

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

На правах рукописи

Богданов Иван Владимирович

**Новые липид-транспортирующие белки растений
семейства *Fabaceae***

Специальность 02.00.10 - биорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н. Овчинникова Татьяна Владимировна

Москва – 2016

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
2.1. Белки, связанные с патогенезом растений	7
2.2. Структурная характеристика растительных LTP	8
2.3. Эволюция генов LTP.....	9
2.4. Связывание и перенос липидных молекул с участием LTP.....	10
2.5. Биологическая активность LTP	12
2.6. Возможные функции LTP.....	13
2.7. Практическое применение LTP	15
2.8. Роль LTP в возникновении аллергических заболеваний и перспективы применения LTP в аллергодиагностике и аллерговакцинации.	17
2.8.1. Возникновение и развитие аллергических реакций	17
2.8.2. Аллергенные свойства LTP	20
2.8.3. Использование LTP растений в диагностике аллергических реакций	23
2.8.4. Современные методы лечения аллергических реакций и перспективы применения LTP	25
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
3.1. Оборудование	36
3.2. Реактивы и расходные материалы	37
3.3. Методы	42
3.3.1. Выделение LTP из семян гороха посевного <i>Pisum sativum</i>	42
3.3.2. SDS-электрофорез	44
3.3.3. Электроблоттинг	45
3.3.4. Иммуноблоттинг	45
3.3.5. Масс-спектрометрический анализ.....	46
3.3.6. Определение N-концевой аминокислотной последовательности	46
3.3.7. Реакция восстановления и алкилирования	46
3.3.8. Спектроскопия кругового дихроизма.....	47
3.3.9. Триптический гидролиз.....	47
3.3.10.Выделение суммарной РНК.....	48
3.3.11.Обратная транскрипция и амплификация концов кДНК (RACE).....	48
3.3.12.Клонирование и секвенирование продуктов ПЦР	51
3.3.13.ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ)	51
3.3.14.Гетерологичная экспрессия LTP	53
3.3.15.Выделение и очистка гибридных белков.....	56
3.3.16.Выделение и очистка рекомбинантных LTP	57
3.3.17.Твердофазный иммуноферментный анализ	58
3.3.18.Определение антимикробной активности	59
3.3.19.Моделирование переваривания <i>in vitro</i> ферментами пищеварительного тракта.....	60
3.3.20.Флуоресцентная спектроскопия	60
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
4.1. Выделение и структурная характеристика новых липид-транспортующих белков гороха	64
4.2. Гетерологичная экспрессия и очистка липид-транспортующих белков	74
4.3. Биотехнологический способ получения Ps-LTP1, тотально меченного стабильными изотопами ¹⁵ N и ¹³ C	79
4.4. Биологическая активность Ps-LTP1.....	85

4.5. Аллергенные свойства Ps-LTP1	91
4.6. Структурно-функциональная характеристика липид-транспортирующих белков чечевицы Lc-LTP1 и Lc-LTP3	97
5. ВЫВОДЫ.....	105
6. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	107
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127

1. Введение

На протяжении миллионов лет в ходе эволюции у растений происходило формирование различных защитных механизмов, обеспечивающих их адаптацию к неблагоприятным факторам окружающей среды. Среди множества защитных факторов растений выделяют семейство белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis-Related Proteins или сокращенно PRP). PRP принимают участие в формировании устойчивости растений не только к биотическому, но и абиотическому стрессу. Индукция синтеза этих белков происходит в основном при патологических состояниях клеток и тканей, в том числе связанных с поражением растения патогенными микроорганизмами. В настоящее время семейство PRP подразделяется на 17 классов белков, экспрессия генов которых в клетках меристемы растений может быть как стресс-индуцированной, так и конститутивной. Семейство PRP включает в себя несколько классов цистеин-содержащих белков, обладающих выраженной антимикробной активностью в отношении фитопатогенных грибов, бактерий и вирусов. Один из классов PRP, а именно класс PRP-14 включает липид-транспортирующие белки (Lipid Transfer Proteins или сокращенно LTP). Свое название LTP получили в связи со способностью обратимо связывать и переносить липиды. Как полагают, данные белки играют важную роль в процессе эмбриогенеза, формировании кутикулы, защите растений от абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды, оплодотворении цветковых растений и метаболизме липидов.

Некоторые представители класса LTP являются аллергенами, ответственными за развитие аллергических реакций на пыльцу, растительные продукты и латекс. Обнаружение новых растительных аллергенов и изучение их свойств является важной фундаментальной задачей экспериментальной медицины, решение которой, с одной стороны, обогащает наше представление о причинах и механизмах развития аллергии, с другой стороны, имеет важное прикладное значение. Природные и рекомбинантные растительные аллергены, а

также их гипоаллергенные аналоги могут стать основой для создания современных диагностических тест-систем и аллерговакцин, предназначенных для профилактики и лечения аллергических заболеваний.

В то же время, устойчивая структура и способность связывать липиды позволяют рассматривать LTP в качестве возможных систем направленной доставки лекарственных и косметических средств. Кроме того, способность растительных LTP эффективно ингибировать рост широкого спектра фитопатогенов успешно используется для создания трансгенных растений, несущих гены данных белков и обладающих повышенной устойчивостью к заболеваниям.

Цель работы состояла в поиске, выделении, структурно-функциональном и иммунологическом исследовании новых липид-транспортирующих белков растительного происхождения. В качестве объекта для поиска нового липид-транспортирующего белка был выбран горох посевной *Pisum sativum* L. Наряду с LTP гороха для проведения сравнительных структурно-функциональных и иммунологических исследований были выбраны Lc-LTP1 и Lc-LTP3 – две новые изоформы липид-транспортирующего белка чечевицы обыкновенной *Lens culinaris* L.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) поиск новых липид-транспортирующих белков;
- 2) разработка методик их выделения и очистки;
- 3) определение полных нуклеотидных последовательностей кДНК, кодирующих белки-предшественники новых LTP, и соответствующих им аминокислотных последовательностей;
- 4) определение уровней экспрессии обнаруженных белков в различных органах и на разных онтогенетических стадиях развития растения;
- 5) создание систем для гетерологичной экспрессии липид-транспортирующих белков;
- 6) получение рекомбинантных LTP и их аналогов, меченных

стабильными изотопами;

7) структурно-функциональная и иммунологическая характеристика выделенных белков.

2. Обзор литературы

2.1. Белки, связанные с патогенезом растений

Липид-транспортирующие белки (LTP) растений относятся к большому семейству белков, связанных с патогенезом (PRP). Данные белки вырабатываются в растениях преимущественно в ответ на различные биотические и абиотические стрессы. Медиаторами индукции экспрессии PRP-генов служат различные сигнальные факторы, такие как салициловая кислота и активные формы кислорода, фитогормоны этилен и метилжасмонат [1].

PRP не обнаруживаются вовсе или присутствуют в очень незначительных количествах в здоровых тканях растений, увеличение их концентрации происходит в патологических условиях. PRP присутствуют во всех органах растений, накапливаются во внеклеточном пространстве и вакуолях, а также в клеточной стенке. Тканеспецифичная активация экспрессии PRP может происходить в растениях также на определенных стадиях онтогенеза [2]. В некоторых органах растений, включая корни и проростки, происходит конститутивная экспрессия основных PRP-генов. Наличие такого механизма защиты наряду с индуцированным обусловлено тем, что корень растения находится в почве, изобилующей микроорганизмами. Таким образом, PRP создают барьер на пути проникновения патогенов [3].

К PRP относятся растительные LTP, которых объединяют индуцируемый стрессовыми факторами биосинтез, участие в механизмах развития приобретенной резистентности, а также их локализация. Как и многие PRP, LTP имеют преимущественно внеклеточную локализацию [4],[5], однако, для некоторых представителей данного класса была показана внутриклеточная локализация в глиоксисомах [6], вакуолях [7] либо везикулах [8]. Получены данные о том, что некоторые LTP способны менять свою локализацию в процессе онтогенетического развития растения [9].

В настоящее время семейство PRP подразделяется на 17 классов [10]. Несколько классов PRP являются сильными аллергенами, например: PR-2 (β -I ,3-

глюканазы), PR-3 (класс I хитиназ), PR-4 (хитиназы), PR-5 (тауматин-подобные белки), PR-8 (класс III хитиназ), PR- I 0 (гомологи Vet v 1) и PR-14 (липид-транспортирующие белки или сокращенно LTP) [3], которые будут подробно рассмотрены далее.

2.2. Структурная характеристика растительных LTP

К настоящему моменту выделено и охарактеризовано большое количество LTP из различных растений. На основании особенностей структурной организации растительные LTP подразделяются на два подкласса: LTP1 и LTP2 с молекулярными массами около 9 и 7 кДа, соответственно [5]. Гомология аминокислотных последовательностей у представителей двух подклассов невелика и составляет не более 30%. Несмотря на то, что доля идентичных аминокислотных остатков в последовательностях белков обоих подклассов невысока, все LTP имеют сходную пространственную структуру, которая характеризуется наличием внутренней гидрофобной впадины. Данная впадина, способная вмещать в себя различные гидрофобные лиганды (например, жирные кислоты с длиной цепи C10-C18), у LTP1 имеет форму туннеля [11],[12] с двумя входами различных размеров, тогда как у представителей второго подкласса – форму полого бокса [13],[14],[15]. Наибольшее значение для связывания с лигандами у LTP1 имеют остатки Arg44 (нумерация относительно LTP1 риса *Oryza sativa*) и Lys35 [11],[16], в то время как для LTP2 ключевыми для связывания являются боковые радикалы остатков Phe39, Tyr45 и Tyr48 (нумерация относительно LTP2 риса) [17].

Пространственная структура LTP представлена в основном α -спиральными участками: у LTP1 она включает четыре α -спирали, фрагмент 3_{10} -спирали и протяженный неструктурированный C-концевой участок (рис. 1А) [18],[19], в то время как у LTP2 она содержит три α -спирали и область одиночных витков спирали (рис. 1Б) [13].

Еще одно различие между LTP1 и LTP2 заключается в структуре фрагмента $-C^VXC^VI-$, который содержит экспонированный наружу молекулы остаток

гидрофильной аминокислоты (чаще всего аспарагина) у LTP1 или обращенный внутрь молекулы остаток фенилаланина у LTP2.

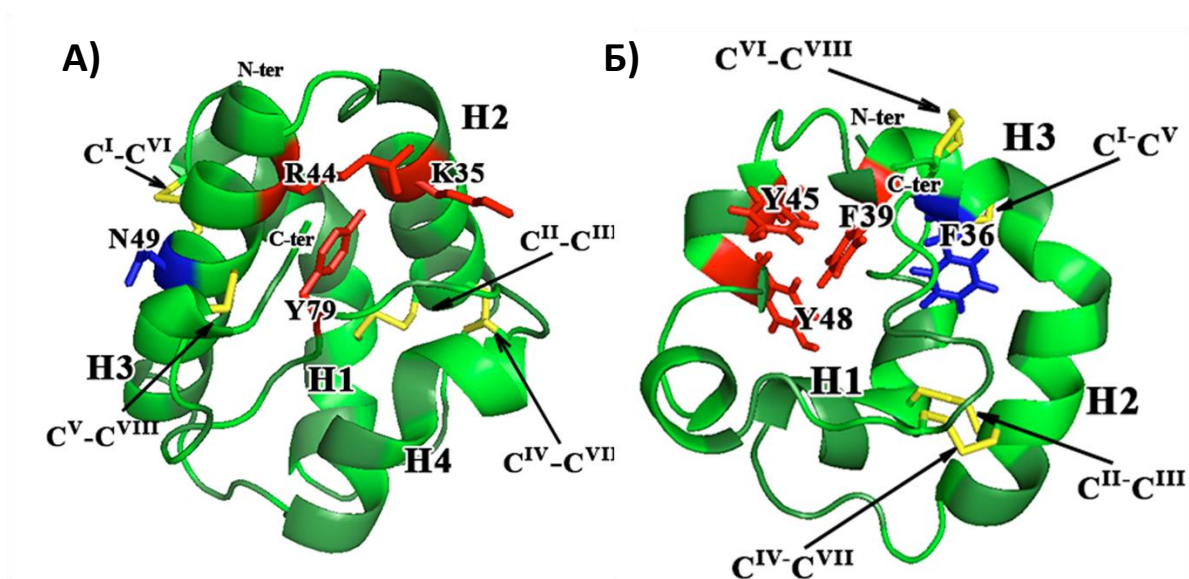


Рис. 1. Пространственные структуры (А) LTP1 (PDB ID: 1RZL) и (Б) LTP2 (PDB ID: 1L6H) из риса в ленточном представлении. На рисунке указаны номера α -спиралей (H1-H4). Темно-зеленым цветом показаны гидрофобные аминокислотные остатки (а.о.), красным – а.о., взаимодействующие с липидным лигандом, желтым – дисульфидные связи, синим – остаток во фрагменте $-C^VXC^VI-$, обращенный наружу или внутрь молекулы белка.

Все известные к настоящему моменту LTP являются катионными белками (pI ~9-10). Благодаря наличию 4 дисульфидных связей пространственная структура растительных LTP обладает крайне высокой устойчивостью к нагреванию, значительным изменениям pH и действию протеолитических ферментов [20],[21],[22]. Дисульфидные связи у представителей разных подклассов также имеют различную организацию: C^1-C^6 , C^2-C^3 , C^4-C^7 , C^5-C^8 в случае LTP1 и C^1-C^5 , C^2-C^3 , C^4-C^7 , C^6-C^8 в случае LTP2 (рис. 1).

2.3. Эволюция генов LTP

Гены LTP присутствуют во всех растениях за исключением водорослей, что может свидетельствовать о появлении данных белков в арсенале растений в связи с выходом последних на сушу [23]. В геномах растений обнаружены мультигенные семейства, кодирующие различные изоформы LTP [24]. Например,

в рисе обнаружено 52 гена LTP, а в арабидопсисе – 49 [25]. Различные изоформы синтезируются на определенных стадиях онтогенеза в различных тканях и органах растения [5], что связывают с выполнением ими различных функций [26]. Кроме того, дифференциальная экспрессия различных изоформ LTP в разных тканях происходит также при действии на растение различных абиотических и биотических факторов окружающей среды. Тканеспецифичная экспрессия под действием различных факторов может рассматриваться как один из элементов защитной стратегии растения в условиях стресса [27]. Дифференциальная экспрессии генов изоформ была показана на примерах LTP кунжута [28], арабидопсиса [26],[29], перца [30], клещевины [6], винограда [31], тамарикса [32] и томата [33].

В настоящее время считается, что различные изоформы одного и того же LTP, выполняющие различные функции в растении, могли появиться в ходе эволюции путём последовательных дупликаций гена-предшественника и последующего мутационного процесса [25]. Установлено, что большинство цветковых претерпели в процессе эволюции одно или несколько удвоений целого генома посредством диплоидии. Дуплицирование генов и фрагментов хромосом продолжается и в настоящее время [34]. В ходе эволюционного развития растений появление мутаций в дуплицированных генах LTP могло приводить либо к псевдогенизации или выключению гена, либо к субфункционализации, при которой у гена сохраняется часть функций гена-предшественника, либо к его неофункционализации, то есть приобретению геном совершенно новых функций по сравнению с геном-предшественником [35]. Последние два пути могли привести к появлению новых изоформ LTP, обладающих различным спектром и степенью выраженности биологической активности, а также белков, сходных по структуре с LTP.

2.4. Связывание и перенос липидных молекул с участием LTP

Способность связывать и переносить липидные молекулы *in vitro* была продемонстрирована для LTP из различных растений. Данные белки связывают

широкий спектр моноацил- и диацил-содержащих липидных молекул, таких как лизофосфолипиды и фосфолипиды (лизофосфатидилхолин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилглицерин), глицеролипиды, галактолипиды, жирные кислоты, ацетил- и олеил-КоА, простагландин В2 [36],[37],[38],[39],[40]. Для некоторых LTP, например, Ace-AMP1 из семян лука *Allium cepa*, было показано отсутствие способности связываться с липидами. Возможно, причиной этого является отсутствие непрерывной гидрофобной полости внутри молекулы белка [41].

Как правило, липид-транспортирующие белки не образуют устойчивых комплексов с липидами, содержащими более 20 атомов углерода в жирнокислотной цепи [42]. Возможно, это связано с пространственными ограничениями, налагаемыми размерами гидрофобной впадины. LTP образуют более прочные комплексы с непредельными ЖК, преимущественно с двойными связями в *цис*-конфигурации [43].

Ориентация липидных молекул в гидрофобной полости белка может быть различной. Так, например, лиганды могут принимать «прямую» ориентацию, т.е. когда полярные головки липидных лигандов направлены в сторону бóльшего входа в гидрофобную впадину [16],[43], либо «обратную», когда они направлены в сторону меньшего входа [44]. В случае связывания фосфолипидов предполагается, что внутрь гидрофобной впадины погружаются только их ацильные цепи [45].

Считается, что в процессе связывания липидных молекул наибольшее значение имеют два консервативных фрагмента белка: $(T/S)^{40}$ -X-X-D-(R/K)⁴⁴ и R⁷⁸-Y-X-I-S⁸² [46]. Результаты исследования гидрофобных впадин липид-транспортирующих белков методом ЯМР-спектроскопии выявили возможность существования двух сайтов связывания липидов в структуре некоторых представителей LTP [44],[47]. В связи с тем, что структура многих растительных LTP содержит участок, гомологичный ВАА-домене (basic amphiphilic α -helix) кальмодулин-связывающих белков, было выдвинуто предположение о возможном участии кальций-кальмодулиновой системы в регуляции способности

растительных LTP связывать липидные лиганды. Так, было показано, что в присутствии кальмодулина способность связывать липиды снижается у Zm-LTP кукурузы *Zea mays*, но увеличивается у ВР-10 репы *Brassica rapa* [48],[49].

Долгое время отсутствовали доказательства связывания LTP растений с эндогенными лигандами *in vivo*. Не так давно из ячменя был выделен не так давно из ячменя был выделен ковалентный комплекс LTP1 с оксипипином – 9(*S*),10-эпокси-10,12(*Z*)-октадекадиеновой кислотой [50],[51], который предположительно играет важную роль в фотопериодизме цветущих растений.

Растительные LTP способны не только связывать липиды, но и осуществлять их транспорт между мембранами в опытах *in vitro* [39],[40],[52]. Показано, что транспортная активность LTP2 в несколько раз превышает таковую у LTP1 [53].

2.5. Биологическая активность LTP

Различные представители LTP обладают антимикробной активностью и ингибируют рост широкого спектра фитопатогенных бактерий и грибов [54],[55], в том числе некоторых патогенных для человека штаммов грибов [8],[56]. Вместе с тем, LTP не оказывают токсического действия на растительные клетки и клетки млекопитающих, включая фибробласты и эритроциты [54],[57]. Некоторые представители обладают слабовыраженной антимикробной активностью, но многие LTP ею не обладают [58]. Показано, что замена даже одного аминокислотного остатка может приводить к изменению пространственной структуры LTP и влиять на распределение на поверхности молекулы белка основных остатков, играющих важную роль в проявлении антимикробной активности, поэтому даже близкие по структуре изоформы могут иметь разную специфичность [59],[60]. Литературные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между антимикробной активностью растительных LTP и их способностью связывать липиды [54],[59],[60]. Механизм антимикробного действия растительных LTP остается предметом дискуссий, показана способность данных белков разрушать модельные мембраны [57] и цитоплазматические мембраны фитопатогенных грибов [57],[59], а также

вызывать высвобождение флуоресцентного красителя из искусственных липосом [41],[57],[61].

Отдельные представители класса ЛТР обладают способностью ингибировать активность α -амилаз [62] и протеолитических ферментов, таких как сериновые протеиназы (трипсин) [63], цистеиновые протеиназы (папаин) [64] и аспарагиновые протеиназы (пепсин) [65]. ЛТР из семян кофе и перца подавляют активность α -амилазы человека [56],[8]. Предполагается, что данные ЛТР, обладающие способностью к ингибированию протеолитических ферментов, могут принимать участие как в и в защите растения от насекомых и травоядных животных, так и в развитии и прорастании семян.

ЛТР из китайского нарцисса *Narcissus tazetta* и капусты полевой (сурепицы) *Brassica campestris* способны проявлять противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса гриппа типа А (H_1N_1), а также ингибировать пролиферацию опухолевых клеток острого промиелоцитарного лейкоза человека [66], печёчно-клеточной аденомы и рака молочной железы [67].

Было показано, что ЛТР из цитрусолистной моринды *Morinda citrifolia*, названный McLTP₁, обладает анальгезирующей активностью [68]. Препарат налоксон, который является антагонистом опиоидных рецепторов, блокирует также анальгезирующее действие данного белка. Это указывает на тот факт, что анальгезирующая активность McLTP₁ может быть опосредована работой эндогенной опиоидной системы.

2.6. Возможные функции ЛТР

Несмотря на то, что растительные липид-транспортирующие белки изучаются уже более 30 лет, их биологические функции в растительном организме остаются предметом дискуссий. Известно лишь, что ЛТР играют важную роль в растении, а выключение их генов приводит к различным нарушениям вегетативного и генеративного развития растений, снижению их устойчивости к инфекциям [26],[69],[70]. К настоящему моменту выдвинут

целый ряд предположений о возможных биологических функциях представителей класса LTP. Полагают, что они принимают участие в оплодотворении покрытосеменных, эмбриогенезе, метаболизме липидов, формировании кутикулы, защите растений от абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды.

Об участии в защите и адаптации растений к воздействию стрессовых факторов свидетельствует увеличение уровня экспрессии этих белков в ответ на механические повреждения, дефицит влаги, низкие температуры, засоление почвы, инфицирование фитопатогенами, обработку растений химическими агентами [26],[28],[30],[33],[71].

Предполагается, что благодаря способности связывать липидные лиганды некоторые LTP участвуют в различных сигнальных каскадах в растениях. Например, известно, что оксипирины участвуют в регуляции роста и развития растений, а также в запуске защитных реакций в условиях стресса. Показано связывание LTP ячменя с оксипирином, которое может свидетельствовать об участии LTP в регуляции сигнальных путей и предотвращении повреждения клеток растения в условиях стресса [51]. Благодаря структурному сходству с белками некоторых фитопатогенных оомицетов (элиситинами) [72] LTP в комплексе с липидными молекулами способны выступать в роли эндогенных элиситоров приобретенной резистентности. Продемонстрирована способность некоторых LTP взаимодействовать с элиситиновыми рецепторами [47],[73],[74], в результате чего в растениях происходит активация ряда защитных факторов, таких как фитоалексины и активные формы кислорода, развитие гиперчувствительного ответа (HR) и, в конечном счете, системной приобретенной резистентности (SAR) [75],[76]. Некоторые представители LTP, например, DIR1 из арабидопсиса, играют ключевую роль в развитии SAR [77], предположительно благодаря связыванию с липидными молекулами (оксипиринами, жирными кислотами или моноацильными липидами) [78].

На основании изучения способности LTP к связыванию и транспорту липидных молекул высказано предположение об участии данных белков в

метаболизме липидов и в целом ряде процессов, сопровождающихся изменениями липидного состава организма, таких как мобилизация липидов при прорастании семени [9], β -окисление жирных кислот [6], синтез кутина и суберина [79],[80], а также участие в формировании защитного липидного слоя вокруг зародыша [81].

Считается, что LTP играют важную роль в размножении покрытосеменных растений. Они участвуют в процессах адгезии пыльцы, формировании и росте пыльцевой трубки [82],[69], а также в постмейотическом развитии пыльцы [70].

Предполагается также, что LTP могут участвовать в процессе созревания плодов путем образования комплексов с полигалактуроназой и увеличения её активности [83]. Регуляция активности данного фермента, субстратом которого является пектин, позволяет участвовать в регуляции скорости размягчения и созревания плодов.

LTP могут играть важную роль в развитии симбиотических отношений между растением и клубеньковыми бактериями [84],[85], которые стимулируют рост растений и защищают их от почвенных фитопатогенов, вызывая развитие индуцированной системной резистентности, сходной с SAR [86].

Было обнаружено, что LTP кукурузы имеет значительное сходство с проапоптотическим белком Bid млекопитающих, который также способен связывать и переносить липиды [87]. Данный LTP в присутствии лизолипидов способен вызывать высвобождение цитохрома C из митохондрий, вызывая апоптотический процесс [88].

2.7. Практическое применение LTP

Актуальной задачей современной фармакологии является создание систем доставки лекарственных препаратов, обеспечивающих снижение токсичности и увеличение времени выведения терапевтического средства из организма за счет предотвращения его быстрой деградации. Наличие гибкой гидрофобной впадины в структуре LTP растений позволяет рассматривать возможность использования

данных белков в качестве транспортеров лекарственных и косметических средств [42],[37].

С использованием метода флуоресцентной спектроскопии было показано, что LTP1 из кукурузы связывает лекарственные препараты, являющиеся производными бензола, LTP2 из риса – стеринны (в том числе β -ситостерин, эффективно понижающий уровень холестерина в крови) и производные трифенилметана (ингибиторы обратной транскриптазы и РНК-полимеразы), а также некоторые иммуносупрессоры [36]. Тем же методом было установлено, что LTP1 пшеницы связывает амфотерицин В (полиеновый макролидный антибиотик), эдельфозин и ильмофозин (производные фосфолипидов), оказывающие антинеопластическое и антилейшманиозное действие, коназол BD56, обладающий противораковой активностью, а также производные сфингозина, используемые в косметологии [37].

В пивоваренной промышленности образование и стабильность пивной пены являются важными критериями качества продукта. Свойства пива тесно связаны с содержанием в нём таких компонентов, как алкоголь, углеводы, хмелевая кислота и белки. Известно, что LTP являются одними из основных белковых компонентов пива и участвует в образовании и стабилизации пивной пены [89],[90]. Использование рекомбинантных LTP позволит лучше контролировать процесс пивоварения и повышать качество выпускаемой продукции.

Благодаря стабильности пространственной структуры LTP сохраняют свою нативную конформацию в процессах ферментации и термической обработки теста при хлебопечении. Было выдвинуто предположение, что LTP облегчают переход полярных липидов пшеницы из бислоев, которые присутствуют в водной фазе, в монослой на границе сред вода-воздух [91]. Таким образом, достигается получение теста необходимой для выпекания текстуры. Дальнейшие исследования роли LTP в процессах, имеющих место при выпекании хлеба, позволят более эффективно использовать данные белки в хлебопекарной отрасли.

Большой практический интерес представляет возможность использования LTP в сельскохозяйственной отрасли для создания трансгенных растений,

обладающих устойчивостью к действию разнообразных абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды. В ряде работ показано, что трансгенные растения, несущие гены LTP, обладают повышенной устойчивостью к заражению фитопатогенными микроорганизмами [92], поражению вредителями [93], действию высоких температур [94], засолению почвы [92], засухе [95] и др.

2.8. Роль LTP в возникновении аллергических заболеваний и перспективы применения LTP в аллергодиагностике и аллерговакцинации

Число аллергических заболеваний стремительно выросло за последние десятилетия. В настоящее время в России, Европе и США аллергическими заболеваниями страдает, в среднем, 20-35% городского населения, однако в отдельных районах эта цифра может достигать 85-90%.

Иммунные процессы, лежащие в основе развития аллергических реакций, к настоящему моменту довольно хорошо изучены и непосредственно связаны с гиперчувствительностью организма. Несмотря на несколько существующих классификаций гиперчувствительного ответа организма, наибольшее распространение и признание получила классификация Ф. Гелла и Р. Кумбса, которая не теряет своей актуальности и сегодня. Согласно данной классификации выделяют I, II, III и IV типы гиперчувствительности организма. Наиболее клинически значимыми аллергическими проявлениями являются опосредованные специфическими IgE реакции, которые относятся к I типу гиперчувствительности организма [96],[97]. Это наиболее важный тип, который ответствен за самые опасные формы проявления немедленных аллергических реакций, такие как анафилактический шок, отёк Квинке, пароксизмальные боли, бронхиальная астма и др.

2.8.1. Возникновение и развитие аллергических реакций

Развитие IgE-опосредованного иммунного ответа представляет собой каскад молекулярных и клеточных взаимодействий, в который вовлечены антиген-презентирующие клетки (Antigen-Presenting Cells или сокращенно APC), T- и B-

клетки. В процессе возникновения аллергического иммунного ответа организма выделяют два основных этапа – первичная выработка антител (так называемая сенсibilизация организма) и, собственно, развитие аллергической реакции при повторном попадании аллергена в организм [98]. Первый этап обусловлен первичным попаданием аллергенного белка в организм, когда происходит его захватывание APC, которые, как правило, обладают макрофагальной активностью. Затем происходит презентация Т-клеточного эпитопа данного аллергена в виде аддукта с молекулами МНС II на поверхности APC, его распознавание CD4⁺ Т-хелперными наивными клетками (Th0) [99] с дальнейшей пролиферацией последних с образованием зрелых эффекторных Th-клеток. Важнейшую роль в процессе презентации большинства аллергенов играют дендритные клетки [100], которые главным образом сосредоточены в тканях, соприкасающихся с внешней средой, например, в эпителиальном слое слизистой оболочки кишечника, а также в подслизистой оболочке респираторного и желудочно-кишечного трактов. В зависимости от микроокружения, а также наличия некоторых цитокинов и кофакторов, дифференцировка наивных Th0 клеток происходит по одному из следующих путей: образование Th1, Th2, Th9, Th17 либо Т-регуляторных (Treg) клеток [101],[102]. Наибольшее значение в манифестации аллергических реакций имеют субпопуляции Th1 и Th2, так как у людей, страдающих аллергическими заболеваниями, в ходе аллерген-специфического иммунного ответа преимущественно вырабатываются Th2 клетки, в то время как у здоровых людей – Th1 [103],[104].

В случае дифференциации наивных клеток по пути образования Th2, образующиеся клетки усиленно продуцируют цитокины IL-4 и IL-13, которые обеспечивают увеличение продукции IgE В-клетками [105],[106]. Кроме того, вырабатываемый IL-4 также стимулирует дифференциацию наивных Th0 клеток в Th2 [101]. Этап сенсibilизации оканчивается связыванием продуцированных специфических IgE с высокоспецифичными (FcεRI) либо низкоспецифичными (FcεRII) рецепторами, расположенными на поверхности тучных клеток и базофилов, что приводит к активации последних [107]. Каждое последующее

попадание данного аллергена в организм будет вызывать непосредственно развитие аллергических реакций, реализуя второй этап иммунного ответа. В ходе второго этапа в результате взаимодействия повторно попавшего в организм аллергена со специфическими IgE, которые расположены на поверхности активированных тучных клеток и базофилов, происходит дегрануляция последних и высвобождение вазоактивных аминов (например, гистамин), липидных медиаторов (простагландина D, фактора активации тромбоцитов, лейкотриенов LTC₄, LTD₄ и LTE₄), хемокинов (CXCL8, CXCL10, CCL2 и CCL4) и некоторых интерлейкинов (IL-4, IL-5 и IL-13) [108]. Данные медиаторы ответственны за развитие немедленной фазы аллергической реакции.

Однако, в присутствии IL-12, IL-18 и IL-17 дифференциация Th0 происходит по пути образования Th1 клеток (т.н. клеток воспаления). Эти клетки вовлечены в Т-клеточную защиту от внутриклеточных микроорганизмов и стимуляцию синтеза В-клетками IgG (т.н. блокирующих антител), главным образом IgG4. Th1 клетки продуцируют преимущественно γ -интерферон (IFN- γ), являющийся антагонистом IL-4, и фактор некроза опухолей- β (TNF- β), который активирует макрофаги [99]. Th1 клетки вовлечены также в реакции гиперчувствительности замедленного типа и ответственны за возникновение поздних симптомов, таких как аллергический дерматит [109].

Остальные пути дифференциации Th0 реализуются реже. Это, прежде всего, популяции Т-хелперных CD4⁺ клеток Th17 и Th9, продуцирующих IL-17 и IL-9, которые обеспечивают индукцию и развитие местных воспалительных реакций, соответственно. Т-регуляторные CD4⁺ клетки, известные как т.н. супрессорные, продуцируют IL-10 и трансформирующий фактор роста бета (TGF β), которые предотвращают развитие аллергической реакции, обладают способностью подавлять индуцируемую аллергеном Т-клеточную пролиферацию и тормозить секрецию цитокинов Th1 и Th2 клетками [101]. Регуляторные Т-клетки способны переключать Th2-опосредованный ответ организма на Th1-опосредованный [101]. Именно эти клетки поддерживают толерантность организма к аутоантигенам.

