

УДК 577.3

Дизайн стабильных α -спиральных пептидов и термостабильных белков в биотехнологии и биомедицине

А. П. Якимов^{1,2*}, А. С. Афанасьева^{1,2}, М. А. Ходорковский¹, М. Г. Петухов^{1,2}¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща, 1

*E-mail: yaleks@nanobio.spbstu.ru

Поступила в редакцию 19.06.2016

Принята к печати 28.09.2016

РЕФЕРАТ Наиболее часто встречающимся элементом вторичной структуры во многих глобулярных водорастворимых белках и пептидах являются α -спирали. Повышенная конформационная стабильность α -спиралей – одна из главных причин высокой термостабильности белков термофильных бактерий. Кроме того, α -спирали часто участвуют во взаимодействиях белков не только с другими белками, но и с нуклеиновыми кислотами, а также с липидами клеточных мембран. Именно поэтому конструирование высокостабильных α -спиральных пептидов, используемых в качестве высокоактивных и высокоспецифичных ингибиторов межбелковых и других взаимодействий, в последнее время находит все больше практических применений в медицине. Для улучшения конформационной стабильности α -спиральных пептидов и термостабильных белков в последнее время разработано несколько подходов, которые мы обсудим в этом обзоре. Кроме того, будут рассмотрены методы улучшения прохождения пептидов и белков через клеточные мембраны и устойчивости к действию внутриклеточных протеаз. Особое внимание уделено методу SEQOPT (<http://mml.spbstu.ru/services/seqopt/>), который используется для конструирования конформационно стабильных коротких α -спиралей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА α -спираль, конформационная стабильность, проницаемость мембран, сопротивляемость внутриклеточному протеолизу, факторы термостабильности.

СОКРАЩЕНИЯ SEQOPT – метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей; МД – метод молекулярной динамики; НС (alpha-helix content) – содержание (%) α -спиральной конформации в белке; PDB – база данных пространственных структур белков; AGADIR, ALB, HELIX – статистико-механические модели, описывающие конформационные переходы α -спираль-клубок в коротких мономерных пептидах; КД – спектроскопия кругового дихроизма.

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования α -спиральных пептидов, проведенные за последние четверть века, не только способствовали лучшему пониманию сворачивания белка в нативную, биологически активную конформацию, но и представляют значительный интерес для разработки лекарственных препаратов, эффективных при заболеваниях, связанных с нарушениями межбелковых взаимодействий [1–3]. С начала 1990-х годов собран большой объем экспериментальных данных по сворачиванию и стабильности α -спиралей в мономерных пептидах [4, 5]. Эти данные показывают, что аминокислотные последовательности α -спиралей, как правило, не оптимизированы для обеспечения высокой конформационной

стабильности. Это может быть важным фактором в предотвращении накопления ошибочных интермедиатов сворачивания глобулярных белков. Поэтому конструирование коротких α -спиральных пептидов и белков с достаточной конформационной стабильностью при заданных условиях среды (температуры, рН и ионной силы) по-прежнему остается интересной и практически важной проблемой белковой инженерии [1, 6].

Огромный объем экспериментальных данных по физическим взаимодействиям, которые влияют на стабильность α -спиралей в белках и мономерных пептидах, позволяет создать теоретические модели, описывающие переходы α -спираль-клубок, и разработать на этой основе новые высокоэффек-

тивные вычислительные методы конструирования α -спиральных пептидов с высокой конформационной стабильностью.

Стабилизацию α -спиралей неоднократно использовали для конструирования промышленно важных ферментов, способных работать при повышенных температурах [7, 8]. В представленной работе обсуждаются также различные способы повышения термостабильности глобулярных белков, включая такие молекулярные механизмы, как изменения аминокислотного состава белков термофильных организмов, введение дополнительных ионных пар и водородных связей, использование аминокислот с повышенной склонностью к α -спиральной конформации, образование дополнительных дисульфидных мостиков, усиление гидрофобных взаимодействий, замены на остатки пролина в петлях, связывание с ионами металлов, более плотная упаковка и др.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ

Термостабильные ферменты используются во многих современных биотехнологических процессах как в лабораторных условиях, так и в широкомасштабном промышленном производстве [9, 10].

Природным источником термофильных белков служат гипертермофильные микроорганизмы, оптимально растущие при температурах от 80 до 110°C. Эти организмы, первоначально найденные в горячих геотермальных источниках, относятся в основном к архебактериям. Ферменты из этих организмов также имеют оптимум активности при высоких температурах (>70°C), а некоторые из них активны при температурах значительно выше 100°C. При этом термостабильные ферменты обычно неактивны при температурах ниже 40°C [11].

Способность надежно предсказывать такие основные физико-химические свойства мутантных белков, как стабильность и растворимость в воде, имеет большое значение в молекулярной биологии и биотехнологии. Ранее во многих работах изучали факторы, влияющие на стабильность и растворимость белков, а также разрабатывали модели для предсказания последствий точечных мутаций в белках [11–14]. В настоящее время ясно, что существует много факторов, которые могут повредить стабильности белковой структуры или ее активности.

Особенности структурной организации термостабильных белков и ферментов, позволяющие им функционировать при температуре 100°C и выше, активно изучали как в экспериментальных, так и в теоретических работах с середины 80-х годов (всего, согласно базе данных Medline, опубликовано около 3000 работ) [12, 15–18].

В основе дискуссии лежит сравнительный анализ гомологичных белков из мезофильных и термофильных микроорганизмов (далее мезофильных и термофильных белков соответственно). Описанные к настоящему времени пространственные структуры термостабильных белков не выявили в организации вторичной или третичной структуры какой-либо особенности, специфичной только для термофилов, по сравнению с их мезофильными аналогами. Различия же, выявляемые на уровне аминокислотных последовательностей, весьма разнородны. Такое разнообразие характеристик терморезистентных белков может быть вызвано тем, что термофильность обусловлена суммированием действия различных факторов, возникающих благодаря подходящей комбинации слабых взаимодействий, вовлеченных в стабилизацию белка.

Недавно показали, что механизмы адаптации к высоким температурам у разных организмов могут зависеть от их эволюционной истории [19]. Вместе с тем замечено, что аминокислотные замены, предположительно сопряженные с терморезистентностью белка, часто локализуются в α -спиральных [20–22]. Следовательно, анализ энергетического баланса молекулярных взаимодействий внутри α -спиралей может прояснить причины стабильности термофильных белков при высоких температурах.

Изменения в аминокислотном составе белков термофильных организмов

Изменения в аминокислотном составе белков термофильных организмов по сравнению с их мезофильными аналогами были одним из первых исследованных факторов, влияющих на термостабильность [23, 24]. Этот статистический анализ показал, что в термофильных белках остатки глицина, серина, лизина и аспарагиновой кислоты часто заменены на аланин, треонин, аргинин и глутаминовую кислоту соответственно [25]. Функция этих замен в основном состоит в повышении внутренней и понижении внешней гидрофобности термостабильных белков. Кроме того, эти замены несколько усиливают стабильность α -спиралей и плотность упаковки аминокислот в термостабильных белках. В последнее время предприняты многие дополнительные исследования различных физических факторов, которые могут приводить к изменению аминокислотного состава термофильных белков (см. обзор на эту тему [18]).

В серии работ [26–28] нами показано, что α -спираль термостабильных белков в целом более конформационно стабильна, чем такие же α -спираль из высокоомологичных белков мезофильных и психрофильных бактерий. При этом состав α -спиралей термостабильных белков меняется за счет увели-

чения содержания аминокислот с высокой склонностью к образованию α -спиралей (аланин, лейцин) и соответственно уменьшения содержания β -разветвленных остатков (валин, изолейцин и треонин). Кроме того, обнаружено значительное увеличение представленности аминокислот, которые могут стабилизировать α -спирали за счет сильных взаимодействий их боковых цепей с боковыми цепями других аминокислот (например, глутаминовой кислоты и аргинина). Сходные результаты получены и в работе других исследователей, которые также обнаружили значительное уменьшение содержания β -разветвленных остатков с низкой склонностью к образованию α -спиралей в термофильных белках [29].

В работе Matthews и соавт. [30] показано, что введение остатков пролина повышает термостабильность белка за счет уменьшения энтропии развернутого состояния.

Дополнительные гидрофобные взаимодействия являются важным механизмом стабилизации структуры в термостабильных белках. Показано, что в среднем каждая дополнительная метильная группа, погруженная в структуру белка, добавляет примерно 1.3 (± 0.5) ккал/моль в стабильность свернутой конформации белка [31].

Ионные пары и связывание с ионами металлов

Сравнение пространственных структур термофильных белков и их аналогов из мезофильных организмов показало, что первые часто имеют существенно большее количество ионных пар, которые значительно стабилизируют их структуру при высоких температурах [32]. Один из наиболее ярких примеров такого рода – увеличение содержания ионных пар, наблюдаемое в гипертермофильной люмазинсинтазе из *Aquifexa olicus* по сравнению с ее мезофильным аналогом из *Bacillus subtilis* более чем на 90% [33].

Уже давно известно, что ионы металлов часто стабилизируют и активируют некоторые ферменты. Например, изомераза ксилозы из *Streptomyces rubiginosus* связывает два иона из набора Co^{2+} , Mg^{2+} или Mn^{2+} , один из которых непосредственно вовлечен в катализ, а второй преимущественно в стабилизацию структуры фермента [34]. Показано, что некоторые термостабильные ферредоксины содержат атомы металлов, которых нет в их мезофильных гомологах [35].

Увеличение количества нековалентных взаимодействий

Предполагается, что увеличение нелокальных нековалентных взаимодействий (например, ионных пар, водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых контак-

тов), связывающих несмежные части белка, может значительно улучшать термостабильность белка. Данные, накопленные в последнее время, в целом подтверждают эту гипотезу. Например, на основе гомологичных белков рубредоксинов из *Pyrococcus furiosus* и *Clostridium pasteurianum* построены химеры [36]. Относительные стабильности этих химер по сравнению с рубредоксинами *P. furiosus* и *C. pasteurianum* указывают на существенные для термостабильности белка взаимодействия между ядром белка и одним из β -листов за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Причем отдельно ни ядро, ни β -лист не обеспечивают необходимую стабилизацию. Сравнение одинаковых белков из термофильных и мезофильных организмов (373 пары белков http://phys.protres.ru/resources/termo_meso_base.html) показало, что первые имеют более плотно упакованную опушку глобулы, а плотность упаковки внутренней части белка и его ядра сворачивания примерно одинакова в обоих случаях [37].

Водородные связи

Другой такой фактор – образование дополнительных водородных связей, стабилизирующих структуру многих термостабильных белков при высоких температурах [38–40]. В частности, изучение механизма влияния водородных связей на термостабильность РНКазы T1 показало, что каждая дополнительная водородная связь в среднем добавляет 1.3 ккал/моль в стабильность этого белка [38].

В другой работе [39] обнаружили сильную корреляцию между термостабильностью белка GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и количеством водородных связей между полярными незаряженными группами в нем. Предположили, что существуют две основные причины, объясняющие, как наличие дополнительных водородных связей может влиять на термостабильность белка: 1) энергия дегидратации таких групп намного меньше, чем энергия дегидратации заряженных групп ионных пар; 2) выигрыш в энтальпии для таких водородных связей значительно выше из-за электростатических заряд-дипольных взаимодействий.

Образование дисульфидных мостиков

Образование дополнительных дисульфидных мостиков – еще один важный фактор, стабилизирующий структуру белка при высоких температурах [41, 42]. Как полагают, этот эффект главным образом связан с уменьшением конфигурационной энтропии развернутого состояния белка.

В некоторых случаях эффект введения в структуру белка множественных дисульфидных мостиков имел аддитивный характер [43]. В частности, в моле-

куле лизоцима фага T4 (фермент без дисульфидов) были спроектированы мутанты с дисульфидными мостами между остатками 3–97, 9–164 и 21–142, которые оказались значительно более термостабильными, чем белок дикого типа.

Однако в других случаях такая аддитивность отсутствовала [42, 44, 45]. Более того, в некоторых случаях образование дисульфидных мостиков вообще не влияет на термостабильность белка [45] или даже понижает ее [42], что указывает на наличие в структуре белка участков с различной термочувствительностью. Интересно, что, по крайней мере в некоторых случаях, величина эффекта термостабилизации белка с помощью искусственных дисульфидных мостиков примерно пропорциональна логарифму количества аминокислотных остатков, разделяющих два остатка цистеина, образующих дисульфидный мостик [16, 43].

В последнее время этот подход к конструированию термостабильных белков приобрел дополнительную популярность в связи с появлением новых теоретических подходов, позволяющих на основе известной пространственной структуры белка рассчитывать не только все возможные комбинации искусственных дисульфидных мостиков, но и примерно оценивать их энергию и вероятность самопроизвольного образования [46].

Направленная эволюция

Основным экспериментальным методом улучшения свойств ферментов является метод направленной эволюции [47]. Главное преимущество этого подхода состоит в том, что он не требует знания никаких деталей структуры изменяемого фермента. Метод основан на контролируемом экспериментатором процессе искусственной ускоренной эволюции микроорганизмов, поставленных в жесткие условия окружающей среды. В отличие от естественной эволюции, это более интенсивный и избирательный процесс, он имеет определенную специфическую цель, ограничен во времени и имитирует такие протекающие в природе процессы, как случайный мутагенез, рекомбинации и отбор.

Работы по направленной эволюции промышленно важных белков с помощью химического и радиационного мутагенеза начали проводить с начала 80-х годов, а в 90-х они получили широкое развитие в связи с наступлением эры промышленной молекулярной биотехнологии. Бурное развитие этой отрасли диктуется необходимостью получения новых все более эффективных и безопасных для здоровья человека биокатализаторов природного происхождения. В 1994 г. появился новый подход – метод перетасовки ДНК [48], который доказал свою эффективность, и на его

основе было создано множество различных разновидностей основного варианта. Например, с помощью этого подхода получен термостабильный субтилизин E, в 15 раз более активный, чем белок дикого типа из *B. subtilis* при 37°C [49]. Изучение его структуры показало, что большинство мутаций, приводящих к повышению термостабильности белка, находятся в петлях, соединяющих элементы вторичной структуры [50]. В другом эксперименте термостабильность и активность *n*-нитробензолэстеразы из *B. subtilis* были увеличены с помощью пяти циклов неточного ПЦР, сопровождаемых одним шагом перетасовки ДНК [51]. Термостабильность мутантного белка увеличилась на 10°C, а активность была выше, чем у фермента дикого типа при любой температуре.

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Для предсказания конформационной стабильности белков и конструирования термостабильных мутантов были предложены многие теоретические модели и компьютерные алгоритмы, основанные на физических и химических принципах [52–54]. Полученные результаты достаточно убедительно показывают, что эти подходы могут стать надежным инструментом белковой инженерии в ближайшем будущем.

Метод молекулярной динамики (МД) – один из основных, хорошо зарекомендовавших себя вычислительных подходов к моделированию конформационной подвижности белков, сворачивания их в нативную конформацию и рационального дизайна мутантов с измененными свойствами [55]. Для того чтобы устранить необходимость моделировать слишком длинные молекулярно-динамические траектории, создана теоретическая модель и соответствующее программное обеспечение, позволяющее предсказывать подвижные и более стабильные области в белках с известной пространственной структурой без моделирования детальной молекулярной динамики этого белка [56].

Многочисленные траектории МД того же самого белка при идентичных условиях позволяют определить структуру и последовательность его промежуточных состояний при термическом разворачивании [57]. Эти наблюдения могут обеспечить подсказки о том, как ферменты начинают разворачиваться и какие их области наиболее подходят для стабилизации [58].

Кроме МД применяются и другие подходы, основанные на современных методах перебора и оптимизации энергии конформеров боковых цепей аминокислотных остатков исследуемых белков [59]. Например, используя компьютерный алгоритм глобальной оптимизации, основанный на ДЭЕ-теореме, накладывающей условия для выявления ротаме-

ров, которые не могут быть членами конформации, обладающей глобальным минимумом энергии [60]. При помощи данного подхода был сконструирован термостабильный мутант G-белка стрептококка [61]. Мутантный белок имел температуру плавления более 100°C, что на 20°C больше по сравнению с белком дикого типа.

Недавно был разработан энергетический потенциал для оценки влияния точечных мутаций на стабильность глобулярных белков с известной пространственной структурой [62]. Эти расчеты доступны также через Интернет-сервер <http://foldx.embl.de/>. Расчеты включают не только оценки изменения свободной энергии белка при заменах аминокислот, но и расчеты положения заряженных групп, водных мостиков и центров связывания металлов, которые также могут оказывать значительное влияние на конформационную стабильность белков.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КОНФОРМАЦИОННУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ α -СПИРАЛЕЙ В КОРОТКИХ ПЕПТИДАХ

В отличие от белков в коротких пептидах длиной 10–20 остатков, отсутствуют многие возможности стабилизации структуры, которые есть у глобулярных белков. Еще в начале 80-х годов считалось, что короткие пептиды не могут поддерживать стабильные конформации в воде даже при относительно низких температурах [63]. Однако в середине 70-х годов в теоретических работах Финкельштейна и Птицына было предсказано, что короткие пептиды, состоящие из аминокислот с высокой склонностью к α -спиральной структуре, могут иметь достаточно стабильные α -спиральные конформации в водных растворах [64–68]. Позднее эти теоретические предсказания были подтверждены экспериментально на основе исследования синтетических пептидов, последовательности которых повторяли последовательности α -спиралей рибонуклеазы А [69, 70]. Теоретическая модель, разработанная Финкельштейном и Птицыным, описывает вероятность образования α -спиралей, β -структур и изгибов в коротких пептидах и глобулярных белках на основе классического подхода Зима–Брэгга с модификациями, позволяющими учесть некоторые дополнительные взаимодействия, такие, как электростатические взаимодействия заряженных боковых цепей между собой и с макродиполем α -спирали, а также гидрофобные взаимодействия боковых цепей некоторых аминокислот. На основе этой теоретической модели создана компьютерная программа (ALB), способная успешно предсказывать не только примерный уровень конформационной стабильности α -спиральных пептидов [4], но и, с вероятностью ~65%, распреде-

ление элементов вторичной структуры в глобулярных белках [71]. Основным недостатком этой модели – отсутствие учета некоторых взаимодействий (например, так называемый CappingBox и/или наличие пролина в первом N-концевом положении α -спирали), позиционных зависимостей склонности аминокислот в первом и последнем витке спирали, а также влияние различных специальных последовательностей соседних с α -спиралью участков рассматриваемого пептида, которые, как показано позднее, играют значительную роль в стабилизации α -спиральной конформации в белках и пептидах.

Начиная с конца 80-х и особенно в 90-е годы, описано большое количество экспериментов, в которых для изучения различных взаимодействий в α -спиралях использовали аминокислотные замены в коротких синтетических пептидах на основе полиаланина [72]. Этот подход позволил накопить достаточно данных и перейти к количественному описанию кооперативных механизмов конформационных переходов в α -спиральную конформацию для пептидов с произвольными последовательностями [5, 73].

В настоящее время считается, что у каждой из 20 природных аминокислот имеется характерная внутренняя, связанная с ковалентной структурой, тенденция к участию в образовании α -спиральных конформаций в пептидах и белках (например, изменения конфигурационной энтропии боковых цепей аминокислот при переходе из случайной в α -спиральную конформацию) [74]. Кроме этого, на стабильность α -спиральных конформаций белков влияют взаимодействия боковых цепей (между остатками в положениях $i, i+3$ и $i, i+4$), электростатические взаимодействия заряженных и полярных остатков с макродиполем α -спирали и Capping-взаимодействия между остатками, примыкающими к α -спирали со свободными NH- и CO-группами основной цепи белка в первом и последнем витке α -спирали [5, 73].

Кроме того, описаны локальные мотивы аминокислотных последовательностей, включающие остатки, прилегающие к α -спирали, которые либо специфически упаковываются против остатков первого (N-концевого) и последнего (C-концевого) витка спирали, либо образуют с ними сеть специфических водородных связей [75].

Обычно предполагается, что структурные склонности аминокислот не зависят от их положения в α -спирали [4, 76, 77]. Однако первый и последний виток α -спирали не эквивалентны остальной части спирали. Как можно видеть из *рис. 1*, подвижность боковой цепи валина в центральных позициях спирали сильно ограничена по сравнению с положением в ее первом витке. Отсутствие учета этого фактора

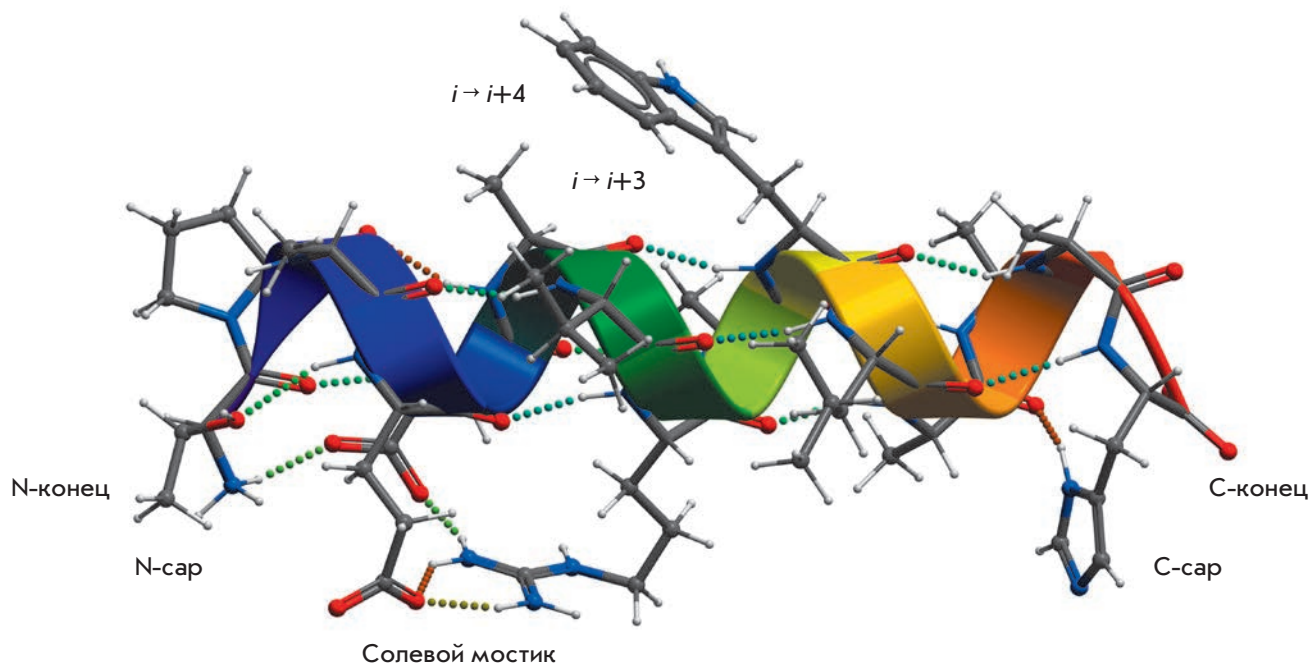


Рис. 1. Структура и факторы, влияющие на конформационную стабильность α -спиралей в белках и мономерных пептидах

значительно снижает точность теоретических моделей переходов α -спираль/случайный клубок в описании экспериментальных наблюдений по измерению стабильности α -спиральных пептидов со сложными аминокислотными последовательностями [78–80].

ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ α -СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Поскольку α -спирали часто служат структурной основой межмолекулярных интерфейсов белковых комплексов, их часто используют в разработках пептидных ингибиторов, направленных против образования этих комплексов. Прицельное разрушение определенных белок-белковых взаимодействий с помощью α -спиральных или β -структурных пептидов является актуальной проблемой химической биологии, активно решаемой в настоящее время.

Однако использование пептидных ингибиторов имеет свои серьезные ограничения. Прежде всего, это недостаточная стабильность α -спиральной конформации коротких пептидов с аминокислотными последовательностями, полученными из природных белков. Кроме того, такие пептиды плохо проникают через клеточную мембрану и легко деградируются протеазами. В течение последних 30 лет разработаны различные методологии химической модификации коротких α -спиральных пептидов для повышения стабильности α -спиральных конформаций, а также их устойчивости к действию

протеаз (рис. 2). Химические модификации для стабилизации α -спиральных конформаций включают: 1) введение в аминокислотную последовательность пептида остатков с ограниченной подвижностью, таких, как α - α -диалкилированные остатки [81]; 2) ковалентное сшивание боковых цепей аминокислот, расположенных на соседних витках α -спиралей, включая образование ковалентных мостиков на основе дисульфидных связей [82], лактамных структур [83] и углеводов [3]; 3) кэппинг группы на N- или C-концах пептида [84]; а также различные комбинации всего вышеперечисленного [2].

В некоторых случаях химические модификации, стабилизирующие α -спирали, одновременно оказались способными улучшить и клеточную проницаемость этих пептидов, что делает их хорошими ингибиторами внутриклеточных мишеней. В частности, за последнее время появилось большое количество данных о повышенной проницаемости мембран некоторых типов раковых клеток человека для химически модифицированных α -спиральных пептидов [85].

КОНСТРУИРОВАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ α -СПИРАЛЕЙ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ГЛОБАЛЬНОЙ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Одним из эффективных способов решения задачи стабилизации структуры биологически активных

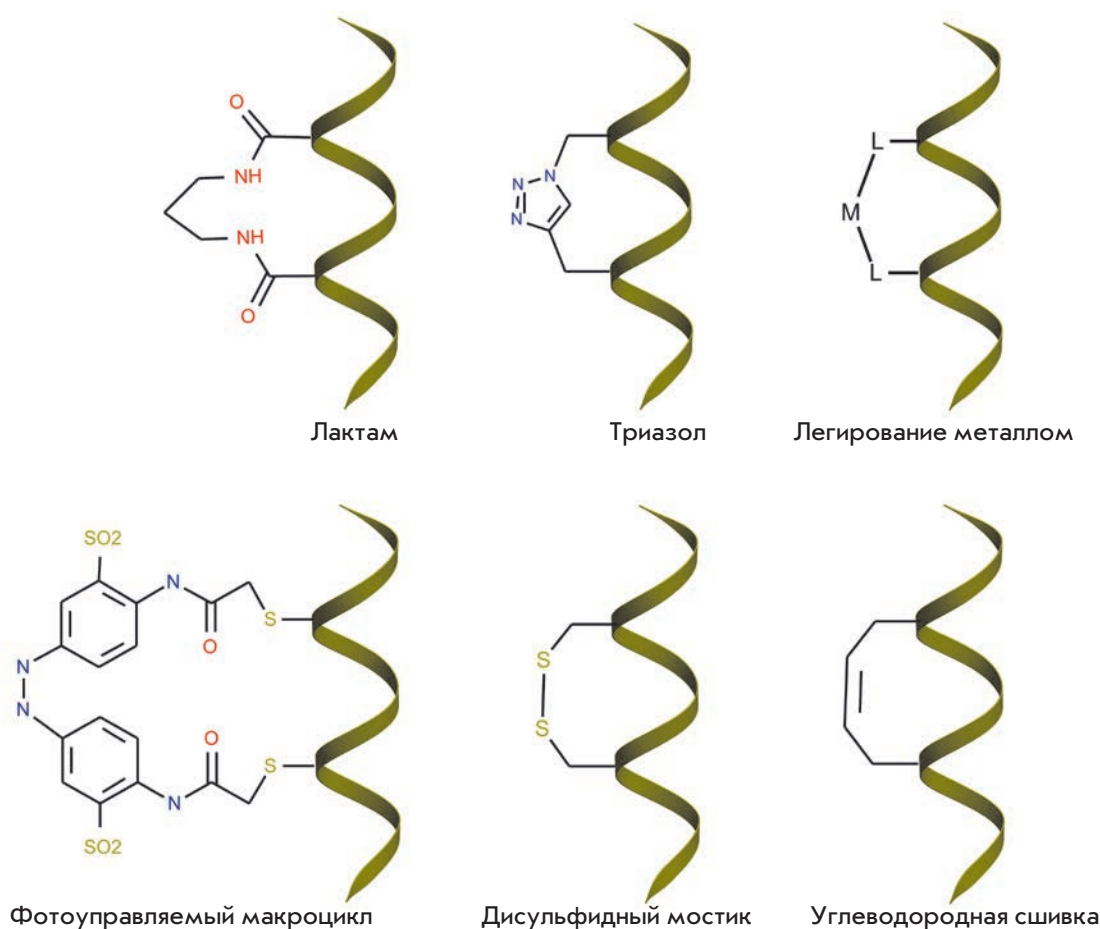


Рис. 2. Основные способы химических модификаций для увеличения конформационной стабильности α -спиральных структур

