединяют линейные пептиды, не образующие α -спиралей и отличающиеся повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков (Gly, Pro, His, Trp). Третий класс составляют пептиды, в структуре которых наблюдаются антипараллельные β -тяжи. Среди АМП последнего класса встречаются молекулы со структурой β -складчатого листа, состоящего из трех тяжей (большинство дефенсинов позвоночных), двух тяжей, образующих β -шпильчатую структуру, или со смешанной структурой, включающей в себя как β -листы, так и α -спиралы. Данный обзор сфокусирован на β -шпильчатых антимикробных пептидах животного происхождения, стабилизированных дисульфидными связями. На *рис. 1* представлены данные о мультифункциональных свойствах основных представителей семейства β -шпильчатых АМП, а также их первичные и пространственные структуры.

Молекулярный механизм антибиотического действия АМП в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны. Предложены три основные модели, описывающие механизмы нарушения барьерных функций клеточной мембраны в присутствии АМП. Согласно первой из них, названной моделью «бочки из клепок» («barrel-stave» model) [8], молекулы АМП, обладающие, как правило, суммарным положительным зарядом, гидрофобностью и амфифильностью, внедряются в мембрану и формируют олигомерные ионные каналы или поры, внутренняя поверхность которых образована гидрофильными аминокислотными остатками. Данная модель была предложена, в частности, для β -шпильчатого АМП тахиплезина из гемоцитов подковообразного краба [9]. Учитывая высокое содержание основных аминокислотных остатков в структуре большинства АМП, образующиеся каналы должны обладать положительно заряженной внутренней поверхностью и быть анион-селективными, что чаще всего не наблюдается. Однако каналы, формируемые β -шпильчатым АМП тахиплезином, действительно обладают выраженной селективностью по отношению к анионам. Вторая модель, основанная на описании формирования тороидальной поры («toroidal pore» model), применима в отношении более широкого круга АМП [10]. Главное отличие этой модели от предыдущей заключается в том, что внутренняя гидрофильная поверхность каналов включает не только катионные участки АМП, но и анионные головки фосфолипидов. Преимуществом этой модели является более высокая стабильность комплекса за счет электростатических взаимодействий АМП и липидов. Третья модель, названная ковровой («carpet» model), основана на детергентоподобном действии АМП при высоких концентрациях пептидов [11]. С повышением концентрации АМП мембрана постепенно утрачивает стабильность, в ней появляются тороидальные разрывы, образуются липид-пептидные мицеллы и, в конечном итоге, происходит лизис клетки. Границы применения описанных моделей носят условный характер, а конечный результат действия АМП по любому из приведенных механизмов – нарушение барьерной функции клеточной мембраны. Избирательность действия АМП объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микробов и клеток организма-хозяина [12].

Наряду с обширными данными о мембранотропных свойствах АМП появляется все больше сведений о внутриклеточных мишенях их действия. В частности, показано, что тахиплезин связывается с ДНК в области малой бороздки [13]. Связываясь

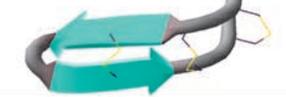
Название	Источник	Активность	Первичная структура	Пространственная структура	Ссылка
Тигеринин-1	<i>Rana tigerina</i> (кожный секрет лягушки)	Б, М	FCTMIPIPRCY*	-	[37]
Бактенецин	<i>Bos taurus</i> (нейтрофилы быка)	Б, В	RLCRIVVIRVCR	-	[34]
Танатин	<i>Podisus maculiventris</i> (гемолимфа клопа)	Б, Г	GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM		[40, 42]
Ареницин-2	<i>Arenicola marina</i> (целомоциты пескожила)	Б, Г, Ц	RWCVYAYVRIRGVLVRYRCW		[50, 54]
Лактоферрицин В	<i>Bos taurus taurus</i> (молоко коровы)	Б, Г, В, О, Л, И	FKCRRWQWRMKKLGAPSIITCVRRAF		[22, 23]
Тахиплезин-1	<i>Tachyplesus tridentatus</i> (гемоциты мечехвоста)	Б, Г, В, О, Ц, Л, И	KWCFRVCYRGICYRRCR*		[62, 63]
Гомезин	<i>Acanthoscurria gomesiana</i> (гемоциты паука)	Б, Г, П, О, Ц	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR*		[72, 73]
Андроктонин	<i>Androctonus australis</i> (гемолимфа скорпиона)	Б, Г, Т	RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY		[76, 77]
Протегрин-1	<i>Sus scrofa</i> (лейкоциты свиньи)	Б, Г, В, О, Ц	RGGRLCYCRRRFCVCVGR*		[79, 80]
θ-дефенсин-1	<i>Macaca mulatta</i> (лейкоциты макаки-резус)	Б, Г, В, Л, И	GFCRCLCRRGVCRICCTR		[89, 93]
Гепцидин	<i>Homo sapiens</i> (гепатоциты человека)	Б, М	DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT		[100, 101, 103]

Рис. 1. Строение и биологическая активность β-шпильчатых антимикробных пептидов. Дисульфидные связи отмечены тонкими линиями. Жирной линией обозначена пептидная связь, замыкающая в цикл структуру θ-дефенсина. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование, Z – N-концевая пироглутаминовая кислота. Обозначение биологических функций: Б – антибактериальная активность, Г – противогрибковая активность, В – противовирусная активность, П – антипаразитарная активность, О – противоопухолевая активность, Ц – цитотоксическая или гемолитическая активность, Л – способность связывать эндо- и экзотоксины, И – иммуномодулирующая активность, Т – нейротоксическая активность, М – регуляция метаболизма

с ДНК, АМП могут подавлять процессы репликации и транскрипции. Наряду с цитоплазматической мембраной и внутриклеточными мишенями некоторые АМП обладают сродством к компонентам клеточной

стенки бактерий и грибов. Высказывается предположение, что антибиотическое действие этих АМП реализуется путем ингибирования биосинтеза клеточной стенки. Многие АМП, обладающие противо-

грибковой активностью (в том числе тахиплезин), способны связываться с хитином [14].

Помимо инактивации микроорганизмов, в том числе бактерий, грибов, простейших, вирусов, АМП как молекулярные факторы системы врожденного иммунитета участвуют в регуляции иммунных реакций организма. В частности, АМП обладают опсонизирующей микробы активностью [15], проявляют хемотаксическую активность в отношении макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [16], вызывают дегрануляцию тучных клеток [17], модулируют дифференцировку дендритных клеток [18], участвуют в регуляции ангиогенеза [19], обладают кортикостатической активностью [20]. Конкретные примеры участия β -спилечных АМП в регуляции иммунных реакций приведены ниже.