Развитие симптомов аллергии при повторном проникновении аллергена спустя промежуток времени в месяцы и годы (например, у людей с сезонными аллергиями) обусловлен аллерген-специфичным Т-клеточным ответом, опосредованным циркулирующими в организме Т-клетками памяти [101].

Необходимо отметить, что пути проникновения в организм аллергена (например, желудочно-кишечный тракт, слизистые оболочки дыхательных путей и т.д.) и его количество являются важными внешними факторами, влияющими на способ презентации аллергена, в то время как особенности презентируемых эпитопов того или иного аллергена относятся к т.н. внутренним факторам, определяющим аллергенность непосредственно того или иного антигена [110].

2.8.2. Аллергенные свойства LTP

В соответствии с путем сенсibilизации IgE-опосредованные аллергические реакции на растительные пищевые продукты могут быть объединены в два различных класса. Реакции, опосредованные сенсibilизацией организма при попадании аллергена в организм через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), относят к классу I аллергических реакций; как правило, они характеризуются системным действием на организм. Реакции, опосредованные сенсibilизацией организма к аллергену, попавшему в организм через респираторный тракт, могут быть отнесены к классу II аллергических реакций, которые, характеризуются, в основном, локальными реакциями, такими как оральная аллергическая реакция (ОАР) [111]. Сходным образом, на 2 класса делят и аллергены, участвующие в развитии аллергических реакций, – аллергены I и II классов, соответственно. Аллергены I класса, характеризующиеся способностью как сенсibilизировать организм, так и вызывать аллергический ответ при повторных попаданиях, обладают стабильной пространственной структурой, устойчивой к действию протеолитических ферментов ЖКТ и термической обработке. Аллергены II класса, напротив, как правило, обладают чувствительной к термической обработке и протеолизу пространственной структурой; многие представители не способны вызывать сенсibilизацию организма, а способны только вызывать

перекрестные аллергические реакции вследствие высокой гомологии пространственной структуры с аллергеном, вызвавшим первичную сенсibilизацию [112].

LTP являются аллергенами I класса, участвующими в развитии аллергических реакций различной степени тяжести на пыльцу, растительные продукты и латекс. Стабильная структура этих белков позволяет им достигать кишечника человека в нативной, иммуногенной форме и вызывать сенсibilизацию [113]. Наличием у растительных LTP устойчивой к тепловой денатурации, химической деградации и ферментативному расщеплению структуры объясняется то, что они выступают в роли основных аллергенов, присутствующих в различных прошедших обработку продуктах (соках, джемах, пиве, вине и др.) [114]. Необходимо отметить, что наиболее охарактеризованными аллергенами являются, в основном, представители первого подкласса растительных LTP (LTP1). Так, в настоящий момент в базе данных аллергенов WHO/IUIS зарегистрированы всего два представителя подкласса LTP2, выделенные из помидора и сельдерея, и 38 LTP1 из различных растений, не считая изоаллергенов и вариантов этих белков. Высокая структурная гомология LTP1 обуславливает широкую перекрестную реактивность данных белков.

Несмотря на широкое распространение LTP1 в царстве растений их клиническая значимость ограничена в основном средиземноморским регионом, где они являются основными аллергенами плодов растений (персика *Prunus persica* Pru p 3, вишни *Prunus avium* Pru av 3, яблока *Malus domestica* Mal d 3, сливы *Prunus domestica* Pru d 3, апельсина *Citrus sinensis* Cit s 3, винограда Vit v 1), некоторых овощей (салата-латука *Asparagus officinalis* Aspa o 1, спаржи *Lactuca sativa* Lec s 1, капусты *Brassica oleracea* Bra o 3) и орехов (фундука *Corylus avellana* Cor a 8, грецкого ореха *Juglans regia* Jug r 3, каштана *Castanea sativa* Cas s 8). Важно отметить, что LTP накапливаются в основном в кожице плодов, а не в их мякоти [115], причиной чего могут являться случаи возникновения анафилактических реакций при каждом контакте человека с

плодами [116]. Значимый вклад в первичную сенсibilизацию вносят и пыльцевые аллергены класса LTP из постенницы иудейской *Parietaria judaica* Par j 2, маслин *Olea europaea* Ole e 7, платана *Platanus acerifolia* Pla a 3 и полыни *Artemisia vulgaris* Art v 3 [117]. Интересно, что LTP из плодов растений семейства *Rosaceae* обнаружены также и в пыльце этих деревьев [118]. Доминирующим аллергеном класса LTP, который играет основную роль в сенсibilизации и распознается IgE-антителами большинства аллергических пациентов, является Pru p 3 персика [119],[120].

К настоящему моменту проведены многочисленные исследования, направленные на выяснение причин высокой аллергенности растительных LTP1 и развития вызываемых ими перекрёстных аллергических реакций. Так, определены B-клеточные эпитопы Pru p 3, которые представляют собой последовательности аминокислотных остатков 11-25, 31-45 и 71-80 и формируют положительно заряженные регионы на поверхности молекулы белка [121]. Показано, что выявленные фрагменты имеют значительное сходство с таковыми у других аллергических LTP1. Также установлено, что решающую роль во взаимодействии Pru p 3 с IgE играют характерные для основной массы аллергических LTP1 остатки Arg39, Thr40 и Arg44 [122].

Выявлено, что в роли T-клеточного эпитопа Pru p 3 выступает участок последовательности, соответствующий аминокислотным остаткам 61-80 [103]. При исследовании T-клеточного ответа иммунной системы на аллергический липид-транспортный белок персика Pru p 3 из крови пациента с аллергией на персик были выделены T-клеточные клоны (TCC), которые в ответ на добавление в культуральную среду аллергена Pru p 3 усиленно экспрессировали на своей поверхности интегрин $\alpha 4\beta 7$ [123],[124]. Интегрины являются адгезивными молекулами, выполняющими функцию тканеспецифических хоуминг-рецепторов (от англ. «homing» – возвращение домой), которые определяют пути миграции лимфоцитов. Интегрины семейства $\beta 7$ регулируют возвращение эффекторных клеток, а также клеток памяти, в стенку желудочно-кишечного тракта. В частности, интегрин $\alpha 4\beta 7$ связывается с адрессином

эндотелиоцитов кишечника (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 или сокращенно MAdCAM-1), обеспечивая миграцию лимфоцитов в стенку кишечника [125], где и происходит их активация. Также были измерены концентрации IL-4 и IFN- γ , которые продуцируются Т-клеточными клонами данных пациентов в ответ на стимуляцию аллергеном Pru p 3, и являются молекулярными маркерами Th1- и Th2-иммунного ответа, соответственно [103]. Соотношение концентраций IFN- γ /IL-4 используется для определения иммунного статуса пациента с аллергией и характеристики иммунного ответа. У здоровых людей это соотношение обычно больше 11, что свидетельствует о преимущественной секреции IFN- γ , который подавляет пролиферацию Th2 клеток. У пациентов с аллергией соотношение концентраций IFN- γ /IL-4, измеренное в ходе проведенного исследования по характеристике Т-клеточного иммунного ответа на Pru p 3, оказалось меньше 2, что свидетельствовало о преимущественной секреции IL-4, и, как следствие, усиленной пролиферации Th2-субпопуляции Т-лимфоцитов, ответственных за IgE-опосредованное развитие аллергических реакций [103],[106].

2.8.3. Использование LTP растений в диагностике аллергических реакций

Основными способами диагностики аллергии *in vivo* являются кожные аллергопробы, провокационные и элиминационные тесты [126]. Данные тесты имеют существенные недостатки, включая низкую специфичность, влияние на результат индивидуальной чувствительности пациента, возможность развития тяжелых аллергических реакций и невозможность проведения анализа у пациентов, находящихся на противоаллергической терапии [127].

Необходимо отметить, что для проведения аллергодиагностики традиционно используются грубые экстракты аллергенов, часто дающие ложные и плохо воспроизводимые результаты [128]. Причиной этого является сложность стандартизации природных экстрактов, колебание содержания в них различных белков и небелковых компонентов, способных вызывать аллергическую реакцию. Нередко мажорный аллерген может присутствовать лишь в небольших

количествах, и его биологическая активность может характеризоваться сильной изменчивостью под влиянием побочных компонентов экстракта. Существенную проблему при серологической диагностике аллергии представляют также перекрёстные реакции аллергенов. Кросс-реактивность наблюдается среди широко распространённых в царстве растений представителей классов липид-транспортующих белков (LTP) [129], экспансинов [130], гомологов *Bet v 1*, относящихся к классу PR-10 белков, связанных с патогенезом растений [3], и профилинов [113]. Перекрёстная реактивность наблюдается также между представителями различных классов белков животного происхождения, включая тропомиозины [131], сывороточные альбумины [132] и парвальбумины [133].

В связи с этим современным направлением развития аллергодиагностики является замена суммарных экстрактов на индивидуальные белковые аллергокомпоненты, которые могут быть использованы для составления молекулярного профиля чувствительности пациента и изучения перекрёстной реактивности [129]. Использование индивидуальных аллергенов снижает риск возникновения перекрёстных аллергических реакций и позволяет определять более точно профиль чувствительности. Выделение клонов кДНК, кодирующих аллергены LTP, и получение их рекомбинантных форм в гетерологичных системах экспрессии позволило использовать их в качестве аллергенных компонентов, моделирующих реакции их природных аналогов в аллергодиагностике *in vitro* [134]. В современных тест-системах, предназначенных для компонент-разрешающей диагностики, уже используются несколько природных и рекомбинантных пыльцевых (*Art v 3* полыни, *Pla a 3* платана, *Par j 2* постенницы и *Ole e 7* маслин) и пищевых (*Pru p 3* персика, *Cor a 8* фундука, *Jug r 3* грецкого ореха, *Ara h 9* арахиса и *Tri a 14* пшеницы) аллергенных LTP [135]. Доскональная проверка иммунологической эквивалентности соответствующему природному аналогу была выполнена для рекомбинантного *Pru p 3*. Было проведено сравнение конформации и IgE-связывающей активности природного и рекомбинантного *Pru p 3*, которое подтвердило их идентичность [136].

Большое значение для диагностики аллергических заболеваний имеет географическое распределение профилей сенсибилизации [137]. Так, например, для Северной Европы характерны симптомы пищевой аллергии на фрукты и овощи, и липид-транспортирующие белки в данном регионе чаще вызывают достаточно легко протекающие местные реакции полости рта или горла – оральный аллергический синдром, в то время как у пациентов в Южной Европе на аллергены класса LTP чаще возникают тяжёлые системные реакции, в частности, анафилаксия. Статистический анализ многочисленных проведенных тестов показывает, что в Центральной и Северной Европе доминирует сенсибилизация основным аллергеном пыльцы березы Bet v 1. В Южной Европе, наоборот, в диагностических тестах определяются преимущественно антитела к LTP, что указывает на преобладание в данном регионе истинной пищевой аллергии [119]. Таким образом, LTP принадлежат к основным компонентам алергодиагностических панелей, а профили их сенсибилизации имеют географические различия. В связи с этим необходима разработка уникальных композиций LTP для алергологических панелей того или иного региона.

2.8.4. Современные методы лечения аллергических реакций и перспективы применения LTP

Как уже было отмечено, в последнее время во всем мире и в Российской Федерации, в частности, наблюдается стремительный рост числа аллергических заболеваний, в том числе отличающихся тяжелой формой течения. Считается, что распространение аллергических заболеваний связано с ухудшением экологической ситуации, повышением интенсивности использования в пищевой промышленности красителей и консервантов, сокращением сроков грудного вскармливания детей, изменением структуры питания, в частности, введением в рацион экзотических фруктов, морепродуктов, пряностей и специй, увеличением частоты встречаемости хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта и бесконтрольного применения лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков, витаминов и противоаллергических средств.

Большое значение имеет источник возникновения аллергических реакций. Так, для пациентов с поллинозом, причиной которого является аллергическая реакция на пыльцу растений, характерны сезонные проявления симптомов аллергии, и наиболее эффективными являются профилактика и лечение аллергии в сезон цветения растительного источника аллергена, в то время как профилактика развития аллергии на растительную пищу имеет важное значение для пациентов с сенсibilизацией к пищевому аллергену независимо от сезонной возможности экстракции аллергенного компонента из природного источника, то есть круглогодично [138].

Используемые в настоящее время классические подходы к профилактике и лечению аллергии основаны, в основном, на исключении из пищевого рациона аллергенных продуктов и применении симптоматических лекарственных средств, которые обладают свойством либо препятствовать высвобождению медиаторов аллергии из тучных клеток и базофилов (глюкокортикоиды, эпинефрин, эуфиллин), либо препятствовать взаимодействию гистамина со своими *H*-рецепторами (антигистаминные препараты) [139]. Однако, в последние десятилетия появилось множество новых перспективных подходов к лечению аллергических реакций, опосредованных IgE-антителами.

2.8.4.1. Использование моноклональных антител

Развивающимся методом лечения аллергических реакций является использование гуманизированных моноклональных антител. Так, анти-IgE антитела, связываясь со свободными IgE сыворотки крови, блокируют взаимодействие IgE с высокоаффинными FcεRI-рецепторами, находящимися на поверхности тучных клеток и базофилов, предотвращая дальнейшую активацию последних, что, в конечном итоге, предотвращает их дегрануляцию и развитие патологического состояния [140]. Анти-IgE антитела показали высокую эффективность в экспериментах с участием пациентов с пищевой аллергией на арахис [141]. Из коммерчески доступных на сегодняшний день препаратов, представляющих собой моноклональные анти-IgE антитела, можно выделить

препарат Xolair (Omalizumab), предназначенный для лечения бронхиальной астмы средневыраженной и тяжелой персистирующей формы [142].

Еще одним подходом к лечению аллергических реакций является использование гуманизированных моноклональных антител против интерлейкина-5 (IL-5), известных как препарат меполизумаб (Mepolizumab) [143]. Данные антитела предназначены, в основном, для лечения тяжелой формы эозинофильной астмы, так как IL-5 играет роль главного активатора и регулятора эозинофилов [144]. Препарат меполизумаб прошел III фазу клинических испытаний в 2014 г. и в настоящее время готовится к выпуску.

К главным недостаткам применения гуманизированных антител можно отнести очень высокую стоимость препаратов на их основе и возможные побочные реакции в силу генерализованного действия на ключевые факторы иммунной системы.

2.8.4.2. Аллерген-специфическая иммунотерапия

Подходом к лечению аллергии, направленным на устранение её причины, является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), при которой пациент постепенно вакцинируется нарастающими дозами специфического антигена, в основном, парентеральным либо сублингвальным способами. Это вызывает десенситизацию или иммунологическую толерантность у пациентов с IgE-опосредованной пищевой аллергией [145]. Традиционная АСИТ, проводимая с использованием суммарных экстрактов, показала свою эффективность в подавляющем большинстве клинических случаев. В то же время, из-за большого количества балластных веществ в природных экстрактах она не всегда достаточно эффективна при тяжелых системных аллергических реакциях и может приводить к побочным реакциям организма. В связи с этим возникли новые подходы к проведению АСИТ.

Одним из таких подходов является использование химически модифицированных экстрактов аллергенов (аллергоидов) со сниженной аллергенностью по сравнению с нативными аллергенами [146]. Аллергоиды

находят сейчас всё более широкое применение при проведении АСИТ. В качестве модифицирующих агентов обычно выступают формальдегид и глутаровый альдегид, которые вызывают полимеризацию аллергенов [147]. Данный подход, направленный на снижение аллергенности белков, позволяет применять для иммунотерапии увеличенные дозы аллергена по сравнению с вакцинами на основе экстрактов нативных аллергенов [148]. Однако, это не решает проблему большого количества балластных веществ в суммарных экстрактах из аллергенных источников.

Более перспективным подходом является использование для лечения аллергии индивидуальных природных и рекомбинантных аллергенов [149]. Однако, несмотря на отсутствие балластных веществ в препарате индивидуального аллергена, белки в нативной конформации несут на своей поверхности весь набор IgE-эпитопов, в связи с чем обладают полным аллергенным потенциалом и могут вызывать аллергические симптомы, стимулируя высвобождение медиаторов воспаления из тучных клеток и базофилов. В свою очередь, рекомбинантные аллергены могут быть получены в трёх основных формах: в виде молекул, точно имитирующих свойства природных аллергенов (т.е. рекомбинантные аллергены дикого типа), в виде модифицированных вариантов с улучшенными свойствами, такими как снижение аллергенной активности либо повышение иммуногенности, а также в виде гибридных молекул, содержащих эпитопы нескольких различных аллергенов [146],[150]. Вакцины на основе гипоаллергенных форм аллергенов рассматриваются в настоящее время в качестве многообещающих препаратов нового поколения для лечения аллергии со сниженной вероятностью возникновения побочных аллергических реакций во время проведения АСИТ.

2.8.4.3. Разработка гипоаллергенных форм аллергенов, предназначенных для создания алерговакцин

Одним из методов получения гипоаллергенных форм является сайт-

направленный мутагенез. С помощью этого метода заменяются ключевые для связывания с IgE-антителами аминокислотные остатки, входящие в состав В-клеточных эпитопов [98]. Целью такого подхода является снижение IgE-реактивности, в то время как сохранение иммуногенности достигается за счёт сохранения в составе аллергена всех необходимых детерминант для индукции пролиферации и поддержания Т-клеток. Недавно с использованием этого подхода были получены гипоаллергенные формы аллергенов Bet v 1a березы и Phl p 5b тимофеевки [151].

Благодаря эпитопному картированию большого количества аллергенов, выделенных из различных источников, а также созданию различных эпитопных баз данных, всё ббольшую роль для поиска участков полпептидной цепи, наиболее значимых для связывания с IgE-антителами, в настоящее время играет подход *in silico*. Так, пространственное моделирование Pru p 3 персика позволило предположить позиции ключевых для связывания с IgE аминокислотных остатков R39, T40 и R44, входящих в состав эпитопов данного аллергена, которые впоследствии были подтверждены. На основании этой информации был получен тройной мутант R39A/T40A/R44A. Данный гипоаллергенный вариант Pru p 3 показал 5-кратное уменьшение IgE-связывающей активности по сравнению с Pru p 3 дикого типа [121].

Другой стратегией создания гипоаллергенных аналогов является получение синтетических или рекомбинантных мутантных форм, а именно укороченных мозаичных форм аллергена или его фрагментов, разнообразных химерных белков. Например, был получен химерный белок, предназначенный для проведения АСИТ у пациентов с аллергией на арахис и представляющий собой слитые полипептидные цепи основных аллергенов арахиса Ara h 1-3 [152]. Также химерный белок со сниженной аллергенностью был получен с использованием двух аллергенов класса LTP постеницы Par j 1 и Par j 2 [153].

Известно, что белковые эпитопы являются преимущественно конформационными, то есть они способны связываться с соответствующими антителами только в том случае, если белки, содержащие эти эпитопы, находятся

в нативной конформации. Это определяется тем фактом, что конформационный эпитоп зачастую включает в себя аминокислотные остатки, которые могут находиться на различном удалении друг от друга в аминокислотной последовательности, но локализованы рядом на поверхности белка, имеющего нативную конформацию. В большинстве случаев нарушение пространственной структуры белка приводит к снижению способности связываться с антителами, поэтому зачастую с помощью сайт-направленного мутагенеза заменяются остатки цистеинов, играющие важную роль в стабилизации пространственной структуры белков. Так, показано, что разрыв внутримолекулярных дисульфидных связей приводит к снижению аллергенности за счёт нарушения нативной структуры белка [154]. Подобные гипоаллергенные варианты аллергенов называются конформационными в связи с тем, что кроме остатков цистина, первичная структура белка не претерпевает значительных изменений. Например, в результате замены остатков цистеина на остатки серина были получены три гипоаллергенные формы главного аллергена кошки Fel d 1 [155]. В отличие от аллергенных фрагментов и мутантов, конформационные варианты аллергена сохраняют все Т-клеточные эпитопы, потому что их первичная структура не меняется. Данный подход используется также для получения различных гипоаллергенных форм аллергенов, принадлежащих классу LTP. Так, аллерген пыльцы постеницы иудейской *Parietaria judaica* Par j 1 содержит конформационный иммунодоминантный эпитоп в N-концевой области (остатки 1-30), который включает ключевые для связывания остатки: два цистеина (Cys14 и Cys29), образующих дисульфидный мостик, и несколько заряженных аминокислот (Lys21, Lys23, Glu24 и Lys27). Один из полученных мутантных гипоаллергенных форм данного аллергена – rPjC – был создан с введенным посредством сайт-направленного мутагенеза дефектом дисульфидных мостиков [156].

Хотелось бы отметить, что к настоящему моменту ни один рекомбинантный аллерген или его гипоаллергенный аналог не получил разрешение на коммерциализацию и введение в широкую медицинскую практику, однако

разработка новых вакцин с ограниченным IgE-связывающим потенциалом в настоящее время является предметом доклинических и клинических исследований [151],[157],[158],[159]. В то же время, среди них пока отсутствуют препараты на основе растительных аллергенов класса LTP.

Решению проблемы может помочь использование при создании вакцин пептидов, отличающихся по аминокислотной последовательности от антигенных детерминант LTP, но сохраняющих способность связываться с комплементарными антителами. Такие пептиды имитируют антигенные детерминанты. Пептиды-имитаторы могут обладать значительной степенью вырожденности и обнаруживать перекрестную реактивность с антителами к разным видам LTP, обладающими частичной структурной гомологией. Вырожденные пептиды при иммунизации могут индуцировать получение антител, перекрестно реагирующих с антигенными вариантами одного и того же LTP, то есть проявлять молекулярную мимикрию [98].

2.8.4.4. Использование пептидов, содержащих T-клеточные эпитопы

Посредством T-клеточных эпитопов происходит взаимодействие аллергенного белка с расположенными на поверхности T-клеток рецепторами (T-Cell Receptor или сокращенно TCR). Основное отличие T-клеточных эпитопов от B-клеточных заключается в том, что сами по себе T-клеточные детерминанты не распознаются иммунной системой. T-клеточный рецептор $\alpha\beta$ TCR распознает не собственно антиген, а его комплекс с продуктами главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex или сокращенно MHC) [160]. Действие данных пептидов основано на активации аллерген-специфических T_{reg}-лимфоцитов, которые, в свою очередь, подавляют выработку IgE-продуцирующих плазматических клеток [161]. Так, было показано значительное повышение толерантности организма к аллергену домашнего клеща Der p 1 наряду с сохранением иммуногенности при использовании вакцины, основанной на его T-клеточном эпитопе [162]. Структурные особенности этих пептидов и их размер обуславливают низкую вероятность

связывания с IgE, хотя аллергические реакции все же могут возникать в случае использования достаточно больших по размеру Т-клеточных пептидов либо в результате использования высоких доз пептида. Данный подход создания противоаллергических вакцин имеет много преимуществ. Основным его недостатком является обязательное наличие информации о локализации Т-клеточных эпитопов.

Информация о расположении Т-клеточных эпитопов в структурах растительных LTP к настоящему моменту весьма ограничена. Известно лишь несколько LTP, у которых Т-клеточные эпитопы картированы. Первым белком класса LTP, для которого был определен Т-клеточный эпитоп, стал пыльцевой аллерген *Par j 1* из постенницы иудейской *Parietaria judaica*, в котором данный эпитоп расположен между третьей и четвертой α -спиралями и соответствует аминокислотным остаткам 53-71 [163]. Schulten с соавт. и Tordesillas с соавт. были проведены два независимых исследования по определению Т-клеточного эпитопа белка Pru p 3, в результате которых было показано, что наиболее вероятным эпитопом является консервативный участок структуры представителей класса LTP, соответствующий аминокислотным остаткам 61-80 [103],[124]. Возможно, данный участок полипептидных цепей растительных LTP является консервативным иммунодоминантным Т-клеточным эпитопом большинства представителей этого класса белков [103].

Несмотря на существующие данные о Т-клеточных эпитопах некоторых липид-транспортирующих белков, пока в литературе отсутствуют данные о создании каких-либо вакцин на основе Т-клеточных пептидов аллергенов класса LTP.

2.8.4.5. Использование пептидов, содержащих В-клеточные эпитопы

В отличие от Т-клеточных В-клеточные эпитопы непосредственно распознаются молекулами антител, продуцируемым циркулирующими в крови плазматическими клетками либо иммуноглобулиновыми рецепторами самих В-клеток. Одним из современных подходов является создание вакцин на основе

пептидов, содержащих В-клеточные аминокислотные последовательности, не способные связываться с IgE, однако, индуцирующие продукцию блокирующих IgG-антител [164]. Как правило, протективные пептиды представляют собой модифицированные последовательности В-клеточных эпитопов [165]. Дизайн таких пептидов осуществляется на основе данных IgE-эпитопного картирования и параметров пространственной структуры того или иного аллергена.

В литературе продемонстрировано успешное применение данного подхода, основанного на использовании для лечения аллергии коротких пептидов, представляющих собой В-клеточные эпитопы [108]. Однако, вакцины на основе В-клеточных эпитопов аллергенов класса LTP пока не применяются в клинической практике.

2.8.4.6. Генотерапия

Одним из современных перспективных подходов к созданию вакцин против аллергических реакций является генотерапия посредством введения в организм нуклеиновых кислот, кодирующих целевой аллерген [98]. Генотерапия посредством введения генов, несущих клинически значимые аллергены, способна вызвать долговременный неаллергенный Th1-иммунный ответ и стимулировать продукцию γ -IFN CD4⁺Th1-клетками. В свою очередь, γ -IFN стимулирует В-клетки синтезировать антитела IgG2a и ингибировать продукцию IgE в опытах на мышах. Около 10 лет назад в литературе появилось первое исследование, выявившее протективные свойства иммунизации мышей плазмидой, кодирующей β -галактозидазу *E.coli*, благодаря которой происходило стимулирование развития Т-клеточного ответа по пути Th1 [166]. В последующие годы появилось множество работ, посвященных созданию плазмид, кодирующих различные клинически важные аллергены и изучению их влияния при иммунизации на IgE-опосредованный тип аллергических реакций [167],[168].

Однако, высокая устойчивость плазмидной ДНК создает риск продолжительного нахождения молекул ДНК в тканях организма, что, в конечном

счете, может привести к неконтролируемо высокому уровню экспрессии кодируемого аллергена, выработке анти-ДНК антител и появлению аутоиммунных реакций [169]. Кроме того, имеется риск интеграции ДНК в геном клеток организма-хозяина и запуска механизмов активации протоонкогенов [170]. В связи с этим, в качестве более безопасного направления в развитии генотерапии в настоящее время рассматривается использование для осуществления генотерапии мРНК [171]. Одним из главных преимуществ использования мРНК является её достаточно низкая стабильность, что ограничивает период полужизни молекул, являющихся основой данного типа вакцин, и решает проблему сокращения продолжительности нахождения нуклеиновой кислоты в тканях организма.

Вакцины для генотерапии аллергических заболеваний, опосредованных сенситизацией к ЛТР, пока не разработаны.

2.8.4.7. Использование CpG-олигодезоксинуклеотидов

Участки ДНК, содержащие большое количество последовательно расположенных цитозинового и гуанинового нуклеотидов, разделенных фосфатом, получили название CpG-островков (CpG, цитозин-фосфат-гуанин). У позвоночных большая часть CpG-островков связана с сайтами инициации транскрипции генов и находится преимущественно в неметилованном состоянии [172]. Известно, что неметилованные CpG-островки, входящие в состав бактериальной ДНК, являются природными лигандами Toll-подобного рецептора 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) [173]. Было показано, что такие CpG-островки нативной бактериальной ДНК, равно как и синтетические CpG-олигодезоксинуклеотиды, способны вызывать Th1-ответ, предотвращая развитие аллергических реакций [174]. Например, комбинированное подкожное введение аллергена арахиса Ara h 2 совместно с синтетическими CpG-олигодезоксинуклеотидами подавляет продукцию Ara h 2-специфических IgE у мышей линии BALB/c [175].

Пока отсутствуют литературные данные о разработке препаратов на основе

СpG-олигодезоксинуклеотидов для лечения аллергических заболеваний, опосредованных сенситизацией на липид-транспортирующие белки.

3. Материалы и методы

3.1. Оборудование

Препаративная центрифуга «J2-21» (Beckman); ультрацентрифуга «L8-70M» (Beckman); центрифуга «5810R» (Eppendorf); низкоскоростная центрифуга с охлаждением «Minifuge GL» (Heraeus); настольная микроцентрифуга «202 МК» (Sigma); ультразвуковой дезинтегратор «5/75.МК2» (MSE); блендер «7011» (Waring); низкотемпературный холодильник (Sanyo); синтезатор ДНК «PCR-MATE 391» (Applied BioSystems); система для секвенирования белков «ProciSe cLC 491», укомплектованная анализатором «120A РТН» (Applied Biosystems); MALDI-времяпролетный масс-спектрометр Reflect III (Bruker); спектрофотометр «Ultraspec 3300 PRO» (Amersham); прецизионный программируемый термостат «106 CycloTemp» (СТМ); твердотельный термостат для микропробирок «Гном» (ДНК-Технология); водяной термостат «Multitemp II» (ЛКВ); амплификатор многоканальный «Терцик» (НПФ ДНК-Технология); амплификатор детектирующий ДТ-96 (ДНК-технология); весы электронные «JP2-3000» и «JL-180» (Chyo); весы электронные аналитические «R200D» (Sartorius); весы «Sartorius 1412» (Sartorius); pH-метр «501 А» (Orion Research); мешалка магнитная «ММЗМ» (Завод комплектных лабораторий); встряхиватель для микропробирок «5432» (Eppendorf); водяные термостаты «U7c» (MLW) и «Frigostat» (Desaga); камера для агарозного электрофореза «GNA-100» (Pharmacia Fine Chemicals) с источником питания «PS500XT» (Hofer); микроволновая печь (Samsung); трансиллюминатор «DK-2900» (BioTecMed), лампа ультрафиолетовая «UVGL-25 Mineralight Lamp» (Ultra-violet Products); система для геледокументирования «Биотест-1» (Россия); настольный ламинарный бокс «ВЛ-22» (Сампо); термостатируемые качалки «Environ-Shaker» и «Incubator-Shaker» (Lab-line); термостатируемый шейкер для 96-луночных планшет «ST-3» (ELMI); планшетный фотометр «Multiscan EX» (Thermo Scientific); биологический микроскоп «CX31» (Olympus); инвертированный микроскоп «СКХ41» (Olympus), оснащенный цифровой камерой «C510» (Levenhuk); сухой термостат 132000

(Boeckel); сухожаровой шкаф; воздушный термостат «Model 132000» (Boeckel Scientific); автоклав «MLS-3781L» (Sanyo); система для заливки гелей «Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster» (Hoefel/Amersham); камера для вертикального электрофореза «2050 Midget Electrophoresis Unit» (Hoefel) с источником питания «EPS 500/400» (Pharmacia) и системой охлаждения «2219 Multitemp II Thermostatic Circulator» (LKB); система для электрооблоттинга «Midget Multiblot» (LKB); лазерный денситометр «2202» (LKB); мини-экструдер Avanti Polar Lipids (Avanti); вакуумный концентратор «SpeedVac» (Savant); насосы перистальтические «Microperpex 2132» и «Microperpex 2115» (LKB); УФ-детектор «Uvicord SII 2238» (LKB); самописцы одноканальный «BD-41» (LKB) и двухканальный «REC-481» (Pharmacia); установки для ультрафильтрации «8003» и «8010» (Amicon); система для фильтрования (Millipore); система для ВЭЖХ (Gilson).

