



УДК 577.112:577.181

## АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ. ЧАСТЬ 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

© 2016 г. С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова<sup>#</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.12.2015 г. Принята к печати 09.03.2016 г.

Антимикробные пептиды (АМП) беспозвоночных животных характеризуются широкой вариативностью механизмов действия, включающих не только нарушение барьерной функции мембраны клетки-мишени, но и специфическое ингибирование процессов метаболизма за счет лиганд-рецепторных взаимодействий с молекулами на поверхности или внутри клетки. Эндогенные АМП могут играть роль медиаторов иммунной системы (иммуномодуляторов), активируя фагоцитоз и хемотаксис, стимулируя выработку цитокинов. Часть 2 обзора посвящена биологическим функциям и механизмам действия АМП беспозвоночных животных. Рассмотрен вопрос биологической значимости антимикробных свойств, наблюдаемых в условиях *in vitro*. Описаны основные механизмы мембранотропного действия АМП (модели цилиндрического канала и тороидальной поры, механизм “ковра”) и проанализированы причины селективности взаимодействия с микробной мембраной. Представлены сведения об альтернативных механизмах антимикробного действия, таких как нарушение транскрипции и трансляции, секвестирование ионов металлов, нарушение биосинтеза клеточной стенки бактерий и грибов. Описан ряд примеров, демонстрирующих регуляторную активность АМП беспозвоночных.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, пептидные антибиотики, ионные каналы, иммуномодуляторы.

DOI: 10.7868/S0132342316040047

### ВВЕДЕНИЕ

АМП беспозвоночных характеризуются огромным разнообразием типов структур, рассмотрению которых была посвящена первая часть обзора [1]. Множество известных сегодня АМП подразделяют на четыре класса: 1) цистеин-содержащие, образующие внутримолекулярные дисульфидные связи; 2) линейные  $\alpha$ -спиральные; 3) линейные, обогащенные остатками определенных аминокислот; 4) АМП смешанного типа, содержащие домены с различной структурой. Следствием значительного структурного разнообразия этих молекул является вариативность механизмов их антимикробного действия [2–4]. Пептиды, выделенные из разных групп живых организмов, но имеющие сходную структуру, объединены общими принципами функционирования, поэтому многие модели и закономерности, которые описаны на примере пептидов

беспозвоночных, в равной степени справедливы для пептидов позвоночных животных, растений и грибов.

Согласно распространенной точке зрения, большинство АМП обладают мембранотропными свойствами и вызывают гибель клеток-мишеней, нарушая целостность цитоплазматической мембраны с помощью низкоселективных механизмов, основанных на ахиральных электростатических и гидрофобных взаимодействиях с липидным бислоем. Кажется, на первый взгляд, что в этом АМП проигрывают классическим антибиотикам, которые стереоспецифично связываются с чужеродными патоген-ассоциированными белками. Однако в этом видится и одно из главных достоинств АМП, которое выводит их на первый план при рассмотрении потенциальных структур для разработки новых антимикробных лекарственных средств. Благодаря универсальной природе взаимодействий с мембранами, многие АМП обладают широким спектром действия и повышенной устойчивостью к адаптации со стороны микроорганизмов [5].

Часть 1 см. [1].

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; МГК – минимальная гемолитическая концентрация; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ЛПС – липополисахарид; РАМР – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: +7 (495) 336-44-44; факс: +7 (495) 336-43-33; e-mail: ovch@ibch.ru).

С годами накапливались факты, свидетельствующие о том, что представление о природе антимикробного действия ряда АМП нуждается в уточнении [6]. Прежде всего, стоит отметить, что некоторые АМП полностью лишены способности нарушать проницаемость мембраны [7, 8]. Кроме того, антимикробная активность ряда АМП демонстрирует зависимость от хиральных свойств молекулы. Так, например, в противоположность аналогам андроктоина (№ 1<sup>#</sup>) [9], цекропина А (№ 40), мелиттина (№ 31) и гибрида цекропин-мелиттин [10], химически синтезированным из *D*-изомеров  $\alpha$ -аминокислот, *D*-энантиомеры пролин-богатых АМП семейства апидецина (№ 49) утрачивают активность, свойственную природным пептидам, построенным из *L*-аминокислот [11]. Результатом энантиомеризации структуры АМП, помимо сохранения или полной потери антимикробной активности, может быть дифференцированное изменение ее спектра, показанное на примере танапина (№ 16) и свидетельствующее о множественности механизмов действия этого пептида [12].

Таким образом, представление о ведущей роли низкоспецифичных мембранотропных эффектов в реализации антимикробной функции справедливо лишь для некоторой части АМП. Остальные осуществляют свою функцию с помощью альтернативных механизмов, а также путем их комбинирования. Если существование белковых мембранных рецепторов или внутриклеточных мишеней для АМП до сих пор представляется скорее исключением, чем правилом [13, 14], то способность к высокоаффинному связыванию с консервативными липидными и полисахаридными структурами на поверхности микроорганизмов была установлена уже для сравнительно большого числа пептидов [8, 15, 16]. Роль хиральных свойств молекулы не всегда поддается однозначной оценке: природный *L*-цекропин В (№ 40) эффективнее связывается с ЛПС, чем его химически синтезированный *D*-энантиомер, однако обе изоформы обладают приблизительно одинаковой способностью подавлять рост микроорганизмов [17].

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМП С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

Независимо от того, приводит взаимодействие пептида с мембраной к нарушению ее целостности или только к транслокации молекулы АМП в цитоплазму микроорганизма, этот процесс можно представить в виде трех обратимых стадий [6, 18]: 1) адсорбция на поверхности; 2) внедрение в поверхностный слой мембраны, состоящий из полярных головок липидов; 3) погружение во внутренний

(гидрофобный) слой мембраны. Исключение составляют те немногие известные случаи, когда для транслокации через мембрану требуются специфические белки-переносчики [19]. Для пептидов, действующих подобно детергентам (см. ниже), описанный путь ограничивается вторым этапом. Контакт с мембраной предшествует процессу диффузии через слой полисахаридов на поверхности микроорганизма – способность преодолевать это препятствие в большой степени влияет на эффективность вещества как антимикробного агента [20–23].

**Адсорбция.** Первоначальное связывание катионного пептида с мембраной происходит за счет электростатических взаимодействий. Эффективность связывания АМП с мембраной зависит от плотности ее поверхностного заряда, а также от трансмембранной разности потенциалов. Благодаря работе ионных насосов живая клетка изнутри заряжена отрицательно по отношению к окружающей среде. Создание трансмембранной разности потенциалов ( $\Delta\psi$ ) величиной минус 20 мВ увеличивает константу связывания тахиплезина (№ 17) (заряд молекулы +7) в 200 раз при физиологической температуре [5]. При связывании с мембраной происходит конкурентное замещение пептидом стабилизирующих ее ионов кальция. Важной характеристикой АМП является их способность функционировать в растворах с высокой ионной силой, ослабляющей электростатические взаимодействия. Известно, например, что антибактериальные дефенсины (№ 8а) [24] и цекропины (№ 40) [25] теряют свою активность в солевых растворах, в то время как гелиомицин (№ 8б) [26], клаванины (№ 25) [25], клаваспирин (№ 25) [27] и стиелины (№ 37) [28] частично сохраняют ее, а карцинины (№ 73) становится даже более активным [29].

**Внедрение пептида в поверхностный слой мембраны.** Связавшаяся с мембраной молекула располагается параллельно ее поверхности. Гидрофобная часть пептида раздвигает полярные головки липидов и погружается в слой, образованный остатками жирных кислот. Гидрофильная поверхность молекулы обращается наружу, продолжая контактировать с анионными группами компонентов мембраны.

Спиральная структура цекропинов насекомых (№ 40), мелиттина (№ 31) и некоторых других линейных пептидов содержит в средней части резкий изгиб (излом), обусловленный наличием в этом месте цепи остатка пролина и(или) глицина [30]. По разные стороны от изгиба лежат амфифильный и гидрофобный домены молекулы. Пролин-глициновый шарнир обеспечивает такое взаимное расположение участков цепи, при котором амфифильный домен ориентируется параллельно поверхности мембраны, а гидрофобный оказывается погруженным в слой углеводородных радикалов жирных кислот [30]. Тем не менее, изгиб цепи, обу-

<sup>#</sup>Здесь и далее по тексту при упоминании названий АМП даются номера соответствующих записей в таблице из первой части обзора [1].

словленный остатком пролина, имеется не у всех цекропин-подобных пептидов; биологически активная конформация многих из них представляет собой единую, протяженную  $\alpha$ -спираль. Введение остатка пролина в последовательность цекропина P1 (№ 41) непосредственно в том же положении, где он встречается у гомологичных ему цекропинов насекомых, не увеличивает, а напротив, уменьшает биологическую активность пептида [31].

Внедрение пептида между полярными липидными головками вносит в структуру мембраны деформацию изгиба и в целом снижает ее термодинамическую стабильность. Это создает предпосылки для локального истончения мембраны (наблюдающегося, в частности, в экспериментах с мелиттином [32]) и нарушения ее целостности, а также для дальнейшей интеграции пептида в гидрофобный слой [33].

Еще одним ключевым событием, происходящим на данном этапе, является изменение конформации пептида, результатом которого становится более выраженное пространственное разделение гидрофобного и гидрофильного участков молекулы. Многие линейные АМП, например цекропины (№ 40), в водном растворе не имеют упорядоченной структуры и приобретают конформацию амфифильной  $\alpha$ -спирали лишь после контакта с липидами [34]. Пептиды, стабилизированные дисульфидными связями, обычно отличаются жесткой структурой, которая почти не изменяется при переходе из одной среды в другую. Наблюдаемое усиление амфифильных свойств таких пептидов при их взаимодействии с фосфолипидной мембраной обеспечивается подвижностью боковых групп аминокислотных остатков. Это было показано, в частности, на примере тахиплезина (№ 17), пространственная структура которого, представляющая собой  $\beta$ -шпильку, фиксируется двумя дисульфидными связями [35]. Отсутствие дисульфидных связей (в результате восстановления или замены остатков цистеинов) может быть причиной полной или частичной потери активности АМП [36–38]. В последнем случае может повышаться селективность действия в отношении микробных мембран (как, например, у гомезина (№ 7) [39, 40] и тахиплезина (№ 17) [41]).

**Погружение пептида в гидрофобный слой мембраны.** По достижении порогового молярного соотношения АМП и липида, пептид начинает проникать в слой, образованный ацильными хвостами мембранных фосфолипидов [33]. При этом ориентация молекул пептида относительно плоскости мембраны меняется с параллельной на перпендикулярную. Пороговая концентрация, отражающая способность АМП проникать в толщу липидного бислоя, зависит как от его собственных физико-химических свойств (гидрофобности, заряда), так и от свойств мембраны (заряда,

кривизны поверхности, величины  $\Delta\psi$ ) [33]. Ключевую роль в этом процессе, по-видимому, играет предшествующая дестабилизация мембраны, вызванная накоплением АМП в ее поверхностном слое. Показано, что в ряде случаев сконцентрированные пептиды формируют агрегаты (димеры и более сложные олигомеры), в которых гидрофильное ядро экранировано гидрофобными поверхностями, обращенными наружу комплекса. Агрегация позволяет амфифильным молекулам еще глубже внедряться в гидрофобный слой мембраны. Олигомерные комплексы способны выполнять функции, зачастую не доступные мономерам пептида, в частности, формировать трансмембранные поры [42, 43]. Гипотеза о том, что молекулы АМП в мембране существуют в виде двух фракций – поверхностной и интегрированной (функционально активной) – получила название “модели двух состояний” (“two-state model”) [44].

## МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕМБРАНЫ

Наибольшей известностью пользуются три основные модели, описывающие механизмы нарушения барьерных функций мембраны.

