

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Опарин Петр Борисович

α -Гарпинины - защитные пептиды растений

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук Василевский Александр Александрович

Официальные оппоненты:

Конарев Александр Васильевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории энтомологии и иммунитета растений к вредителям, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений

Ефимов Александр Васильевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий группой моделирования белковых структур, заместитель директора Института белка РАН

Ведущая организация:

Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”

Защита состоится 25 июня 2014 года в 10 ч 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В. А.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Значительный ущерб мировому сельскому хозяйству, наряду с неблагоприятными климатическими условиями, наносят вредители и всевозможные растительные инфекции. Так, потери урожая основных культур, вызванные патогенами и насекомыми, составляют от 5 до 50%. В то же время возможность расширения сельскохозяйственных территорий неуклонно снижается, а потребление растительного сырья растет с каждым годом. Отсюда очевидно, что увеличение производства должно происходить скорее за счет интенсификации в области агрикультуры путем увеличения продуктивности и устойчивости культурных растений к неблагоприятным факторам.

В ходе эволюции растения выработали комплексную систему защиты, направленную против всевозможных вредителей от микроорганизмов до насекомых и травоядных млекопитающих и основанную на использовании широкого спектра химических веществ различной природы. Среди них большое количество защитных полипептидов, которые условно можно разделить на полипептиды с массой свыше 10 кДа: ферменты, некоторые запасные белки, токсины, такие как рибосом-инактивирующие белки и др.; и защитные пептиды (ЗП) с массой до 10 кДа: антимикробные пептиды (АМП), ингибиторы протеаз и амилаз, лектины и т.п. Стоит отметить, что понятия ЗП и АМП зачастую применяются разными авторами для обозначения одних и тех же групп пептидов, что связано в первую очередь с отсутствием единой системы классификации, структурным сходством различных семейств и их функциональным многообразием.

АМП растений обладают широким спектром действия в отношении растительных патогенов, насекомых-вредителей, а также, по всей видимости, способны участвовать в защите от абиотического стресса (температурного, солевого и т.п.). Предполагается, что основной мишенью АМП являются цитоплазматические мембраны клеток. Однако детальный механизм их действия до сих пор остается не выясненным, и существующие гипотетические модели являются достаточно дискуссионными. В то же время все больше данных указывают на наличие неких внутриклеточных мишеней действия АМП. Большинство известных к настоящему времени АМП растений являются катионными цистеин-богатыми пептидами с достаточно стабильной пространственной структурой. На основании структурной организации их принято разделять на несколько семейств: дефензины,

тионины, гевеиноподобные пептиды и т.д. В то же время существуют АМП, которые не относятся ни к одному из них и, по всей видимости, будут позднее причислены к самостоятельным группам.

Ингибиторы протеаз в растениях могут принимать участие в защите как от всевозможных патогенов, подавляя активность внеклеточных ферментов, так и от различных травоядных животных, ингибируя их пищеварительные ферменты. Ингибиторы протеаз – значительно более гетерогенная группа пептидов, чем АМП, насчитывающая десятки семейств, выделенных по принципу специфичности и особенностей структурной организации.

Изучение ЗП, очевидно, представляет интерес не только в связи с возможностью их использования в сельскохозяйственной биотехнологии, но и с точки зрения фундаментальной науки – для установления взаимосвязи функции и определяющих ее структурных детерминант, а также механизмов молекулярной эволюции и межвидовой коэволюции в системе патоген-хозяин. Кроме того, для некоторых ЗП растений была показана ингибирующая активность в отношении ряда человеческих патогенов, что делает их возможными кандидатами для использования в клинике в качестве антимикробных агентов нового поколения.

Цель и задачи работы. Целью данной работы было структурное и функциональное исследование нового семейства защитных пептидов растений. В соответствии с этим были поставлены следующие практические задачи:

1. Получить рекомбинантные аналоги пептидов исследуемой группы.
2. Провести комплексное изучение активности и сравнительный анализ структуры полученных пептидов.
3. Путем направленного мутагенеза получить новые молекулы с заданной функцией.

Научная новизна

1. Определена первичная структура нового ингибитора сериновых протеаз BWI-2с из семян гречихи культурной *Fagopyrum esculentum*.
2. Установлено существование нового семейства ЗП растений, получившего название α -гарпинины.
3. Получен ряд рекомбинантных аналогов α -гарпининов, с их помощью проведено комплексное исследование их структурных и функциональных особенностей.

4. Проведен дизайн и синтез ряда мутантов α -гарпининов, осуществлено исследование их активности.
5. Впервые показано структурное сходство ЗП растений данной группы с некоторыми токсинами ядовитых животных.

Практическая значимость

Полученные данные показали, что представители нового семейства ЗП растений являются эффективными антифунгальными агентами и в перспективе могут быть использованы для получения трансгенных культур с повышенной устойчивостью к различным видам патогенов. Использование именно растительных пептидов в данном случае представляется наиболее выгодным с точки зрения биоэтики и биобезопасности. Кроме того, проведенная нами работа по получению мутантных производных свидетельствует в пользу того, что структура α -гарпининов позволяет рассматривать их как основу в скаффолд-инженерии при разработке новых пептидных агентов с заданной функцией.

Апробация диссертации

Основные материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и симпозиумах:

Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008», секция «Биология» (Москва, 8-11 апреля 2008), IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 23-27 июня 2009), XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля 2010), Школа-конференция «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины» (Москва, 16-17 сентября 2010), Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Москва, 9-12 ноября 2010), XXXVI конгресс Федерации европейских биохимических сообществ (Турин, Италия, 25-30 июня 2011), V Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 8-12 августа 2011), Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», секция «Биология» (Москва, 9-12 апреля 2012), Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 11 апреля 2012), XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 11-15 февраля 2013), VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Уфа, 11-15 июня 2013).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 106 страницах, содержит 15 рисунков 2 таблицы. Имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, выводы и список литературы, включающий 347 источников.

Содержание работы

Выбор объектов исследования

В данной работе рассматриваются ЗП гречихи культурной (*Fagopyrum esculentum*) и пшеницы гексаплоидной (*Triticum kiharae*), являющихся широко распространенными и высокозначимыми сельскохозяйственными культурами на территории Российской Федерации. Кроме того, исследовались пептиды из двух дикорастущих сорных растений: звездчатки средней (*Stellaria media*) и ежовника обыкновенного (*Echinochloa crus-galli*). Выбор последних обусловлен тем, что сорные растения проявляют гораздо более высокий уровень устойчивости в отношении патогенов и вредителей, а зачастую и к искусственным гербицидам, в сравнении с культурными. Во всех случаях пептиды были выделены из семян, как из наиболее богатого источника ЗП. Многие семейства АМП были впервые обнаружены именно в семенах, и, как правило, их концентрация там значительно выше, чем в других органах растений. Ингибиторы протеаз, по всей видимости, участвуют не только в защите от негативного внешнего воздействия, но также регулируют активность эндопротеаз, задействованных в гидролизе запасных белков, что и обуславливает их высокое содержание в запасных тканях.