3.2. Реактивы и расходные материалы

Набор для выделения РНК «SV Total RNA Isolation System» (Promega); натрия ацетат (Реахим); уксусная кислота (Лекбиофарм); этанол (Ферейн); трис (Serva, Bio-Rad); трицин (Serva); глицин (Sigma); серная кислота (Реахим); соляная кислота (Реахим); трифторуксусная кислота (ТФУ) (Applied BioSystems); трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Реахим); кальция хлорид (Sigma); калия хлорид (Реахим); магния хлорид (Merck); магния сульфат (Helicon); калия гидрофосфат (Fluka); калия дигидрофосфат (Реахим); натрия хлорид (Реахим); персульфат аммония (ПСА) (Bio-Rad); бромциан (Merck); гуанидина гидрохлорид (Amresco); β-меркаптоэтанол (ВМЕ) (Fluka); изопропанол (Реахим); акриламид (Bio-Rad); метиленбисакриламид (Bio-Rad); додецилсульфат натрия (SDS) (Bio-Rad), мочевины (Bio-Rad); N,N,N',N'-тетраметиленамин (TEMED) (Fluka); метанол (Реахим); дитиотреитол DTT (Serva); PEG-6000 (Fermentas); этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА) (Sigma); имидазол (Sigma); сахароза (Реахим); глюкоза (Ferak); [U-¹⁵N] NH₄Cl (99% ¹⁵N, CIL); [U-¹³C₆] D-глюкоза (99% ¹³C, CIL); дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Promega); обратная

транскриптаза M-MLV (Сибэнзим); термостабильная ДНК-полимераза «Taq» (Евроген); термостабильная ДНК-полимераза «Tersus» (Евроген), термостабильная ДНК-полимераза «Encyclo» (Евроген), эндонуклеаза рестрикции EcoRI (Fermentas); эндонуклеаза рестрикции BamHI (Fermentas); набор буферов для рестриктаз (Fermentas); T4 ДНК-лигаза (Fermentas); агароза (Fermentas), этидия бромид (Serva); EvaGreen Dye 20X (Biotium); реагент TRIzol (MRC, Inc.); Orange G (Serva); ДНК маркер молекулярных масс (Сибэнзим); набор для выделения плазмидной ДНК «GenElute Plasmid Miniprep Kit» (Sigma); набор для выделения и очистки продуктов ПЦР «Zymoclean Gel DNA Recovery Kit» (Zymo Research); набор для амплификации кДНК «SMART™ RACE cDNA Amplification Kit» (Clontech); набор для клонирования продуктов ПЦР «pGEM-T Vector System I» (Promega); набор реактивов для синтеза кДНК «Mint» (Евроген); pAL2-T вектор (Евроген); глицерин (Merck, Serva); бакто-агар (Ferak); бакто-триптон (Difco); дрожжевой экстракт (Difco); ампициллина натриевая соль (Ферейн); изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG) (Promega); 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) (Promega); рибонуклеаза-A (Sigma); SDS (Bio-Rad); фенол (Реахим); Triton X-100 (Merck); Ni²⁺-сефароза (Qiagen); белковый маркерный набор (14,4-94 кДа) (Pharmacia Biotech); пептидно-белковый маркерный набор (2,512-16,949 кДа) (Amersham); кумасси G-250 (Serva); амидочерный 10Б (Merck); бромфеноловый синий (LKB); иммобилон-P 0,45 мкм (Millipore); нитроцеллюлозная мембрана 0,2 мкм (Schleicher&Schuell); аммония ацетат (Fluka); фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma); коктейль ингибиторов протеаз (Sigma); поливинилполипирролидон (PVPP) (Sigma); йодацетамид (Sigma); восстановленный и окисленный глутатионы (GSH и GSSG, соответственно) (Panreac AppliChem); L-аргинин (Panreac AppliChem); мембрана диализная MWCO 12-14 кДа (Sigma); мембрана диализная MWCO 6-8 кДа (Spectrapor); патроны хроматографические HiTrap SP FF (GE Healthcare); твин 20 (Sigma); обезжиренное сухое коровье молоко (Bio-Rad); бычий сывороточный альбумин фракция V (БСА) (Serva); конъюгированные с пероксидазой хрена козы антивидовые антитела к IgG кролика (Sigma); конъюгированные с

пероксидазой хрена козы антивидовые антитела к IgE человека (Sigma); 3,3',5,5'-тетраметилбензидина раствор для ИФА (ТМБ) (Sigma); 3,3',5,5'-тетраметилбензидина раствор для мембран (ТМБ) (Sigma); плоскодонные 96-луночные планшеты для ИФА (Costar, 3590); плоскодонные 96-луночные планшеты (Corning, 3596); ацетонитрил (Panreac); колонки для ВЭЖХ: Luna C18 [250×4,6 мм, 5 мкм, 100 Å] (Phenomenex), Vydac C4 [5µm, 4,6×250 mm, 300 Å] (Grace) и Reprosil-Pur C18-AQ [250×10 мм, 5 мкм, 300 Å] (Dr. Masch GmbH); натрия гидрокарбонат (Реахим); трипсин (Promega); пепсин (Sigma); α-химотрипсин (Sigma); диметилсульфоксид (ДМСО) (Merck); сульфат калия (Реахим); D-маннит (Реахим); 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (Mes) (Sigma); 2-п-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота (ТНС) (MP Biomedicals); жирные кислоты: миристиновая, пальмитиновая, маргариновая, стеариновая, пальмитолеиновая, олеиновая, линолевая, линоленовая, ретиноевая, жасмоновая (все Sigma); шприц для стерильной фильтрации Multifit Luer-Lok® 50cc (Becton Dickinson); фильтры TYPE GVPP 0,22 мкм (Millipore); поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore); установка для ультрафильтрации под давлением (Amicon); фильтр PM30 (Amicon); фильтр YM100 (Amicon); азид натрия (Fluka); 2,5-дигидроксibenзойная кислота (Sigma).

При проведении экспериментов использовалась деионизированная вода, полученная на установке «Milli-Q» (Millipore). Водные растворы очищались с помощью фильтров TYPE HVLP 0,45 мкм (Millipore). Стерилизацию водных растворов и белковых препаратов проводили, используя фильтры TYPE GVPP 0,22 мкм (Millipore).

Праймеры для обратной транскрипции и ПЦР (табл. 1) были синтезированы и очищены сотрудником ИБХ РАН С.В. Кузницовой; олигонуклеотид SMART II синтезирован фирмой «Синтол» (Москва). Поликлональные анти-Len с 3 антитела кролика и иммуноаффинная смола, содержащая ковалентно «пришитые» анти-Len с 3 антитела, были получены сотрудником УНЦ ИБХ РАН Е.А. Стукачевой.

Клонирование плазмидной ДНК осуществляли в клетках *Escherichia coli* DH-10B (Life Technologies). Экспрессию рекомбинантных пептидов проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и BL21 (DE3) Star™ (Life Technologies). Экспрессирующие генно-инженерные конструкции были созданы на основе плазмидных векторов pET-His8 и pET-His8-TrxL из коллекции УНЦ ИБХ РАН.

Антимикробную активность белков тестировали на штаммах: *Clavibacter michiganensis* VKM Ac-1144 (грамположительная бактерия), *Pseudomonas syringae* VKMB-1546 (грамотрицательная бактерия), *Agrobacterium tumefaciens* A281 (грамотрицательная бактерия) была взята из лаборатории биотехнологии растений ФИБХ РАН; *Aspergillus niger* VKM F-2259, *Alternaria alternata* VKM F-3047, *Aspergillus versicolor* VKM F-1114, *Fusarium solani* VKM F-142, *Neurospora crassa* VKM F-184, *Botrytis cinerea* F-3700 (фитопатогенные грибы отдела аскомицетов) были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; *Fusarium oxysporum* ТСХА-4 (фитопатогенный гриб отдела аскомицетов) был предоставлен лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

Рекомбинантный аналог аллергена чечевицы Lc-LTP2 (Len с 3) был получен в УНЦ ИБХ РАН в результате гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3).

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Последовательность (5' → 3')	Примечания
T30Cap	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN	праймер для обратной транскрипции и адаптер при 3'-RACE
T25	(T) ₂₅ VN	праймер для обратной транскрипции при 5'-RACE
PlugOligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(riboG) ₄ -P	адаптер при 5'-RACE
T7Cap	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСААГСАГТГГ ТАТСААСГАГАГТ	«длинный» адаптер-специфический праймер для 3'- и 5'-RACE
T7	СТААТАСГАСТСАСТАТАГГГС	«короткий» праймер для 3'- и 5'-RACE
M13 dir	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG	смысловый праймер на участок плазмиды до сайта лигирования

M13 rev	TTGTCGATACTGGTAC	антисмысловой праймер на участок плазмиды после сайта лигирования
1	AACATYCCTTACMMGATCAG	вырожденные ген-специфичные праймеры для 3'-RACE на последовательность, кодирующую зрелый белок
2	GTYAACATYCCTTACMMGAT	
3	TGYRGYGTYAACATYCCTTAC	
4	CCCATGAAATTAGCATGTG	
5	ATGGTAGTTATTGCGCCT	ген-специфичные праймеры для 3'-RACE на последовательность сигнального пептида
6	ACAAGAAGATAGGACCACAT	ген-специфичные праймеры для 5'-RACE на нетранслируемую 3'-концевую последовательность
7	CCCACTCTCATATACTAGTGA	
8	CGCGATAAGATAATCTTGAAACC	
9	AATGGTGTACAGTTGGTGGAGG	
10	GGAGAGCAGCAGCATT	
11	CCCGTGGAACTGTATCTGC	смысловой праймер на Ps-LTP1 для определения уровня его экспрессии
12	GCCGTGGAACTGTATCCTG	смысловой праймер на Ps-LTP2 для определения уровня его экспрессии
13	CCGGCGTGCAACTGTAATGA	смысловой праймер на Ps-LTP3 для определения уровня его экспрессии
14	CGCGGCACTGATCTTGTA	антисмысловой праймер на Ps-LTP1-3 для определения уровня их экспрессии
15	GCTCCCAGCAGTACAGGACTCT	смысловой праймер на β -тубулин
16	TGGCATCCCACATTTGTTGA	антисмысловой праймер на β -тубулин
17	GCGGGATCCATGGCTTTGTCTTGTGGAACTGTA TCCGCTGATTTGGCTCCATGCGTTAC	смысловой праймер для синтеза Ps-LTP1
18	GCGGAATTCTCAAAACCTAACAGTGTTACAGTT GG	антисмысловой праймер для синтеза Ps-LTP1
19	GCGGGATCCATGATAACATGTGGCCAAGCG	смысловой праймер для синтеза Pru p 3
20	GCGGAATTCTCACTTCACGGTGGCGCAGTT	антисмысловой праймер для синтеза Pru p 3
21	GCGAGATCTATTGATGGAAGAATGGCAATCTCAT GCGGAACA	смысловой праймер для синтеза Lc-LTP1
22	GCGAATTCGCGGATCCTTAGAACCTGATGGTG	антисмысловой праймер для синтеза Lc-LTP1
23	GCGAGATCTGATCCGATGGCAGTCTCATGTGGA ACT	смысловой праймер для синтеза Lc-LTP3
24	GCGAATTCGCGGATCCCTTCAAACTTAATG	антисмысловой праймер для синтеза Lc-LTP3

N = A,C,G или T; V = A,G или C; Y=C или T; M= A или C; W= A или T; H= A,C или T; K= G или T;

R= A или G; S= C или G.

3.3. Методы

3.3.1. Выделение ЛТР из семян гороха посевного *Pisum sativum*

3.3.1.1. Получение суммарного экстракта

100 г сортовых семян гороха (сорт «Сахарный 2», семена ГОСТ 3 52171-2003, партия 8374, агрофирма «Удачные семена») гомогенизировали в 300 мл буферного раствора [0,15 М ацетат аммония, 0,2 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1,5% ПВПП, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma)] и проводили экстракцию при температуре 4°C в течение 2 ч при постоянном перемешивании.

3.3.1.2. Тепловая обработка экстракта

Осветленный методом центрифугирования (40 000 g, 50 мин, 4°C) экстракт подвергали тепловой обработке в течение 20 мин при 80°C (термостат «Гном»). Выпавший осадок отделяли центрифугированием (15 000 g, 20 мин).

3.3.1.3. Диализ

После повторного центрифугирования полученный экстракт подвергали диализу (MWCO 6-8 кДа) против 100-кратного объема 50 мМ ацетата аммония (рН 5,3) в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании.

3.3.1.4. Ультрафильтрация

Полученный диализат фильтровали через фильтр TYPE GVPP 0,22 мкм и проводили ультрафильтрацию полученного фильтрата, используя систему для ультрафильтрации в среде инертного газа (Amicon 0850). Сначала ультрафильтрацию осуществляли с использованием мембраны YM100 (Millipore), а затем PM30 (Millipore).

3.3.1.5. Ионообменная хроматография

Полученный фильтрат наносили на катионообменную колонку нормального

давления HiTrap SP FF (GE Healthcare), уравновешенную 50 мМ ацетатом аммония (рН 5,3). Элюцию проводили, используя линейный градиент концентрации хлорида натрия от 0 до 500 мМ за 72 мин при скорости потока 0,7 мл/мин. Детектирование вели при длине волны 280 нм.

3.3.1.6. ВЭЖХ

Очистку Ps-LTP1 проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке Vydac C4 (Grace) при скорости потока 0,5 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 65% за 45 мин в присутствии 0,1% ТФУ. Детектирование вели при длине волны 214 нм. Финальную очистку Ps-LTP1 проводили на колонке Luna C18 (Phenomenex) при скорости потока 0,5 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 30% за 10 мин и далее от 30 до 62% за 40 мин в присутствии 0,1% ТФУ. Полученные фракции элюатов, соответствующие основным пикам на хроматограммах, упаривали с помощью вакуумного концентратора SpeedVac и хранили при температуре -20°C.

3.3.1.7. Иммуноаффинная хроматография

Начальные этапы, включавшие гомогенизацию, экстракцию, центрифугирование и тепловую обработку производили так же, как описано выше. Суммарную концентрацию белков определяли методом Бредфорда согласно стандартному протоколу. Затем супернатант разбавляли связывающим буфером, содержащим 10 мМ Трис-НСl, 0,15 М NaCl, рН 7,0, до конечной суммарной концентрации белковой фракции 0,2-0,5 мг/мл, фильтровали через фильтр с размером пор 45 мкм и наносили на иммуноаффинную колонку с CNBr-активированной сефарозой с пришитыми на нее поликлональными кроличьими антителами IgG к Lc-LTP2 чечевицы. Связывание белка с иммуноаффинной смолой осуществляли в связывающем буфере при скорости потока 0,5 мл/мин, после чего колонку уравнивали этим же буфером и затем проводили элюцию буфером, содержащим 0,1 М Глицин-НСl, рН 3,0. Затем элюат наносили на обращенно-фазовую колонку Vydac C4 и осуществляли ВЭЖХ в той же системе

растворителей и использовали ту же программу контроллера, что была описана выше, и собирали фракцию, элюируемую на 34-й минуте.

3.3.2. SDS-электрофорез

Анализ полученных на разных стадиях выделения фракций проводили с помощью SDS-электрофореза по методу Леммли [176] и в оптимизированной для разделения небольших белков (с молекулярной массой менее 10 кДа) и пептидов трис-трициновой системе [177].

В случае проведения белкового электрофореза для приготовления ступенчатых ПААГ-гелей использовали следующие растворы: разделяющий гель [раствор акриламида (15% Т, 3% С), 0,375 М трис-НСl (рН 8,8), 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,034% ПСА]; концентрирующий гель [раствор акриламида (5% Т, 3% С), 0,125 М трис-НСl (рН 6,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,034% ПСА]. В качестве анодного и катодного электродного раствора использовали 10х буфер [0,25 М трис (рН 8,3), 1,92 М глицина, 1% SDS]. Аликвоты фракций смешивали с 2х буфером [50 мМ трис-НСl (рН 6,8), 2% SDS, 4% ВМЕ, 12% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий] и прогревали на водяной бане в течение 2-5 мин. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 15 мА (при концентрировании) и 25 мА (при разделении) в течение 1-1,5 часов. После окончания электрофореза проводили одновременное фиксирование и окрашивание белковых полос [0,1% кумасси G-250, 25% изопропанол, 10% уксусная кислота] и последующую отмывку геля [30% метанол, 10% уксусная кислота].

В случае проведения пептидного электрофореза для приготовления ступенчатых ПААГ-гелей использовали следующие растворы: разделяющий гель [раствор акриламида (16,5% Т, 6% С), 6 М мочевины (Bio-Rad) или 10% глицерин, 1 М трис-НСl (рН 8,45), 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% ПСА]; спейсортный гель [раствор акриламида (10% Т, 3% С), 1 М трис-НСl (рН 8,45), 0,1% SDS, 0,05% TEMED, 0,05% ПСА]; концентрирующий гель [раствор акриламида (5% Т, 3% С), 0,74 М трис-НСl (рН 8,45), 0,074% SDS, 0,08% TEMED, 0,08% ПСА].

Электродные растворы были следующего состава: анодный буфер [0,2 М трис-НС1 (рН 8,9)]; катодный буфер [0,1 М трис (рН 8,25), 0,1 М трицина, 0,1% SDS]. Аликвоты фракций смешивали с 2х буфером [50 мМ трис-НС1 (рН 6,8), 1% SDS, 1% ВМЕ, 8 М мочевины (Bio-Rad), 0,05% кумасси G-250] и прогревали на водяной бане в течение 2-5 мин. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 80 В (при концентрировании) и 100 В (при разделении) в течение 4-5 часов. После окончания электрофореза проводили фиксирование [50% метанол, 10% уксусная кислота] и окрашивание [0,025% кумасси G-250, 10% уксусная кислота] белковых полос и отмывку геля [10% уксусная кислота].

При необходимости анализируемые фракции предварительно обессоливали, осаждая белки ацетоном или 25% ТХУ.

3.3.3. Электроблоттинг

После проведения SDS-электрофореза в трис-трициновой системе белки переносили из ПААГ-геля на предварительно активированную PVDF мембрану иммобилон-Р. «Мокрый» перенос белков осуществляли в 25 мМ натрий-бикарбонатном буфере (рН 9,0), содержащем 20% метанол и 0,1% SDS, используя блоттер Midget Multiblot, в течение 45 мин при 15°C и постоянной силе тока 400 мА. Для детектирования белковых полос мембрану обрабатывали последовательно 0,1% раствором амидочерного 10Б в 45% метаноле и далее 30% метанолом. Полноту переноса белков определяли, обрабатывая гель, как указано в пункте 3.3.2. Белковые полосы вырезали и использовали для установления N-концевой аминокислотной последовательности методом автоматического микросеквенирования по Эдману.

3.3.4. Иммуноблоттинг

Диализат экстракта из семян гороха был получен, как описано в пунктах 3.3.1.1-3.3.1.3. После проведения SDS-электрофореза в 15% ПААГ осуществляли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в буфере, содержащем 20% метанола и 0,1% SDS. На первом этапе мембрану инкубировали в 1% растворе обезжиренного молока в TBS (20 мМ трис-НС1, 150 мМ NaCl, рН 7,4).

После промывания мембраны тем же буферным раствором, содержащим 0,05% твин-20 (TBST), ее инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов в растворе поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2 антител в 1% растворе молока в TBS (разведение 1:200). После промывания мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в 1% растворе молока в TBS. Отмытую буфером TBST мембрану обрабатывали раствором TMB для мембран (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали, промывая мембрану водой для удаления остатков субстрата.

3.3.5. Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ был проведен в НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН на MALDI-TOF масс-спектрометре Reflex III (Bruker), оснащенный УФ-лазером с рабочей длиной волны 337 нм. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в 20% ацетонитриле, 0,1% ТФУ в концентрации 10 мг/мл.

Масс-спектры полипептидных триптических фрагментов белков (см. п. 3.3.6.) снимали в режиме положительных ионов, используя рефлектрон. MS/MS спектры продуктов триптической фрагментации белков получали в режиме положительных ионов, используя Ultraflex MALDI-TOF/TOF масс-спектрометр (Bruker), оснащенный УФ-лазером с длиной волны 337 нм.

3.3.6. Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems). Фенилтиогидантоиновые производные аминокислотных остатков идентифицировали на анализаторе 785A PTH (Applied Biosystems).

3.3.7. Реакция восстановления и алкилирования

Число дисульфидных связей и количество цистеиновых остатков определяли, используя реакцию выделенного Ps-LTP1 с йодацетамидом до и

после восстановления белка DTT. Навески nPs-LTP1 (по 10 мкг) растворяли в 90 мкл буфера 50 мМ NH_4HCO_3 , pH 8,0 с добавлением или без 2 мМ DTT, после чего пробирки с образцами инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем в каждый образец было добавлено по 10 мкл йодацетамида до конечной концентрации 20 мМ, после чего реакционные смеси инкубировались без доступа света при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем образцы подвергались ОФ-ВЭЖХ очистке и исследовались методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

3.3.8. Спектроскопия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма измеряли при комнатной температуре с помощью спектрополяриметра J-810 (Jasco) в кювете с длиной оптического пути 0,01 см в диапазоне длин волн 180-250 нм с шагом 1 нм. Исследовали конформацию белков, растворенных в воде в концентрации 1 мг/мл.

3.3.9. Триптический гидролиз

Триптический гидролиз белка осуществляли в ПААГ после проведения SDS-электрофореза. Образец природного белка (5 мкг) в 2х буфере для внесения [50 мМ трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 4% BME, 12% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий] вносили в ПААГ и проводили SDS-электрофорез в 15% разделяющем геле. Затем белковые полосы окрашивали и проводили последующую отмывку геля (см. пункт 3.3.2). Гель инкубировали 3 раза по 5 мин в воде, после чего белковую полосу вырезали и переносили в чистую 0,5 мл пробирку. Для удаления Кумасси G-250 белковую полосу дважды отмывали 200 мкл 100 мМ раствора (50% NH_4HCO_3 /50% ацетонитрил) по 45 мин при 37°C каждый раз. Затем гель, содержащий белковую полосу, дегидратировали, инкубируя его в течение 5 мин при комнатной температуре в 100 мкл ацетонитрила, и высушили с помощью вакуумного концентратора SpeedVac. К высушенному гелю добавляли минимальный объем (10-20 мкл) раствора для гидролиза [40 мМ NH_4HCO_3 , 10% ацетонитрила, 20 мкг/мл модифицированного трипсина (Promega)] и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч,

затем переносили в термостат и инкубировали при 37°C в течение ночи. Утром в пробирку добавили 150 мкл воды и инкубировали 10 мин с частым перемешиванием. После центрифугирования отобрали супернатант в новую пробирку. Затем дважды проводили экстракцию из геля органической фазой (50% ацетонитрил/5% ТФУ) в объеме 50 мкл и инкубировали каждый раз по 60 мин при комнатной температуре. Затем объединили фракции, полученные после экстракции водной фазой и двух экстракций органической фазой и высушили с помощью вакуумного концентратора SpeedVac.

3.3.10. Выделение суммарной РНК

Тотальную РНК выделяли с помощью набора «SV Total RNA Isolation System» (Promega) согласно протоколам фирмы-производителя. Проращенные в течение 3-х дней семена гороха, чечевицы, а также кожицу персика, каждого образца массой около 30 мг по отдельности гомогенизировали в жидком азоте. Используя ступку с пестиком. Каждый образец смешивали с 175 мкл лизирующего буфера (рН 7,5), содержащего 4М гуанидин-тиоцианата и 1% ВМЕ. Далее лизат разбавляли 350 мкл буфера и прогревали на водяной бане при 70°C в течение 3 мин. К полученному после центрифугирования супернатанту добавляли 200 мкл 95% этанола. Полученный раствор наносили на колонку, через которую затем последовательно пропускали раствор ДНКазы I в буфере, содержащем 10 мМ MnCl₂, и отмывочный буфер. Суммарную РНК элюировали 100 мкл деионизированной воды, не обладающей нуклеазной активностью. К элюату добавляли 10 мкл 2М подкисленного ацетата натрия (рН 4,5) и 300 мкл 95% этанола, выдерживали в течение 30 мин при температуре минус 20°C, после чего центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Полученный осадок РНК растворяли в 10 мкл воды. Раствор хранили при температуре минус 70°C.

3.3.11. Обратная транскрипция и амплификация концов кДНК (RACE)

Эксперименты по обратной транскрипции и ПЦР проводили, используя наборы для амплификации концов кДНК «SMART™ RACE» (Clontech) и «MINT» (Евроген).

кДНК для 3'-RACE ПЦР была получена с помощью набора реактивов для синтеза кДНК «SMART™ RACE» (Clontech). Для этого в пробирке, помещенной в лед, смешивали 4 мкл раствора тотальной РНК, 2 мкл раствора праймера T30Cap (10 пмоль/мкл) и 2 мкл воды. Полученный раствор инкубировали при температуре 70°C в течение 2 мин, после чего снова помещали в лед и добавляли смесь остальных компонентов, включающую 2 мкл 10x M-MLV буфера [250 mM трис-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 30 mM MgCl₂], 2 мкл раствора dNTP (концентрация каждого нуклеотида 10 mM), 1 мкл раствора дитиотреитола (10 mM), 1 мкл раствора обратной транскриптазы M-MLV (200 ед/мкл) и 6 мкл воды. Реакцию, которая протекала при 45-50°C в течение 90 мин, останавливали прогреванием разбавленной водой до 30 мкл смеси при 80°C в течение 5 мин. Раствор кДНК хранили при температуре -20°C.

кДНК для 5'-RACE ПЦР была получена с помощью набора реактивов для синтеза кДНК «MINT» (Евроген) согласно инструкции производителя: 3 мкл раствора РНК смешивали с 1 мкл раствора праймера T25 (10 пмоль/мкл) и 1 мкл адаптера PlugOligo, инкубировали при температуре 70°C в течение 2 мин, после чего добавляли смесь остальных компонентов, включающую 2 мкл 5x буфера для синтеза первой цепи, 1 мкл DTT (20 mM), 1 мкл смеси dNTP (10 mM), 1 мкл раствора обратной транскриптазы Mint. Инкубировали пробирки при 42°C в течение 30 мин, после чего добавляли 5 мкл IP-смеси и продолжали инкубацию при 42°C в течение 1,5 ч. По окончании реакции добавляли 30 мкл воды и инактивировали фермент нагреванием до 80°C в течение 5 мин. Раствор кДНК хранили при температуре -20°C.

Реакционная смесь для амплификации концов кДНК объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10x буфера (Евроген), 3 мкл раствора эквимольной смеси dNTP (по 1,25 мкМ), 2 мкл раствора кДНК, 0,4 мкл раствора ДНК-полимеразы (Евроген), адаптер-специфические праймеры T7 (2 пмоль) и CapT7 (0,2 пмоль), ген-специфический или вырожденный ген-специфический праймер (10 пмоль) и соответствующее количество воды.

Амплификацию 3'-концевых фрагментов кДНК, кодирующей LTR из *P.*

sativum, выполняли в два последовательных этапа: продукты 1 раунда RACE ПЦР, проведенного с внешними ген-специфическими праймерами 3/Г7/Г7Сар, 2/Г7/Г7Сар и 4/Г7/Г7Сар разводили водой в 100 раз и 2 мкл раствора, полученного после разведения, использовали для амплификации с ген-специфическими праймерами 1/Г7 и 5/Г7, отжигающимися на внутренних частях ампликонов («semi-nested PCR»). Для 1 раунда 3'-RACE ПЦР был использован следующий температурный режим в случае праймеров 3/Г7/Г7Сар и 2/Г7/Г7Сар: 95°C – 1 мин («горячий старт»), далее (94°C – 30 с, 50°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов, и режим ступенчатого понижения температуры на стадии отжига («stepdown») в случае пары праймеров 4/Г7: 95°C – 1 мин, далее (94°C – 30 с, 65...45°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов. Температура понижалась с 65°C до 45°C через каждые 5 циклов на 4°C, и затем еще 5 циклов при 45°C. Для второго раунда реамплификации продуктов 3'-RACE ПЦР с праймерами 1/Г7 и 5/Г7 был использован следующий температурный режим: 95°C – 1 мин («горячий старт»), далее (94°C – 30 с, 48-50°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов.

Амплификацию 5'-концов кДНК проводили также методом полугнездовой ПЦР с четырьмя ген-специфическими праймерами (6, 7, 9 и 10) и использованием ДНК-полимеразы Tersus (Евроген). 5'-RACE и реамплификацию проводили также в два этапа: с комбинациями праймеров 6/Г7Сар/Г7, 7/Г7Сар/Г7 и 9/Г7Сар/Г7 в первом раунде и 7/Г7, 8/Г7 и 10/Г7 – во втором. Для 1 раунда 5'-RACE ПЦР был выбран режим ступенчатого понижения температуры на стадии отжига («stepdown»): 95°C – 1 мин, далее (94°C – 30 с, 63...48°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов – в случае праймеров 6/Г7Сар/Г7 и режим: 95°C – 1 мин, далее (94°C – 30 с, 70...54°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов – в случае праймеров 9/Г7Сар/Г7. В обоих случаях температура понижалась через каждые 5 циклов на 3°C, и затем еще 5 циклов при 48°C и 54°C в первом и втором случаях, соответственно. Для второго раунда реамплификации продуктов 5'-RACE ПЦР с праймерами 7/Г7 и 10/Г7 был использован следующий температурный режим: 95°C – 1 мин («горячий старт»), далее (94°C – 30 с, 46-48°C – 40 с, 68°C – 1 мин); 35 циклов.

3.3.12. Клонирование и секвенирование продуктов ПЦР

Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 1,5% агарозе, содержащей этидий бромид, детектировали в УФ-свете, элюировали с использованием набора «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System» (Promega) и лигировали по липким Т/А-концам с рAL2-T вектором (Евроген). Работы с рекомбинантной ДНК проводили согласно базовым методикам, описанным в [178]. Для трансформации использовали химически компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH-10B. Отбор клонов, содержащих требуемую вставку, осуществляли с помощью сине-белой селекции и ПЦР с праймерами M13For и M13Rev. Для выявления и исключения точечных замен в случае каждого амплифицированного фрагмента на секвенирование отбиралась несколько независимых клонов. Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса. Секвенирование ДНК проводилось в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems). Для повышения достоверности полученных данных каждый клонированный фрагмент секвенировался дважды в противоположных направлениях.

3.3.13. ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ)

Сортовые семена гороха (сорт «Сахарный 2», семена ГОСТ 3 52171-2003, партия 8374, агрофирма «Удачные семена») проращивали в течение 3 дней на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. После проращивания семена переносили в грунт и выращивали до взрослого состояния.

Тотальную РНК выделяли из непроросших сухих семян гороха, из трехдневных зародышей, а также из листьев, стеблей, корней и усиков взрослого растения. Тотальную РНК из трехдневных зародышей, листьев, корней и усиков выделяли набором SV Total RNA Isolation System kit (Promega) согласно инструкции фирмы-производителя. Тотальную РНК из богатых полисахаридами

непроросших сухих семян выделяли согласно методу MLT [179]. Тотальную РНК из стеблей взрослого растения выделяли согласно методу KLC [180] с некоторыми модификациями. Вкראдце, 1 г стеблей гороха измельчили в пестике при помощи ступки в присутствии жидкого азота, поместили в 50-мл пробирку, добавили 7,5 мл экстрагирующего буфного раствора (0,25 М NaCl, 0,05 М Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM ЭДТА, 1% (w/v) SDS, 4% (w/v) PVPP, 5% β -меркаптоэтанол) и 7,5 мл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1 v/v). Содержимое пробирки тщательно перемешали и центрифугировали при 12 900 g в течение 2 мин при температуре 4°C. Затем верхнюю водную фракцию перенесли в свежую 50-мл пробирку и повторили экстракцию эквивалентным объемом смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1 v/v) для удаления следов фенола. Верхнюю водную фракцию перенесли в свежую 50-мл пробирку, добавили 1/10 от объема 3 М ацетата натрия (pH 5,2) и 2,5 объема охлажденного 96% этанола, тщательно перемешали и инкубировали при температуре -20°C в течение 30 мин. Нуклеиновые кислоты были осаждены центрифугированием при 12 900 g в течение 30 мин при 4°C, осадок высушен на воздухе, перерастворен в 750 мкл свободной от РНКаз воды и раствор перенесен в свежую 2-мл пробирку. К образцу был добавлен 1 мл реагента TRIzol (MRC, Inc.) и последующая очистка тотальной РНК была выполнена в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Все выделенные образцы тотальной РНК были подвергнуты обработке ДНКазой I для удаления следов ДНК в образцах. Качественную и количественную оценку выделенных образцов тотальной РНК определяли с помощью UV/VIS спектрометрии (значения OD_{260/280} для всех выделенных образцов РНК были выше 1,95). Степень деградации РНК определяли с помощью денатурирующего РНК-электрофореза в Трис-ацетат-ЭДТА буферном растворе согласно Masek T. и др. [181].