Далее рассмотрены структурно-функциональные характеристики основных представителей семейства β -спилечных АМП, разбитого на четыре подгруппы в зависимости от числа дисульфидных связей.

1. β -СПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ОДНОЙ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗЬЮ

Лактоферрицины

Лактоферрицины представляют собой фрагменты N-концевого функционального домена лактоферрина, образующиеся путем ограниченного протеолиза пепсином в кислых условиях (рис. 2). Лактоферрин – мультифункциональный железосвязывающий гликопротеин, в настоящее время рассматриваемый в качестве одного из неотъемлемых элементов противинфекционной защитной системы человека и животных. Впервые на возможность участия лактоферрина в формировании устойчивости к инфекциям обратили внимание японские ученые [21]. Ими были выделены два пептида, представляющие собой фрагменты 1–54 и 17–41 N-концевого участка коровьего лактоферрина, обладающие значительно более выраженным антимикробным действием по сравнению с исходным белком. Фрагмент 17–41, впоследствии названный лактоферрицином В [22], представляет собой катионный пептид с одной дисульфидной связью, замыкающей 18-членный цикл между остатками Cys2 и Cys20 [23]. Представители семейства лактоферрицинов обладают рядом защитных свойств лактоферринов, выделенных из женского и коровьего молока, причем некоторые свойства проявляются значительно сильнее, чем у исходного белка. Лактоферрицины проявляют антибактериальную активность в отношении широкого диапазона микроорганизмов, действуя как по бактерицидному, так и по бактериостатическому механизму [24]. Противовирусное действие пептида лактофер-

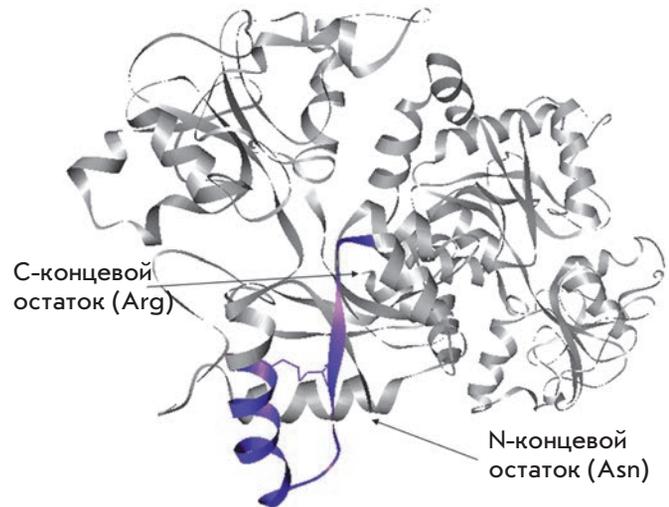


Рис. 2. Кристаллическая структура лактоферрина коровы *Bos taurus taurus*. Синевым цветом выделен фрагмент последовательности, соответствующий лактоферрицину В (аминокислотные остатки с 17 по 41)

рицин В выражено намного слабее, чем у нативного коровьего лактоферрина. Тем не менее он оказывает ингибирующий эффект на ряд вирусов [25]. Наряду с подавлением болезнетворных бактерий, лактоферрицин В обладает ингибирующей активностью в отношении некоторых возбудителей микозов, включая *Candida albicans* и ряд дерматофитов [26], а также проявляет *in vitro* противоопухолевую активность в отношении различных типов малигнизированных клеток, образующихся при лейкозах, фибросаркоме, раке и нейробластоме, в концентрациях, нетоксичных для фибробластов и эритроцитов [27]. Стоит отметить, что лактоферрицин В вызывает гибель опухолевых клеток как в результате некроза, так и апоптоза [28, 29]. В дополнение к этому пептид обладает иммуномодулирующей активностью, выступая в роли противовоспалительного агента [30]. Этот эффект объясняется способностью лактоферрицина В связывать метилированные CpG-содержащие олигонуклеотиды, выделяющиеся в окружающую среду при гибели или в процессе деления бактериальных клеток и активирующие воспалительные процессы в организме [31]. Лактоферрицин В способен также активно связывать бактериальные липополисахариды, тем самым ингибируя активность клеток иммунной системы [32]. К настоящему времени фрагмент hLF1–11 лактоферрина человека, обладающий противовоспалительной активностью, прошел первую стадию клинических испытаний в качестве иммуномодулятора [33].

Бактенецин

Бактенецин – небольшой антимикробный пептид, выделенный из нейтрофильных гранулоцитов крупного рогатого скота и состоящий из 12 аминокислотных остатков. Остатки цистеина в положениях 3 и 11 образуют дисульфидную связь, замыкающую 9-членный цикл [34]. Природный бактенецин обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении широкого спектра как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, при этом его гемолитическая активность находится на незначительном уровне [35]. На основе бактенецина получен ряд аналогов, обладающих повышенным терапевтическим индексом. Некоторые из этих пептидов обладают противовирусной активностью в отношении вируса герпеса [36].

Тигеринин-1

Тигеринин-1 – короткий пептид, состоящий из 12 аминокислотных остатков. Этот пептид, выделенный из кожи лягушки *Rana tigerina*, достаточно сильно отличается от других АМП земноводных. Цистеины в положениях 2 и 10 образуют дисульфидную связь, таким образом большая часть молекулы представляет из себя 9-членный цикл. Эта структурная особенность сближает тигеринин с бактенецином [37]. Сходство сохраняется также и в спектрах активности пептидов. Тигеринин обладает антимикробной активностью в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов [38]. Отдельно следует упомянуть один из аналогов тигеринина – тигеринин-1R, который способен стимулировать выработку инсулина. Показано, что пептид способен вызывать деполяризацию мембраны и увеличивать концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} в β -клетках поджелудочной железы, что приводит к стимуляции выброса инсулина. В ходе экспериментов, проведенных на мышах с сахарным диабетом второго типа, показано значительное ускорение расщепления глюкозы при введении мышам тигеринина-1R. При этом пептид не оказывает токсического воздействия на организм. Рассматривается возможность создания на основе тигеринина-1R препарата, эффективного при сахарном диабете второго типа [39].