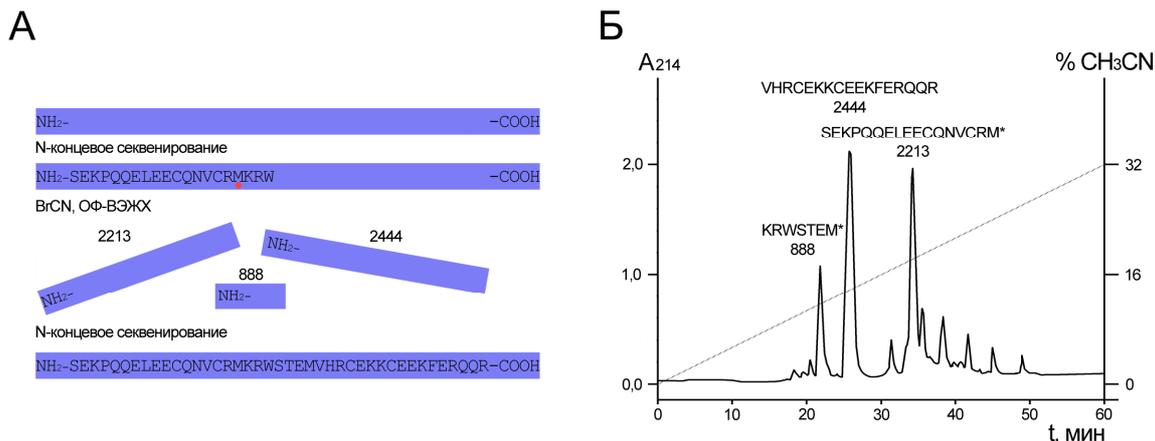
Новый ингибитор трипсина из семян гречихи

В ходе работы по поиску новых растительных ингибиторов сериновых протеаз сотрудниками НИИ ФХБ МГУ, а также ИБХ РАН из семян *F. esculentum* был выделен ряд веществ полипептидной природы, обладавших ингибиторной активностью в отношении трипсина. Для этого из белковой фракции семян гречихи в несколько этапов хроматографическими методами (аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе 4В, ионообменной хроматографии на анионообменной смоле Mono-Q и катионообменной смоле Mono-S) были выделены несколько фракций, обладавших трипсин-ингибирующей активностью. Последующая работа велась с фракцией катионных ингибиторов, удерживаемых на смоле Mono-S. После инкубации полученных фракций с пепсином, они не проявляли активности в отношении трипсина, что свидетельствует в пользу полипептидной природы выделенных ингибиторов. Дальнейшая работа проводилась нами в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

Следующим этапом очистки функционально активного соединения была выбрана обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

(ОФ-ВЭЖХ). Молекулярная масса вещества из мажорной фракции, измеренная с помощью масс-спектрометрии, составила 5182,0 Да. Этот пептид получил название BWI-2с.

Рисунок 1. А – схема установления аминокислотной последовательности пептида BWI-2с. Б – профиль хроматографического разделения продуктов гидролиза BWI-2с бромцианом в градиенте концентрации ацетонитрила (показан пунктирной линией). Числами обозначены массы соответствующих фрагментов.



Поскольку молекулы пептидных ингибиторов из растений, как правило, содержат дисульфидные связи, мы проанализировали выделенный пептид BWI-2с на наличие S-S-мостов. Масса алкилированного без предварительного восстановления BWI-2с не изменилась. Масса восстановленного и алкилированного пептида составила 5606,5 Да. Таким образом было установлено, что BWI-2с содержит в своем составе четыре остатка полуцистеина, образующих две внутримолекулярные дисульфидные связи. Далее методом секвенирования по Эдману была установлена последовательность из 20 N-концевых аминокислотных остатков (а.о.) ингибитора. Присутствие в составе данной последовательности остатка метионина позволило провести селективный гидролиз полипептидной цепи бромцианом. Полученные продукты реакции были разделены с помощью ОФ-ВЭЖХ и проанализированы масс-спектрометрически. Полная аминокислотная последовательность пептида была установлена путем секвенирования полученных фрагментов и сопоставления их последовательностей с уже имеющейся N-концевой (рисунок 1). Таким образом было определено, что BWI-2с представляет собой пептид, состоящий из 41 а.о., четыре из которых являются остатками цистеина, образующими две внутримолекулярные дисульфидные связи и формирующими два мотива CX₃C, где X – любой а.о. Так как масса пептида,

измеренная методом масс-спектрометрии, совпадает с массой, рассчитанной исходя из аминокислотной последовательности, можно утверждать, что других модификаций пептид не содержит.

Новое семейство защитных пептидов растений

Сравнение первичной структуры BWI-2с с уже известными белковыми последовательностями выявило лишь небольшое сходство (31% идентичных а.о.) с вицилиноподобным белком из гречихи. Наличие двух мотивов CX₃C также характерно для еще одного пептидного ингибитора трипсина – VhTI из вероники плющелистной (*Veronica hederifolia*) (рисунок 2).

Рисунок 2. Аминокислотные последовательности α-гарпининов, их производных и структурно родственных пептидов. Справа указаны длины аминокислотных последовательностей. Черным цветом закрашены остатки цистеина, снизу показано расположение S-S связей. Светло-серым цветом закрашены а.о. пептида BWI-2с, перенесенные в состав его производных, серым цветом – а.о., перенесенные из κ-хефутоксина 1 в Tk-heful, темно-серым – остатки метионина в Sm-AMP-C4 и соответствующие им остатки лейцина в Sm-AMP-C4-L. Подчеркиванием отмечена пара аргинин-триптофан в составе BWI-2с и его мутанта BWI-2с-WR.

* – Природные пептиды, исследовавшиеся в данной работе, ** – их производные.

* BWI-2с	-SEKPQ Q EELEECQNVGRMKR-WSTEM-VHRC E KKCEEKFERQQR-----	41
** BWI-2с-WR	-SEKPQ Q EELEECQNVGRMKW-RSTEM-VHRC E KKCEEKFERQQR-----	41
** BWI-x1	-----CQNVGRMKR-WSTEM-VHRC E KKCE-----	23
** BWI-x2	-----GRMKR-WSTEM-VHRC E -----	15
* Tk-AMP-X2	----ADDR--CERM C QRYH-D-RREKKQ-CMKGCRYG-----	28
** Tk-Mut-1	----ADDR--CERM C QRYR-WSTREKKQ-CMKGCRYG-----	29
** Tk-Mut-2	----ADDR--CERM C QMKR-WSTREKKQ-CMKGCRYG-----	29
** Tk-Mut-3	----ADDR--CERM C QMKR-WSTEMKKQ-CMKGCRYG-----	29
κ-hefutoxin 1	-----GHAC Y RNCWR----EGNDEETCKERC-----	22
** Tk-heful	----ADDR--CYRM C QRYH-D-RREKKQ-CKEGCRYG-----	28
* Ec-AMP-1	----GSGRGS C RSQCMRRH-EDEPWRVQECV S Q C RRRRGGGD-----	37
** Ec-AMP-M	----GSGRGS C RSQCMRRR-WSTP E RVQECV S Q C RRRRGGGD-----	37
* Sm-AMP-C4	---VDPDV R AYCKH Q CMSTRGDQAR--KI-CESV C MRQD-----	33
** Sm-AMP-C4-L	---VDPDV R AYCKH Q CMSTRGDQAR--KI-CESV C MRQD-----	33
** Sm-AMP-x1	-----CKH Q CMSTRGDQAR--KI-CESV C M-----	22
** Sm-AMP-x2	-----CMSTRGDQAR--KI-CE-----	14
VhTI	----NT-DPEQ C KVMCYAQRHSSPELLR-RCLDNCEK-EHD-----	34
BWI-2a	-SDKPQ L LEQC R YLC R IRR-WSTDM-VHRC Q QK C QDDFQRQ R GGGSSD---	48
BWI-2b	-SDKPQ L LEQC R YLC R IRR-WSTDM-VHRC Q QK C QDDFQRQ R GGGSSDEGN	51
C2	QRGSPRAEYEV C RLRCQVAERGVEQQ-R-KCEQV C EERLREREQRGEDVD---	49
MiAMP2d	KRDPQ Q REYEDCRRRC E Q Q EPR--QQ--HQ C QLRCREQQ-----	35
Luffin P1	PRGSPRTEYEAC R VRCQVAEHGVERQ-R-R C Q Q V C EKRLREREGREVD-----	47