**Модель цилиндрической поры (“barrel-stave model”).** Модель была предложена Г. Бауманом и П. Мюллером в 70-е годы XX века [45] для описания структур ионных каналов, в том числе образованных АМП, например, аламетицином (вторичным метаболитом гриба *Trichoderma viride*). Согласно данной модели, внедрившиеся и ориентированные перпендикулярно мембране молекулы пептида образуют комплексы, формирующие олигомерные поры, на внутренней поверхности которых экспонированы гидрофильные аминокислотные остатки (рис. 1а). Размеры поры могут увеличиваться путем включения в комплекс дополнительных пептидных субъединиц. Следует учитывать тот факт, что в структуре большинства АМП гидрофильные фрагменты содержат немалую долю положительно заряженных остатков аргинина и лизина, за счет кулоновского отталкивания которых суммарная энергия комплекса должна повышаться, а стабильность и продолжительность жизни поры – уменьшаться. Кроме того, поры, образованные по этому принципу, должны быть анион-селективными, что чаще всего не соответствует действительности. Вследствие указанных ограничений описанная модель не получила широкого распространения в своем первоначальном виде. Лучше всего она описывает действие поробразующих АМП, молекулы которых не имеют заряда или слабозаряжены.

Данная модель была предложена, в частности, для сапепина (№ 8а) [46] и тахиплезина I (№ 17) [47]. В последнем случае применение модели цилиндрической поры оправдано тем, что каналы, формируемые этим пептидом, действительно, от-

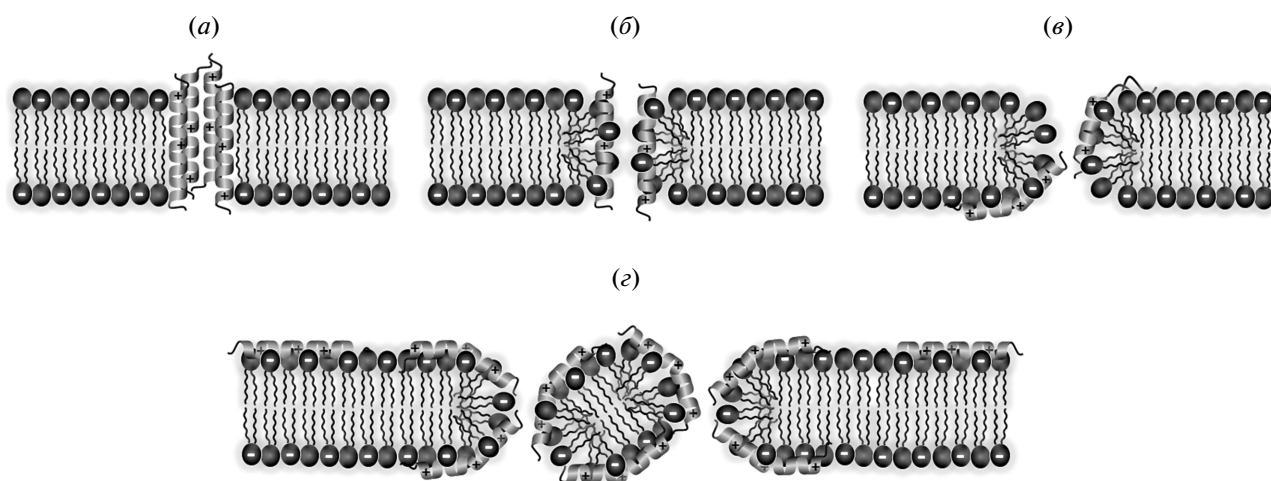


Рис. 1. Основные механизмы повышения проницаемости липидного бислоя. Показаны модели цилиндрической поры (а), тороидальной поры (б), неупорядоченной тороидальной поры (в), детергент-подобный механизм (з).

личаются выраженной селективностью к анионам. Сапесин (дефенсин из гемолимфы мухи *Sarcophaga peregrina*) при контакте с везикулами, построенными из кислых фосфолипидов, образует олигомерные потенциал-независимые каналы, пропускающие молекулы глюкозы [46]. С помощью ЯМР-спектроскопии были определены поверхности пептид-липидного и пептид-пептидного взаимодействия в олигомере. На основании этой информации и данных о трехмерной структуре мономера сапесина была построена модель трансмембранного комплекса в виде пептидного тримера [46].

**Модель тороидальной поры (“toroidal pore”) или червоточины (“wormhole”).** Данная модель, впервые предложенная для магейнина-2 (линейного АМП из шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*) [48] и экспериментально подтвержденная методом нейтронного рассеяния [49], явилась дальнейшим развитием предыдущей модели и, по-видимому, применима в отношении более широкого круга АМП, в том числе для уже упоминавшегося тахиплезина I [42, 50, 51]. Главное структурное отличие тороидальной поры от цилиндрической заключается в том, что ее внутренняя поверхность выстлана не только гидрофильными, положительно заряженными участками АМП, но и чередующимися с ними анионными головками фосфолипидов (рис. 1б). Таким образом, липидный монослой, выстилающий пору, образует изгиб, переходя с одной стороны мембраны на противоположную (появляются “спайки” монослоев). Одним из следствий возникновения тороидальных пор является ускоренный “флип-флоп” липидов, осуществляемый путем латеральной диффузии между соединенными порой монослоями и нарушающий структурную асимметрию мембраны

[48]. Главным преимуществом этой модели по сравнению с предшествующей является более высокая стабильность комплекса как результат электростатических взаимодействий пептидной и липидной составляющих. Пептиды, обладающие более сильными амфифильными свойствами, образуют более стабильные поры, тогда как менее амфифильные с большей вероятностью мигрируют через мембрану. По сравнению с предыдущей моделью, число молекул пептида, требующееся для формирования одной поры того же диаметра, оказывается меньшим. Геометрические характеристики поры и ее селективность по отношению к катионам и анионам могут варьировать в зависимости от условий и соотношения концентраций пептида и липидов.

Исследование методом молекулярной динамики взаимодействия линейного  $\alpha$ -спирального АМП мелиттина (№ 31) с бислоем, построенным из молекул дипальмитоилфосфатидилхолина дало неожиданный результат, заставивший пересмотреть модель и построить ее модифицированный вариант, получивший название неупорядоченной тороидальной поры (“disordered toroidal pore”) [52]. Согласно этой модели, для стабилизации трансмембранного канала достаточно одной-двух молекул пептида, которые выстилают лишь небольшую часть его внутренней поверхности (рис. 1в). Молекулы пептида ориентированы под произвольным углом к плоскости бислоя, что сильно отличает такую пору от цилиндрической и классической тороидальной, в которых пептид пронизывает мембрану в строго перпендикулярной ориентации. Обязательным условием формирования поры является сохранение положительного заряда пептида, в то время как его конформация может отличаться от правильной  $\alpha$ -спиральной.

**Модель “ковра” (“carpet model”) или детергент-подобный механизм (“detergent-like mechanism”).** Множество экспериментальных данных свидетельствуют о том, что мембранотропная активность АМП чаще всего реализуется не путем образования стабильных пор, а через детергент-подобный лизис, происходящий только в том случае, когда в поверхностном слое мембраны создается достаточно высокая концентрация пептида (пептидный “ковер”) [53]. Хотя первой попыткой объяснить действие цекропинов (№ 40) было построение модели цилиндрической поры [54], впоследствии для них был предложен механизм “ковра” [55]. В отличие от двух вышеописанных моделей этот механизм нивелирует роль специфических пептид-пептидных взаимодействий. АМП накапливается в поверхностном слое мембраны, не погружаясь в ее гидрофобную область (рис. 1з). К такому типу взаимодействий склонны молекулы, обладающие сравнительно низкими амфифильными и гидрофобными свойствами (более того, для некоторых гидрофильных АМП с небольшой длиной цепи этот вариант остается единственно возможным). С повышением концентрации пептида мембрана утрачивает термодинамическую стабильность, в ней накапливаются локальные деформации изгиба, появляются множественные тороидальные разрывы и начинается формирование липид-пептидных мицелл [56]. МИК пептидов, действующих подобным образом, должны значительно превышать МИК пептидов-порообразователей [2, 57]. Согласно расчетам, утечка содержимого липосом, а также ингибирование роста микроорганизмов наблюдаются при таких концентрациях пептида в мембране, когда на одну его молекулу приходится от 3–4 до нескольких десятков молекул липидов [58–60]. Для цекропинов минимальные ингибирующие концентрации соответствуют количеству пептида, которое должно покрывать клетку-мишень сплошным слоем [61]. Необходимость в избыточном, на первый взгляд, количестве АМП можно объяснить тем, что в связывании этих молекул принимают участие не только липиды мембраны, но и множество отрицательно заряженных полисахаридов, входящих в состав оболочки микроорганизмов.

Кроме вышеперечисленных моделей, в литературе встречаются описания еще нескольких механизмов, приводящих к нарушению барьерной функции клеточной мембраны [2, 4]. Увеличение проницаемости мембраны для низкомолекулярных соединений и ионов приводит к диссипации трансмембранного потенциала и градиента рН, снижению концентрации АТФ, потере калия и других важнейших компонентов цитоплазмы. Быстрое падение уровня АТФ в цитоплазме может быть обусловлено, главным образом, ускоренным процессом распада этого соединения, а не диффузией через поры или снижением темпов синтеза из-

за деполяризации мембраны и ингибирования дыхания [24]. Скорость АТФазной реакции увеличивается в результате оттока фосфата и уменьшения его концентрации внутри клетки. Гибель клетки может наступить уже через 2–3 мин после добавления АМП в питательную среду.

Более высокая устойчивость грамотрицательных бактерий к воздействию ряда АМП объясняется наличием дополнительного барьера в виде наружной мембраны, повреждения которой оказывается недостаточно для проявления бактерицидного эффекта [62, 63]. АМП не могут проникнуть в периплазму через обычные поры этой мембраны, в норме пропускающие молекулы с массой не более 700 Да. Для того чтобы нанести серьезный ущерб жизнеспособности грамотрицательных бактерий, молекулы АМП должны преодолеть слой ЛПС и последовательно прореагировать с наружной и цитоплазматической мембранами [21, 64].

Прямая зависимость между степенью деполяризации мембраны и антимикробным эффектом была установлена в ранних экспериментах с цекропином А (№ 40) из *Hyalophora cecropia* и его аналогами, действующими по механизму “ковра” [61]. Заметно отличается характер деполяризации мембраны под действием дефенсина А (№ 8а) из *Protophormia terranovaе*: процесс останавливается по достижении значения трансмембранного потенциала  $\Delta\psi = 110$  мВ (начальное значение  $\Delta\psi$  для *Micrococcus luteus* составляет  $-190$  мВ) [24]. Это наблюдение, наряду с тем фактом, что дефенсин А не изменяет проводимость полностью деполяризованной мембраны, указывает на формирование потенциал-зависимых каналов и одновременно говорит об отсутствии детергент-подобного действия.

В экспериментах с дефенсином А повышение ионной силы снижало скорость выхода ионов калия из клетки, а добавление двухвалентных и, в еще большей степени, трехвалентных катионов было способно полностью остановить регистрируемый ток калия. Известно, что присутствие двухвалентных катионов повышает упорядоченность липидного бислоя за счет подавления латеральной диффузии. Сходным образом можно представить влияние, оказываемое двух-трехвалентными катионами на скорость диффузии и олигомеризации АМП в мембране. Не исключено и прямое ингибирование ионных каналов [24].

Помимо концентрации солей значительное влияние на мембранотропную активность АМП оказывают температура, рН среды, состав липидного бислоя [24, 65–67]. Уменьшение активности дефенсина А при температуре ниже 25°C и практически полная ее потеря при температуре ниже 10°C согласуется с данными о фазовых переходах в этом температурном диапазоне и может говорить о трудности образования пор в липидном бислое, на-

ходящемся в более упорядоченном геле-состоянии [24]. Величина рН, предположительно, влияет на степень олигомеризации пептида в растворе, его адсорбцию на поверхности мембраны и непосредственно на функциональное состояние трансмембранного канала [24]. Особенно сильно зависит от изменений рН (в пределах физиологической нормы) активность гистидин-богатых АМП, заряд которых резко меняется при пересечении границы рН ~ 6.0, соответствующей  $pK_a$  имидазольной группы [68, 69].