Около 2 мкг каждого выделенного образца тотальной РНК подвергали обратной транскрипции с 1 мкМ олигодезокситимидинового (олиго-dT₂₅) праймера в объеме 20 мкл. По окончании обратной транскрипции объем реакционной смеси доводили до 100 мкл и использовали в качестве образца в

количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Эксперименты по ОТ-ПЦР РВ были проведены в детектирующем амплификаторе ДТ-96, используя интеркалирующий краситель EvaGreen®. Программа амплификации включала в себя: 1) 1 цикл продолжительностью 5 мин при 95°C, 2) 50 циклов по 10 с при 95°C, затем 30 сек при 59°C и 40 с при 72°C. Ген β-тубулина гороха [код доступа в GenBank: X54844] был выбран в качестве внутреннего контроля для нормализации количества внесенной в каждую реакцию тотальной РНК. Эффективность амплификации для каждой пары праймеров определяли методом стандартной калибровочной прямой при помощи наклона линейной регрессии, вычисленного в серийных разведениях матрицы (коэффициент корреляции Пирсона $R^2=0,95-0,99$). Реакционная смесь (суммарный объем 20 мкл) каждого образца содержала 1 мкл EvaGreen Dye 20X, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида, 2 U Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл 10X раствора для Taq, 0,2 мкМ каждого праймера (прямого и обратного), и 1 мкл образца кДНК (что эквивалентно 20 нг тотальной РНК).

3.3.14. Гетерологичная экспрессия ЛТР

3.3.14.1. Создание генно-инженерных конструкций

Конструкции для экспрессии ЛТР в клетках *E. coli* были получены путем лигирования линейаризованных плазмид рЕТ-His8 и рЕТ-His8-TrxL и фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР и обработанных рестриктазами.

Фрагменты, лигированные с плазмидным вектором:

1) Ps-LTP1 – последовательность, кодирующая зрелый липид-транспортирующий белок гороха и содержащая сайты рестрикции EcoRI и BamHI. Получена в результате амплификации с использованием прямого мутагенизирующего праймера 17, вводящего в структуру сайт расщепления бромцианом (Met) и точечную замену остатка метионина на лейцин в 11-м положении, и обратного – 18. В 20 мкл реакционной смеси содержалось 2 мкл буфера для Tersus ДНК полимеразы, 3 мкл эквимольной смеси dNTP (по 1,25 мкМ), матрица, содержащая клонируемую последовательность, по 10 пмоль

каждого из праймеров и 0,4 мкл Tersus ДНК полимеразы. Температурный режим реакции был следующим: 95°C – 1 мин («горячий старт»), далее (94°C – 30 с, 57°C – 40 с, 72°C – 1 мин); 35 циклов. Продукты экстрагировали смесью фенол-хлороформ (1:1), осаждали спиртом и инкубировали 60 минут при 37°C с рестриктазами EcoRI и BamHI в 2х буфере Tango (Fermentas). Полученный фрагмент, несущий липкие концы, очищали с помощью электрофореза и элюировали из агарозного геля, используя набор для «Zymoclean Gel DNA Recovery Kit» для дальнейшего лигирования. Аналогичная методика использовалась и для синтеза остальных фрагментов.

2) Pru p 3 – последовательность, кодирующая зрелый липид-транспортный белок персика и содержащая сайты рестрикции BamHI и EcoRI. Получена в результате амплификации кДНК персика с праймерами 19 и 20, вводящими в структуру сайт расщепления бромцианом (Met).

3) Lc-LTP1 – последовательность, кодирующая первую изоформу липид-транспортного белка чечевицы и содержащая сайты рестрикции BamHI и EcoRI. Получена в результате амплификации кДНК чечевицы с праймерами 21 и 22, вводящими в структуру сайт расщепления бромцианом и альтернативный сайт расщепления фактором Ха (Phe-Asp-Gly-Arg-Met).

4) Lc-LTP3 – последовательность, кодирующая третью изоформу липид-транспортного белка чечевицы и содержащая сайты рестрикции BamHI и EcoRI. Получена в результате амплификации кДНК чечевицы с праймерами 23 и 24, вводящими в структуру сайт расщепления бромцианом и альтернативный сайт расщепления посредством кислотного гидролиза (Asp-Pro-Met).

3.3.14.2. Получение штаммов-продуцентов

Штаммы-продуценты рекомбинантных белков были получены трансформацией клеток штамма BL21 (DE3) Star™. Компетентные клетки были приготовлены согласно стандартному протоколу с использованием 0,1 М CaCl₂. Трансформанты выращивали на агаризованной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl), содержащей 20 мМ глюкозу и необходимый для

селекции антибиотик ампициллин. Клетки индивидуальных клонов полученных штаммов подращивали на чашках с селективной средой, смывали 2 мл LB с добавлением 15% стерильного глицерина в пластиковые пробирки, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C .

3.3.14.3. Оптимизация условий экспрессии

Предварительные эксперименты по экспрессии проводили в пластиковых пробирках емкостью 50 мл, засевая 5–10 мл жидкой питательной среды с антибиотиком и подращивая культуру в термостатируемой качалке при температуре 37°C и частоте перемешивания 220 мин^{-1} до достижения ею оптической плотности OD_{600} 0,4–1. Для индукции экспрессии добавляли 0,05–2 мМ IPTG. Культуру инкубировали в течение 2–18 ч при температуре 18, 25, 30 или 37°C .

3.3.14.4. Препаративная экспрессия

Препаративную экспрессию рекомбинатных белков проводили в стеклянных колбах емкостью 2 л, заполненных не более, чем на $\frac{1}{4}$ от предельного объема, средой LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы. Клетки засевали в 10 мл селективной среды и подращивали при температуре 37°C . Полученными культурами инокулировали основной объем питательной среды. Условия экспрессии выбирали на основании данных, полученных в ходе оптимизации на предыдущей стадии. Клеточные культуры растили до оптической плотности OD_{600} 0,6–0,8. Индукцию синтеза гибридных белков проводили, добавляя 0,2 мМ IPTG. Инкубацию культуры, экспрессирующей гибридный белок His8-TrxL-Lc-LTP1, проводили при 37°C . Инкубацию культур, экспрессирующих гибридные белки His8-TrxL-Ps-LTP1, His8-TrxL-Lc-LTP3 и His8-TrxL-Pru р 3, проводили при температуре 30°C . Для препаративной экспрессии гибридного белка ^{13}C , ^{15}N -His8-TrxL-Ps-LTP1 была использована бедная питательная среда M9 (0,06% Na_2HPO_4 , 0,03% KH_2PO_4 , 0,005% NaCl , 0,01% $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 2 мМ MgSO_4 , 0,1 мМ CaCl_2 , 10 мкМ FeCl_3) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, 20 мМ $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ D-глюкозы и 0,001% витамина B_1 .

Инкубацию проводили при температуре 25-28°C Продолжительность инкубации всех используемых в работе культур составляла 5-12 ч.

3.3.15. Выделение и очистка гибридных белков

3.3.15.1. Получение растворимых фракций клеточного белка

Выделение рекомбинантных белков проводилось на льду при температуре, близкой к 0°C. Клеточные культуры BL21(DE3)Star™/pET- His8-TrxL-Ps-LTP1, BL21(DE3)Star™/pET-His8-TrxL-Lc-LTP1, BL21(DE3)Star™/pET-His8-TrxL-Lc-LTP3 и BL21(DE3)Star™/pET-His8-TrxL-Pru p 3 центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин для получения клеточных осадков, которые далее ресуспендировали в 30-50 мл связывающего буфера A1 (50 mM трис-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM имидазол, pH 7,8) с добавлением 1 mM PMSF и гомогенизировали с помощью ультразвука. Лизаты центрифугировали при 38000 g в течение 30 мин. В случае Ps-LTP1, Lc-LTP3 и Pru p 3 использовали полученные с помощью центрифугирования осветленные клеточные лизаты. Lc-LTP1 выделяли из телец включения, которые дважды промывали буфером A1, содержащим 1% Тритон X-100, после чего солюбилизировали в буфере A1, содержащем 6 M гуанидина гидрохлорид.

3.3.15.2. Металлохелатная хроматография

Очистку гибридных белков проводили с помощью металлохелатной хроматографии на колонке с Ni²⁺-сефарозой (Amersham Biosciences) в неденатурирующих (в случае Ps-LTP1, Lc-LTP3 и Pru p 3) или денатурирующих (в случае Lc-LTP3) условиях при скорости потока 0,7 мл/мин. Осветленные лизаты наносили на металлохелатную колонку с 10 мл смолы, уравновешенную 100 мл буфера A1 либо A1, содержащего 6 M гуанидина гидрохлорид (в случае Lc-LTP1). Далее колонку тщательно промывали связывающим буфером для удаления неспецифически связавшихся с ней примесей. Элюцию проводили буфером B1 (50 mM трис-HCl, 0,5 M NaCl, 0,5 M имидазола, pH 7,8) без или в присутствии 6 M гуанидина гидрохлорида. Детектирование вели при длине

волны 280 нм. Наличие и чистоту гибридных белков в элюате оценивали методом SDS-электрофореза (см.п.3.3.2.). Далее элюаты диализовали против 3 л подкисленной уксусной кислотой воды, рН 4 (MWCO 12 кДа) в течение ночи при температуре 4°C и постоянном перемешивании. Полученные диализаты лиофильно высушивали.

3.3.15.3. Расщепление гибридных белков

Расщепление гибридных белков проводили с помощью реакции с бромцианом в кислой среде. Навески растворяли в 80% (v/v) ТФУ в концентрации 10-20 мг/мл, добавляли равную массу бромциана и инкубировали в темноте 16-20 ч при температуре 20-25°C. Реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды, после чего упаривали образцы на вакуумном концентраторе SpeedVac. К высушенным препаратам добавляли воду, и образцы снова упаривали. Процедуру упаривания повторяли не менее трех раз. Степень расщепления гибридных белков оценивали методом SDS-электрофореза (см.п.3.3.2.).

3.3.16. Выделение и очистка рекомбинантных LTP

3.3.16.1. Повторная аффинная хроматография

Очистку целевых белков проводили с помощью повторной металлохелатной хроматографии на колонке с Ni²⁺-сефарозой в денатурирующих условиях в присутствии 6 М гуанидина гидрохлорида. Образцы для нанесения на металлохелатную колонку готовили, растворяя упаренный после реакции расщепления бромцианом образец в буфере A1, содержащем 6 М гуанидина гидрохлорид, в концентрации 20-25 мг/мл. Остатки кислоты нейтрализовали, добавляя раствор щелочи (4 М NaOH) до рН 7-8. Нанос на металлохелатную колонку осуществляли в буфере A2 (50 мМ трис-HCl, 6 М гуанидина гидрохлорид, 20 мМ имидазол, рН 7,8).

3.3.16.2. ОФ-ВЭЖХ

Финальную стадию очистки рекомбинантных белков проводили методом

ОФ-ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ (Dr.Maisch GmbH). Хроматографическое разделение белков проводили при скорости потока 2 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин в присутствии 0,1% ТФУ. Детектирование вели при длине волны 214 нм. Фракции элюата, соответствующие основным пикам на хроматограмме, собирали и лиофильно высушивали на вакуумном концентраторе SpeedVac.

3.3.16.3. Рефолдинг

Рефолдинг очищенного Lc-LTP1 проводили в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ NaCl, 0,8 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА), содержащем 1 М мочевины, 0,8 М L-аргинин и 2 мМ GSH/0,2 мМ GSSG [182]. Для проведения рефолдинга рекомбинантный белок растворяли в этом буферном растворе в концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. После этого проводили ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C₁₈ (Phenomenex) в присутствии 0,1% ТФУ, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5% до 80% за 60 мин.

3.3.17. Твердофазный иммуноферментный анализ

Рекомбинантные LTP (0,5 мкг) вносили в лунки 96-луночного планшета (Costar) в 50 мкл TBS и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки тем же буферным раствором, содержащим твин-20 (TBST), планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с 1% раствором BSA в TBS. Далее планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с серийными разведениями сывороток пациентов с аллергией (1:2-1:16) в TBS. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgE человека (Sigma) и инкубировали планшет при температуре 37°C в течение 1 ч. Детекцию связавшихся антител проводили после промывки лунок TBST, используя ТМВ для ИФА (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали добавлением 4 н H₂SO₄ и проводили анализ полученных данных, измеряя оптическую плотность в лунках при 450 нм.

В случае проведения ИФА с поликлональными кроличьими анти-Lc-LTP2

антителами после блокирования свободных сайтов связывания в тех же условиях планшет инкубировали с раствором поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2 антител в TBS (разведения 1:500-1:64000) в течение 1 ч при 37°C. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в TBS и инкубировали планшет при 37°C в течение 1 ч. Детекцию проводили также с помощью ТМВ.

В экспериментах по ингибированию связывания специфических IgE проводили сорбцию меньшего количества рекомбинантных белков (0,2 мкг) и сыворотки пациентов предварительно инкубировали с рекомбинантным Pru p 3 в концентрациях 0,02-200 мкг/мл в течение 3 ч при температуре 37°C.

3.3.18. Определение антимикробной активности

Антимикробную активность липид-транспортирующих белков определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Тест-культуры бактерий *Agrobacterium tumefaciens* A281, *Clavibacter michiganensis* Ac-1144 и *Pseudomonas syringae* B-1546 инокулировали в жидкую среду LB и инкубировали при перемешивании при 30°C до достижения клетками OD₆₀₀ 1,0-1,5. Тест-культуры грибов *Aspergillus niger* F-2259, *Aspergillus versicolor* VKM F-1114, *Fusarium solani* F-142, *Fusarium oxysporum* TCXA-4, *Alternaria alternata* F-3047, *Botrytis cinerea* F-3700 и *Neurospora crassa* F-184 выращивали на картофельно-сахарозном агаре при комнатной температуре до начала активной споруляции. В лунки 96-луночного планшета вносили аликвоты (110 мкл) бактериальных культур (4×10^4 КОЕ/мл) или суспензии спор (10^4 спор/мл) в питательной среде и добавляли по 10 мкл стерильных белковых растворов различной концентрации в 0,1% ТФУ. Каждый вариант теста проводился в трех повторностях. Планшет инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C. Рост культуры оценивали путем измерения оптической плотности в лунках при 620 нм. В качестве отрицательного контроля использовали 0,1% ТФУ. Ингибирующие концентрации белков (IC₅₀), обеспечивающие 50% подавление роста культуры, определяли через 24 ч или 48 ч после начала инкубации в случаях бактериальных или

грибковых культур, соответственно. Прорастание спор и морфологию гиф оценивали с помощью светового инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus) спустя 12 ч и 24 ч после начала инкубации спор в жидкой питательной среде с растворами белков.

3.3.19. Моделирование переваривания *in vitro* ферментами пищеварительного тракта

Для моделирования пищеварения в желудке использовали пепсин (Sigma) при соотношении фермент-субстрат 1:20 (w/w). Ферментативную реакцию проводили в 0,1 М HCl pH 2,0 при 37°C в течение 2 ч. Затем pH смеси доводили до 8,0 с помощью NH_4HCO_3 , добавляли 2,5 нг трипсина (Promega) и 10 нг α -химотрипсина (Sigma) на каждый мкг субстрата и продолжали инкубировать в течение следующих 24 ч, моделируя кишечное пищеварение. В качестве контроля расщепления использовали лабильный к протеолизу субстрат – α -казеин коровьего молока (Sigma-Aldrich). Для денситометрического анализа отсканированных гелей использовали программу Gel-Pro Analyzer.

3.3.20. Флуоресцентная спектроскопия

Спектры флуоресценции были получены с помощью спектрофлуориметра «F-2710» (НІТАСНІ) при температуре 25°C.

3.3.20.1. Измерение интенсивности флуоресценции ТНС в присутствии ЛТР

Флуоресценция ТНС возбуждалась при 320 нм и регистрировалась в диапазоне 330-450 нм. Максимум интенсивности флуоресценции был детектирован при 437 нм. Спектральные щели монохроматоров возбуждения и эмиссии составляли 5 нм. Жирные кислоты (ЖК), и жасмоновую кислоту растворяли в этаноле, лизофосфолипиды растворяли в 50 мМ фосфатном буфере до концентрации 4-8 мг/мл.

Раствор ТНС в концентрации 3 мкМ в буфере (175 мМ D-маннит, 0,5 мМ K_2SO_4 , 0,5 мМ CaCl_2 , 5 мМ MES, pH 7,0) объемом 2 мл с добавлением или без липида инкубировали в кювете в течение 1 мин при постоянном перемешивании,

после чего снимали спектр флуоресценции ТНС. Затем в раствор добавляли рекомбинантный белок (до конечной концентрации 2 мкМ), инкубировали 2 минуты и снимали спектр флуоресценции. Результаты измерений выражали в процентах от интенсивности флуоресценции комплекса белок-ТНС согласно формуле: $((F-F_0)/F_C) \times 100\%$, где F_0 – интенсивность флуоресценции ТНС в растворе; F и F_C – интенсивности флуоресценции комплекса белок-ТНС в присутствии и без добавления липида, соответственно.

3.3.20.2. Влияние присутствия LTP в растворе на разрушение целостности липосом

Липосомы были приготовлены из 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфоглицерина (POPG) и POPC/POPG в мольном соотношении 1:1. Липиды упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе с метанолом (1:1) на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Липидные пленки высушивали 30 мин при 5 Па, затем гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 300 мкл буфера 1, содержащего 50 мМ кальцеин, 10 мМ HEPES, 200 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,5. Суспензию встряхивали, подвергали 5-кратной процедуре замораживания – оттаивания (–195°С – +40°С) и продавливали 10 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки мини-экструдер. Липосомы очищали от внешнего красителя методом гель-фильтрации на колонке, заполненной сефадексом G-75 и уравновешенной буфером 2, содержащем 10 мМ HEPES, 200 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,5. К суспензии липосом (конечная концентрация 10 мкМ по липиду) добавляли 10 мкл раствора Ps-LTP1 и инкубировали 15 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Непосредственно перед измерением пробы разбавляли буфером 2 в 4 раза. Разбавление останавливает лизис и исключает тушение вытекшего кальцеина. Флуоресценцию возбуждали при длине волны 490 нм (ширина щели 2,5 нм) и измеряли при длине волны 520 нм (ширина щели 2,5 нм). 100% выход

кальцеина определяли после добавления к образцу Triton X-100 до конечной концентрации 1,5%. Степень выхода кальцеина определяли согласно расчетам по формуле: $I(\%) = [(F-F_0)/(F_t-F_0)] \times 100\%$, где I – процент выхода кальцеина из липосом; F – интенсивность флуоресценции липосом, в присутствии белка; F_0 — интенсивность флуоресценции липосом в аналогичных условиях без белка; F_t – интенсивность флуоресценции после разрушения липосом детергентом.

3.3.20.3. Определение транспортной активности LTP

Для приготовления донорных липосом были использованы POPC и 2 флуоресцентных зонда: тетраметил-BODIPY-меченный фосфотидилхолин и (бис-циклогексил)-BODIPY-меченный фосфотидилхолин [183]. Для приготовления акцепторных везикул был использован 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоглицерин (DMPG). Липосомы были приготовлены по стандартной методике (см.п.3.3.20.2.). Флуоресценция возбуждалась при 470 нм и регистрировалась при 505 нм. Кинетику процесса измеряли в течение 2400 секунд при 25 °C с непрерывным перемешиванием.

50 мкл меченых донорных липосом (POPC, 30 мкМ) инкубировали с 6 мкл немеченых акцепторных везикул (DMPG 0,67 мг/ мл в 20 мМ Трис, рН 7,4, буфер) в 200 мкл 20 мМ Трис-буфера (1 мМ EDTA, рН 7,4) в течение 300 с. Навеску Ps-LTP1 растворяли в 20 мМ Трис-буфере, рН 7,4, до конечной концентрации 360 мкМ. 8 мкл Ps-LTP1 добавляли к раствору с донорными и акцепторными липосомами и регистрировали изменения интенсивности флуоресценции по времени. Для определения максимальной флуоресценции реакционной смеси в систему добавляли 15% раствор Triton X-100.

4. Результаты и обсуждение

Сельскохозяйственные культуры семейства бобовые широко распространены по всему миру в связи с их высокой пищевой ценностью и неприхотливостью к условиям культивирования. Однако зачастую растения семейства бобовые являются причиной развития у людей пищевых аллергических реакций. Например, в Испании аллергия на бобовые (преимущественно на чечевицу, нут и горох) занимает пятое место в списке наиболее распространенных причин детской пищевой аллергии [114]. К настоящему моменту из растений этого семейства уже выделены и охарактеризованы следующие аллергены, принадлежащие семейству липид-транспортирующих белков: Ara h 9, Ara h 16 и Ara h 17 из арахиса *Arachis hypogaea* [184], Len s 3 из чечевицы *Lens culinaris* [185] и Pha v 3 из фасоли *Phaseolus vulgaris* [186]. Вместе с этим к настоящему моменту из гороха посевного выделены и охарактеризованы всего два аллергена: Pis s 1 (вицилин, 44 кДа) и Pis s 2 (конвицилин, 63 кДа).

В качестве объекта для поиска нового липид-транспортирующего белка нами было выбрано широко распространенное растение семейства бобовые – горох посевной *Pisum sativum* subsp. *sativum* L. [тип – покрытосеменные (Angiosperms), класс – двудольные (Dicotyledones), порядок – бобовоцветные (Fabales), семейство – бобовые (Fabaceae), род – горох (*Pisum* L), подвид – обыкновенный (subsp. *sativum* L.)]. Горох – основная зернобобовая продовольственная культура, используемая также в виде фуражного зерна, зелёного корма для сельскохозяйственных животных, силоса и сена. Широкое распространение гороха обусловлено высоким содержанием белка в зерне (в среднем 20-27%), сбалансированностью его аминокислотного состава, отличными вкусовыми качествами и хорошей урожайностью в зонах возделывания. Однако, массовое пищевое применение гороха ограничено его сравнительно высокой аллергизирующей способностью, обусловленной, в том числе, наличием в зерне липид-транспортирующих белков.

Наряду с ЛТР гороха для проведения сравнительных структурно-функциональных и иммунологических исследований были выбраны Lc-LTP1 и Lc-LTP3 – две новые изоформы липид-транспортирующего белка чечевицы обыкновенной *Lens culinaris* subsp. *culinaris* L. [отдел – покрытосеменные (Angiosperms), класс – двудольные (Dicotyledones), порядок – бобовоцветные (Fabales), семейство – бобовые (Fabaceae), род – чечевица (*Lens* L.), вид – культурная или пищевая (*culinaris* L.), подвид – обыкновенная (subsp. *culinaris* L.)].

4.1. Выделение и структурная характеристика новых липид-транспортирующих белков гороха

Новый липид-транспортирующий белок был обнаружен и выделен из семян гороха посевного *Pisum sativum* L. Исходным препаратом для фракционирования служил экстракт, который был получен в результате гомогенизации семян гороха и экстракции буферным раствором, содержащим 0,15 М NH₄COOH, 0,2 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1,5% ПВПП, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma). Осветленный методом центрифугирования экстракт подвергали двуступенчатому диализу против 50 мМ NH₄COOH. Исходя из известных литературных данных о высокой устойчивости пространственной структуры представителей семейства ЛТР к тепловой денатурации [134], в качестве следующей стадии очистки была использована тепловая обработка, в результате которой высокомолекулярные белки выпадали в осадок при изменении своей структурной организации. Затем проводили последовательную ультрафильтрацию на мембранах YM100 и PM30 (Millipore) с целью получения фракции, содержащей белки с молекулярными массами менее 30 кДа. Далее проводили катионообменную хроматографию в линейном градиенте NaCl от 0 до 0,5 М на колонке HiTrap SP FF (GE Healthcare), в результате чего было получено несколько фракций, которые были проанализированы методом SDS-электрофореза в ПААГ (рис. 2.). На основании литературных данных о молекулярных массах представителей подкласса ЛТР1 для дальнейшей работы была отобрана фракция, содержащая, в основном, белки

с молекулярной массой менее 20 кДа.

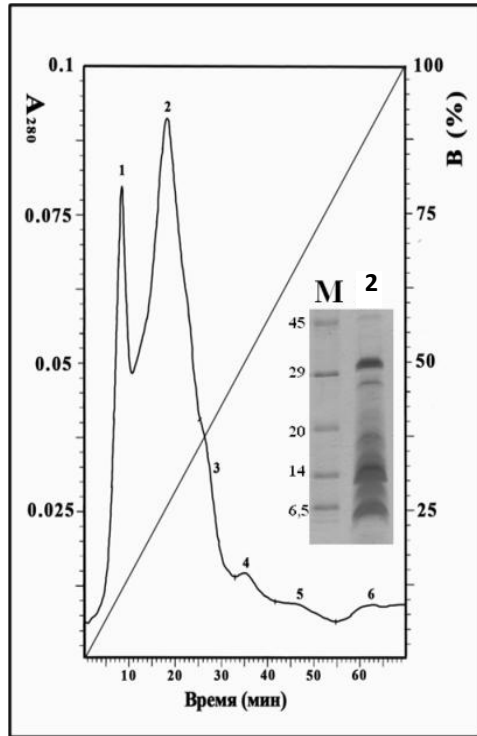


Рис. 2. Хроматограмма разделения белков на катионообменной колонке HiTrap SP FF и электрофореграмма фракции 2 после катионообменной хроматографии. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс.

Последующая очистка включала в себя двустадийную ОФ-ВЭЖХ на колонках Vydac C₄ и Luna C₁₈ в присутствии 0,1% ТФУ с использованием линейного градиента концентрации ацетонитрила (рис. 3А). Масс-спектрометрический анализ полученных после ОФ-ВЭЖХ фракций выявил присутствие белка с молекулярной массой 9400,482 Да во фракции 1. Финальная очистка данного белка проводилась на колонке Luna C₁₈ в той же буферной системе с использованием линейного градиента концентрации ацетонитрила (рис. 3Б).

N-Концевая аминокислотная последовательность выделенного LTP гороха, названного Ps-LTP1, была установлена методом автоматического микросеквенирования по Эдману (ALSXGTVSADMAPXVTYLQA-) и имела значительное сходство с соответствующими последовательностями растительных липид-транспортирующих белков первого подкласса (LTP1). На масс-спектре очищенного Ps-LTP1 были обнаружены три пика с m/z 9401,48, 4698,58 и 18730,21, которые соответствовали однозарядному и двухзарядному молекулярным ионам белка и его димеру, соответственно (рис. 4А).

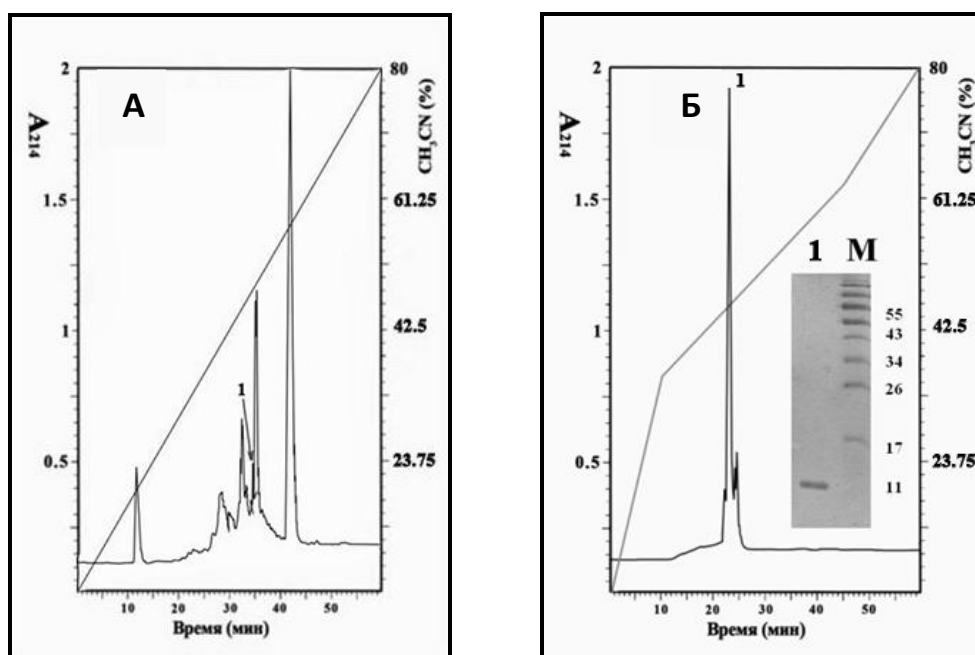


Рис. 3. А) ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C₄ (ЛТР присутствует в пике 1). Б) ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C₁₈ и электрофореграмма фракции 1, содержащей новый ЛТР из гороха. М - смесь белков-стандартов молекулярных масс (11, 17, 26, 34, 43, 55 кДа).

Известно, что расположение остатков цистеина в молекулах представителей липид-транспортирующих белков подкласса LTP1 консервативно, как, впрочем, и организация дисульфидных связей: C¹-C⁶, C²-C³, C⁴-C⁷, C⁵-C⁸. Число остатков цистеина и дисульфидных связей в выделенном Ps-LTP1 определяли, используя реакцию алкилирования иодацетамидом. Иодацетамид ковалентно связывается с сульфгидрильной группой цистеина, что приводит к образованию S-карбоксамидометильной группы и изменению молекулярной массы белка на 57 Да. Восстановление и последующее алкилирование выделенного ЛТР иодацетамидом приводило к изменению молекулярной массы белка на 8 и 456 Да, соответственно, что в сумме составляло 464 Да и свидетельствовало о наличии в белке 8 остатков цистеина. Алкилирование очищенного ЛТР без предварительного восстановления не приводило к изменению его молекулярной массы и свидетельствовало о том, что 8 остатков цистеина в белке вовлечены в образование 4 дисульфидных связей (рис. 4Б,В).

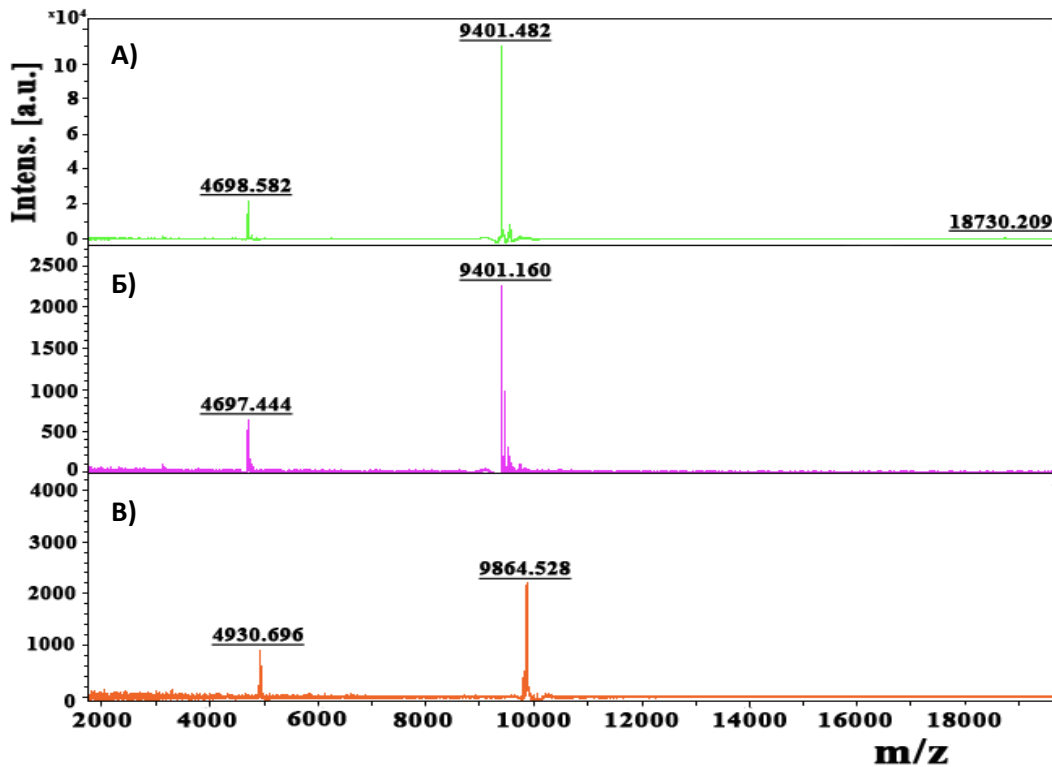


Рис. 4. Масс-спектрометрический анализ: (А) – Ps-LTP1; (Б) – невосстановленный Ps-LTP1 после обработки иодацетамидом; (В) – восстановленный Ps-LTP1 после реакции алкилирования иодацетамидом.

Спектр кругового дихроизма (КД) выделенного природного LTP представлял собой кривую, характерную для белков с высоким содержанием α -спиральной структуры (рис. 5). Вклад α -спиральной структуры у выделенного белка составлял 28,5%, а β -структуры – 19,1%, что соответствовало средним значениям этих показателей для большинства представителей подкласса LTP1.