Танатин

Среди множества АМП, выделенных из насекомых, танатин клопа-щитника *Podisus maculiventris* является единственным пептидом, молекула которого обладает конформацией β -спиральки. Зрелый танатин состоит из 21 аминокислотного остатка и несет значительный положительный заряд (+6) при физиологических значениях pH [40]. Данный пептид не имеет существенной гомологии с другими защитными

Танатин

Бревенин-1



Рис. 3. Сравнение первичной структуры танатина из клопа *P. maculiventris* и бревенина-1 из японской лягушки *R. brevipoda*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

пептидами насекомых, однако близок по первичной и вторичной структуре к АМП из кожных секретов лягушек рода *Rana* [41]. Степень гомологии между танатином и бревенином-1 из кожи японской лягушки *R. brevipoda* приближается к 50%, оба пептида содержат небольшой цикл в С-концевой части молекулы, замкнутый дисульфидной связью и включающий восемь (танатин) или семь (бревенины) аминокислотных остатков (рис. 3).

Характерный для бревенинов мотив, названный «Rana box», обнаружен у многих АМП амфибий – эскулентинов, гаегуринов, ралексинов. Во всех перечисленных молекулах цикл содержит положительно заряженные остатки, разделенные остатком треонина. У танатина данный участок образует жесткую β -спиральную структуру, в то время как N-концевой фрагмент сохраняет подвижность [42].

Обнаружено, что танатин продуцируется в жировом теле насекомого при экспериментальном инфицировании патогенными микроорганизмами. Пептид характеризуется широким спектром антибактериальной и противогрибковой активности, он способен подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей в концентрациях, в большинстве случаев не превышающих 10 мкМ. Кроме того, танатин не проявляет гемолитической активности даже в концентрациях, которые на порядок превышают МИК в отношении бактерий, что свидетельствует о высокой селективности действия. Танатин способен подавлять рост ряда бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе антибиотикоустойчивых штаммов *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. Природный танатин повышает эффективность ряда классических антибиотиков в отношении клинических изолятов, экспрессирующих эффлюксные насосы, обеспечивающие множественную лекарственную устойчивость [43]. В ходе структурно-функциональных исследований танатина был открыт ряд аналогов с улучшенными терапевтическими индексами [44]. Укороченный аналог танатина – R-танатин – способен эффективно

подавлять рост и образование биопленок у различных штаммов MRSA как *in vitro*, так и *in vivo* [45]. Наибольший интерес среди аналогов вызвал более активный S-танатин, в котором треонин в положении 15 был заменен на серин. Была показана высокая безопасность и эффективность данного аналога в отношении мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* как в условиях *in vitro*, так и в случае внутривенного введения в экспериментах на мышах [46, 47]. Способность танатина эффективно подавлять рост грибных патогенов была использована в области биотехнологии растений. Так, трансгенные культуры риса и арабидопсиса, содержащие ген танатина, показали высокую устойчивость к ряду фитопатогенов [48, 49].

Ареницины

Ареницины – катионные пептиды, выделенные из целомоцитов морского кольчатого червя *Arenicola marina* [50]. Молекулы ареницинов состоят из 21 аминокислотного остатка, шесть из которых положительно заряженные остатки аргинина, и стабилизируются одной дисульфидной связью, образующей 18-членный макроцикл (рис. 4). Природные ареницины проявляют высокую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, патогенных грибов и дрожжей даже в условиях высокой ионной силы [51]. Различными методами была показана способность ареницинов нарушать целостность бактериальных мембран. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о бактерицидном, а не о бактериостатическом механизме действия ареницинов. При изучении противогрибковой активности ареницина-1 была показана его роль в индукции апоптоза [52]. Вместе с тем, природные изоформы ареницина обладают и высокой гемолитической активностью. По результатам определения общей токсичности рекомбинантного ареницина в экспериментах *in vivo* этот пептид может быть отнесен к классу III токсичности ($20 > \text{LD}_{50} > 700$ мг/кг) для мышей CD-1 [53]. Пространственная структура



Рис. 4. Сравнение первичных структур изоформ ареницина из морского кольчатого червя *A. marina*. Желтым цветом выделены остатки цистеина – положительно заряженные основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

ареницина-2 в водных растворах представляет собой скрученную β-шпильку, стабилизированную девятью водородными и одной дисульфидной связью [54, 55]. В условиях мембранного окружения происходят конформационные изменения и димеризация пептида, что приводит к образованию олигомерных пор, формируемых с участием липидов [56–58]. Подобный механизм деполаризации мембраны с образованием «тороидальных пор» был описан ранее для β-шпилечного АМП протегрина [59].

2. β-ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ДВУМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

Ареницин-3

В 2005 году датской фармацевтической компанией Adenium Biotech был запатентован выделенный из морского кольчатого червя *A. marina* антимикробный пептид ареницин-3 [60], спектр биологической активности которого сходен со спектрами открытых нами ранее ареницина-1 и ареницина-2 [50] (рис. 4). Ареницин-3 значительно отличается по структуре от двух других представителей семейства: степень гомологии на уровне кодирующей нуклеотидной и аминокислотной последовательности белков-предшественников составляет всего 57 и 44% соответственно. Ареницин-3 состоит из 21 аминокислотного остатка, имеет суммарный положительный заряд +4 и проявляет активность в концентрациях менее 1 мкМ в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью. В отличие от ареницинов-1 и -2, данная молекула стабилизирована двумя дисульфидными связями и практически не вызывает лизис эритроцитов в концентрациях до 400 мкМ. Использование систем высокопроизводительного скрининга комбинаторных библиотек позволило создать широкий спектр его аналогов, структуры которых были запатентованы. Изучение антимикробного действия аналогов ареницина-3 в условиях *in vivo* выявило их высокий терапевтический потенциал, поскольку эффективные дозы были на порядок ниже максимально переносимых при исследованиях на моделях пневмонии и инфекции мочевыделительной системы у мышей. Один из аналогов ареницина-3 (NZ17074) в настоящее время проходит стадию доклинических исследований как препарат против инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями, обладающими множественной лекарственной устойчивостью [61].

Тахиплезины и полифемузины

Тахиплезины были выделены из гемоцитов подковообразного краба *Tachypleus tridentatus* [62]. Похожие

пептиды, названные полифемузуинами, были обнаружены у близкородственного вида *Limulus polyphemus* [63]. Наряду с другими антимикробными факторами тахиплезина и полифемузины депонируются в малых гранулах гемоцитов [64]. Тахиплезина и полифемузины состоят из 17–18 аминокислотных остатков, имеют суммарный положительный заряд +6 или +7 и стабилизированы двумя дисульфидными связями. Среди особенностей структуры стоит отметить наличие амидированного С-концевого остатка аргинина. Положительно заряженные и гидрофобные остатки при контакте с липидным бислоем придают молекуле тахиплезина выраженные амфифильные свойства [65]. Тахиплезина обладают выраженной активностью в отношении широкого спектра бактерий и дрожжей. Полифемузины имеют аналогичный спектр антимикробного действия, однако значения МИК, как правило, ниже, что позволяет считать представителей данного подсемейства, наряду с протегринами и ареницинами, наиболее активными АМП животного происхождения [66]. Более того, активность этих пептидов не ограничивается прямым мембранотропным действием. Помимо способности формировать стабильные поры и вызывать деполяризацию бактериальных мембран, тахиплезина может связываться с внутриклеточными мишенями, в частности с геномной и плазмидной ДНК [13]. Кроме того, тахиплезина способен связывать бактериальные эндотоксины, а также проявлять иммуномодулирующую функцию, участвуя в активации системы комплемента и регуляции пролиферации клеток, обеспечивающих реакции системы врожденного иммунитета [67]. Открытие противовирусной активности полифемузинов в отношении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и гриппа привело к разработке ряда терапевтически ценных аналогов с соответствующей направленностью действия [68]. Еще одна мишень тахиплезина и полифемузинов – опухолевые клетки. Несмотря на выраженную мембранотропную активность, в том числе в отношении эритроцитов, противоопухолевые свойства этих молекул связаны с процессами активации апоптоза [69], подавления пролиферации опухолевых клеток [70], а также активации классического каскада системы комплемента [71].

Гомезин

Гомезин – АМП, выделенный из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana* [72]. По структуре [73] он наиболее близок тахиплезинам и полифемузуинам. Гомология с этими АМП составляет около 50%. Гомезин содержит 18 аминокислотных остатков, включая четыре цистеина, образующих две дисульфидные связи, N-концевую пироглутамино-

вую кислоту и С-концевой амидированный аргинин. Аналогичные модификации N- и С-концевых остатков встречаются среди пептидных гормонов. Спектр антимикробной активности гомезина столь же широк, как и у его гомологов, и включает грамотрицательные и грамположительные бактерии, паразитические простейшие, а также дрожжевые и нитчатые грибы. Например, гомезин способен связываться с поверхностью мембраны и ингибировать рост дрожжеподобного гриба *Cryptococcus neoforma* [74]. Подобно тахиплезинам, гомезин обладает противоопухолевой активностью как *in vitro* в отношении злокачественных клеток молочной железы и толстой кишки и клеток меланомы, так и *in vivo* в экспериментах на мышах с привитой меланомой [75]. Стоит отметить, что гомезин обладает умеренной гемолитической активностью и токсичностью в отношении нормальных клеток.

Андроктонин

Андроктонин – 25-членный пептид из гемолимфы скорпиона *Androctonus australis*, содержащий четыре остатка цистеина, образующих две дисульфидные связи [76]. Синтез андроктонина в гемоцитах скорпиона протекает конститутивно. Молекула андроктонина имеет большой суммарный положительный заряд (+8) и содержит мотив RRRGG, обнаруженный также в дефенсинах скорпионов. Аминокислотные последовательности андроктонина, тахиплезина и полифемузинов характеризуются умеренной степенью гомологии, однако их пространственные структуры отличаются типом β-изгиба [77]. Кроме того, расположением остатков цистеина и положением дисульфидных связей этот пептид напоминает α-коноксин SII – блокатор n-ацетилхолиновых рецепторов из яда морского моллюска *Conus striatus* (рис. 5). Более того, сообщалось, что андроктонин имеет сравнимую с α-коноксином SII аффинность к никотиновому рецептору ската *Torpedo* [76] и, таким образом, может послужить основой для создания анальгетических препаратов.

Андроктонин
α-Коноксин SII

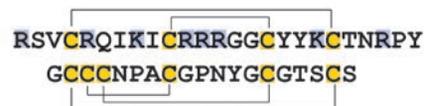


Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей андроктонина из скорпиона *A. australis* и α-коноксина SII из морского моллюска *C. striatus*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи

Даже в высоких концентрациях – вплоть до 150 мкМ – андроктонин не вызывает лизис эритроцитов млекопитающих, что может объясняться его большей гидрофильностью и слабо выраженными амфифильными свойствами [78]. Однако, несмотря на низкое содержание (около 30%) гидрофобных остатков по сравнению с другими β-шпилечными АМП, андроктонин способен нарушать целостность бактериальных мембран. Андроктонин активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, нитчатых и дрожжевых грибов, в то время как его линейный аналог, не содержащий дисульфидных связей, сохраняет активность лишь в отношении грамположительных бактерий.

Протегрины

Семейство протегринов, впервые выделенных из нейтрофилов свиньи более 20 лет назад [79], включает четыре изоформы, состоящие из 16–18 аминокислотных остатков. Стабильность пространственной структуры протегринов обеспечивается двумя внутримолекулярными дисульфидными связями [80]. Протегрины относят к семейству кателицидинов – АМП, которые синтезируются как С-концевая часть белка-предшественника, содержащего консервативный кателиновый домен. Образование зрелых протегринов происходит во внеклеточном пространстве в ходе протеолитического процессинга эластазой [81]. Ранее упоминалось, что протегрины относятся к числу наиболее активных АМП. Минимальная ингибирующая концентрация протегрин-1 в отношении большинства бактериальных штаммов составляет менее 0.5 мкМ [82]. Для сравнения, MSI-78 – высокоактивный аналог одного из наиболее известных α-спиральных АМП магаинина, выделенного из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и действующего по схожему с протегринами мембранотропному механизму, проявляет активность в отношении широкого спектра штаммов бактерий в концентрациях ~ 2–4 мкМ и выше [83]. Помимо антибактериального действия, протегрин способен проявлять активность в отношении дрожжевых и опухолевых клеток [84, 85], а также вирусов [86]. Отдельного упоминания заслуживает один из аналогов протегрин-1 – синтетический 17-членный пептид исеганан (IB-367), отобранный в результате скрининга нескольких сотен аналогов с различными аминокислотными заменами и делециями [87]. Исеганан проявляет выраженную активность в отношении широкого спектра бактерий и грибов, порой превосходя по активности природные пептиды. Его бактерицидная активность сохраняется в растворе NaCl с концентрацией 150 мМ, соответствующей физиологической концентрации ионов Na⁺ в плазме крови человека. Исеганан рассматривается как перспективный пре-

парат для лечения пациентов с оральным мукозитом, подвергнутых противоопухолевой терапии, а также для терапии вентилятор-ассоциированной пневмонии, муковисцидозов и профилактики заболеваний различной этиологии, передающихся половым путем [88].

3. β-ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ТРЕМЯ ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

θ-дефенсины

Дефенсины позвоночных принято разделять на три подсемейства: α-, β- и θ-дефенсины. Всех их объединяют катионные свойства, присутствие β-структурных участков, а также наличие шести остатков цистеина, образующих три внутримолекулярные дисульфидные связи. Отличия заключаются в размерах, структуре и свойствах молекул, а также в положении дисульфидных связей. θ-Дефенсины были выделены из лейкоцитов низших узконосых обезьян – макака-резус и бабуина – и являются единственным примером ковалентно замкнутых циклических пептидов животного происхождения [89, 90]. У человека и других эволюционно более «поздних» приматов θ-дефенсины не обнаружены. Позднее было показано, что лейкоциты человека синтезируют мРНК, кодирующую белки-предшественники θ-дефенсинов, однако наличие стоп-кодона в его сигнальной последовательности препятствует их биосинтезу [91]. На основе данных о последовательности транскриптов были синтезированы θ-дефенсины человека, названные ретроциклинами [92]. θ-Дефенсины у обезьян образуются в результате сплайсинга по принципу «голова к хвосту» двух нонапептидов, являющихся частями двух независимых белков-предшественников (рис. 6). Таким образом,

Источник	Ген/Псевдоген	Нонапептид + 3 а.о.
<i>Homo sapiens</i> (человек)	DEFT-1 (ψ)	RCICGRGIC RLL
	DEFT-4 (ψ)	RCICGRRIC RLL
<i>Gorilla gorilla</i> (горилла)	DEFT-1 (ψ)	RCICGRGIC RLL
<i>Macaca mulatta</i> (макака-резус)	DEFT-1	RCLCRRGVC QLL
	DEFT-2	RCICTRGFC RLL
	DEFT-3	RCICVLGIC RLL
	DEFT-4	RCICTRGVC QLL
<i>Hylobates syndactylus</i> (сиаманг)	DEFT-1	RCICGRGVC RLL

Рис. 6. Сравнение продуктов экспрессии генов/псевдогенов DEFT из приматов [91]. Только первые девять аминокислотных остатков (нонапептид) участвуют в биосинтезе зрелого пептида. Оставшиеся три остатка продукта экспрессии гена удаляются в ходе процессинга. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки

зрелые θ -дефенсины состоят из 18 аминокислотных остатков и формируют β -шпильчатую структуру, стабилизированную тремя дисульфидными связями [93] (рис. 7). Стоит отметить, что благодаря независимому гомо- или гетеродимерному сплайсингу количество экспрессирующихся генов (*DEFT*) белков-предшественников определяет конечное число изоформ θ -дефенсина у конкретного биологического вида. Так, у бабуина *Paria anubis* экспрессия четырех генов *DEFT* теоретически приводит к образованию 10 изоформ, однако на уровне пептидов обнаружены лишь пять [94]. *DEFT* представляет собой мутировавший ген предшественника α -дефенсина со стоп-кодоном в области, кодирующей зрелый пептид.

Нарушая структурную целостность мембран, θ -дефенсины и ретроциклины проявляют высокую антибактериальную и противогрибковую активность при концентрациях около 1 мкМ. Однако, в отличие от ряда описанных выше АМП, при значительном повышении ионной силы среды активность снижается на порядок [90]. θ -Дефенсины обладают способностью связывать бактериальные экзотоксины, в частности летальный фактор сибиреязвенного токсина из *Bacillus anthracis* [95] и листериолизин О из *Listeria monocytogenes* [96]. Как и у андроктоина, пространственная структура θ -дефенсинов характеризуется невысокой амфифильностью, что довольно нетипично для β -шпильчатых АМП, и приводит к низкой гемолитической активности этих молекул. Благодаря низкой токсичности, а также обнаруженным у них свойствам лектинов, θ -дефенсины рассматриваются в качестве прототипов противовирусных средств. Во многих работах показана способность ретроциклинов препятствовать распространению вирусов иммунодефицита человека [92], гриппа [97] и герпеса [98]. Стоит отметить, что противовирусное действие θ -дефенсинов не связано ни с виротоксическими, ни с цитотоксическими эффектами в отношении зараженных клеток. Считается, что θ -дефенсины препятствуют распространению оболочечных вирусов благодаря связыванию с поверхностными гликопротеинами, ответственными за взаимодействие вируса с клеткой при ее заражении. Показана иммуномодулирующая активность θ -дефенсинов, которая проявляется в способности подавлять биосинтез провоспалительных цитокинов [99].

4. β -ШПИЛЕЧНЫЕ АМП, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ЧЕТЫРЬМА ДИСУЛЬФИДНЫМИ СВЯЗЯМИ

Гепцидины

Гепцидины представляют собой семейство β -шпильчатых АМП, стабилизированных четырь-

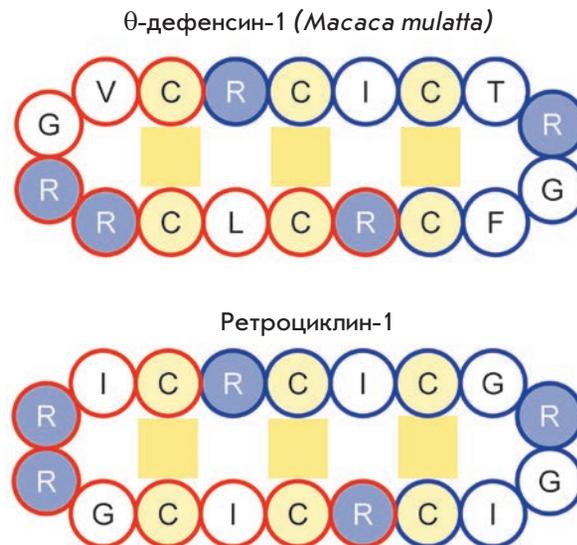


Рис. 7. Аминокислотные последовательности θ -дефенсина-1 из макака-резус *Macaca mulatta* и ретроциклина-1. Аминокислотные остатки, входящие в состав первого и второго нонапептидов, образующих циклическую структуру в результате сплайсинга, обведены красным и синим цветом соответственно. Желтым цветом выделены остатки цистеина и дисульфидные связи, голубым – основные аминокислотные остатки

мя дисульфидными связями. Гепцидины найдены у многих позвоночных на уровне транскрипта, однако в виде зрелого пептида они выделены лишь из жидкостей и тканей человека и рыб [100–102]. Гепцидин человека, который иногда называют экспрессирующимся в печени АМП-1 (LEAP-1 – liver-expressed AMP-1), был выделен из мочи, крови и печени. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гепцидины различных видов, достаточно консервативна, что в большей степени выражено у млекопитающих. Для гепцидинов характерен следующий порядок замыкания дисульфидных связей: Cys1–Cys8, Cys2–Cys7, Cys3–Cys6, Cys4–Cys5, причем три из них участвуют во взаимодействии β -тяжей, в то время как дисульфидный мостик Cys4–Cys5 приводит к характерной для данного семейства молекул деформации области β -поворота и формированию впадины, во внутренней части которой сосредоточены основные аминокислотные остатки, а во внешней – гидрофобные [103]. Благодаря такой амфифильной структуре гепцидины обладают широким спектром антимикробной активности, подавляя рост бактерий, нитчатых грибов и дрожжей. Стоит отметить, что у рыб зрелые гепцидины обнаруже-

ны и выделены из жабр, хотя ген преимущественно экспрессировался в гепатоцитах. Биосинтез гепцидина у рыб индуцируется при контакте с патогенными бактериями. Аналогичная ситуация наблюдалась и у человека: зрелые пептиды присутствовали в моче и плазме крови, в то время как мРНК синтезируется преимущественно в печени.

Показано, что антимикробный эффект гепцидина обусловлен не прямым воздействием на бактериальную мембрану [104], а способностью связываться с нуклеиновыми кислотами [105], а также лишением микроорганизмов доступного железа [106], необходимого для функционирования супероксиддисмутазы, т.е. защиты от активных форм кислорода. Именно поэтому, несмотря на свойства типичного АМП, его основной физиологической функцией в организме принято считать регуляцию метаболизма железа. Ряд экспериментов на нокаутных мышах позволил предположить, что гепцидин играет ключевую роль в поддержании гомеостаза железа [107]. Недостаток гепцидина в организме приводит к метаболическим нарушениям, при которых наблюдается «перенасыщение» железом. Избыток молекул гепцидина связывают с хронической почечной недостаточностью, анемией, воспалением и рядом других заболеваний [108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше данные показывают, что, несмотря на сравнительно небольшое число известных β -спилечных АМП, их биологические функции весьма многообразны. Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что β -спилечные АМП объединяет между собой ряд важных структурно-функциональных особенностей с точки зрения возможности создания новых антибиотиков на их основе, а именно: небольшой размер (до 25 аминокислотных остатков); суммарный положительный заряд и амфифильные свойства, достаточные для проявления мембранотропной активности по отношению к широкому спектру бактериальных мишеней; стабилизированная дисульфидными связями компактная структура, способствующая повышенной

протеолитической устойчивости. Ключевая роль дисульфидных связей как фактора, обуславливающего устойчивость β -спилечных АМП к биодegradации, показана в ряде работ на примере аналогов лактоферрицина, бактенецина, гомезина и θ -дефенсина [109–112]. Таким образом, все описанные в обзоре β -спилечные АМП объединяет не только сходство пространственной структуры, но и способность эффективно уничтожать бактериальные клетки-мишени. Их главным достоинством по сравнению с традиционными антибиотиками является то, что бактерии пока не способны выработать эффективные механизмы развития резистентности в отношении этих веществ, поскольку для этого потребуются внести серьезные изменения в структуру и электрофизиологические свойства клеточной мембраны [113].

Поиск и изучение структурно-функциональных особенностей β -спилечных АМП дают исключительно богатый исходный материал для создания лекарственных средств нового поколения. Ключевой задачей исследователей, работающих над созданием новых антибиотиков пептидной природы, в настоящее время является проблема токсичности и увеличение продолжительности жизни этих молекул в кровотоке. Благодаря своим структурно-функциональным особенностям β -спилечные АМП могут стать основой для создания антибиотиков системного и поверхностного применения, иммуномодуляторов, блокаторов экзо- и эндотоксинов, препаратов для лечения метаболических нарушений, противоопухолевых и противовирусных препаратов, анальгетиков. Альтернативным направлением является использование β -спилечных АМП в сельскохозяйственной биотехнологии, а именно для создания трансгенных линий растительных культур, конститутивно экспрессирующих гены АМП и вследствие этого обладающих повышенной устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам и другим стрессогенным факторам внешней среды. ●

Работа поддержана грантом РФ (соглашение № 14-14-01036).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. С.-Пб.: Наука, 2006. 261 с.
2. Zasloff M. // Nature. 2002. V. 415. № 6870. P. 389–395.
3. Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D. // Ann. Rheum. Dis. 2003. V. 62 (Suppl 2). P. ii17–ii21.
4. Bergquist D.C., Williams F.M., Fisher C.R. // Nature. 2000. V. 403. № 6769. P. 499–500.
5. Roscia G., Falciani C., Bracci L., Pini A. // Curr. Protein Pept. Sci. 2013. V. 14. № 8. P. 641–649.
6. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. // PLoS One. 2013. V. 8. № 6. P. e66557.
7. Boman H.G. // Annu. Rev. Immunol. 1995. V. 13. P. 61–92.
8. Baumann G., Mueller P.J. // Supramol. Struct. 1974. V. 2. № 5–6. P. 538–557.
9. Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. // Biochemistry. 1997. V. 36. № 32. P. 9799–9806.
10. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. // Biophys. J. 2001. V. 81. № 3. P. 1475–1485.

11. Shai Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1462. № 1–2. P. 55–70.
12. Matsuzaki K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1462. № 1–2. P. 1–10.
13. Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 11. P. 2998–3004.
14. Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S.J. // *Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 37. P. 26172–26178.
15. Fleischmann J., Selsted M., Lehrer R.I. // *Diagn. Microbiol. Dis.* 1985. V. 3. № 3. P. 233–242.
16. Biragyn A., Surenhu M., Yang D., Ruffini P.A., Haines B.A., Klyushnenkova E., Oppenheim J.J., Kwak L.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 11. P. 6644–6653.
17. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I. // *Eur. J. Immunol.* 2001. V. 31. № 4. P. 1066–1075.
18. Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., MacDonald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. // *Immunol.* 2004. V. 172. № 2. P. 1146–1156.
19. Li J., Post M., Volk R., Gao Y., Li M., Metais C., Sato K., Tsai J., Aird W., Rosenberg R., et al. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 1. P. 49–55.
20. Zhu Q.Z., Hu J., Mulay S., Esch F., Shimasaki S., Solomon S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 2. P. 592–596.
21. Saito T., Miyakawa H., Tamura Y.J. // *Dairy Sci.* 1991. V. 74. № 11. P. 3724–3730.
22. Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1992. V. 1121. № 1–2. P. 130–136.
23. Hwang P.M., Zhou N., Shan X., Arrowsmith C.H., Vogel H.J. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. № 12. P. 4288–4298.
24. Yamauchi K., Tomita M., Giehl T.J., Ellison R.T. // *Infect. Immun.* 1993. V. 61. № 2. P. 719–728.
25. Jenssen H., Andersen J.H., Uhlin-Hansen L., Gutteberg T.J., Rekdal O. // *Antiviral Res.* 2004. V. 61. № 2. P. 101–109.
26. Bellamy W., Yamauchi K., Wakabayashi H., Takase M., Takakura N., Shimamura S., Tomita M. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. V. 18. P. 230–233.
27. Yoo Y., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I. // *Jpn. J. Cancer Res.* 1997. V. 88. № 2. P. 184–190.
28. Eliassen L.T., Berge G., Leknessund A., Wikman M., Lindin I., Løkke C., Ponthan F., Johnsen J.I., Sveinbjørnsson B., Kogner P., et al. // *Int. J. Cancer.* 2006. V. 119. № 3. P. 493–500.
29. Mader J.S., Salsman J., Conrad D.M., Hoskin D.W. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 4. P. 612–624.
30. Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., Hanson L.A. // *Pediatr. Res.* 1996. V. 40. № 2. P. 257–262.
31. Britigan B.E., Lewis T.S., Waldshemid M., McCormick M.L., Krieg A.M. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 5. P. 2921–2928.
32. Ellison R., 3rd, Giehl T. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. № 8. P. 1080–1091.
33. Velden W.J., van Iersel T.M., Blijlevens N.M., Donnelly J.P. // *BMC Med.* 2009. V. 7. P. 44.
34. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 20. P. 9573–9575.
35. Wu M., Hancock R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 5. P. 1274–1276.
36. Shestakov A., Jenssen H., Hancock R.E., Nordström I., Eriksson K. // *Antiviral Res.* Nov. 2013. V. 100. № 2. P. 455–459.
37. Sai K.P., Jagannadham M.V., Vairamani M., Raju N.P., Devi A.S., Nagaraj R., Sitaram N. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 4. P. 2701–2707.
38. Sitaram N., Purna Sai K., Singh S., Sankaran K., Nagaraj R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 7. P. 2279–2283.
39. Ojo O., Abdel-Wahab Y., Flatt P., Mechkarska M., Conlon J. // *Diabetes Obes. Metab.* 2011. V. 13. № 12. P. 1114–1122.
40. Fehlbaum P., Bulet P., Chernysh S., Briand J.P., Roussel J.P., Letellier L., Hetru C., Hoffmann J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 3. P. 1221–1225.
41. Morikawa N., Hagiwara K., Nakajima T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. № 1. P. 184–190.
42. Mandard N., Sodano P., Labbe H., Bonmatin J.M., Bulet P., Hetru C., Ptak M., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 256. № 2. P. 404–410.
43. Pages J.M., Dimarcq J.L., Quenin S., Hetru C. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003. V. 22. № 3. P. 265–269.
44. Lee M.K., Cha L., Lee S.H., Hahn K.S. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 35. № 3. P. 291–296.
45. Hou Z., Da F., Liu B., Xue X., Xu X., Zhou Y., Li M., Li Z., Ma X., Meng J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 10. P. 5045–5052.
46. Wu G., Deng X., Wu P., Shen Z., Xu H. // *Peptides.* 2012. V. 36. № 1. P. 109–113.
47. Wu G., Wu P., Xue X., Yan X., Liu S., Zhang C., Shen Z., Xi T. // *Peptides.* 2013. V. 45. P. 73–77.
48. Wu T., Tang D., Chen W., Huang H., Wang R., Chen Y. // *Gene.* 2013. V. 527. № 1. P. 235–242.
49. Imamura T., Yasuda M., Kusano H., Nakashita H., Ohno Y., Kamakura T., Taguchi S., Shimada H. // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. № 3. P. 415–424.
50. Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. // *FEBS Lett.* 2004. V. 577. № 1–2. P. 209–214.
51. Andrä J., Jakovkin I., Grötzinger J., Hecht O., Krasnodembskaya A.D., Goldmann T., Gutschmann T., Leippe M. // *Biochem. J.* 2008. V. 410. № 1. P. 113–122.
52. Cho J., Lee D.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 12. P. 1246–1251.
53. Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Якименко З.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // *Токсикологический вестник.* 2012. T. 112. № 1. С. 40–43.
54. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 360. № 1. P. 156–162.
55. Stavroudis A., Tsoulos I.G., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. // *Biopolymers.* 2009. V. 92. № 3. P. 143–155.
56. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Nadezhdin K.D., Paramonov A.S., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // *Biopolymers.* 2008. V. 89. № 5. P. 455–464.
57. Salnikov E.S., Aisenbrey C., Balandin S.V., Zhmak M.N., Ovchinnikova T.V., Bechinger B. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 18. P. 3784–3795.
58. Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 28. P. 6255–6265.
59. Mani R., Cady S.D., Tang M., Waring A.J., Lehrer R.I., Hong M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 44. P. 16242–16247.
60. Hoegenhaug H.H.K., Mygind P.H., Kruse T., Segura D.R., Sandvang D., Neve S. // *WO Patent App.* 2011 PCT/EP2011/059,6896.
61. Fox J.L. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 5. P. 379–382.
62. Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 32. P. 16709–16713.
63. Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y. // *J. Biochem.* 1989. V. 106. № 4. P. 663–668.

64. Shigenaga T., Takayenoki Y., Kawasaki S., Seki N., Muta T., Toh Y., Ito A., Iwanaga S. // *J. Biochem.* 1993. V. 114. № 3. P. 307–316.
65. Oishi O., Yamashita S., Nishimoto E., Lee S., Sugihara G., Ohno M. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 14. P. 4352–4359.
66. Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E., Schneider G. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. V. 11. № 1. P. 37–51.
67. Ozaki A., Arika S., Kawabata S. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 15. P. 3863–3871.
68. Tamamura H., Kuroda M., Masuda M., Otaka A., Funakoshi S., Nakashima H., Yamamoto N., Waki M., Matsumoto A., Lancelin J.M., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1163. № 2. P. 209–216.
69. Chen Y., Xu X., Hong S., Chen J., Liu N., Underhill C.B., Creswell K., Zhang L. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 6. P. 2434–2438.
70. Shi S.L., Wang Y.Y., Liang Y., Li Q.F. // *World J. Gastroenterol.* 2006. V. 12. № 11. P. 1694–1698.
71. Chen J., Xu X.M., Underhill C.B., Yang S., Wang L., Chen Y., Hong S., Creswell K., Zhang L. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 11. P. 4614–4622.
72. Silva P. Jr., Daffre S., Bulet P. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 43. P. 33464–33470.
73. Mandard N., Bulet P., Caille A., Daffre S., Vovelle F. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 4. P. 1190–1198.
74. Barbosa F.M., Daffre S., Maldonado R.A., Miranda A., Nimrichter L., Rodrigues M.L. // *FEMS Microbiol Lett.* 2007. V. 274. № 2. P. 279–286.
75. Rodrigues E.G., Dobroff A.S., Cavarsan C.F., Paschoalin T., Nimrichter L., Mortara R.A., Santos E.L., Fázio M.A., Miranda A., Daffre S., et al. // *Neoplasia.* 2008. V. 10. № 1. P. 61–68.
76. Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffmann J.A., van Dorsselaer A., Bulet P. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 47. P. 29537–29544.
77. Mandard N., Sy D., Maufrais C., Bonmatin J.M., Bulet P., Hetru C., Vovelle F. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1999. V. 17. № 2. P. 367–380.
78. Hetru C., Letellier L., Oren Z., Hoffmann J.A., Shai Y. // *Biochem J.* 2000. V. 345 (Pt 3). P. 653–664.
79. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. // *FEBS Lett.* 1993. V. 327. № 2. P. 231–236.
80. Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. // *Chem. Biol.* 1996. V. 3. № 7. P. 543–550.
81. Panyutich A., Shi J., Boutz P.L., Zhao C., Ganz T. // *Infect. Immun.* 1997. V. 65. № 3. P. 978–985.
82. Steinberg D.A., Hurst M.A., Fujii C.A., Kung A.H., Ho J.F., Cheng F.C., Loury D.J., Fiddes J.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. V. 41. № 8. P. 1738–1742.
83. Ge Y.G., MacDonald D.L., Holroyd K.J., Thornsberry C., Wexler H., Zasloff M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 4. P. 782–788.
84. Shamova O.V., Sakuta G.A., Orlov D.S., Zenin V.V., Shtein G.I., Kolodkin N.I., Afonina I.V., Kokriakov V.N. // *Cell Tissue Biology.* 2007. V. 1. № 6. P. 524–533.
85. Paredes-Gamero E.J., Martins M.N., Cappabianco F.A., Ide J.S., Miranda A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1820. № 7. P. 1062–1072.
86. Rothan H.A., Abdulrahman A.Y., Sasikumer P.G., Othman S., Rahman N.A., Yusof R. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2012. P. ID 251482.
87. Chen J., Falla T.J., Liu H., Hurst M.A., Fujii C.A., Mosca D.A., Embree J.R., Loury D.J., Radcliff P.A., Cheng Chang C., et al. // *Biopolymers.* 2000. V. 55. № 1. P. 88–98.
88. Giles F.J., Redman R., Yazji S., Bellm L. // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2002. V. 11. № 8. P. 1161–1170.
89. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E. // *Science.* 1999. V. 286. № 5439. P. 498–502.
90. Lehrer R.I., Cole A.M., Selsted M.E. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 32. P. 27014–27019.
91. Nguyen T.X., Cole A.M., Lehrer R.I. // *Peptides.* 2003. V. 24. № 11. P. 1647–1654.
92. Cole A.M., Hong T., Boo L.M., Nguyen T., Zhao C., Bristol G., Zack J.A., Waring A.J., Yang O.O., Lehrer R.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 4. P. 1813–1818.
93. Trabi M., Schirra H.J., Craik D.J. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 14. P. 4211–4221.
94. Garcia A.E., Osapay G., Tran P.A., Yuan J., Selsted M.E. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 12. P. 5883–5891.
95. Wang W., Mulakala C., Ward S.C., Jung G., Luong H., Pham D., Waring A.J., Kaznessis Y., Lu W., Bradley K.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32755–32764.
96. Arnett E., Lehrer R.I., Pratikhya P., Lu W., Seveau S. // *Cell Microbiol.* 2011. V. 13. № 4. P. 635–651.
97. Doss M., White M.R., Tecle T., Gantz D., Crouch E.C., Jung G., Ruchala P., Waring A.J., Lehrer R.I., Hartshorn K.L. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 12. P. 7878–7887.
98. Yasin B., Wang W., Pang M., Cheshenko N., Hong T., Waring A.J., Herold B.C., Wagar E.A., Lehrer R.I. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 10. P. 5147–5156.
99. Schaal J.B., Tran D., Tran P., Osapay G., Trinh K., Roberts K.D., Brasky K.M., Tongaonkar P., Ouellette A.J., Selsted M.E. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. e51337.
100. Krause A., Neitz S., Mägert H.J., Schulz A., Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Adermann K. // *FEBS Lett.* 2000. V. 480. № 2–3. P. 147–150.
101. Park C.H., Valore E.V., Waring A.J., Ganz T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 11. P. 7806–7810.
102. Shike H., Lauth X., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., van Olst J.C., Shimizu C., Bulet P., Burns J.C. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 8. P. 2232–2237.
103. Hunter H.N., Fulton D.B., Ganz T., Vogel H.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 40. P. 37597–37603.
104. Hocquellet A., Odaert B., Cabanne C., Noubhani A., Dieryck W., Joucla G., Le Senechal C., Milenkov M., Chaignepain S., Schmitter J.M. // *Peptides.* 2010. V. 31. № 1. P. 58–66.
105. Hocquellet A., Le Senechal C., Garbay B. // *Peptides.* 2012. V. 36. № 2. P. 303–307.
106. Ganz T. // *Blood.* 2003. V. 102. № 3. P. 783–788.
107. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 15. P. 8780–8785.
108. Ganz T., Nemeth E. // *Annu. Rev. Med.* 2011. V. 62. P. 347–360.
109. Nguyen L.T., Chau J.K., Perry N.A., de Boer L., Zaat S.A.J., Vogel H.J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9. P. e12684.
110. Nan Y., Jacob B., Kim Y., Shin S. // *J. Pept. Sci.* 2012. V. 18. № 12. P. 740–747.
111. Fazio M.A., Oliveira V.X., Bulet P., Miranda M.T.M., Daffre S., Miranda A. // *Biopolymers.* 2006. V. 84. № 2. P. 205–218.
112. Conibear A.C., Rosengren K.J., Daly N.L., Henriques S.T., Craik D.J. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 188. № 15. P. 10830–10840.
113. Peschel A., Sahl H.G. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. № 7. P. 529–536.