К числу мембраноактивных пептидов с малоизученным механизмом действия относится гименоптецин (№ 54) — обогащенный глицином АМП, действующий на грамположительные и грамотрицательные бактерии [70]. Способность этого белка повышать проницаемость клеточных мембран была показана в опытах с расщеплением хромогенного субстрата  $\beta$ -галактозидазой *E. coli*. Добавление небольших количеств (0.0005%) Tween 20 существенно снижало для гименоптецина значение минимальной концентрации, ингибирующей рост бактерий (МИК). Известно, что в концентрациях менее 1% неионный детергент не оказывает влияния на жизнеспособность интактных грамотрицательных бактерий [71]. Явление синергизма в данном случае можно объяснить тем, что антимикробный белок нарушает целостность наружной мембраны, тем самым открывая для молекул детергента доступ к более уязвимой цитоплазматической мембране. Отсутствие синергизма с лизоцимом говорит о том, что гименоптецин повышает проницаемость мембраны только для веществ с небольшой молекулярной массой (менее 1000 Да) [70]. Смеси гименоптецина с линейным  $\alpha$ -спиральным АМП магейнином дают лишь аддитивный эффект, так как, по-видимому, оба вещества действуют по сходному механизму [70]. В отличие от почти мгновенного эффекта магейнина, повышение проницаемости мембраны гименоптецином регистрируется не ранее, чем через 2 мин после его добавления в среду, а 100%-й бактерицидный эффект требует инкубации клеток с белком в течение 4 ч, что больше напоминает кинетику действия пролин-богатых АМП [72]. Клетки, помещенные в среду без питательных веществ, оказываются менее чувствительными к гименоптецину [70]. Установлено, что клетки аэробных и анаэробных штаммов одинаково чувствительны к пептиду.

### СЕЛЕКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ

Главной причиной, побуждающей обратиться к вопросу избирательности действия природных АМП, является задача создания лекарственных средств на их основе. Многие АМП беспозвоночных демонстрируют в экспериментах *in vitro* цитотоксичность в отношении клеток эукариот, од-

нако в тканях живого организма потенциальная токсичность эндогенных мембранолитических АМП для собственных клеток компенсируется строгой регуляцией их экспрессии и процессинга, наличием молекул, нейтрализующих их активность в отсутствие патогена (например, сульфатированных гликозаминогликанов), а также работой протеаз, расщепляющих пептиды по мере поступления их во внутреннюю среду организма [73, 74]. Локальный выброс АМП фагоцитирующими клетками можно, вероятно, сравнить с такими сопутствующими фагоцитозу реакциями как “кислородный взрыв” и выброс лизосомальных гидролаз, которые строго ограничены в пространстве и во времени [75]. Наряду с фагоцитами еще одним типичным местом концентрации АМП животных являются слизистые оболочки, эпителий которых отличается устойчивостью к агрессивным воздействиям [74].

И все же, антимикробная активность большинства природных мембраноактивных АМП выражена сильнее, чем их цитотоксические эффекты. Селективность чаще всего оценивают по величине терапевтического индекса (ТИ), который рассчитывают как отношение минимальной гемолитической концентрации (МГК) к МИК. Лизис эритроцитов млекопитающих в экспериментах *in vitro* обычно наступает, когда тестируемые пептиды добавляются в концентрациях, превышающих антимикробные МИК в несколько (реже — в десятки) раз [18, 74]. Стоит отметить, что отношение двух указанных величин не дает истинного представления о процессах, протекающих *in vivo*, хотя бы потому, что наблюдаемые значения сильно зависят от концентрации контактирующих с АМП клеток, а точнее — от суммарной концентрации липидов их мембран [2]. Значительно больший интерес представляют данные о распределении АМП, меченных флуоресцентными и радиоактивными метками, в инфицированных тканях [18, 74].

Селективность мембранотропного действия АМП объясняется различиями биохимического состава и электрофизиологических свойств мембран микробов и клеток организма-хозяина [5]. Это различие особенно велико в тех случаях, когда в роли патогена выступает прокариотический микроорганизм. Липидная фракция прокариотической мембраны представлена, главным образом, кислыми фосфолипидами, такими как фосфатидилглицерин, кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит. Дополнительный отрицательный заряд вносят ЛПС и тейхоевые кислоты. Эукариотическая мембрана, напротив, содержит значительную долю нейтральных цвиттерионных фосфолипидов, главным образом, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина. Еще одним специфическим компонентом мембран эукариот являются стеролы, также не имею-

щие заряда и редко встречающиеся в бактериальных мембранах [18]. Немаловажно и то, что анионные компоненты эукариотической мембраны, в первую очередь фосфатидилсерин, расположены на ее внутренней поверхности. Эта асимметрия нарушается у опухолевых клеток, что делает их более уязвимыми для АМП [76].

Вследствие указанных особенностей, мембраны прокариот, имеющие больший суммарный отрицательный заряд, становятся более предпочтительной мишенью для катионных пептидов. Изменение знака заряда путем присоединения остатков аминокислот или аминокарабинозы к анионным группам фосфолипидов, ЛПС, тейхоевых кислот является одним из эффективных механизмов выработки резистентности к АМП, хотя масштаб этого процесса ограничен, по всей видимости, потребностями физиологии микроорганизмов [22, 77–79].

Причиной высокой селективности мембранотропного действия может быть аффинность АМП к специфическим компонентам мембраны клетки-мишени. Так, селективность антилипополисахаридных факторов (№ 2) в отношении грамотрицательных бактерий объясняется их способностью избирательно связываться с липидом А с помощью группы консервативных аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности четырехцепочечного  $\beta$ -листа [16, 80, 81]. Прочность связывания ( $K_d = 1.26 \times 10^{-8}$  М) приблизительно соответствует прочности связывания ЛПС с рецептором CD14 лейкоцитов млекопитающих ( $K_d = 2.7 \times 10^{-8}$  М) [82]. Антилипополисахаридные факторы также образуют комплексы с липотейхоевыми кислотами грамположительных бактерий ( $K_d = 1.34 \times 10^{-8}$  М). Образование комплексов может быть первым этапом малоизученного к настоящему времени механизма мембранного лизиса [83].

Противогрибковые дефенсины (№ 8б), такие как гелиомицин, избирательно связываются с глюкозилцерамидами грибов, не проявляя аффинности к глюкозилцерамидам растений и млекопитающих [15]. Результатом связывания становится дестабилизация и повышение проницаемости клеточной мембраны. Штаммы дрожжей *Candida albicans* и *Pichia pastoris* с делецией гена глюкозилцерамидсинтазы (UDP-глюкозоцерамид-глюкозилтрансферазы), а также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, не синтезирующие глюкозилцерамидов, устойчивы к действию гелиомицина. Широкое распространение резистентных форм представляется маловероятным, поскольку прекращение синтеза глюкозилцерамидов существенно замедляет рост грибов (не только дрожжевых, но и нитчатых), паразитирующих на растениях и животных, и делает мутантные штаммы значительно менее вирулентными по сравнению со штаммами дикого типа [84–86].

На стадии первоначального связывания АМП с мембраной велика роль трансмембранного потенциала. У нормальных животных клеток величина  $\Delta\psi$  составляет от  $-90$  до  $-110$  мВ, в то время как для бактерий в логарифмической фазе роста она обычно принимает значения в диапазоне от  $-130$  до  $-150$  мВ. Это позволяет рассматривать  $\Delta\psi$  в качестве еще одного параметра, определяющего селективность катионных пептидов [18].

Основные физико-химические характеристики АМП, такие как величина положительного заряда молекулы, гидрофобность и амфифильность, влияют не только на величину антимикробной активности, но и на избирательность действия [4]. Это влияние далеко не однозначно и не имеет характера линейной зависимости, поскольку во многом определяется конформационными особенностями каждого конкретного АМП. Обобщая данные, полученные для природных  $\alpha$ -спиральных пептидов и их синтетических аналогов, можно упрощенно сказать, что увеличение доли гидрофобных остатков и гидрофобного момента сопровождается усилением антимикробных свойств пептида и, одновременно, ведет к потере селективности [18, 87, 88]. В ряде случаев эта закономерность наблюдается и при повышении заряда молекулы [89]. Следует отметить, что пептиды со слабо выраженными гидрофобными и амфифильными свойствами обладают меньшей способностью внедряться в гидрофобный слой мембраны и образовывать стабильные каналы. Основной вклад в энергию их связывания с мембраной вносят электростатические взаимодействия. Такие пептиды более склонны к транслокации через мембрану или действию по детергент-подобному механизму. По мнению авторов модели “ковра”, пептиды именно этого типа обладают наиболее высокой селективностью действия, так как они наиболее чувствительны к различию электростатических свойств мембран прокариот и эукариот [56]. Согласно этой же точке зрения, АМП, образующие ионные каналы и поры, отличаются в целом низкой селективностью.

#### МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА АМП ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ КЛЕТКИ-МИШЕНИ

Как было сказано выше, ключевым признаком нарушения барьерной функции мембраны является диссипация трансмембранного потенциала. Однако не всегда можно проследить связь между концентрацией АМП, вызывающей деполяризацию мембраны, и минимальной концентрацией АМП, ингибирующей рост микроорганизма (МИК). Различные АМП беспозвоночных в разной степени наделены способностью к деполяризации мембраны: одни вызывают ее в концентрациях более низких, чем МИК, другие даже в летальных концентрациях не сразу достигают подобного эффекта [90, 91]. Механизмы порообразования могут слу-

жить лишь средством транспортировки АМП в цитоплазму, где разворачиваются основные события, вызывающие гибель или торможение роста клеток патогенов [6, 92]. Некоторые АМП способны проникать внутрь клетки, не накапливаясь в мембране в высоких концентрациях, не формируя стабильных пор и не ускоряя процесса “флип-флопа” липидов. Положительный заряд и амфифильные свойства таких молекул лишь обеспечивают их транслокацию через липидный бислой.

Развитием идеи короткоживущей поры стала модель агрегатного канала (“aggregate channel”), согласно которой промежуточным этапом трансмембранного транспорта АМП является образование неупорядоченных мицеллоподобных агрегатов, пронизывающих мембрану [93]. Помимо АМП агрегаты могут нести в себе молекулы воды, ионы и, возможно, более крупные полярные молекулы. Дестабилизации комплекса способствует высокий заряд, низкая гидрофобность и слабые амфифильные свойства составляющих его компонентов. После разрушения агрегата они оказываются на одной из двух сторон мембраны и могут далее переходить в раствор. Преимущественная миграция АМП внутрь клетки обеспечивается разностью электрохимических потенциалов. При этом на каждую молекулу пептида приходится сравнительно небольшое число ионов, проникающих вместе с ним в клетку, в результате чего процесс транслокации мало влияет на величину трансмембранных градиентов.

Механизм проникновения поликатионных молекул (антибиотиков класса аминогликозидов, АМП) через наружную мембрану грамотрицательных бактерий был подробно изучен на примере *Pseudomonas aeruginosa* и получил название самоактивируемого поглощения (“self-promoted uptake”) [94]. Ключевая его особенность состоит в замещении поликатионом ионов кальция, связывающих соседние молекулы ЛПС.

Сравнительно малораспространенным способом трансмембранного транспорта АМП является использование белков-переносчиков. Наиболее известными примерами подобного рода транспортировки являются пролин-богатые АМП группы апицицина (№ 49). Пептиды этого семейства самостоятельно проникают через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, после чего используют белок внутренней мембраны SbmA для вторично активного транспорта внутрь клетки [95, 96]. Роль SbmA в нормальной физиологии *E. coli* не установлена [96], однако известно, что этот белок способен переносить через внутреннюю мембрану в цитозоль бактерии такие несхожие по структуре молекулы как пролин-богатый АМП из нейтрофилов быка Vac7(1-35), микроцины MscB17 [97] и MscJ25 [98], а также гликопептидный антибиотик блеомицин [99]. *D*-Энантиомер апицицина

не способен проникать через цитоплазматическую мембрану, его связывание с клеткой носит обратимый характер; добавление в среду *L*-пролина и *L*-пролин-содержащих пептидов конкурентно ингибирует транспорт *L*-апицицина внутрь клетки [100].

Цистеин-содержащие антимикробные пептиды семейства пенеидинов (№ 74) в своей *N*-концевой части обладают значительным числом остатков пролина (P) (от семи до девяти), чередующихся с остатками аргинина (R) и формирующих характерные PRP-мотивы. Отдельно взятый *N*-концевой фрагмент может совпадать по уровню активности с полноразмерной молекулой [101], но может быть и неактивным [102]. Отсутствует активность и у индивидуального пролин-богатого фрагмента диптерицина (№ 56) [103], хотя присоединение его к глицин-богатому домену повышает активность последнего приблизительно в 100 раз [104]. Эти и подобные наблюдения позволили предположить, что пролин-содержащий участок может играть роль транспортирующего вектора, который направляет антимикробные белки внутрь клетки.