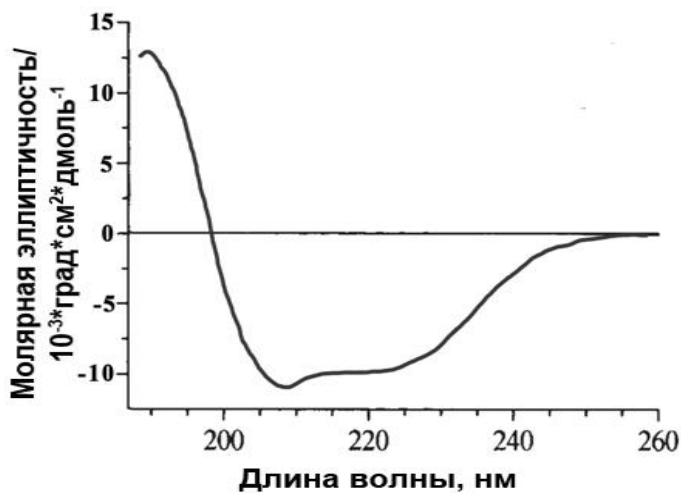


Рис. 5. Спектр КД природного Ps-LTP1 из семян гороха *Pisum sativum*.

Ранее в УНЦ ИБХ РАН методом иммунизации лабораторных животных липид-транспортирующим белком чечевицы Lc-LTP2, внесенным в базу данных аллергенов WHO/IUIS под аббревиатурой Len с 3, были получены поликлональные кроличьи анти-Len с 3 антитела класса IgG. Данные антитела были использованы для получения иммуноаффинной смолы на основе CNBr-активированной сефарозы. Благодаря высокой перекрестной реактивности различных представителей липид-транспортирующих белков растений с антителами [138],[187], в рамках данной работы в качестве альтернативной нами была разработана схема выделения природного липид-транспортирующего белка гороха с использованием иммуноаффинной хроматографии на основе данной смолы с иммобилизованными поликлональными анти-Len с 3 антителами. Введение такого этапа позволило значительно упростить схему выделения природного Ps-LTP1, которая в этом случае включала в себя: экстракцию, диализ, тепловую обработку, иммуноаффинную хроматографию и ОФ-ВЭЖХ (рис.6). По аналогичной схеме нами было проведено также выделение нового липид-транспортирующего белка гороха *Pisum sativum* с использованием иммуноаффинной смолы с анти-Len с 3 антителами.

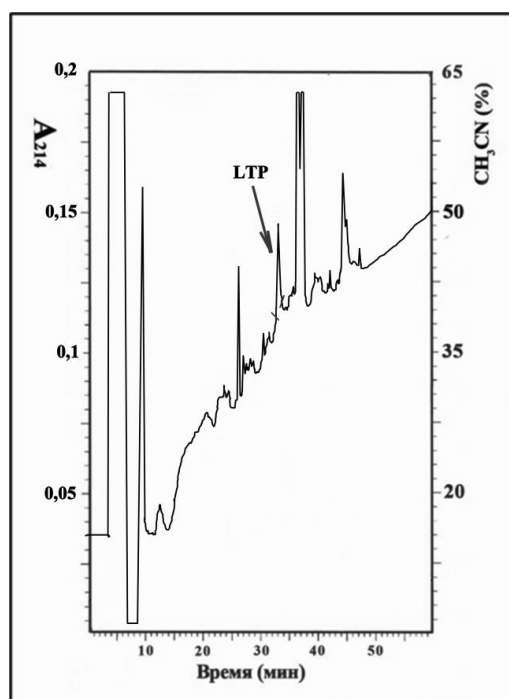


Рис. 6. Хроматограмма ОФ-ВЭЖХ разделения элюата, полученного на выходе с иммуноаффинной колонки

Для установления полной аминокислотной последовательности нового ЛТР была выделена тотальная РНК, проведены обратная транскрипция и быстрая амплификация 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК (RACE). На первом этапе работы проводили 3'-RACE с вырожденными ген-специфичными праймерами на консервативные участки молекул ЛТР. В результате амплификации 3'-концов кДНК с вырожденными праймерами наблюдалось образование фрагментов длиной приблизительно 300 п.н., секвенирование которых позволило установить последовательности 3'-концевых областей кДНК, кодирующих предшественники двух новых липид-транспортирующих белков гороха, названных Ps-LTP1 и Ps-LTP2. Данные последовательности включали в себя транслируемые участки, соответствующие С-концевым областям белков, стоп-кодону и нетранслируемые области.

На втором этапе работы проводили 5'-RACE с ген-специфичными праймерами, комплементарными 3'-нетранслируемым областям кДНК двух новых ЛТР гороха. В результате амплификации 5'-концов кДНК с данными ген-специфичными праймерами наблюдалось образование фрагментов длиной приблизительно 450 п.н., секвенирование которых позволило установить последовательности кДНК, кодирующих предшественники Ps-LTP2 и новой изоформы, названной Ps-LTP3. На третьем этапе работы снова проводили 3'-RACE, однако в данном случае использовали ген-специфичные праймеры, соответствующие консервативным участкам кДНК, кодирующим сигнальные пептиды белков-предшественников ЛТР гороха. В результате амплификации 3'-концов кДНК с ген-специфичными праймерами наблюдалось образование фрагмента длиной приблизительно 600 п.н., секвенирование которого позволило установить полноразмерную структуру кДНК, кодирующую предшественник Ps-LTP1.

Таким образом, при сопоставлении результатов секвенирования 3'- и 5'-концевых фрагментов были установлены структуры двух полноразмерных и одной частичной кДНК, кодирующих предшественники трех новых изоформ липид-транспортирующего белка гороха Ps-LTP1-3. Данные последовательности

были депонированы в базу данных GenBank [коды доступа в GenBank: **KJ569141**, **KJ569142** и **KJ569143** для Ps-LTP1-3, соответственно]. Компьютерный анализ, проведенный на интернет-сервере SignalP_v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>), позволил установить вероятные границы между сигнальными последовательностями и зрелыми белками. Предшественники трех новых LTP содержат сигнальные пептиды размером 24-25 аминокислотных остатков, и зрелые белки, состоящие из 95 аминокислотных остатков и содержащие 8 консервативно расположенных остатков цистеина. Зрелые изоформы Ps-LTP2 и Ps-LTP3 имеют 91 и 75% идентичных аминокислотных остатков с изоформой Ps-LTP1, соответственно.

С помощью измерения относительных уровней экспрессии всех трех изоформ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, было показано, что экспрессия Ps-LTP1 поддерживается на высоком уровне в семенах гороха и резко снижается после их проращивания (рис. 7).

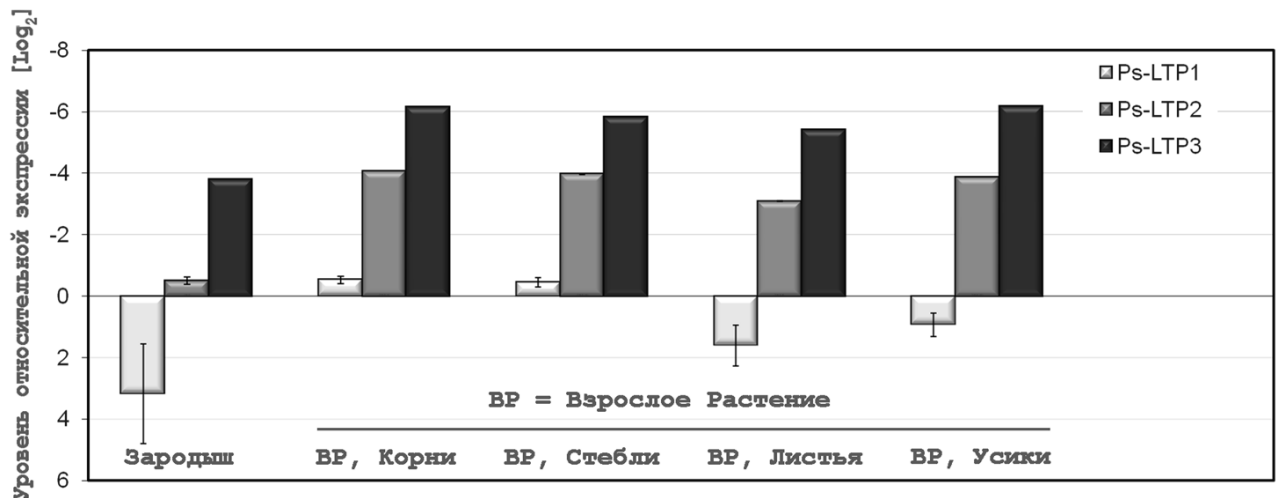


Рис. 7. Профили дифференциальной экспрессии изоформ Ps-LTP1-3 в различных органах гороха. Все значения уровней экспрессии нормализованы относительно референсного гена – β -тубулина. Уровни мРНК в различных органах отнесены к уровню экспрессии соответствующих белков в контрольном состоянии – сухих семенах гороха до проращивания.

По-видимому, биологическая роль Ps-LTP1 осуществляется на самых ранних онтогенетических стадиях развития растения непосредственно перед проращиванием семян. Вероятнее всего, биологическая роль Ps-LTP1 заключается в процессе мобилизации запасных липидов семени во время

набухания и прорастания семени. Индукция экспрессии Ps-LTP2 и Ps-LTP3, напротив, происходит только после прорастания семени и поддерживается на достаточно высоком уровне во всех частях взрослого растения, что может свидетельствовать в пользу участия данных изоформ в таких биологических процессах, как рост клеточной стенки, передача сигнала либо защита от фитопатогенов, характерных для всего растения в целом.

Было обнаружено, что установленная методом MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярная масса выделенного Ps-LTP1 отличается от расчетной молекулярной массы окисленной изоформы Ps-LTP1 на 147 Да, что может быть обусловлено отсутствием у выделенного белка С-концевого остатка фенилаланина. Однако, кДНК, кодирующая укороченную на С-концевой остаток фенилаланина изоформу Ps-LTP1, не была обнаружена. Поскольку все этапы выделения природного белка проводились на холоду и с добавлением коктейля ингибиторов протеаз, выявление укороченной изоформы указывает на наиболее вероятный внутриклеточный процесс ферментативного отщепления С-концевого Phe.

Соответствие транслированной последовательности Ps-LTP1 аминокислотной последовательности выделенного белка было подтверждено путем проведения гидролиза восстановленного белка по остаткам лизина и аргинина модифицированным трипсином. Рассчитанные с помощью инструмента PeptideMass на интернет-сервере ExPASy (<http://web.expasy.org>) молекулярные массы 14 триптических фрагментов Ps-LTP1 соответствовали массам фрагментов выделенного белка, определенных методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (рис. 8.). Молекулярные ионы, соответствовавшие наиболее длинным триптическим фрагментам I (1-35 а.о.) и II (1-36 а.о.), образовавшимся во время протеолиза, подвергали микросеквенированию методом MALDI-LIFT-TOF/TOF тандемной масс-спектрометрии (рис. 9).

В результате была установлена полная аминокислотная последовательность нового выделенного из семян гороха липид-транспортирующего белка Ps-LTP1, внесенная в базу данных UniProt [код доступа UniProtKB: **C0HJR7**], а также

определена структура его предшественника (рис. 10).

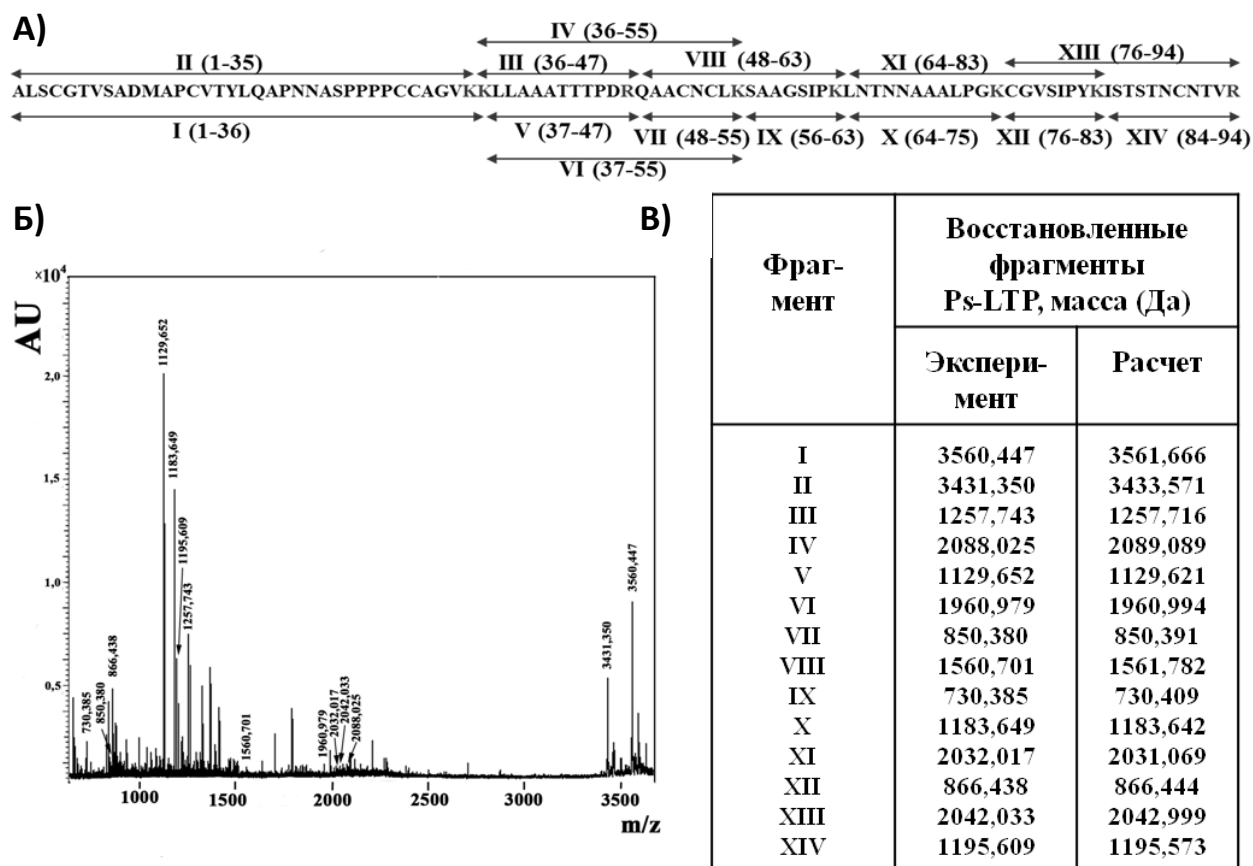


Рис. 8. А) Триптические фрагменты восстановленного Ps-LTP1. Б) Масс-спектрометрический анализ триптического гидролизата Ps-LTP1. В) Сравнение расчетных и экспериментальных данных о молекулярных массах триптических фрагментов восстановленного Ps-LTP1.

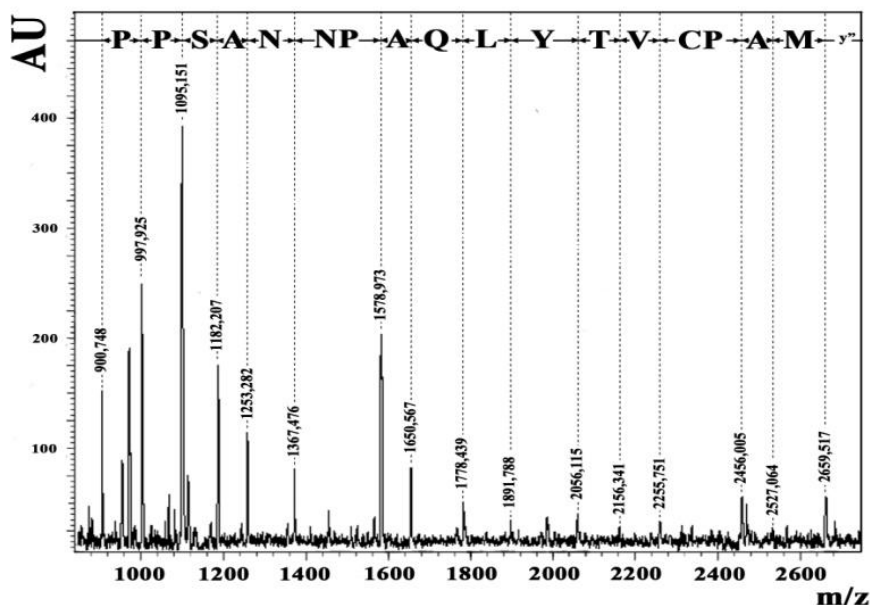


Рис. 9. MALDI-LIFT-TOF/TOF тандемная масс-спектрометрия триптического фрагмента с m/z 3560,447.

4.2. Гетерологичная экспрессия и очистка липид-транспортирующих белков

Для изучения структурно-функциональных свойств растительных липид-транспортирующих белков, в том числе выделенного Ps-LTP1, была поставлена задача разработки биотехнологического способа получения рекомбинантных LTP. Разработка биотехнологических способов экспрессии рекомбинантных генов включает в себя: выбор системы для экспрессии на основе характеристик вводимых рекомбинантных генов и целевых белков, выбор метода трансформации, оптимизацию процессов экспрессии, выделения и очистки целевых белков. Высокий уровень экспрессии целевого продукта обеспечивается выбором оптимального сочетания эффективной экспрессирующей конструкции, подходящего организма-хозяина, состава среды, условий культивирования.

Для получения гетерологичных рекомбинантных белков с клонированной эукариотической кДНК могут использоваться прокариотические системы экспрессии. Прокариотические системы находят самое широкое применение, поскольку работа с ними обходится дешевле, а производительность выше. Получение полностью идентичных природным растительных LTP в бактериях является вполне осуществимой задачей, поскольку структура большинства из них не содержит значительных посттрансляционных модификаций, кроме того описан достаточный выход целевых рекомбинантных белков семейства LTP в прокариотических системах [185],[188],[189].

Разработанные в рамках данной работы системы для гетерологичной экспрессии в клетках *E.coli* позволяют экспрессировать растительные LTP в виде гибридных конструкций с тиоредоксином А и октагистидиновой последовательностью. Полученные в рамках данной работы плазмидные векторы наряду с геном гибридного белка содержат маркерный ген устойчивости к ампициллину *bla*, а также ген-регулятор *lacI*, кодирующий белок-репрессор (рис. 11). Наличие гена *lacI* в структуре плазмиды является одним из факторов, обеспечивающих подавление базальной экспрессии гена гибридного белка, находящегося под контролем промотора бактериофага Т7. Ген Т7 РНК-

полимеразы встроены в бактериальные хромосомы использованных штаммов *E. coli* (BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star™) и контролируется промотором lacUV5. В качестве белка-партнера полученные конструкции содержат модифицированный тиоредоксин А (TrxL), который обеспечивает экспрессию гибридных белков преимущественно в растворимой форме [190]. Кроме того, сам тиоредоксин А является природным компонентом цитоплазмы *E. coli* и в высоких концентрациях не оказывает токсического действия на бактериальные клетки. Введенная во все конструкции N-концевая октагистидиновая последовательность обеспечивает возможность очистки гибридного белка с помощью металлохелатной хроматографии.

Для высвобождения целевых пептидов из состава гибридных белков во все сконструированные плазмиды между последовательностями, кодирующими липид-транспортирующие белки и тиоредоксин А, был введен остаток метионина, который позволял проводить избирательное расщепление полипептидных цепей бромцианом [191]. В случаях изоформ чечевицы между последовательностями модифицированного тиоредоксина А (TrxL) и целевых белков перед метионином были дополнительно введены альтернативные сайты расщепления: в случае His8-TrxL-Lc-LTP3 был введен дипептид Asp-Pro в качестве сайта расщепления в условиях мягкого кислотного гидролиза, а в случае His8-TrxL-Lc-LTP1 – последовательность Pe-Asp-Gly-Arg в качестве сайта расщепления фактором Ха.

Трансформацией клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3) Star™ сконструированными плазмидами были получены штаммы-продуценты рекомбинантных белков. Клетки штаммов-продуцентов культивировали в богатой питательной среде LB при 37°C в случае Lc-LTP1 или при пониженной температуре (26-28°C) в случае остальных белков. В качестве индуктора экспрессии использовали 0,2 мМ изопропилтио-β-D-галактопиранозид. Из литературных данных известно, что накопление экспрессируемых белков в растворимой фракции клеток увеличивают такие факторы, как снижение температуры, обогащение питательной среды и др. [192]. His8-TrxL-Lc-LTP1,

имеющий изоэлектрическую точку в более щелочной области рН, чем гибридные белки остальных ЛТР, накапливался в ходе экспрессии как в растворимой, так и в нерастворимой формах. Однако в растворе в основном присутствовали укороченные в С-концевой области формы His8-TrxL-Lc-LTP1, которые, по-видимому, образовывались в результате протеолитического расщепления Lc-LTP1. В связи с этим, было принято решение проводить экспрессию при повышенной температуре (37°C) с целью увеличения количества телец включения и выделять белок из нерастворимой клеточной фракции.

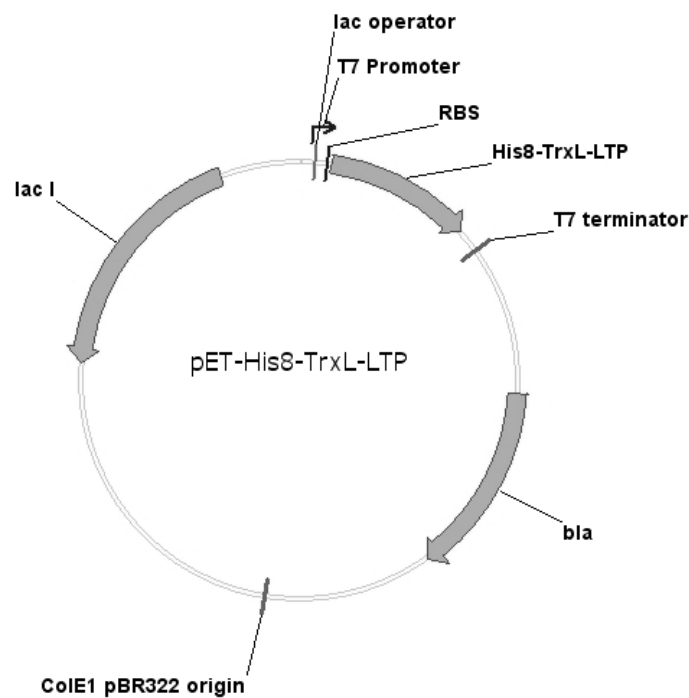


Рис. 11. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pET-His8-TrxL-LTP. Плазмидный вектор включает в себя промотор транскрипции бактериофага T7, lac оператор, сайт связывания рибосомы (RBS), последовательность, кодирующую гибридный белок (His8-TrxL-LTP, где LTP – Lc-LTP1, Lc-LTP3, Pru p 3 или Ps-LTP1), терминатор транскрипции T7, bla – ген устойчивости к β-лактамным антибиотикам, lacI – ген репрессора lac.

Выделение и очистку рекомбинантных Lc-LTP1, Lc-LTP3, Pru p 3 и Ps-LTP1 проводили в несколько стадий, используя растворимую (в случаях Lc-LTP3, Pru p 3 и Ps-LTP1) и нерастворимую (в случае Lc-LTP1) клеточные фракции. Клеточные осадки, полученные в результате центрифугирования, ресуспендировали в буферном растворе А (50 мМ трис-НСl, 0,5 М NaCl, 20

мМ имидазол, рН 7,8), содержащем ингибитор сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторид, и гомогенизировали на льду с помощью ультразвука.

В случае гибридных белков, содержащих Lc-LTP3, Pru p 3 или Ps-LTP1, использовали полученные с помощью центрифугирования осветленные клеточные лизаты. Очистку гибридных белков проводили с помощью металлохелатной хроматографии на Ni²⁺-сефарозе в неденатурирующих условиях, используя для элюции 0,5 М имидазол. His8-TrxL-Lc-LTP1 выделяли из нерастворимой клеточной фракции, которую после обработки 1% Тритоном X-100 солубилизировали в буферном растворе, содержащем 6 М гуанидина гидрохлорид. В этом случае металлохелатную хроматографию проводили в денатурирующих условиях с добавлением 6 М гидрохлорида гуанидина. Расщепление гибридных белков проводили бромцианом в кислой среде по пептидной связи, образованной карбоксильной группой остатка метионина, после чего продукты реакции разделяли с помощью повторной металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях. Финальную очистку рекомбинантных белков осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ. Разделение проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин в присутствии 0,1% ТФУ при скорости потока 2 мл/мин.

Исследование вторичной структуры полученных рекомбинантных белков было проведено с помощью метода КД-спектроскопии. Спектры кругового дихроизма Lc-LTP3, Pru p 3 и Ps-LTP1 были сходными и представляли собой кривую, характерную для белков с высоким содержанием α -спиральной структуры. КД-спектр рекомбинантного Lc-LTP1 имел другую форму, указывающую на то, что белок неструктурирован (*рис. 12(a)*).

Поэтому было принято решение провести рефолдинг очищенного Lc-LTP1. Рефолдинг проводили при низкой температуре (4°C) в мягких денатурирующих условиях в присутствии 1 М мочевины, L-аргинина и пары окисленного и восстановленного глутатионов. Затем продукты реакции разделяли с помощью

ОФ-ВЭЖХ. Анализ КД-спектра Lc-LTP1, прошедшего стадию рефолдинга, показал, что белок принял характерную для LTP растений конформацию (рис. 12(б)).

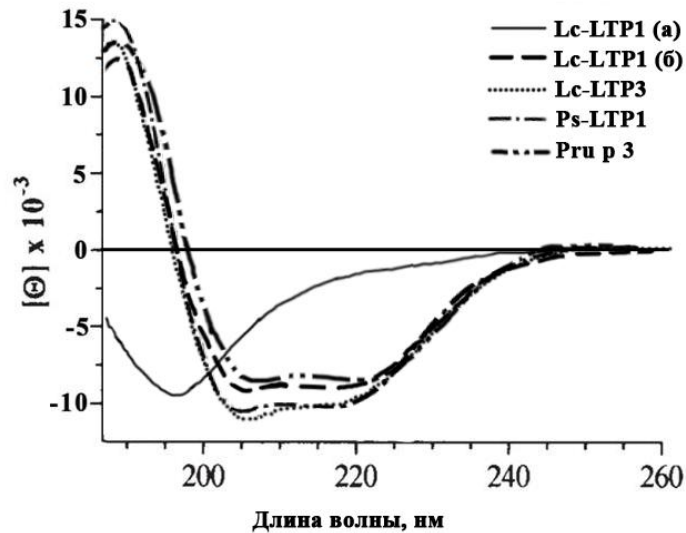


Рис. 12. КД-спектры рекомбинантных липид-транспортирующих белков. (а) и (б) – КД-спектры рекомбинантного Lc-LTP1 до и после рефолдинга.

Гомогенность полученных образцов и идентичность рекомбинантных аналогов природным белкам были подтверждены также с помощью методов SDS-электрофореза в ПААГ, времяпролётной масс-спектрометрии MALDI и автоматического микросеквенирования по Эдману. Анализ полученных препаратов рекомбинантных белков методом SDS-электрофореза показал, что в отсутствие β-меркаптоэтанола все полученные липид-транспортирующие белки находятся как мономерной, так и в преимущественной олигомерной формах, что характерно для белков класса LTP1. Добавление восстанавливающего агента приводило не только к разрыву дисульфидных связей, но и к разрушению нековалентно связанных олигомеров.

Масс-спектрометрический анализ показал, что m/z молекулярных ионов полученных рекомбинантных белков Lc-LTP1 (9350,02), Lc-LTP3 (9235,38), Pru p 3 (9107,84) и Ps-LTP1 (9530,91) соответствуют расчетным молекулярным массам LTP, структура которых стабилизирована четырьмя дисульфидными связями (9350,93, 9235,65, 9107,54 и 9530,04, соответственно) (рис. 13). Выходы

рекомбинантных белков составляли не менее 3 мг/л культуры в пересчете на чистый Lc-LTP1, 5 мг/л для Lc-LTP3 и Ps-LTP1 и 4 мг/л для Pru p 3.

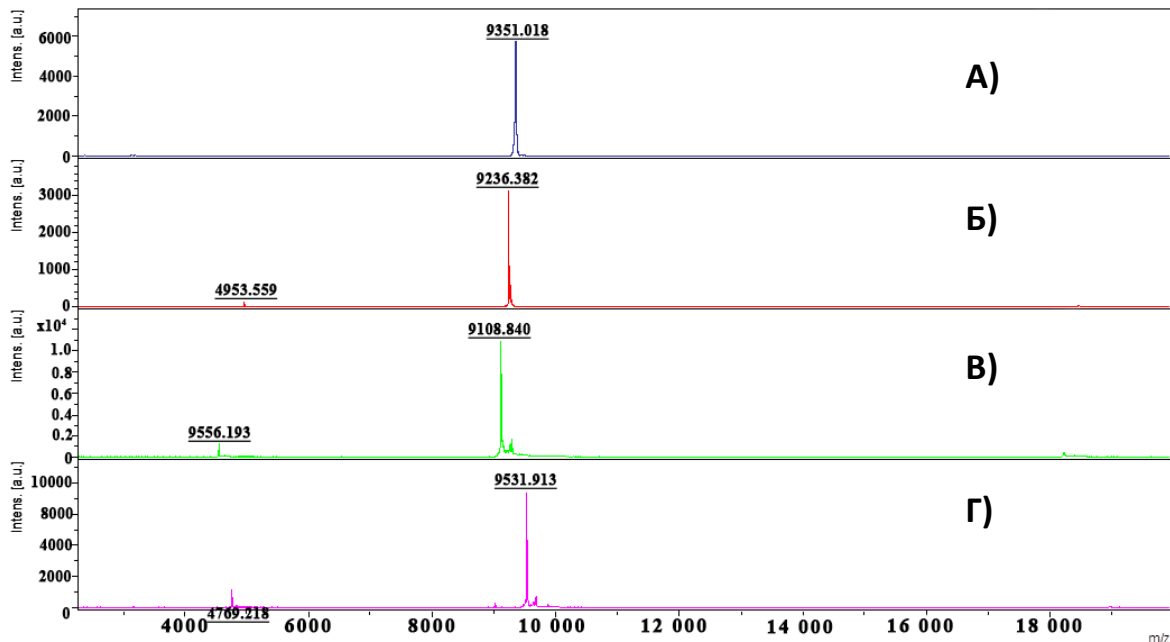


Рис.13. MALDI-TOF масс-спектры рекомбинантных Lc-LTP1 (А), Lc-LTP3 (Б), Pru p 3 (В) и Ps-LTP1 (Г).

4.3. Биотехнологический способ получения Ps-LTP1, тотально меченного стабильными изотопами ^{15}N и ^{13}C

Необходимым этапом в изучении молекулярных механизмов биологического действия белков является исследование их пространственной структуры. Одним из наиболее чувствительных методов, позволяющих получить данные о пространственной структуре молекул, является гетероядерная ЯМР-спектроскопия. Необходимым условием для проведения спектроскопии высокого разрешения является содержание в исследуемой молекуле атомов-маркеров, спиновый момент которых отличен от нуля. Введение в структуру молекулы стабильных (нерадиоактивных) изотопов (например, ^1H , ^{13}C , ^{15}N) является удобным инструментом, позволяющим проводить данным методом исследования пространственной структуры в среде, имитирующей биологическую мембрану, и изучать механизм мембранотропного действия антимикробных белков и пептидов. В частности, изотоп ^{15}N , в отличие от самого распространенного в

природе ^{14}N , имеет ядерный спин $\frac{1}{2}$ и дает четкий сигнал на спектрограмме ЯМР. Для получения меченых молекул чаще всего используют биотехнологические приемы и методы, в том числе культивирование штаммов-продуцентов на средах, содержащих меченый субстрат [193].

Для разработки биотехнологического способа получения totally меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N липид-транспортирующего белка гороха Ps-LTP1 была использована сконструированная в рамках данной работы плазида рЕТ-His8-TrxL-Ps-LTP1. Экспрессию гибридного белка проводили в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3) Star™ при пониженной температуре на бедной питательной среде M9, содержащей $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве единственного источника азота и $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ D-глюкозу в качестве единственного источника углерода, которая широко используется для получения ^{15}N -, ^{13}C - или $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченных белков [194]. Индукцию проводили, добавляя в среду IPTG в средней логарифмической фазе роста клеток. Уменьшение температуры до 25-28°C, приводившее к снижению темпов роста культуры, сопровождалось преимущественным накоплением гибридного белка в растворимой форме в цитоплазме (рис. 14).