Для последнего методом рентгеноструктурного анализа была установлена пространственная структура, которая оказалась уникальной для ингибиторов протеаз и была представлена двумя антипараллельными α-спиралями, каждая из которых содержала по одному характерному мотиву CX₃C. BWI-2с и VhTI

были отнесены к отдельному семейству пептидных ингибиторов протеаз в базе данных MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) – I73. Расположение цистеинов по схеме $C^1X_3C^2X_nC^3X_3C^4$ было обнаружено в некоторых ЗП растений с пока что не известной, но предположительно сходной структурой: MiAMP2d из *Macadamia integrifolia*, MBP-1 из *Zea mays*, C2 из *Cucurbita maxima*, BWI-2a/b из *F. esculentum* (рисунок 2). Поиск гомологов для этих пептидов также показал их незначительное сходство с запасными белками вицилинового (7S глобулинового) типа. На основании отдельных структурных данных (спектры кругового дихроизма) и теоретических расчетов вторичной структуры нами было сделано предположение, что все они, подобно VhPI, будут реализовывать в пространстве структуру в виде α -спиральной шпильки. Известные семейства АМП, равно как и семейства ингибиторов протеаз, не содержат в своем составе представителей с подобной организацией, что указывает на возможную принадлежность BWI-2с и VhPI, а также АМП с двумя CX_3C мотивами, к отдельному семейству ЗП растений. Предполагаемое семейство было названо α -гарпинины (от англ. " α -hairpinins"). Для изучения этой предполагаемой группы наряду с BWI-2с были выбраны следующие пептиды: Tk-AMP-X2 из *T. kiharae*, Sm-AMP-C4 из *S. media* и Ec-AMP-1 из *E. crus-galli* (рисунок 2), первичные структуры которых также были установлены в ИБХ РАН.

Получение рекомбинантных α -гарпининов

Для всестороннего исследования пептидов необходимо иметь достаточное их количество. Помимо выделения нативного пептида из природного источника, которое затруднено ввиду необходимости затрат большой массы растительного материала, многостадийной и, как следствие, длительной очистки с большими потерями целевого продукта, возможно также получать его искусственные аналоги путем химического синтеза или функциональной экспрессии соответствующего гена. Как наиболее эффективная и удобная, нами была выбрана методика получения в бактериальной системе экспрессии. Это обусловлено тем, что в такой системе возможно проводить контролируемый мутагенез, и с большей эффективностью, по сравнению с химическим синтезом, происходит правильное замыкание дисульфидных связей. Работа включала следующие этапы: создание вектора, несущего в своем составе последовательность, кодирующую целевой пептид, трансформация клеток *Escherichia coli* полученным вектором, контролируемая экспрессия гибридного белка, его выделение, расщепление и последующая очистка необходимого компонента.

С помощью обратной трансляции *in silico* (программа EditSeq) с использованием наиболее часто используемых у *E. coli* кодонов были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие BWI-2с, Tk-AMP-X2 и Ec-AMP-1. Каждая последовательность была дополнительно оптимизирована с целью предотвращения формирования шпилечных структур, в 5'- и 3'-концевых областях были добавлены сайты рестрикции *Kpn1* и *VamN1*, соответственно, для клонирования в экспрессионный вектор, в 5'-концевые области были введены последовательности, кодирующие сайт, узнаваемый энтеропептидазой. Полные последовательности были затем разделены на короткие олигонуклеотиды, из которых методом ПЦР были получены синтетические гены. Визуализацию продуктов синтеза осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для проведения экспрессии в бактериальной системе полученные ПЦР-продукты генов пептидов были встроены в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen), который находит широкое применение в биотехнологии для наработки дисульфид-содержащих пептидов. Основная особенность данной системы – возможность синтеза искомого продукта в виде гибрида с белком-помощником тиоредоксином (Trx), который является природной тиол-дисульфид изомеразой *E. coli* и, помимо высокого уровня экспрессии, обеспечивает возможность правильного замыкания дисульфидных связей в целевом продукте. Кроме того, системой предусматривается включение в последовательность гибридного белка олигогистидинового участка для проведения очистки с помощью металл-хелат-аффинной хроматографии. Регуляторные области гена гибридного белка позволяют проводить контролируемую экспрессию с использованием изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в качестве индуктора. Плазмида также содержит ген устойчивости к антибиотику ампициллину, что позволяет контролировать ее наличие в клетках за счет выращивания на селективной среде. Итак, в состав гибридных белков Trx-α-гарпинин были включены следующие вспомогательные последовательности: Trx – белок-помощник, олигогистидиновый участок для аффинной хроматографии, а также сайт, узнаваемый энтеропептидазой, для отделения целевого пептида от белка-помощника. Плазмиду pET-32b и синтетические гены подвергли рестрикции ферментами *Kpn1* и *VamN1*, после чего провели лигирование по липким концам.

Следующим этапом работы была трансформация клеток *E. coli* BL21 (DE3) полученными векторами и проведение качественной оценки возможности экспрессии соответствующих генов: индукция экспрессии ИПТГ с

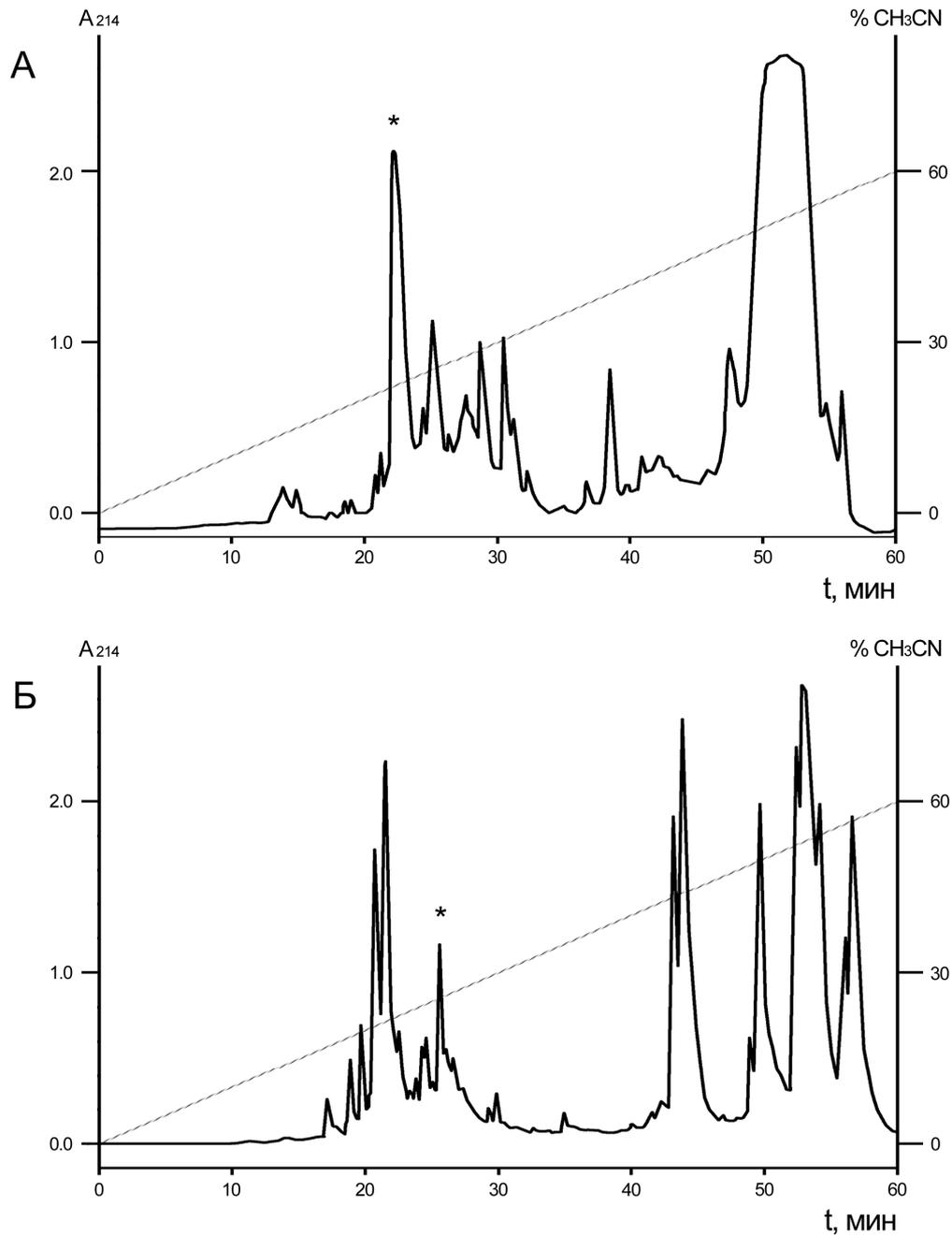
последующей визуализацией результатов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ). Аналитические опыты по экспрессии проводили в трех независимых повторах (использовали три различных клон *E. coli*, полученные при трансформации). Условия аналитического опыта (концентрация индуктора ИПТГ 0,2 мМ, инкубация культуры при 25°C в течение 18 ч) были выбраны, исходя из опыта подобных работ в лаборатории.

Было показано, что, во-первых, имеет место ИПТГ-индуцируемая оверэкспрессия всех целевых генов и, во-вторых, молекулярные массы продуктов, оцениваемые по электрофоретической подвижности в ДСН-ПААГ, приблизительно соответствовали ожидаемым (~20 кДа).

Далее для каждого пептида отбирали один из экспрессионных клонов и проводили препаративную наработку целевых продуктов. Индукцию экспрессии осуществили в культуре объемом 1 л в условиях аналитического опыта. Для выделения гибридного белка из фракции растворимых компонентов клеток *E. coli* использовали метод аффинной хроматографии. Очищенный гибридный белок анализировали с использованием электрофореза, концентрацию определяли по спектру поглощения в УФ-области. Выход гибридного белка для всех трех пептидов составил ~40 мг с 1 л культуры. Далее образец обессоливали ОФ-ВЭЖХ в ступенчатом градиенте ацетонитрила и высушивали на вакуумном концентраторе. Высушенный белок растворяли в буфере с оптимальным для работы фермента рН до конечной концентрации ~1 мг/мл, добавляли энтеропептидазу из расчета 1 единица фермента на 1 мг белка. Гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Продукты протеолиза разделяли при помощи ОФ-ВЭЖХ (рисунок 3А). Концентрацию полученных пептидов оценивали по спектру поглощения в УФ-области. Выход пептидов составлял от 5 до 7 мг с 1 л бактериальной культуры. Полученные рекомбинантные пептиды анализировали при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии. Измеренные средние молекулярные массы составили 5182,0 Да, 3519,0 Да и 4274,7 Да для ВW1-2с, Тк-АМР-Х2 и Ес-АМР-1, соответственно, что совпадало с результатами измерений масс природных пептидов, а также с расчетным значениям.

Автоматическое секвенирование по Эдману показало идентичность N-концевых аминокислотных последовательностей рекомбинантных пептидов природным. Хроматографические подвижности природных и рекомбинантных пептидов также не различались, подтверждая их идентичность.

Рисунок 3. Профили хроматографических разделений гибридных белков: А – Тгх-BWI-2с, гидролизованного энтеропептидазой, Б – Тгх-Sm-AMP-C4-L, гидролизованного бромцианом, в градиенте концентрации ацетонитрила (показан пунктирной линией). Звездочками отмечены фракции, содержавшие целевые пептиды.



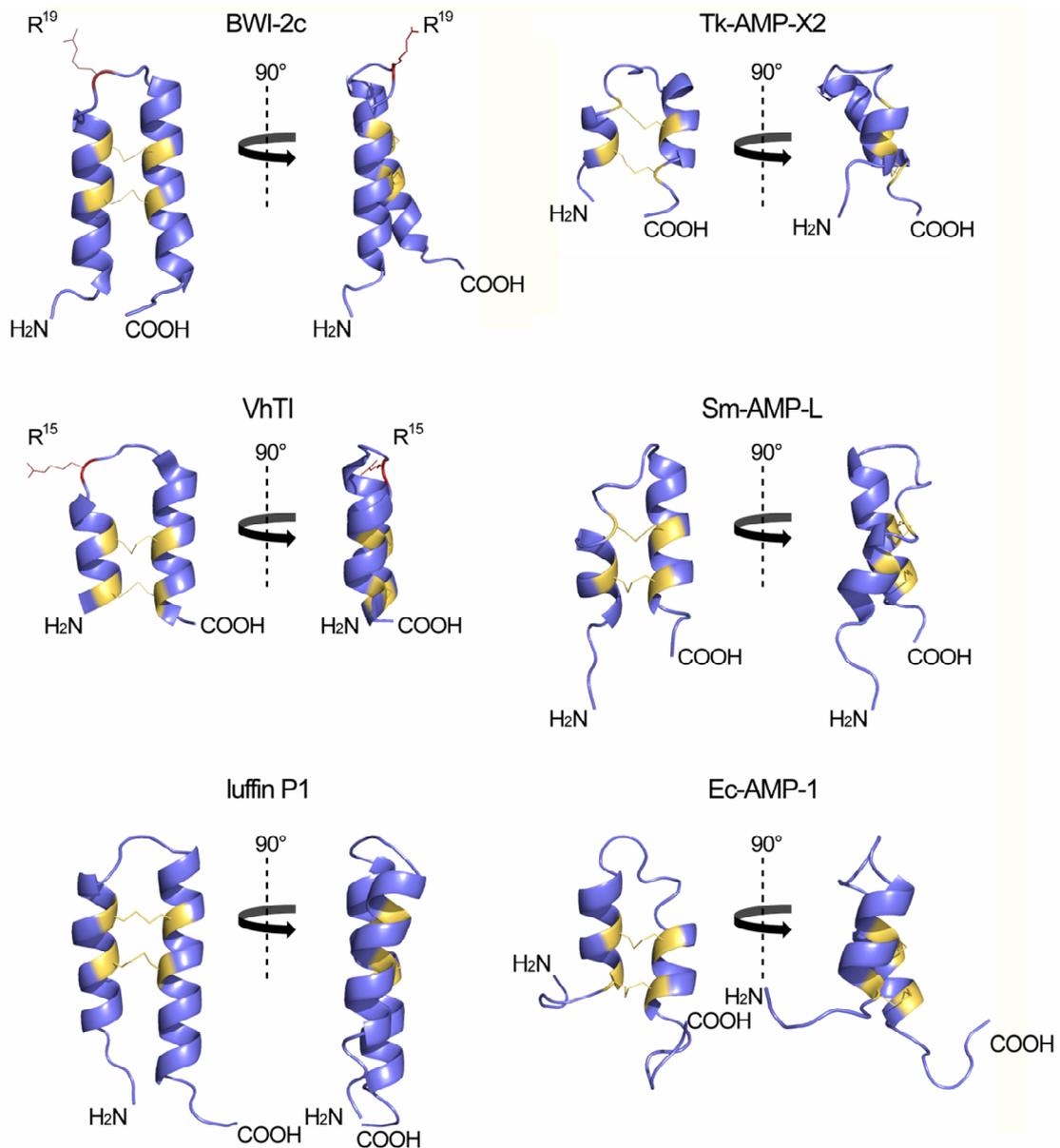
Пептид Sm-AMP-C4 не удалось получить с достаточно высоким выходом в описанной системе, что было обусловлено неспецифическим гидролизом гибридного белка энтеропептидазой в N-концевой области пептида, похожей на сайт гидролиза данного фермента. Поэтому нами было принято решение о получении мутантного пептида Sm-AMP-C4-L (рисунок 2), в котором остатки метионина были заменены остатками лейцина, как наиболее близкими по физико-химическим свойствам. Это позволило заменить в результирующей гибридной конструкции сайт связывания энтеропептидазой на остаток метионина и провести специфический гидролиз белка BrCN (рисунок 3Б). Корректность синтеза Sm-AMP-C4-L проверялась масс-спектрометрически и N-концевым секвенированием. Стоит отметить, что хроматографические подвижности пептидов Sm-AMP-C4 и Sm-AMP-C4-L были близки, что соответствовало ожиданиям. Выход продукта составил ~4,5 мг с 1 л культуры.