Еще одним АМП, использующим механизм активного энергезависимого транспорта для проникновения в клетку, является тенецин-3 (№ 66), выделенный из гемолимфы жука *Tenebrio molitor* [105]. Проникновение белка внутрь клетки прекращается в присутствии ингибитора дыхания (азид натрия). Тенецин-3 не обладает мембранолитическими свойствами: он не вызывает утечки флуоресцирующих красителей из липосом и не снижает трансмембранного потенциала чувствительных к нему клеток *Candida albicans*.

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

**Агглютинация клеток микроорганизмов.** Для одного из представителей семейства цистеин-содержащих АМП мацинов (№ 9), гидрамацина-1, был предложен оригинальный механизм действия, заключающийся в агглютинации бактериальных клеток (“barnacle model”) [106, 107]. Пространственная укладка молекулы представляет собой цистеиновый узел. На поверхности глобулы можно выделить две полусферы, образованные экспонированными наружу гидрофобными остатками (в первую очередь, остатками триптофана), и разделяющий их пояс катионных остатков. Гидрамацин-1 взаимодействует с мембранами двух оказавшихся в непосредственной близости бактериальных клеток таким образом, что его гидрофобные поверхности погружаются в бислой каждой из них, а катионные остатки участвуют в ионных взаимодействиях с отрицательно заряженными головками липидов. Глубина погружения в бислой составляет не более 4 Å, что делает возможным одновременное взаимодействие мо-



лекулы гидрамацина-1 с мембранами двух бактерий. При участии множества молекул пептида происходит образование крупных клеточных агрегатов и их преципитация. По мнению авторов, это замедляет процесс распространения инфекции в тканях и позволяет сконцентрировать защитные факторы иммунной системы в небольшом объеме [107]. Внедрение молекул гидрамацина в липидный бислой, наряду с агглютинацией клеток, приводит к дестабилизации и повышению проницаемости мембраны.

Подобным образом может действовать еще один представитель семейства – нейромацин из пиявки *Hirudo medicinalis*, обладающий сходным распределением заряженных и гидрофобных остатков на поверхности молекулы [108]. В то же время, теромацин из пиявки *Theromyzon tessulatum* обладает более типичной для АМП амфифильной структурой и, в отличие от вышеуказанных пептидов, не вызывает агглютинации бактерий и липосом. Все три исследованных представителя семейства мацинов повышают проницаемость бактериальной мембраны, однако умеренной способностью образовывать стабильные поры обладает лишь нейромацин [108].

Агглютинация и снижение подвижности клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий является одним из механизмов действия  $\beta$ -шпилечного танатина (№ 16) [12, 109]. Эту способность проявляет только природный энантиомер пептида. Наряду с указанными эффектами наблюдается также ингибирование клеточного дыхания. Танатин не обладает мембранолитическими или порообразующими свойствами: он не вызывает лизиса эритроцитов и не изменяет проницаемости бактериальных мембран для ионов калия [12].

**Действие на мембранные белки.** Многие периферические мембранные белки имеют сравнительно слабые контакты с липидным бислоем. Встраивание большого количества молекул АМП способно приводить к делокализации и отрыву этих белков от мембраны, разупорядочиванию белковых комплексов [110]. При этом проницаемость мембраны может сохраняться на нормальном уровне. Результатом дисфункции мембранных белков бактерий становится нарушение клеточного дыхания и ингибирование синтеза пептидогликана. Авторы модели считают, что такой механизм, наблюдаемый в экспериментах с короткими синтетическими пептидами, является универсальным и может объяснять действие многих природных АМП – в первую очередь, тех из них, которые не обладают литическими или порообразующими свойствами.

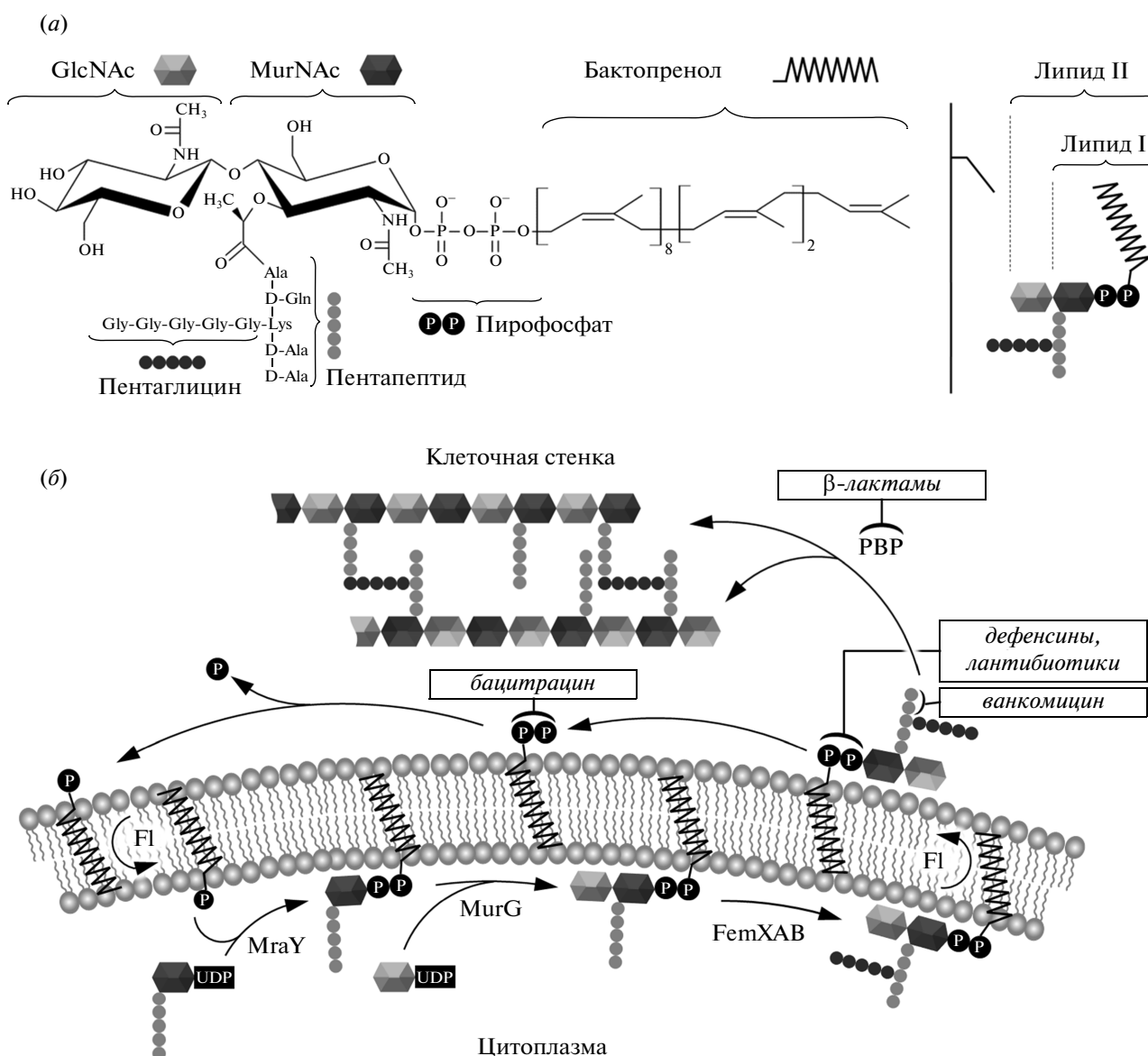
Фундаментальные основы антимикробной активности большинства АМП, обогащенных глицином, остаются малоизученными. Имеются основания полагать, что действие глицин-богатых

пептидов семейства аттацинов (№ 51), приводящее к лизису мембраны, осуществляется не напрямую, а через регуляцию биосинтеза мембранных белков [111]. Аттацины избирательно связываются с ЛПС и, вслед за тем, ингибируют синтез белков наружной мембраны (Omp – Outer membrane proteins) на уровне транскрипции. Повышение проницаемости цитоплазматической мембраны регистрируется через 45 мин после добавления аттацина в среду, тогда как уровень экспрессии Omp снижается уже через 10 мин. Бактерицидный эффект вызывает не только растворенный, но и иммобилизованный на агарозе аттацин. Предполагается, что действие аттацинов не требует внедрения в цитоплазматическую мембрану; оно опосредовано связыванием с рецептором наружной мембраны, роль которого может играть ЛПС. Добавленный в среду свободный ЛПС блокирует действие аттацина. По-видимому, аттацины активируют сигнальный путь, по которому осуществляется обратная связь в регуляции экспрессии генов Omp. Снижение синтеза последних приводит к дестабилизации мембраны. В качестве поздней ответной меры клетка синтезирует ряд стрессовых белков (присутствие которых регистрируется через 30 мин) и увеличивает синтез ЛПС (через 1 ч).

Аналогичными явлениями – связыванием ЛПС, подавлением экспрессии Omp, индукцией стрессовых белков – характеризуется и механизм действия гловеринов (№ 55) [112]. Однако в отличие от диптерицинов (№ 56) и аттацинов, проявляющих мембранолитический эффект лишь в отношении клеток, находящихся в фазе роста [104, 113], гловерин убивает и нерастущие клетки [114]. Быстрота наступления бактерицидного эффекта значительно отличается у разных представителей класса глицин-богатых АМП, что говорит о существенных различиях в механизмах действия [103].

Активность гистидин-богатого  $\alpha$ -спирального АМП клаванина А (№ 25) в кислой среде также объясняют действием на мембранные белки [68]. Показано, что при значениях рН 6.5–7.0 этот пептид ведет себя как неспецифический мембранолитик, вызывающий ингибирование роста бактерий и утечку флуорофоров из липосом. При снижении рН среды до 5.5–5.6 пептид теряет способность лизировать мембраны, однако его способность ингибировать рост бактерий возрастает в несколько раз. Было показано, что при таких значениях рН клаванин А повышает проницаемость бактериальной мембраны для протонов и ионов калия. Данный эффект не воспроизводится на липосомах, что наводит на мысль о рН-зависимом взаимодействии пептида с мембранными белками, участвующими в формировании трансмембранных ионных градиентов.

**Действие на клеточную стенку.** Наряду с цитоплазматической мембраной мишенью для АМП



**Рис. 2.** Структура липида II (a) и схема биосинтеза пептидогликана (б) грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*. Биосинтез начинается в цитоплазме с образования растворимого предшественника UDP-MurNAc-пентапептида, где MurNAc – остаток N-ацетилмурамовой кислоты [119]. Фосфо-MurNAc-пентапептидтрансфераза (MraY) катализирует реакцию присоединения UDP-MurNAc-пентапептида к липидному носителю бактопренилфосфату (ундекапренилфосфату, C55P), в результате которой образуется липид I. Далее ундекапренил-дифосфомурамоилпентапептид- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (MurG) катализирует синтез липида II путем присоединения к липиду I N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Под действием пептидилтрансферазы FemXAB происходит добавление межпептидного мостика из пяти остатков глицина. Благодаря активности ферментов группы флиппаз (Fl) [120] осуществляется транслокация полученной структурной единицы на внешнюю сторону мембраны, где происходит встраивание ее в состав пептидогликана, катализируемое трансглюкозилазами, транспептидазами и карбоксипептидазами, образующими группу пептидогликансвязывающих белков (РВР). Свободный бактопренилфосфат возвращается на внутреннюю сторону мембраны. Отмечены сайты связывания антибактериальных дефензинов и ряда антибиотиков, ингибирующих синтез клеточной стенки.

может становиться клеточная стенка микроорганизмов. 2010 год стал переломным в развитии взглядов на механизм антибактериального действия самого распространенного семейства АМП – дефензинов (№ 8a): в ряде публикаций было показано, что многие из них являются специфическими

ингибиторами биосинтеза клеточной стенки бактерий. На примере дефензинов грибов [115],  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов млекопитающих [116, 117] и антибактериальных дефензинов беспозвоночных [8, 115] была продемонстрирована способность этих молекул связывать липид II, являющийся основным

структурным блоком при биосинтезе пептидогликана (рис. 2). Таким образом, антибактериальные дефенсины имеют общую мишень с лантибиотиками, гликопептидным антибиотиком ванкомицином и депсипептидным антибиотиком теиксобагтином [118]. Противогрибковые дефенсины (№ 86), механизм действия которых был рассмотрен выше, не способны образовывать комплексы с липидом II [115].