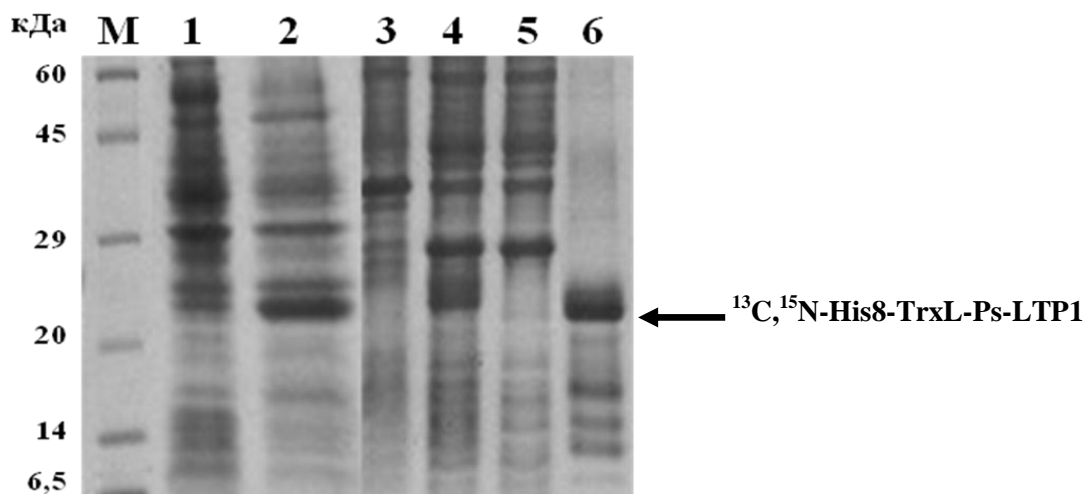


Рис. 14. Экспрессия и очистка гибридного белка на колонке с Ni^{2+} -сефарозой. 1 – суммарный клеточный лизат до индукции, 2 – суммарный клеточный лизат после индукции; 3 – клеточный осадок; 4 – осветленный лизат; 5 - проток, 6 – элюат.

Очистка рекомбинантного $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченого Ps-LTP1 включала его выделение из растворимой фракции клеточного белка, металлохелатную

хроматографию, расщепление гибридного белка бромцианом, повторную аффинную хроматографию и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Выделение гибридного белка осуществляли по приведенной выше схеме (см. пункт 4.2).

Реакция расщепления гибридного белка $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -His8-TrxL-Ps-LTP1 бромцианом проводилась в 80% ТФУ и завершалась образованием $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -His8-TrxL, содержащего С-концевой гомосерин-лактон, и $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -меченного Ps-LTP1. Полученные фрагменты гибридного белка анализировали с помощью SDS-электрофореза (рис. 15).

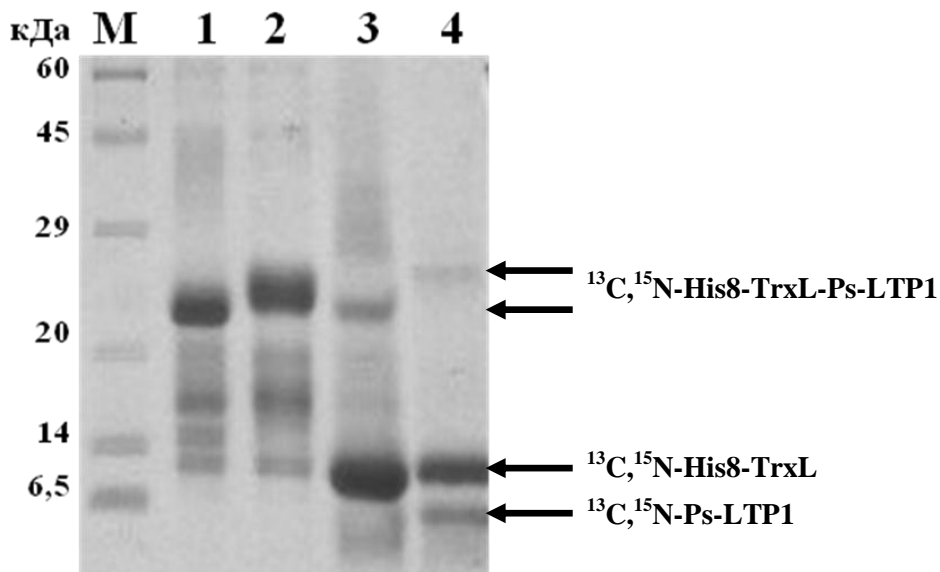


Рис. 15. Электрофореграмма продуктов реакции расщепления гибридного белка бромцианом: 1,2 - диализат без добавления ВМЕ и в его присутствии; 3,4 - продукты реакции расщепления без добавления ВМЕ и в его присутствии. М – маркер молекулярных масс.

На электрофореграмме продуктов расщепления присутствовали три полосы, соответствующие остаточному нерасщепленному гибриднему белку (расчетная М.м. 24,2 кДа), белку-носителю (расчетная М.м. 14,15 кДа) и $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Ps-LTP1 (расчетная М.м. 10,05 кДа). После проведения повторной металлохелатной хроматографии осуществляли двухстадийную ОФ-ВЭЖХ на колонках Reprosil-Pur C₁₈-AQ и Luna C₁₈. В обоих случаях разделение проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин в присутствии 0,1% ТФУ.

По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярная масса $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -меченого белка (10055,75 Да) на 525 Да превышала молекулярную массу

немеченого липид-транспортирующего белка гороха и соответствовала расчетной массе Ps-LTP1, totally меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N и стабилизированного четырьмя дисульфидными связями (расчетная М.м. 10055,04 Да) (рис. 16).

Методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии была подтверждена высокая (~99%) степень включения изотопных меток в структуру молекулы Ps-LTP1. Гомогенность и идентичного полученного меченого аналога природному Ps-LTP1 была показана также в условиях SDS-электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и КД-спектроскопии (рис. 17). Разработанная в рамках данной работы методика позволяет получать $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченый Ps-LTP1 с выходом не менее 2,5 мг/л культуры.

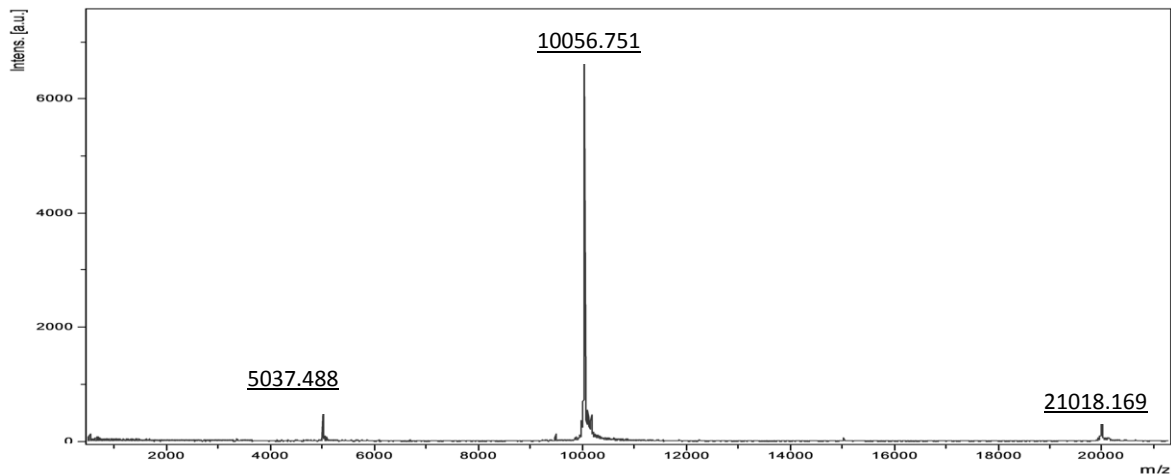


Рис. 16. MALDI-TOF масс-спектр рекомбинантного $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченого Ps-LTP1.

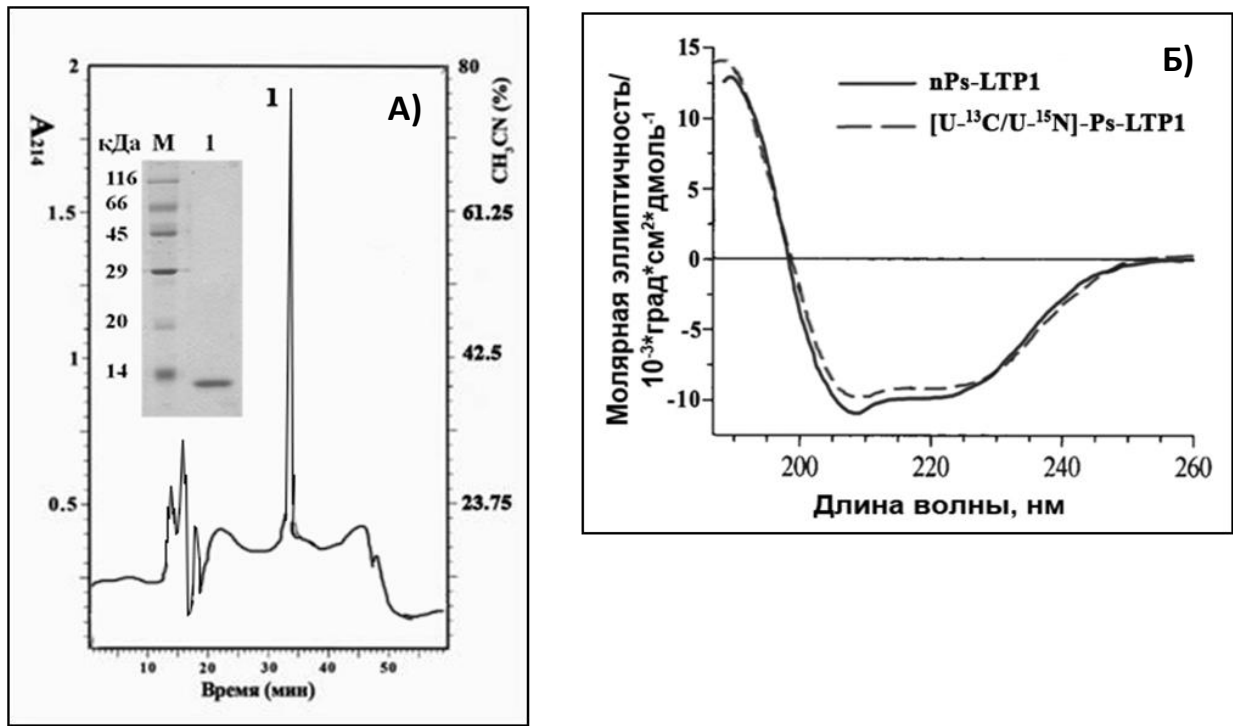


Рис. 17. А) Хроматограмма повторной очистки меченого Ps-LTP1 на аналитической колонке Luna C18 и электрофореграмма фракции 1, содержащей меченый Ps-LTP1, в присутствии β -меркаптоэтанола; М - смесь белков-стандартов молекулярных масс. Б) Спектры КД природного Ps-LTP1 и его ^{13}C , ^{15}N -меченого аналога.

Используя полученный образец ^{13}C , ^{15}N -меченого Ps-LTP1, совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН (в.н.с. З.О. Шенкарёв, зав. лаб. проф. А.С. Арсеньев) была установлена пространственная структура Ps-LTP1 в водном растворе. Впервые для липид-транспортирующих белков была показана конформационная гетерогенность в водном растворе. В случае с Ps-LTP1 в растворе одновременно присутствуют два конформационных изомера – основной и минорный, представленные в соотношении 85:15. Данные изомеры претерпевают конформационные переходы между собой с константой скорости порядка $K_{\text{EX}} \sim 10 \text{ s}^{-1}$. Конформационная гетерогенность зачастую обусловлена *цис-транс*-изомеризацией пептидных связей Xxx-Pro. Предполагается, что минорная конформация Ps-LTP1 соответствует белку со сжатой внутренней полостью. В лаборатории ЯМР-спектроскопии была определена пространственная структура основной формы, содержащая 5 α -спиральных участков: Н1 (Cys4-Gln19), Н2 (Pro29-Ala40), Н3 (Pro45-Ser60), Н4 (Thr66-Cys76) и поворот 310-спирали Н5 (Cys90-Thr92) (рис. 18). Данная

структура была депонирована в базе данных PDB [Protein Data Bank, код доступа: 2N81].

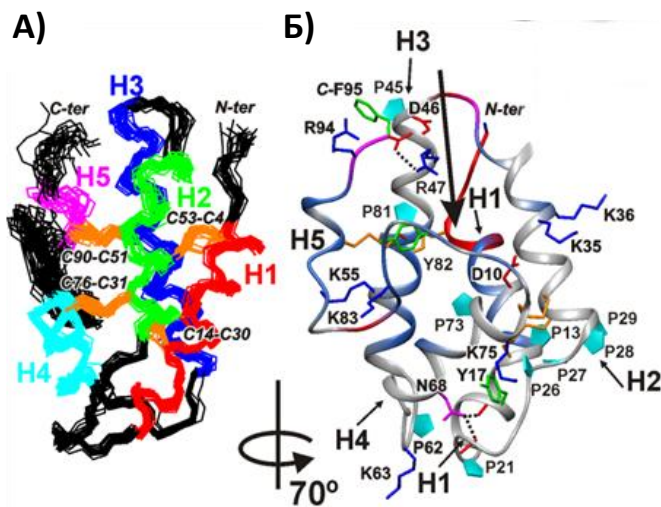


Рис. 18. Пространственная структура Ps-LTP1 в водном растворе. А) Наложение 20 рассчитанных пространственных структур: заметны регионы, где структуры наиболее гетерогенны, отображены α -спирали (H1-H5) и положение дисульфидных связей. Б) ленточное представление пространственной структуры Ps-LTP1, отображены α -спирали (H1-H5), боковые радикалы 10 пролинов, а также заряженных аминокислот. Стрелкой показан вход в гидрофобную полость белка.

Установленная структура обладает чертами сходства со структурами других растительных липид-транспортирующих белков, но имеет отличительные особенности. Различия касаются относительной ориентации межспиральных петель и С-концевой области, изменение которой приводит к значительному увеличению объема гидрофобной впадины в молекуле Ps-LTP1 по сравнению с другими растительными LTP. Известно, что у других LTP1, не связанных с лигандами, ван-дер-ваальсов объем гидрофобной полости лежит в пределах от 80 до 800 \AA^3 (наибольший объем гидрофобных полостей был обнаружен у *Lep* с 3 [19] и *Ag-LTP* [189]). Молекула Ps-LTP1 имеет намного больший объем свободной от лигандов гидрофобной полости, который составляет $\sim 1000 \pm 300 \text{\AA}^3$. Такой большой объем гидрофобной полости является достаточным для связывания двухцепочечных липидов ($\sim 1100 \text{\AA}^3$) и характерен для структур LTP1, связанных с лигандом (650-1350 \AA^3).

Методом ЯМР-спектроскопии были получены также данные о стабильности пространственной структуры Ps-LTP1, которая не претерпевает значительных изменений при нагревании до 70°C.

4.4. Биологическая активность Ps-LTP1

Как полагают, большинство приписываемых функций LTP связано с их способностью к обратимому связыванию липидных молекул, которые играют огромную роль в физиологических процессах в растениях. Липиды обеспечивают энергией клеточные процессы, формируют клеточные мембраны, участвуют в межклеточной и внутриклеточной сигнализации и т.д. Жирные кислоты входят в состав жиров масел и восков, выполняющих защитную функцию, а их производные могут выступать в роли фитогормонов. Например, жасмоновая кислота принимает участие в регуляции таких процессов как рост, старение и опадание листьев. Также она способствует формированию клубней, корнеклубней и луковиц и играет важную роль в заживлении повреждений.

Способность липид-транспортирующего белка гороха связывать и переносить различные липиды была показана с помощью метода флуоресцентной спектроскопии. Выбор данного метода обусловлен его высокой чувствительностью, позволяющей детектировать низкие концентрации веществ (мкМ-пМ), и удобным временным диапазоном измерения, т.к. испускание флуоресценции происходит через 10 нс после поглощения света. Кроме того, к достоинствам флуоресцентной спектроскопии можно отнести возможность работы с нативными препаратами, а также отсутствие необратимых модификаций образца в ходе исследования. Такое сочетание особенностей метода определяет удобство его использования для изучения различных белков и их взаимодействий с другими макромолекулами.

Эксперименты по связыванию и транспорту липидов молекулами LTP были проведены с использованием флуоресцентного зонда – 2-(п-толуидин)нафталин-6-сульфоновой кислоты (ТНС), флуоресценция которой резко возрастает при её попадании в гидрофобную полость белка. В ходе работы были использованы насыщенные ЖК с длиной цепи от C12 до C19, а также ненасыщенные ЖК с длиной цепи C16 и C18, содержащие различное число двойных связей (*рис. 19А*). Выбор данных ЖК был обусловлен предположением о возможном участии растительных липид-транспортирующих белков в формировании кутинового и

суберинового слоёв в растениях, основными составляющими компонентами которых являются производные пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот.

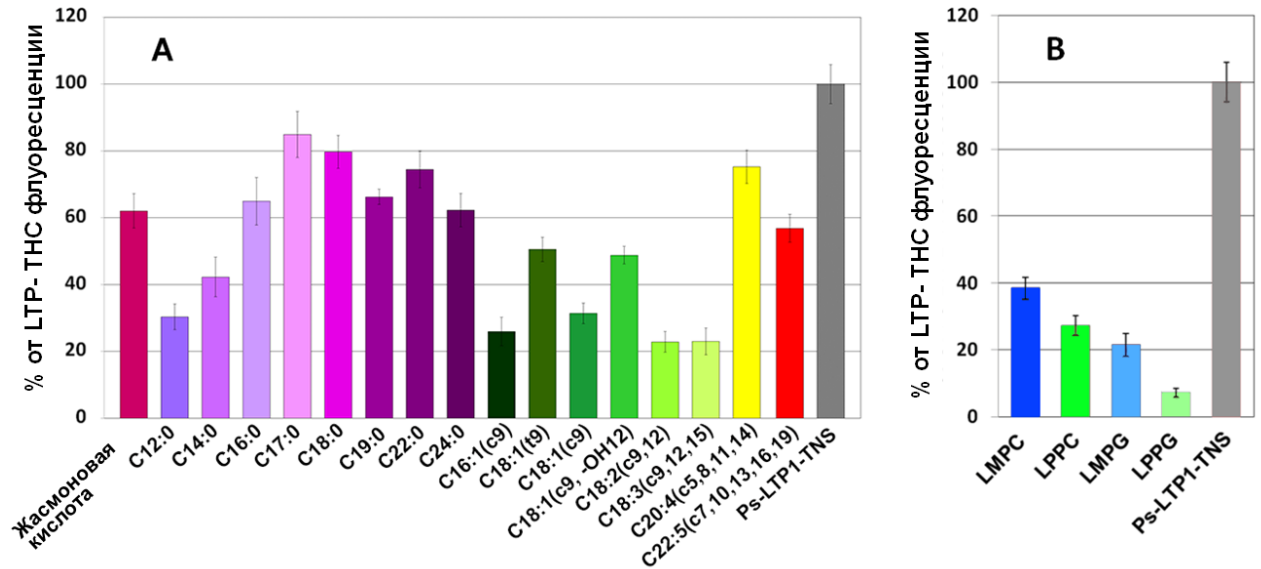


Рис. 19. Влияние присутствия ЖК (А) и лизофосфолипидов (Б) на флуоресценцию комплексов LTP с ТНС.

Было установлено, что линолевая (C18:2 (c9,12)) и линоленовая (C18:3 (c9,12,15)) кислоты с наибольшей эффективностью конкурируют с ТНС за сайт связывания в молекуле Ps-LTP1 гороха, что обуславливает падение флуоресценции до 23% от исходного значения в обоих случаях. При этом все насыщенные ЖК конкурируют со средней эффективностью с ТНС за сайт связывания в молекуле Ps-LTP1. Возможной причиной такой разницы в способности связывать различные ЖК является конформационно более выгодное положение ненасыщенных ЖК в гидрофобной полости Ps-LTP1. Объем гидрофобной полости также, вероятно, влияет на специфичность связывания лигандов. Так, было показано, что Lc-LTP2 чечевицы (ван-дер-ваальсов объем гидрофобной полости $\sim 600 \text{ \AA}^3$) обладает бóльшим сродством к ненасыщенным ЖК, в то время как Ag-LTP укропа (объем гидрофобной полости $\sim 800 \text{ \AA}^3$) характеризуется отсутствием выраженной специфичности при связывании липидов, что может быть обусловлено бóльшим объемом гидрофобной полости у Ag-LTP. [189]. Пространственная структура Ps-LTP1 характеризуется наличием

гидрофобной полости ещё большего объёма ($\sim 1000 \text{ \AA}^3$), однако данный белок также специфично связывает ненасыщенные ЖК, что можно объяснить конформационной гетерогенностью данного белка. Вероятно, специфичность связывания в данном случае обусловлена наличием минорного конформера Ps-LTP1, содержание которого в растворе составляет $\sim 15\%$.

Предполагается, что LTP участвуют в процессах активации иммунного ответа и защите растения при воздействии стрессовых факторов окружающей среды. Была исследована способность Ps-LTP1 связывать жасмоновую кислоту – растительный гормон, участвующий в регуляции роста и развития растения (*рис. 19А*). Несмотря на относительно небольшие размеры, жасмоновая кислота вытесняет ТНС с достаточно низкой эффективностью, приводя к снижению исходной флуоресценции до 62%. На сегодняшний день данное значение является самым низким по сравнению со всеми LTP, для которых ранее было проведено подобное исследование, а именно: LTP1 табака [47], XSP10 томата [195], Lc-LTP2 чечевицы [189] и Ag-LTP укропа [189]. Очевидно, биологические функции Ps-LTP1 не опосредованы взаимодействием с жасмоновой кислотой.

Для исследования эффективности связывания Ps-LTP1 с лизофосфолипидами были использованы лизофосфатидилхолины и лизофосфатидилглицерины с ацильными радикалами длиной 14 и 16 атомов углерода. Было показано, что интенсивность флуоресценции комплекса ТНС с Ps-LTP1 в присутствии 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-[фосфо-*rac*-(1-глицерина)] (LMPG) и 1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-[фосфо-*rac*-(1-глицерина))] (LPPG) снижается значительно эффективнее, чем в присутствии 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (LMPC) и 1-пальмитоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (LPPC) (*рис. 19Б*).

Сродство Ps-LTP1 к лизофосфатидилглицеринам было обнаружено также в экспериментах по изучению влияния данного белка на липосомы различной природы. В ходе работы были использованы липосомы из 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-[фосфо-*rac*-(1-глицерина)] (POPG), 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (POPC) и смеси POPG/POPC (молярное соотношение

1:1). Разрушение липосом регистрировали с использованием инкапсулированного внутри кальцеина, флуоресценция которого резко возрастает при вытекании из липосом. Было обнаружено, что высвобождение флуоресцентного красителя происходит только в случае POPG липосом, причем целостность мембраны зависит от концентрации белка в растворе (рис. 20А). В случае POPC и POPG/POPC липосом целостность мембран была практически неизменной при всех использованных концентрациях белка. Возможно, это связано с большим сродством катионного Ps-LTP1 к анионному POPG.

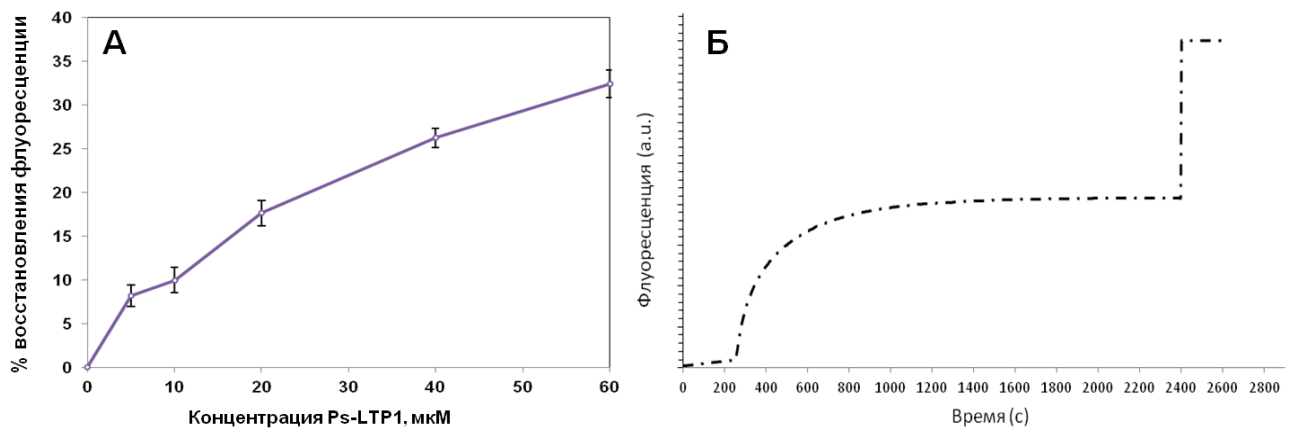


Рис. 20. Исследование способности Ps-LTP1 разрушать искусственные липосомы (А) и транспортировать липиды между модельными липосомами *in vitro* (Б).

LTP растений не только связывают липиды, но и осуществляют их перенос между мембранами в опытах *in vitro*. Показана способность данных белков переносить фосфолипиды, например, фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилшлицерин (ФГ), фосфатидилинозит (ФИ) и их производные, а также ацетил-КоА [39],[40],[52]. Механизм переноса липидов с участием LTP до сих пор неизвестен. Предполагается, что растительные LTP, так же как и фосфатидилхолин-специфичные LTP млекопитающих, переносят липиды по челночному механизму. Комплекс LTP-фосфолипид контактирует с мембраной, в результате чего происходит фосфолипидный обмен между ними [45].

Исследование способности Ps-LTP1 осуществлять транспорт липидов было проведено с использованием донорных липосом, приготовленных из POPC и содержащих в своем составе POPC, меченный тетраметил- и бис-циклогексил-производными флюоресцентного красителя BODIPY, представляющего из себя борфторидный комплекс дипирролилметена. Акцепторные липосомы были приготовлены из 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-[фосфо-*rac*-(1-глицерина)] (DMPG) (рис. 20Б). Показано, что Ps-LTP1 обладает способностью переносить липиды между липосомами, состоящими из POPC и DMPG. Липид-транспортирующий белок гороха с наибольшей эффективностью переносит липиды по сравнению с LTP укропа и чечевицы, для которых были проведены аналогичные исследования (данные не приведены). Такая способность Ps-LTP1 осуществлять транспорт липидов может быть обусловлена особенностями структуры гидрофобной впадины, которая является более гибкой по сравнению с LTP укропа и чечевицы.

Как уже отмечалось, многие растительные LTP проявляют антимикробные свойства. Антимикробное действие большинства растительных LTP характеризуется специфичностью и проявляется в отношении определенного спектра микроорганизмов. Исследование антимикробной активности Ps-LTP1 проводили, используя метод двукратных серийных разведений белка в жидкой питательной среде с культурой бактериальных клеток или спор грибов (табл. 1). Антибактериальную активность белка определяли в отношении грамположительной бактерии *Clavibacter michiganensis* VKM Ac-1144 и двух грамотрицательных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* A281 и *Pseudomonas syringae* VKMB-1546, являющихся причиной развития кольцевой гнили, корончатых галлов, бурого слизетечения, повреждения плодов и пятнистости листьев у растений. Противогрибковую активность LTP определяли в отношении грибов *Alternaria alternata* VKM F-3047, *Aspergillus niger* VKM F-2259, *Aspergillus versicolor* VKM F-1114, *Fusarium oxysporum* TCXA-4, *Fusarium solani* VKM F-142 и *Neurospora crassa* VKM F-184, являющихся причиной развития различных заболеваний растений.

Наиболее чувствительными к Ps-LTP1 штаммами фитопатогенных грибов оказались представители рода *Fusarium*, являющиеся возбудителями различных корневых гнилей и трахеомикозных (сосудистых) увяданий культурных растений (рис. 21). Из литературных данных известно, что некоторые сорта гороха посевного обладают выраженной устойчивостью к заболеваниям, вызываемым грибами рода *Fusarium* [196].

Таблица 1. Антимикробная активность Ps-LTP1 гороха

Фитопатогенные микроорганизмы	IC ₅₀ , мкМ
Бактерии	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , штамм A281	>40
<i>Clavibacter michiganensis</i> , штамм VKM Ac-1144	>40
<i>Pseudomonas syringae</i> , штамм VKM B-1546	>40
Грибы	
<i>Alternaria alternata</i> , штамм VKM F-3047	на*
<i>Aspergillus niger</i> , штамм VKM F-2259	40
<i>Aspergillus versicolor</i> , штамм VKM F-1114	на*
<i>Fusarium oxysporum</i> , штамм ТСХА-4	20-40
<i>Fusarium solani</i> , штамм VKM F-142	10-20
<i>Neurospora crassa</i> , штамм VKM F-184	40

*на - не активен



Рис. 21. Влияние рекомбинантного Ps-LTP1 на рост *Fusarium solani*. Микрофотографии (×40) сделаны после инкубации суспензии спор в течение 16 часов.

Повышенная устойчивость некоторых сортов гороха к фузариозам может быть связана с повышенной экспрессией Ps-LTP1 в растении. В ходе микроскопического анализа было установлено, что Ps-LTP1 ингибирует

проращение спор и удлинение гиф фитопатогенных грибов, однако не влияют на морфологию грибов, как это было показано ранее для некоторых растительных LTP [197]. Необходимо отметить, что механизм антимикробного действия липид-транспортующих белков по-прежнему остается предметом дискуссий. Антимикробное действие большинства катионных АМП связывают с нарушением целостности клеточной мембраны в результате электростатического взаимодействия LTP с отрицательно заряженными компонентами мембраны. Эксперимент по изучению влияния Ps-LTP1 на целостность мембран различного липидного состава показал, что данный белок наиболее эффективно разрушает липосомы, состоящие из ФГ. Интересно отметить, что Ps-LTP1 нарушает целостность липосом, сформированных из ФГ, в установленных в тестах на антимикробную активность концентрациях, аналогичных минимальным ингибирующим концентрациям. Такое различие в эффективности взаимодействия Ps-LTP1 с различными фосфолипидами, вероятно, обусловлено предпочтительным сродством катионных LTP к фосфолипидам, несущим большой отрицательный заряд. Таким образом, можно предположить, что антимикробное действие липид-транспортующего белка гороха может быть связано с его неспецифическим электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженными компонентами биологических мембран фитопатогенов. Локализация белка на поверхности мембраны фитопатогена может изменить её кривизну и дестабилизировать структуру.

4.5. Аллергенные свойства Ps-LTP1

Предсказание потенциальной аллергенности новых белков по их аминокислотным последовательностям и пространственным структурам является одной из важнейших задач биоинформатики. Согласно алгоритму, предложенному Всемирной организацией здравоохранения совместно с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией при ООН, белок считается предполагаемым аллергеном в том случае, если хотя бы один его фрагмент длиной 80 аминокислотных остатков (а.о.) имеет гомологию более 35%

как минимум с одним из известных аллергенов, и/или участок анализируемого белка протяженностью как минимум 6 а.о. идентичен участку аминокислотной последовательности известного аллергена [198].

Анализ первичной структуры Ps-LTP1 с помощью сервиса FARRP (<http://www.allergenonline.org/>) выявил, что фрагменты Ps-LTP1 длиной 80 а.о. имеют более 47% идентичных а.о. с аминокислотными последовательностями 31 зарегистрированного в международной базе данных IUIS аллергенного белка, и столько же аллергенов имеют как минимум одно совпадение 6 последовательно расположенных а.о. Наиболее структурно близкими к Ps-LTP1 аллергенами являются Len s 3 чечевицы (гомология 77%), Ara h 9 арахиса (66%), Pha v 3 фасоли (63%) и Pru p 3 персика (58%). Возможные аллергенные свойства Ps-LTP1 были также косвенно подтверждены с помощью интернет-сервисов AllergenFP, AlgPred и SDAP.