С применением разработанной системы экспрессии нами были получены изотопно-меченые пептиды BWI-2с, Tk-AMP-X2, Sm-AMP-C4-L, содержащие в своем составе изотоп ^{15}N . Для этого клетки штаммов-продуцентов, выращивались на «минимальной» среде M9, содержащей в качестве источника азота $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Дальнейшее выделение и очистка пептидов происходили согласно вышеописанной схеме. Поскольку в использовавшейся среде не было никаких других источников азота, полученные пептиды содержали только ^{15}N , что было подтверждено методом МАЛДИ масс-спектрометрии: разница масс исходных и меченых пептидов была равна общему числу атомов азота для каждого пептида. Выход продуктов составил ~3–5 мг пептида с 1 л бактериальной культуры.

Структурные исследования α -гарпининов

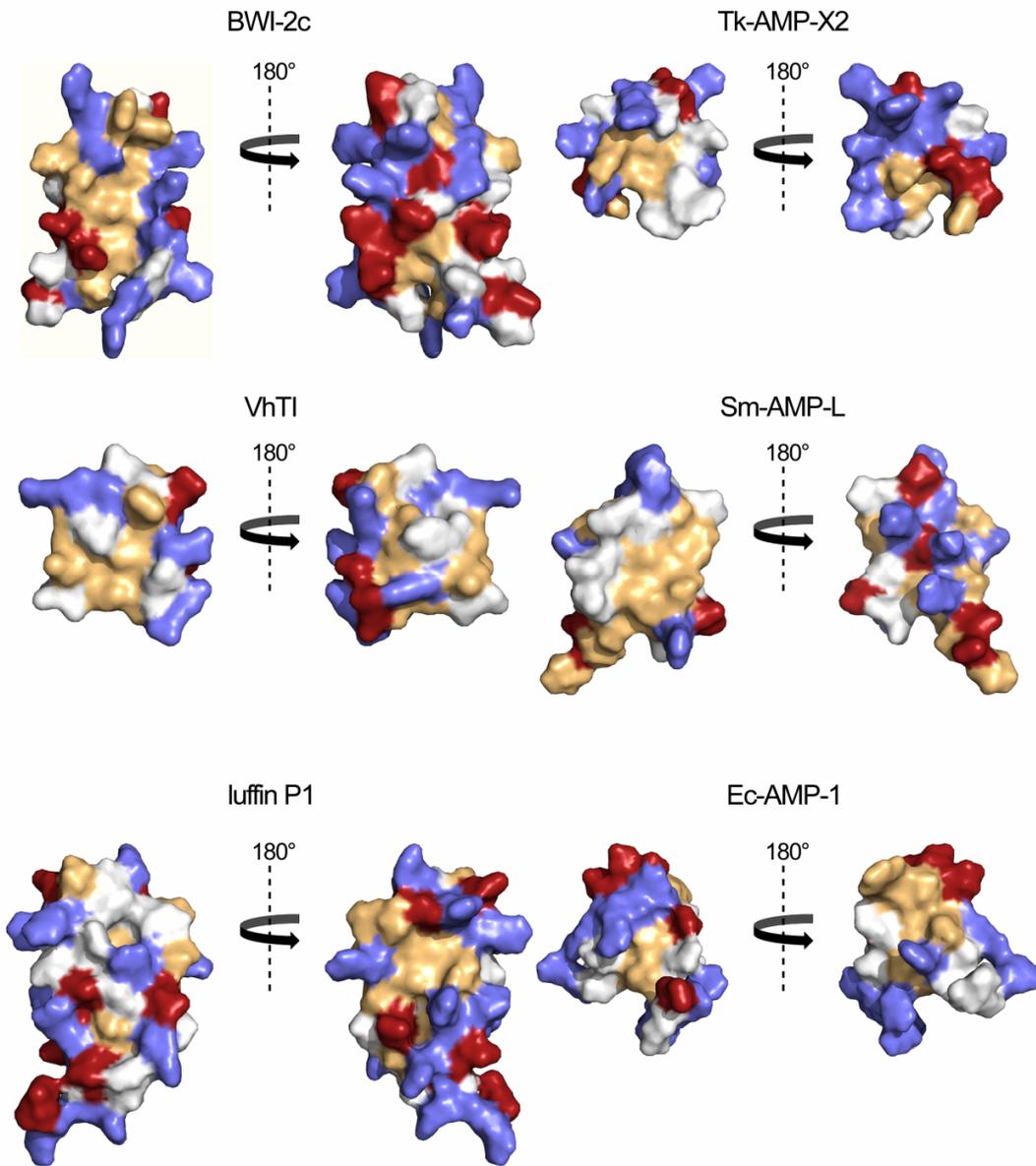
С использованием изотопно-меченых производных методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН были установлены пространственные структуры пептидов BWI-2с, Tk-AMP-X2, Sm-AMP-C4-L в растворе. Как и ожидалось ранее, все они представляют собой α -спиральные шпильки, где две антипараллельные α -спирали соединены посредством коротких петлевых последовательностей и стабилизированы двумя дисульфидами (рисунок 4А). В то время как спиральные участки молекул были жестко фиксированы, N- и C-концевые оставались достаточно подвижными. Межспиральная петля BWI-2с также обладала значительной подвижностью в сравнении с соответствующими участками АМП. Для Ec-AMP-1 в то же время

Рисунок 4А. Пространственные структуры α -гарпининов в ленточном представлении. Желтым цветом обозначены остатки цистеина. Красным – остатки P₁ ингибиторов BWI-2c и VhTI.



пространственная структура была установлена с использованием природного пептида в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН в соавторстве с сотрудниками нашей лаборатории. Вышеупомянутый ингибитор трипсина VhTI и рибосом-инактивирующий пептид luffin P1 – еще

Рисунок 4Б. Пространственные структуры α -гарпининов в глобулярном представлении. Синим цветом отмечены положительно заряженные а.о., красным – отрицательно заряженные а.о., бежевым – гидрофобные а.о., белым – все остальные.



два примера такой же пространственной организации среди ЗП растений. Сравнение пространственных структур α -гарпининов показало различие во взаиморасположении α -спиралей в ингибиторах и АМП, что может быть связано с различной функциональной нагрузкой. В ингибиторах, а также у пептида luffin P1, α -спирали ориентированы практически параллельно друг

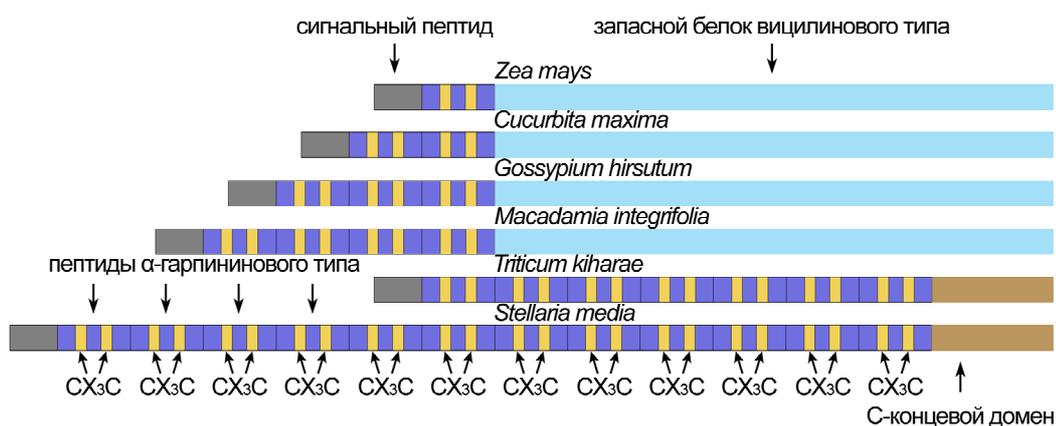
другу, в то время как у АМП они располагаются под углом $\sim 45^\circ$. Для всех рассмотренных α -гарпининов характерно формирование более-менее выраженной гидрофобной поверхности и концентрирование заряженных а.о. на противоположной стороне (рисунок 4Б).

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что фолд α -гарпининового типа был обнаружен у нескольких блокаторов калиевых каналов, таких как, к-хефутоксин 1 (к-hefutoxin 1) из яда скорпиона *Heterometrus fulvipes* и ОмТх1–3 из яда скорпиона *Opisthacanthus madagascariensis*, flf14a–с из моллюска *Conus austini*. Для таких семейств АМП как дефензины и ноттины тоже отмечено структурное сходство с некоторыми нейротоксинами паукообразных.

Структура и эволюция генов α -гарпининов

Разнообразие растительных источников α -гарпининов и принадлежность их к далеким систематическим единицам предположительно указывает на повсеместное распространение этого семейства пептидов в растительном царстве. Стоит отметить, что многие α -гарпинины экспрессируются в составе крупных белков-предшественников, которые могут содержать один (*Z. mays*) или несколько (два в *C. maxima*, три в *Gossypium hirsutum*, четыре в *M. integrifolia*) таких пептидов. В состав этих предшественников также могут входить запасные белки вицилинового типа (рисунок 5).

Рисунок 5. Структура предшественников α -гарпининов из разных растений. Отмечены составные элементы.



Поэтому интересным вопросом является эволюция генов α -гарпининов. Кажется правдоподобным, что некоторые предковые белки-предшественники в ходе эволюции приобрели α -гарпининовый домен, который затем путем

дупликации был размножен в некоторых растениях. Можно предположить, что АМП произошли от ингибиторов протеаз, так как последние нацелены на более широкий спектр вредителей, в то время как АМП действуют преимущественно на микроорганизмы. С другой стороны, учитывая крайне низкую степень сходства первичной структуры α -гарпининов, представляется возможным и независимое происхождение такой структуры у неродственных пептидов в результате параллельной эволюции. В пользу последнего предположения в частности говорит сходство с токсинами беспозвоночных.

Исследование биологической активности α -гарпининов

Тестирование активности рекомбинантного BWI-2с, проводившееся в лаборатории белков растений НИИ ФХБ, показало, что он проявляет ингибирующую активность в отношении препарата трипсиноподобного фермента из кишечника бабочки *Galleria melonella*. В то же время цистеиновые протеазы жуков *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* и *Blattella germanica* не ингибировались вовсе. BWI-2с с высокой эффективностью ингибировал бычий панкреатический трипсин ($K_i=1.74 \times 10^{-10}$ М), но не проявлял активности в отношении сериновых протеаз другой субстратной специфичности (химотрипсин, эластаза, субтилизин). Таким образом, BWI-2с является специфическим ингибитором трипсиноподобных сериновых протеаз. В то же время Tk-AMP-X2, Sm-AMP-C4-L и Ec-AMP-1 не проявляли ингибирующей активности в отношении перечисленных ферментов. Очевидно, механизм их действия не сопряжен с подавлением активности протеолитических ферментов.

Для определения положения функционально важного остатка P₁ BWI-2с инкубировался с трипсином в течение четырех часов с последующим разделением комплекса ОФ-ВЭЖХ. Далее N-концевым секвенированием были определены две последовательности, одна из которых соответствовала N-концу пептида, тогда как вторая – последовательности начиная с двадцатого а.о. В результате было установлено, что гидролиз молекулы ингибитора трипсином происходит по связи R¹⁹-W²⁰. Таким образом, аргинин R¹⁹ является искомым остатком P₁. Отметим, что его положение в последовательности совпадает с остатком P₁ (R¹⁵) у родственного VhPI и находится в положении +4 от второго остатка цистеина (рисунок 4А).

Антифунгальная активность рекомбинантных пептидов тестировалась на нескольких видах фитопатогенных грибов (таблица 1). Опыт показал, что BWI-2с до концентрации 30 мкг/мл не влияет на прорастание спор фитопатогенов. Для остальных пептидов антифунгальная активность

варьировала как по видоспецифичности, так и по эффективной концентрации, необходимой для подавления прорастания спор и роста гиф. Тем не менее, все АМП проявляли активность в микромолярном диапазоне концентраций, что характерно для антифунгальных пептидов в целом.

Таблица 1. Антифунгальная активность пептидов рекомбинантных Tk-AMP-X2, Ec-AMP-1, Sm-AMP-C4-L и синтетических производных Sm-AMP-X1 и Sm-AMP-X2.

Вид гриба	Эффективная ингибирующая концентрация пептидов, мкМ				
	Tk-AMP-X2	Sm-AMP-C4-L	Sm-AMP-X1	Sm-AMP-X2	Ec-AMP-1
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	6,1	24,4	25,0	8,5
<i>Fusarium solani</i>	—	7,2	19,0	22,5	4,0
<i>Fusarium graminearum</i>	7,5	—	—	—	4,5
<i>Fusarium verticillioides</i>	10,0	—	—	—	8,1
<i>Aspergillus niger</i>	—	3,6	8,0	16,9	>32,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	—	>32,0	>32,0	>32,0	18,2
<i>Alternaria alternata</i>	—	12,9	>32,0	>32,0	16,0
<i>Alternaria solani</i>	—	—	—	—	14,0
<i>Botrytis cinerea</i>	—	18,0	>32,0	>32,0	—
<i>Pythium ultimum</i>	—	>32,0	>32,0	>32,0	14,4
<i>Pythium debaryanum</i>	—	—	—	—	12,0
<i>Phytophthora infestans</i>	—	>32,0	>32,0	>32,0	16,3
<i>Pemphigus betae</i>	—	—	—	—	6,0
<i>Diplodia maydis</i>	17,0	—	—	—	>10,0
<i>Colletotrichum graminicola</i>	>32,0	—	—	—	>10,0

Дизайн и получение производных α -гарпининов

Полученные данные указывают на то, что в рамках единого α -гарпининового фолда могут реализовываться различные биологические активности. Таким образом, представляется возможным использование данного типа пространственной укладки для создания молекул с заданной структурой и функцией. Подобный подход, получивший название скаффолд-инженерии, в последние годы рассматривается как один из наиболее перспективных вариантов рационального дизайна белков и уже имеет ряд удачных примеров использования. В ходе данной работы нами был разработан и получен набор производных α -гарпининов для установления отдельных функциональных

детерминант и возможности их сочетания между собой в составе одной молекулы. На первом этапе было предложено получить укороченные по внешним и внутренним цистеинам варианты АМП (Sm-AMP-X1, Sm-AMP-X2) и ингибитора (BWI-X1, BWI-X2) (рисунок 2), чтобы установить минимальную активную составляющую для обоих типов пептидов. Получение укороченных производных в рекомбинантной системе экспрессии было затруднено ввиду сложности отделения от гибридного белка и очистки целевого продукта. В связи с этим было предложено получить их путем химического синтеза. Твердофазный пептидный синтез был осуществлен в лаборатории протеомики ИБХ РАН. Полученные пептиды далее окислялись кислородом воздуха в течение суток при комнатной температуре с последующей очисткой ОФ-ВЭЖХ. Контроль корректности замыкания дисульфидных связей осуществлялся сочетанием методов селективного гидролиза полипептидной цепи, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

BWI-2с и VhPI являются каноническими ингибиторами протеаз. Для ингибиторов этого типа известна основополагающая роль в связывании с активным центром фермента короткой ингибиторной петли, которая в случае α -гарпининов соответствует межспиральному участку молекулы. В связи с этим, было предложено привнести трисин-ингибирующую активность в состав молекулы АМП путем пересадки фрагмента петлевого участка ингибитора. В результате в рекомбинантной системе экспрессии были получены мутантные пептиды Tk-M-1–3, производные Tk-AMP и BWI-2с (рисунок 2), с выходом ~5 мг с 1 л культуры.

Также был сконструирован мутантный пептид Ec-AMP-M – производная Ec-AMP-1 с заменами в петлевом участке, подобранными таким образом, чтобы с минимальным изменением аминокислотного состава добиться сходства с аналогичным участком ингибитора BWI-2с. Ec-AMP-M был получен химическим синтезом в лаборатории протеомики ИБХ РАН с последующим замыканием дисульфидных связей по вышеописанной схеме. Для всех мутантных пептидов проводилось определение соотношения различных элементов вторичной структуры методом спектроскопии кругового дихроизма (таблица 2), расчеты были проведены в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Было показано, что отдельные модификации приводят к существенным структурным изменениям, как например, в случае Tk-Mut-2.

Таблица 2. Содержание элементов вторичной структуры α -гарпининов по данным спектроскопии кругового дихроизма

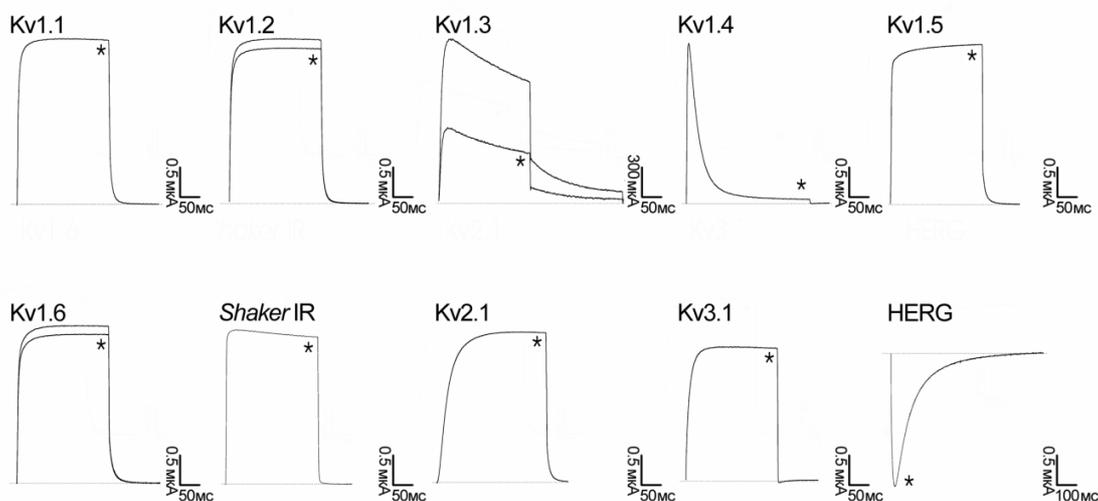
Пептид	Содержание элементов вторичной структуры, %			
	α -Спираль	β -Слой	β -Изгиб	Клубок
BWI-2c	68,2	1,0	11,1	19,7
BWI-x1	18,1	22,4	23,0	36,5
BWI-x2	8,0	29,3	23,4	39,2
EC-AMP-1	44,1	5,7	18,3	31,9
EC-M	45,6	4,7	19,2	30,4
Tk-AMP-X2	31,0	17,6	21,6	29,8
Tk-Mut-1	35,4	11,3	22,5	30,8
Tk-Mut-2	8,2	38,1	21,5	32,3
Tk-Mut-3	27,7	19,8	22,0	30,5
Tk-hefu1	28,9	16,0	22,1	33,1
Sm-AMP-C4	44,2	6,3	17,5	32,1
Sm-AMP-C4-L	44,1	5,1	19,6	31,2
Sm-AMP-x1	13,4	21,9	25,8	38,9
Sm-AMP-x2	38,4	6,0	28,2	27,4

Полученные химерные пептиды и укороченные производные BWI-2c тестировались на бычьим панкреатическом трипсине. Было показано, что Ec-AMP-M и BWI-X1 обладают трипсин-ингибирующей активностью. Ввиду того что эти пептиды достаточно быстро гидролизуются, установить константы ингибирования для них не были определены. Однако было установлено, что в условиях стандартного эксперимента 50% ингибирование фермента наступало при молярном соотношении фермент: ингибитор – $\sim 1:20$ и $\sim 1:10$ для BWI-X1 и Ec-AMP-M соответственно, для сравнения для BWI-2c 50% ингибирование наступало при соотношении 2:1. BWI-X2 был неактивен, что по всей видимости связано с изменением организации молекулы и утратой характерной структуры. Снижение активности BWI-X1 по сравнению с исходным BWI-2c можно объяснить участием дистальных участков молекулы в связывании с ферментом. Все варианты пептидов Tk-Mut также не проявляли активности в отношении трипсина. Sm-AMP-X1, Sm-AMP-X2 тестировались на фитопатогенных грибах в сравнении с Sm-

AMP-C4-L (таблица 1). Для укороченных производных Sm-AMP-C4 также было отмечено снижение активности по сравнению с исходным пептидом. Это может быть вызвано изменением заряда молекулы, утратой одной из спиралей или наличием в составе утраченных фрагментов функционально важных остатков. Однако для обоих вариантов молекулы наблюдалась сохранение активности в микромолярных концентрациях.

Для многих блокаторов калиевых каналов известно, что критическими для проявления активности является пара а.о., так называемая диада Y–K/R. Структурные аналоги α -гарпининов, обнаруженные в ядах скорпионов *H. fulvipes* и *O. madagascariensis*, содержат подобные пары остатков в составе спиральных участков молекул в положениях +1 по отношению к первому и третьему остаткам цистеинов. Еще один химерный пептид, названный Tk-hefu1, был получен путем переноса функциональной диады K–Y из молекулы к-хефутоксина 1 из яда *H. fulvipes* в состав Tk-AMP-X2 по соответствующим положениям. Tk-hefu1 был получен в бактериальной системе экспрессии с выходом ~4 мг с 1 л культуры *E. coli*.

Рисунок 6. Эффекты Tk-hefu1 на различных изоформах потенциал-зависимых калиевых каналов. Кривые отображают токи через соответствующие типы каналов в контроле и при аппликации 40 мкМ токсина (обозначены звездочками).



Электрофизиологическое тестирование исходных и мутантного пептидов проводилось в лаборатории токсикологии Католического университета (г. Лёвен, Бельгия) на панели потенциал-зависимых калиевых каналов (Kv's) различных семейств: Shaker (Kv1.1–Kv1.6, Shaker IR), Shab (Kv2.1), Shaw

(Kv3.1) и erg (HERG). Эффекты Tk-hefu на различных изоформах каналов приведены на рисунке 6. Tk-hefu в концентрации 40 мкМ блокировал ток через каналы Kv1.2, Kv1.3 и Kv1.6 на $8,3 \pm 1,3\%$, $58,4 \pm 1,6\%$ и $7,3 \pm 2,3\%$, соответственно. В то же время Tk-AMP-X2 не проявлял активности в отношении перечисленных каналов вплоть до концентрации 250 мкМ. Концентрация полумаксимального ингибирования Tk-hefu1 (IC₅₀) для Kv1.3 составила $34,0 \pm 2,8$ мкМ и оказалось даже несколько ниже, чем соответствующее значение для исходного к-хефутоксина 1 – 40 мкМ. Тем самым, был достигнут преследуемый результат – молекула АМП приобрела новую активность, прежде ей не присущую.

Полученные результаты показывают, что в рамках молекулы α -гарпининового типа может реализовываться целый набор различных активностей. При этом замена одной функции на другую или приобретение новой осуществимо путем небольшого числа замен а.о. По сути, можно утверждать, что α -гарпинины а также структурно родственные им токсины беспозвоночных построены на базе уникального пептидного домена, который в перспективе может быть использован при создании новых биологически активных веществ для нужд сельского хозяйства и медицины.

Выводы

1. Защитные пептиды растений, характеризующиеся сходством первичной структуры с двумя цистеиновыми мотивами CX₃C и пространственной укладкой в виде α -спиральной шпильки, объединены в семейство α -гарпининов.
2. Получены рекомбинантные аналоги α -гарпининов из четырех видов растений: BWI-2с из гречихи *Fagopyrum esculentum*, Ec-AMP-1 из ежовника *Echinochloa crus-galli*, Sm-AMP-C4 из звездчатки *Stellaria media* и Tk-AMP-X2 из пшеницы *Triticum kiharae*.
3. BWI-2с является каноническим ингибитором трипсина ($K_i = 1,7 \times 10^{-10}$ М), а Ec-AMP-1, Sm-AMP-C4 и Tk-AMP-X2 обладают антифунгальной активностью по отношению к ряду фитопатогенов в микромолярном диапазоне концентраций.
4. На основании сходства пространственной укладки α -гарпининов и некоторых блокаторов калиевых каналов из яда скорпионов сконструирован химерный пептид Tk-hefu, специфично ингибирующий калиевые каналы человека Kv1.3.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Peter B. Oparin, Konstantin S. Mineev, Yakov E. Dunevsky, Alexander S. Arseniev, Mikhail A. Belozersky, Eugene V. Grishin, Tsezi A. Egorov, Alexander A. Vassilevski. Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defense peptides. *Biochem J.* **2012**, 446(1), 69-77.
2. Lyubov L. Utkina, Yaroslav A. Andreev, Eugene A. Rogozhin, Tatyana V. Korostyleva, Anna A. Slavokhotova, Peter B. Oparin, Alexander A. Vassilevski, Eugene V. Grishin, Tsezi A. Egorov, Tatyana I. Odintsova. Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. *FEBS J.* **2013**, 280(15), 3594-608.
3. Anna A. Slavokhotova, Eugene A. Rogozhin, Alexander K. Musolyamov, Yaroslav A. Andreev, Peter B. Oparin, Antonina A. Berkut, Alexander A. Vassilevski, Tsezi A. Egorov, Eugene V. Grishin, Tatyana I. Odintsova. Novel antifungal a-hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. *Plant Mol Biol.* **2014**, 84(1-2):189-202.
4. Antonina A. Berkut, Dinara R. Usmanova, Steve Peigneur, Peter B. Oparin, Konstantin S. Mineev, Tatyana I. Odintsova, Jan Tytgat, Alexander S. Arseniev, Eugene V. Grishin, Alexander A. Vassilevski. Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *J. Biol. Chem.* published online March 26, **2014**, doi: 10.1074/jbc.M113.530477.

Тезисы докладов:

1. Опарин П.Б., Василевский А.А., Мусолямов А.Х., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Ингибитор трипсина из гречихи – представитель нового семейства ингибиторов сериновых протеаз. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008», секция «Биология» (Москва, 8-11 апреля 2008); Тезисы докладов, стр. 41-42. (устный доклад)
2. Опарин П.Б., Василевский А.А., Мусолямов А.Х., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Новый ингибитор сериновых протеиназ из гречихи обыкновенной. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 23-27 июня 2009); Тезисы докладов, стр. 378. (стендовое сообщение)
3. Опарин П.Б., Минеев К.С., Василевский А.А., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Арсеньев А.С., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Новый ингибитор сериновых протеиназ из гречихи обыкновенной. XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 8-11 февраля 2010); Тезисы докладов и стендовых сообщений, стр. 44. (стендовое сообщение)
4. Опарин П.Б., Василевский А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Новое семейство защитных пептидов растений: изучение и применение. Школа-конференция «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины» (Москва, 16-17 сентября 2010); Материалы конференции, стр. 60-61. (стендовое сообщение, устный доклад)
5. Опарин П.Б., Василевский А.А., Беркут А.А., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Гришин Е.В. Антимикробный пептид Tk-AMP-X2 из пшеницы *Triticum kiharae* – представитель

- нового семейства защитных пептидов. Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Москва, 9-12 ноября 2010); Тезисы докладов, стр. 259. (стендовое сообщение)
6. Опарин П.В., Vassilevski A.A., Mineev K.S., Arseniev A.S., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Grishin E.V., Egorov T.A. Structural and functional studies of a trypsin inhibitor from buckwheat seeds. 36th FEBS Congress (25-30 June 2011, Torino, Italy); the FEBS Journal, 278, supplement 1, p. 471. (стендовое сообщение, устный доклад)
 7. Опарин П.Б., Беркут А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Рекомбинантные аналоги 4С_{ys} защитных пептидов растений. V Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 8-12 августа 2011); Тезисы докладов, стр. 308. (стендовое сообщение)
 8. Беркут А.А., Опарин П.Б., Василевский А.А. Изучение α -гарпининов, группы антифунгальных пептидов растений. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», секция «Биология» (Москва, 9-12 апреля 2012); Тезисы докладов, стр. 47. (устный доклад)
 9. Опарин П.Б., Беркут А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Изучение и возможности применения α -гарпининов – нового семейства защитных пептидов растений. Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 11 апреля 2012); Тезисы докладов (устный доклад)
 10. Опарин П.Б., Василевский А.А., Беркут А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. Изучение α -гарпининов – нового семейства защитных пептидов растений. XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 11-15 февраля 2013); Тезисы докладов и стендовых сообщений, 2, стр. 8. (устный доклад)
 11. Опарин П.Б., Беркут А.А., Усманова Д.Р., Минеев К.С., Арсеньев А.С., Пеньёр С., Титгат Я., Гришин Е.В., Егоров Ц.А., Василевский А.А., структурное сходство антимикробного пептида пшеницы и нейротоксина из скорпиона позволяет создавать химерные молекулы. VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Уфа, 11-15 июня 2013); Тезисы докладов, стр. 246. (стендовое сообщение).