Профиль транскрипции генов бактерии при дообавлении в среду дефенсинов типичен для состояния стресса, связанного с повреждением клеточной оболочки, и напоминает ответ на действие ванкомицина и бацитрацина [115]. Дефенсины не вызывают формирования кросс-резистентности с ванкомицином, так как связываются не с подверженным модификации фрагментом *D*-Ala-*D*-Ala липида II, а с его более консервативным участком, содержащим пирофосфат (рис. 2б). Связывание с образованием комплекса происходит необратимо, в стехиометрическом отношении 1 : 1 и сопровождается накоплением в цитоплазме бактерий уридиндифосфат-*N*-ацетилмурамоилпентапептида — предшественника липида II при синтезе пептидогликана. В концентрациях, в 10 раз превышающих МИК, три дефенсина устрицы, принадлежащие к разным структурным подсемействам, не вызывали деполаризации мембраны *Staphylococcus aureus* [8]. Тем не менее, не исключена вероятность того, что другие представители семейства дефенсинов могут одновременно ингибировать синтез пептидогликана и действовать по ранее открытому механизму, связанному с нарушением проницаемости мембраны.

Многие фунгицидные АМП обладают способностью связывать хитин. В частности, к ним относятся пенеидины (№ 74) и все охарактеризованные пептиды из мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Отмечено, что аффинность к хитину коррелирует с противогрибковой активностью: тахиплезины (№ 17) и тахистатины (№ 18), связывающиеся с хитином сильнее, чем “большой дефенсин” (№ 5) и тахицитин (№ 19), проявляют свой эффект в отношении *Candida albicans* и *Pichia pastoris* в значительно более низких концентрациях: МИК<sub>50</sub> “большого дефенсина” и тахицитина — 20–50 мкг/мл; МИК<sub>50</sub> тахиплезинов и тахистатинов — 0.1–3.0 мкг/мл [121]. Ввиду того, что животные, вырабатывающие упомянутые АМП, сами покрыты хитиновой оболочкой, биологическая роль хитин-связывающих пептидов представляется неоднозначной. Возможно, они не только обеспечивают защиту от грибковых патогенов, но и участвуют в процессах сборки и регенерации хитинового экзоскелета [121, 122].

**Ингибирование транскрипции и трансляции.** С момента своего открытия богатые пролином пептиды насекомых заметно выделялись на фоне большинства других АМП своей способностью

избирательно, в малых концентрациях ингибировать метаболические процессы бактерий (преимущественно грамотрицательных), не повреждая клеточной мембраны [72]. Апидецин (№ 49) пчелы *Apis mellifera* не влияет на проницаемость мембраны в концентрациях, на четыре порядка превышающих его МИК [11]. Бактериальные штаммы, резистентные к апидецину, сохраняют чувствительность к порообразующим пептидам. В противоположность “быстродействующим” мембраноактивным пептидам, бактерицидный эффект обогащенных пролином АМП развивается медленно, в течение нескольких часов. *D*-Энантиомеры этих АМП неактивны, что с самого начала их исследования позволило говорить о существовании молекулярных мишеней с хиральными структурами [11, 123]. Как выяснилось впоследствии, хиральная структура апидецин-подобных пептидов критически важна не только для их транслокации через мембрану (см. выше), но и для связывания с внутриклеточной мишенью.

Главной внутриклеточной мишенью пролин-богатых АМП насекомых долгое время считался 70 кДа-белок теплового шока DnaK [124, 125]. Однако эта гипотеза не нашла подтверждения в дальнейших исследованиях: было показано, что искусственные аналоги природных пролин-богатых АМП, более прочно связывающиеся с DnaK, обладают пониженной антимикробной активностью [126], а у некоторых укороченных аналогов, сохраняющих аффинность к DnaK и лучше проникающих через мембрану, полностью отсутствует способность ингибировать клеточный рост [127]. Штамм *E. coli*, несущий нулевую мутацию гена DnaK, остается чувствительным к действию апидецина и онкоцина (№ 49) [128]. Пролин-богатые АМП ингибируют экспрессию генов в бактериальных бесклеточных белок-синтезирующих системах, не влияя на активность добавляемой в реакционную смесь РНК-полимеразы T7 и не связываясь с ДНК-матрицей. Авторы исследования показали, что основной мишенью указанных пептидов являются бактериальные рибосомы, с которыми они образуют комплексы с константами диссоциации, лежащими в наномолярном диапазоне.

На основе данных рентгеноструктурного анализа была построена пространственная модель комплекса производного онкоцина Onc112 с 70S рибосомой *Thermus thermophilus* [13]. Согласно этой модели, пептид блокирует выходной туннель рибосомы и подавляет трансляцию на стадии инициации. Аналогичные результаты были получены для пиррокорицина (№ 63) и метальниковина (№ 61) [14]. Как и в случае с классическими антибиотиками, мутации рибосомальной РНК могут приводить к появлению штаммов, резистентных к пролин-богатым АМП.

Пролин-богатые кателицидины млекопитающих и апидецин-подобные пептиды насекомых, не обнаруживая существенной гомологии на уровне первичной структуры, обладают сходными спектрами активности [72] и сходным механизмом действия [14, 129]. Пептиды млекопитающих отличаются большими размерами, однако антимикробные свойства сохраняются даже у сравнительно коротких фрагментов их молекул, близких по длине к апидецин-подобным пептидам [130]. Активность PR-39, выделенного из кишечника свиньи, как и активность апидецина, снижается при помещении тест-культуры в буферный раствор, не содержащий питательных веществ [131]. Еще более отчетливо данное свойство прослеживается у формечинов муравьев, чувствительностью к которым обладают только растущие бактерии [132]. Тот факт, что в ранних работах *D*-энантиомер PR-39, в отличие от эффека, наблюдаемого для пептидов беспозвоночных [11, 123], сохранял активность своего природного *L*-изомера [133], объясняется высокими концентрациями пептида, использованными в эксперименте: в таких условиях пролин-богатые АМП, независимо от своей хиральной структуры, могут вести себя как неспецифические мембранолитики [134]. Пролин-богатый пептид арасин I (№ 70) из гемоцитов краба *Hyas araneus* также, скорее всего, действует по двум разным механизмам: в низких концентрациях – внутри клетки, в высоких – на уровне мембраны [135]. Его внутриклеточные мишени пока не установлены.

Потенциальной мишенью для многих катионных пептидов, проникающих внутрь микробной клетки, могут быть нуклеиновые кислоты, связывание с которыми ингибирует процессы репликации и транскрипции, а также другие полианионные молекулы. Так, в одной из первых работ, посвященных исследованию цистеин-содержащего  $\beta$ -спилечного АМП тахиплезина I (№ 17), была показана его способность связываться с ДНК в области ее малой бороздки [136]. В число потенциальных мишеней этого пептида, характеризующегося множественностью механизмов действия, включаются также внутриклеточные ферменты [137].

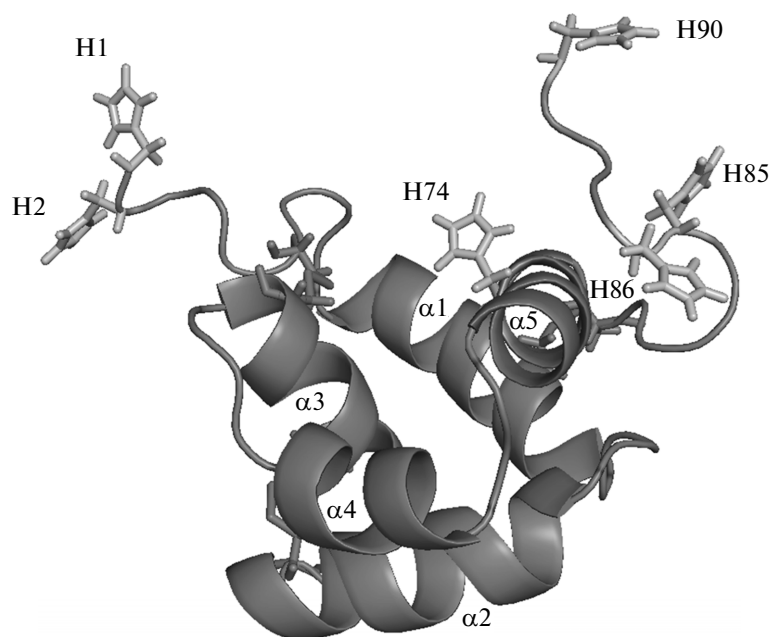
**Индукция апоптоза.** Системы программируемой клеточной гибели жизненно важны для существования не только крупных многоклеточных, но и одноклеточных организмов, в том числе ведущих паразитический образ жизни. С помощью апоптоза осуществляется удаление генетически дефектных клеток и обеспечивается противовирусная защита, сохранение клеточной популяции в условиях дефицита питательных веществ, а также правильный морфогенез у нитчатых грибов [138–141]. Сходные с апоптозом процессы протекают у бактерий, например, при достижении культурой стационарной фазы роста или при формировании биопленок [142].

В настоящее время известно, что принудительная индукция апоптоза у патогенных микроорганизмов с помощью молекулярных факторов врожденного иммунитета может использоваться организмом-хозяином в качестве способа защиты от инфекции [143]. Так, дефенсин-подобный АМП копризин из навозного жука *Copris tripartitus* проникает в клетки патогенных дрожжей *Candida albicans*, не повреждая при этом их цитоплазматической мембраны, и инициирует апоптоз, вызывая диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий, высвобождение цитохрома *c* в цитоплазму, образование активных форм кислорода и активацию метакаспаз [144]. Копризин полностью лишен гемолитической активности в концентрациях до 100 мкМ, а его активность, как и активность большинства мембранотропных АМП, подавляется высокими концентрациями солей, затрудняющих проникновение пептида внутрь клетки-мишени.

Аналогичным механизмом объясняют кандидозидное действие  $\beta$ -спилечного АМП ареницина-1 (№ 3) из целомотов *Arenicola marina* [145, 146], линейных  $\alpha$ -спиральных АМП мелиттина (№ 31) из яда пчелы *Apis mellifera* [147], протонектина из яда осы *Agelaia pallipes pallipe* [148], папилюцина из бабочки *Papilio xuthus* [149] и сколопендина I из многоножки *Scolopendra subspinipes mutilans* [150]. В отличие от копризина, некоторые из перечисленных АМП способны наносить прямые повреждения цитоплазматической мембране дрожжей. В этих случаях сохраняется неопределенность в ответе на вопрос, какой из двух механизмов вносит решающий вклад в уничтожение патогена [146, 148, 151].

**Секвестирование ионов металлов.** Одна из выработанных многоклеточными животными стратегий сдерживания инфекционного процесса заключается в контролируемом снижении во внутренней среде организма концентрации ростовых факторов, необходимых для жизнедеятельности патогенов. Среди них важное место принадлежит ионам металлов, выступающим в качестве кофакторов многих ферментов. В регуляции их концентрации принимают участие некоторые защитные белки и пептиды. В частности, у позвоночных в регуляции содержания ионов железа в тканях участвует полифункциональный секреторный белок лактоферрин [152] и  $\beta$ -спилечный АМП гепцидин [153]. С другой стороны, продуцируемые микроорганизмами молекулы, образующие хелатные комплексы с ионами металлов, являются важными факторами вирулентности [154, 155], а возможность подавления их биосинтеза рассматривается в настоящее время как перспективное направление антимикробной терапии [156].

К числу известных АМП беспозвоночных, действие которых реализуется посредством связывания ионов металлов, относятся микроплю-



**Рис. 3.** Пространственная структура микроплюзина (PDB ID 2KNJ). Отмечено расположение шести остатков гистидина, пять из которых находятся в неупорядоченной части молекулы и могут менять взаимное расположение при образовании хелатных комплексов с ионами металлов.

зин (№ 10) и родственные ему хебрины, выделенные из разных видов клещей [7]. Структура микроплюзина из клеща *Boophilus microplus* включает пять  $\alpha$ -спиральных участков, формирующих глобулу, стабилизированную тремя дисульфидными связями (рис. 3). Неупорядоченные *N*- и *C*-концевые фрагменты полипептидной цепи содержат несколько остатков гистидина, играющих ключевую роль в осуществлении биологической функции, которая состоит в секвестировании ионов металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) в тканях организма. В отличие от дефенсина, который также синтезируется в гемоцитах, но высвобождается из гранул лишь при активации иммунного ответа, микроплюзин сразу после синтеза поступает в гемолимфу [157]. По всей видимости, микроплюзин играет роль конститутивного регулятора содержания ионов металлов в организме клеща. Его антимикробную активность объясняют связыванием свободных ионов меди, являющихся кофакторами таких ферментов, как NADH-дегидрогеназа, цитохромоксидаза, медь/цинк-зависимая супероксиддисмутаза [158]. Микроплюзин связывает эти ионы, образуя металлохелатные комплексы в стехиометрическом отношении 1 : 1 [7]. Его минимальная ингибирующая концентрация определяется содержанием меди в среде, а также особенностями физиологии тестируемых штаммов микроорганизмов, которые могут синтезировать собственные более или менее эффективные хелатирующие агенты, а также отличаться потребностью в экспрессии медь-зависимых фер-

ментов. Эффект микроплюзина на рост тест-культур характеризуется как бактериостатический и может быть легко нейтрализован путем добавления избыточных количеств солей меди. Микроплюзин не влияет на проницаемость бактериальной мембраны.

Подводя итог вышесказанному, хотелось бы еще раз подчеркнуть, что многие АМП, по-видимому, осуществляют свое антимикробное действие с помощью разных одновременно реализуемых механизмов. Это сильно затрудняет выявление причин, вызывающих гибель или ингибирование роста микроорганизмов. Преобладание того или иного механизма может зависеть от концентрации пептида и условий среды. Свою специфику в действие АМП вносят и морфофизиологические особенности клеток-мишеней.

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АМП

Многочисленные исследования показывают, что пептиды, проявляющие антимикробную активность в тестах *in vitro*, могут быть выделены из большинства животных тканей. Хотя активность в микробиологических тестах и гомология первичной структуры считаются достаточными критериями для первоначального отнесения пептида к классу антимикробных, с открытием каждого такого вещества встает вопрос о биологической значимости его антимикробных свойств, его вкладе в защиту организма-хозяина от инфекции. Этот вопрос особенно актуален для пептидов, име-

ющих высокие МИК, утрачивающих активность в присутствии физиологических концентраций солей и других компонентов биологических сред, а также являющихся протеолитическими фрагментами функционально активных белков. Такие молекулы могут играть какую-то иную роль в организме (например, регуляторную), либо являются артефактами, образующимися в процессе выделения и очистки.

Для большого числа АМП беспозвоночных проведены иммуногистохимические исследования их локализации в организме, построены профили экспрессии генов. Показано, что синтез этих пептидов происходит преимущественно в фагоцитах, клетках эпителия и жирового тела насекомых, а их повышенная концентрация наблюдается в гранулах фагоцитов и фаголизосомах, в гемолимфе и секретах экзокринных желез, что подтверждает их роль в качестве молекулярных факторов врожденного иммунитета [159]. Индукция синтеза или выброс в гемолимфу АМП, накопленных в гранулах гемоцитов, в ответ на введение антигенов микробного происхождения также свидетельствуют в пользу их участия в защитных процессах [160]. Так, например, картина экспрессии генов пенеидинов (№ 74) и антилиполисахаридных факторов (№ 2) не позволяет сомневаться в важности роли этих АМП в иммунитете ракообразных [161]. АМП, в том числе фрагменты гистонов, являются участниками процессов инкапсуляции патогенов и нетоза у беспозвоночных [162, 163]. Веским доказательством участия АМП в иммунном ответе являются успешные эксперименты по созданию трансгенных животных, утрачивающих устойчивость к определенным штаммам возбудителей в результате нокаута или нокдауна генов, ответственных за синтез предшественников эндогенных АМП или ферментов их метаболизма, либо, наоборот, приобретающих повышенную устойчивость к инфекции в результате стимулирования экспрессии этих генов [164–166].

Оценка весомости вклада антимикробного действия каждого отдельно взятого АМП затруднена тем, что в живом организме эти вещества всегда действуют совместно с другими эндогенными антимикробными факторами. У каждого биологического вида, в каждой ткани организма формируется уникальное сочетание эндогенных защитных пептидов в зависимости от стадии онтогенеза и внешних условий. Наиболее очевидной причиной использования живыми организмами комбинаций АМП является различие в спектрах их антимикробной активности: большинство индивидуальных АМП не способны обеспечить защиту от микробных патогенов всех классов. Например, можно обобщенно сказать, что крустины (№ 73), пенеидины (№ 74), митицины (№ 14), дефенсины беспозвоночных (№ 8а) наиболее эффективны в отношении грамположи-

тельных, а большинство пролин- и глицин-богатых полипептидов – в отношении граммотрицательных бактерий. К специализированным противогрибковым АМП относятся митимицины (№ 13), тахицитин (№ 19), дефенсины группы дрозомицина (№ 8б), скарабецин (№ 15), АФР (№ 44), холотрицин-3 (№ 69), тенецин-3 (№ 66).

Кроме того, отобранные в процессе эволюции или полученные в экспериментальных условиях комбинации пептидов могут демонстрировать *in vitro* результирующую активность, выходящую за рамки простого аддитивного эффекта. Так, обнаружено потенцирование действия гименоптецина (№ 54), глицин-богатого АМП из гемолимфы шмеля *Bombus pascuorum* (МИК в отношении *E. coli* превышает 2 мкМ), в присутствии пролин-богатого АМП абаецина (№ 45), выделенного из того же вида (МИК = 200 мкМ) [167]. Тестирование смесей двух этих АМП позволило наблюдать бактерицидный эффект при концентрациях гименоптецина и абаецина равных 1.3 и 20 мкМ соответственно. Предполагается, что гименоптецин облегчает проникновение абаецина через мембрану, а тот, в свою очередь, ингибирует синтез белков, необходимых для ее репарации. Аналогичные результаты были получены при комбинировании абаецина с линейными  $\alpha$ -спиральными АМП цекропином А (№ 40) из шелкопряда *Hyalophora cecropia* и стомоксином (№ 38) из мухи *Stomoxys calcitrans*, взятыми в концентрациях 0.3 и 0.05 мкМ [168]. Можно ожидать, что и в живом организме пептидные и непептидные антимикробные факторы не только взаимно дополняют спектры активности, но и усиливают действие друг друга.

Первоначальные исследования новых АМП в большинстве своем сводятся к более подробному анализу все тех же антибиотических свойств, которые стали основанием для отнесения этих соединений к данному функциональному классу. Периодически появляются сообщения об альтернативных эффектах, не связанных напрямую с подавлением роста микроорганизмов. Немалую роль в этом играют работы прикладного характера, связанные с поиском новых лекарственных средств. Некоторые побочные эффекты имеют очевидное биологическое значение, тогда как другие проявляются лишь в искусственно созданных условиях. Так, крустин SWDPm2 из креветки *Penaeus monodon* обладает не только бактерицидной активностью, но и сильной ингибирующей активностью в отношении субтилизина А ( $K_i = 1.98$  нМ) [169]. Ингибирование бактериальных протеиназ, являющихся важными факторами вирулентности, может быть еще одним способом предотвращения распространения инфекции в тканях организма. Другой представитель семейства, крустин Pm4, является регулятором гемопоэза [170].

ЛПС-связывающие свойства, которые демонстрируют многие АМП, могут не только обеспечивать взаимодействие с мембраной грамотрицательных бактерий с целью дальнейшего уничтожения патогена, но и нейтрализовывать свободный ЛПС в гемолимфе, предотвращая развитие системных воспалительных реакций [171, 172]. У ряда АМП, в частности у антилипополисахаридных факторов (№ 2), была обнаружена противовирусная активность [173, 174]. Показано, что экспрессия генов глицин-богатых АМП возрастает в ходе антивирусного ответа у *Drosophila melanogaster* [175]. Стимулом к поиску новых типов активности АМП часто служит обнаружение сходных черт с молекулами других классов на уровне первичной или пространственной структуры. Так, давно известные факты о сходстве дефенсинов беспозвоночных (№ 8а) с нейротоксинами скорпионов, были дополнены сообщением о способности антибактериального дефенсина скорпиона блокировать калиевые каналы ( $IC_{50} = 0.51$  мкМ для потенциал-зависимых каналов Kv1.3) [176].

Взаимодействуя с рецепторами на поверхности клеток организма-хозяина, катионные пептиды выступают в качестве регуляторов роста и регенерации тканей, хемоаттрактантов, индукторов синтеза других сигнальных и эффекторных молекул. Хотя подавляющее большинство работ в этом направлении было проведено с пептидами и культурами клеток млекопитающих [177], представляется вероятным, что многие пептиды беспозвоночных могут обладать аналогичными типами активности [178, 179]. Сходство систем врожденного иммунитета этих так далеко отстоящих друг от друга в эволюционном отношении групп животных позволяет АМП беспозвоночных осуществлять иммуномодуляторную функцию в организме млекопитающих, как было показано на примере антилипополисахаридного фактора *Limulus polyphemus*: интраперитонеальное введение пептида лабораторным мышам приводило к индукции экспрессии ряда цитокинов и снижало негативные последствия инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* [180]. Пенеидины [181] и антилипополисахаридные факторы [182] креветок обладают не только антимикробными, но и опсонизирующими свойствами. Пенеидины также обеспечивают хемотаксис гранулоцитов к очагу инфекционного воспаления [183]. Тахиплезин (№ 17) участвует в индукции иммунного ответа у мечехвоста *Tachypleus tridentatus* [184]. Тахиплезин (№ 17) и ареницин-1 (№ 3) из целомоцитов кольчатого червя *Arenicola marina* формируют стабильные комплексы с белком системы комплемента C1q, что позволяет предположить возможность участия этих пептидов в активации системы комплемента [185, 186]. Свойства ростовых факторов демонстрируют сапексин (№ 8а), стимулирующий рост эмбриональных клеток серой мясной мухи

*Sarcophaga peregrina* [187], а также нейромацин и теромацин (№ 9), стимулирующие регенерацию нервной ткани у пиявок, из которых они были выделены [108].

Таким образом, представление об АМП как об эффекторах врожденного иммунитета постепенно трансформируется в более широкое понятие — как о веществах, играющих сложную регуляторную роль в защитных и пролиферативных процессах [161]. Это, в свою очередь, находит отражение в терминологии: наряду с выражением “antimicrobial peptides” в англоязычной литературе стало применяться более емкое словосочетание “host defense peptides” (защитные пептиды).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. № 3 (в печати). [Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2016. V. 42. № 3.]
2. Wimley W.C., Hristova K. // J. Membr. Biol. 2011. V. 239. № 1–2. P. 27–34.
3. Cruz J., Ortiz C., Guzmán F., Fernández-Lafuente R., Torres R. // Curr. Med. Chem. 2014. V. 21. № 20. P. 2299–2321.
4. Lee T.-H., Hall K.N., Aguilar M.-I. // Curr. Top. Med. Chem. 2016. V. 16. № 1. P. 25–39.
5. Matsuzaki K. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 1–10.
6. Brogden K.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 3. P. 238–250.
7. Silva F.D., Rezende C.A., Rossi D.C., Esteves E., Dyszy F.H., Schreier S., Gueiros-Filho F., Campos C.B., Pires J.R., Daffre S. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 50. P. 34735–34746.
8. Schmitt P., Wilmes M., Pugnère M., Aumelas A., Bachère E., Sahl H.-G., Schneider T., Destoumieux-Garzón D. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 38. P. 29208–29216.
9. Hetru C., Letellier L., Oren Z., Hoffmann J.A., Shai Y. // Biochem. J. 2000. V. 345. Pt 3. P. 653–664.
10. Wade D., Boman A., Wählin B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G., Merrifield R.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 12. P. 4761–4765.
11. Casteels P., Tempst P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 199. № 1. P. 339–345.
12. Fehlbaum P., Bulet P., Chernysh S., Briand J.P., Roussel J.P., Letellier L., Hetru C., Hoffmann J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 3. P. 1221–1225.
13. Roy R.N., Lomakin I.B., Gagnon M.G., Steitz T.A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2015. V. 22. № 6. P. 466–469.

14. Gagnon M.G., Roy R.N., Lomakin I.B., Florin T., Mankin A.S., Steitz T.A. // Nucl. Acids Res. 2016. doi 10.1093/nar/gkw018
15. Thevissen K., Warnecke D.C., François I.E., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B.P., Ferket K.K., Cammue B.P. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 6. P. 3900–3905.
16. Rosa R.D., Vergnes A., de Lorgeril J., Goncalves P., Perazzolo L.M., Sauné L., Romestand B., Fievet J., Gueguen Y., Bachère E., Destoumieux-Garzón D. // PLoS One. 2013. V. 8. № 7. P. e67937.
17. Bland J.M., De Lucca A.J., Jacks T.J., Vigo C.B. // Mol. Cell. Biochem. 2001. V. 218. № 1–2. P. 105–111.
18. Yeaman M.R., Yount N.Y. // Pharmacol. Rev. 2003. V. 55. № 1. P. 27–55.
19. Krizsan A., Knappe D., Hoffmann R. // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. V. 59. № 10. P. 5992–5998.
20. Snyder D.S., McIntosh T.J. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 38. P. 11777–11787.
21. Papo N., Shai Y. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 11. P. 10378–10387.
22. Joo H.-S., Otto M. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 11. Pt B. P. 3055–3061.
23. Malanovic N., Lohner K. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. doi 10.1016/j.bbamem.2015.11.004
24. Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffmann J.A., Letellier L. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 26. P. 19239–19245.
25. Lee I.H., Cho Y., Lehrer R.I. // Infect. Immun. 1997. V. 65. № 7. P. 2898–2903.
26. Lamberty M., Ades S., Uttenweiler-Joseph S., Brookhart G., Bushey D., Hoffmann J.A., Bulet P. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 14. P. 9320–9326.
27. Lee I.H., Zhao C., Nguyen T., Menzel L., Waring A.J., Sherman M.A., Lehrer R.I. // J. Pept. Res. 2001. V. 58. № 6. P. 445–456.
28. Taylor S.W., Craig A.G., Fischer W.H., Park M., Lehrer R.I. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 49. P. 38417–38426.
29. Relf J.M., Chisholm J.R., Kemp G.D., Smith V.J. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 264. № 2. P. 350–357.
30. Bechinger B. // J. Membr. Biol. 1997. V. 156. № 3. P. 197–211.
31. Gazit E., Boman A., Boman H.G., Shai Y. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 36. P. 11479–11488.
32. Chen F.-Y., Lee M.-T., Huang H.W. // Biophys. J. 2003. V. 84. № 6. P. 3751–3758.
33. Huang H.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. № 9. P. 1292–1302.
34. Wang W., Smith D.K., Moulding K., Chen H.M. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 42. P. 27438–27448.
35. Oishi O., Yamashita S., Nishimoto E., Lee S., Sugihara G., Ohno M. // Biochemistry. 1997. V. 36. № 14. P. 4352–4359.
36. Bilikova K., Huang S.-C., Lin I.-P., Šimuth J., Peng C.-C. // Peptides. 2015. V. 68. P. 190–196.
37. Martinez-Lopez A., Encinar J.A., Medina-Gali R.M., Balseiro P., Garcia-Valtanen P., Figueras A., Nova B., Estepa A. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 7. P. 2328–2346.
38. Lee J.-U., Kang D.-I., Zhu W.L., Shin S.Y., Hahn K.-S., Kim Y. // Biopolymers. 2007. V. 88. № 2. P. 208–216.
39. Fázio M.A., Oliveira V.X., Jr., Bulet P., Miranda M.T., Daffre S., Miranda A. // Biopolymers. 2006. V. 84. № 2. P. 205–218.
40. Domingues T.M., Perez K.R., Miranda A., Riske K.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 10. Pt A. P. 2414–2421.
41. Ramamoorthy A., Thennarasu S., Tan A., Gottipati K., Sreekumar S., Heyl D.L., An F.Y., Shelburne C.E. // Biochemistry. 2006. V. 45. № 20. P. 6529–6540.
42. Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochemistry. 2011. V. 50. № 28. P. 6255–6265.
43. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. № 2. P. 105–113.
44. Huang H.W. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 29. P. 8347–8352.
45. Baumann G., Mueller P. // J. Supramol. Struct. 1974. V. 2. № 5–6. P. 538–557.
46. Takeuchi K., Takahashi H., Sugai M., Iwai H., Kohno T., Sekimizu K., Natori S., Shimada I. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 6. P. 4981–4987.
47. Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. // Biochemistry. 1997. V. 36. № 32. P. 9799–9806.
48. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. // Biochemistry. 1996. V. 35. № 35. P. 11361–11368.
49. Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., Huang H.W. // Biochemistry. 1996. V. 35. № 43. P. 13723–13728.
50. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. // Biophys. J. 2001. V. 81. № 3. P. 1475–1485.
51. Imura Y., Nishida M., Ogawa Y., Takakura Y., Matsuzaki K. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. № 5. P. 1160–1169.
52. Sengupta D., Leontiadou H., Mark A.E., Marrink S.-J. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1778. № 10. P. 2308–2317.
53. Shai Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1462. № 1–2. P. 55–70.
54. Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 14. P. 5072–5076.
55. Gazit E., Miller I.R., Biggin P.C., Sansom M.S., Shai Y. // J. Mol. Biol. 1996. V. 258. № 5. P. 860–870.
56. Shai Y., Oren Z. // Peptides. 2001. V. 22. № 10. P. 1629–1641.
57. Wimley W.C. // ACS Chem. Biol. 2010. V. 5. № 10. P. 905–917.



58. Melo M.N., Ferre R., Castanho M.A. // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7. № 3. P. 245–250.
59. Melo M.N., Castanho M.A. // Front. Immunol. 2012. V. 3. P. 236.
60. Roversi D., Luca V., Aureli S., Park Y., Mangoni M.L., Stella L. // ACS Chem. Biol. 2014. V. 9. № 9. P. 2003–2007.
61. Steiner H., Andreu D., Merrifield R.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 939. № 2. P. 260–266.
62. Epand R.M., Epand R.F. // Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies / Ed. Wang G.; Wallingford: CABI, 2010. P. 116–127.
63. Nikaido H. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. № 4. P. 593–656.
64. Delcour A.H. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. № 5. P. 808–816.
65. dos Santos Cabrera M.P., Arcisio-Miranda M., Gorjão R., Leite N.B., de Souza B.M., Curi R., Procopio J., Ruggiero Neto J., Palma M.S. // Biochemistry. 2012. V. 51. № 24. P. 4898–4908.
66. Walkenhorst W.F., Klein J.W., Vo P., Wimley W.C. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 7. P. 3312–3320.
67. Sychev S.V., Balandin S.V., Panteleev P.V., Barsukov L.I., Ovchinnikova T.V. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. № 2. P. 71–76.
68. van Kan E.J., Demel R.A., Breukink E., van der Bent A., de Kruijff B. // Biochemistry. 2002. V. 41. № 24. P. 7529–7539.
69. Tu Z., Young A., Murphy C., Liang J.F. // J. Pept. Sci. 2009. V. 15. № 11. P. 790–795.
70. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 10. P. 7044–7054.
71. Nikaido H., Vaara M. // Microbiol. Rev. 1985. V. 49. № 1. P. 1–32.
72. Orvos L. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. № 7. P. 1138–1150.
73. Michaelson D., Rayner J., Couto M., Ganz T. // J. Leukoc. Biol. 1992. V. 51. № 6. P. 634–639.
74. Matsuzaki K. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. № 8. P. 1687–1692.
75. Browne N., Heelan M., Kavanagh K. // Virulence. 2013. V. 4. № 7. P. 597–603.
76. Gaspar D., Veiga A.S., Castanho M.A. // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 294.
77. Neuhaus F.C., Baddiley J. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. № 4. P. 686–723.
78. Bauer M.E., Shafer W.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 11. Pt B. P. 3101–3111.
79. LaRock C.N., Nizet V. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. № 11. Pt B. P. 3047–3054.
80. Hoess A., Watson S., Siber G.R., Liddington R. // EMBO J. 1993. V. 12. № 9. P. 3351–3356.
81. Sun C., Xu W.-T., Zhang H.-W., Dong L.-P., Zhang T., Zhao X.-F., Wang J.-X. // Fish Shellfish Immunol. 2011. V. 30. № 1. P. 295–303.
82. Somboonwiwat K., Bachère E., Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A. // Dev. Comp. Immunol. 2008. V. 32. № 10. P. 1170–1176.
83. Jaree P., Tassanakajon A., Somboonwiwat K. // Dev. Comp. Immunol. 2012. V. 38. № 4. P. 554–560.
84. Rittershaus P.C., Kechichian T.B., Allegood J.C., Merrill A.H., Hennig M., Luberto C., Del Poeta M. // J. Clin. Invest. 2006. V. 116. № 6. P. 1651–1659.
85. Noble S.M., French S., Kohn L.A., Chen V., Johnson A.D. // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 7. P. 590–598.
86. Zhu C., Wang M., Wang W., Ruan R., Ma H., Mao C., Li H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 455. № 3–4. P. 165–171.
87. Chen Y., Guarneri M.T., Vasil A.I., Vasil M.L., Mant C.T., Hodges R.S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. V. 51. № 4. P. 1398–1406.
88. Chou H.-T., Kuo T.-Y., Chiang J.-C., Pei M.-J., Yang W.-T., Yu H.-C., Lin S.-B., Chen W.-J. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2008. V. 32. № 2. P. 130–138.
89. Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M. // FEBS Lett. 2001. V. 501. № 2–3. P. 146–150.
90. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R.E. // Biochemistry. 1999. V. 38. № 22. P. 7235–7242.
91. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. № 8. P. 2086–2092.
92. Hale J.D., Hancock R.E. // Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2007. V. 5. № 6. P. 951–959.
93. Hancock R.E., Chapple D.S. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. № 6. P. 1317–1323.
94. Hancock R.E., Scott M.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 16. P. 8856–8861.
95. Mattiuzzo M., Bandiera A., Gennaro R., Benincasa M., Pacor S., Antcheva N., Scocchi M. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 1. P. 151–163.
96. Runti G., Lopez Ruiz M. del C., Stoilova T., Hussain R., Jennions M., Choudhury H.G., Benincasa M., Gennaro R., Beis K., Scocchi M. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 23. P. 5343–5351.
97. Laviña M., Pugsley A.P., Moreno F. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. № 6. P. 1685–1693.
98. Salomón R.A., Farías R.N. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. № 11. P. 3323–3325.
99. Yorgey P., Lee J., Kördel J., Vivas E., Warner P., Jebaratnam D., Kolter R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 10. P. 4519–4523.
100. Castle M., Nazarian A., Yi S.S., Tempst P. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 46. P. 32555–32564.
101. Cuthbertson B.J., Büllsbach E.E., Fievet J., Bachère E., Gross P.S. // Biochem. J. 2004. V. 381. Pt 1. P. 79–86.
102. Destoumieux D., Bulet P., Strub J.M., Van Dorsselaer A., Bachère E. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 266. № 2. P. 335–346.
103. Cudic M., Bulet P., Hoffmann R., Craik D.J., Orvos L. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 266. № 2. P. 549–558.

104. *Winans K.A., King D.S., Rao V.R., Bertozzi C.R.* // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 36. P. 11700–11710.
105. *Kim D.H., Lee D.G., Kim K.L., Lee Y.* // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 16. P. 4449–4458.
106. *Jung S., Dingley A.J., Augustin R., Anton-Erxleben F., Stanisak M., Gelhaus C., Gutschmann T., Hammer M.U., Podschun R., Bonvin A.M., Leippe M., Bosch T.C., Grötzinger J.* // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 3. P. 1896–1905.
107. *Michalek M., Vincent B., Podschun R., Grötzinger J., Bechinger B., Jung S.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 7. P. 2955–2966.
108. *Jung S., Sönnichsen F.D., Hung C.-W., Tholey A., Boidin-Wichlacz C., Haeusgen W., Gelhaus C., Desel C., Podschun R., Waetzig V., Tasiemski A., Leippe M., Grötzinger J.* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 17. P. 14246–14258.
109. *Robert É., Lefèvre T., Fillion M., Martial B., Dionne J., Auger M.* // *Biochemistry*. 2015. V. 54. № 25. P. 3932–3941.
110. *Wenzel M., Chiriac A.I., Otto A., Zweytick D., May C., Schumacher C., Gust R., Albada H.B., Penkova M., Krämer U., Erdmann R., Metzler-Nolte N., Straus S.K., Bremer E., Becher D., Brötz-Oesterhelt H., Sahl H.G., Bandow J.E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 14. P. E1409–1418.
111. *Carlsson A., Nyström T., de Cock H., Bennich H.* // *Microbiol. Read. Engl.* 1998. V. 144. Pt 8. P. 2179–2188.
112. *Axen A., Carlsson A., Engstrom A., Bennich H.* // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 247. № 2. P. 614–619.
113. *Hultmark D., Engstrom A., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H.G.* // *EMBO J.* 1983. V. 2. № 4. P. 571–576.
114. *Mackintosh J.A., Gooley A.A., Karuso P.H., Beattie A.J., Jardine D.R., Veal D.A.* // *Dev. Comp. Immunol.* 1998. V. 22. № 4. P. 387–399.
115. *Schneider T., Kruse T., Wimmer R., Wiedemann I., Sass V., Pag U., Jansen A., Nielsen A.K., Mygind P.H., Raventós D.S., Neve S., Ravn B., Bonvin A.M., De Maria L., Andersen A.S., Gammelgaard L.K., Sahl H.G., Kristensen H.H.* // *Science*. 2010. V. 328. № 5982. P. 1168–1172.
116. *de Leeuw E., Li C., Zeng P., Li C., Diepeveen-de Buin M., Lu W.-Y., Breukink E., Lu W.* // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. № 8. P. 1543–1548.
117. *Sass V., Schneider T., Wilmes M., Körner C., Tossi A., Novikova N., Shamova O., Sahl H.-G.* // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. № 6. P. 2793–2800.
118. *Oppedijk S.F., Martin N.I., Breukink E.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. doi 10.1016/j.bbame.2015.10.024
119. *Schneider T., Sahl H.-G.* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2010. V. 300. № 2–3. P. 161–169.
120. *Meeske A.J., Sham L.-T., Kimsey H., Koo B.-M., Gross C.A., Bernhardt T.G., Rudner D.Z.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 20. P. 6437–6442.
121. *Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 37. P. 26172–26178.
122. *Destoumieux D., Muñoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M., Bachère E.* // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113 ( Pt 3). P. 461–469.
123. *Bulet P., Urge L., Ohresser S., Hetru C., Orvos L.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 238. № 1. P. 64–69.
124. *Otvos L., Jr., O I., Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M.* // *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 46. P. 14150–14159.
125. *Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B.A., Hoffmann R., Otvos L., Jr.* // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 10. P. 3016–3026.
126. *Liebscher M., Roujeinikova A.* // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. № 5. P. 1456–1462.
127. *Berthold N., Hoffmann R.* // *Protein Pept. Lett.* 2014. V. 21. № 4. P. 391–398.
128. *Krizsan A., Volke D., Weinert S., Sträter N., Knappe D., Hoffmann R.* // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2014. V. 53. № 45. P. 12236–12239.
129. *Mardirossian M., Grzela R., Giglione C., Meinel T., Gennaro R., Mergaert P., Scocchi M.* // *Chem. Biol.* 2014. V. 21. № 12. P. 1639–1647.
130. *Tokunaga Y., Niidome T., Hatakeyama T., Aoyagi H.* // *J. Pept. Sci.* 2001. V. 7. № 6. P. 297–304.
131. *Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P.* // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 8. P. 2387–2391.
132. *Mackintosh J.A., Veal D.A., Beattie A.J., Gooley A.A.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 11. P. 6139–6143.
133. *Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R.B.* // *J. Pept. Res.* 1997. V. 49. № 1. P. 59–66.
134. *Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1760. № 11. P. 1732–1740.
135. *Paulsen V.S., Blencke H.-M., Benincasa M., Haug T., Eksteen J.J., Styrvold O.B., Scocchi M., Stensvåg K.* // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 1. P. e53326.
136. *Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y.* // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 11. P. 2998–3004.
137. *Hong J., Guan W., Jin G., Zhao H., Jiang X., Dai J.* // *Microbiol. Res.* 2015. V. 170. P. 69–77.
138. *Ivanovska I., Hardwick J.M.* // *J. Cell Biol.* 2005. V. 170. № 3. P. 391–399.
139. *Mazzoni C., Falcone C.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1783. № 7. P. 1320–1327.
140. *Reece S.E., Pollitt L.C., Colegrave N., Gardner A.* // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. № 12. P. e1002320.
141. *Ramsdale M.* // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. V. 15. № 6. P. 646–652.
142. *Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., De Laurenzi V.* // *Cell Death Dis.* 2015. V. 6. P. e1609.
143. *Cho J., Hwang I., Choi H., Hwang J.H., Hwang J.-S., Lee D.G.* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 22. № 11. P. 1457–1466.

144. Lee J., Hwang J.-S., Hwang I.-S., Cho J., Lee E., Kim Y., Lee D.G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 52. № 11–12. P. 2302–2311.
145. Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. // *FEBS Lett.* 2004. V. 577. № 1–2. P. 209–214.
146. Cho J., Lee D.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 12. P. 1246–1251.
147. Lee J., Lee D.G. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 355. № 1. P. 36–42.
148. Wang K., Dang W., Xie J., Zhu R., Sun M., Jia F., Zhao Y., An X., Qiu S., Li X., Ma Z., Yan W., Wang R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1848. № 10. Pt A. P. 2365–2373.
149. Hwang B., Hwang J.-S., Lee J., Kim J.-K., Kim S.R., Kim Y., Lee D.G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 408. № 1. P. 89–93.
150. Choi H., Hwang J.-S., Lee D.G. // *Insect Mol. Biol.* 2014. V. 23. № 6. P. 788–799.
151. Park C., Lee D.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. № 9. P. 1790–1796.
152. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F., García-Montoya I.A., Salazar-Martínez J., Rascón-Cruz Q. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2014. V. 35. № 5. P. 557–566.
153. Michels K., Nemeth E., Ganz T., Mehrad B. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. № 8. P. e1004998.
154. Johnstone T.C., Nolan E.M. // *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003. 2015. V. 44. № 14. P. 6320–6339.
155. Koh E.-I., Henderson J.P. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 31. P. 18967–18974.
156. Lamb A.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1854. № 8. P. 1054–1070.
157. Fogaca A.C., Lorenzini D.M., Kaku L.M., Esteves E., Bulet P., Daffre S. // *Dev. Comp. Immunol.* 2004. V. 28. № 3. P. 191–200.
158. Ridge P.G., Zhang Y., Gladyshev V.N. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 1. P. e1378.
159. Uvell H., Engstrom Y. // *Trends Genet. TIG.* 2007. V. 23. № 7. P. 342–349.
160. Imler J.-L. // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. V. 42. № 1. P. 3–15.
161. Smith V.J., Dyrynda E.A. // *Mol. Immunol.* 2015. V. 68. № 2. Pt B. P. 383–398.
162. Robb C.T., Dyrynda E.A., Gray R.D., Rossi A.G., Smith V.J. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4627.
163. Ng T.H., Wu M.-H., Chang S.-H., Aoki T., Wang H.-C. // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. V. 48. № 1. P. 229–233.
164. Blandin S., Moita L.F., Köcher T., Wilm M., Kafatos F.C., Levashina E.A. // *EMBO Rep.* 2002. V. 3. № 9. P. 852–856.
165. Shin S.W., Kokoza V.A., Raikhel A.S. // *J. Exp. Biol.* 2003. V. 206. Pt 21. P. 3835–3843.
166. Shockey J.E., O’Leary N.A., de la Vega E., Browdy C.L., Baatz J.E., Gross P.S. // *Dev. Comp. Immunol.* 2009. V. 33. № 5. P. 668–673.
167. Rahnamaeian M., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Dobszlaff K., Wiesner J., Twyman R.M., Zuchner T., Sadd B.M., Regoes R.R., Schmid-Hempel P., Vilcinskas A. // *Proc. Biol. Sci.* 2015. V. 282. № 1806. P. 20150293.
168. Rahnamaeian M., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Vilcinskas A. // *Peptides.* 2016.
169. Amparyup P., Donpudsa S., Tassanakajon A. // *Dev. Comp. Immunol.* 2008. V. 32. № 12. P. 1497–1509.
170. Chang Y.-T., Lin C.-Y., Tsai C.-Y., Siva V.S., Chu C.-Y., Tsai H.-J., Song Y.-L. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 8. P. e72793.
171. Sun Y., Shang D. // *Mediators Inflamm.* 2015. V. 2015. P. 167572.
172. Schmidtchen A., Malmsten M. // *J. Colloid Interface Sci.* 2015. V. 449. P. 136–142.
173. Li S., Guo S., Li F., Xiang J. // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. № 5. P. 2602–2616.
174. Chia T.-J., Wu Y.-C., Chen J.-Y., Chi S.-C. // *Fish Shellfish Immunol.* 2010. V. 28. № 3. P. 434–439.
175. Huang Z., Kingsolver M.B., Avadhanula V., Hardy R.W. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 8. P. 4272–4280.
176. Meng L., Xie Z., Zhang Q., Li Y., Yang F., Chen Z., Li W., Cao Z., Wu Y. // *J. Biol. Chem.* 2016.
177. Lai Y., Gallo R.L. // *Trends Immunol.* 2009. V. 30. № 3. P. 131–141.
178. Hancock R.E.W., Brown K.L., Mookherjee N. // *Immunobiology.* 2006. V. 211. № 4. P. 315–322.
179. Otero-González A.J., Magalhães B.S., Garcia-Villarino M., López-Abarrategui C., Sousa D.A., Dias S.C., Franco O.L. // *FASEB J.* 2010. V. 24. № 5. P. 1320–1334.
180. Vallespi M.G., Alvarez-Obregón J.C., Rodríguez-Alonso I., Montero T., Garay H., Reyes O., Araña M.J. // *Int. Immunopharmacol.* 2003. V. 3. № 2. P. 247–256.
181. Muñoz M., Vandenbulcke F., Saulnier D., Bachère E. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 11. P. 2678–2689.
182. Liu C.-C., Chung C.-P., Lin C.-Y., Sung H.-H. // *J. Invertebr. Pathol.* 2014. V. 116. P. 1–7.
183. Li C.-Y., Song Y.-L. // *Fish Shellfish Immunol.* 2010. V. 29. № 6. P. 1044–1052.
184. Kurata S., Arika S., Kawabata S.-I. // *Immunobiology.* 2006. V. 211. № 4. P. 237–249.
185. Chen J., Xu X.-M., Underhill C.B., Yang S., Wang L., Chen Y., Hong S., Creswell K., Zhang L. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 11. P. 4614–4622.
186. Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Леонова Т.С., Мильман Б.Л., Краснодарская А.Д., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н. // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. № 6. С. 597–601. [Berlov M.N., Umnyakova E.S., Leonova T.S., Milman B.L., Krasnodembskaya A.D., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2015. V. 41. № 6. P. 664–668.]
187. Komano H., Homma K., Natori S. // *FEBS Lett.* 1991. V. 289. № 2. P. 167–170.

**Antimicrobial Peptides of Invertebrates.  
Part 2. Biological Functions and Mechanisms of Action**

**S. V. Balandin, T. V. Ovchinnikova<sup>#</sup>**

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 336-44-44; fax: +7 (495) 336-43-33; e-mail: ovch@ibch.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

Antimicrobial peptides (AMPs) of invertebrate animals are characterized by a wide variety of mechanisms of action that are not restricted to disruption of the barrier function of the target membrane, but also include specific inhibition of metabolism processes by ligand-receptor interactions with specific molecules on the surface or within the cell. Endogenous AMPs can play a role of mediators of immune response (immunomodulators), activating phagocytosis and chemotaxis, and stimulating the cytokines production. The second part of the review focuses on biological functions and mechanisms of action of invertebrate AMPs. A problem of biological significance of antimicrobial properties displayed *in vitro* is reviewed. The main mechanisms of membrane perturbation (barrel-stave channel, toroidal pore, carpet model) are described, and the principle of target selectivity is analyzed. The data on alternative mechanisms of antimicrobial action, such as inhibition of transcription and translation, sequestration of metal ions, inhibition of bacterial and fungal cell wall biosynthesis, are presented. A number of examples demonstrate the regulatory activity of invertebrate AMPs.

*Keywords: antimicrobial peptides, innate immunity, peptide antibiotics, ion channels, immunomodulators*