Многие представители LTP1 входят в семейство истинных аллергенов, вызывающих сенсibilизацию к пыльце и растительным пищевым продуктам. Как правило, пространственная структура пищевых аллергенов очень стабильна и устойчива к действию протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), прежде всего пепсина [199]. Устойчивость к расщеплению в ЖКТ была показана методом моделирования пищеварения путём обработки Ps-LTP1 пищеварительными ферментами (рис. 22). Для моделирования пищеварения в желудке использовали пепсин (Sigma) в соотношении фермент-субстрат 1:20 (w/w). Ферментативную реакцию проводили в 0,1 М HCl (pH 2,0) при 37°C в течение 2 ч. Затем pH смеси доводили до 8,0 с помощью NH₄HCO₃ и добавляли 2,5 нг трипсина (Promega) и 10 нг α-химотрипсина (Sigma) на 1 мкг субстрата и продолжали инкубировать в течение следующих 24 ч, моделируя кишечное пищеварение. В качестве контроля расщепления использовали чувствительный к протеолизу субстрат – α-казеин коровьего молока (Sigma-Aldrich), который полностью расщеплялся в первые 5 мин обработки пепсином. Ps-LTP1 проявил очень высокую устойчивость к перевариванию пепсином (расщепление на ~19%

за 2 ч) и смесью ферментов (расщепление на ~47% после инкубирования в течение еще 24 ч).

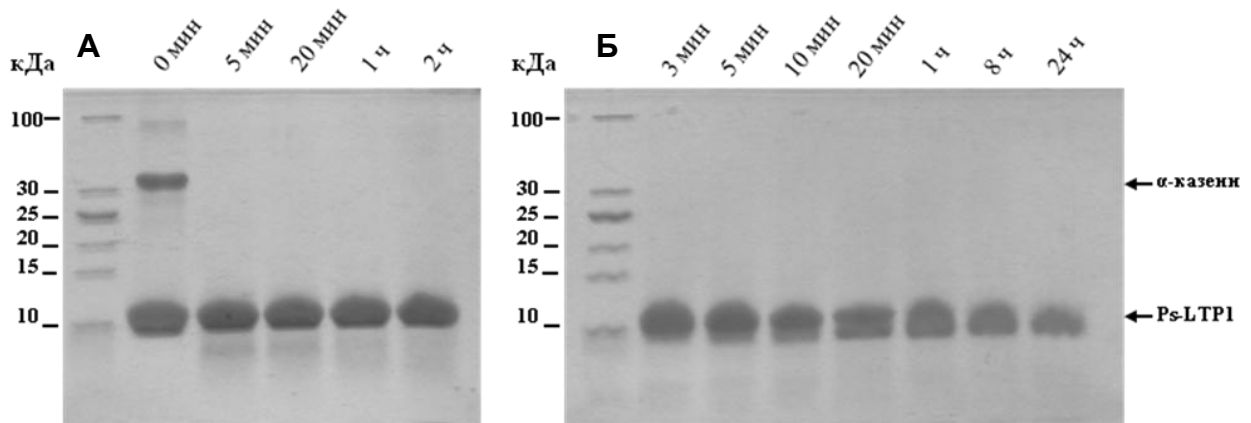


Рис. 22. Моделирование расщепления Ps-LTP1 в желудочно-кишечном тракте под действием пищеварительных ферментов: (А) пепсина, (Б) трипсина и химотрипсина.

Более того, устойчивость к нагреванию является причиной наличия активных форм аллергенов в прошедших термическую обработку пищевых продуктах. Полученные в рамках данной работы ЯМР-спектры Ps-LTP1 также свидетельствуют о стабильности его пространственной структуры, по крайней мере, при температурах до 70°C.

LTP1 составляют один из наиболее клинически значимых классов перекрестно-реагирующих растительных аллергенов. Вследствие высокой консервативности структур липид-транспортирующие белки участвуют в развитии перекрестных аллергических реакций с антителами как на пищевые аллергены, так и на аллергены из пыльцы и млечного сока растений (синдромы латекс-фруктовой и пыльцевой-пищевой аллергии), за что были отнесены к паналлергенам. Например, основной аллерген персика Pru p 3 является главным перекрестно-реагирующим аллергеном класса LTP1, играющим важную роль в сенситизации подавляющего большинства пациентов с аллергическими реакциями. Как было показано выше, Ps-LTP1 имеет значительное структурное сходство с несколькими пищевыми аллергенами, в частности, с Lep s 3 чечевицы и Pru p 3 персика. При значительном сходстве аминокислотных последовательностей белки-аллергены могут иметь сходную топологию, играющую важную роль в возникновении перекрестных аллергических реакций.

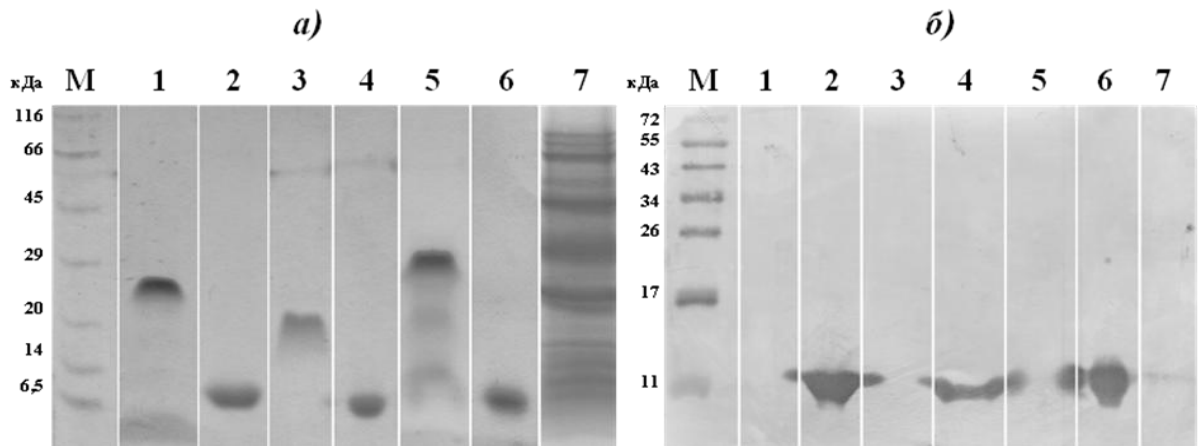


Рис. 23. Электрофореграмма (А) и иммунохимический анализ (Б) рекомбинантных липид-транспортирующих белков. SDS-электрофорез проводили в 15% ПААГ. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану вели в буфере, содержащем 20% метанола и 0,01% SDS. Детекцию белков проводили, используя поликлональные кроличьи антитела к *Lep* с 3. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс; 1,2 – рекомбинантный аллерген *Lep* с 3 в отсутствие и в присутствии ВМЕ, соответственно; 3,4 – рекомбинантный аллерген *Pru* р 3 в отсутствие и в присутствии ВМЕ, соответственно; 5,6 — рекомбинантный белок *Ps-LTP1* в отсутствие и в присутствии ВМЕ, соответственно, 7 – суммарный экстракт гороха в присутствии ВМЕ.

Для исследования перекрестной реактивности *Ps-LTP1* было проведено сравнительное изучение связывания кроличьих поликлональных анти-*Lep* с 3 антител класса IgG с рекомбинантными липид-транспортирующими белками *Ps-LTP1* гороха, *Lep* с 3 чечевицы и *Pru* р 3 персика методами иммуноблоттинга и твердофазного ИФА. В условиях SDS-электрофореза в ПААГ было показано, что в отсутствие восстанавливающего агента β -меркаптоэтанола все LTP находятся преимущественно в олигомерной форме, что характерно для белков класса LTP. Добавление восстанавливающего агента приводило не только к разрыву дисульфидных связей, но и к разрушению нековалентно связанных олигомеров (рис. 23А). В связи с этим, иммунохимическое окрашивание всех трех белков было принято проводить как в присутствии β -меркаптоэтанола, так и в его отсутствие. Связывание природного *Ps-LTP1* с антителами детектировали методом иммуноокрашивания, разделяя в полиакриламидном геле суммарный экстракт гороха после тепловой обработки в присутствии β -меркаптоэтанола (рис. 23Б). С наибольшей эффективностью анти-*Lep* с 3 антитела взаимодействовали, как и следовало ожидать, с *Lep* с 3. Чуть слабее окрашивался

Ps-LTP1 гороха, причиной чего, по-видимому, являлось значительное сходство аминокислотных последовательностей с Len с 3 чечевицы (77% идентичных аминокислотных остатков). Необходимо отметить, что иммуноокрашивание всех трех белков наблюдалось лишь в случае, когда они были предварительно обработаны ВМЕ. Возможно, наблюдаемая олигомеризация липид-транспортирующих нативных белков в условиях SDS-электрофореза в отсутствие ВМЕ создает пространственные препятствия для связывания эпитопов с антителами. В результате проведения ИФА было также показано, что анти-Len с 3 антитела связываются со всеми тремя белками с различной эффективностью (рис. 24А). Причиной перекрестной реактивности различных ЛТП с антителами IgG кролика может являться наличие высоко консервативных участков в аминокислотных последовательностях данных белков, выступающих в роли В-клеточных эпитопов.

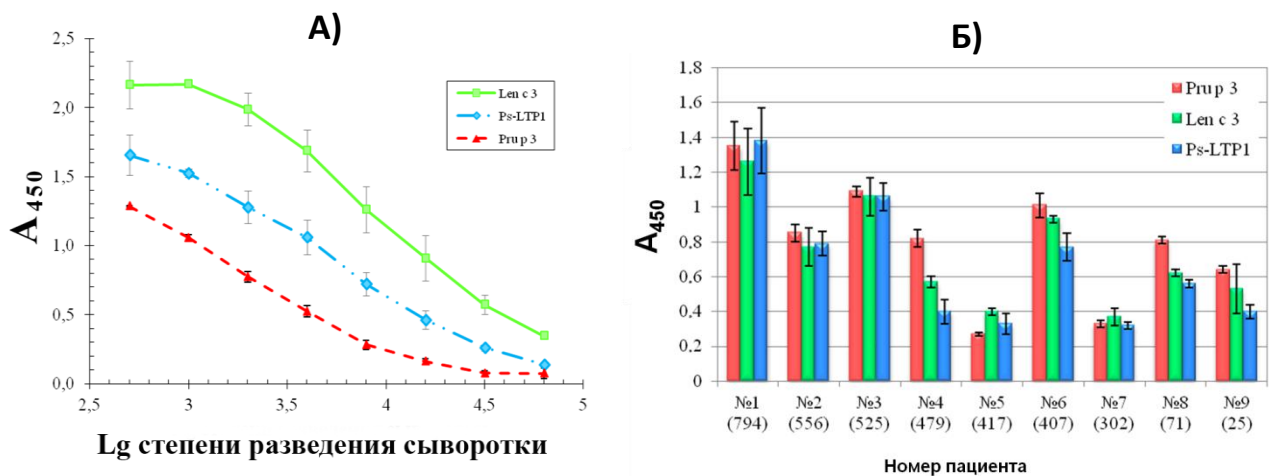


Рис. 24. А) ИФА с использованием поликлональных кроличьих анти-Len с 3 антител. Б) ИФА с использованием сывороток пациентов с пищевой аллергией (разведение 1:2); в скобках под номерами сывороток указано значение общего уровня IgE (kU/L).

Ранее в семенах гороха были обнаружены всего два аллергена, внесенные в международную базу данных по аллергенам WHO/IUIS: Pis s 1 (вицилин, 44 кДа) и Pis s 2 (конвицилин, 63 кДа). Аллергенные свойства нового липид-транспортирующего белка гороха Ps-LTP1 были показаны с использованием сывороток пациентов с аллергическими реакциями. В исследовании были использованы сыворотки 20 пациентов с пищевой аллергией на фрукты, орехи и

бобовые, из числа которых были отобраны 9 сывороток пациентов, сенсibilизованных к LTP (*рис. 24Б*). Анализ полученных данных позволил прийти к выводу о том, что Ps-LTP1 гороха является перекрёстным пищевым аллергеном, имеющим наибольшее сходство с пищевыми аллергенами бобовых (Lep s 3 чечевицы, Ara h 9 арахиса, Pva v 3 фасоли), а также Pru p 3 персика. Ps-LTP1 гороха был внесён нами в базу данных по аллергенам (www.allergen.org) Международного союза иммунологических обществ (WHO/IUIS) под аббревиатурой Pis s 3. Таким образом, горох является четвертым после арахиса, стручковой фасоли и чечевицы бобовым растением, из которого были выделены LTP, охарактеризованные как новые аллергены. Вместе с этим, обнаруженный нами Ps-LTP1 является третьим после вицилина и конвицилина пищевым аллергеном гороха посевного *Pisum sativum*.

Сходная IgE-реактивность может быть обусловлена наличием гомологичных IgE-связывающих участков на поверхностях этих аллергенов (*рис. 25*). Главный конформационный эпитоп Pru p 3 (Asn35-Ala46/Ser76-Tyr79) содержит три ключевые аминокислоты (Arg39, Thr40 и Arg44), непосредственно участвующие в связывании с IgE [120].

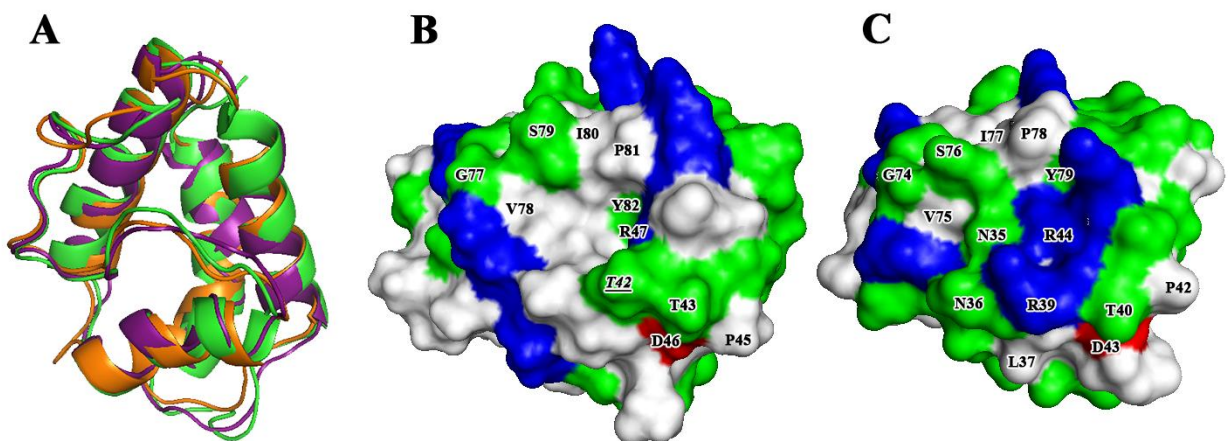


Рис. 25. А) Наложение пространственных структур аллергенов Pis s 3 гороха (зеленый), Lep s 3 чечевицы (оранжевый, [19]) и Pru p 3 персика (фиолетовый, [200]). ВС) Сравнение пространственных структур Pis s 3 гороха (В) и Pru p 3 персика (С). Основные остатки окрашены синим, кислые – красным, остальные полярные – зелёным, неполярные – белым. Подписаны остатки, формирующие главный конформационный эпитоп Asn35-Ala46/Ser76-Tyr79 на поверхности Pru p 3, и идентичные им остатки на поверхности Pis s 3 (полярный остаток Thr42 на поверхности Pis s 3 вместо основного Arg39 в молекуле Pru p 3 подписан курсивом с подчеркиванием).

Гомологичный данному эпитопу участок *Pis s 3* (Thr42-Ala49/Gly77-Tyr82) содержит два из упомянутых аминокислотных остатков – Thr43 и Arg47 (соответствуют остаткам Thr40 и Arg44 в случае *Pru p 3*) и имеет сходные с конформационным эпитопом *Pru p 3* свойства, такие как пространственная локализация на поверхности молекулы и близкое взаимное расположение преимущественно основных аминокислотных остатков, что характерно для эпитопных участков в аллергенах (рис. 25Б,В). Необходимо отметить, что у аллергена пшеницы *Tri a 14* гомологичный участок также является IgE-связывающим эпитопом. [138]. Нами показано, что остатки, входящие в состав данного эпитопа, находятся в непосредственной близости от входа в гидрофобную полость в случае всех трёх рассматриваемых аллергенов. Так, один из ключевых для связывания с IgE остатков в *Pru p 3* – Arg44 – и полярный остаток Tyr79, также входящий в состав конформационного эпитопа *Pru p 3*, являются высоко консервативными для LTP1. Данные остатки участвуют в формировании центра связывания с липидными молекулами у растительных липид-транспортирующих белков первого подкласса [5]. Таким образом, один и тот же участок молекулы, в котором преимущественно локализован её заряд, у растительных LTP1 может быть вовлечен как в связывание с IgE, так и в связывание с липидами.

4.6. Структурно-функциональная характеристика липид-транспортирующих белков чечевицы *Lc-LTP1* и *Lc-LTP3*

В геномах растений липид-транспортирующие белки представлены семействами генов, кодирующими различные изоформы LTP. Обнаружение нескольких изоформ липид-транспортирующего белка в одном растении даёт основания для более глубокого изучения биологической роли каждой из них. Было высказано предположение, что экспрессия генов тех или иных изоформ LTP определяется прежде всего влиянием на растение окружающей среды, а синтез множественных изоформ LTP является одним из элементов защитной стратегии растения при воздействии различных абиотических и биотических стрессовых

факторов [27]. Это предположение получило подтверждение при изучении дифференциальной экспрессии генов изоформ LTP в различных органах и тканях растений при воздействии абиотических и биотических стрессовых факторов на примере кунжута [28], арабидопсиса [29], перца [30], клещевины [6], винограда [31]. При этом было показано, что для биосинтеза конкретных изоформ LTP в растениях характерна тканеспецифичность, и гены определенных изоформ экспрессируются на различных этапах онтогенеза растения.

Ранее в семенах чечевицы *Lens culinaris* в Учебно-научном центре ИБХ РАН было обнаружено подсемейство из восьми липид-транспортирующих белков (Lc-LTP1–8). Один из этих белков, а именно Lc-LTP2, был выделен из семян чечевицы и охарактеризован как белок, обладающий способностью связывать липиды и антимикробной активностью [201]. Этот белок имеет характерную для представителей класса LTP пространственную структуру, включающую в себя четыре α -спирали. Гидрофобные аминокислотные остатки в белке обращены внутрь молекулы и формируют гидрофобную впадину, способную вмещать в себя липидные лиганды. Было установлено, что Lc-LTP2, как и ряд других растительных LTP, является пищевым аллергеном, который был зарегистрирован в базе данных аллергенов WHO/IUIS под аббревиатурой Len c 3 [185]. Было показано, что биосинтез выделенных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы Lc-LTP2,4,7,8 происходит на ранней стадии развития проростков семян и, возможно, обусловлен участием этих белков в борьбе с патогенами или транспорте липидов при переходе растения в фазу активного метаболизма при прорастании семян. Биологическая роль изоформ Lc-LTP1,3,5,6 пока остается невыясненной.

Один из разделов данной работы посвящен получению и сравнительному исследованию структурно-функциональных и иммунологических свойств двух других изоформ LTP чечевицы. Для проведения сравнительного исследования были выбраны изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, наиболее отличающиеся от Lc-LTP2 по аминокислотной последовательности (степень гомологии 72% и 77%, соответственно) (рис. 26).

только неспецифическое электростатическое взаимодействие ЛТР с мембраной имеет значение для проявления антимикробного эффекта.

Таблица 2. Антимикробная активность рекомбинантных ЛТР чечевицы.

Фитопатогенные микроорганизмы	IC ₅₀ , мкМ/л		
	Lc-LTP1	Lc-LTP2	Lc-LTP3
Бактерии			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , штамм A281	н.о.	20-40	н.о.
<i>Clavibacter michiganensis</i> , штамм VKM Ac-1144	40	н.о.	>40
<i>Pseudomonas syringae</i> , штамм VKM B-1546	>40	н.о.	>40
Грибы			
<i>Aspergillus niger</i> , штамм VKM F-2259	5-10	10	10
<i>Alternaria alternata</i> , штамм VKM F-3047	40	>40	40
<i>Botrytis cinerea</i> , штамм F-3700	20-40	10-20	>40
<i>Fusarium solani</i> , штамм VKM F-142	20-40	>40	40
<i>Neurospora crassa</i> , штамм VKM F-184	40	20-40	20-40

н.о. – не определялась

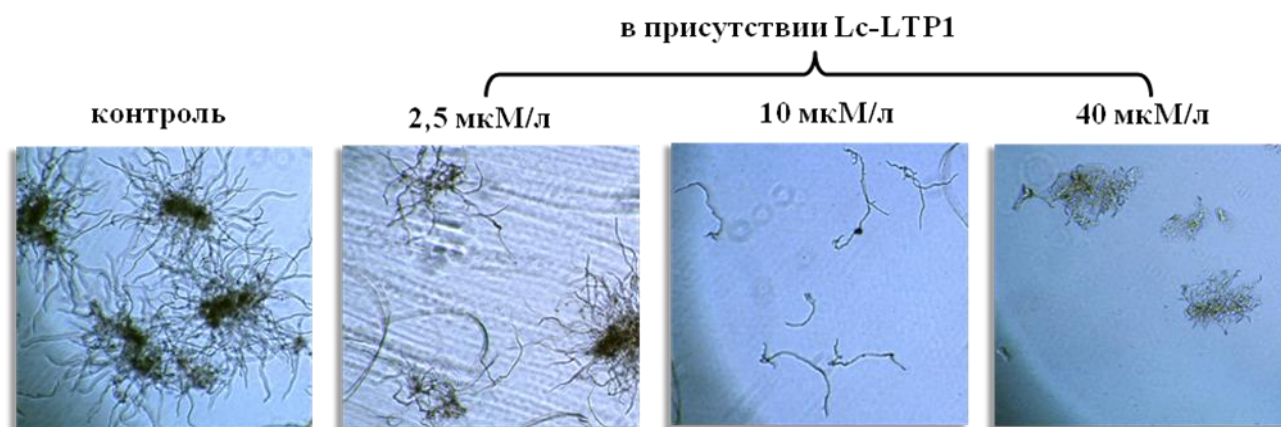


Рис. 27. Влияние рекомбинантного Lc-LTP1 на рост *Aspergillus niger*. Микрофотографии ($\times 40$) сделаны после инкубации суспензии спор в течение 16 часов.

Помимо антимикробной активности практически все известные ЛТР растений обладают способностью связывать и переносить разнообразные липиды. Это обусловлено наличием в структуре ЛТР гидрофобной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Растительные ЛТР связывают широкий спектр лигандов, включая жирные кислоты с длиной цепи C10-C18, ацильные производные кофермента А, фосфо- и галактолипиды, простагландин В2, молекулы органических растворителей и некоторые лекарственные средства

[103]. Эффективность связывания различных липидных лигандов зависит от размера гидрофобной впадины белка. Считается, что участие LTP во многих процессах в растении является следствием их способности связывать и переносить различные липиды.

В настоящей работе было проведено исследование взаимодействия трех рекомбинантных LTP чечевицы со стеариновой кислотой с использованием флуоресцентного зонда ТНС, увеличение флуоресценции которой происходит при попадании ее в гидрофобное окружение. Было показано, что добавление к раствору ТНС неправильно свернутого Lc-LTP1, не прошедшего стадию рефолдинга, не влияло на интенсивность ее флуоресценции. Добавление же рекомбинантных Lc-LTP2 и Lc-LTP3, а также Lc-LTP1, прошедшего стадию рефолдинга, приводило к значительному увеличению интенсивности флуоресценции ТНС. Это свидетельствовало об образовании комплексов ТНС с белками и о наличии в структуре всех трех LTP гидрофобной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Добавление каждого из трех рекомбинантных LTP чечевицы к смеси ТНС и стеариновой кислоты приводило к менее значительному увеличению интенсивности флуоресценции и свидетельствовало о существовании конкуренции между молекулами жирной кислоты и ТНС за сайты связывания в исследуемых белках (рис. 28).

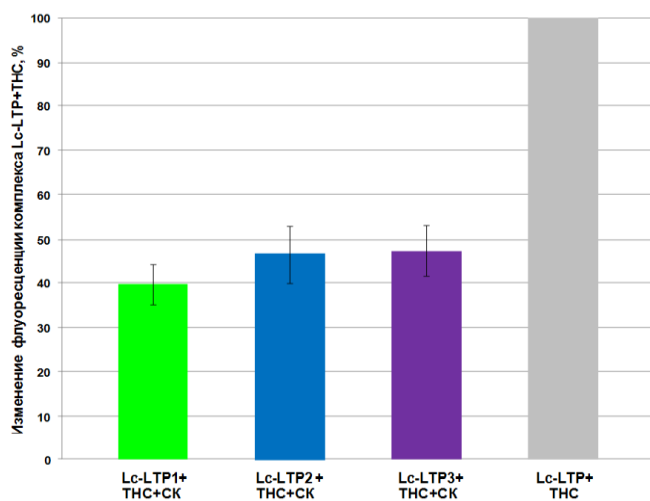


Рис. 28. Изменение флуоресценции комплексов рекомбинантных LTP и ТНС в присутствии стеариновой кислоты (СК). Lc-LTP соответствует одной из трёх изоформ.

Таким образом, было показано, что все три изоформы обладают способностью связывать жирные кислоты. При этом было отмечено отсутствие

существенной разницы в эффективности связывания жирной кислоты тремя белками, причиной чего, возможно, являлось сходство размеров гидрофобных впадин трех изоформ LTP чечевицы.

LTP из различных растений были охарактеризованы как аллергены. Зачастую причиной развития аллергических реакций является перекрестная реактивность между доминирующим аллергеном класса LTP Pru p 3 персика и гомологичными аллергенными белками из различных растительных продуктов и пыльцы. Обнаруженный ранее в Учебно-научном центре ИБХ РАН аллерген чечевицы способен связываться со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими сходные эпитопы основного аллергена персика Pru p 3, что может являться причиной развития перекрестных аллергических реакций [185].

Взаимодействие кроличьих поликлональных анти-Lc-LTP2 IgG со всеми тремя изоформами LTP чечевицы и Pru p 3 персика было исследовано с помощью иммуноблоттинга (рис. 29А) и ИФА (рис. 29Б).

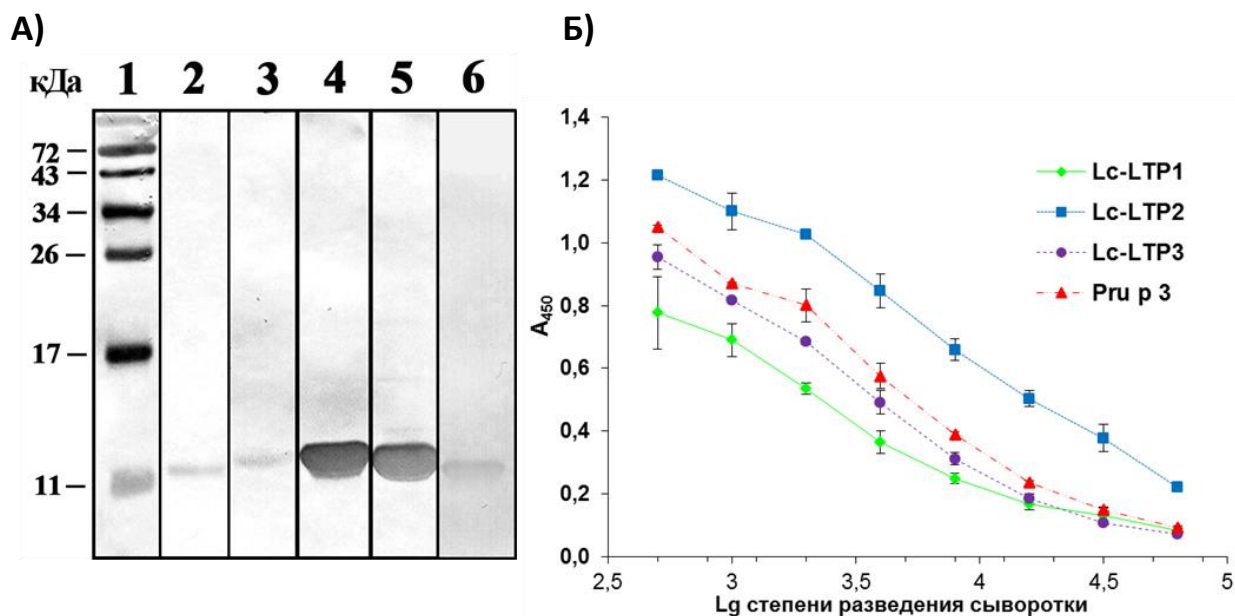


Рис. 29. А) Иммуноблоттинг с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2 антител: 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – экстракт семян чечевицы; 3-5 – рекомбинантные Lc-LTP1,2,3, соответственно; 6 – рекомбинантный Pru p 3. Б) ИФА с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2 антител.

В случае иммуноблоттинга использовались предварительно восстановленные рекомбинантные LTP. Результаты иммуноблоттинга показали,

что поликлональные кроличьи анти-Lc-LTP2 антитела связываются со всеми тремя изоформами LTP чечевицы и с Pru p 3 персика. С наибольшей эффективностью анти-Lc-LTP2 антитела взаимодействовали, как и следовало ожидать, с Lc-LTP2. Наименьшая эффективность связывания с антителами наблюдалась в случае Lc-LTP1, хотя наименьшее структурное сходство с Lc-LTP2 имеет Pru p 3 персика (степень гомологии всего 55%). Результаты ИФА принципиально не отличались от результатов иммуноблоттинга, хотя в данном случае использовались нативные белки. Наибольшая эффективность связывания с анти-Lc-LTP2 антителами наблюдалась в случае Lc-LTP2, наименьшая – в случае Lc-LTP1. Полученные результаты свидетельствовали о схожести структурной организации всех LTP и, по крайней мере, о частичном сходстве их линейных и конформационных антигенных детерминант.

Способность рекомбинантных белков связываться со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на фрукты, орехи и бобовые была показана с помощью ИФА (рис. 30).

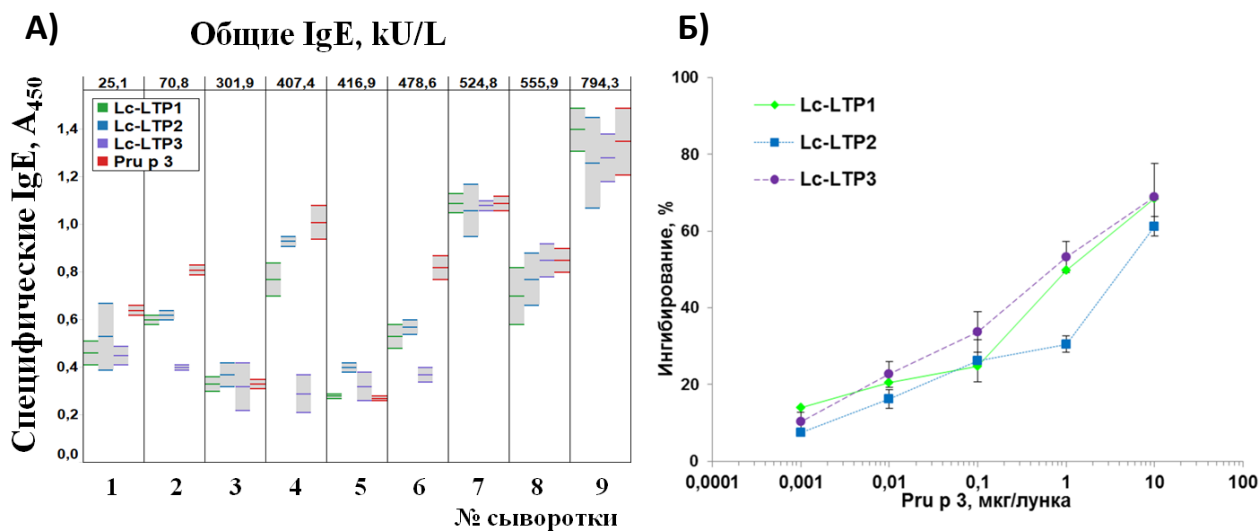


Рис. 30. А) ИФА с использованием сывороток пациентов с пищевой аллергией (разведение 1:2). Б) Ингибирование рекомбинантным Pru p 3 связывания LTP чечевицы со специфическими IgE из сыворотки №7 пациента с пищевой аллергией.

Все три изоформы LTP чечевицы связывались со специфическими IgE, но их иммунореактивность была ниже, чем у Pru p 3, что было показано при анализе большинства сывороток пациентов. Сравнение иммунореактивности трех LTP

чечевицы показало, что IgE-иммунореактивность рекомбинантного Lc-LTP3 была ниже, чем у остальных двух изоформ. Это свидетельствовало о том, что все три изоформы LTP чечевицы обладают свойствами аллергенов и что Lc-LTP3, по предварительным данным, является наименее аллергенной изоформой LTP чечевицы. Возможной причиной менее выраженной иммунореактивности третьей изоформы являлось то, что в его структуре присутствует меньшее, чем в других LTP чечевицы, число аминокислотных остатков (7 из 13), составляющих конформационные эпитопы Pru p 3 персика (*рис. 26*).

