

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Пантелеев Павел Валерьевич

**Структурно-функциональное исследование антимикробных
пептидов животного происхождения**

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Овчинникова Татьяна Владимировна

Москва – 2015

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы.....	7
2.1. Введение. Антимикробные пептиды как факторы врожденного иммунитета.....	7
2.2. β -Шпилечные АМП, стабилизированные одной дисульфидной связью.....	11
Бактенецины	11
Тигеринины и ранациклины.....	13
Танатин.....	15
Лактоферрицины	18
Ареницины.....	21
2.3. β -Шпилечные АМП, стабилизированные двумя дисульфидными связями.....	25
Протегрины.....	25
Гомезин	29
Тахиплезины и полифемузины	31
Андроктонин.....	34
2.4. β -Шпилечные АМП, стабилизированные тремя дисульфидными связями	35
θ -Дефенсины.....	35
γ -Дефенсины	39
2.5. β -Шпилечные АМП, стабилизированные четырьмя дисульфидными связями.....	40
Гепцидины	40
2.6. Заключение	43
3. Материалы и методы.....	46
3.1. Оборудование	46
3.2. Реактивы и расходные материалы	47
3.3. Программное обеспечение	48
3.4. Создание последовательностей, кодирующих антимикробные пептиды	49
3.4.1. Определение концентрации олигонуклеотидов.....	49
3.4.2. Сборка фрагментов ДНК	49
3.5. Создание генно-инженерных конструкций	50
3.5.1. Приготовление электрокомпетентных клеток.....	51
3.5.2. Трансформация клеток <i>E.coli</i> методом электропорации.....	51
3.5.3. Выделение плазмидной ДНК	51
3.5.4. Рестрикция фрагментов ДНК и плазмидных векторов	51
3.5.5. Лигазная реакция.....	52
3.5.6. Приготовление химически компетентных клеток <i>E. coli</i>	52
3.5.7. Трансформация методом теплового шока	52
3.5.8. ПЦР-анализ клонов	52
3.5.9. Электрофорез в агарозном геле	53
3.5.10. Секвенирование ДНК.....	53
3.6. Сайт-направленный мутагенез.....	53
3.6.1. Инвертированная ПЦР.....	54
3.6.2. Введение дополнительных остатков и делеций	56
3.7. Гетерологическая экспрессия антимикробных пептидов в составе гибридных белков	57
3.7.1. Оптимизация условий экспрессии.....	57
3.7.2. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле	57
3.7.3. Препаративная экспрессия антимикробных пептидов.....	58
3.8. Выделение и очистка рекомбинантных антимикробных пептидов	59
3.8.1. Выделение клеточного белка	59
3.8.2. Металлохелатная хроматография.....	59

3.8.3. Диализ.....	60
3.8.4. Расщепление гибридного белка	60
3.8.5. Циклизация N-концевого остатка глутамина	60
3.8.6. Селективное осаждение белков	60
3.8.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография	61
3.9. Качественный и количественный анализ очищенных пептидов.....	61
3.10. Контроль корректного замыкания дисульфидных связей в пептидах.....	62
3.11. Антимикробная активность.....	62
3.12. Гемолитическая активность	63
3.13. Цитотоксичность	63
3.14. ДНК-связывающая активность	64
3.15. Измерение проницаемости наружной и цитоплазматической мембран <i>E. coli</i> в реальном времени.....	64
3.16. Измерение проницаемости цитоплазматической мембраны <i>S. aureus</i> в реальном времени	65
3.17. Измерение стабильности пептидов в сыворотке крови.....	66
3.18. Измерение синергических эффектов при совместном действии антимикробных пептидов	66
4. Результаты и обсуждение	67
4.1. Структурно-функциональное исследование ареницина-1	67
4.1.1. Изучение полноразмерных аналогов ареницина-1	68
4.1.2. Изучение укороченных аналогов ареницина-1	80
4.1.3. Сравнительное изучение биологических свойств ареницина-1 и его аналогов	83
4.2. Структурно-функциональное исследование тахиплезина-1	88
4.3. Получение рекомбинантных аналогов антимикробных пептидов и исследование их совместного действия на бактерии.....	97
5. Заключение	106
6. Выводы	108
7. Библиографический список.....	109

1. Введение

Жизнь многоклеточных организмов протекает в среде обитания множества патогенов. Система врождённого иммунитета животных обеспечивает немедленную защиту организма в ответ на внедрение патогена благодаря большому числу молекулярных факторов, реализующих рекогносцировочные и эффекторные механизмы ее функционирования. К таким факторам относятся молекулы клеточной адгезии, паттерн-распознающие, в том числе Toll-подобные рецепторы, сквенджер-рецепторы, пептидогликан-распознающие белки, лектины, пентраксины, компоненты системы комплемента, липополисахарид-связывающий белок, лизоцим, лактоферрин, цитокины, хемокины и многие другие соединения, регулирующие инициацию и развитие 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. В отличие от многих классических антибиотиков, являющихся продуктами вторичного метаболизма, подавляющее большинство АМП синтезируются непосредственно на рибосомах. Клетки, синтезирующие цитотоксичные пептиды, обладают механизмами защиты от их негативного воздействия. Как правило, АМП синтезируются в составе неактивного белка-предшественника, от которого специфически отщепляются в ходе энзиматического процессинга, и далее могут подвергаться посттрансляционным модификациям [2]. Зрелые АМП, содержащие от нескольких единиц до нескольких десятков аминокислотных остатков, обладают основными свойствами благодаря высокому содержанию аргинина и лизина [3]. Кроме того, для большинства АМП характерна высокая доля (не менее 30%) гидрофобных аминокислотных остатков и амфифильные свойства. Следует отметить, что среди АМП встречаются и анионные молекулы, однако в отличие от катионных АМП их нельзя отнести к факторам иммунитета, универсальным для всех животных видов [4].

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 новых АМП стало очевидно, что эти молекулы являются универсальными и эволюционно древними элементами системы врожденного иммунитета. Позднее, наряду с прямым эффекторным (антибиотическим) действием была обнаружена способность многих АМП проявлять регуляторную (иммуномодулирующую) функцию и участвовать в реакциях не только врожденного, но и приобретенного иммунитета [5,6]. 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, участвующих в регуляции иммунных процессов организма-хозяина.

За годы, прошедшие со времени открытия первых антибиотиков, массовое применение этих веществ привело к появлению и распространению целого ряда мультирезистентных штаммов патогенных бактерий, причем в отношении большинства антибиотических соединений устойчивость развивается за несколько лет [7]. В течение последних 50 лет в клиническую практику были введены всего несколько новых классов антибиотиков, причем для большинства из них мишенью являются грамположительные бактерии [8]. Для преодоления проблемы резистентности к антибиотикам необходим поиск новых антимикробных соединений, принципиально отличающихся по механизму действия от используемых в настоящее время противоинфекционных средств. Среди таких соединений особый практический интерес представляют АМП, которые обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с традиционными антибиотиками. Для большинства АМП мишенью действия являются мембраны клеток патогенных организмов, а механизмом действия – нарушение нормальной проницаемости этих мембран, вплоть до лизиса. По этой причине развитие резистентности патогенов к этим веществам менее вероятно, так как для этого необходимы изменения в структуре и электрофизиологических свойствах клеточной мембраны, на которую ориентировано действие почти всех известных АМП. 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 [9,10], что особенно актуально на фоне снижения потенциала обычных антибиотиков. На данный момент известно о десяти АМП, проходящих за рубежом предклинические и клинические испытания [11], однако ни один препарат на основе защитных пептидов животных пока не появился на фармацевтическом рынке. Подобная ситуация сложилась как из-за строгости критериев оценки эффективности и безопасности антимикробных средств, принятых Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA), так и из-за того, что эти критерии ранее были адаптированы для испытаний конвенциональных антибиотиков. Однако в настоящее время ведется разработка новых стандартов, учитывающих, в первую очередь, проблемы возникновения резистентности к препарату [11]. В пользу некоторого ослабления строгости критериев оценки безопасности противоинфекционных средств свидетельствует появление на фармацевтическом рынке синтетического пептидного антиретровирусного

препарата Enfuvirtide, разработанного компанией Trimeris (США) и выпускаемого компанией Roche под торговой маркой Fuzeon.

Активная научная работа, посвященная выделению и изучению структурно-функциональных свойств антимикробных пептидов животного происхождения, ведется во всем мире в течение трех последних десятилетий. К числу наиболее активных и устойчивых к действию протеаз АМП животного происхождения относятся молекулы, образующие стабилизированную дисульфидными связями β -шпилечную структуру. Однако сравнительно высокая цитотоксичность этих природных пептидов в отношении нормальных клеток млекопитающих ограничивает их дальнейшее применение в медицине. В данной работе было проведено структурно-функциональное исследование ряда АМП животного происхождения с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксические эффекты при использовании этих соединений. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получение рекомбинантных аналогов ряда антимикробных пептидов животного происхождения и сравнительный анализ их биологической активности.
2. Изучение взаимосвязи структуры и биологических свойств β -шпилечных антимикробных пептидов ареницина-1 и тахиплезина-1 с помощью сайт-направленного мутагенеза.
3. Создание менее токсичных аналогов β -шпилечных антимикробных пептидов, сохраняющих высокую антибактериальную активность.
4. Изучение эффектов совместного действия антимикробных пептидов на бактерии.

2. Обзор литературы

2.1. Введение. Антимикробные пептиды как факторы врожденного иммунитета

Приобретенный иммунитет в процессе эволюции возник лишь с появлением челюстных рыб около 500 млн. лет назад [12]. Так как беспозвоночные организмы лишены приобретенного иммунитета, при контакте с патогенами они могут полагаться только на систему врожденного ответа. Стоит отметить, что к беспозвоночным относится подавляющее число (более 98%) видов животных на Земле, причем жизненный цикл некоторых представителей превышает 100 лет [13]. Учитывая «эволюционный успех» беспозвоночных, можно говорить о высокой эффективности сформировавшихся у них систем защиты, ключевую роль в которой играют антимикробные пептиды. В многоклеточных организмах АМП могут распределяться системно, например, экспрессируясь в клетках гемолимфы беспозвоночных [14] или крови позвоночных [15], либо локализоваться в эпителиальных тканях, которые чаще других контактируют с патогенами (слизистые оболочки, кожа) [16,17]. Нарушения в экспрессии генов АМП приводят к развитию серьезных хронических инфекционных и воспалительных заболеваний [18]. Важно отметить, что заболевания могут быть связаны как с недостатком [19,20], так и с избытком АМП в организме [21], что подчеркивает ключевую роль этих соединений в регуляции иммунных процессов. Показано, что снижение уровня экспрессии β -дефенсинов может приводить к развитию раковых заболеваний у человека [22].

Молекулярный механизм антибиотического действия АМП в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны. На первом этапе происходит связывание АМП с клеткой-мишенью благодаря электростатическим взаимодействиям, обусловленным катионными свойствами АМП и отрицательным зарядом молекулярных компонентов поверхности клетки, например, липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий или липотейхоевых кислот (ЛТК) грамположительных бактерий. В ходе этого процесса происходит вытеснение двухвалентных катионов (Mg^{2+} и Ca^{2+}) молекулами АМП, приводящее к дестабилизации мембраны и дальнейшему проникновению АМП. Процессы, происходящие на поверхности мембраны, являются предметом дискуссий и по нынешний день. Были предложены три базовые модели, описывающие механизмы нарушения барьерных функций клеточной мембраны в присутствии АМП. Согласно первой из них, названной моделью «бочки из клепок» («barrel-stave» model) [23], 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. Впервые данная модель была предложена при изучении каналобразующего антибиотика аламетицина.

Учитывая высокое содержание основных аминокислотных остатков в структуре большинства АМП, образующиеся каналы должны обладать положительно заряженной внутренней поверхностью и быть анион-селективными. Вторая модель, основанная на представлении о формировании тороидальной поры («toroidal pore» model), применима в отношении более широкого круга АМП, хотя впервые была предложена для α -спирального АМП магейнина [24]. 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 [25]. Концепция данного механизма была сформулирована при изучении АМП цекропина, овиспирина и дермасептина. 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.

Селективность действия катионных АМП в отношении бактериальных клеток объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микроорганизмов и клеток организма-хозяина. В состав мембраны грамположительных бактерий главным образом входят кислые фосфолипиды, такие как фосфатидилглицерин (ФГ) и кардиолипин (КЛ), а грамотрицательных – цвиттерионный фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и минорная доля кислых липидов [26]. Дополнительный отрицательный заряд вносят ЛПС грамотрицательных бактерий и ЛТК грамположительных [27]. Эукариотическая мембрана, напротив, содержит значительную долю нейтральных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин (ФХ), сфингомиелин (СМ) и ФЭ. Вследствие указанных особенностей строения мембраны прокариот, имеющие большой суммарный отрицательный заряд, становятся предпочтительной мишенью для катионных АМП. Кроме того, наличие холестерина в структуре мембран клеток млекопитающих увеличивает жесткость бислоя и препятствует её перестройке под влиянием амфифильных АМП [28]. Показано, что высокий трансмембранный электрический потенциал у бактерий также способствует проникновению катионных АМП не только к поверхности, но и внутрь бислоя и даже внутрь клеток [29]. Также стоит отметить, что липидный состав и соответствующая ему спонтанная кривизна поверхности бактериальных мембран влияют на конформационные переходы и процессы олигомеризации АМП, необходимые для проявления ими биологической активности [30].

За миллионы лет борьбы с иммунной системой многоклеточных организмов, бактерии, за исключением нескольких видов [31], так и не смогли выработать и эволюционно закрепить эффективные механизмы резистентности в отношении защитных катионных АМП, поскольку для этого требуется внести серьезные изменения в структуру и электрофизиологические свойства клеточной мембраны [29]. Тем не менее, для снижения чувствительности к АМП некоторые патогенные микроорганизмы предпринимают временные меры защиты, такие как снижение отрицательного заряда на поверхности клетки путем модификации ЛПС [32] и ЛТК [33], химическая модификация фосфолипидов [34], подавление экспрессии кодирующих АМП генов в клетках организма-хозяина [35], биосинтез протеаз [36], образование биопленок и капсул [37], экспрессия эффлюксных насосов [38], секреция АМП-связывающих белков [39] и ДНК [40]. В отличие от традиционных антибиотиков при снятии селективирующего давления чувствительность к АМП быстро возвращается [41], что наводит на мысль о высокой нагрузке на метаболизм клетки, находящейся в состоянии повышенной устойчивости к катионным пептидам.

Наряду с обширными данными о мембранотропных свойствах АМП появляется все больше сведений о наличии внутриклеточных мишеней для катионных пептидов, что дополнительно снижает риск возникновения резистентности к этим соединениям [42]. Благодаря высокому содержанию остатков аргинина в структуре АМП многие из них способны эффективно связывать нуклеиновые кислоты за счет электростатических взаимодействий. 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 противогрибковой активностью, способны связываться с хитином [43].

Помимо инактивации микроорганизмов, в том числе бактерий, грибов, простейших, вирусов, а также опухолевых клеток АМП как молекулярные факторы системы врожденного иммунитета участвуют в регуляции иммунных реакций организма [44]. В частности, АМП осуществляют опсонизацию возбудителей инфекций [45], проявляют хемотаксическую активность в отношении макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [46], вызывают дегрануляцию тучных клеток [47], модулируют дифференцировку дендритных клеток [48], участвуют в регуляции ангиогенеза [49], обладают кортикостатической активностью [50], регулируют биосинтез цитокинов [51], способствуют ранозаживлению [52]. Иммуномодулирующая активность в кровотоке проявляется пептидами в наномолярных концентрациях, в то время как бактерицидный эффект достигается, как правило, в микромолярном диапазоне концентраций. В последние годы стало известно, что АМП также

могут регулировать работу и видовой состав полезных симбиотических микроорганизмов у многоклеточных видов [53,54]. Так, α -дефенсины 5 и 6 млекопитающих, которые конститутивно синтезируются клетками Панета слизистой оболочки кишечника, играют важную роль в функционировании микробиома животных [55,56].

К настоящему времени выделено и охарактеризовано около 4000 природных АМП [57]. 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 классификационным признаком оказалась пространственная структура пептидов. Впервые классификация на основе особенностей пространственной структуры АМП была предложена в 1995 году [58]. Большое значение в этой системе придается наличию дисульфидных связей в молекуле пептида и их числу. Однако наибольшее распространение получила классификация, в соответствии с которой АМП животного происхождения подразделяются на три структурных семейства. К первому относят пептиды, приобретающие преимущественно α -спиральную структуру при контакте с мембранами или в условиях гидрофобного окружения. Во второе семейство объединяют линейные пептиды, не образующие α -спиралей и отличающиеся повышенным содержанием определенных аминокислотных остатков (Gly, Pro, His, Trp). Третье семейство составляют пептиды, в структуре которых наблюдаются антипараллельные β -тяжи. Среди АМП последнего семейства встречаются молекулы со структурой β -складчатого листа, состоящего из трех тяжей (большинство дефенсинов позвоночных), либо с β -шпилечной структурой, образованной двумя тяжами, или со смешанной структурой, включающей в себя как β -складчатые листы, так и α -спирали.

Благодаря небольшому размеру, высокой устойчивости к протеолизу и широкому спектру биологической активности особый интерес в плане практического применения представляют β -шпилечные АМП, стабилизированные дисульфидными связями. Стоит отметить, что АМП данного структурного семейства немногочисленны и нашли распространение исключительно среди животных видов. Весьма условно, к сходным по структуре и, в ряде случаев, по механизму действия молекулам можно отнести некоторые бактериальные антибиотики, например, грамицидин С и его аналоги [59], а также липопептиды. Однако, их отличает биосинтез без участия рибосомы, циклическая структура, наличие значительных химических модификаций и отсутствие дисульфидных связей.

Данный обзор сфокусирован на особенностях биосинтеза, структуры и биологических свойств основных представителей семейства β -шпилечных АМП, разбитого на четыре подгруппы в зависимости от числа дисульфидных связей.

2.2. β -Шпильчатые АМП, стабилизированные одной дисульфидной связью

Бактенецины

Первый представитель данной группы АМП, названный бактенецином, был выделен из нейтрофилов быка. Бактенецин – небольшой антимикробный пептид, состоящий из 12 аминокислотных остатков (а.о.). Остатки цистеина в положениях 3 и 11 образуют дисульфидную связь, замыкающую 9-членный цикл [60]. Структура бактенецина, представляющая из себя амфифильную β -шпильку с β -изгибом I типа, сохраняет стабильность как в водных растворах, так и в условиях мембранного окружения [61,62].

С помощью иммунофлюоресцентного анализа с использованием моноклональных антител было показано, что молекулы зрелого бактенецина локализуются исключительно в нейтрофилах, в том числе, находящихся на стадии созревания в костном мозге [63]. Эти данные согласуются с результатами исследования, в котором присутствие транскриптов бактенецина было показано только для тканей костного мозга [64]. Таким образом, созревание бактенецинов в гранулах нейтрофилов может происходить одновременно с дифференцировкой клеток. Аналогичным образом происходит биосинтез α -дефензинов человека. Процессинг может происходить заблаговременно до секреции АМП и непосредственно в момент высвобождения и контакта с патогеном. АМП при этом депонируются в гранулах в виде либо зрелых молекул, либо пропоследовательностей [65]. Бактенецин, как и другие β -шпильчатые АМП, например, протегрины из лейкоцитов свиньи, относится к семейству кателицидинов [66]. Это семейство характеризуется общим происхождением от идентичного белка-предшественника, включающего сигнальный пептид, так называемый кателин-подобный домен и вариабельный зрелый пептид, образование которого осуществляется с помощью присущей данному семейству системы процессинга. Кателин-подобный домен состоит из 98–114 а.о., включает четыре консервативных остатка цистеина и имеет высокую степень гомологии с ингибитором катепсина L из лейкоцитов свиньи [67].

Изучение биосинтеза бактенецина показало, что данный пептид может не только продуцироваться *in vivo* в виде β -шпильки, но и формировать димеры с образованием двух межмолекулярных дисульфидных связей [68]. Дальнейшие исследования показали, что восстановленный бактенецин при окислении в условиях *in vitro* способен самопроизвольно переходить в форму димера с антипараллельной ориентацией β -шпилек [69]. При этом антимикробная активность димера бактенецина возрастала не менее чем в два раза по сравнению с мономерной формой [70]. Более того, димеризация усиливает способность к неспецифическому лизису мембран как бактериальных клеток, так и эритроцитов. По-

видимому, аналогичный процесс замыкания одной межмолекулярной дисульфидной связи является начальной стадией образования θ -дефенсинов из двух пропептидов [71].

Изоформа бактенецина была найдена и у другого представителя млекопитающих – домашней овцы *Ovis aries*. Анализ генов, кодирующих кателицидины овцы, показал среди ряда других АМП наличие двух генов *OaDodeA* и *OaDodeB*, кодирующих один и тот же пептид (OaBac), гомологичный бактенецину быка [72] (Рисунок 1).

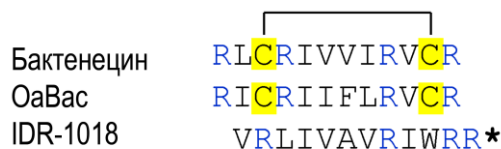


Рисунок 1. Сравнение первичной структуры бактенецинов и их производного IDR-1018. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками над аминокислотными последовательностями обозначены дисульфидные связи. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование.

Природный бактенецин обладает антибиотической активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [73]. Данные о механизме действия бактенецина на бактериальные клетки весьма противоречивы. Исследования на бислойных липидных мембранах (БЛМ) показали, что бактенецин способен вызывать полную деполяризацию модельной мембраны *E. coli*, действуя в количественных соотношениях, на порядок превышающих значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) [74]. Эти данные свидетельствуют в пользу механизма, связанного с проникновением пептида внутрь клетки-мишени без лизиса мембраны. Однако, в другом исследовании была показана способность быстро вызывать деполяризацию мембраны грамотрицательных бактерий после связывания с ЛПС, подобно липопептидному антибиотику полимиксину В [75]. Способность лизировать бактериальные клетки авторы связывают с формированием димеров пептида за счет нековалентных взаимодействий при связывании с мембраной. Бактенецин и его аналоги не способны вызывать лизис эритроцитов при концентрациях вплоть до 64 мкг/мл, однако инициируют их агглютинацию при более низких концентрациях [73]. Кроме того, была показана высокая цитотоксичность бактенецина в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток (клеточной линии глиобластомы) млекопитающих [76].

По сравнению с другими β -спилечными АМП природный бактенецин обладает менее выраженной антимикробной активностью, однако благодаря небольшому размеру активно использовался как основа для создания более эффективных АМП. Так, были предприняты попытки повысить его активность и расширить спектр активности путём модификации

амфифильности и изменения расположения положительно заряженных остатков [73], успешно завершившиеся получением более активных аналогов.

Стоит отметить, что линеаризация бактенецина путем восстановления дисульфидных связей кардинальным образом изменяла спектр активности пептида, однако не влияла на способность эффективно связывать ЛПС [77]. Линейный бактенецин был выбран в качестве основы для рационального дизайна *in silico* терапевтически ценных аналогов с применением искусственных нейронных сетей [78,79]. В результате скрининга последовательностей были отобраны наиболее перспективные аналоги, обладающие как антимикробной, так и иммуномодулирующей активностью [80]. Так, аналог IDR-1018 (Рисунок 1), обладающий широким спектром биологической активности (антимикробной, противовоспалительной, ранозаживляющей и др.), рассматривается в качестве иммуномодулятора нового поколения [81], а аналог IMX942 к настоящему моменту проходит вторую фазу клинических испытаний как антибиотик для больных с фебрильной нейтропенией [82].

Некоторые из этих пептидов, в том числе IDR-1018, обладают ингибирующей активностью *iv vivo* в отношении вируса герпеса. Показано, что их действие связано с блокировкой проникновения вирусной частицы внутрь клетки-мишени [83].

Тигеринины и ранациклины

Кожный покров амфибий является богатейшим источником природных АМП. После обнаружения в 1969 году первого АМП в кожном секрете жерлянки *Bombina variegata* было показано, что практически любой вид амфибий способен синтезировать широкий спектр защитных пептидов, длина которых составляет от 10 до 50 аминокислотных остатков [84]. Ранее АМП амфибий было принято разделять на два структурных класса: линейные α -спиральные (бомбинины, буфорин, магейнины, темпорины и др.), а также пептиды, в С-концевой части которых располагается так называемый «Rana-box» – циклический участок из 6-8 аминокислотных остатков, образующийся благодаря замыканию дисульфидной связи с участием С-концевого цистеина (эскулентины, бревенины, гаегурины, раналексины) [85–89]. Представители последней группы структурно напоминают липопептидные антибиотики бактериального происхождения – полимиксины, однако подавляют рост бактериальных микроорганизмов в значительно более высоких концентрациях [90]. Позднее у амфибий были обнаружены короткие АМП, образующие β -шпильку, стабилизированную одной дисульфидной связью. Данный структурный класс включает в себя тигеринин-подобные пептиды и ранациклины (Рисунок 2).

Тигеринины были впервые выделены из кожи лягушки *Rana tigerina* в 2001 году [91]. Эти пептиды значительно отличаются от других представителей АМП земноводных. Они состоят из

11–12 аминокислотных остатков, а два остатка цистеина, входящих в состав пептидов, образуют дисульфидную связь таким образом, что большая часть молекулы представляет из себя 9-членный цикл (Рисунок 2). Эта структурная особенность сближает тигеринины с бактенецином. Сходство сохраняется также и в спектрах активности пептидов. Тигеринин и его структурные аналоги обладают антимикробной активностью в отношении широкого круга патогенных микроорганизмов [92].



Рисунок 2. Сравнение первичной структуры тигеринин-подобных пептидов, а также ранациклина B1 и ингибитора трипсина SFTI-1. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи. Жирной линией обозначена пептидная связь, замыкающая в цикл структуру SFTI-1. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование.

В дальнейшем из других видов амфибий были выделены новые тигеринин-подобные АМП [84,93], причем для тигеринина-1M антимикробная активность отсутствовала даже при тестировании в концентрации 200 мкМ [94]. Роль пептидов, не обладающих бактерицидным действием, по-видимому, связана со способностью регулировать работу иммунных клеток. Было показано, что тигеринин-подобные пептиды способны оказывать противовоспалительный эффект, влияя на биосинтез ряда цитокинов, в частности, усиливая биосинтез интерлейкина-10 [95]. Отдельно следует упомянуть тигеринин-1R, выделенный из кожного секрета лягушки *Hoplobatrachus rugulosus* [96]. Было установлено, что тигеринин-1R, обладая антимикробным действием, также способен стимулировать выработку инсулина. Пептид вызывает деполяризацию мембраны и увеличивает 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 тигерина-1R препарата, эффективного при сахарном диабете второго типа [96,97].

Ранациклины можно отнести к бифункциональным молекулам, поскольку они проявляют как антибиотические свойства в отношении бактерий и дрожжей, так и способность ингибировать активность сериновых протеаз [98]. Известно, что секретируемые протеазы микроорганизмов играют важную роль в развитии ряда заболеваний [99]. Ингибиторы сериновых протеаз широко представлены у животных видов, однако размер полипептидов, как правило, превышает 5 кДа [98]. Ранациклины состоят из 17–20 а.о. и считаются наименьшими по размеру ингибиторами сериновых протеаз животного происхождения. Наличие характерной реакционной петли и консервативных аминокислотных остатков позволило отнести ранациклины к ингибиторам сериновых протеаз семейства Баумана-Бирка [100]. Полученные позднее кристаллические структуры комплексов ранациклинов с трипсином подтвердили это предположение [101]. Ближайшим гомологом ранациклинов является ингибитор трипсина из подсолнечника SFTI-1. Данный пептид имеет циклическую структуру [102], состоит из 14 а.о. и является самым эффективным ингибитором семейства Баумана-Бирка [103]. Циклическая структура, по-видимому, необходима для повышенной протеолитической устойчивости пептида, поскольку линейный аналог SFTI-1 также имеет высокую ингибирующую активность. Размер реакционной петли ранациклинов составляет 11 а.о., в то время как для ингибиторов Баумана-Бирка характерен размер петли 9 а.о. Стоит отметить, что пептидомный анализ кожного секрета вида *Rana palustris* показал наличие ингибиторов с «классическим» размером петли 9 а.о. [104]. Анализ структуры генов ранациклинов подтвердил высокую степень гомологии их белков-предшественников с таковыми для многих АМП амфибий, что наводит на мысль об эволюционном родстве этих классов пептидов [101]. Так, для ранациклина-B1 была показана как высокая антимикробная активность, сопоставимая со многими АМП амфибий, так и умеренная активность как ингибитора. Подобная бифункциональность ранациклинов представляется чрезвычайно ценной для защиты от возбудителей инфекций, поскольку микробные протеазы могут выступать не только как факторы патогенности, действуя на ткани организма, но и как факторы резистентности, действуя на молекулы АМП [36,105–107].

Танатин

Среди множества АМП, выделенных из насекомых, танатин клопа-щитника *Podisus maculiventris* является единственным пептидом, молекула которого обладает β -шпилечной структурой. Зрелый танатин состоит из 21 а.о. и несет значительный положительный заряд (+6) при физиологических значениях pH [108]. Обнаружено, что танатин продуцируется в жировом теле насекомого при экспериментальном инфицировании

патогенными микроорганизмами. Данная система биосинтеза АМП характерна для большинства насекомых [109]. У эволюционно более древних классов беспозвоночных, таких как полихеты, меростомовые и другие хелицеровые или ракообразные членистоногие, синтез АМП происходит, как правило, конститутивно в циркулирующих иммунных клетках.

Танатин не имеет существенной гомологии с другими защитными пептидами насекомых, однако, пептид близок по первичной и вторичной структуре к АМП из кожных секретов лягушек [87]. Степень гомологии между танатином и бревинином-1 из кожи японской лягушки *Rana brevipoda* приближается к 50%, оба пептида содержат небольшой цикл в С-концевой части молекулы, замкнутый дисульфидной связью и включающий восемь (танатин) или семь (бревинины) аминокислотных остатков (Рисунок 3).

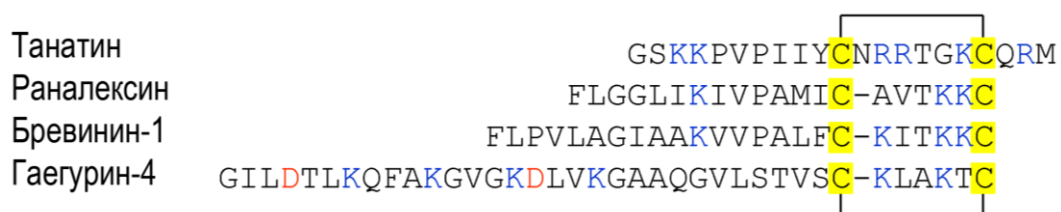


Рисунок 3. Сравнение первичной структуры танатина и α -спиральных АМП амфибий. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки, красным – остатки аспарагиновой кислоты. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи.

Характерный для бревининов мотив «Rana-box», как было отмечено ранее, обнаружен также у многих АМП амфибий – эскулентинов, гаегуринов, раналексинов. Во всех перечисленных молекулах цикл содержит основные остатки, а также остаток треонина. Несмотря на высокое, на первый взгляд, сходство танатина с АМП амфибий, их пространственные структуры кардинально различаются. У танатина циклический мотив играет ключевую роль в образовании жесткой β -шпилечной структуры, а N-концевой фрагмент подвижен и не структурирован вследствие наличия двух остатков пролина [110]. В отличие от танатина вышеперечисленные АМП амфибий образуют линейную α -спиральную структуру в условиях гидрофобного окружения (Рисунок 4), а положительно заряженный петлевой мотив играет роль своеобразного «якоря» при взаимодействии с мембраной бактерий [87,90].

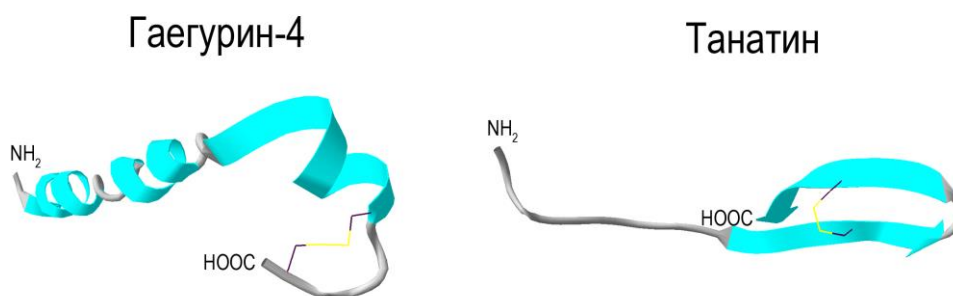


Рисунок 4. Пространственные структуры гаегурина-4 из бугорчатой лягушки *Rana rugosa* [87] и танатина из клопа-щитника *Podisus maculiventris* [110].

Также стоит отметить, что у АМП амфибий «Rana-box» играет роль защиты от действия карбоксипептидаз, поскольку в замыкании цикла с помощью образования дисульфидной связи участвует С-концевой остаток цистеина.

Танатин характеризуется наиболее широким спектром антибактериальной и противогрибковой активностей среди известных АМП насекомых. Он способен подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей в концентрациях, в большинстве случаев не превышающих 10 мкМ [108]. Кроме того, пептид активен в отношении ряда бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе антибиотикоустойчивых штаммов *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae*. Танатин также повышает эффективность ряда классических антибиотиков в отношении клинических изолятов антибиотикорезистентных микроорганизмов, экспрессирующих эффлюксные насосы, которые обеспечивают множественную лекарственную устойчивость патогенов [111]. Однако, не все клинические изоляты полирезистентных бактерий оказались чувствительны к АМП: штаммы *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и *Proteus mirabilis* оказались высокоустойчивыми к действию аналога танатина [112], что может свидетельствовать о наличии кросс-резистентности. Известно, что бактерии *P. mirabilis* способны синтезировать неспецифичную металлопротеиназу ZapA, которая участвует не только в патогенезе, но и активно разрушает устойчивый к протеолитической деградации β -дефенсин-1 [113]. Кроме того для *P. mirabilis* характерна защита от АМП путем модификации структуры липида А, что делает микроорганизмы резистентными ко многим АМП и антибиотикам, мишенью для которых является ЛПС [114]. Интересен тот факт, что бактерии родов *Serratia* и *Morganella* имеют природную повышенную устойчивость к катионным АМП, поскольку их мембраны не обладают высоким отрицательным зарядом [115]. Таким образом, косвенно подтверждается предположение о «ковровом» механизме действия танатина [116], для которого ключевую роль играют электростатические взаимодействия на поверхности клетки-мишени.

В отличие от других β -шпилечных АМП D-энантиомер танатина полностью теряет активность в отношении грамотрицательных и отдельных видов грамположительных бактерий, что наводит на мысль о существовании нескольких механизмов действия этого пептида. Удаление С-концевого трипептида QRM из структуры танатина (по аналогии с бревининами) также приводит к потере активности против грамположительных бактерий. Противогрибковая активность оказалась идентичной для D- и L-изоформ.

В ходе структурно-функциональных исследований танатина был открыт ряд аналогов с улучшенными терапевтическими свойствами [117,118]. Не вполне ясна роль консервативного для танатина и АМП амфибий остатка Thr¹⁵, поскольку его удаление или замена на остаток

серина приводили к увеличению антимикробной активности танатина. Наибольший интерес среди аналогов вызвали укороченный аналог R-танатин, а также S-танатин, в котором треонин в положении 15 был заменен на серин. R-танатин, состоящий из 12 а.о., способен эффективно подавлять рост и образование биопленок у различных штаммов MRSA *in vitro*. R-танатин, равно как и амидированный аналог танатина, доказали свою высокую эффективность, сопоставимую с классическими антибиотиками, как препараты для системного применения *in vivo* [119,120]. Антибактериальная активность танатина и его аналогов стремительно снижается при повышении ионной силы среды, что отличает данный пептид от других β -спилечных АМП и ограничивает его практическое применение [121]. Тем не менее, была показана эффективность S-танатина в отношении мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* как в условиях *in vitro* [122], так и при системном применении в экспериментах на мышах [123,124].

Танатин не проявляет гемолитической активности даже в концентрациях, которые на порядок превышают значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в отношении бактерий, что свидетельствует о высокой селективности действия. Особую роль в обеспечении низкой цитотоксичности танатина и ряда других АМП играет холестерин, придающий повышенную жесткость мембранам клеток млекопитающих [28,125]. В экспериментах по определению острой токсичности пептид продемонстрировал высокую безопасность при внутривенном введении, а значение полумлетальной дозы (ЛД₅₀) составило более 400 мг/кг [126]. Для танатина не была показана иммуномодулирующая функция, однако высокое сродство к ЛПС позволяет рассматривать его как потенциальное средство против эндотоксемии [127,128].

Способность танатина эффективно подавлять рост фитопатогенных грибов была использована в области биотехнологии растений. Так, трансгенные культуры риса и арабидопсиса, содержащие ген танатина, показали высокую устойчивость к ряду фитопатогенов [129–131]. Также ведутся работы по созданию трансгенных животных, обладающих повышенным иммунитетом за счет экспрессии танатина [132].

Лактоферрицины

Лактоферрицины представляют собой фрагменты N-концевого функционального домена лактоферрина, образующиеся при его ограниченном протеолизе пепсином в кислых условиях (Рисунок 5). Лактоферрин – multifunctional железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа, в настоящее время рассматриваемый в качестве одного из неотъемлемых элементов противoinфекционной защитной системы человека и животных.

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 спектра микроорганизмов [139], действуя как по бактерицидному, так и по бактериостатическому механизму [140]. На первом этапе пептид связывается с ЛПС грамотрицательных или ЛТК грамположительных бактерий. Преобладающим механизмом действия на мембраны считается транслокация, не сопровождающаяся лизисом, и связывание с внутриклеточными мишенями, такими как ДНК [141]. В некоторых исследованиях производные лактоферрицина человека проявляли свойства, характерные для пептидов – пептидов, способных пересекать мембраны клеток, не нарушая их целостности [142]. Структурно-функциональные исследования лактоферрицина В показали ключевую роль высокого положительного заряда молекулы, а также остатков триптофана в проявлении антимикробной активности пептида [143].

Противовирусное действие пептида лактоферрицина В выражено намного слабее, чем у нативного коровьего лактоферрина. Тем не менее, пептид оказывает ингибирующий эффект на ряд вирусов [144–146]. Лактоферрицин В способен повышать эффективность не только конвенциональных антибиотиков [147], но и противовирусных препаратов [148]. Наряду с подавлением болезнетворных бактерий, лактоферрицин В обладает ингибирующей активностью в отношении некоторых возбудителей микозов, включая *Candida albicans*, целого ряда дерматофитов [149], а также возбудителей протозойных заболеваний [150].

Как и в случае с бактериальными клетками, мишенью для многих катионных АМП являются мембраны опухолевых клеток. В частности, АМП могут нарушать целостность как цитоплазматической мембраны клетки, так и митохондриальной мембраны. В первом случае результатом действия пептида, как правило, является некроз клетки, а во втором – апоптоз как следствие высвобождения цитохрома С из поврежденных митохондрий и активации каспаз [151–153]. Селективность действия катионных АМП определяется рядом физиологических особенностей раковых клеток. В норме мембраны клеток млекопитающих снаружи представлены цвиттерионными фосфолипидами – фосфатидилэаноламином (ФЭ), фосфатидилхолином (ФХ) и сфингомиелином (СМ), однако для опухолевых клеток характерен иной состав мембран. Цитоплазматическая мембрана трансформированных клеток приобретает выраженный отрицательный заряд из-за высокого содержания фосфатидилсерина (ФС) [154,155], гликопротеинов и гликолипидов, обогащенных сиаловыми кислотами [156–158], а также протеогликанов, обогащенных сульфатом гепарина [159]. Потеря асимметрии в распределении липидов была продемонстрирована на примере многих типов опухолевых линий клеток, что говорит о возможности рассматривать данное явление как ключевой маркер

раковых клеток. Кроме того, для опухолевых клеток характерно повышение текучести мембран за счет пониженного содержания холестерина. Примечателен тот факт, что устойчивые к АМП опухолевые линии рака простаты и молочной железы синтезируют повышенные количества холестерина, что повышает жесткость и плотность упаковки мембраны, препятствуя ее лизису [160].

Лактоферрицин В проявляет *in vitro* противоопухолевую активность в отношении различных типов малигнизированных клеток, образующихся при лейкозах, фибросаркоме и нейробластоме, в концентрациях, нетоксичных для фибробластов и эритроцитов. Стоит отметить, что лактоферрицин В вызывает гибель опухолевых клеток как в результате некроза, так и апоптоза [161–164]. При действии на клетки лимфомы лактоферрицин В вызывает апоптоз, однако механизм процесса не связан с активацией каспаз [165].

Несмотря на снижение активности лактоферрина В в присутствии белков плазмы крови, он показал высокую эффективность *in vivo* в экспериментах на мышах при лечении рака легких, печени, толстой кишки, меланомы, лимфомы, фибросаркомы и нейробластомы [161,163,165,166].

В дополнение к вышеописанным свойствам лактоферрицин В обладает иммуномодулирующей активностью, выступая в роли противовоспалительного агента [167]. Этот эффект объясняется способностью лактоферрина В связывать неметилированные CpG-содержащие олигонуклеотиды, выделяющиеся в окружающую среду при гибели или в процессе деления бактериальных клеток и активирующие воспалительные процессы в организме [168]. Лактоферрицин В способен также активно связывать бактериальные эндотоксины, тем самым ингибируя активность клеток иммунной системы [169]. К настоящему времени фрагмент лактоферрина человека (hLF1–11), обладающий противовоспалительной активностью, прошел первую стадию клинических испытаний в качестве иммуномодулятора [170].

Ареницины

Ареницины – катионные пептиды, выделенные из целомоцитов морского кольчатого червя пескожила *Arenicola marina* [171]. Молекулы ареницинов представлены двумя изоформами, состоят из 21 аминокислотного остатка, шесть из которых – основные остатки аргинина, и стабилизированы одной дисульфидной связью, образующей 18-членный макроцикл (Рисунок 7).

Структура препропоследовательности ареницинов является типичной для множества АМП и включает в себя N-концевой гидрофобный сигнальный участок (25 а.о.), центральный анионный фрагмент (156 а.о.), необходимый для нейтрализации заряда катионного АМП, и зрелый пептид (21 а.о.).

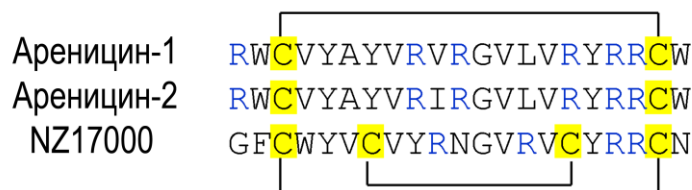


Рисунок 7. Сравнение первичных структур изоформ ареницина из морского кольчатого червя *Arenicola marina*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи.

Поскольку пескожилы, аналогично другим морским беспозвоночным, находятся в непрерывном контакте с большим количеством микроорганизмов, в покровных тканях животного происходит конститутивный биосинтез ареницинов, однако, в сравнительно невысоких концентрациях. О важной роли ареницинов в защитной системе пескожилов говорит высокая антимикробная активность в растворах с высокой концентрацией солей, вплоть до 0,5 М NaCl, и при низкой температуре [172], что характерно для среды обитания животных. Методами ПЦР и иммуногистохимии показано, что ареницины вне зависимости от наличия патогенов синтезируются в высокой концентрации в целомотитах и участвуют в процессе фагоцитоза [173]. У других представителей морских беспозвоночных, в том числе у других видов полихет, наблюдается аналогичный механизм ответа, однако он дополняется секрецией АМП в целомическую жидкость [174].

Пространственная структура ареницинов в водных растворах представляет собой β -шпильку, скрученную на $\sim 200^\circ$, стабилизированную девятью водородными и одной дисульфидной связью [172,175]. В обеих изоформах присутствует β -изгиб I типа. Кроме того, методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и молекулярной динамики был показан вклад в стабилизацию структуры π -катионных взаимодействий между остатками Tyr⁵, Tyr⁷, Tyr¹⁷, Trp²¹ и Arg¹⁸, Arg¹⁶, Arg¹⁹, Arg¹, соответственно [175,176].

Несмотря на минимизацию размера гидрофобной поверхности за счет образования кора из остатков Val⁸, Val/Ile¹⁰, Val¹³ и Val¹⁵, ареницины сохраняют амфифильные свойства и склонность к агрегации даже в водных растворах. Методами спектроскопии ЯМР и кругового дихроизма (КД) было показано, что в условиях гидрофобного окружения ареницины сохраняют β -шпильчатую структуру, однако молекула становится более плоской [177,178]. Более того, в присутствии мицелл додецилфосфохолина (ДФХ), имитирующих нейтральные мембраны клеток млекопитающих, ареницин-2 образует устойчивые димерные структуры, обладающие еще более выраженной амфифильностью [179]. Показано, что ареницины способны взаимодействовать с нейтральными мембранами, состоящими из 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолина (ПОФХ), а также фосфатидилхолиновыми липосомами [180], что

подтверждается высокой гемолитической активностью пептидов [172,181]. Электрофизиологические исследования на бислойных липидных мембранах (БЛМ) показали способность ареницинов формировать поры в мембранах, построенных как из отрицательно заряженных, так и цвиттерионных липидов [172].

Природные ареницины проявляют выраженную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, патогенных грибов и дрожжей даже в условиях высокой ионной силы [171,172]. Различными методами была показана способность ареницинов нарушать целостность бактериальных мембран. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о бактерицидном, а не о бактериостатическом механизме действия ареницинов, однако наличие внутриклеточных мишеней для ареницинов не исключается [180]. Механизм действия ареницина, по-видимому, связан с процессами олигомеризации пептида [178,182]. В условиях мембранного окружения происходят конформационные изменения и димеризация пептида, что приводит к образованию олигомерных пор, формируемых с участием липидов [179]. При этом димеры приобретают трансмембранную ориентацию таким образом, что N- и C-концевые фрагменты и β -изгиб контактируют с полярными средами на наружной и внутренней сторонах мембраны. Подобный механизм деполяризации мембраны с образованием тороидальных пор, сформированных из димеров пептида, был описан ранее для β -спиличного АМП протегрина [183,184]. Однако, в случае с ареницинами образование димера связано с асимметричным параллельным взаимодействием N-концевых β -тяжей пептида (Рисунок 8).

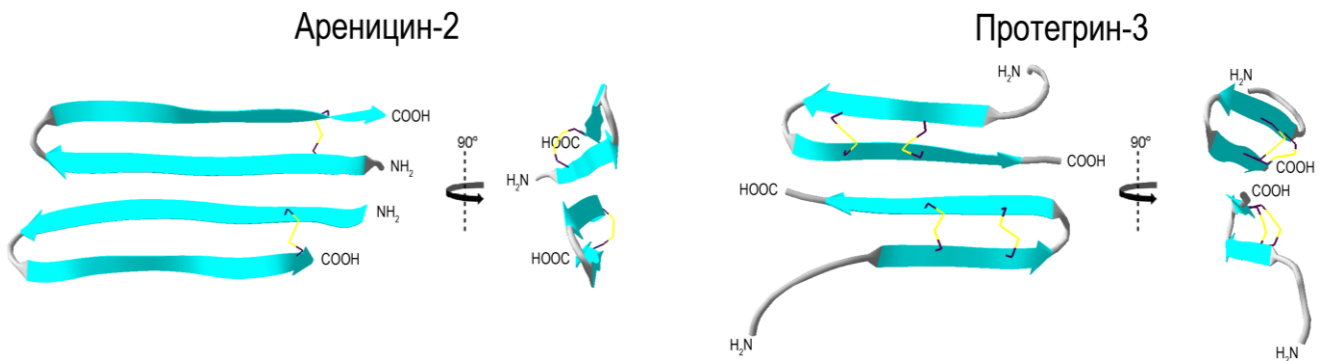


Рисунок 8. Пространственные структуры димеров ареницина-2 [179] и протегрина-3 [184] в присутствии мицелл додецилфосфохолина.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было показано, что при концентрациях, на порядок превышающих МИК, ареницины вызывают полный лизис мембран в течение 30 минут [172]. Способность ареницинов повышать проницаемость мембран была доказана в ходе изучения синергизма с рядом конвенциональных антибиотиков [185]. Повышение эффективности при совместном применении может быть связано с дестабилизацией мембран бактерий, препятствующих процессу диффузии антибиотиков внутрь клетки. Противогрибковое действие

ареницина-1 в отношении дрожжей и дерматофитов связывают не только с прямым действием на мембрану клеток, но и с запуском апоптотического каскада как результата накопления в клетке активных форм кислорода, индуцируемого пептидом [186,187].

Ряд структурно-функциональных исследований ареницинов дополнил информацию об их механизме действия, однако не привел к созданию терапевтически ценных и безопасных для клеток млекопитающих аналогов. В частности, было показано, что отсутствие дисульфидной связи приводит к снижению антимикробной активности в отношении бактерий [177]. В присутствии физиологических и более высоких концентраций солей данный эффект был еще более выраженным, причем в отношении грамотрицательных бактерий *P. mirabilis* активность исчезала [180]. Введение дополнительной дисульфидной связи, наоборот, в небольшой степени повышает антимикробную активность пептида, однако усиливает агрегацию пептида в растворе [188]. Замена сразу шести остатков аргинина на остатки лизина, а также Arg¹¹ в области β -изгиба на аланин приводили к снижению антимикробной активности в отношении большинства тестируемых бактерий, что подчеркивает важную роль гуанидиновой группы в структуре аргинина во взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидами [189,190]. Удаление N-концевого дипептида RW приводит к снижению антимикробной активности в несколько раз [189,191], что подчеркивает особую роль концевых остатков наряду с остатками в области β -изгиба в реализации механизма действия ареницинов.

В 2005 году датской фармацевтической компанией Adenium Biotech был запатентован выделенный из морского кольчатого червя *A. marina* антимикробный пептид NZ17000, названный авторами ареницином-3 [192]. NZ17000 и открытые ранее ареницин-1 и ареницин-2 [171] обладают идентичным спектром биологической активности. Тем не менее, пептид значительно отличается по структуре от двух других представителей семейства (Рисунок 7): степень гомологии на уровне кодирующей нуклеотидной и аминокислотной последовательности белков-предшественников составляет всего 57% и 44%, соответственно. NZ17000 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 штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. В отличие от ареницинов-1 и -2, β -структура молекулы NZ17000 стабилизирована двумя дисульфидными связями, а также сайтом Asn-Gly в области β -изгиба [193]. Кроме того, NZ17000 не вызывает характерный для ареницинов лизис бактериальных клеток, однако нарушает целостность их мембран, а также ингибирует процессы биосинтеза белка в клетке. По-видимому, механизм действия NZ17000 на мембрану не связан с олигомеризацией пептида, что подтверждается менее выраженной гемолитической активностью NZ17000 по сравнению с ареницинами.

Использование систем высокопроизводительного скрининга комбинаторных библиотек позволило создать широкий спектр аналогов ареницина-3, структуры которых были запатентованы [192]. Изучение антимикробного действия этих аналогов 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 [11].

2.3. β -Шпилечные АМП, стабилизированные двумя дисульфидными связями

Протегрины

Семейство протегринов, впервые выделенных из нейтрофилов свиньи более 20 лет назад [194], включает пять изоформ, состоящих из 16–18 аминокислотных остатков (Рисунок 9). Стабильность пространственной структуры протегринов обеспечивается двумя внутримолекулярными дисульфидными связями [195], однако их расположение отличается от других β -шпилечных АМП.

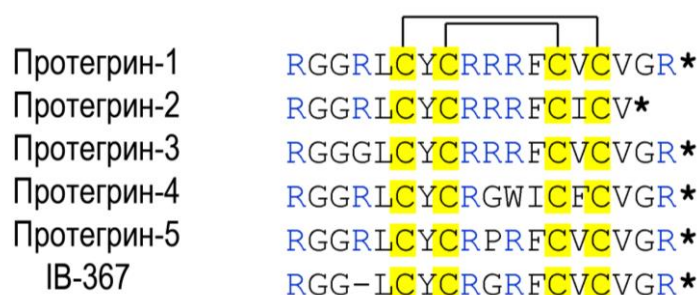


Рисунок 9. Сравнение первичной структуры протегринов и их аналога IB-367. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование.

Как и бактенецины, протегрины принадлежат к семейству кателицидинов – АМП, которые синтезируются как С-концевая часть белка-предшественника, содержащего консервативный кателин-подобный домен. Протегрины депонируются в гранулах нейтрофилов в виде пропоследовательностей, а образование зрелых пептидов происходит во внеклеточном пространстве в ходе протеолитического процессинга эластазой [196]. Таким образом, созревание протегринов может активироваться, в том числе, рядом бактерий, продуцирующих

эластазу [36]. Основную функцию кателин-подобного домена связывают как с нейтрализацией токсичности протегринов за счет гидрофобных взаимодействий, так и с защитой АМП от быстрой деградации в очаге инфекции. Показано, что кателин-подобные домены структурно и функционально близки ингибиторам протеаз семейства цистатинов [68,197].

Кателицидины были обнаружены у рыб, птиц, змей и млекопитающих [198]. У отдельных видов могут присутствовать представители различных классов кателицидинов. Так, среди кателицидинов свиньи можно выделить два ключевых компонента: протегрины и пептид PR-39, обогащенный остатками пролина и аргинина. Оба типа АМП обладают высокой антимикробной активностью, однако первые повышают проницаемость и деполаризуют мембрану микроорганизмов, а PR-39 действует на внутриклеточные мишени [199]. Можно предположить, что эти пептиды действуют в синергизме друг с другом, поскольку оба синтезируются в лейкоцитах. Тот факт, что кателицидины были обнаружены у миксиновых – примитивных бесчелюстных рыб [200] – говорит об универсальности и древности данной системы биосинтеза защитных пептидов, с помощью которой организмы способны тонко настраивать иммунный ответ в зависимости от особенностей окружающей микрофлоры.

Протегрины относятся к числу наиболее активных АМП животного происхождения. Минимальная ингибирующая концентрация протегрина-1 в отношении большинства бактериальных штаммов составляет менее 0,5 мкМ [201]. Для сравнения, дошедший до третьей стадии клинических испытаний антибиотический препарат MSI-78 [11] – высокоактивный аналог одного из наиболее известных α -спиральных АМП магейнина, выделенного из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и действующего по сходному с протегринами мембранотропному механизму – проявляет активность в отношении широкого спектра штаммов бактерий в концентрациях ~2–4 мкМ и выше [202].

Благодаря высокому положительному заряду и жёсткой пространственной структуре повышение ионной силы не оказывает влияния на антимикробные свойства протегринов. Спектр антибактериальной активности протегринов практически неограничен и включает подавление возбудителей туберкулеза [203], периодонтита [204] и ряда заболеваний, передающихся половым путем [205–207]. Исследования эффективности противоинфекционного действия протегринов при внутривенном введении животным давали противоречивые результаты. Во всех случаях применение протегрина приводило к снижению концентрации патогенов в крови [201,208]. Однако, из-за высокой цитотоксичности выживаемость животных в ряде случаев оставалась на уровне контрольной группы [209]. Трансгенная линия мышей, способных синтезировать протегрин, обладала повышенной устойчивостью к бактериям *Actinobacillus suis* [210].

Помимо антибактериального действия, протегрины способны проявлять активность в отношении дрожжей и вирусов [211]. Противоопухолевая активность была продемонстрирована *in vitro* в отношении суспензионных клеточных линий лейкемии и лимфомы, а также адгезивных культур карциномы, остеосаркомы и фибросаркомы [212–214]. Предположительно, механизм действия пептида связан как с повреждением клеточных мембран, так и с запуском апоптотических процессов.

Механизм действия протегринов на бактериальные клетки хорошо изучен [183,215,216]. Как и большинство других β -шпилечных АМП, на начальной стадии пептиды взаимодействуют с липополисахаридами и липотейхоевыми кислотами на поверхности клеток благодаря электростатическим взаимодействиям. Далее происходит взаимодействие амфифильных молекул АМП с мембраной, сопровождающееся изменением кривизны поверхности, и формирование ион-проницаемых каналов в соответствии с моделью тороидальной поры. Особую роль в структуре протегринов играют остатки аргинина. Их расположение обуславливает перпендикулярную трансмембранную ориентацию β -шпилек в бислое благодаря взаимодействию гуанидиновых групп остатков аргининов с фосфатными группами полярных головок липидов [183]. При изучении пространственной структуры протегринов в присутствии нейтральных мицелл и липосом была показана способность пептидов формировать димерные плоские структуры путем параллельной [217] и антипараллельной [184,218] ассоциации С-концевых β -тяжей (Рисунок 8). По-видимому, именно димер пептида является минимальным структурным элементом при формировании пор различного размера.

Из-за способности образовывать олигомерные структуры и нарушать целостность нейтральных мембран нативные протегрины нельзя отнести к числу безопасных препаратов с точки зрения применения в медицине. В частности, протегрины способны лизировать человеческие эритроциты при концентрациях, близких к минимальным значениям, при которых наблюдается подавление роста микроорганизмов. В то же время, концентрация протегринов в жидкости, полученной из гнойной полости при абсцессе у свиней, достигала 50 мкМ [219]. Стоит отметить, что в отличие от человеческих, эритроциты отдельных представителей парнокопытных видов, включая свиней, коз и быков, резистентны к действию протегринов [220]. Одной из причин такой селективности в отношении эритроцитов разных видов могут быть различия в строении и липидном составе их мембран. Так, характерной особенностью строения мембран эритроцитов быков является чрезвычайно низкая доля (2%) фосфатидилэтаноламина (ФЭ) во внешнем липидном слое [221], что на порядок ниже значений для человеческих эритроцитов [30]. Известно, что присутствие ФЭ благодаря особенностям строения данного фосфолипида вызывает появление отрицательной кривизны поверхности мембраны [222]. В последние годы появилось множество исследований, в которых мембранную

селективность АМП связывают не только с зарядом, но и с кривизной поверхности мембраны, которая может изменяться благодаря различным факторам, например, асимметрии в распределении фосфолипидов в бислое [223]. В частности, связь между способностью разрушать мембранные структуры и наличием в их составе ФЭ, формирующего отрицательную кривизну поверхности, была показана для сходных с протегрином β -шпилечных АМП ареницинов [222] и тахиплезина-1 [224,225]. Однако, для самого протегрина-1, а также для θ -дефенсина-1 была показана более высокая селективность в отношении мембран с высоким содержанием фосфатидилхолина (ФХ) [226,227], для которого вклад в кривизну поверхности незначителен благодаря бóльшему размеру полярной головки по сравнению с ФЭ. Стоит отметить, что еще одной особенностью строения мембран бычьих эритроцитов является практически полное отсутствие ФХ и повышенное содержание сфингомиелина (СМ) [221]. По-видимому, решающую роль в резистентности эритроцитов парнокопытных к действию собственных АМП, таких как протегрины, может играть отсутствие ключевых для проявления цитотоксичности компонентов мембран.

Протегрины стали объектами множества структурно-функциональных исследований, целями которых являлись изучение механизма действия и поиск терапевтически ценных аналогов [228,229]. О важной роли дисульфидных связей в структуре протегринов свидетельствует значительная потеря активности линейных аналогов в отношении микроорганизмов [230,231] и опухолевых клеток [232].

Отдельного упоминания заслуживает один из аналогов протегрина – синтетический 17-членный пептид исеганан (IB-367), отобранный в результате скрининга нескольких сотен аналогов с различными аминокислотными заменами и делециями [220]. 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. Аналог сохраняет высокую цитотоксичность, характерную для природных изоформ пептида, поэтому рассматривался, в первую очередь, как препарат для местного применения. В ходе клинических испытаний исеганан был заявлен как препарат для лечения пациентов с оральным мукозитом, возникшем на фоне противоопухолевой терапии. Кроме того, препарат может быть использован для терапии вентилятор-ассоциированной пневмонии и муковисцидозов или для профилактики заболеваний различной этиологии, передающихся половым путем [233].

Гомезин

Гомезин – АМП, выделенный из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana* [234]. Ряд исследований показал, что гомезин синтезируется конститутивно, локализуется исключительно в гранулах гемоцитов паука и, по-видимому, секретируется в гемолимфу после инфицирования [235]. Однако, неясно, в какой момент происходит образование зрелого гомезина из пробелка. Структурная организация белка-предшественника, а также пространственная структура гомезина [236] наиболее близки тахиплезинам и полифемузинам, речь о которых пойдет в следующем разделе. Гомология зрелых пептидов составляет ~50% (Рисунок 10).

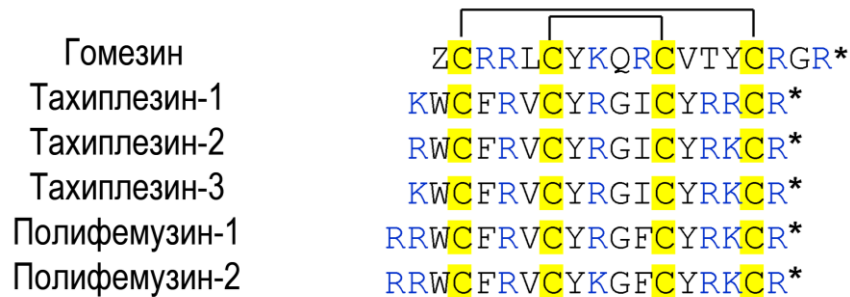


Рисунок 10. Сравнение первичной структуры гомезина и β-шпичечных АМП из мечехвостов (тахиплезинов и полифемузинов). Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи. Звездочкой (*) обозначено С-концевое амидирование.

Гомезин содержит 18 аминокислотных остатков, включая четыре цистеина, образующие две дисульфидные связи, N-концевую пироглутаминовую кислоту (Z) и С-концевой амидированный аргинин. Важно отметить, что среди известных АМП только две молекулы имеют в своём составе как N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты, так и амидированный С-концевой аминокислотный остаток: гомезин паука и PR-бомбезин лягушки [237]. Аналогичные модификации N- и С-концевых остатков встречаются среди пептидных гормонов (гонадолиберин и тиролиберин), нейропептидов (нейротензин и эledoизин) [238–240] и конотоксинов [241].

Наличие посттрансляционных модификаций не является обязательным свойством АМП, однако зачастую обнаруживается в природных молекулах. Образование дисульфидных связей, а также блокирование N- и С-концевых аминокислотных остатков являются наиболее часто встречающимися посттрансляционными модификациями АМП [2]. Модификация концевых аминокислотных остатков, по-видимому, имеет решающее значение для защиты АМП от действия экзопептидаз. Образование N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты из остатков глутамина или глутаминовой кислоты в природе может происходить как с участием

ферментов, так и без них [242]. Амидирование является результатом специфического расщепления молекулы-предшественника по пептидной связи между Хаа-Gly (где Хаа – любой аминокислотный остаток) после гидроксирования глицина с помощью бифункционального фермента – пептидилглицин α -амидирующей монооксигеназы [243]. Стоит отметить, что присутствие или отсутствие этих модификаций в большинстве случаев не оказывает влияния на механизм антимикробного действия, однако, способно менять спектр активности АМП [244,245].

N-Концевой остаток пироглутаминовой кислоты обеспечивает надежную защиту от действия аминопептидаз для широкого спектра природных белков. Однако, избыточная протеолитическая устойчивость молекул может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний. Так, среди различных причин развития болезни Альцгеймера называют также наличие остатка пироглутаминовой кислоты в структуре бета-амилоидных пептидов (A β), способствующего их устойчивости к протеолизу, а также процессу агрегации [246–248].

Согласно базе данных APD (Antimicrobial Peptide Database), на сегодняшний день известно о двух десятках АМП, имеющих в своей структуре N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Среди белков и пептидов, вовлеченных в реализацию механизмов врожденного иммунитета животных, остаток пироглутаминовой кислоты был найден у ангигенинов человека [249], иксодидина клеща [250], лебоцина бражника [251]. Кроме того, аналогичная модификация присутствует в цистеин-богатых защитных пептидах растений [252–255], а также в дефенсине гриба *Coprinopsis cinerea* [256].

Наличие компактной структуры и защиты N- и C-концевых остатков обеспечивают высокую устойчивость гомезина к протелизу (>80%) после 48 часов инкубации в сыворотке крови человека [257]. Важно отметить, что линейные аналоги гомезина, не стабилизированные дисульфидными связями, подвергались полному разрушению в тех же условиях менее чем за 2 часа [258]. В отличие от других β -шпилечных АМП, ковалентная циклизация пептидного остова не влияет на антимикробные свойства гомезина [259], однако в несколько раз увеличивает селективность в отношении опухолевых клеток [260].

Спектр антимикробной активности гомезина столь же широк, как и у других β -шпилечных АМП, и включает действие на грамотрицательные и грамположительные бактерии, паразитические простейшие рода *Plasmodium* [261], а также дрожжевые и нитчатые грибы. Например, гомезин способен связываться с поверхностью мембраны и ингибировать рост дрожжеподобного гриба *Cryptococcus neoforma*. Более того, он способен повышать эффективность противогрибкового препарата флуконазола, действуя с ним в синергизме [262]. Также сообщалось о способности гомезина ингибировать процесс образования бактериальных биопленок [263].

Стабилизация гомезина дисульфидными связями важна для проявления антибактериальной активности, однако практически не влияет на противогрибковую [257,258]. Это может свидетельствовать о различиях в механизме действия пептида на данные микроорганизмы. Гомезин не способен формировать стабильных пор при действии на модельные везикулы, а конформационная стабильность в наибольшей степени определяется отрицательным зарядом поверхности мембраны [264,265]. Таким образом, детергент-подобный механизм действия на мембраны является наиболее вероятным для гомезина.

Подобно тахиплезинам, гомезин обладает противоопухолевой активностью как *in vitro* в отношении злокачественных клеток молочной железы, толстой кишки и меланомы, так и *in vivo* в экспериментах на мышах с привитой меланомой [266]. Стоит отметить, что гомезин обладает умеренной гемолитической активностью и токсичностью в отношении нормальных клеток млекопитающих. Противоопухолевый эффект пептида связан с воздействием на мембранные структуры, а не специфические мишени, поскольку D-энантиомер гомезина полностью сохраняет свою активность [266]. Однако, данные о механизме противоопухолевого действия весьма противоречивы. Так, на примере линии эритролейкимии было показано преобладание апоптотического механизма без разрушения цитоплазматической мембраны клетки [232,267]. В отношении клеток меланомы [266] и нейробластомы [268], наоборот, было показано преобладание некротического механизма и, как следствие, лизиса клеток. Отдельно подчеркивается важная роль протеолитической стабильности природного гомезина в способности эффективно убивать раковые клетки [269].

По сравнению с другими β -спилечными пептидами гомезин обладает наибольшей противоопухолевой активностью. Кроме того, наличие высокой протеолитической стабильности делает природный пептид потенциальным кандидатом для применения в медицине.

Тахиплезины и полифемузины

Тахиплезины были выделены из гемоцитов подковообразного краба (мечехвоста) *Tachypleus tridentatus* [270,271]. Подобные пептиды, названные полифемузинами, были обнаружены у близкородственного вида *Limulus polyphemus* [272]. Тахиплезины и полифемузины состоят из 17–18 аминокислотных остатков, имеют суммарный положительный заряд +6 или +7 (Рисунок 10). Среди особенностей структуры стоит отметить наличие амидированного С-концевого остатка аргинина.

Наряду с другими антимикробными факторами тахиплезины и полифемузины в виде пробелков депонируются преимущественно в малых гранулах гемоцитов, где происходит их дальнейшее созревание [273]. Структура белков-предшественников тахиплезинов включает в

себя сигнальный пептид (23 а.о.), зрелый пептид (17 а.о.), сайт амидирования Gly-Lys-Arg и C-концевую последовательность, обогащенную остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот (34 а.о.) [274]. Подобная структурная организация про-доменов была обнаружена у многих АМП, включая гомезин.

Пространственная структура пептидов в водных растворах представляет собой скрученную β -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями [275,276]. Подобная стабилизация структуры играет ключевую роль в механизме действия пептидов и влияет на антимикробную активность [277]. Так, в целом ряде исследований было показано, что удаление цистинов приводит к снижению активности пептидов [276,278]. В то же время, одновременная замена всех цистеинов на ароматические остатки не снижала способности пептидов подавлять рост бактерий благодаря стабилизации структуры с помощью стэкинг-взаимодействий [279]. Стоит отметить, что при рациональном дизайне β -шпилечных АМП для повышения жесткости структуры, как правило, используют дисульфидные связи [280,281], стэкинг-взаимодействия [282] и π -катион-взаимодействия [283,284].

Тахиплезины и полифемузины обладают выраженной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов и, наряду с протегринами и ареницинами, считаются наиболее активными АМП животного происхождения [82,285]. Однако в отличие от ареницинов и протегринов принцип действия пептидов из-за особенностей структуры не связан с олигомеризацией и формированием стабильных пор. Механизм действия тахиплезинов и полифемузинов на бактериальные клетки весьма сложен и, вероятно, не может быть объяснен в рамках одной из предложенных на сегодняшний день моделей. Известно, что данные пептиды могут, с одной стороны, нарушать мембранный потенциал и целостность клеточных мембран [276,286,287], с другой – накапливаться внутри клеток и связываться с мишенями, например, с нуклеиновыми кислотами [288,289]. В ряде работ отмечается способность пептидов вызывать деполаризацию мембраны без разрушения её структуры [289,290], что соответствует образованию короткоживущих каналов [277]. В соответствии с данными ЯМР, полученными при взаимодействии тахиплезина с отрицательно заряженными мембранами, было высказано предположение, что пептид (преимущественно в виде мономера) погружается в липидный бислой и, совершая амплитудные вращения параллельно плоскости мембраны, вызывает нарушения в его структуре [291]. По-видимому, вращение приводит к локальному уменьшению толщины бислоя и появлению нестабильных участков и разрывов в структуре мембраны в соответствии с моделью «погружения и вращения в плоскости» («in-plane diffusion model») [292]. Кроме того, действие тахиплезина [225] и полифемузина [293] приводит к локальной перестройке мембран и появлению отрицательной кривизны поверхности, что также может объяснить проникновение АМП внутрь клетки в составе мицеллоподобных структур без

разрушения мембраны в соответствии с моделью образования агрегатов («aggregate model») [294]. Вероятно, данные пептиды способны реализовать оба механизма действия, причем один из них может быть преимущественным в зависимости от клетки-мишени, что было показано на примере бактерий *E. coli* и *S. aureus* [295]. Наличие множества мишеней для тахиплезина может объяснять неспособность приведенных выше бактерий вырабатывать механизмы резистентности к нему даже после нескольких десятков пассажей в присутствии субингибирующих концентраций пептида [296].

Ключевой мишенью для тахиплезинов на поверхности бактерий является ЛПС [297,298]. Данное свойство обуславливает способность дестабилизировать внешние мембраны грамотрицательных бактерий и повышать эффективность действия гидрофобных антибиотиков [299,300] и других АМП [301] при совместном применении с тахиплезином. Спектр активности пептидов включает множество видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и патогенных грибов [272,302]. В ходе сравнительного исследования АМП различных структурных классов, тахиплезин продемонстрировал высокую антипротозойную активность в отношении *Leishmania braziliensis* и *Trypanosoma cruzi* [303]. Кроме того, тахиплезин способен связывать бактериальные эндотоксины, а также проявлять иммуномодулирующую функцию, участвуя в активации системы комплемента и регуляции пролиферации клеток, обеспечивающих реакции системы врожденного иммунитета [304]. Несмотря на относительно небольшую длину β -листа и, соответственно, невысокую склонность к олигомеризации тахиплезины и полифемузины вызывают значительные повреждения эритроцитов даже в концентрации 20 мкМ [287,290].

Еще одна мишень тахиплезинов и полифемузинов – опухолевые клетки. Несмотря на выраженную мембранотропную активность, в том числе в отношении нормальных клеток млекопитающих, противоопухолевые свойства этих молекул связаны не только с процессами некроза [232]. Тахиплезин способен выступать в качестве связующего звена между гиалуроновыми кислотами на поверхности клеток карциномы простаты и C1q компонентом системы комплемента. Такое взаимодействие приводит к активации классического каскада системы комплемента [305]. Гиалуроновые кислоты активно синтезируются на поверхности не только опухолевых, но и эндотелиальных клеток [306]. Благодаря способности одновременно подавлять неоваскуляризацию при развитии опухоли и вызывать апоптоз раковых клеток, тахиплезин показал высокую эффективность при лечении меланомы у мышей [307]. Способность пептида подавлять пролиферацию опухолевых клеток была показана на примере гепатомы и аденокарциномы человека [308]. Наличие селективности в отношении раковых клеток позволяет рассматривать тахиплезины в качестве векторов для доставки других соединений к клеткам-мишеням [309].

Открытие противовирусной активности полифемузинов в отношении вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и гриппа привело к разработке ряда терапевтически ценных аналогов с соответствующей направленностью действия [310]. В ходе целого ряда исследований были синтезированы и исследованы более 100 аналогов пептида [311]. Среди них наибольший практический интерес представляет низкотоксичный аналог T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-полифемузин-2). Пространственная структура аналога практически не изменилась, однако менее выраженная амфифильность и гидрофобность привела к снижению цитотоксичности [312]. T22 способен в два раза снижать эффективность инфицирования клеток вирусом ВИЧ *in vitro* при концентрации 6 нМ, что сопоставимо с показателями для зидовудина. Ряд исследований показал, что T22 блокирует процесс взаимодействия между вирусом и клеткой [313] благодаря способности специфично связываться с вирусным белком gp120 и белком CD4 Т-клеток [314]. Позднее было показано взаимодействие аналога полифемузина T22 с рецептором хемокина CXCR4 – фузином, который также является корецептором для ВИЧ-1, обеспечивающим его проникновение в Т-клетки [315].

Андроктонин

Андроктонин – 25-членный пептид из гемолимфы скорпиона *Androctonus australis*, содержащий четыре остатка цистеина, образующих две дисульфидные связи [316]. Биосинтез андроктонина в гемоцитах скорпиона протекает конститутивно, что является характерным и для дефенсинов скорпионов [317]. Молекула андроктонина имеет высокий суммарный положительный заряд (+8) и содержит мотив RRRGG, обнаруженный также в дефенсинах скорпионов. Аминокислотные последовательности андроктонина, тахиплезинов и полифемузинов характеризуются умеренной степенью гомологии, а их пространственные структуры отличаются типом β -изгиба [318]. 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 по сравнению с другими β -спилечными АМП [319]. Однако, несмотря на низкое содержание (~30%) гидрофобных остатков, 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 [320]. Андроктонин, как и большинство АМП, не действует на специфические внутриклеточные мишени, поскольку его D-энантиомер обладает аналогичной антимикробной активностью [319]. Данные ЯМР-спектроскопии и молекулярного моделирования для исследования молекулярной динамики андроктонина на поверхности мембраны свидетельствуют

о переходе скрученной β -шпильки в более амфифильную и плоскую, но не стабилизированную водородными связями структуру [318]. Было высказано предположение, что в такой ориентации 8 основных остатков андроктоина формируют участок, имеющий повышенное сродство к фосфатным группам липидов, что ведет к накоплению пептида на поверхности мембраны и её деполяризации согласно «ковровой» модели. С повышением концентрации пептида мембрана утрачивает термодинамическую стабильность, в ней накапливаются локальные деформации изгиба, появляются множественные разрывы и начинается формирование липид-пептидных мицелл [25]. Действие согласно вышеописанному механизму может объяснять более высокие концентрации андроктоина, необходимые для разрушения мембран и, как следствие, лизиса клеток бактерий, по сравнению с аналогом магейнина, образующим тороидальные поры [316]. Однако благодаря высокой растворимости в водных буферах, отсутствию токсичности и конститутивному биосинтезу, в гемолимфе организма, по-видимому, создается высокая концентрация пептида, обеспечивающая надежную защиту от патогенов.

Расположением остатков цистеина и организацией дисульфидных связей этот пептид напоминает α -конотоксин SII – блокатор н-ацетилхолиновых рецепторов из яда морского моллюска *Conus striatus* [321] (Рисунок 11). В отличие от ближайших гомологов из других видов α -конотоксин SII имеет больший размер и стабилизирован не двумя, а тремя дисульфидными связями [322]. Более того, сообщалось, что андроктоин имеет сравнимую с α -конотоксином SII аффинность к никотиновому рецептору ската *Torpedo* и, таким образом, может послужить основой для создания анальгетических препаратов.

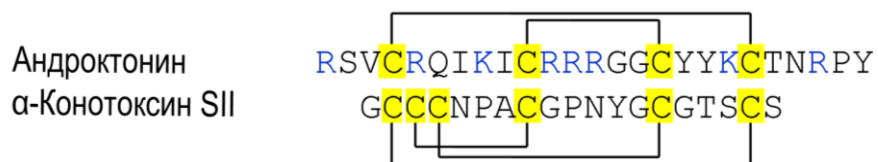


Рисунок 11. Сравнение первичной структуры андроктоина из скорпиона *A. australis* и α -конотоксина SII из морского моллюска *C. striatus*. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи.

2.4. β -Шпильчные АМП, стабилизированные тремя дисульфидными связями

θ -Дефенсины

Дефенсины млекопитающих 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.

Различия заключаются в размерах, структуре и свойствах молекул, а также в положении дисульфидных связей [323]. Зрелые θ -дефенсины были выделены из лейкоцитов крови и клеток костного мозга низших узконосых обезьян (макак-резус и павианов) и являются единственным примером ковалентно замкнутых циклических пептидов млекопитающих [324–327]. Напротив, среди пептидов растений известно три класса циклических молекул: циклотиды [328], орбитиды [329] и ингибиторы трипсина [102]. Более того, на данный момент θ -дефенсины – единственный известный в природе пример циклических пептидов, синтезирующихся из продуктов экспрессии двух разных генов [330].

θ -Дефенсины образуются в результате сплайсинга по принципу «голова к хвосту» двух нонапептидов, являющихся частями двух независимых белков-предшественников. Таким образом, зрелые θ -дефенсины состоят из 18 аминокислотных остатков и формируют β -шпильчатую структуру, стабилизированную тремя дисульфидными связями [331] (Рисунок 12).



Рисунок 12. Аминокислотные последовательности θ -дефенсина-1 макаки-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.

Стоит отметить, что благодаря независимому гомо- или гетеродимерному сплайсингу количество экспрессирующихся генов *DEFT* (*DEFT*, *defensin theta*) белков-предшественников определяет конечное число изоформ θ -дефенсина у конкретного биологического вида. Так, у бабуина *Papio anubis* экспрессия четырех генов *DEFT* теоретически приводит к образованию 10 изоформ, однако в числе зрелых пептидов были обнаружены лишь пять [326]. *DEFT* представляет собой мутировавший ген предшественника α -дефенсина со стоп-кодоном в области, кодирующей зрелый пептид.

У человека и ряда других гоминид θ -дефенсины не были найдены на уровне пептидома. Позднее было показано, что лейкоциты человека синтезируют мРНК, кодирующую белки-предшественники θ -дефенсинов, однако наличие стоп-кодона в его сигнальной

последовательности препятствует биосинтезу пептидов [332]. Более того, клеточная линия человеческих промиелоцитов способна синтезировать циклический ретроциклин-1 в присутствии аминокликозидных соединений, способствующих «пропуску» стоп-кодонов в ходе трансляции [333]. Это показывает, что биохимический механизм циклизации этих АМП функционирует в клетках человека. Важно отметить, что в отличие от циклических АМП растений – циклотидов – в природе не были найдены линейные аналоги θ -дефенсинов, что указывает на принципиальное отличие в механизмах циклизации этих семейств АМП. По-видимому, важную роль в процессе циклизации играет взаимодействие двух пропептидов, в том числе за счет образования одной межмолекулярной дисульфидной связи между двумя нонапептидами.

В ходе филогенетических исследований интактные *DEFT* гены были обнаружены только у низших узконосых обезьян, принадлежащим к семействам марышковых и гиббоновых [332,334]. Стоит отметить, что *DEFT* гены не были найдены у широконосых и мокроносых обезьян [334]. В геноме человека и других гоминид (гориллы, шимпанзе и бонобо) были идентифицированы только псевдогены *DEFT* (ψ) со стоп-кодоном в сигнальной последовательности, в отличие от орангутанов, обладающих шестью интактными генами и одним псевдогеном [332,335]. Интересно отметить, что псевдогены шимпанзе и бонобо включают в себя кодоны четырех остатков цистеина вместо шести. Сравнение продуктов экспрессии генов и псевдогенов *DEFT* приматов приведено на рисунке 13.

Источник	Ген/Псевдоген	Нонапептид + 3 а.о.
<i>Homo sapiens</i> (человек)	<i>DEFT</i> 1, 2, 3, 5, 6 (ψ)	RCICGRGIC RLL
	<i>DEFT</i> 4 (ψ)	RCICGRRIC RLL
<i>Gorilla gorilla</i> (горилла)	<i>DEFT</i> 1 (ψ)	RCICGRGIC RLL
<i>Pan troglodytes</i> (шимпанзе)	<i>DEFT</i> 1 (ψ)	RCIGGRGIC GLL
<i>Pongo abelii</i> (орангутан)	<i>DEFT</i> 1 (ψ)	RCICRRGVC RFL
	<i>DEFT</i> 1, 2, 4	RCICRRGVC RLL
	<i>DEFT</i> 3	RCICGRGVC RLL
<i>Macaca mulatta</i> (макак-резус)	<i>DEFT</i> 1	RCICRRGVC QLL
	<i>DEFT</i> 2	RCICTRGFC RLL
	<i>DEFT</i> 3	RCICVLGIC RLL
	<i>DEFT</i> 4	RCICTRGVC QLL
<i>Hylobates syndactylus</i> (сиаманг)	<i>DEFT</i> 1	RCICGRGVC RLL

Рисунок 13. Сравнение продуктов экспрессии генов/псевдогенов *DEFT* из приматов. Только первые 9 аминокислотных остатков (нонапептид) участвуют в биосинтезе зрелого пептида, а следующие за ними 3 остатка продукта экспрессии гена удаляются в ходе процессинга. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки.

На основе данных о последовательности транскриптов были синтезированы θ -дефенсины человека, названные ретроциклинами [335]. Пространственная структура ретроциклинов аналогична таковой для θ -дефенсинов и представляет жёсткую β -шпильку, включающую два β -изгиба типа I' [336]. Высокая устойчивость данной структуры к действию протеаз в равной степени определяется и ковалентной циклизацией пептидного остова, и стабилизацией дисульфидными связями [337].

Нарушая структурную целостность мембран, θ -дефенсины и ретроциклины проявляют антимикробную активность в концентрациях ~ 10 мкМ в отношении дрожжей и бактерий, в том числе клинических изолятов патогенов с множественной устойчивостью к антибиотикам [324,326,338]. Однако, в отличие от ряда других β -шпилечных АМП при значительном повышении ионной силы среды активность θ -дефенсинов снижается в несколько раз [330]. Тем не менее, данный эффект выражен в меньшей степени, чем для α - и β -дефенсинов, полностью теряющих свою активность в отношении ряда бактериальных штаммов в аналогичных условиях. Как и у андроктонина, пространственная структура θ -дефенсинов характеризуется слабо выраженной амфифильностью, что обуславливает не только «ковровый» механизм действия и сравнительно невысокую антимикробную активность, но и отсутствие цитотоксичности в отношении клеток млекопитающих [339]. Кроме того, было показано, что ретроциклин склонен к образованию тримера в водных растворах [340]. В отличие от ареницинов и протегринов, олигомеризация ретроциклина, по-видимому, приводит к еще большему ослаблению амфифильных свойств за счет маскирования гидрофобных участков. Высокая селективность θ -дефенсинов по отношению к отрицательно заряженным мембранам была также подтверждена при изучении связывания с липосомами [337,341].

θ -Дефенсины показали высокую эффективность и стабильность *in vivo*, повышая выживаемость мышей с сепсисом, причем их действие было связано со способностью подавлять биосинтез провоспалительных цитокинов [342]. θ -Дефенсины обладают способностью связывать бактериальные экзотоксины, в частности, летальный фактор сибиреязвенного токсина из *Bacillus anthracis* [343], токсин из *Gardnerella vaginalis* [344] и листериолизин O из *Listeria monocytogenes* [345]. Механизм нейтрализации связывают со способностью пептидов нарушать пространственную структуру белковых токсинов и уменьшать их устойчивость к протеолитической деградации [346]. Ретроциклин-1, равно как и протегрин-1, способен блокировать активность сериновой протеазы NS2B-NS3, которая играет важную роль в распространении Денге-вируса [211,347].

Благодаря низкой токсичности, а также обнаруженным у них свойствам лектинов [348], θ -дефенсины рассматриваются в качестве прототипов противовирусных средств. Во многих работах была показана способность ретроциклинов препятствовать распространению вирусов

иммунодефицита человека [333,335,349], гриппа [350] и герпеса [351]. Стоит отметить, что противовирусное действие θ -дефенсинов не связано ни с виротоксическими, ни с цитотоксическими эффектами в отношении заражённых клеток. Считается, что θ -дефенсины препятствуют распространению оболочечных вирусов благодаря связыванию с поверхностными гликопротеинами, ответственными за взаимодействие вируса с клеткой при её заражении. Интересно, что устойчивость к ВИЧ у отдельных представителей *Homo sapiens*, по-видимому, не связана с экспрессией ретроциклинов, поскольку в их геноме были обнаружены все типичные для вида псевдогены, препятствующие биосинтезу пептидов [352]. Нециклические аналоги θ -дефенсинов сохраняют значительную антибактериальную и противовирусную активность [324,353,354]. Это позволило создать трансгенный сорт табака, обладающий повышенной устойчивостью как к бактериальным инфекциям, так и к вирусу табачной мозаики [355].

γ -Дефенсины

γ -Дефенсины, также называемые «оводефенсинами» [356], к настоящему моменту были выделены из яиц рептилий и птиц. Пептиды состоят из 36–40 аминокислотных остатков, стабилизированы тремя дисульфидными связями и обладают антимикробными свойствами. Все это позволяет формально отнести данные АМП к классу дефенсинов. На примере γ -дефенсина TEWP («turtle egg-white protein»), выделенного из яиц морской черепахи *Caretta caretta*, было показано, что ключевой особенностью их строения является отличная от α - и β -дефенсинов млекопитающих и других дефенсинов животных [357] организация дисульфидных связей по типу C1-C6, C2-C5, C3-C4 (Рисунок 14), что позволяет формировать пространственную структуру, состоящую из двух антипараллельных β -тяжей [358].

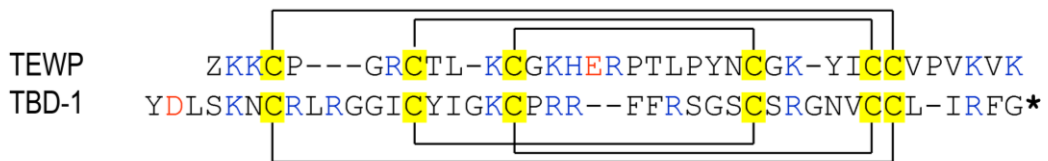


Рисунок 14. Сравнение первичной структуры γ -дефенсина TEWP из яиц морской черепахи *Caretta caretta* [356] и β -дефенсина-1 из лейкоцитов черепахи *Emys orbicularis* [357]. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки, красным – остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот. Квадратными скобками показаны дисульфидные связи. Звездочкой (*) обозначено C-концевое амидирование.

Характерными особенностями пептида TEWP являются наличие высокого положительного заряда, а также образование N-концевой пироглутаминовой кислоты в ходе биосинтеза, как и в случае с гомезином. Было показано, что TEWP способен не только ингибировать рост бактериальных культур *S. aureus*, *E. coli* и *S. typhimurium* в микромолярном

диапазоне концентраций пептида, но и с высокой эффективностью препятствует распространению оболочечных вирусов [358]. Среди структурно близких TEWP дефенсинов, выделенных из яичного белка птиц, стоит отметить галлин из курицы [357], мелеагрин из индейки [359], цигнин из лебеда [360] и BPS-1 из кряквы [361]. Однако, несмотря на высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей принадлежность приведенных АМП к γ -дефенсинам еще предстоит доказать, поскольку нет данных о характере замыкания дисульфидных связей в их структуре.

2.5. β -Шпилечные АМП, стабилизированные четырьмя дисульфидными связями

Гепцидины

Гепцидины представляют собой семейство β -шпилечных АМП, стабилизированных четырьмя дисульфидными связями. Для гепцидинов характерен следующий порядок замыкания дисульфидных связей: C1-C8, C2-C7, C3-C6, C4-C5, причем три из них участвуют во взаимодействии β -тяжей, в то время как дисульфидный мостик C4-C5 приводит к характерной для данного семейства молекул деформации области β -изгиба и формированию впадины, во внутренней части которой сосредоточены основные аминокислотные остатки, а на внешней поверхности – гидрофобные [362].

Гепцидины найдены у многих позвоночных на уровне транскриптома, однако в виде зрелого пептида они выделены лишь из жидкостей и тканей человека и рыб [363–365]. Стоит отметить, что у рыб зрелые гепцидины обнаружены и выделены из жабр, хотя ген преимущественно экспрессируется в гепатоцитах. Гепцидин человека, который иногда называют экспрессирующимся в печени АМП-1 (LEAP-1 – liver-expressed AMP-1), был найден в сыворотке крови и моче. Ряд исследований показал, что на первом этапе в гепатоцитах синтезируется прогепцидин (64 а.о.), а его процессинг с образованием зрелого гепцидина (25 а.о.) происходит в кровотоке при непосредственном взаимодействии с ионами железа [366,367]. Далее пептид может подвергаться расщеплению с образованием двух производных (20 и 22 а.о.), которые были найдены в моче [368]. Функция данных производных пока неясна, однако, было установлено, что гепцидин-20 сохраняет высокую антимикробную активность [364]. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гепцидины у различных видов, достаточно консервативна, что в большей степени выражено у млекопитающих (Рисунок 15) [369,370]. Также на уровне генома у рыб были найдены новые изоформы гепцидина, содержащего всего две дисульфидные связи [371]. Несмотря на наличие типичной для катионных АМП амфифильной структуры, основной физиологической функцией гепцидина в организме млекопитающих принято считать регуляцию метаболизма железа [372]. После ряда

экспериментов на нокаутных мышах было высказано предположение, что гепцидин играет ключевую роль в поддержании гомеостаза железа [373]. 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 [374]. В отличие от человека, у мышей было обнаружено два гена, кодирующих разные изоформы гепцидина, только один из которых функционирует как гормон [375].

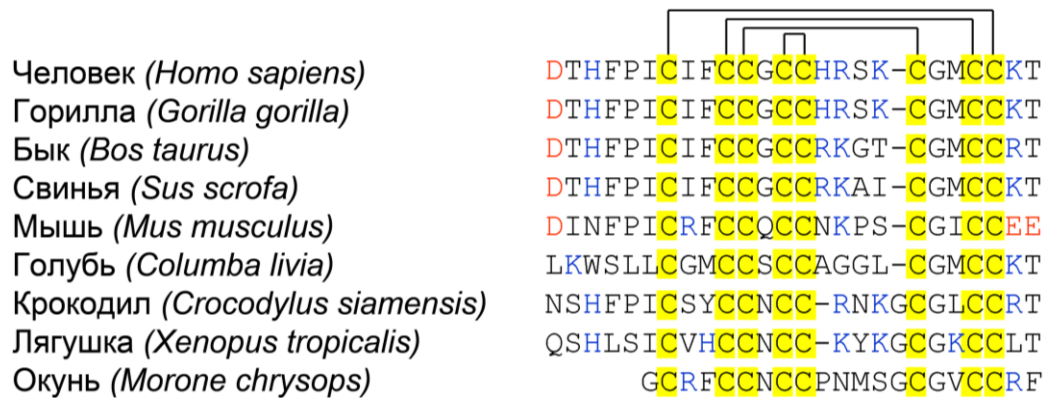


Рисунок 15. Сравнение первичной структуры гепцидинов животных. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки, красным – остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот. Квадратными скобками обозначены дисульфидные связи.

Регуляция концентрации железа в кровотоке происходит благодаря взаимодействию гепцидина с белком ферропортином, который контролирует высвобождение железа в плазму из запасующих его клеток – макрофагов, энтероцитов и гепатоцитов [376,377]. Так, при избытке «свободного» железа в плазме крови концентрация зрелого гепцидина повышается, что приводит к связыванию с ферропортином, деградации комплекса внутри клеток, остановке процесса абсорбции железа и, соответственно, его запасанию в клетках, и наоборот. Особая роль во взаимодействии с ферропортином отводится N-концевому «ATCUN» мотиву (Amino Terminus Copper Nickel binding site), также способному связывать ионы двухвалентных металлов. Несмотря на существование связи между метаболизмом железа и биосинтезом гепцидинов у рыб, различия в структуре этого мотива для млекопитающих и остальных животных, вплоть до полного его отсутствия у гепцидина окуня [365], наводят на мысль о существовании альтернативного механизма регуляции, не связанного с ферропортином. На то, что гепцидины рыб являются именно антимикробными пептидами, указывают следующие факты: биосинтез в высоких (микромольных) концентрациях [378], достаточных для прямого антимикробного действия, а также синергизм с другими АМП рыб [379]. По-видимому, в ходе эволюции позвоночных изменилась основная функция гепцидинов в организме – от защитных пептидов к гормонам. Регуляция биосинтеза гепцидинов у млекопитающих весьма сложна,

однако, среди прочих факторов, к усиленной экспрессии генов этого пептида приводит инфицирование микроорганизмами и провоспалительные цитокины, что наводит на мысль о сохранении функции пептидов как компонента иммунной системы. Предположительно, роль гепцидина при инфицировании связана с созданием гипоферритимического состояния у организма, сопровождающегося анемией. В таких условиях концентрация ионов железа в кровотоке минимальна, что создает неблагоприятные условия для развития патогенных микроорганизмов [380]. Ожидается, что в ближайшее время на фармацевтическом рынке появятся антагонисты гепцидина, нацеленные на лечение анемии при хроническом воспалении [366].

Многие гепцидины обладают широким спектром антимикробной активности, подавляя рост бактерий, дрожжей, нитчатых грибов и опухолевых клеток в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкМ [363,381–383]. В ряде исследований было показано, что удаление отдельных дисульфидных связей не влияет на связывание гепцидина человека с ферропортином, однако снижает устойчивость к протеазам сыворотки крови и антимикробную активность *in vitro* [376,384]. Жёсткая амфифильная структура пептида обеспечивает способность пересекать мембрану клеток-мишеней. Особый интерес представляет способность гепцидина проникать внутрь макрофагов и селективно уничтожать бактерии *Mycobacterium tuberculosis* [385]. В нейтральных средах антимикробный эффект гепцидина обусловлен не нарушением целостности бактериальной мембраны [386], а способностью связываться с нуклеиновыми кислотами [384], а также связыванием ионов металлов [372], подобно лактоферрину молока. Отсутствие ряда важнейших кофакторов приводит к торможению процесса дыхания и нарушению синтеза нуклеиновых кислот у бактерий. Кроме того блокируется работа супероксиддисмутазы, обеспечивающая защиту микроорганизмов от воздействия активных форм кислорода (АФК). Повышенная активность гепцидина по сравнению с укороченными аналогами может объясняться вкладом «ATCUN» мотива, присутствующего в гистатине-5 [387]. Как и гепцидин, гистатин-5 способен вызывать накопление АФК в клетках-мишенях.

Благодаря наличию двух остатков гистидина в структуре гепцидина LEAP-1 антимикробный эффект в отношении ряда мультирезистентных бактерий возрастает при закислении среды [381]. Важно отметить, что при pH 5,0 у гепцидина LEAP-1 изменяется механизм действия и появляется способность нарушать целостность бактериальных мембран [388]. Не вызывает удивления и тот факт, что гепцидины человека не проявляют цитотоксических эффектов в отношении нормальных клеток млекопитающих [389]. Установленная недавно способность гепцидина-20 блокировать процесс образования биопленок у бактерий [390], а также отсутствие цитотоксичности позволяют рассматривать этот пептид как средство для обработки инструментов и протезов в хирургии.

2.6. Заключение

Приведенные выше данные показывают, что несмотря на сравнительно небольшое число известных β -спилечных АМП, их биологические функции весьма разнообразны. Интересен тот факт, что у животных β -спилечная структура нашла основное распространение среди защитных пептидов. Исключениями являются короткие токсины семейства χ -конопептидов [391] и барретиды – анионные пептиды с неизвестной биологической функцией из морской губки *Geodia barretti* [392]. Поиск и изучение структурно-функциональных особенностей β -спилечных АМП дает исключительно богатый исходный материал для создания лекарственных средств нового поколения. На рисунке 16 представлены данные о мультифункциональных свойствах основных представителей семейства β -спилечных АМП, а также их первичные и пространственные структуры. Благодаря особенностям строения и многообразию биологических функций β -спилечные АМП могут стать основой для создания антибиотиков системного и наружного применения, иммуномодуляторов, противовоспалительных средств, блокаторов экзотоксинов, ингибиторов протеаз, препаратов для лечения метаболических нарушений, противоопухолевых и противовирусных препаратов, анальгетиков. Кроме того, β -спилечные АМП могут быть использованы в терапии нейродегенеративных заболеваний, действуя в качестве блокаторов образования А β фибрилл [393].

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 широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов, вирусам и другим стрессовым факторам внешней среды. Кроме того, в дальнейшем растительные культуры и клеточные линии могут быть использованы для промышленного получения β -спилечных АМП. Являясь факторами, повышающими проницаемость бактериальных мембран [394], АМП могут найти применение при действии в синергизме с конвенциональными антибиотиками, а также другими защитными пептидами, подобно тому, как это происходит в природе. Парадоксально, но количество исследований совместного применения различных АМП весьма немногочисленно [395]. Не меньший интерес представляет изучение систем, моделирующих взаимодействие защитных пептидов человека и животных и бактериоцинов их нормальной микрофлоры.


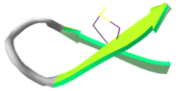

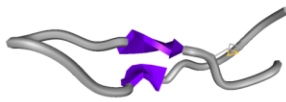

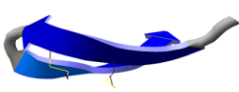
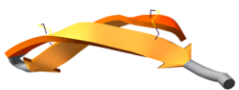
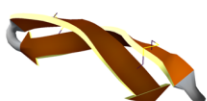
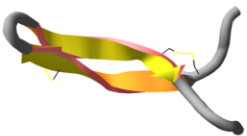
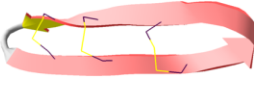
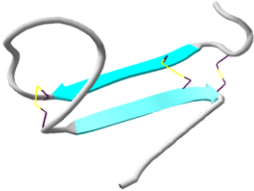
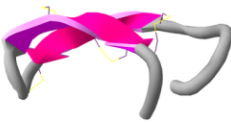
Название	Источник	Активность	Первичная структура	Пространственная структура	Ссылки
Бактенецин	<i>Bos taurus</i> (нейтрофилы быка)	Б,В,О,Л,И	RLCRIVVIRVCR		[60,62]
Тигеринин-1	<i>Rana tigrina</i> (кожный секрет лягушки)	Б,И,М,Ф	FCTMPIIPRCY*		[91]
Танатин	<i>Podisus maculiventris</i> (гемолимфа клопа)	Б,Г,Л	GSKKPVPIIYCNRRTGKCRQM		[108,110]
Лактоферрицин В	<i>Bos taurus taurus</i> (молоко коровы)	Б,Г,В,О,Л,И	FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAF		[135,136]
Ареницин-2	<i>Arenicola marina</i> (целомоциты пескожила)	Б,Г,Ц,Л	RWCVYAYVRIIRGVLVRYRCW		[171,175]
Протегрин-1	<i>Sus scrofa</i> (лейкоциты свиньи)	Б,Г,В,О,Ц,Л,Ф	RGGRLCYCRRRFCVCGR*		[194,195]
Гомезин	<i>Acanthoscurria gomesiana</i> (гемоциты паука)	Б,Г,П,О,Ц	ZCRRLCYKQRCVTYCRGR*		[234,236]
Тахиплезин-1	<i>Tachypleus tridentatus</i> (гемоциты мечехвоста)	Б,Г,П,В,О,Ц,Л,И	KWCFRVCYRGICYRRCR*		[270,275]
Андроктонин	<i>Androctonus australis</i> (гемолимфа скорпиона)	Б,Г,Т	RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY		[316,318]
θ-Дефенсин (RTD-1)	<i>Macaca mulatta</i> (лейкоциты обезьяны)	Б,Г,В,Л,И,Ф	GFRCRLCRRGVCRCLCTR		[71,324]
γ-Дефенсин (TEWP)	<i>Caretta caretta</i> (яйца черепахи)	Б,В	ZKKCPGRCTLCKGKHERPTLPYNCGKYICVVPVKVK		[358]
Гепцидин (LEAP-1)	<i>Homo sapiens</i> (гепатоциты человека)	Б,Г,О,И,М	DTNHFICIFCCGGCHRSKCGMCCKT		[362,364]

Рисунок 16. Строение и биологическая активность β-шпилечных 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-концевой остаток пироглутаминовой кислоты. Обозначение биологических функций: Б – антибактериальная активность, Г – противогрибковая активность, В – противовирусная активность, П – антипротозойная активность, О – противоопухолевая активность, Ц – цитотоксическая или гемолитическая активность, Л – способность связывать эндо- и экзотоксины, И – иммуномодулирующая активность, Т – нейротоксическая активность, М – регуляция метаболизма, Ф – способность ингибировать протеолитические ферменты.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что β -шпилечные АМП объединяет между собой ряд важных структурно-функциональных особенностей с точки зрения возможности создания новых антибиотиков на их основе, а именно: небольшой размер (~20 а.о.); суммарный положительный заряд и амфифильные свойства, достаточные для проявления мембранотропной активности по отношению к широкому спектру бактерий и других микроорганизмов; быстрое уничтожение клеток-мишеней благодаря бактерицидному действию; наличие множества биологических мишеней; стабилизированная дисульфидными связями компактная структура, способствующая повышенной протеолитической устойчивости. Эти качества сводят к минимуму вероятность развития резистентности в отношении β -шпилечных АМП.

Важными задачами исследователей, работающих над созданием новых антибиотиков пептидной природы, в настоящее время являются: увеличение продолжительности жизни пептидов в кровотоке, повышение селективности действия АМП в отношении бактерий, а также разработка эффективных технологий промышленного получения.

Тот факт, что β -шпилечные АМП имеют структуру, стабилизированную дисульфидными связями, а иногда включает и другие посттрансляционные модификации, делает их относительно дорогими объектами для производства путем химического синтеза и широкого медицинского применения. Целый ряд β -шпилечных АМП был получен путем гетерологической экспрессии в бактериальных [396] и дрожжевых [397] клетках, а также культурах растений [398]. Более того, известно о технологиях получения циклических θ -дефенсинов в бактериальных системах с использованием интеинов [399]. Ключевая роль дисульфидных связей как фактора, обуславливающего устойчивость β -шпилечных АМП к биодegradации, показана в ряде работ на примере аналогов бактенецина, лактоферрицина, гомезина и θ -дефенсина. В связи с этим задача повышения стабильности препаратов в кровотоке может быть решена при использовании β -шпилечных АМП как основы для дизайна новых антибиотиков. С целью повышения селективности действия АМП предпринимаются попытки описать зависимость антимикробных и цитотоксических свойств пептидов от характеристик их первичной и вторичной структуры. Однако оценка вклада конкретного физико-химического параметра (суммарный заряд, гидрофобность, амфифильность и др.) представляет собой непростую задачу, поскольку все они находятся в значительной зависимости друг от друга [400].

3. Материалы и методы

3.1. Оборудование

Настольные микроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf); установка для дегазирования (Millipore); микроволновая печь (Samsung); мешалка магнитная «ММЗМ» (Завод комплектных лабораторий); pH-метр «501А» (Orion Research); прецизионный программируемый термостат «Терцик» (ДНК-Технология); установка для лиофильной сушки «FreeZone 2.5» (Labconco); спектрофотометр «Ultraspec 3300 PRO» (Amersham Biosciences); твердотельный термостат для микропробирок «Гном» (ДНК-Технология); термостатируемые качалки «C24 Benchtop Incubator» (New Brunswick Scientific) и «Incubator-Shaker» (Lab-line); весы электронные «E5500S» (Sartorius); весы электронные аналитические «R200D» (Sartorius); встряхиватель для пробирок «ВП» (Россия); система для заливки гелей (Amersham); камера для вертикального электрофореза «SE 250» (Hoefler); камера для горизонтального электрофореза «GNA-100» (Pharmacia Fine Chemicals); источник питания «PS500XT» (Hoefler Scientific Instruments); водяной термостат «Multitemp II» (LKB); лампа ультрафиолетовая «UVGL-25 Mineralight Lamp» (Ultra-violet Products); трансиллюминатор (Vilber Lourmat); настольные ламинарные боксы «Gelaire» (Flow Laboratories) и «Purifier Cell Logic» (Labconco); низкоскоростная центрифуга с охлаждением «Minifuge GL» (Heraeus); система для электропорации Electroporator 2510 (Eppendorf); низкотемпературный холодильник (Sanyo); вакуумный концентратор «SpeedVac» (Savant); планшетные фотометры «Multiscan EX» (Thermo Scientific) и «PlateReader AF2200» (Eppendorf); системы очистки воды «RiOs» и «Milli-Q» (Millipore); препаративная центрифуга «J2-21» (Beckman); ультрацентрифуга «L8-70M» (Beckman); ультразвуковой дезинтегратор «5/75.МК2» (MSE); насос перистальтический «2115 Multiperperх» (LKB); встряхиватель для микропробирок «5432» (Eppendorf); термостатируемый шейкер для 96-луночных планшетов «PST-60HL-4» (Biosan); амплификатор ДНК с флуоресцентным детектором «ДТ-96» (ДНК-Технология); автоматические пипетки на 20, 200, 1000 мкл (HTL, Eppendorf); автоматические многоканальные пипетки на 200 мкл (HTL, Gilson); встряхиватель пробирок «Bio Vortex V1» (Biosan); автоклав «MLS-3781L» (Sanyo); сухожаровой шкаф; воздушный термостат «Model 132000» (Boekel Scientific); роторный испаритель «Laborota 4001» (Heidolph); CO₂-икубатор «Galaxy 48R» (New Brunswick Scientific); системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии «HPLC System Gold 126» (Beckman) и «Gradient Analytical Module HPLC System 305» (Gilson).

3.2. Реактивы и расходные материалы

Термостабильные ДНК-полимеразы «Advantage 2 Polymerase Mix» (Clontech), Taq и «Tersus» (Евроген); ДНК-лигаза фага T4 (Fermentas); эндонуклеазы рестрикции EcoRI, BglII, BamHI, HindIII (Fermentas), SacII (NEB); буфер FastDigest (Fermentas); аденозинтрифосфат (АТФ) (Amresco); дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Promega); ДНК маркеры молекулярных масс (Сибэнзим); Orange G (Serva); X-Gal (Promega); этидий бромид (Serva); фенол (Реахим); хлороформ (Химмед); изоамиловый спирт (Fluka); глицерин (Merck, Serva); трифторуксусная кислота (ТФУ) (Applied BioSystems); изопропанол (Реахим); диметилсульфоксид (ДМСО) (Merck); метанол (Реахим); этанол; ацетонитрил (Panreac, Merck); уксусная кислота (Химмед); этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА) (Sigma-Aldrich); соляная кислота (Реахим); гидроксид натрия (Lachema); ацетат натрия (Реахим); ацетат калия (Реахим); хлорид натрия (Sigma-Aldrich, Реахим); хлорид калия (Реахим); хлорид магния (Merck); сульфат аммония (Serva); ацетат аммония (Fluka); хлорид кальция (Sigma-Aldrich); хлорид железа III (Реахим); хлорид марганца (Реахим); сульфат цинка (Реахим); хлорид кобальта II (Реахим); хлорид никеля II (Реахим); сульфат меди II (Реахим); парамолибдат аммония (Реахим); борная кислота (Реахим); цитрат тринатрия (Merck); гидроортофосфат натрия (Fluka); дигидроортофосфат натрия (Fluka); дигидроортофосфат калия (Реахим); ¹⁵N-меченый хлорид аммония (Cambridge Isotope Laboratories); гуанидин гидрохлорид (Sigma-Aldrich); имидазол (Sigma-Aldrich); трис (Serva, Bio-Rad); трицин (Serva); глицин (Merck); агароза (Bio-Rad), бакто-агар (Difco); бакто-триптон (Difco); дрожжевой экстракт (Pronadisa); среда Мюллера-Хинтон (HiMedia); тиамин гидрохлорид (Мосхимфармпрепараты); α-лактоза (Sigma-Aldrich); глюкоза (Ferak); ампициллин (Синтез, Applichem); β-меркаптоэтанол (ВМЕ) (Fluka); акриламид (Bio-Rad); метиленбисакриламид (Bio-Rad); мочеви́на (Merck); белковые и пептидные маркеры молекулярных масс (Fermentas, Applichem); дитиотреитол (Serva); кумасси G-250 (Serva); N'N'N'N'-тетраметилендиамин (TEMED) (Fluka); персульфат аммония (Bio-Rad); Triton X-100 (Merck); фенолметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma-Aldrich); Ni-NTA агароза (Qiagen); бромциан (Merck); додецилсульфат натрия (Bio-Rad); додецилфосфохолин (ДФХ) (Anatrace); нитроцефин (Calbiochem); о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG) (Sigma-Aldrich); SYTOX Green (Life Technologies); полимиксин В сульфат (Applichem); изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG) (Applichem); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich); забуференный физиологический раствор (ЗФР) (Gibco); среда DMEM/F-12 (Gibco); fetalная бычья сыворотка (ФБС) (Gibco); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ-реагент) (Sigma-Aldrich); набор для выделения ДНК из агарозного геля ZymoClean Gel DNA Recovery Kits (Zymo Research); набор для выделения плазмидной ДНК «Gen Elute Plasmid Miniprep Kit» (Sigma-Aldrich); LAL-тест (Sigma-Aldrich); мембрана

диализная (Sigma-Aldrich); фильтр PM30 (Amicon); колонки для ОФ-ВЭЖХ (Dr. Maisch, Waters).

При проведении экспериментов использовалась деионизированная вода, полученная на установке «Milli-Q» (Millipore). Стерилизация питательных сред, воды для биологических исследований, буферов и других растворов проводилась путем автоклавирования или с помощью фильтров Stericup-GP (Millipore).

Экспрессирующие генно-инженерные конструкции были созданы на основе плазмид рЕТ-20b(+), рЕТ-31b(+), рЕТ-32a(+)(Novagen). В работе также были использованы плазмиды рGEM-T (Promega) и рUC19. Для экспрессии аурелина в составе гибридного белка использовалась плазида рЕТ-Aur из коллекции Учебно-научного центра ИБХ РАН. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы и очищены сотрудником ИБХ РАН С.В. Кузницовой. Клонирование плазмидной ДНК в штамме *E. coli* DH10B (Life Technologies). Экспрессию рекомбинантных пептидов проводили в штаммах *E. coli* BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) (Novagen).

Антибактериальную активность тестировали на штаммах: *Escherichia coli* C600 и ML-35p, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Тестирование антибактериальной активности в отношении клинических изолятов полирезистентных и чувствительных к антибиотикам штаммов бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* проводилось в лаборатории биопестицидов ФГУП «ГосНИИгенетика». Тестирование антибактериальной активности пептидов в отношении штамма MRSA ATCC 33591 проводилось в лаборатории общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Кровь и сыворотка крови здоровых доноров была получена в лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН.

3.3. Программное обеспечение

Программа для оптимизации последовательностей олигонуклеотидов OligoAnalyzer (IDT; <http://www.idtdna.com>); программа для денситометрической обработки гелей Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics); программа для обработки данных масс-спектрометрического анализа FlexAnalysis 2.4 (Bruker); пакет программ Lasergene 10 (DNASTAR); пакет программ Vector NTI9 (Life Technologies); программа для визуализации пространственных структур Swiss PDB Viewer 4.1 (ExPASy); многофункциональный графический редактор Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems).

3.4. Создание последовательностей, кодирующих антимикробные пептиды

На начальном этапе с учетом данных о частоте использования кодонов у *E. coli* были спроектированы праймеры для синтеза и амплификации последовательностей, кодирующих следующие АМП: ареницин-1, ALP1, NZ17000, тахиплезин-1, гомезин, апидаецин 1b, тритрптицин и бактенецин ChVac3.4. Перед последовательностями, кодирующими АМП, был предусмотрен метиониновый кодон ATG, а после – стоп-кодона ТАА и TAG. Последовательности всех праймеров были оптимизированы с помощью программы OligoAnalyzer (IDT) для снижения вероятности образования вторичных структур (шпилек и димеров) в ходе синтеза.

3.4.1. Определение концентрации олигонуклеотидов

Навеску олигонуклеотида растворяли в 300 мкл деионизированной воды и интенсивно перемешивали с помощью шейкера. Аликвоту раствора объемом 10 мкл разбавляли 990 мкл воды и переносили в кварцевую кювету с толщиной (длиной оптического пути) равной 1 см. Концентрацию праймера определяли в соответствии с формулой: $C_M = OD_{260} \times 100 / N$, где OD_{260} – оптическая плотность раствора при 260 нм, N – расчетный молярный коэффициент экстинкции олигонуклеотида [л/моль], 100 – коэффициент разбавления. Расчетные значения молярных коэффициентов экстинкции получали с помощью программы OligoAnalyzer.

3.4.2. Сборка фрагментов ДНК

Каждую из последовательностей, кодирующих вышеупомянутые АМП (за исключением ChVac3.4), получали путем медленного отжига 3'-концов (по 15–18 нуклеотидов) двух праймеров, соответствующих N- и C-концевым областям пептида, с последующей достройкой до двухцепочечной структуры. 5'-Концы прямых праймеров были фланкированы сайтами узнавания рестриктазы BglII и, в ряде случаев, дополнительным сайтом NdeI. 5'-Концы обратных праймеров были фланкированы сайтом узнавания рестриктазы EcoRI. Эквимольную смесь двух праймеров (по 50 пмоль) растворяли в 41 мкл воды, нагревали до 90°C и плавно снижали температуру до 37°C за 20 мин с помощью регулируемого термостата. После отжига праймеров добавляли в пробирку 5 мкл 10× универсального буфера FastDigest (Fermentas), 3 мкл эквимольной смеси dNTP (по 1,25 мкМ) и 1 мкл фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (NEB). Реакцию проводили в течение 40 мин при 37°C, после чего термически инактивировали фермент и медленно охлаждали смесь до 4°C. Полученный продукт не очищали перед обработкой рестриктазами.

В случае пептида ChVac3.4, имеющего больший размер (26 а.о.), последовательность синтезировали из трех праймеров: сначала получали промежуточный продукт аналогично

вышеописанной методике и далее проводили достройку с помощью внешних праймеров в ходе ПЦР. Реакцию проводили в стандартных условиях с помощью Taq-полимеразы (Евроген). Продукты экстрагировали смесью фенол-хлороформ и осаждали этиловым спиртом. Для этого к исходному раствору реакционной смеси, разведенному водой вдвое, добавляли 5 М раствор NaCl до конечной концентрации 0,2 М. После этого к раствору добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ и встряхивали до образования эмульсии. Далее, при помощи центрифугирования проводили разделение фаз и отбирали водную фазу, содержащую растворенную ДНК. К раствору ДНК добавляли 2,5 объема 95% этанола и выдерживали в течение 20 мин при температуре минус 20°C. После инкубации раствор подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 10000g. В результате продукт ПЦР выпадал в осадок, в то время как остатки праймеров оставались растворенными. В дальнейшем осадок отмывали от избытка солей 70% этанолом и растворяли в воде.

Фрагмент ДНК, кодирующий аципенсин-1, получали методом ПЦР с использованием мутагенизирующих праймеров для замены редких кодонов предпочтительными для экспрессии в *E. coli*. В качестве матрицы использовали плазмиду pGEM-Ac1, содержащую клонированную кДНК аципенсина-1, из коллекции Учебно-научного центра ИБХ РАН. Смысловые праймеры содержали в 5'-концевой области сайт рестрикции BglII и следующий за ним метиониновый кодон, обратные содержали сайт рестрикции EcoRI и стоп-кодон TAA. Состав реакционной смеси: 2 мкл 10× буфера, 3 мкл эквимольной смеси dNTP (по 1,25 мкМ), 0,5 мкл Taq-полимеразы, 4 мкл раствора плазмиды pGEM-Ac1 (10 нг/мкл), по 1 мкл растворов праймеров (10 пмоль/мкл) и 8,5 мкл воды. Температурный режим: 95°C 1 мин («горячий старт»), далее 35 циклов: 94°C - 30 сек, 55°C - 40 сек, 72°C - 30 сек. Продукты экстрагировали смесью фенол-хлороформ, осаждали этиловым спиртом, осадок растворяли в воде.

3.5. Создание генно-инженерных конструкций

В работе были использованы два основных типа плазмидных векторов, сконструированных в Учебно-научном центре ИБХ РАН. Векторы были получены путем лигирования фрагмента, включающего T7lac промотор, сайт связывания рибосомы, последовательность, кодирующую восемь остатков гистидина и модифицированный тиоредоксин А (Met37Leu), в обработанные рестриктазами BglII и XhoI фрагменты плазмид pET31b(+) (5253 п.о.) и pET20b(+) (3490 п.о.) по соответствующим липким концам. Последовательность модифицированного тиоредоксина была амплифицирована с использованием плазмиды pET-32a(+) в ходе нескольких раундов ПЦР. Полученные плазмиды обозначали как pET-ТК1 (длинная) и pET-ТК2 (короткая).

3.5.1. Приготовление электрокомпетентных клеток

Клетки культуры *E. coli* штамма DH10B вносили в 10 мл жидкой среды LB и растили в течение 16 ч при 37°C и 220 мин⁻¹. Далее расчетный объем культуры инокулировали в 200 мл жидкой среды LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) таким образом, чтобы начальная OD₆₀₀ составляла ~0,05. Клетки растили до оптической плотности 0,5–0,7 ед., после чего культуру центрифугировали при 2000 мин⁻¹ и 4°C в течение 10 мин. Дальнейшую работу с клетками проводили при температуре 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 мл охлажденного стерильного 10% глицерина, перемешивали, после чего повторно центрифугировали в тех же условиях, супернатант декантировали. Отмывку повторяли три раза. Далее клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл охлажденного до 4°C стерильного 10% глицерина, тщательно перемешивали, и готовили аликвоты по 200 мкл в стерильных 1,5 мл пробирках. Замораживали пробирки в жидком азоте, хранили при температуре минус 70°C.

3.5.2. Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

Наработку плазмид рЕТ-ТК1 и рЕТ-ТК2 проводили путем клонирования в клетках *E. coli* DH10B. К 40 мкл взвеси электрокомпетентных клеток при температуре 4°C добавляли 2 мкл аликвоты плазмидной ДНК с концентрацией 1 нг/мкл. Смесь клеток с плазмидой аккуратно перемешивали, не пипетируя, после чего переносили в заранее охлажденную кювету для электропорации. Процесс осуществляли при напряжении 1,25 кВ, при этом время импульса составляло 4,5 мс. Сразу после электропорации содержимое кюветы доводили до объема 1 мл богатой питательной средой SOC (2% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза), перемешивали и переносили в стерильную пробирку, после чего термостатировали в течение 60 мин при 37°C. Далее 150 мкл культуры высевали на чашку Петри с LB-агаром (1,5% бактоагар) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение 16 ч.

3.5.3. Выделение плазмидной ДНК

Отдельные выросшие колонии инокулировали в 10 мл питательной среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и выращивали в течение 16 ч. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора «Gen Elute Plasmid Miniprep Kit» (Sigma) согласно инструкции производителя. Элюцию с сорбента производили с помощью деионизированной воды.

3.5.4. Рестрикция фрагментов ДНК и плазмидных векторов

Фрагменты ДНК, кодирующие АМП, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции для образования липких концов. Реакционная смесь содержала 100–200 нг раствора ДНК, 2 мкл 10× буфера FastDigest, по 1 мкл рестриктаз EcoRI (10 ед. акт./мкл) и BglII (10 ед. акт./мкл), воду (до

20 мкл). Растворы плазмидной ДНК (по 700 нг) смешивали с 3 мкл 10× буфера FastDigest, 2 мкл рестриктазы EcoRI (10 ед. акт./мкл), 2 мкл рестриктазы BamHI (10 ед. акт./мкл) и водой (до 30 мкл). Реакции проводили в течение 1 ч при 37°C, разбавляли водой, после чего проводили тепловую инактивацию ферментов и медленно охлаждали смеси.

3.5.5. Лигазная реакция

Смешивали 10 нг фрагмента ДНК с 100 нг линейризованной плазмиды и помещали в охлажденный до 4°C штатив на 1 мин. Далее добавляли 1 мкл 10 мМ АТФ, 1 мкл 10× буфера FastDigest, 0,5 мкл раствора ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas) и воду до объема 10 мкл. Смесь инкубировали при 16°C в водяном термостате в течение 3 ч. По завершении реакции добавляли 30 мкл воды и проводили тепловую инактивацию ДНК-лигазы.

3.5.6. Приготовление химически компетентных клеток *E. coli*

Клетки культуры *E. coli* штаммов DH10B, BL21 (DE3) и BL21 Star (DE3) из консерва (температура хранения минус 70°C) микробиологической петлей переносили в 10 мл жидкой среды LB без антибиотика и растили в течение 16 ч при 37°C и 220 мин⁻¹. Далее делали пересев в свежую среду и растили культуру до оптической плотности 0,5 ед., после чего осаждали клетки. Дальнейшую работу с клетками проводили при температуре 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 160 мл охлажденного стерильного 0,1 М CaCl₂, перемешивали, выдерживали 20 мин на льду и снова осаждали клетки. Осадок ресуспендировали в 20 мл охлажденного стерильного 0,1 М CaCl₂, добавляли 5 мл стерильного 50% глицерина. После этого суспензию клеток тщательно перемешивали, и готовили аликвоты по 1 мл в стерильных пробирках. Замораживали пробирки в жидком азоте и хранили при температуре минус 70°C.

3.5.7. Трансформация методом теплового шока

50 мкл взвеси компетентных клеток смешивали с 5 мкл лигазной смеси, инкубировали на льду в течение 20 мин. Смесь инкубировали в течение 90 сек при 42°C и переносили в лед на 5 мин. Содержимое пробирки доводили до объема 1 мл питательной средой SOC и термостатировали при 37°C в течение 45 мин. Далее осаждали клетки, отбирали 850 мкл супернатанта, клеточный осадок ресуспендировали в оставшемся объеме среды и высевали на чашки Петри с LB-агаром с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы. Инкубировали чашки при температуре 37°C в течение 16 ч.

3.5.8. ПЦР-анализ клонов

Наличие в плазмиде вставки требуемой длины контролировали с помощью ПЦР. В качестве прямого праймера применяли олигонуклеотиды, которые ранее использовали для

синтеза фрагментов, кодирующих АМП. Обратный праймер («T7 Reverse»), комплементарный сайту терминации транскрипции, был универсальным для всех реакций. В отдельных случаях из-за различий в физико-химических свойствах праймеров амплификацию проводили в режиме ступенчатого понижения температуры отжига («step-down PCR») с 67 до 48°C. Небольшое количество клеточного материала, содержащего анализируемую плазмидную ДНК, переносили микробиологической петлей с чашки Петри в пробирку с готовой стандартной реакционной смесью. Температурный режим реакции: 95°C – 10 мин (лизис клеток и денатурация ДНК), далее 32 цикла: 94°C – 30 сек, 67→48°C – 40 сек, 72°C – 30 сек.

3.5.9. Электрофорез в агарозном геле

Смешивали 10 мкл реакционной смеси с 3 мкл буфера для внесения образцов (1% Orange G, 50 mM ЭДТА, 30% глицерин) и переносили в лунки 1,5% агарозного геля, содержащего бромистый этидий. Разделение проводили в буфере ТАЕ (трис-ацетат-ЭДТА, pH 8,0) при постоянной напряженности поля 5 В/см. Облучая гели источником УФ, проводили качественную и количественную оценку в ходе сравнения образцов и стандартных ДНК маркеров с известной концентрацией.

3.5.10. Секвенирование ДНК

Из клонов, содержащих вставки нужного размера, выделяли плазмидную ДНК, смешивали с праймером «T7 Reverse» и высушивали. Секвенирование ДНК проводилось в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» на базе ИМБ РАН.

3.6. Сайт-направленный мутагенез

Большой по размеру вектор рЕТ-ТК1, включающий дополнительный ген белка-репрессора лактозного оперона, был использован для экспрессии пептидов, в структуру которых не предполагалось введение аминокислотных замен (апидаецин 1b, триртрицин, ChVas3.4, аципенсин-1). Короткий вектор рЕТ-ТК2 был использован для экспрессии β-шпилечных АМП (ареницин-1, ALP1, NZ17000, гомезин, тахиплезин-1). Сравнительно небольшая длина вектора позволяет с высокой эффективностью проводить амплификацию всей молекулы ДНК. В ходе работы проводили мутагенез нуклеотидных последовательностей, кодирующих АМП ареницин-1, ALP1 и тахиплезин-1. Схема введения мутаций включала полное копирование экспрессирующих конструкций на основе плазмиды рЕТ-ТК2, кодирующих последовательности пептидов, методом инвертированной ПЦР с использованием мутагенизирующих праймеров.

3.6.1. Инвертированная ПЦР

В ходе реакции отжиг праймеров происходил на интересующем фрагменте ДНК по принципу «хвост к хвосту». Были разработаны универсальные (У) и мутагенизирующие (М) праймеры, разбитые на три группы: 1) для мутагенеза N-концевой области пептидов; 2) для мутагенеза в районе β -изгиба пептидов; 3) для мутагенеза C-концевого участка пептидов. При амплификации последовательности, кодирующей ареницин-1, мутагенизирующие праймеры были вырожденными по первому нуклеотиду заменяющего триплета таким образом, чтобы вводить кодоны AGC (Ser), CGC (Arg) и GGC (Gly). В остальных случаях все мутагенизирующие праймеры были невырожденными. На 5'-концах всех праймеров был предусмотрен сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции (HindIII, SacII или EcoRI), который необходим для циркуляризации линейного ампликона с использованием «липких» концов. Схемы сайт-направленного мутагенеза пептидов представлены на рисунке 17.

В ходе мутагенеза N-концевой области ареницина-1 и ALP1 в качестве обратного праймера использовался универсальный праймер У1, комплементарный C-концевой области тиоредоксина и содержащий сайт рестрикции HindIII. В качестве прямых праймеров использовались пять различных мутагенизирующих олигонуклеотидов М1-М4, М10. Помимо мутаций в структуре АМП данная схема подразумевает технологическую замену линкерного дипептида Gly-Ser между тиоредоксином и целевым пептидом на дипептид Lys-Leu после введения сайта рестрикции HindIII. Для мутагенеза C-концевого остатка триптофана ареницина-1 и ALP1 использовались универсальный праймер У4 и мутагенизирующие праймеры М9 и М16, каждый из которых включал сайт узнавания рестриктазы EcoRI. При проведении мутагенеза центральной части пептидов 5'-концы праймеров отжигались на последовательности, являющейся сайтом узнавания рестриктазы SacII, и частично кодирующей консервативный для исследуемых β -шпильчатых АМП дипептид Arg-Gly в области β -изгиба. Для замен остатков в центральной части пептидов были использованы следующие праймеры: У2, У3, М5-М8 – для ареницина-1; У5, У6, М11-М15 – для ALP1; У7, У8, М17-М22 – для тахиплезина-1. Таким образом, амплификация проводилась со следующими парами праймеров: У1/М1, У1/М2, У1/М3, У1/М4, У3/М5, У2/М6, У2/М7, У2/М8, У4/М9, У1/М10, У6/М11, У6/М13, У5/М14, М12/М15, У4/М16, У7/М17, У7/М18, У7/М19, У7/М20, У8/М21, У8/М22.

Амплификацию проводили с помощью смеси термостабильных ДНК-полимераз «Advantage 2 Polymerase Mix» (Clontech) или полимеразы «Tersus» (Евроген), которые отличаются повышенной процессивностью и точностью копирования длинных ДНК-матриц в ходе реакции. Состав реакционной смеси: 2 мкл 10 \times буфера, 3 мкл эквимольной смеси dNTP (по 1,25 мкМ), 0,5 мкл полимеразы, 2 мкл раствора матричной плазмиды (0,02 нг/мкл), по 1 мкл растворов праймеров (10 пмоль/мкл) и 10,5 мкл воды.

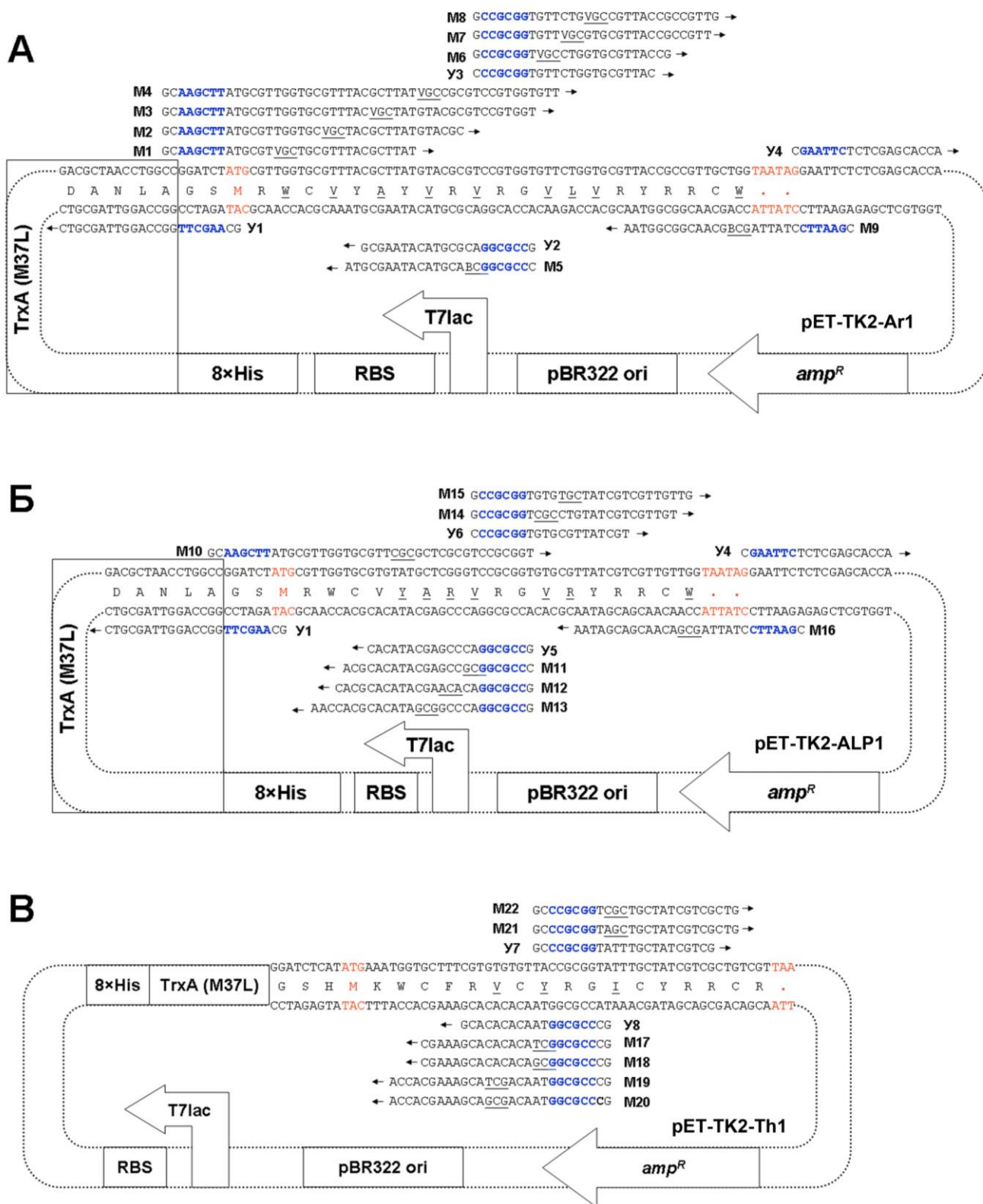


Рисунок 17. Схема сайт-направленного мутагенеза аргеницина-1 (А), ALP1 (Б), тахиплезина-1 (В). М1-М22 – мутагенизирующие праймеры, Y1-Y8 – универсальные праймеры. Мутагенизирующие кодоны и заменяемые аминокислотные остатки в структуре АМП подчеркнуты. Синим цветом выделены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции. Структурные элементы плазмиды: TrxA (M37L) – последовательность, кодирующая модифицированный тиоредоксин; 8×His – последовательность, кодирующая восемь остатков гистидина; pBR322 ori – участок инициации репликации плазмиды; *amp^R* – ген устойчивости к β-лактамым антибиотикам; T7lac – промотор транскрипции; RBS – сайт связывания рибосомы.

Температурный режим реакции: 95°C – 2 мин («горячий старт»), далее 25 циклов: 94°C – 30 с, 50°C – 40 с, 68°C – 8 мин, далее финальная элонгация 68°C – 15 мин. В отдельных случаях оптимизировали условия и компоненты реакции с целью увеличения специфичности и эффективности процесса.

Продукты ПЦР, фланкированные сайтами узнавания рестриктаз, анализировали с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле. ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и осаждали этиловым спиртом согласно вышеописанной методике. Далее ампликоны обрабатывали соответствующими рестриктазами (HindIII, SacII или EcoRI) в стандартных условиях и очищали с помощью агарозного электрофореза. Фрагменты длиной 4000 п.о. вырезали из 0,8% агарозного геля и выделяли с использованием сорбирующих нуклеиновые кислоты колонок с силикагелем из набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kits (Zymo Research) согласно инструкции производителя.

Циркуляризацию линейных ампликонов по «липким» концам проводили в условиях сильного разбавления ДНК (0,5–1 нг/мкл) в объеме 100 мкл. Реакционная смесь включала ДНК, 1 мкл ДНК-лигаза фага T4 (Fermentas), 10 мкл 10× буфер для лигазы (Fermentas), 1 мМ АТФ. Смесь инкубировали в течение 4 ч при ступенчатом повышении температуры от 14 до 25°C в водяном термостате.

Клоны, несущие плазмиды с необходимыми заменами, были получены в результате трансформации клеток *E. coli* DH10B лигазной смесью. При получении конструкций, кодирующих аналоги ареницина-1, с каждой из девяти чашек были отобраны по 8–10 клонов, из которых была выделена плазмидная ДНК. Отбор плазмид, несущих мутации Ser, Arg и Gly в каждом из положений, проводился с помощью секвенирования выделенных плазмидных ДНК. В остальных случаях отбирали по 2–3 клон, выделяли плазмидную ДНК и контролировали наличие требуемых замен также с помощью секвенирования ДНК.

Для получения аналогов ареницина-1 с двойными заменами в полипептидной цепи использовали полученные мутантные плазмиды в качестве матрицы для второго раунда инвертированной ПЦР с другими парами праймеров.

3.6.2. Введение дополнительных остатков и делеций

Фрагменты ДНК, кодирующие аналоги тахиплезина-1 с дополнительными N- и C-концевыми остатками и делециями, получали путем амплификации участка плазмиды pET-ТК2-Th1. Мутагенизирующие праймеры были фланкированы необходимыми сайтами и делециями, а также вышеописанными структурными элементами, позволяющими лигировать фрагменты в экспрессирующий вектор pET-ТК2. Амплификацию ДНК, сборку, очистку и анализ полученных плазмид проводили согласно приведенным ранее методикам.

3.7. Гетерологическая экспрессия антимикробных пептидов в составе гибридных белков

В работе была использована прокариотическая система, предназначенная для гетерологической экспрессии гибридных белков в непатогенных штаммах *E. coli* BL21 (DE3) и *E. coli* BL21 Star (DE3) со встроенным в хромосому геном T7 РНК-полимеразы. Штаммы продуценты всех антимикробных пептидов и их мутантных аналогов были получены путем трансформации клеток методом теплового шока или электропорации. Перед каждым циклом экспрессии получали свежие клоны, которые хранили на твердой питательной среде с глюкозой и ампициллином не более 7 дней при температуре 4°C. Индивидуальные клоны микробиологической петлей переносили с чашки в 10 мл питательной среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы и выращивали в течение 16 ч.

3.7.1. Оптимизация условий экспрессии

Предварительные эксперименты по экспрессии проводили путем культивирования клеток в небольших объемах среды LB или других богатых питательной сред (10–100 мл) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, 20 мМ глюкозы, фосфатного буфера (рН 7,8) и 1 мМ MgSO₄ при температуре 37°C и интенсивном перемешивании. По достижении культурой OD₆₀₀ ~0,5–4,0 добавляли индуктор изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG) до концентрации 0,2–0,5 мМ и продолжали инкубирование при температуре 25–37°C в течение 3–24 ч. Контроль за уровнем экспрессии гибридного белка осуществляли методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-электрофорез).

3.7.2. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

В ходе подготовки образцов для электрофоретического анализа аликвоты клеток ресуспендировали в денатурирующем буфере (0,1 М трис-НСl, 1% ДСН, 8 М мочевины, 1% β-меркаптоэтанола (ВМЕ), 0,01% Кумасси G-250, (рН 6,6)), выдерживали при температуре 99°C в течение 10 мин и вносили в лунки геля.

Анализ уровня экспрессии белков проводили по модифицированному методу Лэммли [401]. Разделение проводили в 15% акриламидном разделяющем геле в трис-глициновой буферной системе при постоянной силе тока 12 мА в течение 1,5 ч. Для разделения использовали электродный буфер (192 мМ глицин, 25 мМ трис-НСl, 0,1% ДСН, рН 8,3), разделяющий гель (15% Т, 3% С, 0,375 М трис-НСl (рН 8,8), 0,1% ДСН, 0,05% TEMED, 0,1% персульфат аммония), концентрирующий гель (5% Т, 3% С, 0,125 М трис-НСl (рН 6,8), 0,1% ДСН, 0,1% TEMED, 0,1% персульфат аммония). В случае анализа пептидных фракций с молекулярной массой менее 5 кДа разделение проводили в 16,5% акриламидном геле с добавлением 6 М мочевины в трис-трициновой буферной системе [402]. Электрофорез

проводили при напряжении 80 В (при концентрировании) и 110 В (при разделении) в течение 4 ч.

По окончании электрофореза гель обрабатывали фиксирующим раствором (50% метанол, 10% уксусная кислота) в течение 30 мин. Далее проводили замену на окрашивающий раствор (0,025% Кумасси G-250, 10% уксусная кислота) и выдерживали гель в течение 30 мин. Последующую двукратную отмывку 5% уксусной кислотой проводили в течение 24 ч.

3.7.3. Препаративная экспрессия антимикробных пептидов

Препаративную экспрессию проводили в стеклянных колбах Эрленмейера емкостью 2 л, в которые вносили по 500 мл питательной среды. Инокулят растили в течение 16 ч и добавляли в готовые среды таким образом, чтобы плотность культуры составляла ~0,02–0,05 опт. ед. Условия экспрессии выбирали на основании данных, полученных в ходе оптимизации.

Экспрессию аурелина проводили с помощью автоиндукции лактозой [403]. Состав среды: смесь для автоиндукции (0,5% глицерин, 0,05% глюкоза и 0,2% α -лактоза), 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ MgSO_4 , 100 мкг/мл ампициллина и богатая питательная среда (2% триптон, 3% дрожжевой экстракт, 1% NaCl). После внесения посевного материала культуру растили на качалке при 30°C в течение 20 ч до достижения OD_{600} 9,0–12,0.

Экспрессию остальных АМП индуцировали с помощью IPTG. Состав среды: 20 мМ глюкоза, 1 мМ MgSO_4 , 100 мкг/мл ампициллина и богатая среда LB. Клеточную культуру растили до оптической плотности OD_{600} 1,0, добавляли 0,2 мМ IPTG. При экспрессии аципенсина-1 время роста клеток после добавления индуктора составило 3 ч, в остальных случаях 5–6 ч. Температура индукции в большинстве случаев составляла 30–35°C. В отдельных случаях с целью препаративной наработки больших количеств ряда β -шпилечных АМП использовали модифицированные условия индукции, обеспечивающие накопление гибридного белка преимущественно в составе телец включения. Инокулят вносили в богатую среду, содержащую 1,5% триптона, 1,75% дрожжевого экстракта, 1% NaCl , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ MgSO_4 , 20 мМ глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина, и растили в течение нескольких часов при 37°C до OD_{600} 4,0. После добавления 0,2–0,4 мМ IPTG культивировали клетки в течение 20 ч при 30°C и интенсивном перемешивании. Конечные значения OD_{600} составляли 12–18.

С целью изучения структуры и свойств АМП методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии в ряде случаев использовалась методика получения пептидов, тотально меченных стабильным изотопом ^{15}N . Трансформированные клетки *E. coli* BL21 (DE3) и *E. coli* BL21 Star (DE3) культивировали в бедной среде M9, содержащей 0,2 г/л $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве основного источника азота, 0,2 мМ глюкозу, 1 мМ MgSO_4 , 100 мкг/мл ампициллин, 2 мг/л дрожжевого

экстракта, 10 мг/л гидрохлорида тиамина, а также следовые количества ряда микроэлементов в виде солей (FeCl_3 , CaCl_2 , MnCl_2 , ZnSO_4 , CoCl_2 , NiCl_2 , CuSO_4 , H_3BO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$). Клеточную культуру растили до оптической плотности OD_{600} 1,0. После добавления 0,2 мМ IPTG культивировали клетки в течение 16 ч при 30°C и интенсивном перемешивании.

3.8. Выделение и очистка рекомбинантных антимикробных пептидов

3.8.1. Выделение клеточного белка

Работы по выделению рекомбинантных белков проводили при температуре 4°C. В различных экспериментах выделяли растворимую, нерастворимую и суммарную фракцию клеточного белка. В первом случае клеточный осадок ресуспендировали в буфере для металлохелатной хроматографии (100 мМ фосфатный буфер (pH 7,8), 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол) в присутствии 2 мМ ингибитора сериновых протеиназ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) с помощью стеклянного гомогенизатора Даунса до получения однородной суспензии. Суспензию переносили в 50 мл пробирки и подвергали нескольким циклам ультразвукового лизиса, чередуя их со стадиями охлаждения. При выделении суммарной фракции клеточного белка все процедуры были аналогичны вышеописанным за исключением состава буфера: использовали буфер для металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях (100 мМ фосфатный буфер (pH 7,8), 6 М гуанидина-HCl, 20 мМ имидазол). Далее лизат осветляли путем центрифугирования при 30000g. Для выделения нерастворимой фракции клеточного белка на первом этапе ресуспендировали клетки в лизирующем буфере (100 мМ фосфатный буфер (pH 7,8), 0,5 М NaCl, 1% Triton X-100, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF) и подвергали их ультразвуковому лизису. Лизат центрифугировали при 30000g, осадок промывали с помощью 4 М раствора мочевины и далее растворяли или в закисленном 6 М гуанидине-HCl, или буфере для металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях, в зависимости от способа дальнейшей очистки. При необходимости нерастворимые примеси отделяли путем центрифугирования.

3.8.2. Металлохелатная хроматография

Раствор, содержащий рекомбинантный белок с октагистиридиновой последовательностью, наносили на хроматографическую колонку с металлохелатным сорбентом (Ni-NTA агарозой), предварительно уравновешенную одним из буферов вышеуказанного состава. Очистку проводили при нормальном давлении. Объемная скорость потока составляла 1 мл/мин. В зависимости от количества наносимого образца объем сорбента составлял от 4 до 20 мл. После отмывки колонки от неспецифически связавшихся компонентов проводили элюцию гибридного

белка буфером, содержащим 500 мМ имидазола. Выход белка детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 280 нм.

3.8.3. Диализ

В отдельных случаях компоненты буфера удаляли с помощью диализа через мембрану с размером пор 14 кДа. Диализ проводили дважды против 100–200 объемов 2% уксусной кислоты в течение 16 ч при 4°C. После диализа белок высушивали с помощью установки для лиофильной сушки.

3.8.4. Расщепление гибридного белка

Расщепление гибридного белка с целью высвобождения целевого пептида проводили с помощью реакции с бромцианом в кислой среде. Собранную после очистки с помощью металлохелатной хроматографии в 6 М гуанидине фракцию, содержащую белок, титровали концентрированной соляной кислотой до значения pH ~1,0, после чего добавляли бромциан со 100-кратным молярным избытком по отношению к метионину белка. В остальных случаях высушенный белок или тельца включения растворяли в 6 М гуанидине-HCl и 0,2 М HCl в концентрации 50 мг/мл, после чего добавляли бромциан. Реакцию проводили в течение 16–20 ч, в темноте при температуре 22°C. Бромциан добавляли в виде 50% раствора в ацетонитриле. Реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды и упариванием образца на вакуумной центрифуге при температуре 37°C. Далее к смеси добавляли воду до исходного объема реакции.

3.8.5. Циклизация N-концевого остатка глутамина

При наличии в структуре целевого пептида N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты (Z) проводили циклизацию остатка глутамина при кислых значениях pH. Реакционную смесь (pH 1,0) после удаления бромциана дополнительно инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч, после чего подвергали дальнейшей очистке.

3.8.6. Селективное осаждение белков

После химического расщепления бромцианом телец включения, обогащенных гибридным белком, добавляли к одному объему реакционной смеси два объема водного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ), до конечной концентрации 10%. Для осаждения белков смесь инкубировали 60 мин при температуре 0°C и далее центрифугировали при 10000g в течение 20 мин. Супернатант переносили в новую пробирку и упаривали на вакуумной центрифуге с целью удаления бромциана и ТФУ, после чего добавляли воду до полного растворения смеси.

3.8.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Финальную стадию очистки рекомбинантных пептидов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на полупрепаративной колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ (10×250 мм, Dr. Maisch) в системе буферов, содержащих ацетонитрил и 0,1% ТФУ в тридистиллированной воде. Перед нанесением на колонку образцов, содержащих целевой пептид, растворы титровали до слабокислых или нейтральных значений pH с помощью 1 М NaOH и удаляли механические примеси путем центрифугирования. Разделение проводили при скорости потока 2 мл/мин в линейном или ступенчатом градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% в зависимости от свойств целевого пептида. Выход пептидов детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 214 нм. Фракции элюата, соответствующие основным пикам на хроматограмме, собирали и лиофильно высушивали на вакуумной центрифуге. При работе с объемами элюата (более 50 мл) сушку проводили в два этапа: сначала удаляли большую часть ацетонитрила с помощью роторного испарителя при 37°C, после чего высушивали пептид на установке для лиофильной сушки.

Для определения времени удерживания АМП на ОФ-ВЭЖХ колонке, соответствующего общей гидрофобности молекулы, использовали аналитическую колонку Symmetry 300 C₁₈ (4,6×250 мм, Waters). Аликвоту пептида (50 мкг) в виде раствора в воде наносили на колонку и проводили разделение в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 32% за 80 мин в присутствии 0,1% ТФУ при постоянной температуре 25°C.

3.9. Качественный и количественный анализ очищенных пептидов

Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов проверяли с помощью ПААГ-электрофореза и МАЛДИ масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ проводился в Центре коллективного пользования ИБМХ РАМН на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Reflex III (Bruker Daltonics). Концентрацию очищенных пептидов в водных растворах определяли методом спектрофотометрии по поглощению при 280 нм по следующей формуле: $C_M = OD_{280}/\epsilon$, где OD_{280} – оптическая плотность раствора при 280 нм, ϵ – расчетный молярный коэффициент экстинкции пептида [л/моль]. Расчетные значения молярных коэффициентов экстинкции получали с помощью программы ProtParam (ExPASy).

Дополнительный качественный анализ вторичной структуры пептидов в водных и мицеллярных растворах осуществляли с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Анализ проводился в Центре коллективного пользования ИБХ РАН на приборе J-810 (Jasco).

Содержание свободного эндотоксина *E. coli* в очищенных препаратах АМП, предназначенных для тестирования цитотоксичности *in vitro* и острой токсичности *in vivo*,

контролировали с помощью LAL-реактива (*Limulus Amebocyte Lysate*) (Sigma). Эксперимент проводили в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

3.10. Контроль корректного замыкания дисульфидных связей в пептидах

Очищенный препарат (100 мкг) анализируемого пептида растворяли в 100 мкл 0,1 М трис-НСl буфере (рН 8,0), после чего добавляли трипсин, предварительно растворенный в 50 мМ уксусной кислоте, в массовом соотношении к пептиду 1:50. Гидролиз осуществляли в течение 16 ч при температуре 37°C. Продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на аналитической колонке Symmetry 300 C₁₈ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 35% за 70 мин в присутствии 0,1% ТФУ. Основные фракции элюата лиофильно высушивали и анализировали с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии.

3.11. Антимикробная активность

Антимикробную активность пептидов определяли методом двукратных серийных разведений в стерильных 96-луночных планшетах (Costar, Biofil) в жидкой питательной среде, содержащей 5 г/л триптона, 2,5 г/л дрожжевого экстракта и 10 г/л NaCl. Бактериальные культуры растили в среде LB в течение 16 ч при 37°C и 220 мин⁻¹. После этого аликвоту культуры объемом 300 мкл добавляли к 6 мл среды LB/2 и инкубировали в термостатируемой качалке при 37°C до достижения культурой оптической плотности OD₆₀₀ 1,0. Далее методом последовательных разведений в 2× питательной среде готовили тестовые культуры с концентрацией 2–5×10⁵ КОЕ/мл. Аликвоты тест-культуры объемом 50 мкл добавляли к 50 мкл водных растворов пептидов, предварительно разведенных от 50 до 0,4 мкМ в пересчете на конечную концентрацию в лунке. После добавления культуры, планшет инкубировали в течение 24 ч при 37°C и интенсивном перемешивании 1000 мин⁻¹. Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) определяли визуально и с помощью спектрофотометра, как минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост культуры. Эксперименты проводились в течение 3–4 раз в трехкратной повторности, причем итоговая МИК рассчитывалась как медиана полученных значений. Значение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) определяли как минимальную концентрацию, при которой наблюдается отсутствие роста бактериальных колоний при пересеве культуры из лунки с соответствующей концентрацией препарата на твердую питательную среду. Тестирование активности в отношении клинических изолятов мультрезистентных бактерий проводили аналогичным образом в 2,1% бульоне Мюллера-Хинтон с добавлением или без 10 г/л NaCl. Серийные разведения тестируемых пептидов проводили в 0,1% водном растворе бычьего

сывороточного альбумина (БСА) с целью снижения неспецифического связывания пептидов с поверхностью планшетов. В ходе проведения экспериментов учитывали рекомендации, приведенные в работах [404,405].

3.12. Гемолитическая активность

Для тестирования гемолитической активности пептидов использовались свежевыделенные человеческие эритроциты. К отобранной крови здорового донора для предотвращения свертывания добавляли цитратный буфер. В дальнейшем цельную кровь центрифугировали в растворе фиколла 400 и урографина (плотность 1,077 г/мл) в течение 15 мин при 500g. Фракцию эритроцитов отбирали со дна и трижды промывали двадцатью объемами охлажденного забуференного физиологического раствора (ЗФР) (рН 7,4), после чего готовили 8% (v/v) суспензию эритроцитов в ЗФР.

Для теста в 96-луночном планшете готовили серии двойных разведений исследуемых пептидов от 400 до 3,13 мкМ (в пересчете на конечную концентрацию в лунке) объемом 50 мкл. После этого к растворам пептидов добавляли по 50 мкл 8% суспензии эритроцитов. Планшет инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C и интенсивном перемешивании 1000 мин⁻¹. После инкубации, планшеты центрифугировали в течение 15 мин при 1000g для осаждения интактных эритроцитов. Далее аликвоты супернатанта переносили в другой планшет для измерения количества свободного гемоглобина по поглощению раствора при 405 нм. В качестве отрицательного контроля (К-) использовали супернатант, полученный после центрифугирования эритроцитов, инкубировавшихся в растворе ЗФР без добавления пептида. В качестве положительного контроля (К+) использовали супернатант, полученный после центрифугирования эритроцитов, инкубировавшихся в 0,1% водном растворе Triton X-100, вызывающего их полный лизис. Процент гемолиза рассчитывали по формуле: гемолиз (%) = $(OD_{405} \text{ пробы} - OD_{405} \text{ «К-»}) \times 100 / (OD_{405} \text{ «К+»} - OD_{405} \text{ «К-»})$. Эксперименты проводились в трехкратной повторности в течение 2–3 раз с кровью одного и того же человека.

3.13. Цитотоксичность

Тестирование цитотоксического действия АМП в отношении нормальных клеток млекопитающих проводили с помощью МТТ-теста. Методика основана на способности дегидрогеназ живых клеток, восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ-реагент) до нерастворимого в воде фиолетового кристаллического фармазана. Клеточные линии человека (нормальные астроциты (ННА) и эмбриональные фибробласты (НЕФ)) высаживали в 96-луночные планшеты (по 10⁴ клеток в каждую лунку) и

растили в среде DMEM/F-12 в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ в воздухе). Далее культуральную жидкость заменяли свежей средой, в которой предварительно растворяли тестируемый пептид. После инкубации в течение 24 ч в вышеописанных условиях в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ в ЗФР (5 г/л), после чего продолжали инкубацию в течение 4 ч. Аккуратно удаляли среду, добавляли в лунки по 100 мкл смеси диметилсульфоксида (ДМСО) и этилового спирта (1:1) для растворения кристаллов формазана и измеряли оптическую плотность растворов при 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра. Долю живых клеток определяли по формуле: $\text{выживаемость (\%)} = [(\text{OD}_{570} \text{ пробы} - \text{OD}_{570} \text{ «К-»}) \times 100 / (\text{OD}_{570} \text{ клетки без пептида} - \text{OD}_{570} \text{ «К-»})]$, где «К-» фоновое поглощение лунки с растворителем. Эксперименты проводились в течение 2 раз в трехкратной повторности.

3.14. ДНК-связывающая активность

Способность АМП связываться с молекулами ДНК оценивали по изменению электрофоретической подвижности плазмиды pUC19 в 0,8% агарозном геле после добавления пептида. Плазмиду в количестве 100 нг смешивали с АМП в различных массовых соотношениях в буфере, содержащем 5% глицерин, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 20 мМ КСl и 50 мг/л БСА, и инкубировали при 25°C в течение 30 мин. В отдельных экспериментах оценивали влияние повышенной ионной силы на связывание, добавляя в буфер 100 мМ NaCl. Внесение образцов в лунки и электрофоретическое разделение проводили согласно вышеописанной методике. Визуализацию результатов проводили с помощью УФ-трансиллюминатора.

3.15. Измерение проницаемости наружной и цитоплазматической мембран *E. coli* в реальном времени

Используемый в данном методе штамм *E. coli* ML-35p отличается отсутствием пермеазы лактозы, конститутивным синтезом β-галактозидазы в цитоплазме, а также присутствием β-лактамазы в периплазматическом пространстве клетки. О состоянии цитоплазматической и наружной мембран *E. coli* ML-35p судили по ее проницаемости в присутствии АМП для хромогенных маркеров – о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG) и нитроцефина – субстратов β-галактозидазы и β-лактамазы, соответственно. В результате ферментативного расщепления субстрата происходит возрастание поглощения раствора в лунке при длине волны 540 нм (продукт гидролиза нитроцефина) или 405 нм (продукт гидролиза ONPG), что позволяет

контролировать процесс повреждения наружной или цитоплазматической мембраны бактерии под действием антимикробного агента в режиме реального времени.

Состав смеси (объем 200 мкл): 2,5 мМ ONPG или 20 мкМ нитроцефина, 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,4), $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл бактерий, пептид. Контрольные пробы содержали вместо препаратов АМП равные объемы воды. В отдельных экспериментах оценивали влияние повышенной ионной силы, добавляя в буфер 100 мМ NaCl, а также физиологического состояния клеток, используя культуры, находящиеся в логарифмической (экспоненциальной) или стационарной фазах роста. Для снижения неспецифической сорбции пептидов, присутствующих в низких концентрациях, в лунки планшета предварительно добавляли по 200 мкл 0,1% БСА, инкубировали 60 мин и удаляли перед внесением тестируемых смесей. Пробы вносили в лунки 96-луночного планшета, инкубировали в течение 120 мин при 37°C и перемешивании. Оптическую плотность раствора измеряли с помощью планшетного спектрофотометра каждые 3 мин в течение первого часа, далее через 90 и 120 мин. Эксперименты повторяли 2 раза в трехкратной повторности.

3.16. Измерение проницаемости цитоплазматической мембраны *S. aureus* в реальном времени

Клетки грамположительных бактерий *S. aureus* 209P выращивали в жидкой питательной среде LB при 30°C. Клетки, находящиеся в логарифмической и стационарной фазах роста, промывали и разводили 10 мМ натрий-фосфатным буфером (рН 7,4) до концентрации 2×10^6 КОЕ/мл. К суспензии клеток добавляли 1 мкМ красителя SYTOX Green и инкубировали смесь в темноте в течение 15 мин. Далее аликвоты клеточной суспензии (по 95 мкл) помещали в 96-луночную полипропиленовую плашку для ПЦР и добавляли многоканальной пипеткой пробы по 5 мкл пептида таким образом, чтобы конечная концентрация составила 2 мкМ. Плашку быстро переносили в детектирующий флюоресценцию амплификатор ДТ-96 (ДНК-Технология), запрограммированный следующим образом: фильтр – FAM (470/520 нм), время – 30 мин, температура – 30°C, детектирование каждую минуту. Под действием АМП происходит нарушение целостности мембраны, что приводит к взаимодействию ДНК и интеркалирующего красителя. Таким образом, детектировали возрастание сигнала флюоресценции во времени. Данные фоновой флюоресценции ячеек амплификатора и контрольных проб без пептида вычитали из соответствующих экспериментальных значений. Эксперименты повторяли 2 раза в трехкратной повторности. Характер кривых был аналогичным во всех сериях экспериментов.

3.17. Измерение стабильности пептидов в сыворотке крови

Свежевыделенную человеческую сыворотку центрифугировали при 14000g в течение 15 мин, после чего удаляли липидные компоненты с поверхности супернатанта. В эксперименте использовали 25% раствор сыворотки в ЗФР. Аликвоты анализируемых пептидов (по 60 мкг) инкубировали в растворе сыворотки в течение: 30 мин, 2, 8 и 24 ч при температуре 37°C. После инкубации селективно осаждали сывороточные белки из смеси, добавляя 10% ТФУ в присутствии 3 М мочевины. В контрольных образцах осаждение проводили сразу после добавления сыворотки. Далее образцы выдерживали при температуре 0°C в течение 30 мин, центрифугировали при 14000g в течение 20 мин. Полученный супернатант анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии согласно методикам, приведенным выше. Количественную оценку интактного пептида в элюате оценивали по высоте соответствующего пика на хроматограмме ОФ-ВЭЖХ и контролировали с помощью спектрофотометрии по расчетным коэффициентам экстинкции.

3.18. Измерение синергических эффектов при совместном действии антимикробных пептидов

Антибактериальную активность смеси двух пептидов определяли методом двукратных серийных разведений в 96-луночных планшетах (Biofil) согласно вышеописанной методике. Соотношение пептидов в смеси выбирали исходя из значений индивидуальных МИК. Оценка синергического эффекта проводили путем вычисления индексов фракционных ингибирующих концентраций (индекс ФИК, FIC index – *f*ractional *i*nhibitory *c*oncentration *i*ndex) по формуле: $\text{ФИК} = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$, где МИК_A и МИК_B – минимальные ингибирующие концентрации для индивидуальных веществ, а $[A]$ и $[B]$ – минимальные ингибирующие концентрации при совместном применении препаратов. Значение индекса $\text{ФИК} \leq 0,5$ указывает на синергический эффект при совместном применении пептидов.

4. Результаты и обсуждение

В ходе работы по поиску новых пептидов системы врожденного иммунитета животных сотрудниками Учебно-научного центра ИБХ РАН совместно с лабораторией общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» был выделен и охарактеризован ряд соединений из морских беспозвоночных и рыб, обладающих антимикробной активностью: ареницины из целомацитов морского кольчатого червя *Arenicola marina*, аципенсины из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* и аурелин из мезоглеи сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. Ранее в Учебно-научном центре ИБХ РАН для всех пептидов была определена аминокислотная последовательность, а также структурная организация кодирующих их генов и белков-предшественников [171,406,407]. В совместной работе с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН ранее была определена пространственная структура ареницина-2 в водном растворе, представляющая собой β -шпильку [175]. Также была установлена структура аурелина, который формирует в водном растворе две скрещивающиеся α -спирали, стабилизированные тремя дисульфидными связями [408], что характерно для ряда токсинов из яда морских анемонов [409]. Аципенсины являются фрагментами гистона H2A и, по-видимому, аналогично буфориам из жабы *Bufo bufo gargarizans* [410], формируют линейную α -спиральную структуру при контакте с липидным бислоем клетки-мишени.

На начальном этапе данной работы с целью сравнительного анализа антимикробного потенциала были получены рекомбинантные аналоги ареницина-1, аципенсина-1 и аурелина, а также целого ряда АМП животного происхождения, относящихся к различным структурным классам и обладающих различными механизмами действия (см. п. 4.3): β -шпилечные тахиплезин-1, гомезин и NZ17000; пролин-богатые бактенецин ChVac3.4 и апидаецин 1b; триптофан-богатый трирптицин. В ходе экспериментов в условиях *in vitro* активность β -шпилечных АМП ареницина-1, тахиплезина-1 и NZ17000 в отношении ряда распространенных бактериальных возбудителей заболеваний на порядок превышала показатели для остальных пептидов (см. п. 4.3). Благодаря высокому антибактериальному потенциалу для дальнейших структурно-функциональных исследований были выбраны пептиды ареницин-1 и тахиплезин-1. Пептид NZ17000, аналог которого проходит клинические испытания в США как антибиотический препарат широкого спектра действия, использовался нами в качестве контрольного препарата в ряде экспериментов.

4.1. Структурно-функциональное исследование ареницина-1

Несмотря на возрастающее в последние годы количество структурно-функциональных исследований АМП, закономерности, позволяющие точно прогнозировать биологические

свойства и активность этих молекул, пока еще не выявлены. Современная биоинженерия новых высокоактивных и селективных антибиотиков на основе АМП включает поиск и выделение их прототипов из природных источников, высокопроизводительный скрининг комбинаторных библиотек, рациональный дизайн *de novo*, биофизические методы, направленные на изучение молекулярной динамики взаимодействия АМП и мембран, а также методы виртуального скрининга [82]. В отличие от молекул, действующих на специфические рецепторы, мишенью для большинства катионных АМП является мембрана клетки, что значительно усложняет моделирование их взаимодействия *in silico*.

4.1.1. Изучение полноразмерных аналогов ареницина-1

Ранее в ходе скрининга нескольких сотен аналогов β -спилечного протеина-1 было показано, что замена или удаление целого ряда аминокислотных остатков в структуре АМП не вызывает значительного изменения биологических свойств пептида, что свидетельствует о ключевой роли общих физико-химических параметров и пространственной структуры в механизме действия. Изменение суммарного заряда, амфифильности, общей гидрофобности и длины молекулы способно оказывать влияние на спектр и селективность действия в отношении клеток-мишеней, однако редко приводит к заметному увеличению антимикробной активности АМП [228]. Исходя из этого, усиление терапевтического потенциала антимикробных пептидов может быть достигнуто, в первую очередь, за счет снижения их цитотоксичности в отношении клеток млекопитающих, что является характерной особенностью наиболее активных β -спилечных АМП. Жесткая пространственная структура, стабилизированная водородными связями, π -катион-взаимодействиями и дисульфидными мостиками, делает их удобными объектами для направленного мутагенеза с целью изменения биологических функций и селективности действия.

Для создания терапевтически ценных аналогов ареницина-1 был применен «матричный» подход («template-based» study) [82], который позволяет путем точечных замен выявить аминокислотные остатки в структуре пептида, обуславливающие высокую токсичность в отношении клеток млекопитающих. Кроме того, данный подход позволяет пролить свет на особенности механизма действия пептида и ключевые для высокой антимикробной активности аминокислотные остатки.

Ранее подобным образом был исследован ряд цитотоксичных АМП. Так, изменение амфифильности α -спиральных антимикробных пептидов V681 и аналога кателицидина LL-37 путем замены остатка Val в центре гидрофобной поверхности на Lys, Ser или Gly приводило к снижению цитотоксичности пептида на порядок без ущерба для антимикробных свойств [411,412]. К схожему результату приводило нарушение выраженной амфифильности у

циклического и удлиненного аналога грамицидина С [59]. Выраженная амфифильность структуры в ряде случаев является причиной агрегации пептидов. Известно, что к увеличению селективности α -спирального мембранолитика мелиттина из яда пчелы приводят точечные замены остатков лейцина, ответственных за олигомеризацию пептида на поверхности мембран, на менее гидрофобный аланин [413]. На примере протегрина-1 была показана ключевая роль агрегации пептида в лизисе мембран, обогащенных цвиттерионными липидами [190]. С другой стороны, структурно схожие с протегринами θ -дефенсины не обладают столь выраженной амфифильностью, что, по-видимому, обуславливает их невысокую гемолитическую активность.

Независимо от типа пространственной структуры, большинство АМП содержат в своем составе ~50% гидрофобных аминокислотных остатков. Значительное снижение, равно как и увеличение, доли гидрофобных остатков приводит к потере способности взаимодействовать с мембраной клетки мишени [400]. Известно, что усиление гидрофобных свойств АМП, как путем добавления соответствующих остатков, так и путем химических модификаций (ацилирование [414], фторирование [415]), ведет к снижению селективности мембранотропного действия вследствие значительного возрастания сродства к цвиттерионным и нейтральным компонентам мембран клеток млекопитающих при сохранении антимикробной активности на прежнем уровне. Кроме того, высокая гидрофобность снижает растворимость пептидов в водных растворах, что приводит к процессам агрегации и неспецифическому связыванию с мембранами любого состава. Подобная «избыточная» гидрофобность характерна и для многих природных АМП. Таким образом, уменьшение гидрофобности АМП путем замены алифатических или ароматических аминокислотных остатков на полярные является одним из способов повышения селективности действия АМП в отношении бактериальных клеток. Так, объект данной работы – ареницин-1 – содержит более 50% гидрофобных аминокислотных остатков, обладает выраженной амфифильностью, которая может усиливаться за счет димеризации пептида при взаимодействии с мембрано-имитирующими средами [179].

На первом этапе работы была поставлена задача – создать методику для направленного мутагенеза ареницина-1 и получить с ее помощью набор генно-инженерных конструкций для гетерологической экспрессии аналогов пептида. Методы сайт-направленного мутагенеза являются в настоящее время ключевым инструментом для рационального дизайна молекул белково-пептидной природы, а также для понимания взаимосвязи между их структурой и функциями. Развитие метода и разработка новых молекулярных инструментов для ПЦР позволили проводить эффективную амплификацию длинных фрагментов ДНК. В результате возник метод амплификации всей генно-инженерной конструкции с помощью «инвертированной» ПЦР, который применяется наряду с мутагенезом для исследования и клонирования неизвестных геномных последовательностей, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые

области или интроны [416]. В данной работе метод не потребовал использования эндонуклеазы DpnI для удаления метилированной матричной плазмиды, поскольку ее концентрация по окончании реакции была несопоставимо меньше концентрации ПЦР-продукта. На стадии планирования эксперимента были разработаны три группы праймеров: для мутагенеза N-концевой последовательности ареницина-1, области β -изгиба и C-концевого участка пептида. Использование при создании плазмидных конструкций палиндрома CCGCGG (сайт рестрикции SacII), частично кодирующего консервативный для многих β -шпилечных АМП дипептид Arg-Gly в области β -изгиба, позволило проводить сайт-направленный мутагенез центральной части пептидов с дальнейшей циркуляризацией ампликонов по липким концам. В ходе оптимизации условий ПЦР высокая специфичность и эффективность реакции была достигнута путем снижения длины экспрессирующей плазмиды с 5,8 до 4 т.п.н. и добавления в реакционную смесь неионных детергентов. Детергенты в низких концентрациях способствуют стабилизации фермента ДНК-полимеразы в ходе длительного процесса амплификации, что в итоге приводит к повышению качества конечного продукта ПЦР.

Выбор вводимых аминокислотных остатков был обусловлен как разнообразием их химических свойств, так и удобством осуществления процедуры мутагенеза. В работе были использованы вырожденные мутагенизирующие праймеры с целью получения сразу трех вариантов аминокислотных замен по одному остатку за один раунд амплификации (AGC - Ser, CGC - Arg, GGC - Gly). Разделение смесей плазмид осуществлялось на стадии селекции отдельных клонов. Ведение одного из трех остатков способно в различной степени снизить общую гидрофобность молекулы. В соответствии с большинством известных шкал гидрофобности данный параметр снижается в ряду: глицин > серин > аргинин [417].

Аргинин широко представлен в структурах β -шпилечных АМП и играет важную роль в механизме их действия. В отличие от лизина, боковая группа аргинина содержит гуанидин, который благодаря делокализованному по плоской структуре положительному заряду позволяет более эффективно взаимодействовать с фосфатными группами липидов и нуклеиновых кислот [418]. Серин также является типичным остатком для многих АМП и, обладая полярными свойствами, способен снизить общую гидрофобность молекулы. Глицин, не обладающий боковым радикалом, в большей мере был использован для исследования функциональной значимости отдельных остатков, аналогично методу сканирования аланином [419]. В данном случае использование глицина вполне оправдано, поскольку его конформационная подвижность нивелируется общей стабильностью пространственной структуры ареницина-1.

В результате анализа особенностей структуры ареницина-1 ($R^1WCVYAYVVRV^{10}RGVLRVYRRC^{20}W^{21}$) и обобщения литературных данных была выработана стратегия сайт-направленного мутагенеза пептида, основными пунктами которой являлись следующие:

- в ходе сайт-направленного мутагенеза с помощью вырожденного триплета (G,A,C)GC вводили один из трёх остатков (глицин, серин или аргинин);
- в структуре пептида на первом этапе проводились точечные аминокислотные замены;
- замене не подвергались остатки, обеспечивающие стабильность структуры: дипептид Arg¹¹-Gly¹², способствующий формированию β-изгиба; остатки Cys³ и Cys²⁰, образующие дисульфидную связь; остатки Tyr⁵, Tyr⁷ и Tyr¹⁷, участвующие в π-катион-взаимодействиях [176];
- для оценки вклада отдельных аминокислот в суммарную гидрофобность и цитотоксичность проводили замены остатков аланина, валина, лейцина, триптофана на менее гидрофобный глицин или более гидрофильные серин и аргинин;
- для оценки влияния выраженной амфифильности ареницина-1 на уровень цитотоксичности производили замены остатков Val⁸, Val¹⁰, Val¹³, Val¹⁵, формирующих гидрофобную поверхность в структуре мономера [176], на полярные остатки серина и аргинина;
- для оценки роли димеризации ареницина-1 в проявлении цитотоксичности производили замены остатков, входящих в состав N-концевой цепи пептида.

Все 27 аналогов ареницина-1 с точечными заменами были получены с использованием единой схемы экспрессии и очистки. Разработка схемы проводилась с учетом опыта предшествующих работ по получению других рекомбинантных АМП в Учебно-научном центре ИБХ РАН, а также общих рекомендаций по созданию суперпродуцентов белков на основе *E. coli* [420,421]. Выбор был сделан в пользу системы, основанной на использовании РНК-полимеразы бактериофага T7 и промотора T7, на экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3), а также на получении гибридного белка, содержащего октагистидиновую последовательность и модифицированный тиоредоксин, обеспечивающих, соответственно, возможность аффинной очистки белка и сверхэкспрессию токсичного для клетки-продуцента продукта в растворимой форме в цитоплазме клетки. Несмотря на это, гибридные белки, содержащие, ареницины были склонны к частичной экспрессии в нерастворимой форме даже при невысоких температурах культивирования. Для увеличения выхода гибридного белка лизис клеток после экспрессии проводили в денатурирующих условиях. С целью упрощения процедуры очистки расщепление гибридного белка проводили путем добавления бромциана непосредственно в элюат после металлохелатной хроматографии, поскольку наличие солей и других компонентов буферов не

влияет на эффективность реакции [422]. Для предотвращения фрагментации белка-носителя метионин в последовательности тиоредоксина был заранее заменен остатком лейцина. Очистку целевых пептидов из смеси проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ на полупрепаративной колонке. Лиофильно высушенные пептиды растворяли в воде, после чего определяли концентрацию по поглощению в УФ-области спектра. Средний выход пептидов составил около 4 мг с 1 л бактериальной культуры. Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов подтверждали с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Значения полученных молекулярных масс соответствовали расчетным с учетом замыкания одной дисульфидной связи (данные не приведены).

Для всех пептидов была протестирована антимикробная активность в отношении ряда условно-патогенных грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерий, являющихся возбудителями ряда распространенных инфекционных заболеваний. Эксперименты проводились в богатой питательной среде, а также в присутствии хлорида натрия в физиологической концентрации, которая снижает активность многих природных АМП [31].

Цитотоксическая активность пептидов определялась по способности вызывать лизис человеческих эритроцитов. Ранее было показано, что ареницин-2 не взаимодействует с нейтральными липосомами на основе 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолина (ПОФХ). Тем не менее, обе природные изоформы ареницина вызывают быстрый лизис эритроцитов и гибель других клеток млекопитающих. Стоит отметить, что мембрана эритроцитов имеет весьма сложное строение, а поверхность клеток не является электрически нейтральной за счет высокой доли экспонированных сиаловых кислот [423]. Кроме того, в ряде работ по изучению механизма действия АМП было показано отсутствие корреляции при сопоставлении результатов исследований на отрицательно заряженных липосомах и бактериальных клетках [424]. В связи с вышесказанным, в данной работе исследовалась мембранотропная активность пептидов в отношении живых клеток. Оценка селективности действия полученных аналогов была проанализирована путем расчета соответствующих терапевтических индексов (ТИ) – отношения минимальной гемолитической концентрации (МГК) к среднему геометрическому значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для трех бактериальных культур. Данные о биологической активности ареницина-1 и его аналогов представлены в таблице 1.

Тестирование минимальной бактерицидной концентрации (МБК) с высевом содержимого лунок на твердую питательную среду показало, что в большинстве случаев МБК для наиболее активных аналогов совпадает или в два раза превышает значения МИК для соответствующего пептида. Это указывает на бактерицидный, а не бактериостатический механизм действия ареницина-1 и его аналогов.

Таблица 1. Биологическая активность ареницина-1 и его аналогов

Пептид	МИК ^а , мкМ			СГ ^б , мкМ	МГК ^в , мкМ	ТИ ^г
	<i>S. aureus</i> , 209P	<i>E. coli</i> , C600	<i>P. aeruginosa</i> , PAO1			
Ареницин-1	6,25	1,56	6,25	3,9	4,1	1,1
W2G	50	12,5	25	25,0	5,5	0,2
W2S	>50	25	25	39,7	5,5	0,1
W2R	>50	12,5	25	31,5	9,4	0,3
V4G	6,25	3,13	6,25	5,0	36,2	7,2
V4S	50	6,25	25	19,8	23,1	1,2
V4R	25	3,13	12,5	9,9	48,5	4,9
A6G	6,25	1,56	3,13	3,1	17,0	5,5
A6S	25	3,13	6,25	7,9	13,9	1,8
A6R	>50	6,25	25	25,0	71,0	2,8
V8G	6,25	1,56	1,56	2,5	6,7	2,7
V8S	3,13	0,8	1,56	1,6	26,8	16,8
V8R	6,25	1,56	1,56	2,5	125,0	50,0
V10G	>50	50	50	63,0	4,9	0,1
V10S	25	3,13	12,5	9,9	4,3	0,4
V10R	3,13	0,8	1,56	1,6	9,5	5,9
V13G	6,25	1,56	1,56	2,5	5,9	2,4
V13S	6,25	1,56	1,56	2,5	9,7	3,9
V13R	6,25	0,8	1,56	2,0	13,7	6,9
L14G	25	6,25	12,5	12,5	4,4	0,4
L14S	25	3,13	25	12,5	3,1	0,2
L14R	6,25	1,56	6,25	3,9	3,1	0,8
V15G	6,25	3,13	6,25	5,0	12,8	2,6
V15S	6,25	1,56	3,13	3,1	24,8	8,0
V15R	12,5	1,56	12,5	6,2	28,3	4,6
W21G	25	25	25	25,0	8,4	0,3
W21S	25	6,25	12,5	12,5	9,2	0,7
W21R	25	6,25	12,5	12,5	10,8	0,9
V8S,V15S	12,5	1,56	12,5	6,3	95,5	15,2
V8R,V15S	25	1,56	25	9,9	120,5	12,2
V8R,V15R	25	3,13	50	15,7	116,0	7,4

^аМИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; ^бСГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; ^вМГК: минимальная гемолитическая концентрация (концентрация, вызывающая лизис 10% эритроцитов); ^гТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. большие значения соответствуют большей селективности препарата. В случаях, когда МИК была >50 мкМ при расчете СГ использовали значение 100 мкМ.

Низкая селективность действия ареницина-1 на мембраны клеток приводит к тому, что расчетный терапевтический индекс пептида имеет значение около 1. Учитывая наличие у ареницина-1 скрученной β-спиральной структуры, гидрофобности его аналогов оценивали не расчетными методами, а экспериментально – по времени удерживания на аналитической колонке ОФ-ВЭЖХ. Ранее подобный подход применялся в ходе структурно-функционального

исследования ряда α -спиральных АМП [411]. Сравнительный анализ гемолитической активности аналогов, а также их общей гидрофобности приведен на рисунке 18.

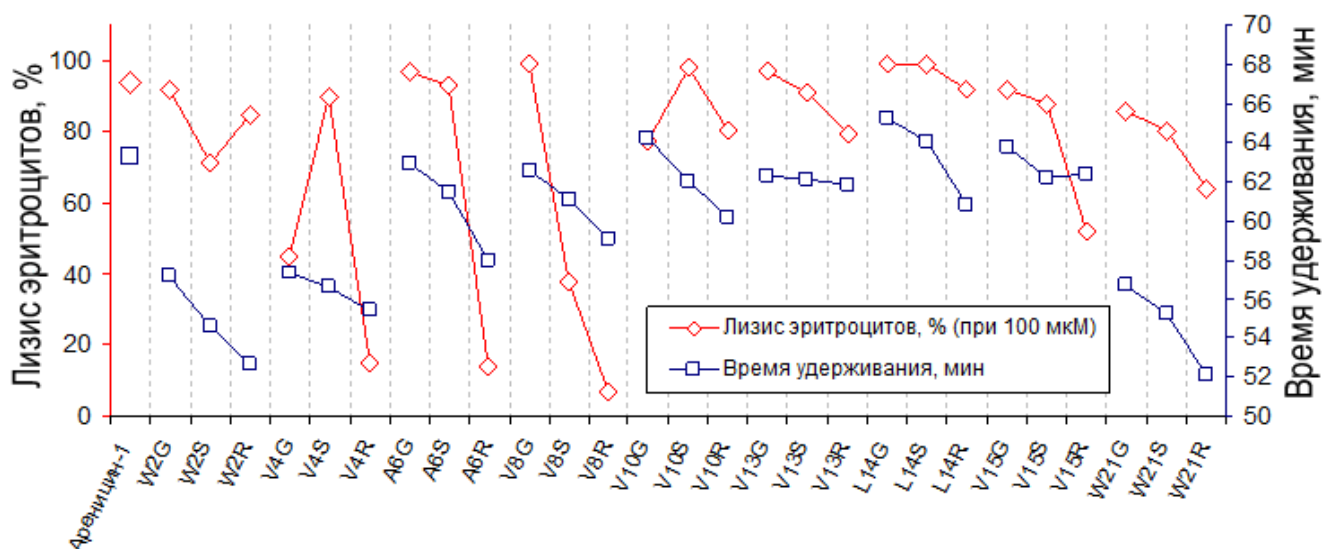


Рисунок 18. Сравнительный анализ гемолитической активности ареницина-1 и его аналогов при концентрации 100 мкМ и их времен удерживания на ОФ-ВЭЖХ колонке, соответствующих общей гидрофобности пептидов.

Остатки Trp² и Trp²¹ играют важную роль в реализации механизма действия ареницина-1 на бактериальные клетки, поскольку их замена приводит в большинстве случаев к снижению активности в 4 раза. Известно, что остатки триптофана чрезвычайно важны для структуры и активности целого ряда катионных АМП. Благодаря значительной электроотрицательности ароматической структуры индола, обусловленной делокализованными π -электронами, триптофан способен взаимодействовать как с положительно заряженными остатками лизина и аргинина, так и с аминокетильными группами полярных головок липидов [425]. Таким образом, остатки триптофана, располагающиеся на концах молекулы, обеспечивают стабилизацию структуры катионных β -шпильчатых АМП [426], а также, по-видимому, играют ключевую роль в механизме действия, благодаря способности локализоваться на границе раздела фаз [427]. Напротив, гемолитическая активность после таких замен снижается незначительно, несмотря на максимальное среди всех проанализированных аналогов сокращение времени удерживания на хроматографической колонке и, следовательно, снижение общей гидрофобности после замены любого из остатков триптофана (Рисунок 18).

Замены алифатических остатков в структуре различным образом влияют на биологические свойства пептида. Важно отметить, что гемолитическая активность снижается для большинства аналогов во всём диапазоне измеряемых концентраций. Исключение составляет один из наиболее гидрофобных остатков пептида – Leu¹⁴, замена которого не нарушает способности лизировать эритроциты, однако снижает антибактериальную активность. Данный факт, как и в случае с остатками триптофана, наводит на мысль, что общая гидрофобность пептида в

меньшей степени влияет на гемолитическую активность по сравнению с выраженной амфифильностью и склонностью к димеризации.

Введение остатка глицина, как правило, не снижало антимикробный потенциал пептида, что свидетельствует о жесткости пространственной структуры АМП. Менее толерантной к подобным заменам является область β -изгиба, поскольку аналог V10G практически потерял антимикробные свойства при сохранении гемолитических. Это может свидетельствовать о значительных отличиях в механизме действия ареницина на бактерии и клетки млекопитающих.

Введение остатков аргинина или серина в гидрофобную область, формируемую четырьмя остатками валина в положениях 8, 10, 13 и 15 пептида, в большинстве случаев приводило к увеличению антимикробной активности. Подобное явление было ранее показано для модельных α -спиральных пептидов, обладающих выраженной амфифильной структурой: замена остатка валина в центре гидрофобной поверхности молекулы на лизин приводила к повышению антимикробных свойств в 2–4 раза [411]. Данный эффект может быть связан с повышением растворимости пептида, снижением агрегации в водных растворах и повышением способности проникать через внешнюю мембрану и клеточную стенку бактерий к бислою цитоплазматической мембраны. Максимальное значение ТИ (50,0) было достигнуто для аналога V8R, поскольку данная замена приводила как к повышению антимикробной активности, так и к практически полному отсутствию гемолитических свойств даже при 100 мкМ. Замены Val⁴ и Ala⁶ на остаток аргинина аналогичным образом приводили к подавлению гемолитической активности, однако, вместе с тем, снижался и антимикробный эффект аналогов. Среди всех протестированных пептидов лишь аналоги с точечными заменами остатков Val⁴, Ala⁶, Val⁸ на остаток аргинина сохраняли значительную толерантность к эритроцитам человека при повышении концентрации до 50–100 мкМ (Рисунок 18). При этом не наблюдалось корреляции между общей гидрофобностью молекулы и способностью лизировать эритроциты. Проследить линейную зависимость этих свойств возможно лишь в рамках отдельных положений полипептидной цепи. Важно отметить, что все три остатка (Val⁴, Ala⁶, Val⁸) располагаются на N-полуцепях ареницина-1, при взаимодействии которых в присутствии нейтральных мицелл додецилфосфохолина (ДФХ) образуется ассиметричный димер по типу CN $\uparrow\uparrow$ NC (Рисунок 8).

Полученные данные позволили высказать предположение о том, что наибольшее влияние на гемолитическую активность природных ареницинов оказывает димеризация пептидов на поверхности мембран, которая, как было показано ранее, сопровождается разворачиванием β -шпилек и формированием выраженной амфифильной структуры [179].

Для проверки данной гипотезы методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) была проанализирована вторичная структура ареницина-1 и ряда его аналогов (Рисунок 19). Важно отметить, что димеризация ареницина в нейтральных мицеллах ДФХ сопровождается появлением характерного КД-спектра с возрастанием амплитуды при 190 и 203-230 нм [179]. Это делает ДФХ подходящей модельной средой для изучения влияния аминокислотных замен на процессы агрегации ареницина. Исходя из биологических свойств, для исследования был отобран ряд пептидов: ареницин-1 (сильный антибиотик, сильный гемолитик), L14R (сильный антибиотик, сильный гемолитик), V8R (сильный антибиотик, умеренный гемолитик), V8R (сильный антибиотик, слабый гемолитик), A6R (слабый антибиотик, слабый гемолитик). Спектры для приведенных выше пептидов были сняты в воде, мицеллах ДСН (имитирующих отрицательно заряженные мембраны бактерий) и мицеллах ДФХ (имитирующих цвиттерионные мембраны клеток млекопитающих) [428].

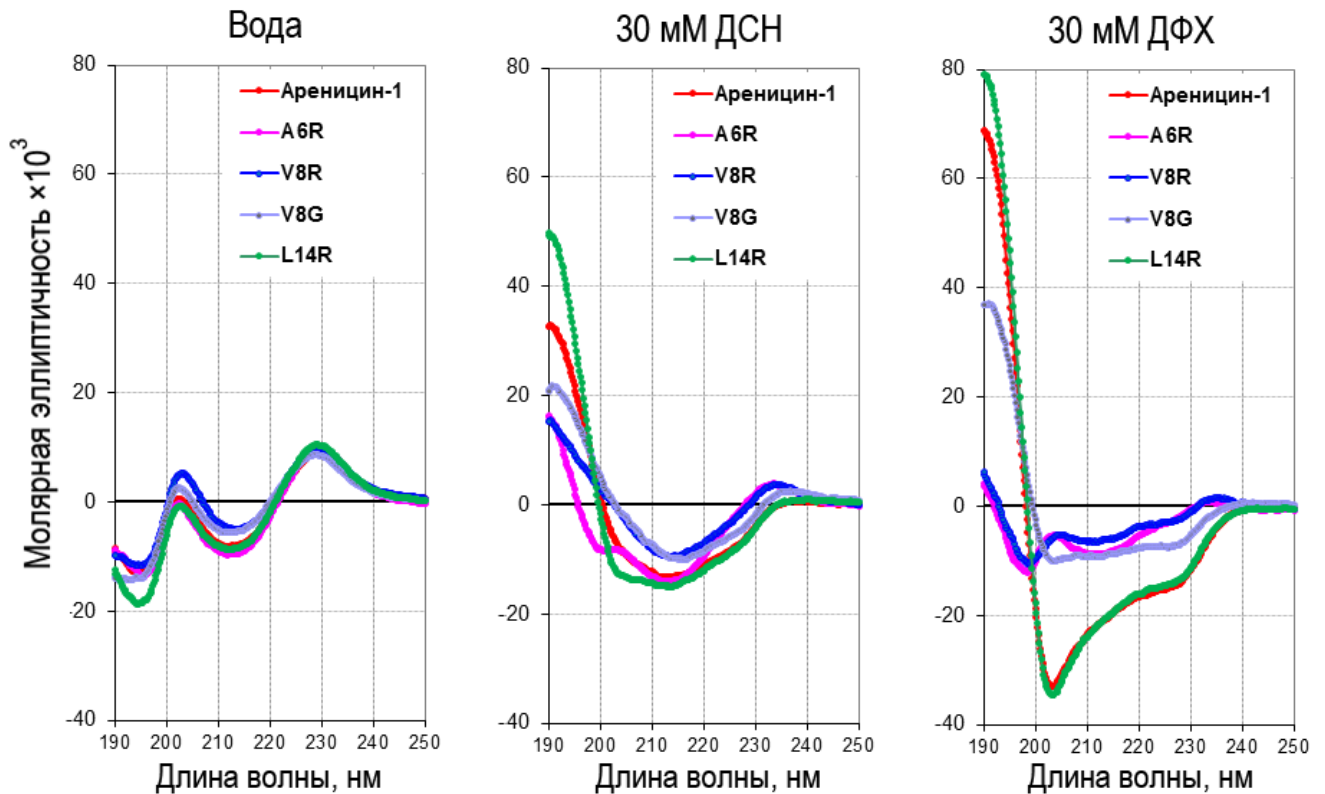


Рисунок 19. Спектры кругового дихроизма ареницина-1 и его аналогов в воде, мицеллах додецилсульфата натрия (ДСН) и мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ).

Форма кривой КД-спектра для всех аналогов в водной среде была идентичной таковой у природного ареницина-1, что говорит об отсутствии влияния точечных замен на пространственную структуру пептида. Стоит отметить, что добавление ДСН к пептидам, обладающим высокой активностью, вызывало опалесценцию раствора, указывающую на взаимодействие АМП и мицелл детергента. В присутствии мицелл ДФХ пептиды, обладающие гемолитическими свойствами (ареницин-1, L14R, V8G), имели КД-спектр, характерный для

димера. В ходе анализа гемолитически неактивных аналогов (A6R и V8R), напротив, было показано изменение конформации пептидов по сравнению с ареницином-1, сопровождающееся значительными изменениями кривой КД-спектра. Форма этих спектров в большей степени напоминала таковую для водного раствора, в котором ранее было показано преобладание пептида в виде мономера. Интересно, что структурно близкие в воде и в отрицательно заряженных мицеллах ДСН аналоги V8G и V8R обладают идентичной антибактериальной активностью, однако значительно различаются по гемолитическим свойствам и структуре в мицеллахДФХ. Можно предположить, что введение объемного положительно заряженного остатка аргинина вместо остатка Val⁸ препятствует димеризации пептида, тогда как отсутствие бокового радикала в случае с остатком глицина практически не влияет на этот процесс. Возможность сочетания высокой антимикробной активности и низкой гемолитической для аналогов ареницина указывает на принципиальную разницу в механизме действия природного пептида на различные типы клеточных мембран.

Аналогичные эффекты были показаны при изучении димеризации протегрина-1 в мицеллахДФХ и бислое ПОФХ [217]. Как и в случае с ареницином, димер протегрина-1 обладает более выраженной амфифильностью по сравнению с мономерной формой. При взаимодействии с отрицательно заряженными мембранами для протегрина-1 характерно образование стабильных тороидальных пор, сопровождающееся олигомеризацией пептида. С другой стороны, при взаимодействии с нейтральными мембранами агрегация пептида происходит на поверхности – параллельно плоскости бислоя [183]. Интересно, что ранее в другом исследовании был получен менее токсичный, но сохраняющий антибактериальную активность, аналог протегрина-1, в котором Val¹⁴ был заменен на более гидрофильный треонин [220] (Рисунок 20), однако авторы не связали столь значительное увеличение селективности с возможным влиянием на процесс олигомеризации пептида, поскольку формирование димера путем ассоциации С-полупепей пептида, в структуру которых входит остаток Val¹⁴, было показано позднее.

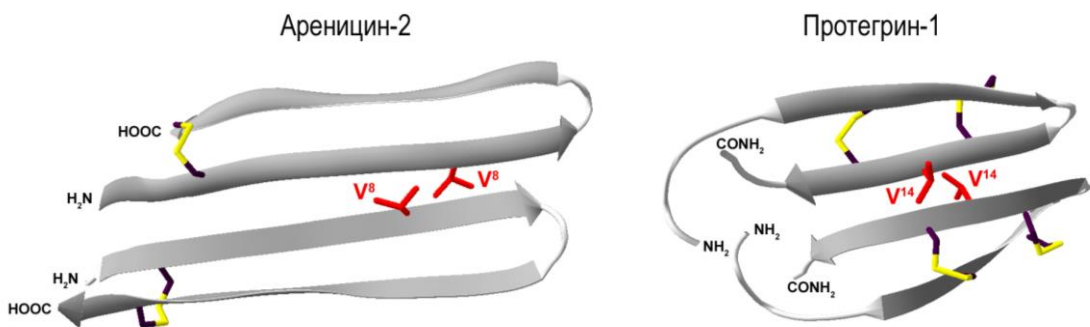


Рисунок 20. Сравнение пространственных структур димера ареницина-2 [179] и димера протегрина-1 [217] в присутствии мицелл додецилфосфохолина. Красным цветом отмечены остатки Val⁸ (ареницин) и Val¹⁴ (протегрин), замены которых на полярные аминокислоты приводят к значительному снижению цитотоксичности пептидов.

С целью изучения пространственной структуры методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии наиболее терапевтически ценного аналога V8R, а также исследования процесса димеризации в мембрано-имитирующих средах был получен его рекомбинантный аналог, тотально меченный стабильным изотопом ^{15}N . Трансформированные клетки *E.coli* BL21 Star (DE3) культивировали в бедной среде M9, содержащей $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве единственного источника азота. Согласно результатам денситометрической обработки отсканированного геля после ПААГ-электрофореза, доля гибридного белка после экспрессии составила не менее 30% (Рисунок 21).

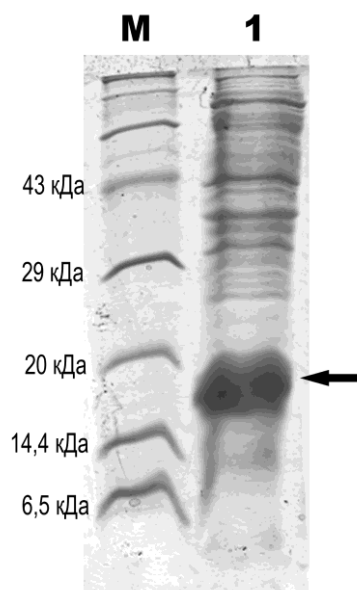


Рисунок 21. Контроль экспрессии ^{15}N -меченого гибридного белка, включающего аналог V8R, с помощью ПААГ-электрофореза. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс; 1 – суммарный клеточный лизат после индукции с помощью IPTG. Стрелка указывает на целевой гибридный белок His8-TrxL-V8R (16,1 кДа).

Процедура выделения и очистки была осуществлена согласно вышеописанной методике. Значение средней молекулярной массы ^{15}N -меченого V8R, полученное экспериментально (2858,8 Да), соответствовало расчетному (2859,3 Да) и свидетельствовало о тотальном включении изотопа ^{15}N в структуру пептида. Выход пептида составил 7,5 мг с 1 л бактериальной культуры.

Совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН была исследована пространственная структура аналога в воде, а также в растворе, содержащем мицеллы додецилфосфохолина. Полученные результаты подтвердили высказанные ранее предположения: пространственная структура аналога в воде практически идентична природным асеницинам и представляет скрученную β -шпильку (Рисунок 22); в отличие от природного асеницина, переходящего в форму амфифильного димера, аналог V8R существует преимущественно в виде мономера в присутствии нейтральных мицеллДФХ.

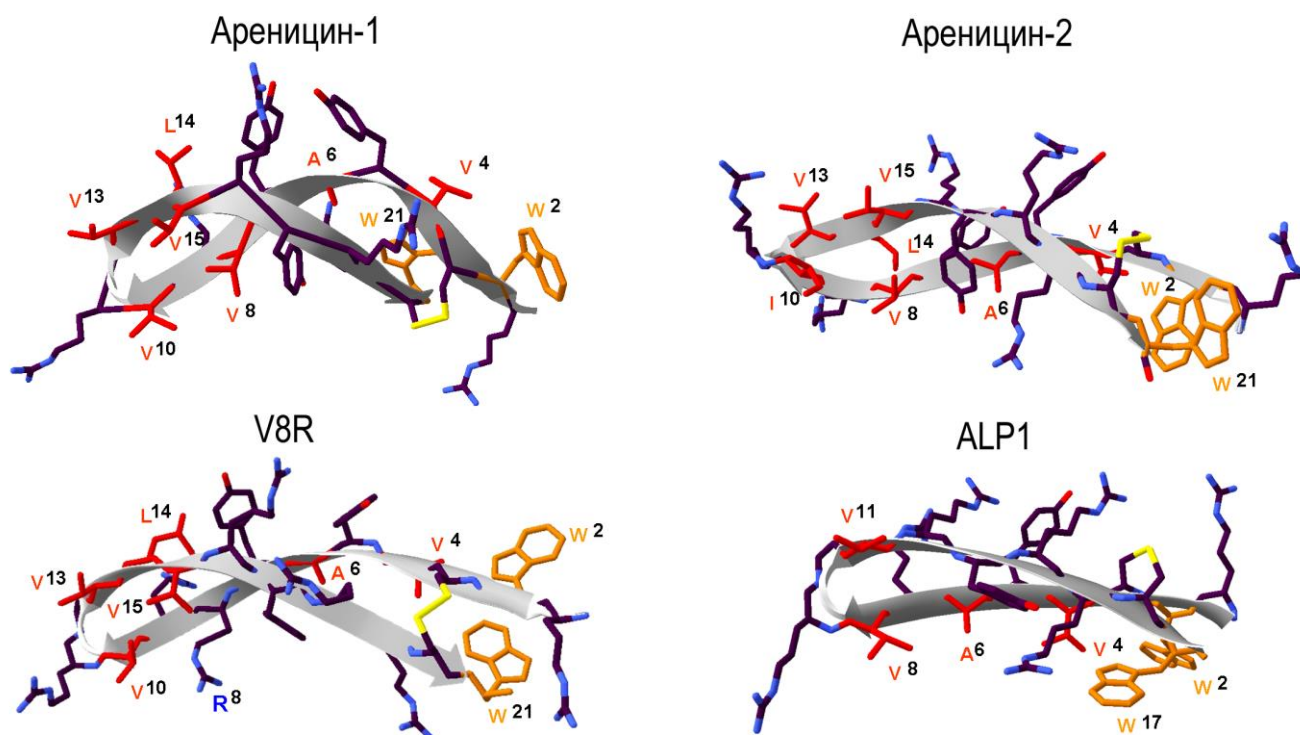


Рисунок 22. Пространственные структуры ареницина-1 [172], ареницина-2 [175], аналога V8R, установленные методом ЯМР-спектроскопии, и модель укороченного аналога ареницина ALP1, предсказанная с помощью программы QUARK [429]. Алифатические аминокислотные остатки выделены красным цветом, остатки триптофана – оранжевым.

Далее с использованием вышеописанных методик были получены аналоги с двойными заменами в полипептидной цепи (Val⁸, Val¹⁵) (Таблица 1). Дальнейшее снижение гидрофобности аналога V8R приводит к значительному падению антимикробной активности, однако не влияет на гемолитические свойства. В случае аналога с двойной заменой V8S,V15S при сравнении с пептидами, несущими соответствующие точечные замены (V8S или V15S), наблюдалось снижение активности пептида как в отношении бактериальных клеток, так и эритроцитов. Таким образом, оптимальные значения ТИ в ходе мутагенеза ареницина могут быть достигнуты путем точечных замен гидрофобных остатков.

Обобщая полученные данные можно сделать вывод, что существенными факторами для высокой антибактериальной активности ареницинов являются: наличие остатков триптофана и стабильность структуры β -изгиба. Остальные положения полипептидной цепи в различной степени толерантны к аминокислотным заменам. В результате, на примере ареницина-1 было подтверждено, что физико-химические особенности молекулы в целом имеют большее значение для биологических свойств АМП, чем природа отдельно взятых аминокислотных остатков.

4.1.2. Изучение укороченных аналогов ареницина-1

Еще одним важным физико-химическим параметром, обуславливающим селективность мембрано-активных катионных АМП в отношении бактерий, является длина молекулы. Целый ряд исследований по изучению зависимости биологических свойств от длины пептида был проведен в отношении α -спиральных и β -шпильчатых АМП [59,281,282,430], а также пептидов без регулярной вторичной структуры с повторяющимися аминокислотными мотивами [431–433]. В целом, исходя из результатов этих работ, можно сделать основной вывод: слишком малый размер молекулы АМП не позволяет формировать стабильную вторичную структуру и эффективно взаимодействовать с мембраной клетки-мишени, в то время как избыточная длина ведет к снижению селективности действия на мембраны из-за более высокой вероятности агрегации пептида. Для ряда β -шпильчатых АМП, полученных с помощью дизайна *de novo*, максимальная селективность действия была достигнута при длине молекулы 14–16 аминокислотных остатков. На следующем этапе работы подход, связанный с изменением длины пептида, был использован в отношении природного ареницина-1. В качестве матрицы при дизайне укороченных аналогов использовали структуру высокоактивного β -шпильчатого АМП тахиплезина-1 (Рисунок 23). Таким образом, одновременно из N- и C-получепей ареницина-1 были удалены по два аминокислотных остатка (Tyr⁷, Val⁸ и Val¹³, Leu¹⁴), что позволило значительно снизить долю гидрофобных остатков в структуре пептида, названного ALP1 (*arenicin-like peptide*).

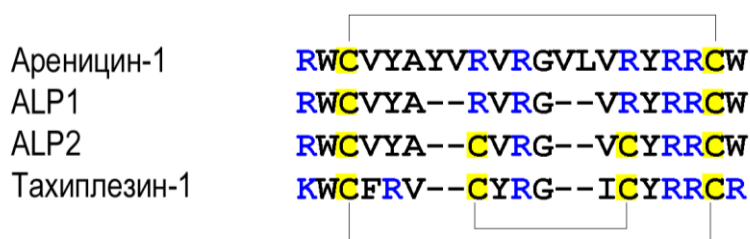


Рисунок 23. Сравнение первичной структуры ареницина-1, тахиплезина-1 и укороченных аналогов ареницина. Желтым цветом выделены остатки цистеина, синим – основные аминокислотные остатки. Линиями обозначены дисульфидные связи.

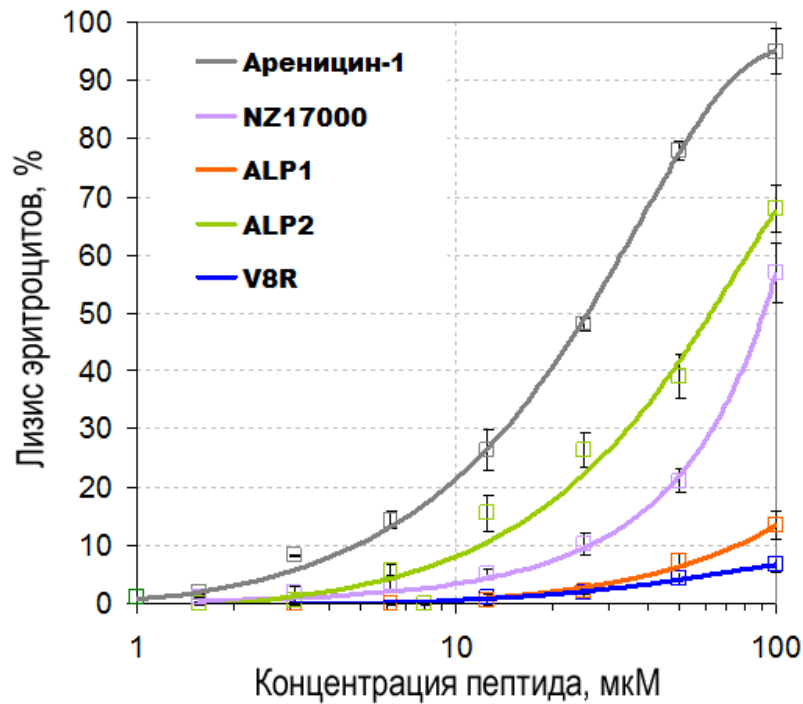
На основе сконструированной плазмиды, предназначенной для экспрессии ALP1, методом направленного мутагенеза были синтезированы шесть генно-инженерных конструкций для биотехнологического получения аналогов укороченного пептида. Все укороченные рекомбинантные аналоги, состоящие из 17 остатков, были получены согласно вышеописанному методу. Средний выход целевых пептидов составил около 9 мг с 1 л бактериальной культуры. В структуру пептида ALP2 была введена вторая дисульфидная связь по аналогии со структурой тахиплезина. В остальных случаях проводили замены гидрофобных остатков Tyr⁵, Ala⁶, Val⁸, Val¹¹, Trp¹⁷ на остаток аргинина. Результаты тестирования биологической активности аналогов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Биологическая активность укороченных аналогов ареницина-1

Пептид	МИК ^а , мкМ			СГ ^б , мкМ	МГК ^в , мкМ	ТИ ^г
	<i>S. aureus</i> , 209P	<i>E. coli</i> , C600	<i>P. aeruginosa</i> , PAO1			
Ареницин-1	6,25	1,56	6,25	3,9	4,1	1,1
ALP1	1,56	0,8	6,25	2,0	68	34,0
ALP2	3,13	0,8	3,13	2,0	10	5,0
ALP3 (W17R)	3,13	3,13	6,25	3,9	110	28,2
ALP4 (V11R)	3,13	3,13	25	6,3	50	7,9
ALP5 (V8R)	3,13	3,13	50	7,9	73	9,2
ALP6 (A6R)	50	12,5	50	31,5	65,5	2,1
ALP7 (Y5R)	1,56	1,56	12,5	3,13	88	28,1

^аМИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; ^бСГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; ^вМГК: минимальная гемолитическая концентрация (концентрация, вызывающая лизис 10% эритроцитов); ^гТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. большие значения соответствуют большей селективности препарата.

Сокращение длины пептида позволило не только повысить активность ALP1 в среднем в два раза, но и снизить цитотоксичность в отношении эритроцитов более чем на порядок. Как результат, терапевтический индекс полученного аналога составил 34,0. Введение дополнительной дисульфидной связи путем замены остатков Arg⁶ и Arg¹² на цистеины практически не повлияло на антимикробные свойства пептида ALP1, однако значительно усилило гемолитическую активность (Рисунок 24).

**Рисунок 24.** Сравнение гемолитической активности ареницина-1, NZ17000, укороченных производных ALP1 и ALP2, полноразмерного аналога V8R.

Согласно данным спектроскопии КД удаление четырех остатков из последовательности ареницина-1 практически не повлияло на пространственную структуру пептида в воде, поскольку для ALP1 наблюдалась аналогичная форма КД-спектра (Рисунок 25). Несмотря на столь значительное сокращение доли гидрофобных остатков, время удерживания ALP1 на гидрофобной колонке снизилось лишь в незначительной степени по сравнению с природным пептидом. Таким образом, снижение длины пептида, по-видимому, в большей степени отрицательно повлияло на способность молекулы лизировать эритроциты и образовывать стабильные димеры, что также может подтверждаться значительным снижением амплитуды спектра КД в присутствии мицелл нейтральногоДФХ (Рисунок 25). Замена Ala⁶ на аргинин, как и в случае с полноразмерным аналогом А6R, приводила к значительной потере антимикробных свойств. В остальных случаях повышение суммарного заряда молекулы на единицу (до +7) не увеличивало антимикробную активность и терапевтическую ценность пептида.

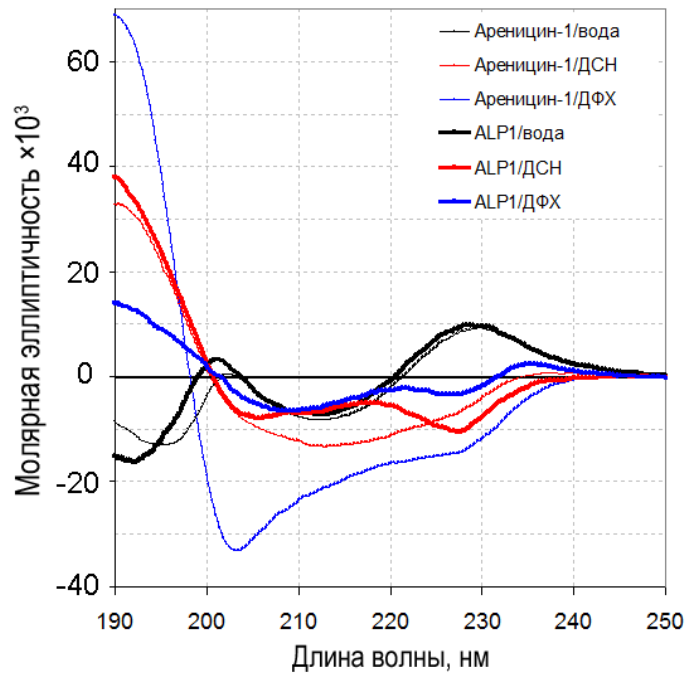


Рисунок 25. Спектры кругового дихроизма ареницина-1 и его укороченного аналога ALP1 в воде, мицеллах додецилсульфата натрия (ДСН) и мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ).

Для выяснения причин повышенной антибактериальной активности укороченных аналогов ALP1 и ALP2 по сравнению с природным ареницином-1 было решено проанализировать способность пептидов связываться с ДНК – внутриклеточной мишенью для ряда катионных АМП. С этой целью смеси пептида с ДНК в различных массовых соотношениях инкубировались в буфере, имитирующем восстановительную среду цитоплазмы бактерий, и далее подвергались электрофоретическому разделению в агарозном геле (Рисунок 26).

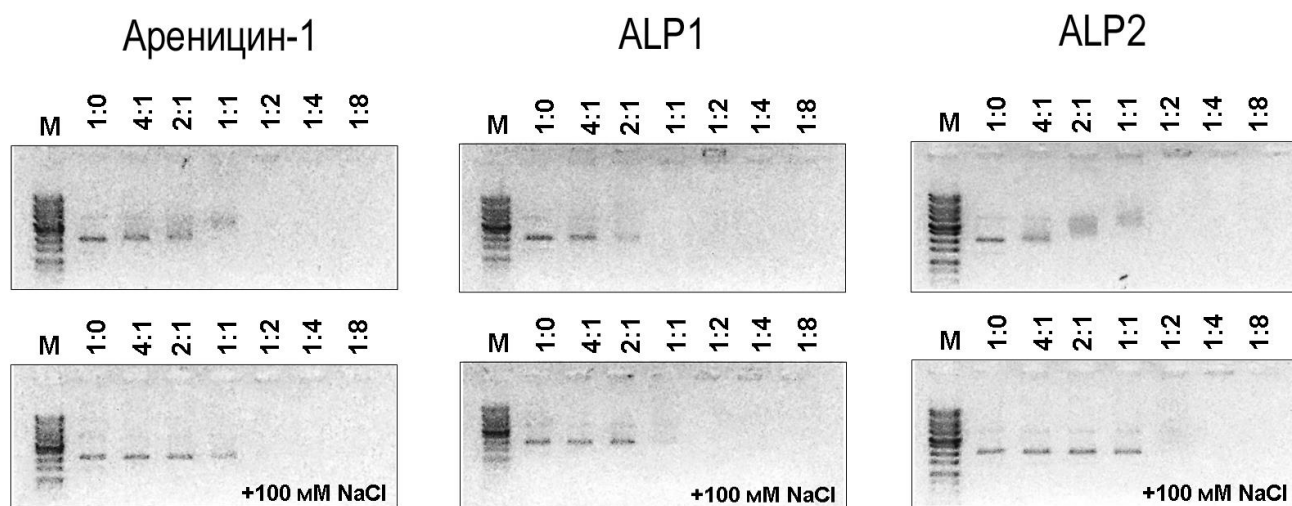


Рисунок 26. ДНК-связывающая активность ареницина-1 и его укороченных аналогов. На рисунке представлены электрофореграммы разделения смесей ДНК:пептид в различных массовых соотношениях после 30 мин инкубации. М – ДНК-маркер (200–20000 п.о.).

Известно, что тахиплезин-1 способен эффективно связываться с двухцепочечной ДНК, локализуясь в её малой бороздке, причем ключевую роль в процессе играет компактная пространственная структура пептида [288]. Ранее для ареницина-1 методами электронной микроскопии было показано образование областей повышенной плотности внутри клетки после проникновения пептида [172,180], что также может свидетельствовать о взаимодействии с нуклеиновыми кислотами. Подобно тахиплезину-1, ареницин-1 и его аналоги взаимодействовали с плазмидной ДНК и снижали ее электрофоретическую подвижность. ALP1 полностью связывал ДНК при массовом соотношении 1:1, что свидетельствует о двукратном увеличении эффективности по сравнению с ареницином-1 и ALP2. Для всех пептидов наблюдалось снижение эффективности связывания в растворах с повышенной ионной силой, что говорит об электростатической природе взаимодействий между АМП и ДНК.

4.1.3. Сравнительное изучение биологических свойств ареницина-1 и его аналогов

Дальнейшая работа была нацелена на углубленное изучение механизма действия и биологической активности наименее токсичных и перспективных с точки зрения практического применения аналогов V8R и ALP1 в сравнении с природным ареницином-1. Все три пептида были получены в количестве не менее 30 мг с помощью разработанной ранее системы экспрессии и очистки.

Одним из существенных преимуществ АМП перед конвенциональными антибиотиками является способность быстро уничтожать клетки-мишени, вызывая нарушение целостности мембраны вплоть до ее полного лизиса. Наиболее активные АМП, такие как протегрин-1, способны эффективно уничтожать бактериальные клетки-мишени независимо от их

физиологического состояния и метаболической активности [434]. Тем не менее, не все катионные АМП способны с одинаковой эффективностью убивать клетки-мишени, находящиеся в различных физиологических состояниях. Известно, что переход в стационарную фазу роста приводит к изменению структуры мембран, а также подавлению аэробного метаболизма у бактерий и, следовательно, снижению трансмембранного потенциала [435] – одного из ключевых факторов, определяющих селективность АМП в отношении бактериальных клеток [29]. Важно отметить, что персистирующие бактерии, т.е. микроорганизмы с сильно замедленным метаболизмом, доля которых возрастает при переходе в стационарную фазу роста, зачастую невосприимчивы к действию классических антибиотиков так же, как и мутантные резистентные формы.

Ранее в ряде исследований был показан основной механизм действия ареницинов – повышение проницаемости бактериальных мембран. Таким образом, на следующем этапе работы сравнивалась способность ареницина-1 и его аналогов нарушать целостность цитоплазматической мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий в режиме реального времени. В случае с грамположительными клетками *S. aureus* использовали флюориметрический подход: под действием АМП происходит нарушение целостности мембраны, что приводит к взаимодействию ДНК и интеркалирующего красителя SYTOX Green и возрастанию интенсивности эмиссии флюоресценции более чем в 500 раз [436] (Рисунок 27).

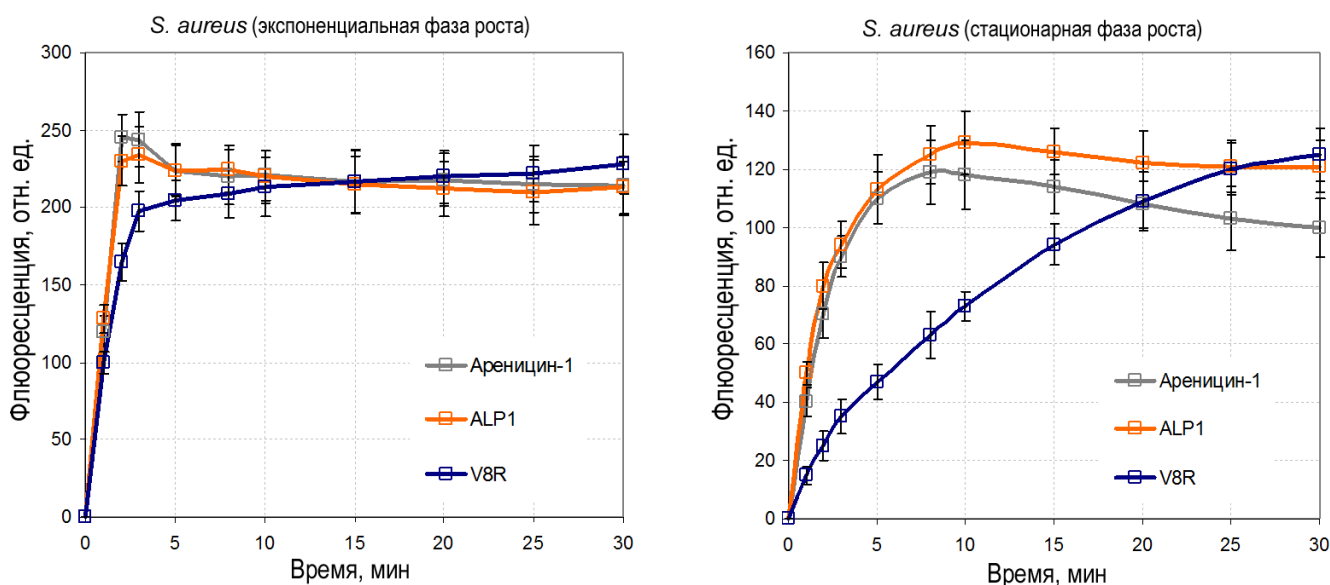


Рисунок 27. Флюориметрическая оценка повышения проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий *S. aureus* 209P, вызванной ареницином-1 и его аналогами V8R и ALP1.

Для оценки действия АМП на грамотрицательные бактерии использовали штамм *E. coli* ML-35p, конститутивно синтезирующий фермент β -галактозидазу, функционирующий в цитоплазме клетки. Рост проницаемости цитоплазматической мембраны оценивался спектрофотометрически по накоплению хромогенного продукта реакции гидролитического

расщепления β -галактозидазой субстрата ONPG после попадания последнего внутрь клетки (Рисунок 28).

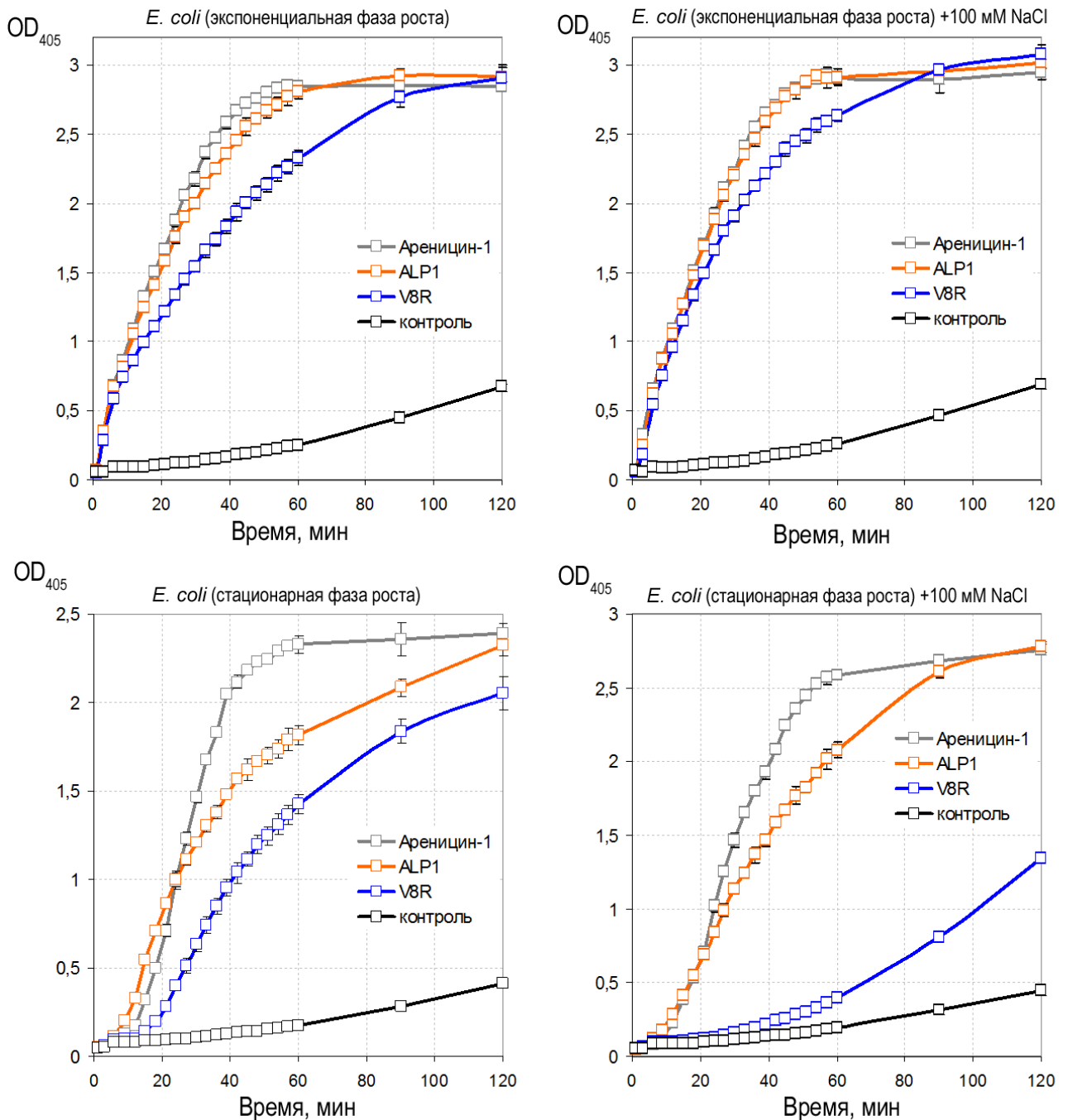


Рисунок 28. Фотометрическая оценка повышения проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий *E. coli* ML-35r, вызванной ареницином-1 и его аналогами V8R и ALP1.

Ареницин-1 и ALP1 вызвали максимальную деполаризацию мембраны *S. aureus* в течение 5–10 мин независимо от физиологического состояния клеток. Аналог ALP1 продемонстрировал идентичный природному пептиду характер действия на все бактериальные клетки, что говорит о сохранении механизма действия, несмотря на уменьшение длины молекулы. Все пептиды проявили высокую и сопоставимую друг с другом активность в отношении метаболически активных клеток *E. coli*, в том числе, в присутствии солей в

повышенной концентрации. Скорость действия аналога V8R была ниже в отношении клеток *S. aureus* и *E. coli*, находящихся в стационарной фазе роста, что наводит на мысль о возрастающей роли трансмембранного потенциала для проявления максимальной активности пептидом и некотором изменении механизма его действия в отношении бактерий.

Для целого ряда β -спилечных АМП ранее была показана способность убивать бактериальные клетки вне зависимости от наличия у них устойчивости к классическим антибиотикам. Это свидетельствует об отсутствии эффекта кросс-резистентности бактерий к АМП. Для подтверждения данного эффекта активность ареницина-1 и терапевтически ценных аналогов была протестирована в отношении метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA), а также клинических изолятов грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), обладающих устойчивостью к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, бета-лактамам и цефалоспорином (Таблица 3). Наряду с *Acinetobacter baumannii* перечисленные грамотрицательные бактерии представляют особую опасность, поскольку являются возбудителями заболеваний в большинстве случаев возникновения внутрибольничных инфекций [437]. Конкретные механизмы, обуславливающие множественную устойчивость у использованных в данной работе изолятов не были охарактеризованы. Однако, как правило, наиболее вероятной причиной появления множественной устойчивости грамотрицательных бактерий к соединениям различной природы, включая некоторые АМП [438], является повышенный уровень биосинтеза неспецифичных эффлюксных насосов [439,440].

Таблица 3. Антимикробная активность ареницина-1 и его аналогов в отношении MRSA и мультирезистентных (MDR, multidrug-resistant) штаммов грамотрицательных бактерий

	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ						
	MRSA	MDR <i>E. coli</i>		MDR <i>P. aeruginosa</i>		MDR <i>K. pneumoniae</i>	
		-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl
Тахиплезин-1	0,06	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0
Ареницин-1	0,25	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	2,0
ALP1	0,06	1,0	0,5	2,0	4,0	1,0	2,0
ALP2	0,12	1,0	0,5	2,0	2,0	1,0	2,0
V8R	0,25	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
NZ17000	н.д.	0,25	0,25	0,5	1,0	1,0	1,0

В качестве молекул сравнения использовали β -спилечные рекомбинантные АМП тахиплезин-1 и NZ17000, полученные согласно вышеописанному методу. Стоит отметить, что NZ17000 относится к числу наиболее активных АМП животного происхождения, а его модифицированные аналоги были запатентованы фармацевтической компанией Adenium

Biotech и в настоящее время проходят предклинические испытания в качестве антибиотиков широкого спектра действия. Разработанные аналоги ареницина-1 показали высокую активность в отношении всех тест-культур, которая в ряде случаев была сопоставима с активностью референсных АМП. Полученные данные продемонстрировали важнейшее качество β -спилечных АМП – способность быстро уничтожать резистентные бактериальные клетки, в том числе, в условиях высокой ионной силы раствора.

На заключительном этапе исследования аналогов ареницина-1 были протестированы их цитотоксические свойства в отношении нормальных клеток *in vitro*, а также острая токсичность в условиях *in vivo* для мышей. В ходе экспериментов *in vitro* с помощью МТТ-теста анализировали цитотоксическую активность пептидов в отношении адгезивных культур нормальных клеток человека – эмбриональных фибробластов и астроцитов (Рисунок 29).

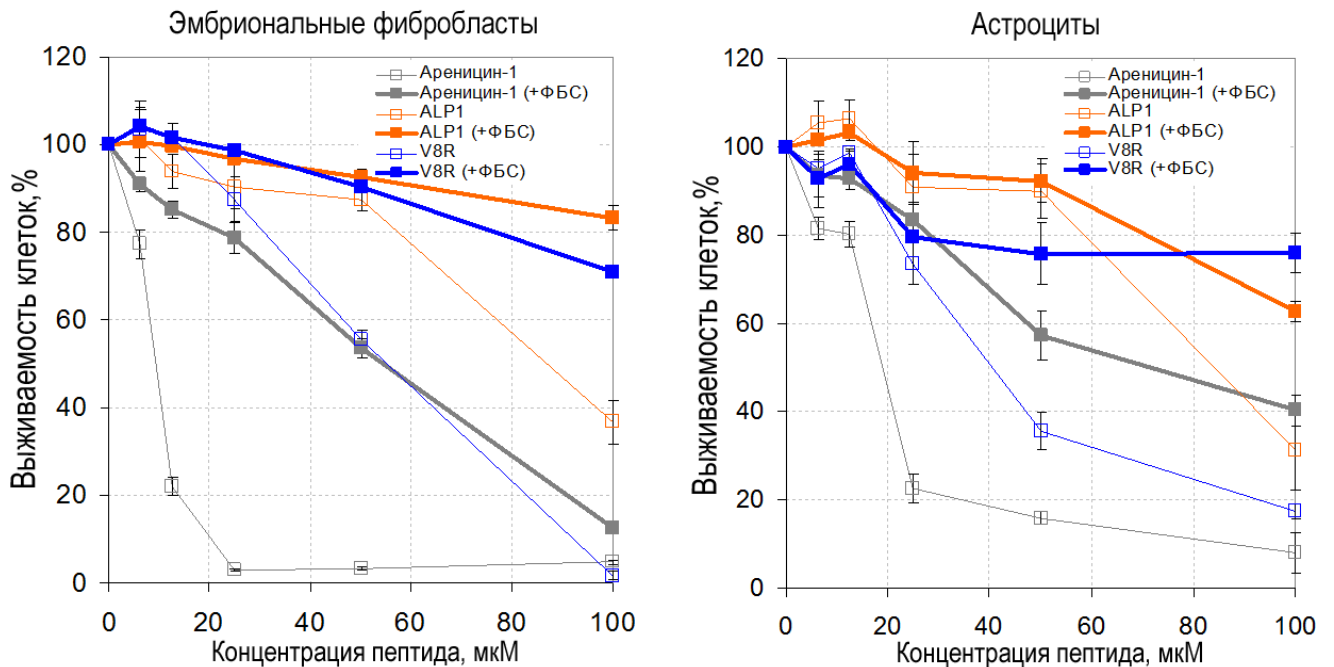


Рисунок 29. Цитотоксическое действие ареницина-1 и его аналогов на нормальные клетки млекопитающих *in vitro* по результатам МТТ-теста. ФБС – 10% fetalная бычья сыворотка.

По сравнению с аналогами природный ареницин-1 вызывал более выраженный цитотоксический эффект. Так, гибель 50% обоих типов клеток происходила при концентрации 50 мкМ в присутствии 10% fetalной бычьей сыворотки (ФБС). В отсутствие сыворотки аналогичный эффект достигался уже при концентрации менее 20 мкМ. Было показано, что снижение активности в присутствии ФБС является результатом связывания пептидов с компонентами сыворотки крови, а не действия протеаз, входящих в состав ФБС. Ранее, для β -спилечного АМП ретроцилина-1 была показана способность проявлять свойства лектина и специфично связываться с гликопротеином фетуином – основным компонентом сыворотки крови [348]. В параллельном эксперименте было установлено, что инкубация пептидов в

течение 24 ч при 37°C в присутствии 10% ФБС в забуференном физиологическом растворе приводит к протеолитической деградации не более чем 5% АМП. Концентрации аналогов, вызывающие гибель 50% клеток фибробластов и астроцитов в присутствии ФБС, не были установлены и составляли более 100 мкМ. Стоит отметить, что аналог ALP1 при концентрации, достигающей 50 мкМ, практически не оказывал влияния на жизнеспособность клеток вне зависимости от наличия ФБС в среде. Цитотоксический эффект аналога V8R в отсутствие ФБС в среде был более выраженным по сравнению с ALP1: гибель 50% клеток астроцитов и фибробластов достигалась при 40 и 50 мкМ, соответственно.

Исследование острой токсичности пептидов на мышах CD-1 проводилось совместно с лабораторией биологических испытаний ФИБХ РАН. В ходе эксперимента производили двукратное введение (с интервалом в 15 мин) пептидов в физиологическом растворе внутривенно. Значения ЛД₅₀ для ареницина-1 находились в диапазоне от 15 до 22,5 мг/кг. ЛД₅₀ для аналога V8R составило 45 мг/кг. Значения ЛД₅₀ для аналога ALP1 лежали в диапазоне от 30 до 45 мг/кг. Весьма схожие результаты, опубликованные компанией Adenium Biotech, были достигнуты в ходе скрининга менее токсичных аналогов пептида NZ17000. Так, для наиболее перспективных вариантов пептида, сохранивших высокую антимикробную активность, также было продемонстрировано снижение максимальной толерантной дозы для мышей, однако не более чем в два раза (<http://adeniumbiotech.com/>). Полученные нами данные согласуются с результатами вышеописанных экспериментов *in vitro* на клеточных линиях и позволяют предварительно отнести аналоги V8R и ALP1 к 3-му классу токсичности ($20 > \text{ЛД}_{50} > 700$ мг/кг) для мышей CD-1.

4.2. Структурно-функциональное исследование тахиплезина-1

Ранее из гемоцитов подковообразного краба *Tachypleus tridentatus* группой японских ученых были выделены три изоформы катионных АМП, названных тахиплезинами [270,271]. Пространственная структура пептидов в водных растворах представляет скрученную β-шпильку, состоящую из 17 аминокислотных остатков и стабилизированную двумя дисульфидными связями [275,276]. Тахиплезины входят в число наиболее активных АМП животного происхождения, вызывающих нарушение целостности бактериальных мембран (см. раздел «Обзор литературы»), что было подтверждено нами в ходе предварительных экспериментов с рекомбинантным аналогом тахиплезина-1. Однако, в отличие от ареницинов и протегринов механизм действия этих пептидов не связан с олигомеризацией и формированием стабильных пор. При контакте с липидным бислоем [441] или в присутствии мицелл [224] молекула тахиплезина-1 приобретает плоскую конформацию и значительно более выраженные амфифильные свойства по сравнению с таковой в водных растворах. Более того, при

повышении концентрации цвиттерионного ДФХ в мицеллярном растворе тахиплезин-1, несмотря на потерю стабилизированной водородными связями β -структурной организации, формирует обширную гидрофобную поверхность из двух цистинов и остатков Trp², Val⁶, Tyr⁸ и, таким образом, сохраняет выраженные афифильные свойства [275]. По всей видимости, с этим связана высокая гемолитическая активность тахиплезинов [287] и полифемузинов [290], которая проявляется в значительных повреждениях эритроцитов даже при концентрации пептида 20 мкМ. В данной работе тахиплезин-1 был использован в качестве основы для создания менее токсичных антибиотиков. В ходе дизайна аналогов тахиплезина-1 (K¹WCFRVCYRG¹⁰ICYRRCR¹⁷) использовался разработанный ранее подход:

- с помощью сайт-направленного мутагенеза проводились точечные аминокислотные замены гидрофобных остатков на остатки серина или аргинина;
- замене не подвергались участки полипептидной цепи и отдельные аминокислотные остатки, обеспечивающие стабильность структуры, в том числе: дипептид Arg¹¹-Gly¹², способствующий формированию β -изгиба, а также остатки Cys³, Cys⁷, Cys¹² и Cys¹⁶, образующие две дисульфидные связи;
- в консервативном для ряда β -шпилечных АМП участке Tyr-Arg-Arg, равно как и в ЛПС-связывающем N-концевом пентапептиде Lys-Trp-Cys-Phe-Arg [298], замены не проводились;
- заменам подвергались гидрофобные остатки Val⁶, Tyr⁸, Ile¹¹, обуславливающие выраженную амфифильность пептида при контакте с мицеллами ДФХ.

Рекомбинантный тахиплезин-1 и его аналоги были получены способом, сочетающим сайт-направленный мутагенез и гетерологическую экспрессию. На первом этапе была использована методика, включающая стандартную индукцию биосинтеза с помощью IPTG в течение нескольких часов, аффинную хроматографию суммарного лизата и ОФ-ВЭЖХ очистку пептидов из смеси после химического расщепления гибридного белка. Средний выход пептидов составил ~6–7 мг с 1 л бактериальной культуры. Ранее в ряде работ по созданию рекомбинантных аналогов других β -шпилечных АМП (танатин [442], лактоферрицин В [443], полифемузин-1 [444], протегрин-1 [396], гепцидин [445]) в бактериальной системе достигались сопоставимые выходы от 1 до 13 мг с 1 литра культуры. Тем не менее, описанные процедуры, в том числе, использованная в данной работе методика, включают несколько стадий хроматографии, а также культивирование в больших объемах ростовых сред. Для упрощения процедуры дальнейшего скрининга аналогов была поставлена задача оптимизации технологии получения пептидов. Несмотря на то, что тиоредоксин обычно используется в качестве белка-носителя, увеличивающего растворимость целевого продукта в клетках *E. coli*, гибридные

белки, содержащие β -шпилечные АМП, способны накапливаться в нерастворимой форме даже в ходе экспрессии при пониженной температуре. По всей видимости, данный факт является следствием склонности АМП к агрегации. Данный эффект был использован нами для упрощения процедуры очистки гибридного белка, содержащего аминокислотную последовательность тахиплезина-1, за счет его преимущественного накопления в нерастворимой форме. Для увеличения выхода конечного продукта культивирование клеток-продуцентов проводили до достижения высоких значений оптической плотности бактериальной культуры. В ходе предварительных экспериментов по оптимизации условий экспрессии был достигнут максимальный выход гибридного белка в нерастворимой форме, равный ~ 1 мг с 1 мл культуры клеток. Отмывка нерастворимых в лизирующем буфере агрегатов, обогащенных гибридным белком, позволила получить достаточно чистую фракцию, подходящую для прямого химического расщепления бромцианом после солюбилизации в 6 М гуанидине (Рисунок 30). Таким образом, из процедуры очистки гибридного белка удалось исключить стадию аффинной хроматографии.

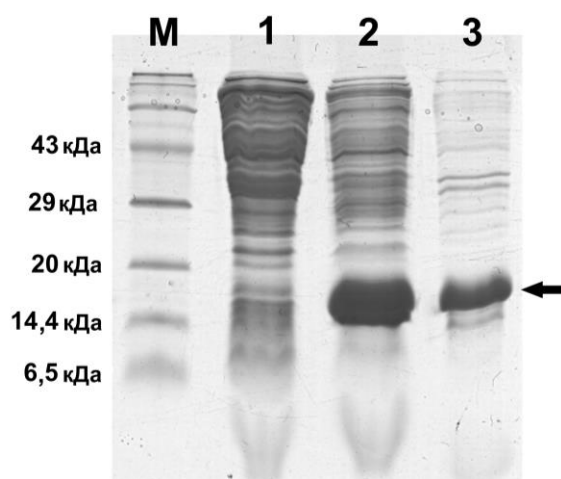


Рисунок 30. Контроль экспрессии гибридного белка, включающего тахиплезин-1, с помощью ПААГ-электрофореза. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс; 1 – суммарный клеточный лизат до индукции, 2 – суммарный клеточный лизат после индукции с помощью IPTG, 3 – отмываемая нерастворимая фракция клеточного лизата. Стрелка указывает на целевой гибридный белок His8-TrxL-ThI (15,6 кДа).

После расщепления гибридного белка бромцианом для снижения нагрузки на колонку ОФ-ВЭЖХ перед финальной очисткой большая часть белка-носителя была удалена путем селективного осаждения из реакционной смеси 10% трифторуксусной кислотой (ТФУ). Стоит отметить, что в использование в качестве белка-носителя кетостероидизомеразы, способствующей накоплению продукта в составе телец включения [421], приводило к высокому уровню экспрессии, однако на стадии обработки ТФУ происходило неселективное соосаждение большей части тахиплезина-1 (данные не приведены). Процесс очистки контролировался с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза в трис-трициновой буферной системе, содержащей 6 М мочевины (Рисунок 31А).

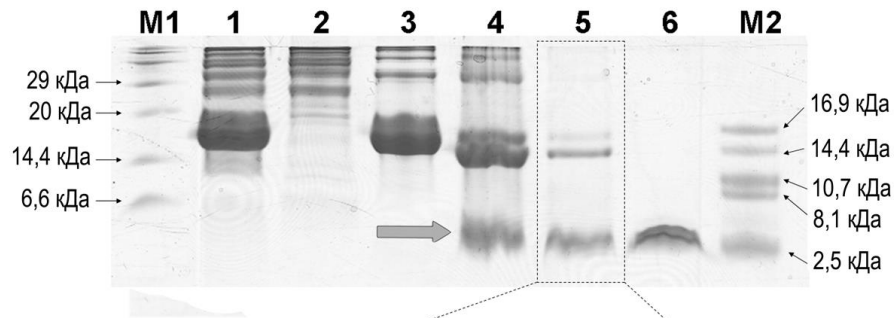
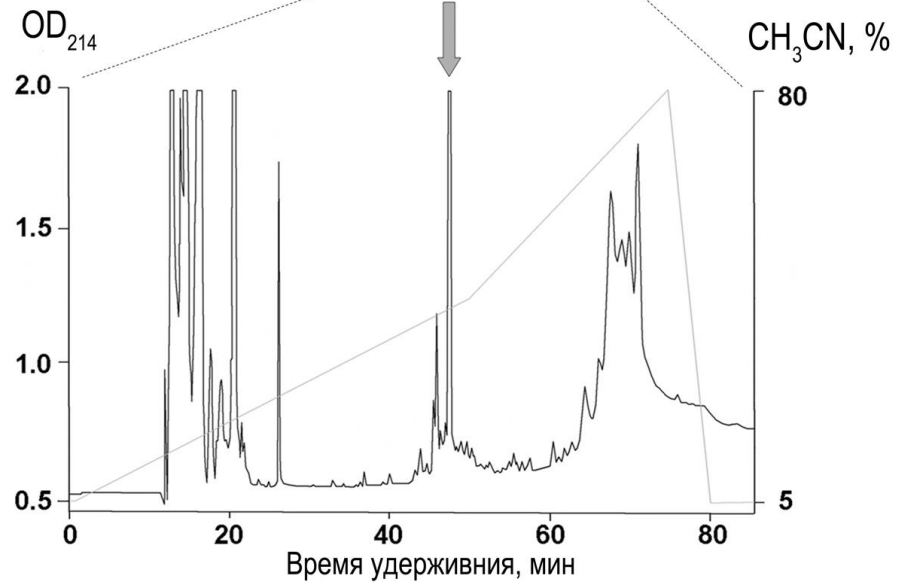
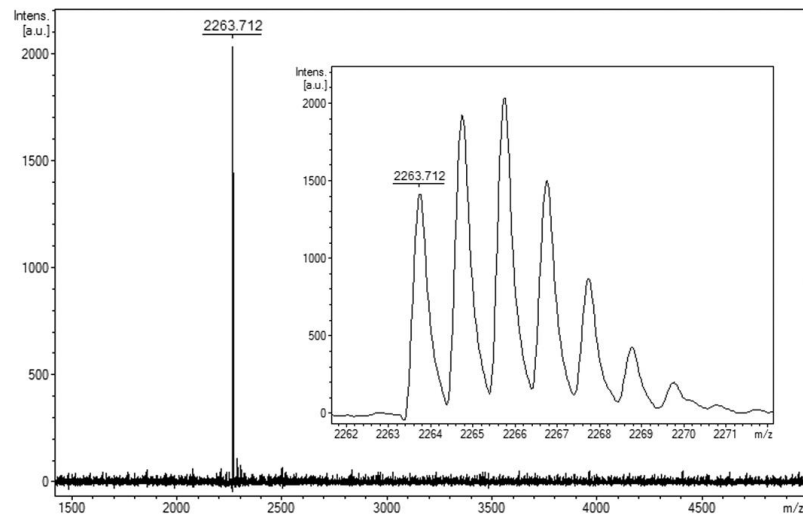
A**Б****В**

Рисунок 31. Экспрессия и очистка рекомбинантного тахиплезина-1 по упрощенной методике. А – контроль экспрессии и очистки тахиплезина-1 с помощью ПААГ-электрофореза в присутствии мочевины (M1, M2 – смеси белков-стандартов молекулярных масс, 1 – суммарный клеточный лизат после индукции IPTG, 2 – растворимая фракция клеточного лизата, 3 – отмытая нерастворимая фракция клеточного лизата, 4 – нерастворимая фракция, содержащая гибридный белок, после расщепления бромцианом, 5 – реакционная смесь после осаждения белков, 6 – элюат ОФ-ВЭЖХ), Б – ОФ-ВЭЖХ очистка тахиплезина-1, В – МАЛДИ масс-спектрометрический анализ фракции ОФ-ВЭЖХ, соответствующей целевому пептиду. Стрелкой на электрофореграмме и хроматограмме отмечен рекомбинантный тахиплезин-1.

Расчетная масса гибридного белка и пептида составляет 15,6 и 2,3 кДа, соответственно. Полученная фракция ОФ-ВЭЖХ (Рисунок 31Б) анализировалась с помощью автоматического секвенирования и МАЛДИ масс-спектрометрии (Рисунок 31В). Экспериментальное значение m/z моноизотопного иона (2263,71) соответствовало расчетному значению молекулярной массы протонированного иона целевого пептида, содержащего две дисульфидные связи (2264,10 Да). Корректность замыкания дисульфидных связей (C1-C4, C2-C3) была доказана путем гидролиза трипсином, с последующим разделением на аналитической ОФ-ВЭЖХ колонке и анализом фракций с помощью МАЛДИ-МС (данные не приведены). Данный подход позволил получить 1,7 мг целевого пептида со 100 мл бактериальной культуры, что соответствует выходу 17 мг с 1 л культуры. Идентичность полученного рекомбинантного аналога и природного тахиплезина-1 была доказана с помощью спектроскопии КД и анализа биологической активности. Несмотря на накопление гибридного белка в виде нерастворимой фракции, корректное замыкание дисульфидных связей, по-видимому, происходит при окислении кислородом воздуха в ходе процесса выделения и очистки целевого пептида, что позволяет избежать стадии рефолдинга. Данные об исследовании биологических свойств полученных аналогов тахиплезина-1 представлены в таблице 4. Рекомбинантный тахиплезин-1 продемонстрировал высокую антибактериальную активность, сопоставимую с полимиксином В. Ранее аналогичный результат был показан для природного тахиплезина-1 [272,286]. Рекомбинантный пептид вызывал лизис ~30% эритроцитов в суспензии при концентрации 100 мкМ, что также соответствовало литературным данным для природного пептида.

Таблица 4. Биологическая активность тахиплезина-1 и его аналогов

Пептид	Аминокислотная последовательность	МИК ^а , мкМ			СГ ^б , мкМ	МГК ^в , мкМ	ТИ ^г
		<i>S. aureus</i> 209P	<i>E. coli</i> C600	<i>P. aeruginosa</i> PAO1			
Полимиксин В	-	6,25	0,4	1,56	1,56	н.д.	н.д.
Тахиплезин-1	KWCFRV S CYRGICYRRCR	1,56	0,8	1,56	1,24	12	9,7
V6S	KWCFR S CYRGICYRRCR	6,25	1,56	12,5	4,96	280	56,5
V6R	KWCFR R CYRGICYRRCR	>50	1,56	>50	25,0	200	8,0
Y8S	KWCFRV S RGICYRRCR	3,13	0,8	3,13	1,97	310	157,4
Y8R	KWCFRV R RGICYRRCR	3,13	1,56	6,25	3,13	195	62,4
I11S	KWCFRV S RGISCYRRCR	3,13	0,8	3,13	1,97	190	96,4
I11R	KWCFRV R RGISCYRRCR	1,56	1,56	6,25	2,48	80	32,3
[+Z]	Z KWCFRV S CYRGICYRRCR	1,56	0,8	1,56	1,24	39	31,5
[+Z,-R]	Z KWCFRV S CYRGICYRRC	3,13	3,13	3,13	3,13	43	13,7

^аМИК: минимальная концентрация пептида, при которой отсутствует рост бактериальной тест-культуры после 24-часовой инкубации при 37°C; ^бСГ: среднее геометрическое значений МИК для всех тест-культур; ^вМГК: минимальная гемолитическая концентрация (концентрация, вызывающая лизис 2% эритроцитов); ^гТИ: терапевтический индекс определяется как отношение МГК к СГ, т.е. бóльшие значения соответствуют бóльшей селективности препарата.

*н.д. – нет данных

В данной работе с целью создания менее токсичных аналогов был использован рациональный дизайн, учитывающий особенности строения тахиплезина-1 при контакте с нейтральными мицеллами, имитирующими мембрану клеток млекопитающих. Как и ожидалось, замена остатка Val⁶ или Tyr⁸, каждый из которых вовлечен в формирование обширной гидрофобной поверхности при контакте с мицеллами ДФХ, на полярный остаток приводила к практически полной потере гемолитических свойств (Рисунок 32).

Однако, замена Val⁶, вместе с тем, сопровождается значительным снижением антибактериальной активности. Ранее в ходе исследований методом ЯМР-спектроскопии отмечалось, что механизм действия тахиплезина-1 связан с частичным погружением пептида в бислой и вращением параллельно плоскости бактериальной мембраны, причем максимальная амплитуда была продемонстрирована для области β -изгиба (Tyr⁸-Arg⁹-Gly¹⁰-Phe¹¹) [291]. По-видимому, остаток Val⁶ играет ключевую роль во взаимодействии тахиплезина-1 с бактериальной мембраной, в то время как более мобильные остатки Tyr⁸ и Phe¹¹ оказывают сравнительно небольшое влияние на антимикробные свойства, хотя и важны для проявления максимальной активности пептидом.

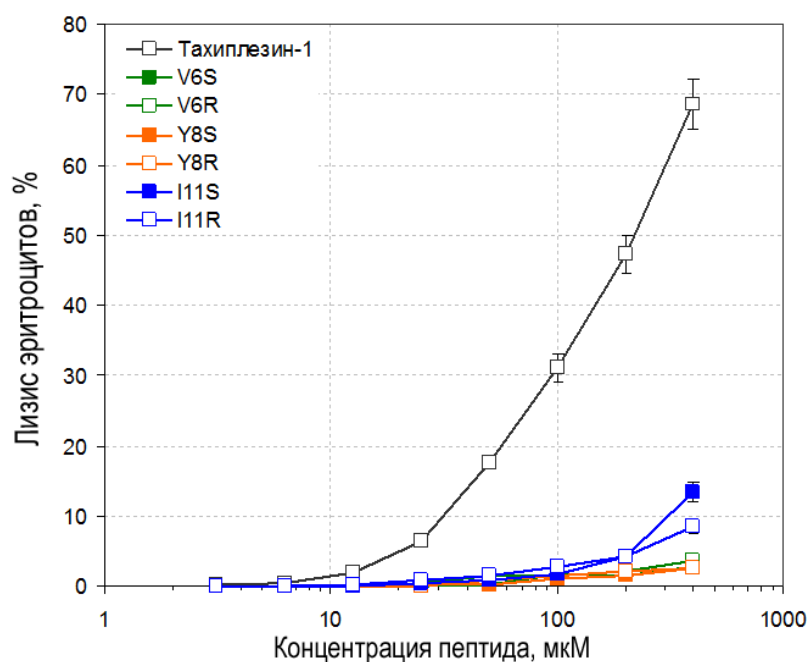


Рисунок 32. Гемолитическая активность тахиплезина-1 и его аналогов.

Исследование тахиплезина-1 в воде и мицеллах детергентов методом спектроскопии КД показало идентичность вторичной структуры рекомбинантного и природного пептидов [297]. В водном растворе для тахиплезина-1 наблюдалась характерная форма КД-спектра с двумя максимумами при 200 и 230 нм и одним минимумом при 210 нм. Весьма неожиданно, что для

нетоксичного аналога Y8S и тахиплезина-1 были показаны идентичные формы КД-спектров как в воде, так и в присутствии ДСН (минимум при 210 нм, максимумы при 190 и 230 нм) и ДФХ (минимум при 205 нм, максимум при 230 нм). По-видимому, данный факт может свидетельствовать о сохранении у аналога пространственной структуры пептида дикого типа, а также об отсутствии влияния агрегации на гемолитическую активность тахиплезина-1. Более детальные выводы могут быть сделаны лишь после подробного изучения процесса взаимодействия аналога Y8S со структурами, моделирующими мембрану эритроцитов.

Изменение амфифильных свойств тахиплезина-1 позволило создать аналоги Y8S и I11S, которые в значительной степени сохранили антимикробный потенциал природной молекулы при увеличении терапевтического индекса в 16 и 10 раз, соответственно. Кинетика действия тахиплезина-1 и аналогов (Y8S и I11S) на мембраны клеток *E. coli* ML-35p и *S. aureus* 209P была изучена вышеописанными методами. Рекомбинантный тахиплезин-1 и аналог I11S вызывали быстрое разрушение мембран грамположительных и грамотрицательных клеток независимо от их физиологического состояния, действуя аналогично ареницину-1. Аналог Y8S сохранил показатели пептида дикого типа при действии на активно делящиеся клетки, однако был значительно менее эффективен в отношении мембран клеток, которые находились в стационарной фазе роста.

Далее была изучена цитотоксическая активность тахиплезина-1 и аналогов в отношении нормальных клеток человека *in vitro* (Рисунок 33).

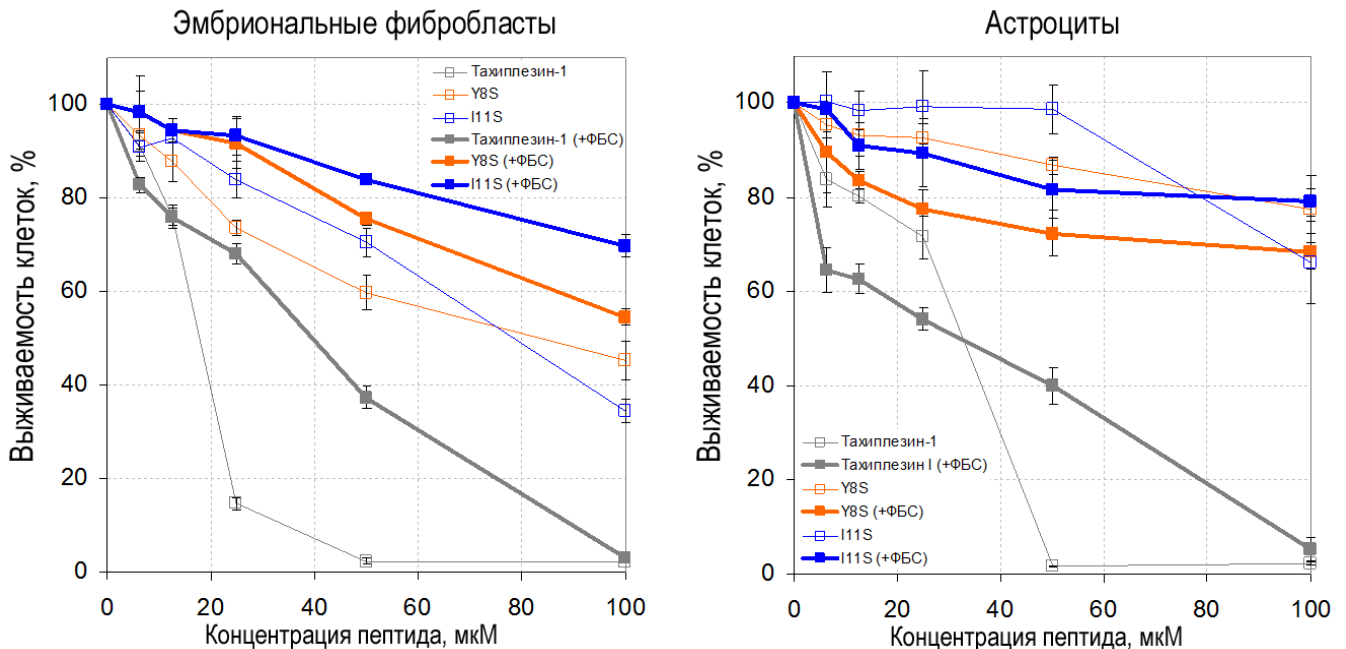


Рисунок 33. Цитотоксическое действие тахиплезина-1 и его аналогов на нормальные клетки человека *in vitro* по результатам МТТ-теста. ФБС – 10% fetal бычья сыворотка.

Рекомбинантный тахиплезин-1 вызывал гибель 50% астроцитов уже при 30 мкМ как в присутствии, так и без ФБС в среде. Пептид был также активен в отношении фибробластов: значение полумаксимальной гибели клеток (IC_{50}) в отсутствие сыворотки составило ~20 мкМ, а в присутствии – 40 мкМ. Аналогичный эффект был ранее показан для синтетического тахиплезина-1 в отношении клеток яичника китайского хомячка [446]. Значения IC_{50} для Y8S и I11S в отношении астроцитов составили более 100 мкМ независимо от присутствия сыворотки в среде. При действии на фибробласты значения IC_{50} в присутствии сыворотки также составили более 100 мкМ. Важно отметить, что наиболее перспективный аналог I11S продемонстрировал низкую цитотоксичность при повышении концентрации вплоть до 50 мкМ, которая соответствует терапевтической концентрации в кровотоке при системном применении *in vivo*, исходя из опыта для ряда других АМП.

Системное применение АМП в значительной степени затруднено из-за их протеолитической деградации и связывания с белками крови. К настоящему моменту известно о 569 протеолитических ферментах различных классов в организме человека [447]. Тем не менее, наличие компактной структуры, стабилизированной дисульфидными связями, затрудняет гидролиз пептидных связей в β -шпилечных АМП протеазами [257]. В данной работе была поставлена задача оценить устойчивость рекомбинантного тахиплезина-1 к протеолизу. Тахиплезин-1 инкубировали в присутствии 25% свежевыделенной человеческой сыворотки в забуференном физиологическом растворе. В ходе оптимизации были опробованы различные подходы к быстрой очистке АМП от компонентов сыворотки после инкубации для дальнейшего качественного и количественного анализа. Метод осаждения компонентов сыворотки из инкубационной смеси с помощью 10% ТФУ, описанный для ряда других АМП [257,448], приводил к практически полному соосаждению пептида и низкому выходу. Ультрафильтрация через фильтр с размером пор 30 кДа позволяла достичь высокой степени очистки от компонентов сыворотки, однако, вместе с тем приводила к потере более чем 50% пептида. По-видимому, благодаря наличию амфифильной структуры, а также лектин-подобным свойствам, которые ранее были показаны для β -шпилечных АМП, тахиплезин-1 способен эффективно связываться как с целлюлозным носителем мембраны, так и с гликопротеинами сыворотки за счет водородных связей. Во избежание вышеописанных взаимодействий на стадии разделения было решено использовать хаотропные агенты, разрушающие водородные связи. В результате оптимизации условий процесса, осаждение смеси пептида с сывороткой с помощью 10% ТФУ проводили в присутствии 3 М мочевины, что позволило добиться сохранения более 95% пептида и удаления большей части сыворотки.

После 24 ч инкубации продукты протеолиза были проанализированы с помощью ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии. Далее были выявлены основные сайты

протеолитического расщепления молекулы (Рисунок 34). Важно отметить, что гидролиз происходил в основном за пределами стабилизированной дисульфидными связями шпильки, что может свидетельствовать о ключевом значении цистинов в формировании устойчивости пептида к протеазам. Время полураспада для рекомбинантного тахиплезина-1 составило ~1,5 ч. Для сравнения, время полураспада для α -спирального АМП буфорина-2 в аналогичных условиях составило менее 5 мин.

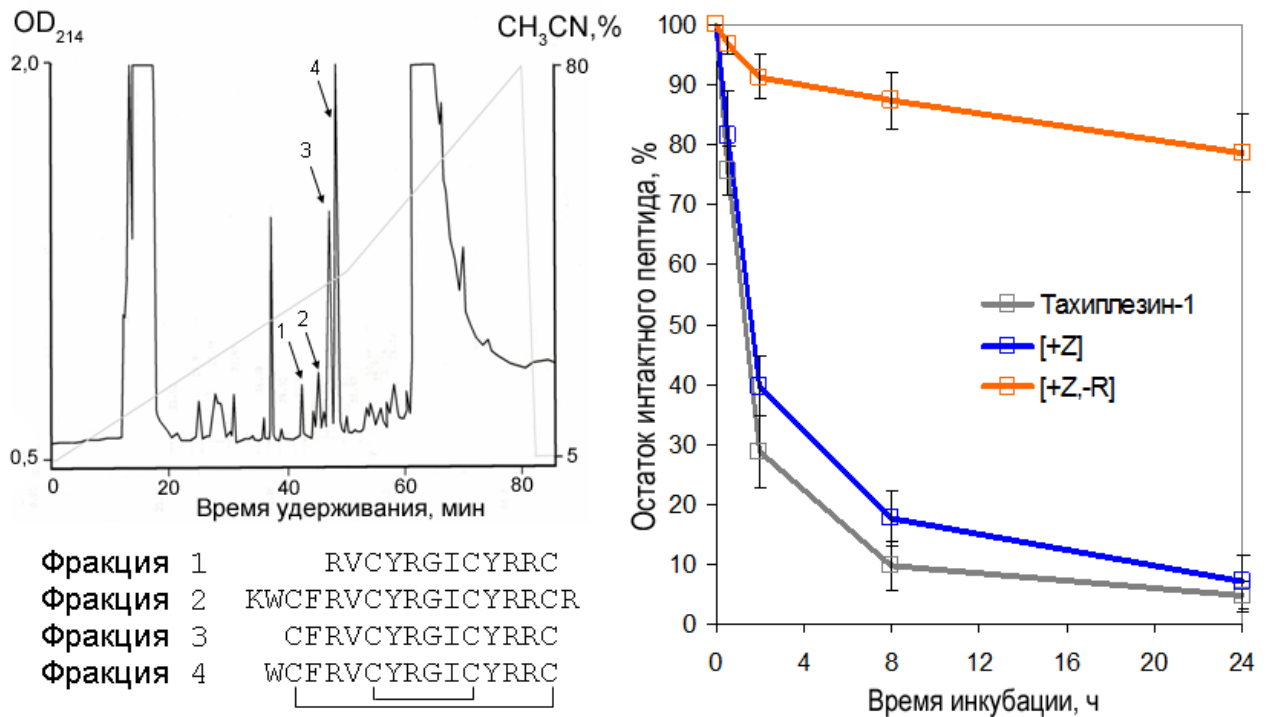


Рисунок 34. Изучение протеолитической деградации рекомбинантного тахиплезина-1 и его аналогов в сыворотке крови человека. Слева – анализ продуктов протеолиза рекомбинантного тахиплезина-1 после 24 ч инкубации в 25% сыворотке крови. Справа – сравнительное исследование устойчивости природного пептида и его аналогов к протеолитической деградации в 25% сыворотке крови.

С целью создания более устойчивых к протеолитической деградации соединений были синтезированы аналоги тахиплезина-1, защищенные N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты (Z). В одном из аналогов, кроме того, был удален C-концевой остаток аргинина. Аналогичный тип защиты от карбоксипептидаз известен среди АМП, содержащих в своей структуре «Rana-box», образующийся путем окисления двух остатков цистеина, один из которых является C-концевым. Наличие N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты характерно для ряда АМП (см. 2.3. «Обзора литературы»). Его образование в природе происходит путем циклизации боковой цепи N-концевого остатка глутамина или глутаминовой кислоты. Для проведения данной модификации в структуру аналогов был добавлен N-концевой глутамин. Известно, что циклизация может быть осуществлена как ферментативным путем при

участии глутаминилциклазы, так и химическим – путем инкубации в растворах с низким значением pH [242]. Для упрощения процедуры получения модифицированных аналогов циклизацию проводили путем инкубации смеси после расщепления гибридного белка и удаления бромциана, в течение 24 ч при pH 1,0. С помощью ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии оценивался выход реакции, который составил не менее 90%.

Аналог тахиплезина-1, защищенный N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты и лишенный C-концевого аргинина, подвергался незначительной деградации даже после 24-часовой инкубации в сыворотке крови (Рисунок 34). В результате тестирования антимикробной активности аналогов было показано, что введение остатка пироглутаминовой кислоты в структуру тахиплезина-1 (аналог [+Z]) не влияет на антимикробные свойства пептида (Таблица 4), однако повышает протеолитическую устойчивость. Кроме того, основным продуктом протеолиза аналога [+Z] спустя 24 ч инкубирования является аналог [+Z,-R]. Важно отметить, что C-концевой положительно заряженный остаток аргинина играет важную роль в реализации механизма действия пептида как на грамположительные, так и с грамотрицательные микроорганизмы, поскольку антибактериальная активность аналога [+Z,-R] снижалась в среднем в 2–4 раза. Таким образом, было показано, что защита пептидов с помощью N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты является эффективным приёмом для создания рекомбинантных β -спилечных АМП с повышенным уровнем стабильности в сыворотке крови без ущерба для антимикробных свойств. Несмотря на продемонстрированную устойчивость β -спилечного каркаса к протеолитической деградации в сыворотке крови, актуальной задачей остается разработка биотехнологических подходов к получению аналогов, защищенных от действия экзопептидаз, в том числе ковалентно замкнутых циклических производных.

4.3. Получение рекомбинантных аналогов антимикробных пептидов и исследование их совместного действия на бактерии

Всесторонние исследования структуры и биологических свойств АМП требуют значительных количеств вещества, которые практически невозможно получить из природного источника. Обусловлено это низким содержанием пептида в тканях животного, колебаниями уровня экспрессии, сложностью методики выделения и ее высокой стоимостью. В настоящее время широкое распространение получают технологии производства промышленно значимых белков и пептидов, основанные на создании сверхпродуцентов с помощью генной инженерии. Высокий уровень экспрессии целевого продукта обеспечивается подбором оптимального сочетания эффективной экспрессирующей конструкции и подходящих организма-хозяина, состава среды и условий культивирования. В качестве организмов-продуцентов используют бактерии, дрожжи, культуры клеток растений и животных, а также бесклеточные

белоксинтезирующие системы. Отсутствие существенных посттрансляционных модификаций в структурах природных пептидов позволило сделать выбор в пользу гетерологической экспрессии в прокариотических клетках. В ходе предварительных испытаний и анализа литературных данных было установлено, что для большинства АМП удается достичь значительного уровня биосинтеза при экспрессии в составе гибридного белка, содержащего олигогистидиновую последовательность и модифицированный тиоредоксин (M37L). Тиоредоксин способен в высокой концентрации накапливаться в цитоплазме *E. coli* в растворимой форме и широко применяется для сверхэкспрессии биологически активных и токсичных пептидов – в первую очередь, обогащенных остатками цистеина, обеспечивая образование корректной пространственной структуры продукта [449]. Поскольку ни один из исследуемых в данной работе АМП не содержал в своей структуре остаток метионина, между последовательностями белка-носителя и соответствующих пептидов был введен метиониновый кодон (ATG), что позволило с помощью реакции расщепления гибридного белка бромцианом в кислой среде получить целевые рекомбинантные пептиды. Для обеспечения возможности металлохелатной очистки гибридного белка в его структуре был предусмотрен N-концевой фрагмент из восьми остатков гистидина.

В Учебно-научном центре ИБХ РАН совместно с лабораторией общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» ведется работа по исследованию аурелина – пептида, выделенного из мезоглеи сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. Аурелин имеет молекулярную массу 4,3 кДа и состоит из 40 аминокислотных остатков, шесть из которых – цистеины, образующие три внутримолекулярные дисульфидные связи. Показано, что рекомбинантный аналог аурелина формирует ShKT тип пространственной структуры [408], характерный для блокирующих калиевые каналы токсинов из яда морских анемонов. Ранее методом радиальной диффузии в агарозном геле была продемонстрирована антимикробная активность в отношении ряда бактериальных штаммов. По-видимому, в природе данный тип пространственной укладки является универсальной основой для различных биологически активных молекул, действующих в таких агрессивных средах, как морская вода. Для проведения дальнейших испытаний биологической активности этого пептида была поставлена задача оптимизации метода получения рекомбинантного аурелина. В рамках данной работы был использован метод гетерологической экспрессии АМП в составе гибридного белка путем автоиндукции лактозой. Данный подход позволяет выращивать культуру клеток-продуцентов до высоких значений оптической плотности, сохраняя при этом высокий уровень экспрессии целевого продукта в растворимой форме. Для сравнения экспрессию аурелина также проводили в стандартных условиях с индукцией 0,2 mM IPTG в течение 5 ч. Температура индукции в обоих случаях

составила 30°C. Относительное содержание гибридного белка в клеточном лизате был приблизительно равным (Рисунок 35), однако большие значения конечной оптической плотности бактериальной культуры при автоиндукции позволяли достичь в 4 раза более высокого выхода по массе гибридного белка с литра культуры.

Очистку аурелина в обоих случаях проводили без использования денатурирующих агентов, таких как гуанидин или мочевины, при пониженной температуре согласно следующей методике: металлохелатная хроматография растворимой фракции клеточного белка, диализ элюата против раствора уксусной кислоты, химическое расщепление гибридного белка, повторная металлохелатная хроматография с целью удаления белка-носителя, финальная очистка пептида с помощью ОФ-ВЭЖХ. Соответствие основной фракции ОФ-ВЭЖХ целевому продукту подтверждали с помощью автоматического микросеквенирования, МАЛДИ масс-спектрометрии и КД-спектроскопии. Конечный выход пептида при индукции IPTG составил 4,5 мг с 1 л бактериальной культуры. Метод автоиндукции лактозой позволил увеличить выход пептида до 18,9 мг с 1 л бактериальной суспензии, что позволяет рассматривать предложенный подход в качестве основного для дальнейшего получения рекомбинантных аналогов цистеин-богатых АМП в растворимой форме.

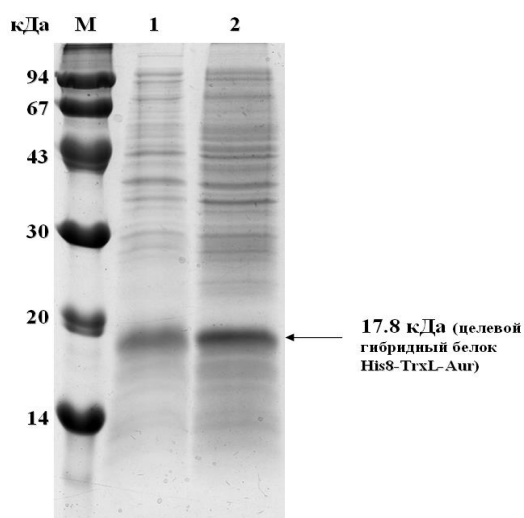


Рисунок 35. Контроль экспрессии гибридного белка, содержащего аурелин, с помощью ПААГ-электрофореза. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс; 1 – суммарный клеточный лизат после индукции с помощью IPTG; 2 – суммарный клеточный лизат после автоиндукции лактозой.

В ходе тестирования биологической активности рекомбинантного пептида было показано, что аурелин не способен подавлять рост бактерий при тестировании в жидкой питательной среде даже при концентрации 50 мкМ, в том числе в отсутствие NaCl. Способность пептида оказывать незначительный ингибирующий эффект на скорость роста бактерий может быть связана с суммарным положительным зарядом и слабо выраженными амфифильными свойствами. Важно отметить, что аурелин не оказывал повреждающего действия на эритроциты человека даже при концентрации 100 мкМ.

В отличие от млекопитающих и амфибий сведения об АМП рыб пока весьма немногочисленны и связаны, как правило, с изучением пептидов, выделенных из слизи, кожи, жабр и ряда других органов [450]. Ранее в ходе совместной работы Учебно-научного центра ИБХ РАН и с лабораторией общей патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» из лейкоцитов крови русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* были выделены и охарактеризованы новые катионные АМП, названные аципенсинами и являющиеся частями гистона H2A. Стоит отметить, что из слизистых покровов палтуса *Hippoglossus hippoglossus* и сома *Parasilurus asotus* были выделены гомологичные аципенсином антимикробные пептиды, названные хиппосином [451] и паразином 1 [452]. В ходе данной работы была поставлена задача получения рекомбинантного аналога аципенсина-1 (50 а.о.), преимущественной фракции в лейкоцитах, и изучения его биологических свойств. В ходе предварительных испытаний по экспрессии пептида в составе гибридного белка было установлено, что аципенсин-1 подвергается протеолитической деградации при длительном культивировании клеток-продуцентов. В связи с этим было решено снизить время индукции до 3 ч, что позволило свести к минимуму количество побочных продуктов протеолиза. Очистку целевого пептида проводили аналогично рекомбинантному аурелину, в соответствии с приведенной выше методикой. Финальный выход пептида составил 13,1 мг с 1 л бактериальной культуры. Для дальнейших испытаний было получено не менее 40 мг аципенсина-1 в виде сухого порошка.

Рекомбинантный аципенсин-1 аналогично природному пептиду не проявлял гемолитической активности в диапазоне концентраций от 0 до 100 мкМ. Как и в случае с другими производными гистона H2A, антимикробная активность аципенсина-1, по-видимому, обусловлена связыванием с внутриклеточными мишенями – нуклеиновыми кислотами. Исследование ДНК-связывающей активности *in vitro* подтвердило это предположение: после кратковременной инкубации рекомбинантного аципенсина-1 с плазмидной ДНК при массовом соотношении 1:1 электрофоретическая подвижность последней значительно снижалась.

Наряду с аурелином и аципенсином-1 для сравнительного исследования антибактериальной активности были отобраны и получены рекомбинантные аналоги АМП животного происхождения, обладающие различными механизмами действия и типами пространственной структуры (Таблица 5): гомезин из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, нарушающий целостность мембран [234]; апидаецин 1b из гемолимфы пчелы *Apis mellifera*, связывающий белки теплового шока [453]; бактенецин ChVac3.4 из лейкоцитов козы *Capra hircus* и тритрптицин из костного мозга свиньи *Sus scrofa*, действующие как на мембраны, так и на внутриклеточные мишени [454,455]. Для их получения была использована методика, разработанная ранее для экспрессии и очистки аципенсина-1. В таблице 5 приведены АМП

животного происхождения, полученные в данной работе с использованием тиоредоксина в качестве белка-носителя.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности и выходы полученных рекомбинантных АМП

Название	Структурный класс	Аминокислотная последовательность	Выход, мг/л
Аципенсин-1	α -спиральный	SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAQRVVGAGAPVY	13,1
Аурелин	α -спиральный	AACSDRAHGHI ^C ESFKSFC ^K DSGRNGVKLRAN ^C CKTC ^G GLC	18,9
Ареницин-1	β -шпилечный	RWC ^V YAYVVRVGV ^L VR ^R RC ^W	4,5
NZ17000	β -шпилечный	GC ^W YV ^C VYRNGV ^R V ^C YRR ^C N	5,2
Гомезин	β -шпилечный	Z ^C RRL ^C CYKQR ^C VTY ^C RGR	9,2
Тахиплезин-1	β -шпилечный	KW ^C FRV ^C YRGI ^C YRR ^C R	17,0
ChVac3.4	Pro-богатый	RFRLPFRRPPIRIHPPPFYPPFRFL	3,8
Апидаецин 1b	Pro-богатый	GNNRPVYIPQPRPPHRL	0,3
Тритрптицин	Trp-богатый	VRRFPWWPFLRR	11,6

Полученные данные указывают на способность тиоредоксина как белка-носителя нейтрализовывать токсические эффекты большинства АМП в ходе гетерологической экспрессии в бактериальной системе. Исключение составил апидаецин 1b, который, даже входя в состав гибридного белка, в значительной степени ингибирует рост клеток-продуцентов, что, в конечном счете, приводит к резкому падению выхода конечного продукта до 0,3 мг с литра бактериальной культуры. Ранее была обнаружена способность апидаецина 1b в ходе экспрессии в составе другого белка-носителя (ингибитора субтилизина стрептомицетов) подавлять рост бактерий-продуцентов (*E. coli*), что было использовано для скрининга аналогов пептида с целью поиска ключевых для высокой активности аминокислотных остатков [456].

Сравнительный анализ антибактериальной активности всех полученных в данной работе АМП проводили методом серийных разведений в богатой питательной среде в присутствии 0,05% БСА и 170 мМ NaCl (Таблица 6).

Таблица 6. Антибактериальная активность рекомбинантных АМП и полимиксина В

АМП	МИК, мкМ			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Полимиксин В	6,25	0,2	0,8	1,56
Ареницин-1	1,56	0,8	1,56	6,25
Тахиплезин-1	0,8	0,4	0,8	0,8
Гомезин	25	6,25	25	н.д.
Аурелин	>50	>50	>50	>50
Аципенсин-1	>50	>50	>50	>50
Апидаецин 1b	>50	>50	>50	>50
ChVac3.4	>50	3,13	>50	50
Тритрптицин	>50	12,5	>50	>50

*н.д. – нет данных

β -Шпилечные АМП, за исключением гомезина, продемонстрировали высокую активность в отношении всех тест-культур, сопоставимую с бактерицидным антибиотиком полимиксином В. В данных условиях остальные пептиды оказывали лишь незначительный ингибирующий эффект, лишь в ряде случаев полностью подавляя рост бактерий. Стоит отметить, что многие из проанализированных АМП действовали с большей эффективностью в бессолевых средах. В то же время, повышенная ионная сила практически не оказывает влияния на активность β -шпилечных АМП. Было высказано предположение, что слабо выраженная активность отдельных защитных пептидов животных может повышаться за счет синергического эффекта при совместном действии с другими АМП в очаге инфекции.

Для проверки данной гипотезы было решено проанализировать антибактериальные свойства аципенсина-1, бактенецина ChVac3.4 и тритриптицина в присутствии тахиплезина-1, теоретически способного потенцировать их активность благодаря выраженному мембранолитическому механизму действия. Для сравнения также изучили совместное действие тахиплезина-1 с другими соединениями, обладающими схожими механизмами действия (полимиксин В, ареницин-1). На рисунке 36 для исследуемых АМП представлены предполагаемые механизмы действия на цитоплазматическую мембрану бактерий, а также внутриклеточные мишени.

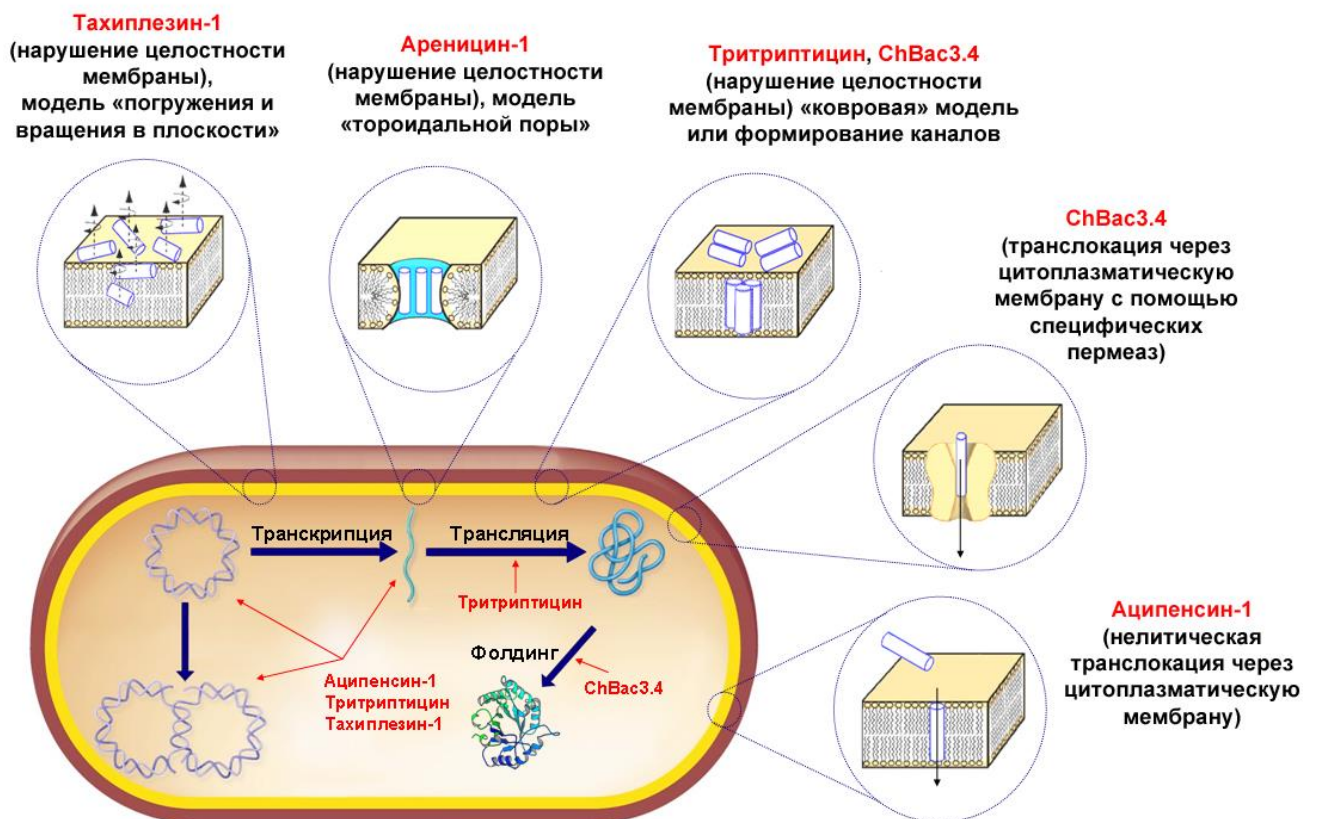


Рисунок 36. Схематическое сравнение предполагаемых механизмов действия АМП различных структурных классов, отобранных для изучения совместного действия на бактериальные тест-культуры. При создании рисунка были использованы данные из [179,288,407,418,455,457].

Тестирование пар соединений проводилось методом серийных разведений в описанных выше условиях. В ходе предварительных испытаний использовали различные соотношения пептидов в смеси. Оценку синергического эффекта проводили путем вычисления индекса фракционной ингибирующей концентрации (индекс ФИК, FIC index – fractional inhibitory concentration index) по формуле: $\text{ФИК} = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$, где МИК_A и МИК_B – минимальные ингибирующие концентрации для индивидуальных веществ, а $[A]$ и $[B]$ – минимальные ингибирующие концентрации при совместном применении препаратов. К примеру, при значении индекса ФИК = 0,5 достигается четырехкратное снижение значений индивидуальных МИК в смеси их двух соединений. Таким образом, значение индекса ФИК $\leq 0,5$ указывает на синергический эффект при совместном применении пептидов. Результаты совместного действия АМП на бактериальные клетки представлены в таблице 7. В случаях, когда значение МИК индивидуального вещества составляло >50 мкМ, для расчета индекса ФИК использовали значение 100 мкМ.

Таблица 7. Совместное действие АМП на бактерии

Тест-культура	Индекс ФИК ($[A]+[B]$)				
	Полимиксин В + тахиплезин-1	Ареницин-1+ тахиплезин-1	Аципенсин-1 + тахиплезин-1	Тритрптицин + тахиплезин-1	ChВас3.4 + тахиплезин-1
<i>S. aureus</i>	1,125 (0,8+0,8)	0,75 (0,8+0,2)	0,141 (1,56+0,1)	0,281 (3,13+0,2)	0,281 (3,13+0,2)
<i>E. coli</i>	0,75 (0,1+0,1)	1,0 (0,4+0,2)	0,067 (0,4+0,025)	0,313 (0,8+0,1)	0,375 (0,4+0,1)
<i>P. aeruginosa</i>	1,0 (0,4+0,4)	0,75 (0,8+0,2)	0,281 (3,13+0,2)	0,563 (6,25+0,4)	0,563 (6,25+0,4)
<i>K. pneumoniae</i>	0,75 (0,4+0,4)	1,0 (1,56+0,4)	0,281 (3,13+0,2)	0,281 (3,13+0,2)	0,281 (3,13+0,2)

Как и предполагалось, действующие по схожему механизму пары пептидов (полимиксин В/ тахиплезин-1 и ареницин-1/тахиплезин-1) проявили лишь аддитивный эффект (ФИК ~ 1) в отношении всех бактериальных культур. В остальных случаях (кроме тестирования пар тритрптицин/тахиплезин-1 и ChВас3.4/тахиплезин-1 в отношении *P. aeruginosa*) наблюдался синергический эффект с падением значений МИК для тахиплезина-1 в 4–16 раз. Важно отметить, что тритрптицин и ChВас3.4 принадлежат к семейству кателицидинов, поэтому их экспрессия в нейтрофилах, вероятно, происходит совместно с другими представителями этой группы АМП – протегринами у свиньи и бактенецинами у козы. Можно предположить, что β -шипилечные протегрины и бактенецины, способные эффективно разрушать мембраны бактерий в присутствии физиологических концентраций соли, подобно тахиплецину-1, усиливают действие тритрптицина и ChВас3.4 в условиях *in vivo*.

Особое внимание привлекла пара АМП аципенсин-1/тахиплезин-1. Во-первых, данные пептиды проявили выраженный синергизм при действии на все бактериальные тест-культуры. Во-вторых, тахиплезин-1, действуя в наномолярном диапазоне концентраций, по сути, способен активировать аципенсин-1 в присутствии 170 мМ NaCl, снижая значение его МИК с >50 мкМ до 0,4–3,13 мкМ. Важно отметить, что весьма схожий эффект снижения МИК для аципенсина-1 достигался путем удаления NaCl из питательной среды при тестировании методом серийных разведений в жидкой питательной среде (Таблица 8).

Таблица 8. Сравнение антибактериальной активности тахиплезина-1 и аципенсина-1

АМП	МИК, мкМ							
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl	-NaCl	+170 мМ NaCl
Тахиплезин-1	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8
Аципенсин-1	3,13	>50	1,56	>50	1,56	>50	3,13	>50

Было высказано предположение, что повышение ионной силы раствора (соли в физиологических концентрациях) приводит к созданию электростатического барьера вокруг бактериальной клетки, препятствующего взаимодействию с мембраной катионных АМП, не обладающих выраженной амфифильностью [31]. Исходя из этого, было решено проверить способность аципенсина-1 и тахиплезина-1 нарушать целостность внешней мембраны грамотрицательной бактерии *E. coli* ML-35p в отсутствие и в присутствии 170 мМ NaCl (Рисунок 37). Данный штамм способен конститутивно экспрессировать фермент β-лактамазу в периплазматическом пространстве клетки. В ходе эксперимента оценивали накопление продукта ферментативного гидролиза хромогенного субстрата – нитроцефина.

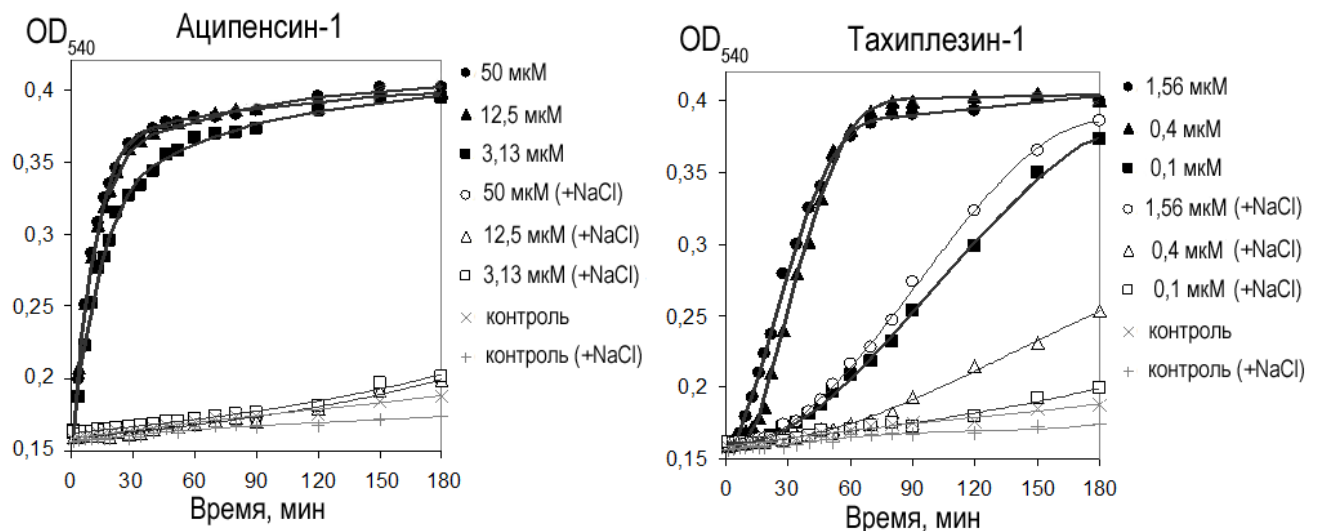


Рисунок 37. Фотометрическая оценка повышения проницаемости внешней мембраны бактерий *E. coli* ML-35p при действии различных концентраций антимикробных пептидов аципенсина-1 и тахиплезина-1 в отсутствие и в присутствии 170 мМ NaCl.

В условиях данного эксперимента были установлены значения МИК для аципенсина-1 (МИК_(-NaCl) 12,5 мкМ, МИК_(+NaCl) >50 мкМ) и тахиплезина-1 (МИК_(-NaCl) 1,56 мкМ, МИК_(+NaCl) 3,13 мкМ). В отсутствие солей аципенсин-1 способен быстро разрушать внешнюю мембрану бактерий, действуя, в том числе, в субингибирующих концентрациях. Наоборот, в присутствии 170 мМ NaCl действие аципенсина-1 на мембрану не наблюдалось даже при максимальной концентрации – 50 мкМ. В случае тахиплезина-1 наличие соли также оказывало негативное влияние на скорость разрушения внешней мембраны. Тем не менее, независимо от присутствия NaCl в среде, тахиплезин-1 продемонстрировал способность повышать проницаемость внешней мембраны *E. coli* при действии в субингибирующей концентрации (1/8×МИК). Важно отметить, что значение индекса ФИК для пары аципенсин-1/тахиплезин-1 в отсутствие солей составило 0,19 (0,2+0,025). Таким образом, потенцирование свойств аципенсина-1 в присутствии тахиплезина-1 происходит не только благодаря преодолению электростатического барьера, но и другим эффектам.

Полученные результаты указывают на возможность совместного применения различных АМП в медицине. С другой стороны, использование β-спилечных АМП, таких как тахиплезин-1, может способствовать повышению антибактериальной активности ряда защитных пептидов млекопитающих в условиях *in vivo*. Снижение антимикробной активности при повышении ионной силы раствора характерно для целого ряда описанных АМП, например, α-дефенсинов человека. При этом антимикробная активность α-дефенсинов может восстанавливаться в средах, содержащих физиологические концентрации NaCl, в результате синергического взаимодействия с кателицидином LL-37, известного мембранолитического АМП из нейтрофилов человека [458]. Данный эффект может объяснять единовременное присутствие целого ряда АМП в очаге инфекции у различных видов животных. К примеру, у некоторых насекомых были обнаружены репертуары из 8–10 пептидов, обладающих различными механизмами действия [459]. Таким образом, возможным направлением дальнейшей работы по изучению системы врожденного иммунитета осетра *Acipenser gueldenstaedtii* является поиск других АМП в тканях животного, способных повышать эффективность аципенсинов в условиях *in vivo*. К настоящему моменту было проведено лишь несколько исследований синергизма при совместном действии различных АМП [301,458,460,461]. Важно отметить, что выраженный синергический эффект был показан для катионных АМП животных и бактериоцинов из молочнокислых бактерий [462]. Исследования в этом направлении могут пролить свет на особенности взаимодействия бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника, с иммунной системой млекопитающих.

5. Заключение

Основной целью данной работы был поиск подходов, позволяющих снизить цитотоксические свойства β -спилечных АМП. Для ее достижения на первом этапе были получены рекомбинантные аналоги ряда природных АМП, проведено исследование их антимикробных свойств и отобраны наиболее активные соединения – ареницин-1 и тахиплезин-1. В результате сравнительного изучения свойств широкого спектра мутантных аналогов этих соединений, полученных с помощью направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе, были выявлены ключевые особенности структуры, обуславливающие высокую антимикробную активность и цитотоксичность в отношении нормальных клеток млекопитающих. Была продемонстрирована прямая связь между процессом димеризации ареницина-1 при контакте с цвиттерионными мицеллами, имитирующими мембранное окружение, и высокой гемолитической активностью природного пептида. На примере аналогов тахиплезина-1 показано, что изменение амфифильности молекулы путем точечных аминокислотных замен является эффективным способом снижения побочных цитотоксических свойств природных АМП.

Практическая значимость данной работы заключается в создании ряда менее токсичных (*in vitro* и *in vivo*) аналогов природных β -спилечных АМП, сохраняющих высокую антибактериальную активность. Эффективность полноразмерного аналога V8R и укороченного аналога ALP1, в ряде случаев превышающая показатели для природного пептида, была подтверждена в экспериментах на клинических изолятах бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам. Стоит отметить, что аналог V8R проявляет значительную активность в отношении грамотрицательных бактерий, однако способность пептида нарушать целостность мембран снижается при замедлении метаболизма клеток-мишеней, что ограничивает его возможности как антибиотика. Наибольший интерес представляет укороченный аналог ALP1 поскольку он полностью сохраняет способность пептида дикого типа быстро лизировать бактериальные клетки, находящиеся в различных физиологических состояниях. Важно отметить, что его активность сохраняется в условиях повышенной ионной силы, когда многие другие АМП теряют свою активность. Отсутствие значительных цитотоксических эффектов в отношении эритроцитов, астроцитов и эмбриональных фибробластов вплоть до концентрации 50 мкМ делают аналог ALP1 перспективной основой для создания антимикробного препарата широкого спектра действия. Существенным преимуществом полученных аналогов по сравнению с другими представителями β -спилечных АМП является наличие всего одной дисульфидной связи, что упрощает технологию как биотехнологического, так и синтетического получения пептидов. С

целью защиты результатов интеллектуальной деятельности была подана заявка для получения патента РФ, охватывающая широкий спектр полученных аналогов ареницина-1. Дальнейшие исследования будут нацелены на разработку более эффективной и экономичной технологии получения пептидов с целью проведения расширенных структурно-функциональных и предклинических испытаний. Кроме того, важнейшей задачей станет поиск и разработка наиболее эффективной лекарственной формы для применения полученных соединений в медицине.

В ходе изучения совместного действия АМП была показана способность β -спилечного АМП тахиплезина-1 при действии в субингибирующих концентрациях восстанавливать высокую антибактериальную активность целого ряда защитных пептидов животных в присутствии хлорида натрия в физиологической концентрации. Полученные результаты дают основание полагать, что в будущем значительный практический интерес будет представлять терапия «коктейлями» АМП, действующими в синергизме друг с другом. С одной стороны, это позволит снизить эффективные дозы индивидуальных АМП и стоимость курса лечения, с другой – свести к минимуму токсическое воздействие на организм пациента.

6. Выводы

1. Получены рекомбинантные аналоги антимикробных пептидов животного происхождения аципенсина-1 из лейкоцитов осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, гомезина из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*, тахиплезина-1 из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, апидаецина 1b из гемолимфы пчелы *Apis mellifera*, бактенецина ChVac3.4 из лейкоцитов козы *Capra hircus*, тритрптицина из костного мозга свиньи *Sus scrofa*. Оптимизирована технология получения рекомбинантного аурелина из мезоглеи медузы *Aurelia aurita*.
2. С помощью сайт-направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе получен широкий спектр рекомбинантных аналогов β -шпилечных АМП ареницина-1 из целоцитов морского червя *Arenicola marina* и тахиплезина-1 с точечными аминокислотными заменами.
3. Показана ключевая роль димеризации ареницина-1 в проявлении высокой гемолитической активности пептида.
4. В структуре ареницина-1 и тахиплезина-1 выявлены аминокислотные остатки, оказывающие наиболее существенное влияние на антибактериальные и цитотоксические свойства пептидов. Показана возможность использования природных β -шпилечных АМП в качестве матрицы для создания менее токсичных аналогов, сохраняющих высокую антибактериальную активность и мембранолитический механизм действия.
5. Проведено сравнительное исследование антимикробной активности рекомбинантных пептидов животного происхождения. Показан выраженный синергический эффект при совместном действии тахиплезина-1 и ряда других АМП на бактерии. Выявлена и изучена способность тахиплезина-1 восстанавливать антимикробную активность аципенсина-1 в присутствии солей в физиологических концентрациях.

7. Библиографический список

1. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. С.-Пб.: Наука, 2006. 260 с.
2. Wang G. Post-translational modifications of natural antimicrobial peptides and strategies for peptide engineering // *Curr. Biotechnol.* 2012. Vol. 1, № 1. P. 72–79.
3. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature.* 2002. Vol. 415, № 6870. P. 389–395.
4. Harris F., Dennison S.R., Phoenix D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009. Vol. 10, № 6. P. 585–606.
5. Oppenheim J.J. et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity // *Ann. Rheum. Dis.* 2003. Vol. 62 Suppl 2. P. ii17–ii21.
6. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity: AMPs, the small yet big players of immunity // *FEBS J.* 2009. Vol. 276, № 22. P. 6497–6508.
7. Palumbi S.R. Humans as the world's greatest evolutionary force // *Science.* 2001. Vol. 293, № 5536. P. 1786–1790.
8. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // *J. Antibiot.* 2013. Vol. 66, № 10. P. 571–591.
9. Brogden N.K., Brogden K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011. Vol. 38, № 3. P. 217–225.
10. Roscia G. et al. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013. Vol. 14, № 8. P. 641–649.
11. Fox J.L. Antimicrobial peptides stage a comeback // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31, № 5. P. 379–382.
12. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 521 с.
13. Bergquist D.C., Williams F.M., Fisher C.R. Longevity record for deep-sea invertebrate // *Nature.* 2000. Vol. 403, № 6769. P. 499–500.
14. Lemaitre B., Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster* // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. Vol. 25, № 1. P. 697–743.
15. Risso A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity // *J. Leukoc. Biol.* 2000. Vol. 68, № 6. P. 785–792.
16. Selsted M.E., Ouellette A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6, № 6. P. 551–557.
17. Cunliffe R.N. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract // *J. Leukoc. Biol.* 2003. Vol. 75, № 1. P. 49–58.
18. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases // *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 2007. Vol. 85, № 4. P. 317–329.
19. Wehkamp J. et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 50. P. 18129–18134.
20. Pütsep K. et al. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study // *Lancet Lond. Engl.* 2002. Vol. 360, № 9340. P. 1144–1149.
21. Lande R. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide // *Nature.* 2007. Vol. 449, № 7162. P. 564–569.
22. Bullard R.S. et al. Functional analysis of the host defense peptide human beta defensin-1: new insight into its potential role in cancer // *Mol. Immunol.* 2008. Vol. 45, № 3. P. 839–848.
23. Baumann G., Mueller P. A molecular model of membrane excitability // *J. Supramol. Struct.* 1974. Vol. 2, № 5-6. P. 538–557.
24. Ludtke S.J. et al. Membrane pores induced by magainin // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 43. P. 13723–13728.
25. Pouny Y. et al. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31, № 49. P. 12416–12423.

26. Epand R.M., Epand R.F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents // *J. Pept. Sci.* 2011. Vol. 17, № 5. P. 298–305.
27. Neuhaus F.C., Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 2003. Vol. 67, № 4. P. 686–723.
28. Raghuraman H., Chattopadhyay A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes // *Chem. Phys. Lipids.* 2005. Vol. 134, № 2. P. 183–189.
29. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance // *Pharmacol. Rev.* 2003. Vol. 55, № 1. P. 27–55.
30. Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes // *Prog. Lipid Res.* 2012. Vol. 51, № 2. P. 149–177.
31. Malmsten M. Antimicrobial peptides // *Ups. J. Med. Sci.* 2014. Vol. 119, № 2. P. 199–204.
32. Tran A.X. et al. The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188, № 12. P. 4531–4541.
33. Peschel A. et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 13. P. 8405–8410.
34. Peschel A. et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine // *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193, № 9. P. 1067–1076.
35. Guilhelmelli F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance // *Front. Microbiol.* 2013. Vol. 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00353.
36. Schmidtchen A. et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37 // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 46, № 1. P. 157–168.
37. Chan C., Burrows L.L., Deber C.M. Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 37. P. 38749–38754.
38. Shafer W.M. et al. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 4. P. 1829–1833.
39. Frick I.-M. et al. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 19. P. 16561–16566.
40. Lewenza S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* 2013. Vol. 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00021
41. Habets M.G.J.L., Brockhurst M.A. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity // *Biol. Lett.* 2012. Vol. 8, № 3. P. 416–418.
42. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3, № 3. P. 238–250.
43. Osaki T. et al. Horseshoe crab hemocyte-derived antimicrobial polypeptides, tachystatins, with sequence similarity to spider neurotoxins // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 37. P. 26172–26178.
44. Hilchie A.L., Wuerth K., Hancock R.E.W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides // *Nat. Chem. Biol.* 2013. Vol. 9, № 12. P. 761–768.
45. Fleischmann J., Selsted M.E., Lehrer R.I. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1985. Vol. 3, № 3. P. 233–242.
46. Biragyn A. et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 2001. Vol. 167, № 11. P. 6644–6653.
47. Niyonsaba F. et al. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells // *Eur. J. Immunol.* 2001. Vol. 31, № 4. P. 1066–1075.

48. Davidson D.J. et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 2004. Vol. 172, № 2. P. 1146–1156.
49. Li J. et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6, № 1. P. 49–55.
50. Zhu Q.Z. et al. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988. Vol. 85, № 2. P. 592–596.
51. Niyonsaba F. et al. Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines // *J. Invest. Dermatol.* 2007. Vol. 127, № 3. P. 594–604.
52. Steinstraesser L. et al. Host defense peptides in wound healing // *Mol. Med. Camb. Mass.* 2008. Vol. 14, № 7-8. P. 528–537.
53. Login F.H. et al. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control // *Science.* 2011. Vol. 334, № 6054. P. 362–365.
54. Maróti G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals // *Res. Microbiol.* 2011. Vol. 162, № 4. P. 363–374.
55. Salzman N.H. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces // *Gut Microbes.* 2010. Vol. 1, № 6. P. 401–406.
56. Salzman N.H. et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology // *Nat. Immunol.* 2010. Vol. 11, № 1. P. 76–82.
57. Zhao X. et al. LAMP: a database linking antimicrobial peptides // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, № 6. P. e66557.
58. Boman H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 61–92.
59. Lee D.L., Hodges R.S. Structure-activity relationships of *de novo* designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S // *Biopolymers.* 2003. Vol. 71, № 1. P. 28–48.
60. Romeo D. et al. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263, № 20. P. 9573–9575.
61. Wu M., Hancock R.E. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 1. P. 29–35.
62. Raj P.A., Karunakaran T., Sukumaran D.K. Synthesis, microbicidal activity, and solution structure of the dodecapeptide from bovine neutrophils // *Biopolymers.* 2000. Vol. 53, № 4. P. 281–292.
63. Smith W.L., Sunaga O., Cullor J.S. An evaluation of the tissue expression of a bovine dodecapeptide bactenecin in the adult and fetal animal // *Comp. Haematol. Int.* 1999. Vol. 9, № 3. P. 132–138.
64. Storici P. et al. cDNA sequence analysis of an antibiotic dodecapeptide from neutrophils // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 314, № 2. P. 187–190.
65. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 3, № 9. P. 710–720.
66. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity // *J. Leukoc. Biol.* 2003. Vol. 75, № 1. P. 39–48.
67. Ritonja A. et al. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 255, № 2. P. 211–214.
68. Storici P. et al. Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides // *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 238, № 3. P. 769–776.
69. Lee J.Y. et al. Salt-resistant homodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide: salt-resistant homodimeric bactenecin // *FEBS J.* 2008. Vol. 275, № 15. P. 3911–3920.
70. Lee J.Y. et al. Different modes of antibiotic action of homodimeric and monomeric bactenecin, a cathelicidin-derived antibacterial peptide // *BMB Rep.* 2009. Vol. 42, № 9. P. 586–592.
71. Conibear A.C., Craik D.J. The chemistry and biology of theta-defensins // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014. Vol. 53, № 40. P. 10612–10623.

72. Huttner K.M. et al. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes // *Gene*. 1998. Vol. 206, № 1. P. 85–91.
73. Wu M., Hancock R.E. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43, № 5. P. 1274–1276.
74. Wu M. et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, № 22. P. 7235–7242.
75. Madhonsa K. et al. Antimicrobial action of the cyclic peptide bactenecin on *Burkholderia pseudomallei* correlates with efficient membrane permeabilization // *PLoS Negl. Trop. Dis.* / ed. Yang R. 2013. Vol. 7, № 6. P. e2267.
76. Radermacher S.W., Schoop V.M., Schluesener H.J. Bactenecin, a leukocytic antimicrobial peptide, is cytotoxic to neuronal and glial cells // *J. Neurosci. Res.* 1993. Vol. 36, № 6. P. 657–662.
77. Hai Nan Y. et al. Linear bactenecin analogs with cell selectivity and anti-endotoxic activity // *J. Pept. Sci.* 2012. Vol. 18, № 12. P. 740–747.
78. Hilpert K. et al. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides // *Chem. Biol.* 2006. Vol. 13, № 10. P. 1101–1107.
79. Cherkasov A. et al. Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs // *ACS Chem. Biol.* 2009. Vol. 4, № 1. P. 65–74.
80. Wiczorek M. et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity // *Chem. Biol.* 2010. Vol. 17, № 9. P. 970–980.
81. Mansour S.C., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E.W. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections // *J. Pept. Sci.* 2015. Vol. 21, № 5. P. 323–329.
82. Fjell C.D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. Vol. 11, № 1. P. 37–51.
83. Shestakov A. et al. Synthetic analogues of bovine bactenecin dodecapeptide reduce herpes simplex virus type 2 infectivity in mice // *Antiviral Res.* 2013. Vol. 100, № 2. P. 455–459.
84. Song Y. et al. Purification, characterization and cloning of two novel tigerinin-like peptides from skin secretions of *Fejervarya cancrivora* // *Peptides*. 2009. Vol. 30, № 7. P. 1228–1232.
85. Rinaldi A.C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002. Vol. 6, № 6. P. 799–804.
86. Pukala T.L. et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity // *Nat. Prod. Rep.* 2006. Vol. 23, № 3. P. 368–393.
87. Chi S.-W. et al. Solution structure and membrane interaction mode of an antimicrobial peptide gaegurin 4 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 352, № 3. P. 592–597.
88. Mangoni M.L., Shai Y. Temporins and their synergism against gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1788, № 8. P. 1610–1619.
89. Conlon J.M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, № 13. P. 2303–2315.
90. Vignal E. et al. Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles // *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 253, № 1. P. 221–228.
91. Sai K.P. et al. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 4. P. 2701–2707.
92. Sitaram N. et al. Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerinin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. Vol. 46, № 7. P. 2279–2283.

93. Conlon J.M. et al. Purification of peptides with differential cytolytic activities from the skin secretions of the Central American frog, *Lithobates vaillanti* (Ranidae) // Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 2009. Vol. 150, № 2. P. 150–154.
94. Mechkarska M. et al. Peptidomic analysis of skin secretions demonstrates that the allopatric populations of *Xenopus muelleri* (Pipidae) are not conspecific // Peptides. 2011. Vol. 32, № 7. P. 1502–1508.
95. Pantic J.M. et al. Effects of tigerinin peptides on cytokine production by mouse peritoneal macrophages and spleen cells and by human peripheral blood mononuclear cells // Biochimie. 2014. Vol. 101. P. 83–92.
96. Ojo O.O. et al. Tigerinin-1R: a potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from the skin of the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus* // Diabetes Obes. Metab. 2011. Vol. 13, № 12. P. 1114–1122.
97. Srinivasan D. et al. Insulin-releasing and cytotoxic properties of the frog skin peptide, tigerinin-1R: a structure–activity study // Peptides. 2014. Vol. 55. P. 23–31.
98. Yan X. et al. Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in Ranidae amphibian skins // Amino Acids. 2012. Vol. 43, № 1. P. 309–316.
99. Christeller J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability: proteinase inhibitor variability // FEBS J. 2005. Vol. 272, № 22. P. 5710–5722.
100. Qi R.-F., Song Z.-W., Chi C.-W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2005. Vol. 37, № 5. P. 283–292.
101. Li J. et al. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides // FASEB J. 2007. Vol. 21, № 10. P. 2466–2473.
102. Luckett S. et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 290, № 2. P. 525–533.
103. Korsinczky M.L. et al. Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant // J. Mol. Biol. 2001. Vol. 311, № 3. P. 579–591.
104. Basir Y.J., Conlon J.M. Peptidomic analysis of the skin secretions of the pickerel frog *Rana palustris* identifies six novel families of structurally-related peptides // Peptides. 2003. Vol. 24, № 3. P. 379–383.
105. Ulvatne H. Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B // J. Antimicrob. Chemother. 2002. Vol. 50, № 4. P. 461–467.
106. Dubin G. Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* // Biol. Chem. 2002. Vol. 383, № 7-8. P. 1075–1086.
107. Anaya-López J.L., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides // Crit. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 39, № 2. P. 180–195.
108. Fehlbaum P. et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996. Vol. 93, № 3. P. 1221–1225.
109. Bulet P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function // Dev. Comp. Immunol. 1999. Vol. 23, № 4-5. P. 329–344.
110. Mandard N. et al. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 256, № 2. P. 404–410.
111. Pagès J. Thanatin activity on multidrug resistant clinical isolates of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2003. Vol. 22, № 3. P. 265–269.
112. Wu G. et al. The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria // Peptides. 2011. Vol. 32, № 6. P. 1139–1145.

113. Belas R., Manos J., Suvanasuthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72, № 9. P. 5159–5167.
114. McCoy A.J. et al. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45, № 7. P. 2030–2037.
115. Cézard C. et al. Antibacterial peptides: a review. "Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances". A. Méndez-Vilas. Formatex Research Center. Vol. 2. P. 926-937.
116. Wu G. et al. Membrane aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 395, № 1. P. 31–35.
117. Lee M.K. et al. Role of amino acid residues within the disulfide loop of thanatin, a potent antibiotic peptide // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002. Vol. 35, № 3. P. 291–296.
118. Imamura T. et al. NMR based structure–activity relationship analysis of an antimicrobial peptide, thanatin, engineered by site-specific chemical modification: activity improvement and spectrum alteration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 369, № 2. P. 609–615.
119. Hou Z. et al. Underlying mechanism of *in vivo* and *in vitro* activity of C-terminal-amidated thanatin against clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* // *J. Infect. Dis.* 2011. Vol. 203, № 2. P. 273–282.
120. Hou Z. et al. R-Thanatin inhibits growth and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* *in vivo* and *in vitro* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 10. P. 5045–5052.
121. Wu G. et al. Effects of cations and pH on antimicrobial activity of thanatin and S-thanatin against *Escherichia coli* ATCC25922 and *B. subtilis* ATCC 21332 // *Curr. Microbiol.* 2008. Vol. 57, № 6. P. 552–557.
122. Wu G.-Q. et al. Activity of the antimicrobial peptide and thanatin analog S-thanatin on clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to conventional antibiotics with different structures // *Curr. Microbiol.* 2009. Vol. 59, № 2. P. 147–153.
123. Andrès E. Cationic antimicrobial peptides in clinical development, with special focus on thanatin and heliomicin // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012. Vol. 31, № 6. P. 881–888.
124. Wu G. et al. Application of S-thanatin, an antimicrobial peptide derived from thanatin, in mouse model of *Klebsiella pneumoniae* infection // *Peptides.* 2013. Vol. 45. P. 73–77.
125. Wu G. et al. Selective toxicity of antimicrobial peptide S-thanatin on bacteria // *Peptides.* 2010. Vol. 31, № 9. P. 1669–1673.
126. Wu G. et al. Subacute toxicity of antimicrobial peptide S-thanatin in ICR mice // *Peptides.* 2012. Vol. 36, № 1. P. 109–113.
127. Wu G. et al. Interaction of antimicrobial peptide S-thanatin with lipopolysaccharide *in vitro* and in an experimental mouse model of septic shock caused by a multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli* // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010. Vol. 35, № 3. P. 250–254.
128. Wu G. et al. Protective effects of antimicrobial peptide S-thanatin against endotoxic shock in mice introduced by LPS // *Peptides.* 2011. Vol. 32, № 2. P. 353–357.
129. Wu T. et al. Expression of antimicrobial peptides thanatin(S) in transgenic Arabidopsis enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria // *Gene.* 2013. Vol. 527, № 1. P. 235–242.
130. Koch A. et al. The antimicrobial peptide thanatin reduces fungal infections in Arabidopsis: thanatin reduces fungal infection in plants // *J. Phytopathol.* 2012. Vol. 160, № 10. P. 606–610.
131. Imamura T. et al. Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin // *Transgenic Res.* 2010. Vol. 19, № 3. P. 415–424.
132. Miao X.-Y., Zhang X. Production of transgenic mice carrying the thanatin gene by intratesticular injection // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 415, № 3. P. 429–433.
133. Moore S.A. et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 274, № 2. P. 222–236.

134. Saito H. et al. Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH // *J. Dairy Sci.* 1991. Vol. 74, № 11. P. 3724–3730.
135. Bellamy W. et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. Vol. 1121, № 1-2. P. 130–136.
136. Hwang P.M. et al. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37, № 12. P. 4288–4298.
137. Vorland L.H. et al. Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin // *Scand. J. Infect. Dis.* 1998. Vol. 30, № 5. P. 513–517.
138. Hunter H.N. et al. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 8. P. 3387–3395.
139. Bellamy W. et al. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin // *J. Appl. Bacteriol.* 1992. Vol. 73, № 6. P. 472–479.
140. Yamauchi K. et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment // *Infect. Immun.* 1993. Vol. 61, № 2. P. 719–728.
141. Vogel H.J. et al. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides // *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 2002. Vol. 80, № 1. P. 49–63.
142. Duchardt F. et al. A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 52. P. 36099–36108.
143. Strom M.B., Rekdal O., Svendsen J.S. The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin // *J. Pept. Sci.* 2002. Vol. 8, № 1. P. 36–43.
144. Andersen J.H. et al. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts // *Antiviral Res.* 2001. Vol. 51, № 2. P. 141–149.
145. McCann K.B. et al. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures // *J. Appl. Microbiol.* 2003. Vol. 95, № 5. P. 1026–1033.
146. Jenssen H. et al. Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate // *Antiviral Res.* 2004. Vol. 61, № 2. P. 101–109.
147. Vorland L.H. et al. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* // *Scand. J. Infect. Dis.* 1999. Vol. 31, № 2. P. 173–177.
148. Andersen J.H., Jenssen H., Gutteberg T.J. Lactoferrin and lactoferricin inhibit *Herpes simplex* 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir // *Antiviral Res.* 2003. Vol. 58, № 3. P. 209–215.
149. Bellamy W. et al. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin // *Lett. Appl. Microbiol.* 1994. Vol. 18, № 4. P. 230–233.
150. Omata Y. et al. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin // *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 2001. Vol. 63, № 2. P. 187–190.
151. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. Vol. 68. P. 383–424.
152. Mai J.C. et al. A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors // *Cancer Res.* 2001. Vol. 61, № 21. P. 7709–7712.
153. Hoskin D.W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1778, № 2. P. 357–375.
154. Utsugi T. et al. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes // *Cancer Res.* 1991. Vol. 51, № 11. P. 3062–3066.

155. Dobrzyńska I. et al. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells // *Mol. Cell. Biochem.* 2005. Vol. 276, № 1-2. P. 113–119.
156. Burdick M.D. et al. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 39. P. 24198–24202.
157. Yoon W.H. et al. Effect of O-glycosylated mucin on invasion and metastasis of HM7 human colon cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 222, № 3. P. 694–699.
158. Risso A., Zanetti M., Gennaro R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity // *Cell. Immunol.* 1998. Vol. 189, № 2. P. 107–115.
159. Kleeff J. et al. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 102, № 9. P. 1662–1673.
160. Silvestro L. et al. The concentration-dependent membrane activity of cecropin A // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, № 38. P. 11452–11460.
161. Yoo Y.C. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice // *Jpn. J. Cancer Res. Gann.* 1997. Vol. 88, № 2. P. 184–190.
162. Mader J.S. et al. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines // *Mol. Cancer Ther.* 2005. Vol. 4, № 4. P. 612–624.
163. Eliassen L.T. et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells *in vitro* and inhibits xenograft growth *in vivo* // *Int. J. Cancer.* 2006. Vol. 119, № 3. P. 493–500.
164. Onishi J. et al. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60) // *J. Pept. Sci.* 2008. Vol. 14, № 9. P. 1032–1038.
165. Furlong S.J., Mader J.S., Hoskin D.W. Bovine lactoferricin induces caspase-independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts // *Exp. Mol. Pathol.* 2010. Vol. 88, № 3. P. 371–375.
166. Eliassen L.T. et al. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin // *Anticancer Res.* 2002. Vol. 22, № 5. P. 2703–2710.
167. Mattsby-Baltzer I. et al. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells // *Pediatr. Res.* 1996. Vol. 40, № 2. P. 257–262.
168. Britigan B.E. et al. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167, № 5. P. 2921–2928.
169. Ellison R.T., Giehl T.J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme // *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 88, № 4. P. 1080–1091.
170. van der Velden W.J. et al. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) // *BMC Med.* 2009. Vol. 7, № 1. P. 44.
171. Ovchinnikova T.V. et al. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 577, № 1-2. P. 209–214.
172. Andrä J. et al. Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin // *Biochem. J.* 2008. Vol. 410, № 1. P. 113–122.
173. Maltseva A.L. et al. Expression pattern of arenicins, the antimicrobial peptides of polychaete *Arenicola marina* // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00497.
174. Tasiemski A. et al. Hedistin: a novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor* // *Dev. Comp. Immunol.* 2007. Vol. 31, № 8. P. 749–762.
175. Ovchinnikova T.V. et al. Recombinant expression, synthesis, purification, and solution structure of arenicin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 360, № 1. P. 156–162.
176. Stavrakoudis A. et al. Molecular dynamics simulation of antimicrobial peptide arenicin-2: β -hairpin stabilization by noncovalent interactions // *Biopolymers.* 2009. Vol. 92, № 3. P. 143–155.
177. Lee J.-U. et al. Solution structures and biological functions of the antimicrobial peptide, arenicin-1, and its linear derivative // *Biopolymers.* 2007. Vol. 88, № 2. P. 208–216.

178. Ovchinnikova T.V. et al. Molecular insight into mechanism of antimicrobial action of the β -hairpin peptide arenicin: specific oligomerization in detergent micelles // *Biopolymers*. 2008. Vol. 89, № 5. P. 455–464.
179. Shenkarev Z.O. et al. Molecular mechanism of action of β -hairpin antimicrobial peptide arenicin: Oligomeric structure in dodecylphosphocholine micelles and pore formation in planar lipid bilayers // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50, № 28. P. 6255–6265.
180. Andrä J. et al. Significance of the cyclic structure and of arginine residues for the antibacterial activity of arenicin-1 and its interaction with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes // *Biol. Chem.* 2009. Vol. 390, № 4. P. 337–349.
181. Salnikov E.S. et al. Structure and alignment of the membrane-associated antimicrobial peptide arenicin by oriented solid-state NMR spectroscopy // *Biochemistry*. 2011. Vol. 50, № 18. P. 3784–3795.
182. Davis R.W. et al. Antimicrobial peptide interactions with silica bead supported bilayers and *E. coli*: buforin II, magainin II, and arenicin // *J. Pept. Sci.* 2009. Vol. 15, № 8. P. 511–522.
183. Tang M., Hong M. Structure and mechanism of β -hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy // *Mol. Biosyst.* 2009. Vol. 5, № 4. P. 317–322.
184. Usachev K.S. et al. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles: a high-resolution NMR study // *J. Biomol. NMR*. 2015. Vol. 62, № 1. P. 71–79.
185. Choi H., Lee D.G. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria // *Res. Microbiol.* 2012. Vol. 163, № 6-7. P. 479–486.
186. Park C., Lee D.G. Fungicidal effect of antimicrobial peptide arenicin-1 // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2009. Vol. 1788, № 9. P. 1790–1796.
187. Cho J., Lee D.G. The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. Vol. 1810, № 12. P. 1246–1251.
188. Ju-Un Lee. Cell selectivity of arenicin-1 and its derivative with two disulfide bonds // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008. Vol. 29, № 6. P. 1190–1194.
189. Cho J., Lee D.G. The characteristic region of arenicin-1 involved with a bacterial membrane targeting mechanism // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 405, № 3. P. 422–427.
190. Tang M. et al. Effects of guanidinium–phosphate hydrogen bonding on the membrane-bound structure and activity of an arginine-rich membrane peptide from solid-state NMR spectroscopy // *Angew. Chem.* 2008. Vol. 120, № 17. P. 3246–3249.
191. Park C. et al. Membranolytic antifungal activity of arenicin-1 requires the N-terminal tryptophan and the beta-turn arginine // *Biotechnol. Lett.* 2011. Vol. 33, № 1. P. 185–189.
192. Hoegenhaug H.-H. et al. Antimicrobial peptide variants and polynucleotides encoding same: pat. WO/2011/154525 USA. 2011.
193. Stanger, Gellman S. Rules for antiparallel beta-sheet design: D-Pro-Gly is superior to L-Asn-Gly for beta-hairpin nucleation // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120. P. 4236–4237.
194. Kokryakov V.N. et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 327, № 2. P. 231–236.
195. Fahrner R.L. et al. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes // *Chem. Biol.* 1996. Vol. 3, № 7. P. 543–550.
196. Panyutich A. et al. Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted proprotegrins // *Infect. Immun.* 1997. Vol. 65, № 3. P. 978–985.
197. Sanchez J.-F. et al. Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2002. Vol. 10, № 10. P. 1363–1370.
198. Gennaro R., Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides // *Biopolymers*. 2000. Vol. 55, № 1. P. 31–49.

199. Sang Y., Blecha F. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions // *Dev. Comp. Immunol.* 2009. Vol. 33, № 3. P. 334–343.
200. Basañez G., Shinnar A.E., Zimmerberg J. Interaction of hagfish cathelicidin antimicrobial peptides with model lipid membranes // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 532, № 1-2. P. 115–120.
201. Steinberg D.A. et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. Vol. 41, № 8. P. 1738–1742.
202. Ge Y. et al. *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43, № 4. P. 782–788.
203. Fattorini L. et al. *In vitro* activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against *Mycobacterium tuberculosis* // *Peptides.* 2004. Vol. 25, № 7. P. 1075–1077.
204. Miyasaki K.T. et al. Killing of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* by protegrins // *J. Periodontal Res.* 1998. Vol. 33, № 2. P. 91–98.
205. Yasin B. et al. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to protegrins and defensins // *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64, № 3. P. 709–713.
206. Qu X.D. et al. Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae* // *Infect. Immun.* 1997. Vol. 65, № 2. P. 636–639.
207. Fortney K. et al. *Haemophilus ducreyi* is susceptible to protegrin // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. Vol. 42, № 10. P. 2690–2693.
208. Giacometti A. et al. Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin induced mortality in bile duct ligated rats // *Gut.* 2003. Vol. 52, № 6. P. 874–878.
209. Steintraesser L. et al. Protegrin-1 increases bacterial clearance in sepsis but decreases survival // *Crit. Care Med.* 2003. Vol. 31, № 1. P. 221–226.
210. Cheung Q.C.K. et al. Enhanced resistance to bacterial infection in protegrin-1 transgenic mice // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52, № 5. P. 1812–1819.
211. Rothan H.A. et al. Protegrin-1 inhibits dengue NS2B-NS3 serine protease and viral replication in MK2 cells // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. Vol. 2012. P. 1–6.
212. Shamova O.V. et al. Effects of antimicrobial peptides of neutrophils on tumor and normal cells in culture // *Tsitologija.* 2007. Vol. 49, № 12. P. 1000–1010.
213. Koszalka P. et al. Antitumor activity of antimicrobial peptides against U937 histiocytic cell line // *Acta Biochim. Pol.* 2011. Vol. 58, № 1. P. 111–117.
214. Steintraesser L. et al. Genotoxic and cytotoxic activity of host defense peptides against human soft tissue sarcoma in an *in vitro* model // *Drug Chem. Toxicol.* 2012. Vol. 35, № 1. P. 96–103.
215. Sokolov Y. et al. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1420, № 1-2. P. 23–29.
216. Jang H. et al. Interaction of protegrin-1 with lipid bilayers: membrane thinning effect // *Biophys. J.* 2006. Vol. 91, № 8. P. 2848–2859.
217. Mani R. et al. Membrane-bound dimer structure of a β -hairpin antimicrobial peptide from rotational-echo double-resonance solid-state NMR // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45, № 27. P. 8341–8349.
218. Roumestand C. et al. Oligomerization of protegrin-1 in the presence of DPC micelles. A proton high-resolution NMR study // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 421, № 3. P. 263–267.
219. Shi J., Ganz T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids // *Infect. Immun.* 1998. Vol. 66, № 8. P. 3611–3617.
220. Bellm L., Lehrer R.I., Ganz T. Protegrins: new antibiotics of mammalian origin // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2000. Vol. 9, № 8. P. 1731–1742.
221. Florin-Christensen J. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 14. P. 7736–7741.
222. Sychev S.V. et al. Lipid-dependent pore formation by antimicrobial peptides arenicin-2 and melittin demonstrated by their proton transfer activity: proton transfer activity of arenicin-2 and melittin // *J. Pept. Sci.* 2015. Vol. 21, № 2. P. 71–76.

223. Zimmerberg J., Kozlov M.M. How proteins produce cellular membrane curvature // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 9–19.
224. Doherty T., Waring A.J., Hong M. Membrane-bound conformation and topology of the antimicrobial peptide tachyplesin I by solid-state NMR // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45, № 44. P. 13323–13330.
225. Doherty T., Waring A.J., Hong M. Peptide–lipid interactions of the β -hairpin antimicrobial peptide tachyplesin and its linear derivatives from solid-state NMR // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1758, № 9. P. 1285–1291.
226. Mani R. et al. Membrane-disruptive abilities of β -hairpin antimicrobial peptides correlate with conformation and activity: a ^{31}P and ^1H NMR study // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1716, № 1. P. 11–18.
227. Buffy J.J. et al. Immobilization and aggregation of the antimicrobial peptide protegrin-1 in lipid bilayers investigated by solid-state NMR // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42, № 46. P. 13725–13734.
228. Chen J. et al. Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues // *Biopolymers.* 2000. Vol. 55, № 1. P. 88–98.
229. Ostberg N., Kaznessis Y. Protegrin structure–activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity // *Peptides.* 2005. Vol. 26, № 2. P. 197–206.
230. Harwig S.S. et al. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations // *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 240, № 2. P. 352–357.
231. Mohanram H., Bhattacharjya S. Cysteine deleted protegrin-1 (CDP-1): anti-bacterial activity, outer-membrane disruption and selectivity // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1840, № 10. P. 3006–3016.
232. Paredes-Gamero E.J. et al. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1820, № 7. P. 1062–1072.
233. Giles F.J. et al. Isegran HCl: a novel antimicrobial agent // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2002. Vol. 11, № 8. P. 1161–1170.
234. Silva P.I., Daffre S., Bulet P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 43. P. 33464–33470.
235. Lorenzini D.M. et al. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2003. Vol. 33, № 10. P. 1011–1016.
236. Mandard N. et al. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269, № 4. P. 1190–1198.
237. Lai R. et al. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima* // *Peptides.* 2002. Vol. 23, № 3. P. 437–442.
238. Boler J. et al. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969. Vol. 37, № 4. P. 705–710.
239. Carraway R., Leeman S.E. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, № 5. P. 1907–1911.
240. Kumar A., Bachhawat A.K. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite // *Curr Sci.* 2012. Vol. 102, № 2. P. 288.
241. Mandal A.K. et al. Sequencing of T-superfamily conotoxins from *Conus virgo*: pyroglutamic acid identification and disulfide arrangement by MALDI mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007. Vol. 18, № 8. P. 1396–1404.

242. Mischo A. et al. Recombinant production of isotope-labeled peptides and spontaneous cyclization of amino-terminal glutamine into pyroglutamic acid // *ChemBioChem*. 2012. Vol. 13, № 10. P. 1421–1423.
243. Kim K.-H., Seong B.L. Peptide amidation: production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro* // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2001. Vol. 6. P. 244–251.
244. Santos Cabrera M.P. Dos et al. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C-terminus // *J. Pept. Sci.* 2008. Vol. 14, № 6. P. 661–669.
245. Dennison S.R. et al. The effect of C-terminal amidation on the efficacy and selectivity of antimicrobial and anticancer peptides // *Mol. Cell. Biochem.* 2009. Vol. 332, № 1-2. P. 43–50.
246. Schilling S. et al. Glutaminy cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14, № 10. P. 1106–1111.
247. Schlenzig D. et al. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 29. P. 7072–7078.
248. Tomidokoro Y. et al. Pyroglutamate formation at the N-termini of ABri molecules in familial British dementia is not restricted to the central nervous system // *Hiroshima Med. J.* 2010. Vol. 61, № Suppl. P. S262–S269.
249. Hooper L.V. et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 3. P. 269–273.
250. Fogaça A.C. et al. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases // *Peptides*. 2006. Vol. 27, № 4. P. 667–674.
251. Rayaprolu S. et al. Functional analysis of four processing products from multiple precursors encoded by a leucocin-related gene from *Manduca sexta* // *Dev. Comp. Immunol.* 2010. Vol. 34, № 6. P. 638–647.
252. Gassenschmidt U. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. Vol. 1243, № 3. P. 477–481.
253. Tailor R.H. et al. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 39. P. 24480–24487.
254. Huang R.-H. et al. Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 521, № 1-3. P. 87–90.
255. Nguyen G.K.T. et al. Discovery of linear cyclotides in monocot plant *Panicum laxum* of *Poaceae* family provides new insights into evolution and distribution of cyclotides in plants // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 5. P. 3370–3380.
256. Essig A. et al. Copsin, a Novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 50. P. 34953–34964.
257. Fázio M.A. et al. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability // *Biopolymers*. 2006. Vol. 84, № 2. P. 205–218.
258. Fázio M.A. et al. Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices // *Biopolymers*. 2007. Vol. 88, № 3. P. 386–400.
259. Machado A. et al. Synthesis and properties of cyclic gomesin and analogues: backbone-cyclized analogues of gomesin // *J. Pept. Sci.* 2012. Vol. 18, № 9. P. 588–598.
260. Chan L.Y. et al. Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: influences on stability and bioactivity // *ChemBioChem*. 2013. Vol. 14, № 5. P. 617–624.
261. Moreira C.K. et al. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium spp.* // *Exp. Parasitol.* 2007. Vol. 116, № 4. P. 346–353.
262. Barbosa F.M. et al. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. Vol. 274, № 2. P. 279–286.

263. Fogaça A.C. et al. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa* // FEMS Microbiol. Lett. 2010. Vol. 306, № 2. P. 152–159.
264. Moraes L.G.M. et al. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1768, № 1. P. 52–58.
265. Domingues T.M. et al. Interaction of the antimicrobial peptide gomesin with model membranes: a calorimetric study // Langmuir. 2013. Vol. 29, № 27. P. 8609–8618.
266. Rodrigues E.G. et al. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin // Neoplasia. 2008. Vol. 10, № 1. P. 61–68.
267. Paredes-Gamero E.J. et al. Cell-permeable gomesin peptide promotes cell death by intracellular Ca²⁺ overload // Mol. Pharm. 2012. Vol. 9, № 9. P. 2686–2697.
268. Soletti R.C. et al. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species // Chem. Biol. Interact. 2010. Vol. 186, № 2. P. 135–143.
269. Buri M.V. et al. Resistance to degradation and cellular distribution are important features for the antitumor activity of gomesin // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 11. P. e80924.
270. Nakamura T. et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263, № 32. P. 16709–16713.
271. Muta T. et al. Tachyplesins isolated from hemocytes of Southeast Asian horseshoe crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*): identification of a new tachyplesin, tachyplesin III, and a processing intermediate of its precursor // J. Biochem. 1990. Vol. 108, № 2. P. 261–266.
272. Miyata T. et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity // J. Biochem. 1989. Vol. 106, № 4. P. 663–668.
273. Shigenaga T. et al. Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components // J. Biochem. 1993. Vol. 114, № 3. P. 307–316.
274. Shigenaga T. et al. Antimicrobial tachyplesin peptide precursor. cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265, № 34. P. 21350–21354.
275. Laederach A., Andreotti A.H., Fulton D.B. Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives // Biochemistry. 2002. Vol. 41, № 41. P. 12359–12368.
276. Powers J.-P.S., Rozek A., Hancock R.E.W. Structure–activity relationships for the β -hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1698, № 2. P. 239–250.
277. Matsuzaki K. et al. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog // Biochemistry. 1997. Vol. 36, № 32. P. 9799–9806.
278. Matsuzaki K. et al. Role of disulfide linkages in tachyplesin-lipid interactions // Biochemistry. 1993. Vol. 32, № 43. P. 11704–11710.
279. Rao A.G. Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds // Arch. Biochem. Biophys. 1999. Vol. 361, № 1. P. 127–134.
280. Frecer V., Ho B., Ding J.L. *De novo* design of potent antimicrobial peptides // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. Vol. 48, № 9. P. 3349–3357.
281. Dong N. et al. Strand length-dependent antimicrobial activity and membrane-active mechanism of arginine- and valine-rich β -hairpin-like antimicrobial peptides // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. Vol. 56, № 6. P. 2994–3003.
282. Xu L. et al. Antimicrobial activity and membrane-active mechanism of tryptophan zipper-like β -hairpin antimicrobial peptides // Amino Acids. 2015. Vol. 47, № 11. P. 2385–2397.
283. Cline L.L., Waters M.L. The structure of well-folded beta-hairpin peptides promotes resistance to peptidase degradation // Biopolymers. 2009. Vol. 92, № 6. P. 502–507.

284. Park J.H., Waters M.L. Positional effects of click cyclization on β -hairpin structure, stability, and function // *Org Biomol Chem*. 2013. Vol. 11, № 1. P. 69–77.
285. Muhle S.A., Tam J.P. Design of Gram-negative selective antimicrobial peptides // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40, № 19. P. 5777–5785.
286. Ohta M. et al. Mechanisms of antibacterial action of tachyplesins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1992. Vol. 36, № 7. P. 1460–1465.
287. Katsu T., Nakao S., Iwanaga S. Mode of action of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, on biomembranes // *Biol. Pharm. Bull*. 1993. Vol. 16, № 2. P. 178–181.
288. Yonezawa A. et al. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31, № 11. P. 2998–3004.
289. Powers J.-P.S. et al. The Antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006. Vol. 50, № 4. P. 1522–1524.
290. Zhang L. et al. Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39, № 47. P. 14504–14514.
291. Doherty T., Waring A.J., Hong M. Dynamic structure of disulfide-removed linear analogs of tachyplesin I in the lipid bilayer from solid-state NMR // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47, № 4. P. 1105–1116.
292. Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. Vol. 1462, № 1-2. P. 157–183.
293. Powers J.-P.S. et al. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44, № 47. P. 15504–15513.
294. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. Peptide antimicrobial agents // *Clin. Microbiol. Rev*. 2006. Vol. 19, № 3. P. 491–511.
295. Hong J. et al. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry // *Microbiol. Res*. 2015. Vol. 170. P. 69–77.
296. Hong J. et al. Tachyplesin I induce drug resistance in bacteria *in vitro* // *J. Anim. Vet. Adv*. 2012. Vol. 11, № 7. P. 939–945.
297. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic beta-sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1562, № 1-2. P. 32–36.
298. Kushibiki T. et al. Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1844, № 3. P. 527–534.
299. Cirioni O. et al. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007. Vol. 51, № 6. P. 2005–2010.
300. Cirioni O. et al. Efficacy of the combination of tachyplesin III and clarithromycin in rat models of *Escherichia coli* sepsis // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008. Vol. 52, № 12. P. 4351–4355.
301. Kobayashi S., Hirakura Y., Matsuzaki K. Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides alpha-helical magainin 2 and cyclic beta-sheet tachyplesin I: toward cocktail therapy // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40, № 48. P. 14330–14335.
302. Simonetti O. et al. *In vitro* activity of Tachyplesin III alone and in combination with terbinafine against clinical isolates of dermatophytes // *Peptides*. 2009. Vol. 30, № 10. P. 1794–1797.
303. Löfgren S.E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals // *Exp. Parasitol*. 2008. Vol. 118, № 2. P. 197–202.

304. Ozaki A., Ariki S., Kawabata S. An antimicrobial peptide tachyplesin acts as a secondary secretagogue and amplifies lipopolysaccharide-induced hemocyte exocytosis: an antimicrobial peptide as a secretagogue // *FEBS J.* 2005. Vol. 272, № 15. P. 3863–3871.
305. Chen J. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, № 11. P. 4614–4622.
306. Adamia S., Maxwell C.A., Pilarski L.M. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer // *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 2005. Vol. 5, № 1. P. 3–14.
307. Chen Y. et al. RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth // *Cancer Res.* 2001. Vol. 61, № 6. P. 2434–2438.
308. Shi S.-L. et al. Effects of tachyplesin and n-sodium butyrate on proliferation and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 // *World J. Gastroenterol. WJG.* 2006. Vol. 12, № 11. P. 1694–1698.
309. Jain A., Yadav B.K., Chugh A. Marine antimicrobial peptide tachyplesin as an efficient nanocarrier for macromolecule delivery in plant and mammalian cells // *FEBS J.* 2015. Vol. 282, № 4. P. 732–745.
310. Tamamura H. et al. Downsizing of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), with the maintenance of anti-HIV activity and solution structure // *Bioorg. Med. Chem.* 1998. Vol. 6, № 4. P. 473–479.
311. Masuda M. et al. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr^{5,12},Lys⁷]-polyphemusin II) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. Vol. 189, № 2. P. 845–850.
312. Tamamura H. et al. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1163, № 2. P. 209–216.
313. Nakashima H. et al. Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-^{5,12}, Lys-⁷]polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992. Vol. 36, № 6. P. 1249–1255.
314. Tamamura H. et al. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr⁵, 12, Lys⁷]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1298, № 1. P. 37–44.
315. Murakami T. et al. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection // *J. Exp. Med.* 1997. Vol. 186, № 8. P. 1389–1393.
316. Ehret-Sabatier L. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 47. P. 29537–29544.
317. Cociancich S. et al. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 194, № 1. P. 17–22.
318. Mandard N. et al. Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1999. Vol. 17, № 2. P. 367–380.
319. Hetru C. et al. Androctonin, a hydrophilic disulphide-bridged non-haemolytic anti-microbial peptide: a plausible mode of action // *Biochem. J.* 2000. Vol. 345 Pt 3. P. 653–664.
320. Bulet P., Stöcklin R., Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 198. P. 169–184.
321. Ramilo C.A. et al. Novel alpha- and omega-conotoxins from *Conus striatus* venom // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31, № 41. P. 9919–9926.
322. McIntosh J.M. et al. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin ImI // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 24. P. 16733–16739.
323. Lehrer R.I. Primate defensins // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 2, № 9. P. 727–738.
324. Tang Y.Q. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins // *Science.* 1999. Vol. 286, № 5439. P. 498–502.

325. Leonova L. et al. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity // *J. Leukoc. Biol.* 2001. Vol. 70, № 3. P. 461–464.
326. Garcia A.E. et al. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes // *Infect. Immun.* 2008. Vol. 76, № 12. P. 5883–5891.
327. Stegemann C. et al. *De novo* sequencing of two new cyclic θ -defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. Vol. 24, № 5. P. 599–604.
328. Craik D.J. et al. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 294, № 5. P. 1327–1336.
329. Tan N.-H., Zhou J. Plant Cyclopeptides // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106, № 3. P. 840–895.
330. Lehrer R.I., Cole A.M., Selsted M.E. Theta-Defensins: cyclic peptides with endless potential // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 32. P. 27014–27019.
331. Trabi M., Schirra H.J., Craik D.J. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40, № 14. P. 4211–4221.
332. Nguyen T.X., Cole A.M., Lehrer R.I. Evolution of primate θ -defensins: a serpentine path to a sweet tooth // *Peptides.* 2003. Vol. 24, № 11. P. 1647–1654.
333. Venkataraman N. et al. Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1 // *PLoS Biol.* / ed. Emerman M. 2009. Vol. 7, № 4. P. e95.
334. Li D. et al. Evolution of primate α - and θ -defensins revealed by analysis of genomes // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Vol. 41, № 6. P. 3859–3866.
335. Cole A.M. et al. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 4. P. 1813–1818.
336. Conibear A.C. et al. Structural characterization of the cyclic cystine ladder motif of θ -defensins // *Biochemistry.* 2012. Vol. 51, № 48. P. 9718–9726.
337. Conibear A.C. et al. The Cyclic cystine ladder in θ -defensins is important for structure and stability, but not antibacterial activity // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 15. P. 10830–10840.
338. Tran D. et al. Homodimeric θ -defensins from *Rhesus macaque* leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 5. P. 3079–3084.
339. Tran D. et al. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of *Rhesus macaque* theta-defensins // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52, № 3. P. 944–953.
340. Daly N.L. et al. Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV θ -defensin // *Biochemistry.* 2007. Vol. 46, № 35. P. 9920–9928.
341. Buffy J.J. et al. Solid-state NMR investigation of the selective perturbation of lipid bilayers by the cyclic antimicrobial peptide RTD-1 // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43, № 30. P. 9800–9812.
342. Schaal J.B. et al. *Rhesus macaque* theta-defensins suppress inflammatory cytokines and enhance survival in mouse models of bacteremic sepsis // *PLoS ONE* / ed. Zimmer J. 2012. Vol. 7, № 12. P. e51337.
343. Wang W. et al. Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of *Bacillus anthracis* and inactivate anthrax lethal toxin // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 43. P. 32755–32764.
344. Hooven T.A. et al. Retrocyclin inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilm formation and toxin activity // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. Vol. 67, № 12. P. 2870–2872.
345. Arnett E. et al. Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*: defensins inhibit *Listeria* multiplication in macrophages // *Cell. Microbiol.* 2011. Vol. 13, № 4. P. 635–651.
346. Kudryashova E. et al. Retrocyclins neutralize bacterial toxins by potentiating their unfolding // *Biochem. J.* 2015. Vol. 467, № 2. P. 311–320.
347. Rothan H.A. et al. Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1 // *BMC Infect. Dis.* 2012. Vol. 12, № 1. P. 314.
348. Wang W. et al. Retrocyclin, an antiretroviral defensin, is a lectin // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170, № 9. P. 4708–4716.

349. Münk C. et al. The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2003. Vol. 19, № 10. P. 875–881.
350. Doss M. et al. Interactions of α -, β -, and θ -defensins with influenza a virus and surfactant protein D // *J. Immunol*. 2009. Vol. 182, № 12. P. 7878–7887.
351. Yasin B. et al. Defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry // *J. Virol*. 2004. Vol. 78, № 10. P. 5147–5156.
352. Yang C. et al. θ -Defensin pseudogenes in HIV-1-exposed, persistently seronegative female sex-workers from Thailand // *Infect. Genet. Evol.* 2005. Vol. 5, № 1. P. 11–15.
353. Owen S.M. et al. A theta-defensin composed exclusively of D-amino acids is active against HIV-1 // *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* 2004. Vol. 63, № 6. P. 469–476.
354. Lamers R.P. et al. Characterization of the retrocyclin analogue RC-101 as a preventative of *Staphylococcus aureus* nasal colonization // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. Vol. 55, № 11. P. 5338–5346.
355. Lee S.-B. et al. Expression and characterization of antimicrobial peptides retrocyclin-101 and protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections: plant-made antimicrobial peptides // *Plant Biotechnol. J.* 2011. Vol. 9, № 1. P. 100–115.
356. Gong D. et al. Gallin: an antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication // *BMC Immunol.* 2010. Vol. 11. P. 12.
357. Stegemann C. et al. Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first beta-defensin from leukocytes of reptiles // *Proteomics*. 2009. Vol. 9, № 5. P. 1364–1373.
358. Chattopadhyay S. et al. Small cationic protein from a marine turtle has β -defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2006. Vol. 64, № 2. P. 524–531.
359. Odani S. et al. Covalent structure of a low-molecular-mass protein, meleagrin, present in a turkey (*Meleagris gallopavo*) ovomucoid preparation // *J. Biochem.* 1989. Vol. 105, № 4. P. 660–663.
360. Simpson R.J., Morgan F.J. Isolation and complete amino acid sequence of a basic low molecular weight protein from black swan egg white // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1983. Vol. 22, № 4. P. 476–481.
361. Naknukool S. et al. Structural and physicochemical characteristics of novel basic proteins isolated from duck egg white // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. Vol. 72, № 8. P. 2082–2091.
362. Hunter H.N. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 40. P. 37597–37603.
363. Krause A. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 480, № 2-3. P. 147–150.
364. Park C.H. et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 11. P. 7806–7810.
365. Shike H. et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269, № 8. P. 2232–2237.
366. Maule W.J. Hepcidin. A Brief review // *Medical Technology SA*. 2013. Vol. 27, № 1. P. 9–16.
367. Farnaud S. et al. Identification of an iron-hepcidin complex // *Biochem. J.* 2008. Vol. 413, № 3. P. 553–557.
368. Kemna E.H.J.M. et al. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications // *Clin. Chem.* 2007. Vol. 53, № 4. P. 620–628.
369. Douglas S.E. et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish // *Dev. Comp. Immunol.* 2003. Vol. 27, № 6-7. P. 589–601.
370. Hilton K.B., Lambert L.A. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates // *Gene*. 2008. Vol. 415, № 1-2. P. 40–48.
371. Qu H. et al. Molecular cloning, recombinant expression, and antimicrobial activity of EC-hepcidin-3, a new four-cysteine hepcidin isoform from *Epinephelus coioides* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. Vol. 77, № 1. P. 103–110.

372. Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation // *Blood*. 2003. Vol. 102, № 3. P. 783–788.
373. Nicolas G. et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 15. P. 8780–8785.
374. Ganz T., Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism // *Annu. Rev. Med.* 2011. Vol. 62, № 1. P. 347–360.
375. Lou D.-Q. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice // *Blood*. 2004. Vol. 103, № 7. P. 2816–2821.
376. Nemeth E. et al. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study // *Blood*. 2006. Vol. 107, № 1. P. 328–333.
377. De Domenico I. et al. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved // *Cell Metab.* 2008. Vol. 8, № 2. P. 146–156.
378. Shi J., Camus A.C. Heparins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? // *Dev. Comp. Immunol.* 2006. Vol. 30, № 9. P. 746–755.
379. Lauth X. et al. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and *in vivo* hepatic response to bacterial infections // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 10. P. 9272–9282.
380. Rouault T.A. Microbiology. Pathogenic bacteria prefer heme // *Science*. 2004. Vol. 305, № 5690. P. 1577–1578.
381. Maisetta G. et al. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH // *Peptides*. 2010. Vol. 31, № 11. P. 1995–2002.
382. Tavanti A. et al. Fungicidal activity of the human peptide hepcidin 20 alone or in combination with other antifungals against *Candida glabrata* isolates // *Peptides*. 2011. Vol. 32, № 12. P. 2484–2487.
383. Chen J.-Y., Lin W.-J., Lin T.-L. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells // *Peptides*. 2009. Vol. 30, № 9. P. 1636–1642.
384. Hocquellet A., le Senechal C., Garbay B. Importance of the disulfide bridges in the antibacterial activity of human hepcidin // *Peptides*. 2012. Vol. 36, № 2. P. 303–307.
385. Sow F.B. et al. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis // *J. Leukoc. Biol.* 2007. Vol. 82, № 4. P. 934–945.
386. Hocquellet A. et al. Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2 // *Peptides*. 2010. Vol. 31, № 1. P. 58–66.
387. Melino S. et al. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5 // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, № 51. P. 15373–15383.
388. Maisetta G. et al. pH-dependent disruption of *Escherichia coli* ATCC 25922 and model membranes by the human antimicrobial peptides hepcidin 20 and 25 // *FEBS J.* 2013. Vol. 280, № 12. P. 2842–2854.
389. Del Gaudio G. et al. Antifungal activity of the noncytotoxic human peptide hepcidin 20 against fluconazole-resistant *Candida glabrata* in human vaginal fluid // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 9. P. 4314–4321.
390. Brancatisano F.L. et al. Inhibitory effect of the human liver-derived antimicrobial peptide hepcidin 20 on biofilms of polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-positive and PIA-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* // *Biofouling*. 2014. Vol. 30, № 4. P. 435–446.
391. Nilsson K.P.R. et al. Solution structure of χ -conopeptide MrIA, a modulator of the human norepinephrine transporter // *Biopolymers*. 2005. Vol. 80, № 6. P. 815–823.
392. Carstens B.B. et al. Isolation, characterization, and synthesis of the barrettides: disulfide-containing peptides from the marine sponge *Geodia barretti* // *J. Nat. Prod.* 2015. Vol. 78, № 8. P. 1886–1893.
393. Yamin G., Ruchala P., Teplow D.B. A peptide hairpin inhibitor of amyloid beta-protein oligomerization and fibrillogenesis // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 48. P. 11329–11331.

394. Savage P.B. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gram-negative bacteria // *Ann. Med.* 2001. Vol. 33, № 3. P. 167–171.
395. Cassone M., Otvos Jr L. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010. Vol. 8, № 6. P. 703–716.
396. Fan F., Wu Y., Liu J. Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and protegrin-1 in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* 2010. Vol. 73, № 2. P. 147–151.
397. Wang X.J. et al. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner // *Lett. Appl. Microbiol.* 2014. Vol. 59, № 1. P. 71–78.
398. Patiño-Rodríguez O. et al. Transient expression and characterization of the antimicrobial peptide protegrin-1 in *Nicotiana tabacum* for control of bacterial and fungal mammalian pathogens // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013. Vol. 115, № 1. P. 99–106.
399. Gould A. et al. Recombinant production of rhesus θ -defensin-1 (RTD-1) using a bacterial expression system // *Mol. Biosyst.* 2012. Vol. 8, № 4. P. 1359–1365.
400. Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2012. Vol. 32, № 2. P. 143–171.
401. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
402. Schägger H. Tricine–SDS–PAGE // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 16–22.
403. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures // *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.
404. Sanchez-Gomez S. et al. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides // *BMC Microbiol.* 2008. Vol. 8, № 1. doi: 10.1186/1471-2180-8-196.
405. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3, № 2. P. 163–175.
406. Ovchinnikova T.V. et al. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 348, № 2. P. 514–523.
407. Shamova O.V. et al. Acipensins - novel antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* // *Acta Naturae.* 2014. Vol. 6, № 4. P. 99–109.
408. Shenkarev Z.O. et al. Recombinant expression and solution structure of antimicrobial peptide aurelin from jellyfish *Aurelia aurita* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. Vol. 429, № 1-2. P. 63–69.
409. Chi V. et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases // *Toxicon.* 2012. Vol. 59, № 4. P. 529–546.
410. Kim H.S. et al. cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 229, № 2. P. 381–387.
411. Chen Y. et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12316–12329.
412. Son M. et al. Disruption of interactions between hydrophobic residues on nonpolar faces is a key determinant in decreasing hemolysis and increasing antimicrobial activities of α -helical amphipathic peptides // *ChemMedChem.* 2013. Vol. 8, № 10. P. 1638–1642.
413. Asthana N., Yadav S.P., Ghosh J.K. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 53. P. 55042–55050.
414. Malina A., Shai Y. Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide // *Biochem. J.* 2005. Vol. 390, № 3. P. 695–702.

415. Gottler L.M. et al. Using fluorous amino acids to probe the effects of changing hydrophobicity on the physical and biological properties of the β -hairpin antimicrobial peptide protegrin-1 // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47, № 35. P. 9243–9250.
416. Ling M.M., Robinson B.H. Approaches to DNA mutagenesis: an overview // *Anal. Biochem.* 1997. Vol. 254, № 2. P. 157–178.
417. Eisenberg D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. Vol. 53. P. 595–623.
418. Su Y., Li S., Hong M. Cationic membrane peptides: atomic-level insight of structure–activity relationships from solid-state NMR // *Amino Acids*. 2013. Vol. 44, № 3. P. 821–833.
419. Grieco P. et al. Alanine scanning analysis and structure–function relationships of the frog-skin antimicrobial peptide temporin-1Ta // *J. Pept. Sci.* 2011. Vol. 17, № 5. P. 358–365.
420. Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* // *Microbiol. Rev.* 1996. Vol. 60, № 3. P. 512–538.
421. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review // *Protein Expr. Purif.* 2011. Vol. 80, № 2. P. 260–267.
422. Andreev Y.A. et al. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions // *Anal. Biochem.* 2010. Vol. 407, № 1. P. 144–146.
423. Fernandes H.P., Cesar C.L., Barjas-Castro M. de L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation // *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* 2011. Vol. 33, № 4. P. 297–301.
424. He J., Krauson A.J., Wimley W.C. Toward the *de novo* design of antimicrobial peptides: lack of correlation between peptide permeabilization of lipid vesicles and antimicrobial, cytolytic, or cytotoxic activity in living cells: toward the *de novo* design of antimicrobial peptides // *Biopolymers*. 2014. Vol. 102, № 1. P. 1–6.
425. Takahashi D. et al. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity // *Biochimie*. 2010. Vol. 92, № 9. P. 1236–1241.
426. Santiveri C.M., Jiménez M.A. Tryptophan residues: scarce in proteins but strong stabilizers of β -hairpin peptides // *Biopolymers*. 2010. Vol. 94, № 6. P. 779–790.
427. Yau W.M. et al. The preference of tryptophan for membrane interfaces // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37, № 42. P. 14713–14718.
428. Sayyed-Ahmad A., Khandelia H., Kaznessis Y.N. Relative free energy of binding between antimicrobial peptides and SDS or DPC micelles // *Mol. Simul.* 2009. Vol. 35, № 10-11. P. 986–997.
429. Xu D., Zhang Y. Ab Initio structure prediction for *Escherichia coli*: towards genome-wide protein structure modeling and fold assignment // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. doi: 10.1038/srep01895.
430. Zelezetsky I., Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1758, № 9. P. 1436–1449.
431. Deslouches B. et al. *De novo* generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 1. P. 316–322.
432. Liu Z. et al. Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51, № 2. P. 597–603.
433. Gopal R. et al. Effect of repetitive lysine–tryptophan motifs on the bactericidal activity of antimicrobial peptides // *Amino Acids*. 2013. Vol. 44, № 2. P. 645–660.
434. Mosca D.A. et al. IB-367, a protegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44, № 7. P. 1803–1808.
435. Navarro Llorens J.M., Tormo A., Martínez-García E. Stationary phase in gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 34, № 4. P. 476–495.
436. Roth B.L. et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol. 63, № 6. P. 2421–2431.

437. Gaynes R., Edwards J.R. National nosocomial infections surveillance system. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli // *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2005. Vol. 41, № 6. P. 848–854.
438. Anaya-López J.L., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides // *Crit. Rev. Microbiol.* 2013. Vol. 39, № 2. P. 180–195.
439. Piddock L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. Vol. 4, № 8. P. 629–636.
440. Padilla E. et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 1. P. 177–183.
441. Oishi O. et al. Conformations and orientations of aromatic amino acid residues of tachyplesin I in phospholipid membranes // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, № 14. P. 4352–4359.
442. Wu G.-Q. et al. High-level expression and novel purification strategy of recombinant thanatin analog in *Escherichia coli* // *Curr. Microbiol.* 2008. Vol. 57, № 2. P. 95–101.
443. Feng X. et al. Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* 2006. Vol. 47, № 1. P. 110–117.
444. Pierce J.C. et al. Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus* // *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997. Vol. 6, № 3. P. 248–259.
445. Zhang H. et al. Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41, № 2. P. 409–416.
446. Imura Y. et al. Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1768, № 5. P. 1160–1169.
447. López-Otín C., Matrisian L.M. Emerging roles of proteases in tumour suppression // *Nat. Rev. Cancer.* 2007. Vol. 7, № 10. P. 800–808.
448. Berthold N. et al. Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by gram-negative pathogens // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 1. P. 402–409.
449. Parachin N.S. et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides // *Peptides.* 2012. Vol. 38, № 2. P. 446–456.
450. Rieger A.M., Barreda D.R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. Vol. 35, № 12. P. 1238–1245.
451. Birkemo G.A. et al. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. Vol. 1646, № 1-2. P. 207–215.
452. Park I.Y. et al. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus* // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 437, № 3. P. 258–262.
453. Li W.-F., Ma G.-X., Zhou X.-X. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure–function relationships and mode of action // *Peptides.* 2006. Vol. 27, № 9. P. 2350–2359.
454. Schibli D.J., Hwang P.M., Vogel H.J. Structure of the antimicrobial peptide tritrypticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38, № 51. P. 16749–16755.
455. Shamova O. et al. ChBac3.4: a novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2009. Vol. 15, № 1. P. 31–42.
456. Taguchi S. et al. *In vivo* monitoring system for structure-function relationship analysis of the antibacterial peptide apidaecin // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. Vol. 60, № 10. P. 3566–3572.
457. Arias M. et al. Hydroxy-tryptophan containing derivatives of tritrypticin: modification of antimicrobial activity and membrane interactions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1848, № 1. P. 277–288.
458. Nagaoka I. et al. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins // *Inflamm. Res.* 2000. Vol. 49, № 2. P. 73–79.
459. Otvos L. Antibacterial peptides isolated from insects // *J. Pept. Sci.* 2000. Vol. 6, № 10. P. 497–511.

460. Singh P.K. et al. Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000. Vol. 279, № 5. P. 799–805.
461. Yan H., Hancock R.E.W. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45, № 5. P. 1558–1560.
462. Luders T. et al. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69, № 3. P. 1797–1799.