α -спиральных пептидов с использованием только природных аминокислот является SEQOPT – недавно разработанный метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей в мономерных пептидах и глобулярных белках [1]. Этот метод позволяет конструировать α -спирали белков с максимально возможной конформационной стабильностью при данных условиях (конформационное окружение, pH, температура и ионная сила раствора) с помощью глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей с произвольным фиксированием любых комбинаций аминокислот. Теоретической основой предлагаемого метода является модель AGADIR, описывающая термодинамику сворачивания α -спиралей при различных условиях окружающей среды (температура, pH и ионная сила раствора и т.д.) [77], успешно использованная также для конструирования мутантных белков с повышенной конформационной стабильностью [7]. Эта модель хорошо воспроизводит имеющиеся экспериментальные данные по стабильности α -спиральной конформации огромного количества коротких пептидов [73, 77–80, 86–88].

Зависимость энергетических параметров модели от температуры, pH и ионной силы растворителя была включена в расчеты как описано в работе [86].

Хотя гарантированная сходимость к глобальному минимуму в настоящее время не может быть получена для большинства практически значимых многомерных задач, показано, что разработанный метод имеет высокую эффективность в оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиральных пептидов. Измерения КД нескольких синтетических пептидов с оптимизированными последовательностями оказались в хорошем согласии с теоретическими расчетами как в терминах абсолютных, так и относительных величин α -спирального содержания [6].

Как известно, короткие пептиды обычно весьма подвижны и не имеют какой-то одной выделенной конформации. На рис. 3 представлены распределения заселенностей всех возможных сегментов в коротких пептидах длиной 13 аминокислотных остатков. Последовательность (AETAAKFLRANA) одного из этих пептидов (см. панель 3A) соответствует α -спирали С рибонуклеазы А – одного из первых пептидов, значительная стабильность α -спиральной

конформации которого в воде (НС ~21%, 5°C, pH 7, ионная сила 100 ммоль/л, N- и C-концы ацетилированы и амидированы соответственно) показана экспериментально. Для сравнения на *рис. 3Б* представлены данные для пептида такой же длины, но имеющего оптимизированную последовательность DYMERWYRYYNEF и НС ~ 88%.

Из этих рисунков видно, что у пептида с аминокислотной последовательностью, взятой из глобулярного белка, в растворе заселенными оказались в основном несколько спиральных сегментов, начинающихся с аланина в четвертом положении. При этом заселенности каждого такого сегмента меняются случайным образом в зависимости от его длины и соответственно аминокислот С-концевой части данного участка. В результате первые четыре, а также последние две аминокислоты этого пептида почти не имеют шансов участвовать в образовании α -спиральной конформации, средняя длина которой около шести аминокислотных остатков. В результате спиральное содержание этого пептида довольно низкое – около 21%.

Оптимизированная последовательность, в отличие от природной, ведет себя совершенно иным образом. Наиболее высокую заселенность имеет спиральный сегмент, покрывающий всю последовательность пептида. Следующими по заселенности идут сегменты, отличающиеся от максимально длинного одним или двумя остатками, потерявшими α -спиральную конформацию с N- и C-концов.

В результате общее спиральное содержание пептида с оптимизированной последовательностью достигает почти 90%. Естественно, с увеличением длины пептида стабильность α -спиральной конформации возрастает, приближаясь к 100%. Значительно выше и средняя длина α -спирального участка пептида. Эти результаты показывают не только возможности метода SEQOPT, но и то, что потенциал 20 природных кислот вполне позволяет получать достаточно стабильные конформации в коротких α -спиральных пептидах длиной всего 10–20 остатков.

В обновленной версии SEQOPT (сервер доступен <http://mml.spbstu.ru/services/seqopt/>, см. *рис. 4*) введена новая, практически важная функция алгоритма, позволяющая установить минимально допустимый уровень растворимости α -спиральных пептидов с оптимизированными последовательностями. Насколько известно авторам, это первая работа в новой и многообещающей области глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей белков.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ ПЕПТИДОВ

В последнее время высокостабильные α -спиральные пептиды, используемые в качестве высокоактивных

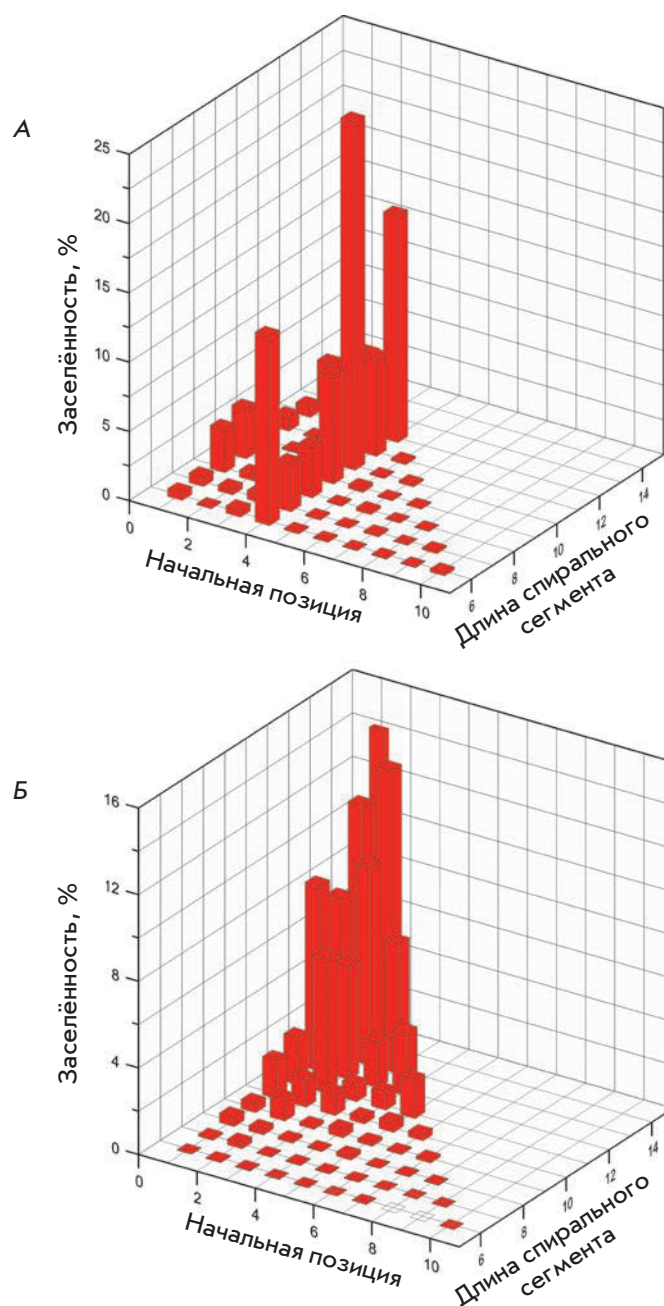


Рис. 3. Распределение заселенностей всех возможных сегментов в коротких пептидах длиной 13 аминокислотных остатков (согласно AGADIR [77]). А – С-пептид из рибонуклеазы А (ac-AETA AAKFLRAHA-nh2) [69, 70]; Б – пептид с оптимизированной последовательностью такой же длины ac-DYMERWYRYYNEF-nh2

и высокоспецифичных ингибиторов межбелковых взаимодействий, находят все большее практическое применение в медицине в качестве антибиотиков различного назначения, а также для разрушения некоторых комплексов, играющих ключевую

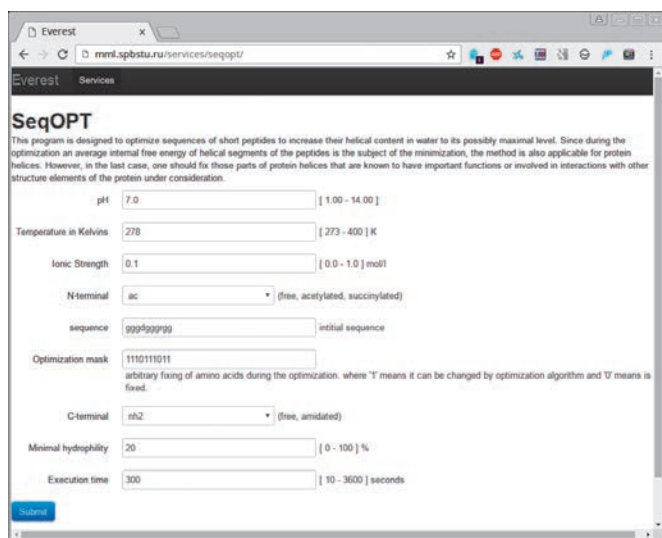


Рис. 4. Изображение интерфейса программы SEQOPT для задания таких параметров, как рН, температура, ионная сила, начальная последовательность для оптимизации и фиксируемые положения аминокислотных остатков, требования по минимальной растворимости, время расчета

роль в жизнедеятельности клеток человека [2]. Одна из главных проблем использования пептидов в медицине состоит в возможности их проникновения через клеточные мембраны.

Клеточная стенка препятствует попаданию чужеродных молекул внутрь клетки, что затрудняет использование сконструированных высокостабильных пептидов в терапевтических целях. Известно несколько подходов к решению этой проблемы. Один из них основан на использовании специальных рецепторов, распознающих определенные химические

соединения и включающих механизмы активного транспорта внутрь клетки [89]. Другим способом является разрушение клеточной мембраны и проникновение сквозь открывшиеся поры.

Известен и хорошо изучен целый класс пептидов, обладающих антимикробными свойствами и проникающих сквозь клеточные мембраны, в том числе способных переносить через мембрану как другие пептиды, так и химические соединения другой природы [102, 103]. Эти пептиды были выделены из белков различных организмов – от вирусов до высших (табл. 1).

Успешное применение пептидов с антибактериальной активностью для доставки лекарственных средств внутрь клеток показано в ряде экспериментов [101, 104, 105], при этом эффективность их проникновения в различные клетки существенным образом не отличается. Сигнальные пептиды другой группы также способны проникать в клетки. Общий механизм их действия остается неустановленным [89]. В табл. 2 представлены аминокислотные последовательности пептидов и указана их способность проникать в клетки одноклеточных микроорганизмов.

Эти пептиды могут быть синтезированы или клонированы вместе с необходимыми терапевтическими агентами.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ α -СПИРАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Одна из основных проблем, ограничивающих развитие пептидных терапевтических средств, – их неустойчивость к протеолизу и связанные с этим проблемы с доставкой к молекулярным мишеням. Протеолиз обычно происходит в кишечнике, в ми-

Таблица 1. Наиболее часто используемые пептиды с антибактериальной активностью, способные проникать сквозь клеточную мембрану

Пептид	Аминокислотная последовательность	Вторичная структура	Ссылка
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	α -спиральная	[90]
Tat	GRKKRRQRRRPPQ	неструктурированная, PPII-спиральная	[91]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	α -спиральная	[92]
S4 ₁₃ -PV	ALWKTLKKVLPKAPKKKRKV	α -спиральная	[93]
Magainin 2	GIGKFLHSAKFKGKAFVGEIMNS	α -спиральная	[94]
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	α -спиральная	[95]
Apidacins	RP - - - - PRPPHR	неструктурированная	[96]
Transportan (TP10)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	α -спиральная	[97]
MAP	KLALKLALKALKALKLA	α -спиральная	[98]
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	α -спиральная	[99]
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	α -спиральная	[100]
Bac7	PFPRGPRPIRPLPFPRGPRPIPRP	PPII- и α -спиральная	[101]

Таблица 2. N-Концевые пептиды, способствующие проникновению в клетки микроорганизмов

Аминокислотная последовательность	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ссылка
VLTNENPFSDP	+		+	+		[106]
YKKSNNPFSD		+		+	+	[107]
RSNNPFRAR	+	+	+			[107]
CMVSCAMPNPF					+	[108]
LLDLMD	+					[109]
LMDLAD	+				+	[109]
RQIKIWFQNRMRKWKK	+					[110]
YGRKKRRQRRRCKGGAKL			+			[110]
CFFKDEL					+	[111]
GASDYQLGCG		+			+	[111]

кроворсинках на внутренних стенках тонкого кишечника, в энтероцитах, гепатоцитах, антигенпредставляющих клетках и плазме, поэтому пероральное применение пептидных препаратов, как правило, не представляется возможным и требуется инъекционное введение. Однако даже при парентеральном введении деградация пептидных препаратов в крови в сочетании с быстрой почечной фильтрацией делают применение пептидных препаратов дорогим и неудобным [112]. Кроме того, синтетические терапевтические пептиды, как правило, по большей части неструктурированы и поэтому быстро расщепляются в естественных условиях внутриклеточными протеазами, часто с периодом полураспада порядка минут.

Устойчивость α -спиральных пептидов к действию протеаз можно усилить путем введения различных факторов, стабилизирующих конформационную стабильность α -спирали, – дополнительных солевых мостиковых связей или других модификаций, таких, как лактамные мостики [113, 114], а также образования пептидных олигомерных структур [115].

Поскольку природные пептиды в целом обладают сравнительно коротким временем жизни в плазме, для его увеличения разработаны несколько подходов. Первый подход направлен на ограничение ферментативной деградации путем выявления возможных сайтов расщепления пептида с последующими структурными модификациями, например, замещением аминокислот в сайте расщепления. Повысить степень устойчивости пептидов к расщеплению можно также путем усовершенствования укладки вторичной структуры пептида. Такой подход предполагает использование структурно-индуцированных проб – (SIP)-хвост, лактамных мостиков, а также сшивки либо циклизацию пептидной цепи [3, 83, 116].

Для увеличения времени жизни пептида используют также стратегии связывания пептидов с циркулирующим белком альбумином в качестве транс-

портного средства и пептидное ацилирование [117]. Связывание полиэтиленгликоля с пептидами часто применяют для увеличения периода полувыведения пептидных препаратов из плазмы крови [118].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы биологически активные пептиды приобретают все большую популярность в качестве потенциальных лекарственных средств в связи с их высокой активностью, нетоксичностью и умеренной стоимостью. Проблемы, связанные с недостаточной конформационной стабильностью, способностью проникать через клеточные мембраны, а также с быстрой деградацией внутриклеточными протеазами, в значительной мере удается преодолеть с помощью современных методов конструирования высокостабильных пептидов на основе только природных аминокислот или с использованием нескольких типов их химических модификаций. SEQOPT – недавно разработанный вычислительный метод конструирования α -спиральных пептидов, содержащих только 20 природных аминокислот, позволяет получать пептиды с максимально возможной стабильностью их α -спиральной конформации. Метод позволяет учесть конформационное окружение, условия окружающей среды (рН, температура и ионная сила раствора), минимально допустимый уровень растворимости, а также произвольно фиксировать любые комбинации аминокислот, необходимые для биологической активности пептидов. Конформационная стабильность мономерных пептидов с оптимизированной структурой приближается к конформационной стабильности α -спиральных участков вторичной структуры глобулярных белков. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-34-00023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yakimov A., Rychkov G., Petukhov M. // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1216. P. 1–14.
2. Estieu-Gionnet K., Guichard G. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2011. V. 6. № 9. P. 937–963.
3. Robertson N.S., Jamieson A.G. // *Repts Organic Chem.* 2015. V. 5. P. 65–74.
4. Finkelstein A.V., Badretdinov A.Y., Ptitsyn O.B. // *Proteins.* 1991. V. 10. № 4. P. 287–299.
5. Doig A.J. // *Biophys. Chem.* 2002. V. 101–102. P. 281–293.
6. Petukhov M., Tatsu Y., Tamaki K., Murase S., Uekawa H., Yoshikawa S., Serrano L., Yumoto N. // *J. Pept. Sci.* 2009. V. 15. № 5. P. 359–365.
7. Villegas V., Viguera A.R., Aviles F.X., Serrano L. // *Fold Des.* 1996. V. 1. № 1. P. 29–34.
8. Суржик М.А., Чуркина С.В., Шмидт А.Е., Швецов А.В., Кожина Т.Н., Фирсов Д.Л., Фирсов Л.М., Петухов М.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 2. С. 221–227.
9. Bruins M.E., Janssen A.E., Boom R.M. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 90. № 2. P. 155–186.
10. Глик Б., Пастернак Д. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.* М.: Мир, 2002.
11. Razvi A., Scholtz J.M. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. № 7. P. 1569–1578.
12. Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R. // *Genet. Mol. Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 816–827.
13. Mozo-Villiarías A., Querol E. // *Curr. Bioinformatics.* 2006. V. 1. № 1. P. 25–32.
14. Li W.F., Zhou X.X., Lu P. // *Biotechnol. Adv.* 2005. V. 23. № 4. P. 271–281.
15. Ladenstein R., Antranikian G. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1998. V. 61. P. 37–85.
16. Vieille C., Zeikus G.J. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. № 1. P. 1–43.
17. Sterner R., Liebl W. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2001. V. 36. № 1. P. 39–106.
18. Zhou X.X., Wang Y.B., Pan Y.J., Li W.F. // *Amino Acids.* 2008. V. 34. № 1. P. 25–33.
19. Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 36. P. 12742–12747.
20. Menendez-Arias L., Argos P. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 206. № 2. P. 397–406.
21. Wetmur J.G., Wong D.M., Ortiz B., Tong J., Reichert F., Gelfand D.H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 41. P. 25928–25935.
22. Britton K.L., Baker P.J., Borges K.M., Engel P.C., Pasquo A., Rice D.W., Robb F.T., Scandurra R., Stillman T.J., Yip K.S. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 229. № 3. P. 688–695.
23. Argos P., Rossman M.G., Grau U.M., Zuber H., Frank G., Tratschin J.D. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. № 25. P. 5698–5703.
24. Bohm G., Jaenicke R. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1994. V. 43. № 1. P. 97–106.
25. Zeldovich K.B., Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. // *PLoS Comput. Biol.* 2007. V. 3. № 1. P. e5.
26. Petukhov M., Kil Y., Kuramitsu S., Lanzov V. // *Proteins.* 1997. V. 29. № 3. P. 309–320.
27. Петухов М.Г., Киль Ю.В., Ланцов В.А. // *ДАН.* 1997. Т. 356. № 2. С. 268–271.
28. Петухов М.Г., Байтин Д.М., Киль Ю.В., Ланцов В.А. // *ДАН.* 1998. Т. 362. № 1. С. 118–121.
29. Facchiano A.M., Colonna G., Ragone R. // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 9. P. 753–760.
30. Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. № 19. P. 6663–6667.
31. Pace C.N. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. № 1. P. 29–35.
32. Matsui I., Harata K. // *FEBS J.* 2007. V. 274. № 16. P. 4012–4022.
33. Zhang X., Meining W., Fischer M., Bacher A., Ladenstein R. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 306. № 5. P. 1099–1114.
34. Whitlow M., Howard A.J., Finzel B.C., Poulos T.L., Winborne E., Gilliland G.L. // *Proteins.* 1991. V. 9. № 3. P. 153–173.
35. Fujii T., Hata Y., Oozeki M., Moriyama H., Wakagi T., Tanaka N., Oshima T. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 6. P. 1505–1513.
36. Eidsness M.K., Richie K.A., Burden A.E., Kurtz D.M., Jr., Scott R.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 34. P. 10406–10413.
37. Glyakina A.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 17. P. 2231–2238.
38. Shirley B.A., Stanssens P., Hahn U., Pace C.N. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 3. P. 725–732.
39. Tanner J.J., Hecht R.M., Krause K.L. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 8. P. 2597–2609.
40. Jaenicke R., Bohm G. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. V. 8. № 6. P. 738–748.
41. Matsumura M., Matthews B.W. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 202. P. 336–356.
42. Суржик М.А., Шмидт А.Е., Глазунов Е.А., Фирсов Д.Л., Петухов М.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2014. Т. 50. № 2. С. 139–146.
43. Matsumura M., Signor G., Matthews B.W. // *Nature.* 1989. V. 342. № 6247. P. 291–293.
44. Fierobe H.P., Stoffer B.B., Frandsen T.P., Svensson B. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 26. P. 8696–8704.
45. Li Y., Coutinho P.M., Ford C. // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 8. P. 661–667.
46. Dombkowski A.A. // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. № 14. P. 1852–1853.
47. Jackel C., Kast P., Hilvert D. // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 153–173.
48. Stemmer W.P. // *Nature.* 1994. V. 370. № 6488. P. 389–391.
49. Zhao H., Arnold F.H. // *Protein Eng.* 1999. V. 12. № 1. P. 47–53.
50. Mamonova T.B., Glyakina A.V., Kurnikova M.G., Galzitskaya O.V. // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2010. V. 8. № 3. P. 377–394.
51. Giver L., Gershenson A., Freskgard P.O., Arnold F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 22. P. 12809–12813.
52. Lippow S.M., Tidor B. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 4. P. 305–311.
53. Kang S.G., Saven J.G. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. V. 11. № 3. P. 329–334.
54. Marti S., Andres J., Moliner V., Silla E., Tunon I., Bertran J. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. № 12. P. 2634–2643.
55. Morra G., Meli M., Colombo G. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2008. V. 9. № 2. P. 181–196.
56. Jacobs D.J., Rader A.J., Kuhn L.A., Thorpe M.F. // *Proteins.* 2001. V. 44. № 2. P. 150–165.
57. Lazaridis T., Karplus M. // *Science.* 1997. V. 278. № 5345. P. 1928–1931.
58. Lazaridis T., Lee I., Karplus M. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 12. P. 2589–2605.
59. Galzitskaya O.V., Higo J., Finkelstein A.V. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2002. V. 3. № 2. P. 191–200.
60. Desmet J., De Maeyer M., Hazes B., Lasters I. // *Nature.* 1992. V. 356. № 6369. P. 539–542.
61. Malakauskas S.M., Mayo S.L. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 6. P. 470–475.
62. Schymkowitz J.W., Rousseau F., Martins I.C., Ferkinghoff-Borg J., Stricher F., Serrano L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 29. P. 10147–10152.

63. Shoemaker K.R., Kim P.S., Brems D.N., Marqusee S., York E.J., Chaiken I.M., Stewart J.M., Baldwin R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 8. P. 2349–2353.
64. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *J. Mol. Biol.* 1976. V. 103. № 1. P. 15–24.
65. Finkelstein A.V. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 525–529.
66. Финкельштейн А.В. // *Мол. биол.* 1977. Т. 11. С. 811–819.
67. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 469–495.
68. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B., Kozitsyn S.A. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 497–524.
69. Bierczynski A., Kim P.S., Baldwin R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 8. P. 2470–2474.
70. Kim P.S., Baldwin R.L. // *Nature*. 1984. V. 307. № 5949. P. 329–334.
71. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. М.: Книжный дом «Университет», 2002.
72. Scholtz J.M., Baldwin R.L. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1992. V. 21. P. 95–118.
73. Munoz V., Serrano L. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. № 6. P. 399–409.
74. Creamer T.P., Rose G.D. // *Proteins*. 1994. V. 19. № 2. P. 85–97.
75. Doig A.J., Baldwin R.L. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 7. P. 1325–1336.
76. Stapley B.J., Rohl C.A., Doig A.J. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 11. P. 2383–2391.
77. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. № 3. P. 275–296.
78. Petukhov M., Munoz V., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. № 1. P. 279–289.
79. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 10. P. 2144–2150.
80. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Serrano L. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. № 4. P. 766–777.
81. Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Peggion C. // *Biopolymers*. 2001. V. 60. № 6. P. 396–419.
82. Ravi A., Prasad B.V.V., Balaram P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. № 1. P. 105–109.
83. Taylor J.W. // *Biopolymers*. 2002. V. 66. № 1. P. 49–75.
84. Chapman R.N., Dimartino G., Arora P.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 39. P. 12252–12253.
85. Chu Q., Moellering R.E., Hilinski G.J., Kim Y.-W., Grossmann T.N., Yeh J.T.H., Verdine G.L. // *Med. Chem. Comm.* 2015. V. 6. № 1. P. 111–119.
86. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. № 3. P. 297–308.
87. Petukhov M., Yumoto N., Murase S., Onmura R., Yoshikawa S. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 2. P. 387–397.
88. Lacroix E., Viguera A.R., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. № 1. P. 173–191.
89. Rajarao G.K., Nekhotiaeva N., Good L. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 215. № 2. P. 267–272.
90. Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 14. P. 10444–10450.
91. Vives E., Brodin P., Lebleu B. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 25. P. 16010–16017.
92. Morris M.C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 14. P. 2730–2736.
93. Hariton-Gazal E., Feder R., Mor A., Graessmann A., Brack-Werner R., Jans D., Gilon C., Loyter A. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 29. P. 9208–9214.
94. Zasloff M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. № 15. P. 5449–5453.
95. Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 1. P. 253–257.
96. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 8. P. 2387–2391.
97. Pooga M., Hallbrink M., Zorko M., Langel U. // *FASEB J.* 1998. V. 12. № 1. P. 67–77.
98. Steiner V., Schar M., Bornsen K.O., Mutter M. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 586. № 1. P. 43–50.
99. Neundorf I., Rennert R., Hoyer J., Schramm F., Löbner K., Kitanovic I., Wöfl S. // *Pharmaceuticals*. 2009. V. 2. № 2. P. 49.
100. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y. // *Biochem. J.* 1999. V. 341 (Pt 3). P. 501–513.
101. Otvos L., Jr., Cudic M., Chua B.Y., Deliyannis G., Jackson D.C. // *Mol. Pharm.* 2004. V. 1. № 3. P. 220–232.
102. Splith K., Neundorf I. // *Eur. Biophys. J.* 2011. V. 40. № 4. P. 387–397.
103. Henriques S.T., Melo M.N., Castanho M.A. // *Biochem. J.* 2006. V. 399. № 1. P. 1–7.
104. Rousselle C., Clair P., Lefauconnier J.M., Kaczorek M., Scherrmann J.M., Temsamani J. // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 57. № 4. P. 679–686.
105. Splith K., Hu W., Schatzschneider U., Gust R., Ott I., Onambele L.A., Prokop A., Neundorf I. // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. № 7. P. 1288–1296.
106. Tan P.K., Howard J.P., Payne G.S. // *J. Cell Biol.* 1996. V. 135. № 6. Pt 2. P. 1789–1800.
107. Paoluzi S., Castagnoli L., Lauro I., Salcini A.E., Coda L., Fre S., Confalonieri S., Pelicci P.G., Di Fiore P.P., Cesareni G. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 22. P. 6541–6550.
108. Fernandez-Chacon R., Achiriloaie M., Janz R., Albanesi J.P., Sudhof T.C. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 17. P. 12752–12756.
109. Rosenthal J.A., Chen H., Slepnev V.I., Pellegrini L., Salcini A.E., Di Fiore P.P., De Camilli P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 48. P. 33959–33965.
110. Schwartz J.J., Zhang S. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000. V. 2. № 2. P. 162–167.
111. Pap E.H., Dansen T.B., van Summeren R., Wirtz K.W. // *Exp. Cell Res.* 2001. V. 265. № 2. P. 288–293.
112. Weinstock M.T., Francis J.N., Redman J.S., Kay M.S. // *Biopolymers*. 2012. V. 98. № 5. P. 431–442.
113. Houston M.E., Jr., Campbell A.P., Lix B., Kay C.M., Sykes B.D., Hodges R.S. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 31. P. 10041–10050.
114. Houston M.E., Jr., Gannon C.L., Kay C.M., Hodges R.S. // *J. Pept. Sci.* 1995. V. 1. № 4. P. 274–282.
115. Jeong W.J., Lee M.S., Lim Y.B. // *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. № 8. P. 2684–2689.
116. Sim S., Kim Y., Kim T., Lim S., Lee M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 50. P. 20270–20272.
117. Bao W., Holt L.J., Prince R.D., Jones G.X., Aravindhan K., Szapacs M., Barbour A.M., Jolivet L.J., Lepore J.J., Willette R.N., et al. // *Cardiovasc. Diabetol.* 2013. V. 12. P. 148.
118. Delgado C., Francis G.E., Fisher D. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992. V. 9. № 3–4. P. 249–304.