Перекрестная реактивность рекомбинантных изоформ LTP чечевицы была исследована с помощью ИФА с использованием в качестве ингибитора связывания с IgE рекомбинантного Pru p 3 (*рис. 30Б*). Ингибирование связывания с IgE наблюдалось в случае всех трех LTP чечевицы. Полученные результаты свидетельствовали о том, что изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, имеют схожие с основным аллергеном персика Pru p 3 эпитопы.

5. Выводы

1. В семенах гороха *Pisum sativum* L. обнаружено подсемейство из трёх новых липид-транспортирующих белков, названных Ps-LTP1-3. Установлены структуры кДНК, кодирующих белки-предшественники трёх LTP и соответствующие им полные аминокислотные последовательности. На основании профилей дифференциальной экспрессии данных белков предложены возможные биологические функции Ps-LTP1-3. Разработана методика выделения Ps-LTP1 из семян гороха *Pisum sativum* L. Получен индивидуальный природный Ps-LTP1, использованный в дальнейших структурно-функциональных исследованиях.
2. Разработаны биотехнологические способы получения Ps-LTP1 и его ^{13}C , ^{15}N -меченого аналога в клетках *E. coli*. Получены рекомбинатные аналоги природного и изотопно меченого Ps-LTP1, использованные для установления пространственной структуры данного белка методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии в растворе.
3. Созданы генно-инженерные конструкции для экспрессии Lc-LTP1, Lc-LTP3 и Pru p 3 в клетках *E. coli* в составе гибридных белков. Получены штаммы-продуценты, позволяющие экспрессировать эти белки с выходом 3 мг/л, 5 мг/л и 4 мг/л культуры в пересчёте на индивидуальные Lc-LTP1, Lc-LTP3 и Pru p 3, соответственно.
4. Установлено, что Ps-LTP1 с различной эффективностью связывает широкий спектр липидных молекул, включая жирные кислоты, лизолипиды и регулятор роста растений – жасмоновую кислоту.
5. Показано, что Ps-LTP1 обладает антимикробной активностью в отношении ряда фитопатогенных организмов, способен разрушать некоторые виды искусственных липосом, а также осуществлять транспорт липидов между модельными мембранами в опытах *in vitro*.
6. Показано, что липид-транспортирующий белок Ps-LTP1 является третьим пищевым аллергеном гороха *Pisum sativum*, выделенным к настоящему моменту, который был внесён в международную базу данных по аллергенам WHO/IUIS под аббревиатурой Pis s 3. Данный аллерген обладает выраженной устойчивостью к нагреванию и протеолизу в условиях, моделирующих переваривание пищи в ЖКТ.
7. Проведена сравнительная структурно-функциональная и иммунологическая характеристика изоформ аллергена Len s 3 – Lc-LTP1 и Lc-LTP3. Показано,

что они обладают антибактериальной активностью и не различаются по специфичности антимикробного действия. Установлено, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Len с 3, способны связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, однако IgE-иммунореактивность у Lc-LTP3 ниже, чем у Lc-LTP1 и Len с 3.

6. Библиографический список

1. Sabater-Jara A.B., Almagro L., Pedreño M.A. Induction of extracellular defense-related proteins in suspension cultured-cells of *Daucus carota* elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. T. 77. C. 133–139.
2. Edreva A. Pathogenesis-Related Proteins: Research Progress in the Last 15 Years // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2005. T. 31. № 1-2. C. 105–124.
3. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. T. 30. № Pt 6. C. 930–5.
4. Douliez J.P. et al. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels // *J. Cereal Sci.* 2000. T. 32. № 1. C. 1–20.
5. Carvalho A.D.O., Gomes V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review // *Peptides.* 2007. T. 28. № 5. C. 1144–1153.
6. Tsuboi S. et al. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. // *J. Biochem.* 1992. T. 111. № 4. C. 500–8.
7. O. Carvalho A. de et al. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds // *Physiol. Plant.* 2004. T. 122. № 3. C. 328–336.
8. Diz M.S. et al. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. // *Physiol. Plant.* 2011. T. 142. № 3. C. 233–46.
9. Pagnussat L. et al. An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. // *J. Exp. Bot.* 2012. T. 63. № 18. C. 6555–63.
10. Loon L.C. van, Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. T. 44. C. 135–62.

11. Simorre J.P. et al. Two- and three-dimensional ^1H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. // *Biochemistry*. 1991. T. 30. № 49. C. 11600–8.
12. Yeats T.H., Rose J.K.C. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). // *Protein Sci.* 2008. T. 17. № 2. C. 191–198.
13. Samuel D. et al. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277. № 38. C. 35267–35273.
14. Hoh F. et al. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2005. T. 61. № 4. C. 397–406.
15. Pons J.-L. et al. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. // *J. Biol. Chem.* 2003. T. 278. № 16. C. 14249–56.
16. Gomar J. et al. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. // *Protein Sci.* 1996. T. 5. № 4. C. 565–77.
17. Cheng C.-S. et al. Mutagenesis study of rice nonspecific lipid transfer protein 2 reveals residues that contribute to structure and ligand binding. // *Proteins*. 2008. T. 70. № 3. C. 695–706.
18. Lee J.Y. et al. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. // *J. Mol. Biol.* 1998. T. 276. № 2. C. 437–48.
19. Gizatullina A.K. et al. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. T. 439. № 4. C. 427–432.
20. Wijesinha-Bettoni R. et al. The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis // *Biochemistry*. 2010. T. 49. № 10. C. 2130–2139.
21. Vassilopoulou E. et al. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the

allergenicity of grape lipid transfer protein // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. T. 118. № 2. C. 473–480.

22. Bogdanov I. V. et al. A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties // *BMC Plant Biol.* 2016. T. 16. № 1. C. 107.

23. Edstam M.M. et al. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. // *Mol. Plant.* 2011. T. 4. № 6. C. 947–64.

24. Bogdanov I. V et al. Structural and functional characterization of recombinant isoforms of the lentil lipid transfer protein // *Acta Naturae.* 2015. T. 7. № 26. C. 65–73.

25. Boutrot F., Chantret N., Gautier M.-F. Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining // *BMC Genomics.* 2008. T. 9. № 1. C. 86.

26. Chae K. et al. A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like *Arabidopsis* lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. // *J. Exp. Bot.* 2010. T. 61. № 15. C. 4277–90.

27. García-Olmedo F. et al. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. // *Trends Microbiol.* 1995. T. 3. № 2. C. 72–4.

28. Choi A.M. et al. Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. T. 46. № 2. C. 127–139.

29. Thoma S. et al. Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* 1994. T. 105. № 1. C. 35–45.

30. Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. // *Plant. Cell Environ.* 2003. T. 26. № 6. C. 915–928.

31. Gomès E. et al. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. // *Mol. Plant. Microbe. Interact.*

2003. T. 16. № 5. C. 456–64.

32. Wang C. et al. Cloning and expression analysis of 14 lipid transfer protein genes from *Tamarix hispida* responding to different abiotic stresses // *Tree Physiol.* 2009. T. 29. № 12. C. 1607–1619.

33. Trevino M.B., OConnell M.A. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. // *Plant Physiol.* 1998. T. 116. № 4. C. 1461–8.

34. Jang C.S. et al. Divergence of genes encoding non-specific lipid transfer proteins in the poaceae family. // *Mol. Cells.* 2007. T. 24. № 2. C. 215–23.

35. Moore R.C., Purugganan M.D. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. T. 8. № 2. C. 122–8.

36. Cheng C.-S. et al. Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery // *Enzyme Microb. Technol.* 2004. T. 35. № 6-7. C. 532–539.

37. Pato C. et al. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. // *Biochem. Pharmacol.* 2001. T. 62. № 5. C. 555–560.

38. Zachowski A. et al. Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. // *Eur. J. Biochem.* 1998. T. 257. № 2. C. 443–8.

39. Guerbette F. et al. Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. // *Biochemistry.* 1999. T. 38. C. 14131–14137.

40. Guerbette F. et al. Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties. // *Mol. Cell. Biochem.* 1999. T. 192. № 1-2. C. 157–61.

41. Tassin S. et al. Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. // *Biochemistry.* 1998. T. 37. № 11. C. 3623–37.

42. Tassin-Moindrot S. et al. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. // *Eur. J.*

Biochem. 2000. T. 267. № 4. C. 1117–24.

43. Douliez J.P., Michon T., Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). // Biochim. Biophys. Acta. 2000. T. 1467. № 1. C. 65–72.

44. Charvolin D. et al. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. // Eur. J. Biochem. 1999. T. 264. № 2. C. 562–8.

45. Kader J., Physiologie L. De, Pierre U. LIPID-TRANSFER PROTEINS IN PLANTS // 1996.

46. Cheng H.-C. et al. Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. // Protein Sci. 2004. T. 13. № 9. C. 2304–2315.

47. Buhot N. et al. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. // Mol. Biol. Cell. 2004. T. 15. № 11. C. 5047–52.

48. Li C. et al. Calmodulin binds to maize lipid transfer protein and modulates its lipids binding ability // FEBS J. 2008. T. 275. № 21. C. 5298–5308.

49. Wang Z. et al. Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in *Arabidopsis*. // FEBS Lett. 2005. T. 579. № 7. C. 1683–7.

50. Bakan B. et al. The crystal structure of oxylipin-conjugated barley LTP1 highlights the unique plasticity of the hydrophobic cavity of these plant lipid-binding proteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. T. 390. № 3. C. 780–785.

51. Bakan B. et al. Specific adduction of plant lipid transfer protein by an allene oxide generated by 9-lipoxygenase and allene oxide synthase // J. Biol. Chem. 2006. T. 281. № 51. C. 38981–38988.

52. Ostergaard J. et al. Acyl-binding/lipid-transfer proteins from rape seedlings, a novel category of proteins interacting with lipids. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. T. 1170. № 2. C. 109–17.

53. Douliez J.P. et al. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. // *Eur. J. Biochem.* 2001. T. 268. № 5. C. 1400–3.
54. Cammue B.P. et al. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. // *Plant Physiol.* 1995. T. 109. № 2. C. 445–55.
55. Segura A., Moreno M., García-Olmedo F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. // *FEBS Lett.* 1993. T. 332. № 3. C. 243–6.
56. Zottich U. et al. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. T. 1810. № 4. C. 375–83.
57. Regente M.C. et al. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2005. T. 40. № 3. C. 183–189.
58. Dubreil L. et al. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties // *Plant Sci.* 1998. T. 138. № 2. C. 121–135.
59. Sun J.-Y. et al. Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. // *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2008. T. 21. № 3. C. 346–360.
60. Ge X. et al. Preliminary study on the structural basis of the antifungal activity of a rice lipid transfer protein. // *Protein Eng.* 2003. T. 16. № 6. C. 387–390.
61. Caaveiro J.M. et al. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. // *FEBS Lett.* 1997. T. 410. № 2-3. C. 338–42.
62. Zhang N., Jones B.L., Tao H.P. Purification and Characterization of a New Class of Insect α -Amylase Inhibitors from Barley // *Cereal Chem.* 1997. T. 74. № 2. C. 119–

122.

63. Melo F.R. et al. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling, and docking. // *Proteins*. 2002. T. 48. № 2. C. 311–9.

64. Jones B.L., Marinac L.A. Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). // *J. Agric. Food Chem.* 2000. T. 48. № 2. C. 257–64.

65. Sawano Y. et al. Proteinase inhibitor from ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. // *Plant Physiol.* 2008. T. 146. № 4. C. 1909–19.

66. Ooi L.S.M. et al. Isolation, characterization, molecular cloning and modeling of a new lipid transfer protein with antiviral and antiproliferative activities from *Narcissus tazetta* // *Peptides*. 2008. T. 29. № 12. C. 2101–2109.

67. Lin P. et al. Lipid transfer proteins from *Brassica campestris* and mung bean surpass mung bean chitinase in exploitability // *J. Pept. Sci.* 2007. T. 13. № 10. C. 642–648.

68. Campos D.C.O. et al. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. T. 86. C. 71–79.

69. Chae K. et al. A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. // *Plant Cell*. 2009. T. 21. № 12. C. 3902–14.

70. Zhang D. et al. OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice. // *Plant Physiol.* 2010. T. 154. № 1. C. 149–62.

71. Hinch D.K. Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2002. T. 357. № 1423. C. 909–16.

72. Buhot N. et al. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. // *FEBS Lett.* 2001. T. 509. № 1. C. 27–30.

73. Cheng C. et al. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense // *Biochemistry*. 2004. C. 13628–13636.
74. Wang X. et al. A rice lipid transfer protein binds to plasma membrane proteinaceous sites. // *Mol. Biol. Rep.* 2009. T. 36. № 4. C. 745–50.
75. Osman H. et al. Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. // *Mol. Biol. Cell*. 2001. T. 12. № 9. C. 2825–34.
76. Kim Y.-T. et al. Isolation and characterization of NgRLK1, a receptor-like kinase of *Nicotiana glutinosa* that interacts with the elicitor of *Phytophthora capsici*. // *Mol. Biol. Rep.* 2010. T. 37. № 2. C. 717–27.
77. Maldonado A.M. et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. // *Nature*. 2002. T. 419. № 6905. C. 399–403.
78. Lascombe M.-B. et al. The structure of “defective in induced resistance” protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. // *Protein Sci.* 2008. T. 17. № 9. C. 1522–30.
79. Cameron K.D., Teece M. a, Smart L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. // *Plant Physiol.* 2006. T. 140. № 1. C. 176–183.
80. Lee S.B. et al. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. // *Plant Physiol.* 2009. T. 150. № 1. C. 42–54.
81. Sterk P. et al. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. // *Plant Cell*. 1991. T. 3. № 9. C. 907–21.
82. Park S.Y. et al. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. // *Plant Cell*. 2000. T. 12. № 1. C. 151–64.
83. Tomassen M.M.M. et al. Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. // *J.*

Exp. Bot. 2007. T. 58. № 5. C. 1151–60.

84. Pii Y. et al. The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2009. T. 22. № 12. C. 1577–87.

85. Pii Y., Molesini B., Pandolfini T. The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection. // Plant Signal. Behav. 2013. T. 8. № 7. C. e24836.

86. Rudrappa T. et al. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. // Commun. Integr. Biol. 2010. T. 3. № 2. C. 130–8.

87. Degli Esposti M. Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer proteins // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2002. T. 1553. № 3. C. 331–340.

88. Crimi M. et al. Pro-apoptotic effect of maize lipid transfer protein on mammalian mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. 2006. T. 445. № 1. C. 65–71.

89. Perrocheau L. et al. Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process. // J. Agric. Food Chem. 2006. T. 54. № 8. C. 3108–13.

90. Nieuwoudt M., Lombard N., Rautenbach M. Optimised purification and characterisation of lipid transfer protein 1 (LTP1) and its lipid-bound isoform LTP1b from barley malt // Food Chem. 2014. T. 157. C. 559–567.

91. Salt L.J. et al. The identification of foam-forming soluble proteins from wheat (*Triticum aestivum*) dough // Proteomics. 2005. T. 5. № 6. C. 1612–1623.

92. Safi H. et al. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. // Plant Physiol. Biochem. 2015. T. 89. C. 64–75.

93. Choi Y.E. et al. Tobacco NtLTP1, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes. // Plant J. 2012. T. 70. № 3. C.

480–91.

94. Wang F. et al. A wheat lipid transfer protein 3 could enhance the basal thermotolerance and oxidative stress resistance of Arabidopsis. // *Gene*. 2014. T. 550. № 1. C. 18–26.

95. Guo C., Ge X., Ma H. The rice OsDIL gene plays a role in drought tolerance at vegetative and reproductive stages. // *Plant Mol. Biol.* 2013. T. 82. № 3. C. 239–53.

96. Rajan T. V. The Gell – Coombs classification of hypersensitivity reactions : a re-interpretation // 2003. T. 24. № 7. C. 376–379.

97. FLOISTRUP H. et al. Allergic disease and sensitization in Steiner school children // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. T. 117. № 1. C. 59–66.

98. Bidad K., Nicknam M.H., Farid R. A review of allergy and allergen specific immunotherapy // *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* 2011. T. 10. № 1. C. 1–9.

99. Bohle B. T lymphocytes and food allergy // *Mol. Nutr. Food Res.* 2004. T. 48. № 6. C. 424–433.

100. Lambrecht B.N., Pauwels R.A., Fazekas B. Induction of Rapid T Cell Activation, Division, and Recirculation by Intratracheal Injection of Dendritic Cells in a TCR Transgenic Model // 2016.

101. Woodfolk J. a. T-cell responses to allergens // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007. T. 119. № 2. C. 280–294.

102. Akdis C.A. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells // 2011. C. 735–746.

103. Tordesillas L. et al. T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects // *Mol. Immunol.* 2009. T. 46. № 4. C. 722–728.

104. Turcanu V., Maleki S.J., Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. // *J. Clin. Invest.* 2003. T. 111. № 7. C. 1065–72.

105. Pène J. et al. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. // *J. Immunol.* 1988. T. 141. № 4. C. 1218–24.
106. Punnonen J. et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. T. 90. № 8. C. 3730–4.
107. Bhalla P.L., Singh M.B. Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination // *Trends Biotechnol.* 2008. T. 26. № 3. C. 153–161.
108. Larché M., Akdis C.A., Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. T. 6. № 10. C. 761–71.
109. Werfel T. et al. Milk-responsive atopic dermatitis is associated with a casein-specific lymphocyte response in adolescent and adult patients. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997. T. 99. № 1 Pt 1. C. 124–33.
110. Leonardi S. et al. Atopic disease, immune system, and the environment // *Allergy Asthma Proc.* 2007. T. 28. № 4. C. 410–417.
111. Egger M. et al. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. // *Allergy.* 2006. T. 61. № 4. C. 461–76.
112. Nowak-Węgrzyn A. Food allergy to proteins. // *Nestlé Nutr. Work. Ser. Paediatr. Program.* 2007. T. 59. C. 17–31; discussion 31–6.
113. Hauser M. et al. Panallergens and their impact on the allergic patient. // *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* 2010. T. 6. № 1. C. 1.
114. Crespo J.F. et al. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain // *Pediatr. Allergy Immunol.* 1995. T. 6. № 1. C. 39–43.
115. Borges J.-P. et al. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. T. 44. № 10. C. 535–542.
116. González-mancebo E. et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach

- lipid transfer protein , Pru p 3 , in the Spanish population // *J Allergy Clin Immunol.* 2003. T. 112. № 4. C. 789–795.
117. Egger M. et al. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010. T. 10. № 5. C. 326–335.
118. Marzban G. et al. Direct evidence for the presence of allergens in Rosaceae fruit tree pollen // *Aerobiologia (Bologna).* 2006. T. 22. № 3. C. 237–245.
119. Fernández-Rivas M. et al. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. T. 118. № 2. C. 481–488.
120. Pacios L.F. et al. Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: Peach Pru p 3 allergen as a model // *Mol. Immunol.* 2008. T. 45. № 8. C. 2269–2276.
121. García-Casado G. et al. Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. T. 112. № 3. C. 599–605.
122. Salcedo G. et al. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. T. 1771. № 6. C. 781–91.
123. Leonardi S. et al. Atopic disease, immune system, and the environment // *Allergy Asthma Proc.* 2007. T. 28. № 4. C. 410–417.
124. Schulten V. et al. Characterization of the allergic T-cell response to Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein in peach // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. T. 124. № 1. C. 100–107.
125. Butcher E.C. et al. Lymphocyte trafficking and regional immunity. // *Adv. Immunol.* 1999. T. 72. C. 209–53.
126. Lieberman J.A., Sicherer S.H. Diagnosis of food allergy: epicutaneous skin tests, in vitro tests, and oral food challenge. // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2011. T. 11. № 1. C. 58–64.

127. Nowak-Wegrzyn A. et al. Work Group report: oral food challenge testing. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. T. 123. № 6 Suppl. C. S365–83.
128. Turnbull J.L., Adams H.N., Gorard D.A. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015. T. 41. № 1. C. 3–25.
129. Winkle R.C. Van, Chang C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014. T. 46. № 3. C. 211–24.
130. Moreno-Aguilar C. Improving pollen immunotherapy: minor allergens and panallergens. // *Allergol. Immunopathol. (Madr).* T. 36. № 1. C. 26–30.
131. Becker S. et al. Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients // *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology.* 2011. T. 269. № 4. C. 1291–1296.
132. Chruszcz M. et al. Serum albumins—Unusual allergens // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013. T. 1830. № 12. C. 5375–5381.
133. Leung N.Y.H. et al. Current Immunological and Molecular Biological Perspectives on Seafood Allergy: A Comprehensive Review // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2012. T. 46. № 3. C. 180–197.
134. Palacin a. et al. Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: A novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. T. 39. № 8. C. 1267–1276.
135. Salcedo G. et al. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. T. 34. № 9. C. 1336–1341.
136. Díaz-Perales A. et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: A new tool for the diagnosis of fruit allergy // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. T. 111. № 3. C. 628–633.
137. Reuter A. et al. A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. // *Clin. Exp. Allergy.* 2006. T. 36. № 6. C.

815–23.

138. Tordesillas L. et al. Molecular basis of allergen cross-reactivity: Non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models // *Mol. Immunol.* 2009. T. 47. № 2-3. C. 534–540.

139. Sánchez-García S., Cipriani F., Ricci G. Prevention, treatment and food allergy phenotypes: an update. // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2015.

140. Yang Y.-H., Chiang B.-L. Novel approaches to food allergy. // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014. T. 46. № 3. C. 250–7.

141. Leung D.Y.M. et al. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. // *N. Engl. J. Med.* 2003. T. 348. № 11. C. 986–93.

142. Rafi A. et al. Effects of omalizumab in patients with food allergy. // *Allergy Asthma Proc.* T. 31. № 1. C. 76–83.

143. Straumann A. et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. // *Gut.* 2010. T. 59. № 1. C. 21–30.

144. Garrett J.K. et al. Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004. T. 113. № 1. C. 115–9.

145. Bublin M., Breiteneder H. Developing Therapies for Peanut Allergy // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2014. T. 165. № 3. C. 179–194.

146. Ferreira F. et al. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. // *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 2006. T. 5. № 1. C. 5–14.

147. Valenta R. et al. Genetically engineered and synthetic allergen derivatives: candidates for vaccination against type I allergy. // *Biol. Chem.* T. 380. № 7-8. C. 815–24.

148. Verheggen B.G. et al. Health economic comparison of SLIT allergen and SCIT allergoid immunotherapy in patients with seasonal grass-allergic rhinoconjunctivitis in Germany. // *Clin. Transl. Allergy.* 2015. T. 5. C. 1.

149. Cromwell O., Häfner D., Nandy A. Recombinant allergens for specific immunotherapy // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. T. 127. № 4. C. 865–872.
150. Mutschlechner S., Deifl S., Bohle B. Genetic allergen modification in the development of novel approaches to specific immunotherapy // *Clin. Exp. Allergy.* 2009. T. 39. № 11. C. 1635–1642.
151. Thalhamer T. et al. Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by means of in silico mutation and screening // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. T. 125. № 4.
152. Li X.-M. et al. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. // *J. Immunol.* 2003. T. 170. № 6. C. 3289–3295.
153. Bonura a. et al. Characterization of a Par j 1/Par j 2 mutant hybrid with reduced allergenicity for immunotherapy of *Parietaria* allergy // *Clin. Exp. Allergy.* 2012. T. 42. № 3. C. 471–480.
154. Banerjee S. et al. Conversion of Der p 23, a new major house dust mite allergen, into a hypoallergenic vaccine. // *J. Immunol.* 2014. T. 192. № 10. C. 4867–75.
155. Curin M. et al. Hypoallergenic derivatives of Fel d 1 obtained by rational reassembly for allergy vaccination and tolerance induction. // *Clin. Exp. Allergy.* 2014. T. 44. № 6. C. 882–94.
156. Orlandi a. et al. The recombinant major allergen of *Parietaria judaica* and its hypoallergenic variant: In vivo evaluation in a murine model of allergic sensitization // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. T. 34. № 3. C. 470–477.
157. Niederberger V. et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. T. 101 Suppl . C. 14677–82.
158. Reisinger J. et al. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen

sensitivity. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005. T. 116. № 2. C. 347–54.

159. Wild C. et al. A recombinant allergen chimera as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities. // *Allergy.* 2007. T. 62. № 1. C. 33–41.

160. Malherbe L. T-cell epitope mapping. // *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 2009. T. 103. № 1. C. 76–79.

161. Larché M. Update on the current status of peptide immunotherapy. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007. T. 119. № 4. C. 906–9.

162. Zhao J. et al. Construction of the recombinant vaccine based on T-cell epitope encoding Der p1 and evaluation on its specific immunotherapy efficacy. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. T. 8. № 4. C. 6436–43.

163. Palma R. De et al. Use of antagonist peptides to inhibit in vitro T cell responses to Par j1, the major allergen of *Parietaria judaica* pollen. // *J. Immunol.* 1999. T. 162. № 4. C. 1982–1987.

164. Singh H. et al. Designing B-Cell Epitopes for Immunotherapy and Subunit Vaccines // *Methods Mol Biol.* 2015. T. 1348. C. 327–340.

165. Tanabe S. Epitope peptides and immunotherapy. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2007. T. 8. № 1. C. 109–118.

166. Raz E. et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. T. 93. № 10. C. 5141–5.

167. Chua K.Y., Kuo I.-C., Huang C.-H. DNA vaccines for the prevention and treatment of allergy. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009. T. 9. № 1. C. 50–4.

168. Weiss R. et al. Is genetic vaccination against allergy possible? // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2006. T. 139. № 4. C. 332–45.

169. Medjitna T.D.E. et al. DNA vaccines: safety aspect assessment and regulation. // *Dev. Biol. (Basel).* 2006. T. 126. C. 261–70; discussion 327.

170. Manam S. et al. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. // *Intervirology*. 2000. T. 43. № 4-6. C. 273–81.
171. Weiss R. et al. mRNA vaccination as a safe approach for specific protection from type I allergy. // *Expert Rev. Vaccines*. 2012. T. 11. № 1. C. 55–67.
172. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. // *Genes Dev*. 2011. T. 25. № 10. C. 1010–22.
173. Li X. et al. TLR9-ERK-mTOR signaling is critical for autophagic cell death induced by CpG oligodeoxynucleotide 107 combined with irradiation in glioma cells. // *Sci. Rep*. 2016. T. 6. C. 27104.
174. Hayen S.M. et al. Novel immunotherapy approaches to food allergy // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol*. 2014. T. 14. № 6. C. 549–556.
175. Pali-Schöll I. et al. Protamine nanoparticles with CpG-oligodeoxynucleotide prevent an allergen-induced Th2-response in BALB/c mice. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2013. T. 85. № 3 Pt A. C. 656–64.
176. Laemmli U. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis // *Nature*. 1970. T. 227. C. 680–686.
177. Schägger H., Jagow G. von. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem*. 1987. T. 166. № 2. C. 368–379.
178. Malke H. J. SAMBROCK, E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition), Volumes 1, 2 and 3*. 1625 S., zahlreiche Abb. und Tab. Cold Spring Harbor 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. \$ 115.00. ISBN: 0-87969-309-6 // *J. Basic Microbiol*. 1990. T. 30. № 8. C. 623–623.
179. Mornkham T. et al. Extractions of High Quality RNA from the Seeds of Jerusalem Artichoke and Other Plant Species with High Levels of Starch and Lipid //

Plants. 2013. Т. 2. № 2. С. 302–316.

180. Kam-Lock Chan, Chai-Ling Ho, Parameswari Namasivayam S.N. A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides : Protocol Exchange // *Protoc. Exch.* 2007.

181. Masek T. et al. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. // *Anal. Biochem.* 2005. Т. 336. № 1. С. 46–50.

182. Wan L. et al. Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin // *Protein Expr. Purif.* 2006. Т. 48. № 2. С. 307–313.

183. Алексеева А.С., Третьякова Д.С., Мельникова Д.Н., Молотковский Юл.Г. Б.И.А. Новый флуоресцентный мембранный зонд (2,3-5,6-бис-циклогексил)BODIPY-меченный фосфатидилхолин // *Биоорганическая химия.* 2015.

184. Krause S. et al. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. Т. 124. № 4. С. 771–778.e5.

185. Akkerdaas J. et al. Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: A novel legume allergen // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2011. Т. 157. № 1. С. 51–57.

186. Zoccatelli G. et al. Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3) // *Mol. Immunol.* 2010. Т. 47. № 7-8. С. 1561–1568.

187. Asero R. et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. // *Allergy.* 2002. Т. 57. № 10. С. 900–906.

188. Ramazzina I. et al. Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (*Pyr c 3*) // *Gene.*

2012. T. 491. № 2. C. 173–181.

189. Melnikova D.N. et al. A novel lipid transfer protein from the dill *Anethum graveolens* L.: isolation, structure, heterologous expression, and functional characteristics // *J. Pept. Sci.* № in press.

190. Hlavac F., Rouer E. Expression of the protein-tyrosine kinase p56lck by the pTRX vector yields a highly soluble protein recovered by mild sonication. // *Protein Expr. Purif.* 1997. T. 11. № 3. C. 227–32.

191. Andreev Y. a. et al. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions // *Anal. Biochem.* 2010. T. 407. № 1. C. 144–146.

192. Wang K., Sipes B.S., Schmitt D.P. *Crotalaria* As a Cover Crop for Nematode Management : a Review // *Nematropica.* 2002. T. 32. № 4584. C. 35–57.

193. Lundström P. et al. Isotope labeling methods for studies of excited protein states by relaxation dispersion NMR spectroscopy. // *Nat. Protoc.* 2009. T. 4. № 11. C. 1641–8.

194. Bracken C., Marley J., Lu M. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins // *J Biomol NMR.* 2001. T. 20. № 1. C. 71–5.

195. Krasikov V. et al. The tomato xylem sap protein XSP10 is required for full susceptibility to *Fusarium* wilt disease. // *J. Exp. Bot.* 2011. T. 62. № 3. C. 963–73.

196. Castillejo M.Á., Bani M., Rubiales D. Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. // *Phytochemistry.* 2015. T. 115. C. 44–58.

197. Isaac Kirubakaran S. et al. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. T. 46. № 10. C. 918–927.

198. Ladics G.S. Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity // *Food Chem. Toxicol.* 2008. T. 46. № 10 SUPPL. C. S20–S23.

199. Astwood J.D., Leach J.N., Fuchs R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. // *Nat. Biotechnol.* 1996. T. 14. № 10. C. 1269–73.

200. Pasquato N. et al. Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens. // J. Mol. Biol. 2006. T. 356. № 3. C. 684–94.

201. Finkina E.I. et al. Purification and primary structure of novel lipid transfer proteins from germinated lentil (*Lens culinaris*) seeds. // Biochem. 2007. T. 72. № 4. C. 430–438.

7. Список сокращений

BME (β -mercaptoethanol) – β -меркаптоэтанол;

DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns) – сигнализирующие об опасности молекулярные паттерны;

DTT (Dithiothreitol) – дитиотреитол;

HR (Hypersensitive Response) – гиперчувствительный ответ;

IC₅₀ (Inhibition Concentration) – концентрация антибиотика, необходимая для 50% ингибирования роста микроорганизма;

IL (Interleukin) – интерлейкин;

IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;

LTP (LipidTransferProtein) – липид-транспортирующие белки;

MALDI-TOF (Time-Of-Flight Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) – времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация;

Mes– 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота;

PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны;

PMSF (Phenylmethanesulfonyl Fluoride) – фенилметилсульфонилфторид;

PRP, PR-белки (Pathogenesis-Related Proteins) – белки, связанные с патогенезом;

PVPP (Polyvinylpyrrolidone) – поливинилполипирролидон;

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) – быстрая амплификация концов кДНК;

SAR (Systemic Acquired Resistan) – системная приобретенная резистентность;

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрия;

TBS (Tris-buffered saline) – трис-буфер

TCR (T-Cell Recceptor) – Т-клеточный рецептор;

ТЕМЕД (N,N,N'N'-tetramethylethylenediamine) – N,N,N'N'-тетраметилендиамин;

АГБ – арабиногалактановые белки;

АМП – антимикробные пептиды;

АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия;

АФК – активные формы кислорода;

ГФИ – гликозилфосфатидилинозитный якорь;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ЖК – жирная кислота;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

КоА – коэнзим А;

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПСА – персульфат аммония;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ТНС–2-п-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

ФГ – фосфатидилглицерины;

ФИ – фосфотидилинозиты;

ФХ – фосфатидилхолины;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс.