

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

На правах рукописи

БОГДАНОВ Иван Владимирович

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

(специальность 02.00.10 – биоорганическая химия)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Учебно-научном центре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор химических наук
Овчинникова Татьяна Владимировна
профессор, заведующая отделом «Учебно-научный центр» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН,
доктор химических наук
Северин Евгений Сергеевич
профессор, заведующий отделом нанобиотехнологии Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения

доктор биологических наук
Бабак Алексей Владимирович
профессор, главный научный сотрудник лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится 14 декабря 2016 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

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

Автореферат разослан _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук


В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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). Белки этого семейства принимают участие в формировании устойчивости растений не только к биотическому, но и к абиотическому стрессу. Наряду с конститутивной экспрессией генов этих белков в клетках меристемы растений наблюдается стресс-индуцированный синтез PRP. 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. Одним из них является класс липид-транспортирующих белков (Lipid Transfer Proteins или сокращенно LTP), обладающих антимикробной активностью в отношении фитопатогенных грибов, бактерий и вирусов. В соответствии с молекулярными массами белки данного класса разделяют на два подкласса: LTP1 (~9 кДа) и LTP2 (~7 кДа).

Биологическая роль LTP в растениях пока недостаточно изучена. Показано участие растительных LTP в таких физиологических процессах, как эмбриогенез, метаболизм липидов, защита растений от воздействия абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды, биосинтез клеточной стенки, депонирование кутикулярного воска, модуляция роста растений и многие другие. Высказываются предположения о том, что многообразные функции данных белков связаны с их способностью обратимо связывать и переносить различные липидные молекулы.

Особенности структуры растительных LTP обуславливают их высокую стабильность к термической денатурации, химической деградации и ферментативному расщеплению. Считается, что именно благодаря повышенной устойчивости к деградации ферментами пищеварительного тракта растительные LTP являются одним из наиболее клинически важных классов белков, участвующих в развитии аллергических реакций на растительные пищевые продукты, латекс и пыльцу. В связи с постоянным ростом числа пациентов с аллергическими заболеваниями в настоящее время актуальными задачами биоорганической химии и фундаментальной медицины являются поиск, идентификация и изучение свойств новых аллергенов. Структурно-функциональное изучение новых аллергенов, принадлежащих к классу растительных LTP, и разработка биотехнологических способов их получения открывают возможности их использования при создании диагностических тест-систем нового поколения для компонентной аллергодиагностики, а также вакцин на основе гипоаллергенных форм LTP для проведения превентивной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

Цель и задачи исследования

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* subsp. *sativum* L. [отдел – покрытосеменные Angiosperms), класс – двудольные (Dicotyledones), порядок – бобовоцветные (Fabales),

семейство – бобовые (Fabaceae), род – горох (*Pisum L.*), вид – посевной (*sativum 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 алергизирующей 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.*)].

Проведенные исследования включали выделение, очистку, определение структуры, изучение физико-химических, биологических и иммунологических свойств новых растительных липид-транспортирующих белков, а также разработку биотехнологических способов получения рекомбинантных ЛТР и их аналогов, меченных стабильными изотопами.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) поиск новых липид-транспортирующих белков;
- 2) разработка методик их выделения и очистки из природного сырья;
- 3) определение полных нуклеотидных последовательностей кДНК, кодирующих белки-предшественники новых ЛТР, и соответствующих им аминокислотных последовательностей;
- 4) определение уровня экспрессии генов исследуемых белков в различных органах растения и на разных стадиях его онтогенетического развития;
- 5) создание систем для гетерологичной экспрессии липид-транспортирующих белков;
- 6) получение рекомбинантных ЛТР и их аналогов, меченных стабильными изотопами;
- 7) структурно-функциональная и иммунологическая характеристика выделенных белков.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе проведенной работы в семенах гороха *Pisum sativum L.* обнаружено подсемейство из трёх новых липид-транспортирующих белков, названных Ps-LTP1-3, и исследованы профили дифференциальной экспрессии их генов в различных органах растения и на разных стадиях его онтогенетического развития. Разработана методика выделения природного белка Ps-LTP1, экспрессия которого поддерживается в семенах на высоком уровне. Разработаны биотехнологические способы получения рекомбинантных Ps-LTP1 гороха *Pisum sativum*, Lc-LTP1 и Lc-LTP3 чечевицы обыкновенной *Lens culinaris*, основного аллергена персика *Prunus persica*, названного ранее Pru p 3. Разработан биотехнологический способ получения рекомбинантного Ps-LTP1, тотально

меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N . С использованием ^{13}C , ^{15}N -меченого аналога изучены физико-химические свойства пептида, показано сходство пространственных структур Ps-LTP1 и Lc-LTP2. Вместе с тем, впервые для липид-транспортирующих белков выявлена конформационная гетерогенность пептида в водном растворе. Проведено исследование функциональных свойств выделенного Ps-LTP1, включающее в себя изучение антимикробной и липид-связывающей активностей, а также способности переносить липиды между мембранами *in vitro* и разрушать искусственные липосомы. Продемонстрировано иммунологическое сходство Ps-LTP1 с двумя пищевыми аллергенами класса LTP – Len с 3 чечевицы и Pru p 3 персика. Установлено, что липид-транспортирующий белок гороха Ps-LTP1 является новым пищевым аллергеном. Данный белок внесен нами в базу данных по аллергенам (<http://www.allergen.org>) Международного союза иммунологических обществ (WHO/IUIS) в качестве пищевого аллергена гороха под аббревиатурой Pis s 3. Данный белок стал третьим пищевым аллергеном гороха, известным к настоящему моменту. Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что в молекулах растительных LTP1 присутствуют консервативные аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание как с липидными лигандами, так и со специфическими антителами класса IgE. Проведено сравнительное исследование свойств новых изоформ (Lc-LTP1 и Lc-LTP3) липид-транспортирующего белка чечевицы Lc-LTP2, ранее зарегистрированного в базе данных по аллергенам WHO/IUIS как Len с 3. Показаны менее выраженные аллергенные свойства изоформы Lc-LTP3 по сравнению с Len с 3.

Полученные результаты обогащают наши представления о разнообразии свойств растительных липид-транспортирующих белков и могут стать основой для их дальнейших структурно-функциональных и иммунологических исследований, включая изучение молекулярных механизмов их антимикробного действия, липид-связывающей и липид-транспортирующей активностей, а также аллергенных свойств с целью практического применения в медицине для создания гипоаллергенных форм клинически значимых аллергенов.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы (соглашение № 8043 от 20.07.2012 г.), Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 12-04-01224 и № 13-08-00956), Российского научного фонда (соглашение № 14-50-00131), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «У.М.Н.И.К.»).

Апробация работы и публикации

Результаты исследования были представлены на 38-ом конгрессе ФЕБО (Санкт-Петербург, 2013); VI, VII и VIII Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011, 2013 и 2015); научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва, 2011); международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012); международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института

биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014); международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015); V международной конференции ФизТехБио (Долгопрудный, 2015); осеннем финале РАН программы «У.М.Н.И.К.» (Москва, 2015); международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Москва, 2016); IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016); V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016); XXII-XXVIII зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 и 2016). По теме диссертации опубликовано 34 работы.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 128 страницах; содержит 30 рисунков и 2 таблицы; состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, библиографического списка, включающего 201 наименование, и списка сокращений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выделение и структурная характеристика нового липид-транспортирующего белка Ps-LTP1 из гороха *Pisum sativum*

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 150 мМ NH₄COOH, 200 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1,5% ПВПП, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma). Осветленный методом центрифугирования экстракт подвергали диализу против 50 мМ NH₄COOH. В качестве следующей стадии очистки была использована тепловая обработка, в результате которой высокомолекулярные белки выпадали в осадок. 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 белковых фракций, которые были проанализированы методом SDS-электрофореза в ПААГ (рис. 1А). Для дальнейшей работы была отобрана фракция, содержащая, в основном, белки с молекулярной массой менее 20 кДа. 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. 1Б).

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.

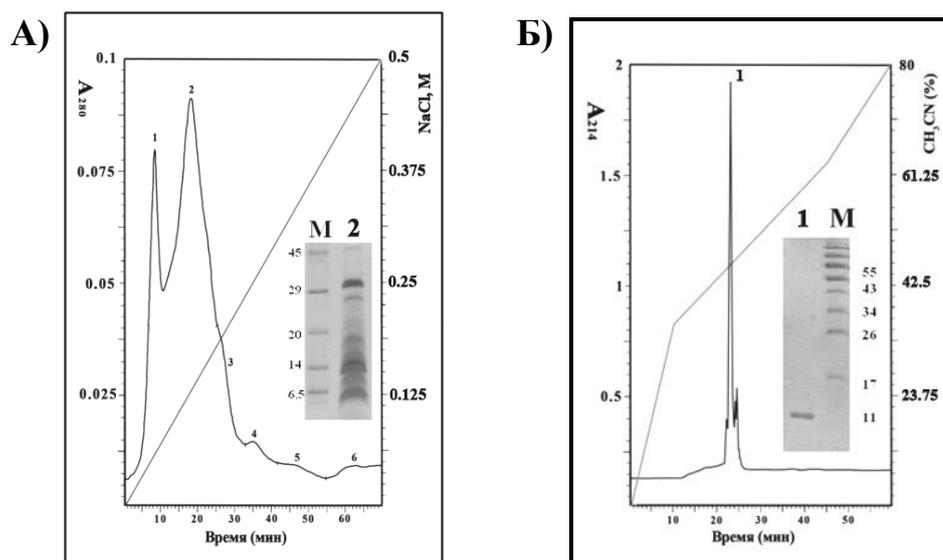


Рис. 1. А) Хроматограмма разделения белков на катионообменной колонке HiTrap SP FF и электрофореграмма фракции 2 после катионообменной хроматографии. Б) ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C18 и электрофореграмма фракции 1, содержащей новый ЛТР из гороха; М – смесь белков-стандартов молекулярных масс.

В результате проведенной реакции алкилирования выделенного белка иодацетамидом без предварительного восстановления дитиотреитолом и после него было показано, что ЛТР гороха содержит 8 остатков цистеина, вовлеченные в образование 4 дисульфидных связей. Спектр кругового дихроизма (КД) природного Ps-LTP1 представлял собой кривую, характерную для белков с высоким содержанием α -спиральной структуры и имел два минимума при 208 и 220 нм.

В качестве альтернативной схемы выделения липид-транспортирующего белка гороха нами была разработана методика с использованием иммуноаффинной хроматографии на основе BgCN-активированной сефарозы с «пришитыми» к ней поликлональными анти-Lep с 3 антителами.

Для установления полной аминокислотной последовательности нового ЛТР была выделена суммарная РНК, проведены обратная транскрипция и быстрая амплификация 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК (RACE). В результате проведения RACE были установлены структуры двух полноразмерных (Ps-LTP1,2) и одной частичной кДНК (Ps-LTP3), кодирующих предшественники трех новых изоформ липид-транспортирующего белка гороха Ps-LTP1-3 [коды доступа в GenBank: **KJ569141**, **KJ569142** и **KJ569143**, соответственно]. Компьютерный анализ, проведенный с помощью интернет-сервера SignalP_v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>), позволил установить вероятные границы между сигнальными последовательностями и зрелыми белками. Предшественники трёх новых ЛТР1 содержат сигнальные пептиды размером 24-25 аминокислотных остатков, и зрелые белки, состоящие из 95 аминокислотных остатков и содержащие по 8 консервативно расположенных остатков цистеина. Зрелые изоформы Ps-LTP2 и Ps-LTP3 имеют 91 и 75% идентичных аминокислотных остатков с изоформой Ps-LTP1, соответственно.

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.

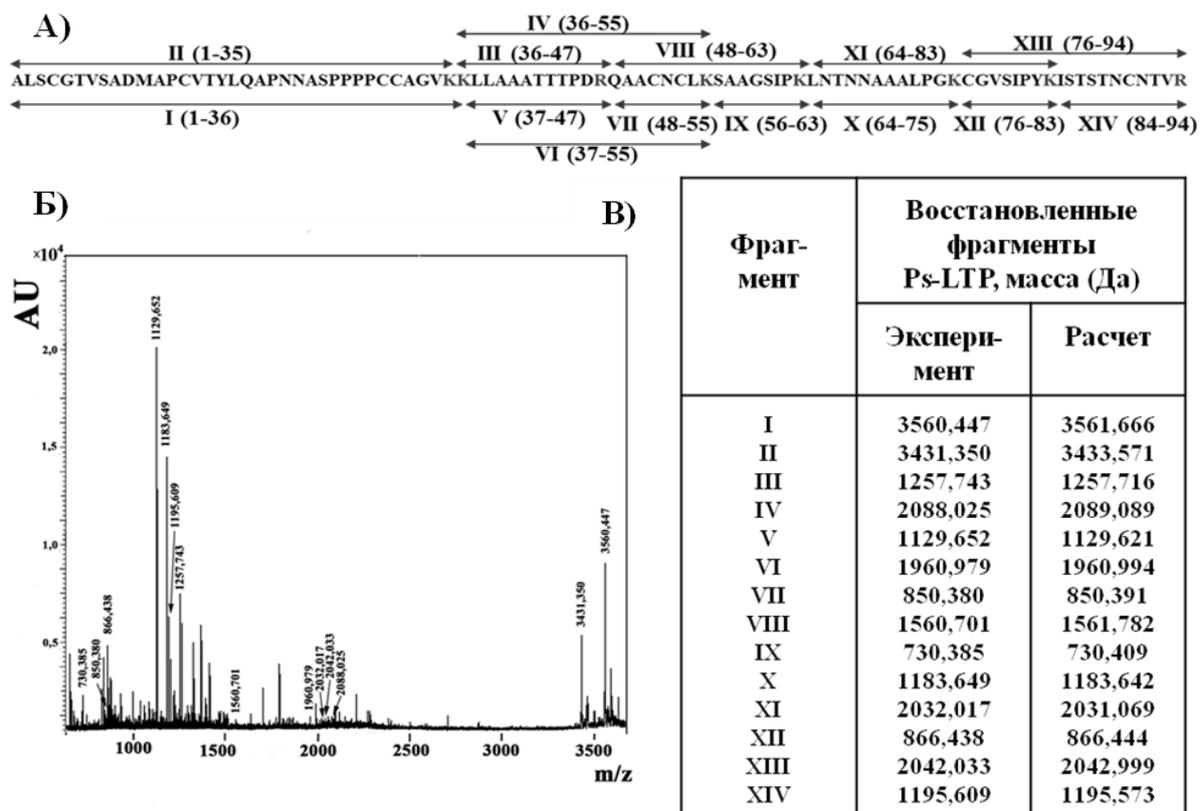


Рис. 2. А) Триптические фрагменты восстановленного Ps-LTP1. Б) Масс-спектрометрический анализ триптического гидролизата Ps-LTP1. В) Сравнение расчетных и экспериментальных данных о молекулярных массах триптических фрагментов восстановленного Ps-LTP1.

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. 2А,Б).

```

                                     №4 (3' RACE)
                                     .....
M A R S M K L A C V A L Y
+1
1  CAACAAC CAAGAAAA GAATGAAA AGTTAGAAA AAAAAATG GCAAGAACC ATGAAGTTA GCATGTGTT GCTTTGGTG
                                     .....
                                     №5 (3' RACE)
                                     .....
+1  I C M V I A P M A E A A L S C G T V S A D M A P C V
82  ATGTGCATG GTGGTTATT GCGCCTATG GCAGAAAGCT GCTTTGTCT TGTGGAAC TATCCGCT GATATGGCT CCATGGCTT
+1  T Y L Q A P N N A S P P P C A G V K L L A A A T
163 ACTTATCTT CAAGCTCCT AATAATGCC AGTCCTCCA CCGCCATGC TGTGCAGGA GTGAAGAAG CTTCTTGT GCGGCCACC
+1  T T P D R Q A A C N C L K S A A G S I P K L N T N N A
244 ACCACGCCG GATGTCAG GCTGCCCTGT AACTGCTTG AAATCAGCT GCCGGTCT ATTCTAAA TTGAATACT AACAAATGCT
                                     .....
                                     №2 (3' RACE)
                                     .....
                                     №1 (3' RACE)
                                     .....
+1  A A L P G K C G V S I P Y K I S T S T N C N T V R F
325 GCTGCTCTC CCTGGCAAA TGGGTGTT AGCATCCCT TACAAGATC AGTACCTCC ACCAACTGT AACACTGT AGGTTTGA
406 AGATGGTGG TGTGGTTTC AGGGTTATC ATATGGAAG CTTGTCACT AGTATATGA GAGTTTAAA TATTAAGAA TAAAAATTT
                                     .....
                                     №7 (5' RACE)
                                     .....
487 TAGTGAGAG TGATATAGG ATCATCTTA CATGTGTC STATCCTCT TGTACTAGA TCTATACTG TATTCACSTG TTTCTCACT
                                     .....
                                     №6 (5' RACE)
                                     .....
568 ATGTTGTTG AATCAATCT ATATAATGA CATATTTA ATTTGAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

```

Рис. 3. Последовательность кДНК, кодирующая предшественник Ps-LTP1, и соответствующая ей аминокислотная последовательность пребелка. Открытая рамка считывания включает сигнальный пептид (выделен черным цветом) и зрелый белок (выделен серым цветом). Показаны сайты отжига праймеров, использованных для амплификации концов кДНК.

Соответствие молекулярных масс структурам наиболее длинных фрагментов было дополнительно подтверждено с помощью тандемной масс-спектрометрии. В результате была установлена полная аминокислотная последовательность нового выделенного из семян гороха липид-транспортующего белка Ps-LTP1, внесенная в базу данных UniProt [код доступа: **СОНJR7**], и структура его предшественника (рис. 3).

Методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) изучена экспрессия генов трёх обнаруженных изоформ липид-транспортующего белка гороха (Ps-LTP1-3) в различных органах взрослого растения и на разных стадиях его онтогенетического развития. Тотальную РНК выделяли из непроросших сухих семян, из трёхдневных проростков, а также из листьев, стеблей, корней и усиков взрослого растения (35 дней после прорастания). Обратную транскрипцию проводили, используя олиго-dT₂₅ праймер. ПЦР-РВ проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология) с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium). Эффективность амплификации для каждой пары праймеров определяли методом линейной регрессии стандартных калибровочных прямых, построенных по результатам амплификации при серийных двукратных разведениях матрицы (коэффициент корреляции Пирсона R²=0,95-0,99).

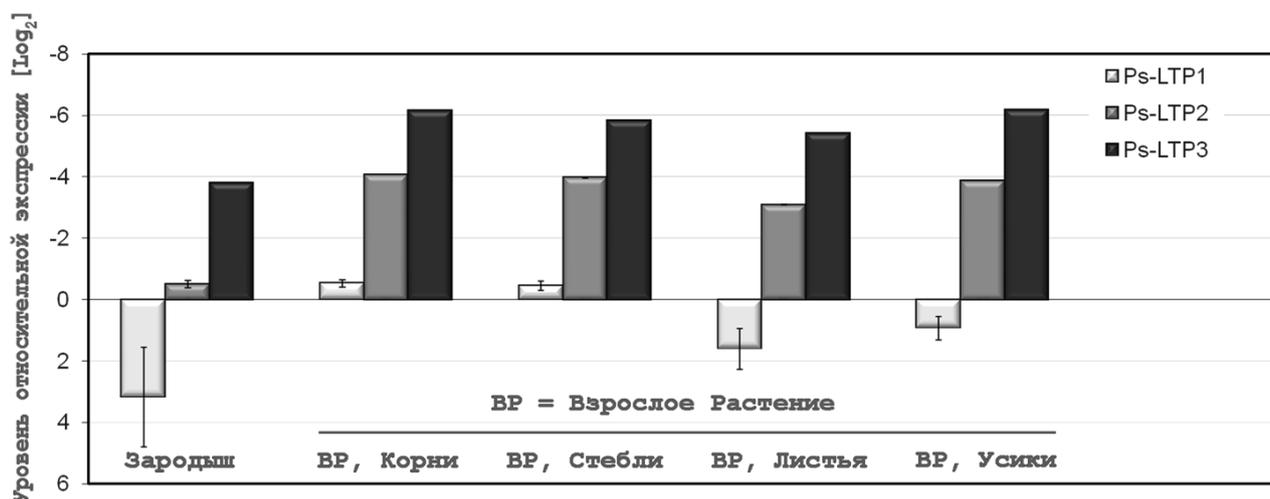


Рис. 4. Профили дифференциальной экспрессии изоформ Ps-LTP1-3 в различных органах гороха. Все значения уровней экспрессии нормализованы относительно референсного гена – β-тубулина. Уровни мРНК в различных органах отнесены к уровню экспрессии соответствующих белков в сухих семенах гороха до проращивания.

Показано, что экспрессия гена Ps-LTP1 поддерживается на высоком уровне в семенах гороха и резко снижается после их проращивания (рис. 4). По-видимому, биологическая функция Ps-LTP1 реализуется на самых ранних стадиях онтогенетического развития растения непосредственно перед прорастанием семян. Вероятнее всего, биологическая роль Ps-LTP1 заключается в мобилизации запасных липидов семян во время их набухания и прорастания. Индукция экспрессии генов 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.

2. Гетерологичная экспрессия и очистка липид-транспортирующих белков

Для проведения структурно-функциональных исследований растительных липид-транспортирующих белков на основе плазмиды серии pET и штамма *E. coli* BL21 (DE3) Star™ были созданы системы для гетерологичной экспрессии Ps-LTP1 гороха, Lc-LTP1,3 чечевицы и Pru p 3 персика (рис. 5). Рекомбинантные белки экспрессировали в виде гибридных конструкций с тиоредоксином А и октагистиридиновой последовательностью, обеспечивающей возможность металлохелатной очистки гибридных белков. С целью последующего расщепления гибридных белков бромцианом в область между целевым белком и тиоредоксином А, модифицированным для предотвращения его фрагментации (Met37Leu), был введен остаток метионина. Возможность альтернативного способа фрагментации обеспечивалась введением сайта расщепления фактором Ха (в случае Lc-LTP1) или последовательности двух аминокислотных остатков Asp-Pro (в случае Lc-LTP3), пептидная связь между которыми подвержена специфичному кислотному гидролизу.

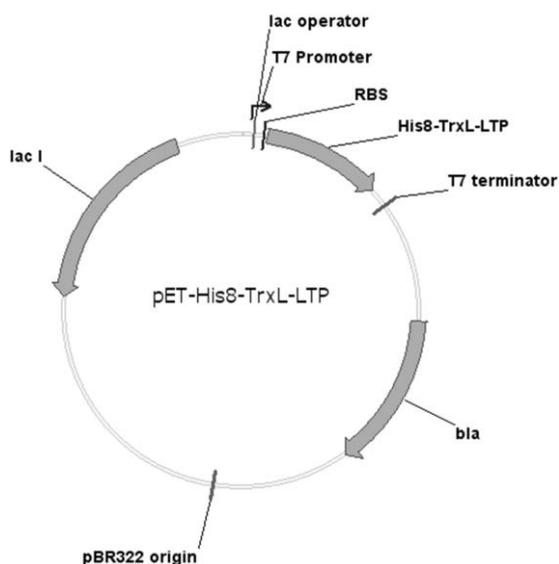


Рис. 5. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pET-His8-TrxL-LTP. Плазмидный вектор включает в себя промотор транскрипции бактериофага T7, lac-оператор, сайт связывания рибосомы (RBS), последовательность, кодирующую гибридный белок (His8-TrxL-LTP, где LTP – Ps-LTP1, Lc-LTP1, Lc-LTP3 или Pru p 3), терминатор транскрипции T7, bla – ген устойчивости к β-лактамам, lacI – ген репрессора lac.

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. 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 полученный с помощью центрифугирования осветленный клеточный лизат. 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 солюбилизировали 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-PurC18-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 (рис. 6). 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. 6а). Поэтому было принято решение провести рефолдинг очищенного Lc-LTP1. Рефолдинг проводили при низкой температуре 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. 6б).

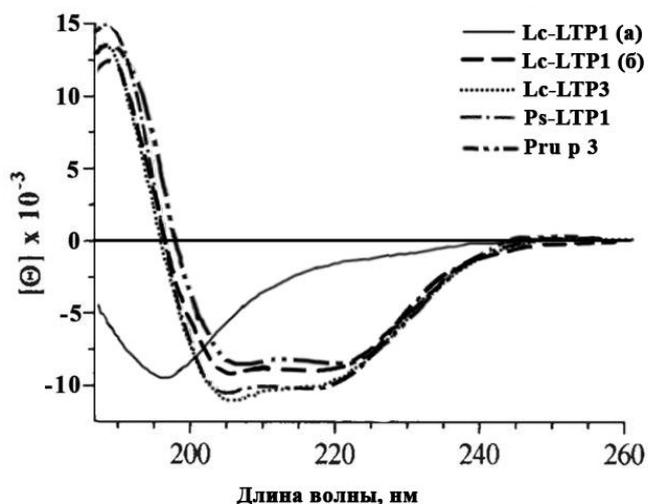


Рис. 6. КД-спектры рекомбинантных липид-транспортирующих белков. (а) и (б) – КД-спектры рекомбинантного Lc-LTP1 до и после рефолдинга, соответственно.

Гомогенность полученных образцов и идентичность рекомбинантных аналогов природным белкам были подтверждены с помощью методов SDS-электрофореза в ПААГ, времяпролётной масс-спектрометрии MALDI, автоматического микросеквенирования по Эдману и КД-спектроскопии. Масс-спектрометрический анализ показал, что молекулярные массы полученных рекомбинантных белков соответствуют расчётным массам LTP, структура которых стабилизирована 4 дисульфидными связями. Выходы рекомбинантных белков составляли не менее 3 мг/л культуры в пересчёте на чистый Lc-LTP1, 5 мг/л для Lc-LTP3 и Ps-LTP1 и 4 мг/л для Pru p 3.

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

Для разработки биотехнологического способа получения тотально меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N липид-транспортующего белка гороха Ps-LTP1 была использована сконструированная в рамках данной работы плаزمида pET-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. Очистка рекомбинантного ^{13}C , ^{15}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. Экспериментально полученное методом MALDI-TOF масс-спектрометрии значение m/z рекомбинантного белка (10056,75) соответствовало расчетной моноизотопной молекулярной массе Ps-LTP1 (10055,04 Да), тотально меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N и стабилизированного четырьмя дисульфидными связями. Методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии была подтверждена высокая (~99%) степень включения изотопных меток в структуру молекулы Ps-LTP1. Таким образом, нами был разработан биотехнологический способ получения липид-транспортующего белка гороха, тотально меченного стабильными изотопами ^{13}C и ^{15}N и идентичного природному Ps-LTP1 в условиях SDS-электрофореза, ОФ-ВЭЖХ и КД-спектроскопии. Разработанная в рамках данной работы методика позволяет получать ^{13}C , ^{15}N -меченый Ps-LTP1 с выходом не менее 2,5 мг/л культуры.

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-транспортующих 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. Пространственная структура основного конформера включает 5 α -спиральных участков: H1 (Cys4-Gln19), H2 (Pro29-Ala40), H3 (Pro45-Ser60), H4 (Thr66-Cys76) и поворот 3_{10} -спирали H5 (Cys90-Thr92) (рис. 7). Данная структура была депонирована в базу данных PDB [Protein Data Bank, код доступа: 2N81].

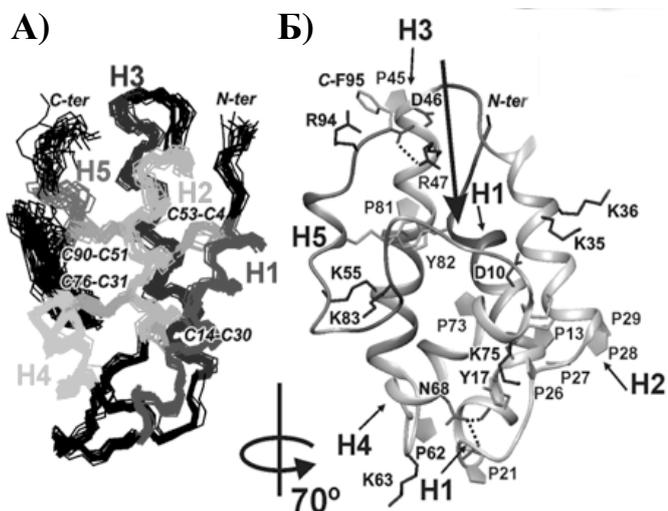


Рис. 7. Пространственная структура Ps-LTP1 в водном растворе. А) Наложение 20 рассчитанных пространственных структур. Заметны участки, где структуры наиболее гетерогенны. Отображены α -спирали (H1-H5) и положение дисульфидных связей. Б) Ленточное представление пространственной структуры Ps-LTP1: отображены α -спирали (H1-H5), боковые радикалы 10 остатков пролина, а также заряженных аминокислотных остатков. Стрелкой показан вход в гидрофобную полость

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 Å³. Молекула Ps-LTP1 имеет намного больший объем свободной от лигандов гидрофобной полости, который составляет ~1000 ± 300 Å³. Такой большой объем гидрофобной полости является достаточным для связывания двухцепочечных липидов (~1100 Å³) и характерен для структур LTP1, связанных с лигандом (650-1350 Å³).

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

4. Изучение биологической активности нового липид-транспортирующего белка гороха *Pisum sativum*

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 (ЖК) входят в состав жиров, масел и восков, выполняющих защитную функцию, и их производные могут выступать в роли фитогормонов (например, жасмоновая кислота).

Способность липид-транспортирующего белка гороха связывать и осуществлять транспорт различных липидных молекул была показана с помощью метода флуоресцентной спектроскопии с использованием флуоресцентного зонда – 2-п-толуидинилнафталин-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. 8А). 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.

Было установлено, что линолевая (C18:2 (с9,12)) и линоленовая (C18:3 (с9,12,15)) 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 ~600 Å³) обладает бóльшим сродством к ненасыщенным ЖК, в то время как Ag-LTP укропа (объем гидрофобной полости ~800 Å³)

характеризуется отсутствием выраженной специфичности при связывании липидов, что может быть обусловлено большим объемом гидрофобной полости у Ag-LTP. Пространственная структура Ps-LTP1 характеризуется наличием гидрофобной полости ещё большего объема (~1000 Å³), 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 ~15%.

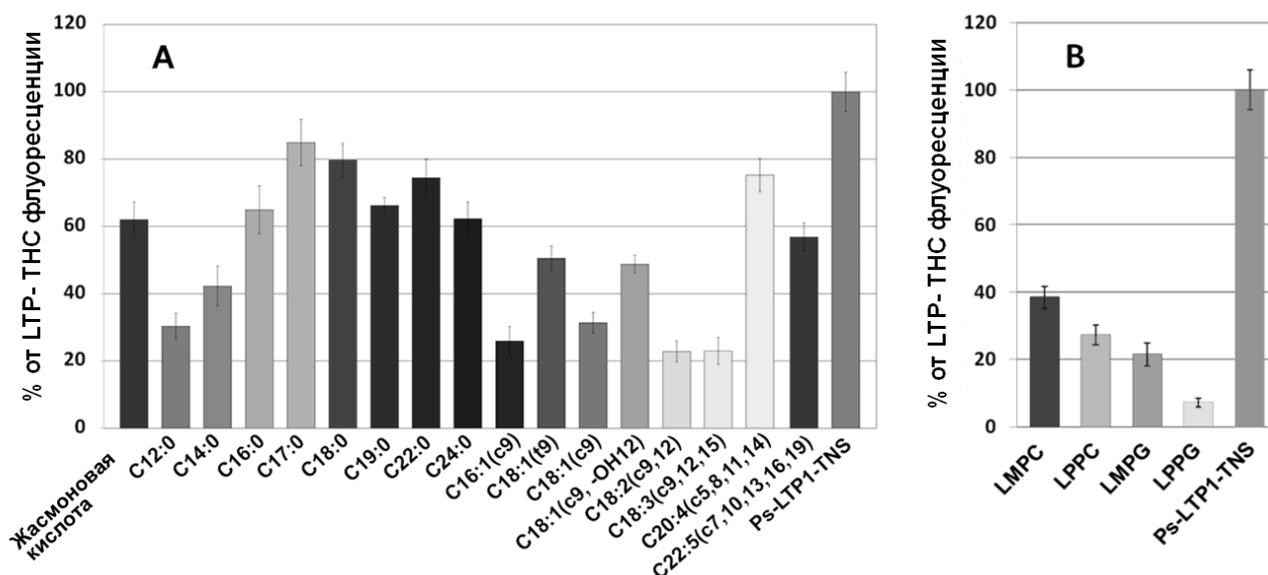


Рис. 8. Влияние ЖК (А) и лизолипидов (Б) на образование комплексов LTP с ТНС.

Несмотря на небольшие размеры молекулы жасмоновой кислоты – растительного гормона, участвующего в регуляции роста и развития растения, вытеснение ТНС этим соединением происходит с достаточно низкой эффективностью, что проявляется в снижении исходного уровня флуоресценции до 62%. Данное значение является самым низким по сравнению со снижением уровня флуоресценции, наблюдаемым в экспериментах с другими LTP, для которых ранее было проведено подобное исследование. По-видимому, реализация биологических функций Ps-LTP1 не связана с взаимодействием белка 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. 8Б).

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. 9А). 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.

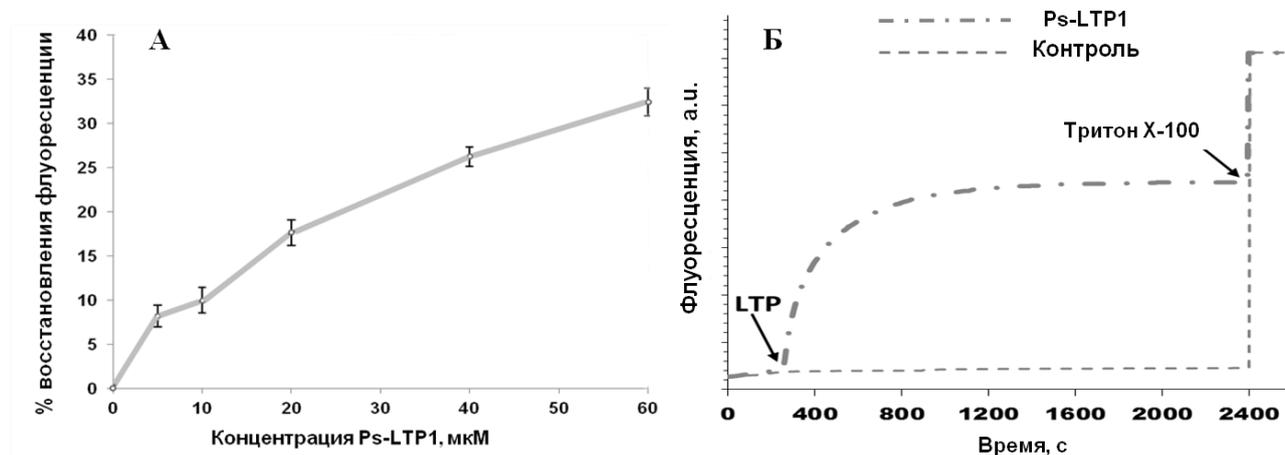


Рис. 9. Исследование способности Ps-LTP1 разрушать искусственные липосомы (А) и транспортировать липиды между модельными липосомами *in vitro* (Б).

LTP растений не только связывают липиды, но и осуществляют их транспорт между мембранами в опытах *in vitro*. 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 флуоресцентного 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. 9Б). Показано, что Ps-LTP1 обладает способностью переносить липиды между липосомами, состоящими из POPC и DMPG.

Антимикробную активность Ps-LTP1 определяли в отношении штаммов фитопатогенных бактерий *Clavibacter michiganensis* VKM Ac-1144, *Agrobacterium tumefaciens* A281, *Pseudomonas syringae* VKMB-1546 и грибов *Alternaria alternata* VKM F-3047, *Aspergillus niger* VKM F-2259, *Aspergillus versicolor* VKM F-1114, *Fusarium oxysporum* ТСХА-4, *Fusarium solani* VKM F-142 и *Neurospora crassa* VKM F-184, являющихся причиной развития различных заболеваний растений. Показано, что Ps-LTP1 обладает антимикробной активностью в отношении большинства фитопатогенных тест-культур (табл. 1).

Наиболее чувствительными к Ps-LTP1 штаммами фитопатогенных грибов оказались представители рода *Fusarium*, являющиеся возбудителями различных корневых гнилей и трахеомикозных (сосудистых) увяданий культурных растений (рис. 10). Известно, что некоторые сорта гороха посевного обладают выраженной устойчивостью к заболеваниям, вызываемым грибами рода *Fusarium*. Установлено, что Ps-LTP1

ингибирует прорастание спор и удлинение гиф фитопатогенных грибов, однако не влияет на морфологию грибов, как это было показано ранее для некоторых растительных LTP.

Таблица 1. Антимикробная активность Ps-LTP1

Фитопатогенные микроорганизмы	IC ₅₀ , мкМ
Бактерии	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	>40
<i>Clavibacter michiganensis</i>	>40
<i>Pseudomonas syringae</i>	>40
Грибы	
<i>Alternaria alternata</i>	на*
<i>Aspergillus niger</i>	40
<i>Aspergillus versicolor</i>	на*
<i>Fusarium oxysporum</i>	20-40
<i>Fusarium solani</i>	10-20
<i>Neurospora crassa</i>	40

*на - не активен

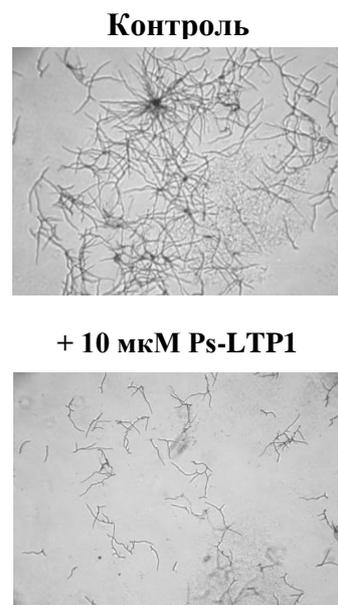


Рис. 10. Влияние рекомбинантного Ps-LTP1 на рост *Fusarium solani*.

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 POPG. Интересно отметить, что Ps-LTP1 нарушает целостность липосом, сформированных из POPG, 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 больший отрицательный заряд.

5. Аллергенные свойства Ps-LTP1

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.

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 WHO/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 Lep с 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 сенсибилизацию 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. Устойчивость к расщеплению в ЖКТ была показана методом моделирования пищеварения путём обработки Ps-LTP1 пищеварительными ферментами (рис. 11). 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).

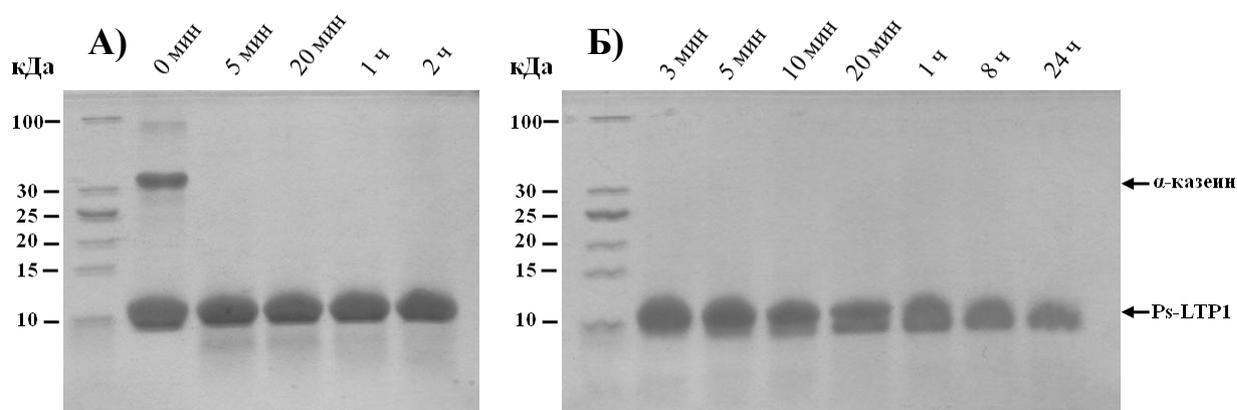


Рис. 11. Моделирование расщепления Ps-LTP1 в желудочно-кишечном тракте под действием пищеварительных ферментов: (А) пепсина, (Б) трипсина и химотрипсина.

LTP1 составляют один из наиболее клинически значимых классов перекрестно-реагирующих аллергенов. Сравнительное изучение связывания кроличьих поликлональных антител класса IgG к аллергену чечевицы Lep с 3 с рекомбинантным Ps-LTP1, аллергеном персика Pru p 3, а также, в качестве положительного контроля, с аллергеном чечевицы Lep с 3 было проведено методами иммуноблоттинга (рис. 12) и иммуноферментного анализа (рис. 13). В результате было показано, что антитела к Lep с 3 связываются с различной эффективностью со всеми тремя белками. Причиной перекрестной реактивности антител IgG кролика может являться наличие в аминокислотных последовательностях данных белков высоко консервативных участков, выступающих в роли В-клеточных эпитопов.

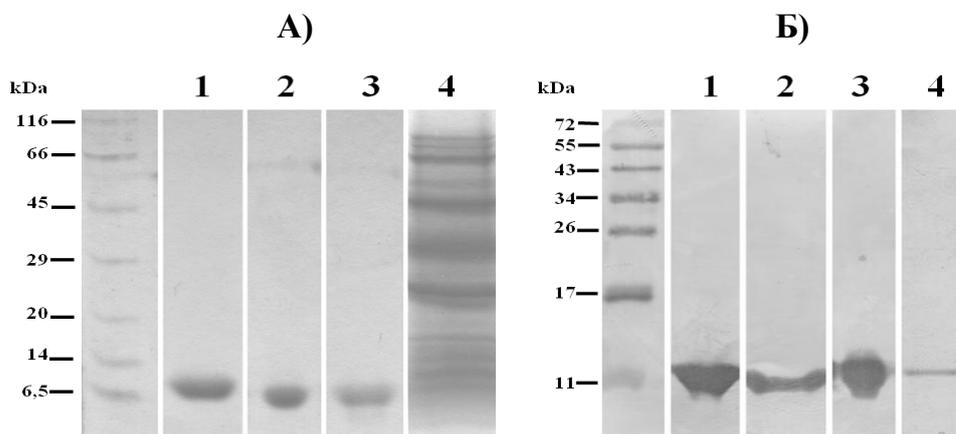


Рис. 12. Электрофореграмма (А) и иммунохимический анализ (Б) рекомбинантных липид-транспортирующих белков. Детекцию белков проводили, используя поликлональные кроличьи антитела к Len с 3. М – смесь белков-стандартов молекулярных масс; 1,2,3 – рекомбинантные Len с 3, Pru p 3 и Ps-LTP1 в присутствии ВМЕ, соответственно, 4 – суммарный экстракт гороха в присутствии ВМЕ.

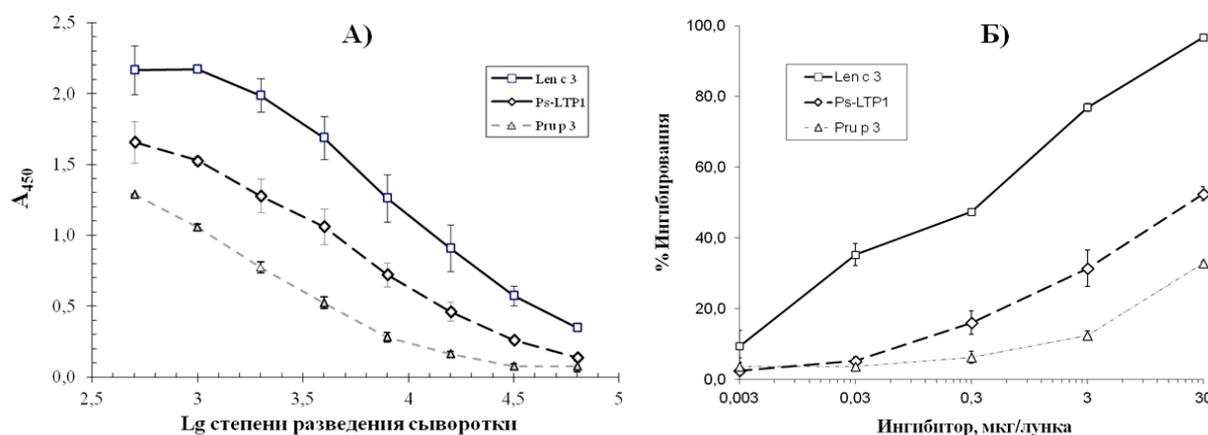


Рис. 13. А) Иммуноферментный анализ с использованием поликлональных кроличьих антител к Len с 3. Б) Ингибирование рекомбинантным Ps-LTP1 и аллергеном Pru p 3 связывания аллергена чечевицы с кроличьими антителами к Len с 3.

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. 14). Анализ полученных данных позволил прийти к выводу о том, что Ps-LTP1 гороха является перекрёстным пищевым аллергеном, имеющим наибольшее сходство с пищевыми аллергенами бобовых (Len с 3 чечевицы, Ara h 9 арахиса, Pva v 3 фасоли), а также с 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 тем, обнаруженный нами Ps-LTP1 является третьим после вицилина и конвицилина пищевым аллергеном гороха посевного *Pisum sativum*.

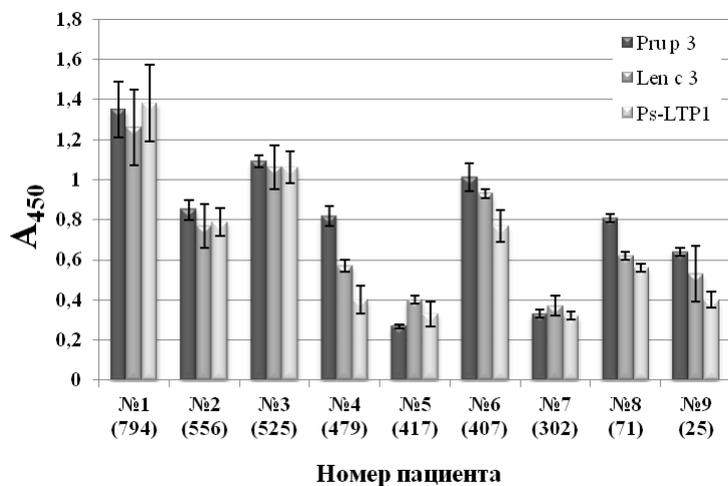


Рис. 14. Иммуноферментный анализ с использованием сывороток пациентов с пищевой аллергией (разведение 1:2). В скобках под номерами сывороток указано значение общего уровня IgE (kU/L).

Сходная IgE-реактивность может быть обусловлена наличием гомологичных IgE-

связывающих участков на поверхностях этих аллергенов. Главный конформационный эпитоп Pru p 3 (Asn35-Ala46/Ser76-Tyr79) содержит три ключевые аминокислоты (Arg39, Thr40 и Arg44), непосредственно участвующие в связывании с IgE. 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 белках. Необходимо отметить, что у аллергена пшеницы Tri a 14 гомологичный участок также является IgE-связывающим эпитопом. 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. 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.

6. Структурно-функциональная характеристика новых изоформ аллергена чечевицы Len s 3

Ранее в проросших семенах чечевицы *Lens culinaris* было обнаружено подсемейство из восьми изоформ липид-транспортирующего белка (Lc-LTP1-8). Свойства одной из них, а именно Lc-LTP2, были детально изучены. Данный белок обладает антимикробной активностью и способностью связывать липиды, а также является перекрестно-реагирующим пищевым аллергеном, способным связываться со специфическими IgE к основному аллергену персика Pru p 3, и зарегистрированным в базе данных аллергенов

IUIS под аббревиатурой Len с 3. Ранее в УИЦ ИБХ РАН было показано, что биосинтез изоформ Lc-LTP2,4,7,8 происходит на ранней стадии развития проростков семян чечевицы. Возможно, экспрессия этих белков обусловлена их участием в защите от патогенов и/или транспорте липидов при переходе растения в фазу активного метаболизма при прорастании семян. Биологическая роль изоформ Lc-LTP1,3,5,6 пока остается невыясненной. В качестве объектов исследований нами были выбраны изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, степень гомологии которых с аминокислотной последовательностью Lc-LTP2 является наименьшей по сравнению с другими изоформами (72% и 77%, соответственно).

Из литературных источников известно, что даже близкие по структуре изоформы липид-транспортующих белков, выделенные из одного растения, обладают различной антимикробной активностью. На первом этапе изучения функциональных свойств изоформ LTP чечевицы проводилось сравнительное исследование их антимикробной активности. Было показано, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, обладают противогрибковой и слабовыраженной антибактериальной активностью и практически не различаются между собой по специфичности антимикробного действия (табл. 2). Было установлено, что наиболее чувствительной культурой для всех трех изоформ LTP чечевицы является возбудитель черной гнили растений *Aspergillus niger*. Показано, что рекомбинантные изоформы LTP чечевицы, как и Ps-LTP1, ингибируют прорастание спор фитопатогенных грибов, рост и развитие мицелия, но не влияют на морфологию гиф. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в уровне антимикробной активности трёх изоформ LTP чечевицы, несмотря на существенную разницу в первичной структуре и кислотно-основных свойствах данных белков. На основании этого было высказано предположение, что не только неспецифическое электростатическое взаимодействие LTP с мембраной имеет значение для проявления антимикробного эффекта.

Таблица 2. Антимикробная активность рекомбинантных изоформ LTP чечевицы.

Фитопатогенные микроорганизмы	IC ₅₀ , мкМ/л		
	Lc-LTP1	Lc-LTP2	Lc-LTP3
Бактерии			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	н.о.*	20-40	н.о.
<i>Clavibacter michiganensis</i>	40	н.о.	>40
<i>Pseudomonas syringae</i>	>40	н.о.	>40
Грибы			
<i>Aspergillus niger</i>	5-10	10	10
<i>Alternaria alternata</i>	40	>40	40
<i>Botrytis cinerea</i>	20-40	10-20	>40
<i>Fusarium solani</i>	20-40	>40	40
<i>Neurospora crassa</i>	40	20-40	20-40

*н.о. – не определялась.

Для проведения исследований по сравнению эффективности связывания жирных кислот тремя изоформами LTP чечевицы была выбрана стеариновая кислота (СК), связывание с которой было показано ранее для ряда представителей подкласса LTP1 (рис. 15). Установлено, что все три изоформы обладают способностью связывать СК. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в эффективности связывания СК

тремя белками, что согласуется со сходством размеров гидрофобных впадин данных изоформ LTP чечевицы.

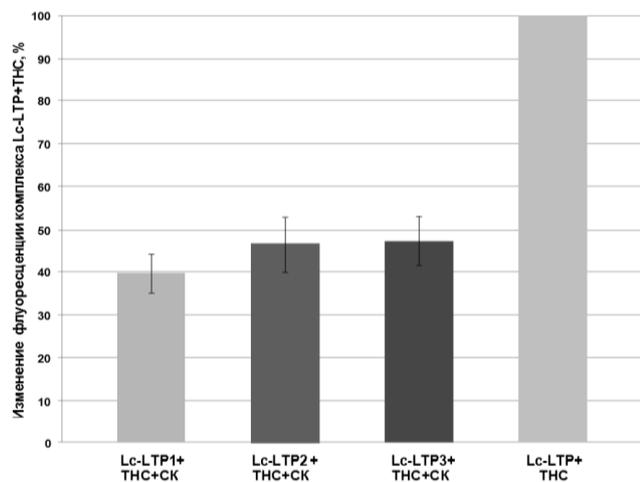


Рис. 15. Изменение флуоресценции комплексов THC с рекомбинантными LTP в присутствии стеариновой кислоты (СК). Lc-LTP соответствует каждой из трёх изоформ.

Ранее было выявлено связывание Len с 3 со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими сходные эпитопы основного аллергена персика Pru p 3, что

может являться причиной развития перекрёстных аллергических реакций. В аминокислотных последовательностях исследуемых изоформ LTP чечевицы также присутствуют остатки, входящие в состав конформационного эпитопа Pru p 3 (Asn36, Arg40, Thr41, Asp44, Arg45, Ala47, Pro80 и Tyr81), что дает основание предполагать наличие свойств аллергенов у обеих изоформ LTP чечевицы. Кроме того, природные изоформы аллергенов со сниженной IgE-иммунореактивностью могут быть использованы в качестве более безопасных средств для аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). В связи с этим было проведено сравнительное изучение иммунологических свойств всех трёх изоформ LTP чечевицы и основного аллергена персика Pru p 3. Сравнительное исследование связывания трёх изоформ LTP чечевицы и Pru p 3 персика с кроличьими поликлональными IgG антителами к Lc-LTP2 было проведено методами иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа. Было показано, что поликлональные кроличьи антитела к Lc-LTP2 связываются со всеми тремя изоформами LTP чечевицы и с Pru p 3 персика. С наибольшей эффективностью эти 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%). Полученные результаты свидетельствовали о сходстве иммунологических свойств всех исследованных LTP.

Наличие специфических IgE к липид-транспортирующим белкам в сыворотках пациентов с пищевой аллергией на фрукты, орехи и бобовые было установлено с помощью иммуноферментного анализа (рис. 16А). Было показано связывание всех трёх изоформ LTP чечевицы со специфическими IgE, но их иммунореактивность 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 ниже, чем у остальных двух изоформ. Это свидетельствует в пользу того, 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 является то, что в его структуре присутствует меньшее, чем в других LTP

чечевицы, число аминокислотных остатков (7 из 13), составляющих конформационный эпитоп Pru p 3 персика.

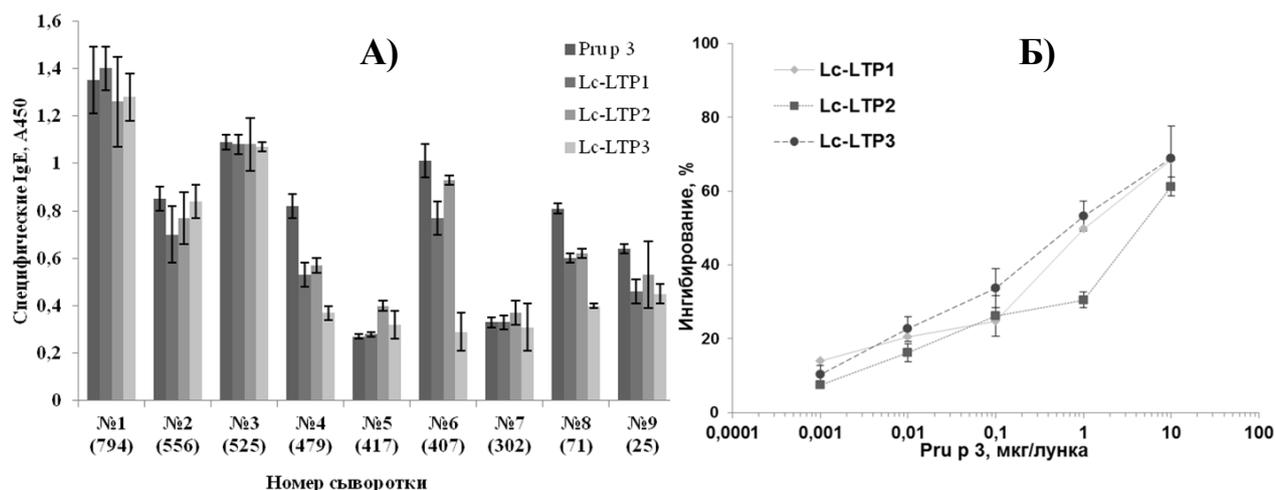


Рис. 16. А) Иммуноферментный анализ с использованием сывороток пациентов с пищевой аллергией (разведение 1:2). В скобках под номерами сывороток указано значение уровня общего IgE (кU/L). Б) Ингибирование рекомбинантным Pru p 3 связывания LTP чечевицы со специфическими IgE из сыворотки пациента №7 с пищевой аллергией.

Перекрестная реактивность рекомбинантных изоформ LTP чечевицы была исследована с помощью иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного Pru p 3 в качестве ингибитора связывания с IgE (рис. 16Б). Ингибирование связывания с IgE наблюдалось в случае всех трёх изоформ LTP чечевицы. Полученные результаты свидетельствуют в пользу сходства эпитопов исследованных изоформ LTP чечевицы и основного аллергена персика Pru p 3.

Выводы

1. В семенах гороха *Pisum sativum* L. обнаружено подсемейство из трёх новых липид-транспортующих белков, названных Ps-LTP1-3. Установлены структуры кДНК, кодирующих белки-предшественники трёх LTP и соответствующие им полные аминокислотные последовательности. На основании профилей дифференциальной экспрессии генов данных белков высказаны предположения о возможных биологических функциях 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 ¹³C, ¹⁵N-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. Установлено, что липид-транспортирующий белок Ps-LTP1 является третьим пищевым аллергеном гороха *Pisum sativum*. Ps-LTP1 внесён в международную базу данных по аллергенам WHO/IUIS под аббревиатурой Pis s 3. Показано, что 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 чечевицы 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 s 3, способны связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, однако IgE-иммунореактивность у Lc-LTP3 ниже, чем у Lc-LTP1 и Len s 3.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи:

- 1) **Ivan V. Bogdanov**, Zakhar O. Shenkarev, Ekaterina I. Finkina, Daria N. Melnikova, Eugene I. Rumynskiy, Alexander S. Arseniev, Tatiana V. Ovchinnikova. A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties // *BMC plant biology* – **2016**. – V. 16. – No. 1(107).DOI 10.1186/s12870-016-0792-6.
- 2) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Баландин С.В., Мельникова Д.Н., Стукачева Е.А., Овчинникова Т.В. Структурно-функциональная характеристика рекомбинантных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы // *Acta Naturae* – **2015**. – Том 7. – Вып. 3. – № 26. – С. 72–81.
- 3) Albina K. Gizatullina, Ekaterina I. Finkina, Konstantin S. Mineev, Daria N. Melnikova, **Ivan V. Bogdanov**, Irina N. Telezhinskaya, Sergey V. Balandin, Zakhar O. Shenkarev, Alexander S. Arseniev, Tatiana V. Ovchinnikova. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – **2013**. – V. 439. - No. 4. - P. 427–432.
- 4) Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., **Богданов И.В.**, Овчинникова Т.В. Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов: структура, функции и практическое применение // *Acta Naturae* – **2016**. – Том 8. – Вып. 2. – № 29. – С. 53–69.

Патенты:

- 5) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Аллерген гороха Pis s 3 для диагностики и терапии пищевой аллергии и способ его выделения из природного сырья // Заявка на патент РФ №2016129502 (045848) от 19.07.2016.
- 6) **Богданов И.В.**, Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Плазмидный вектор pET-pPsLTP, штамм бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)Star/pET-pPsLTP – продуцент пищевого аллергена гороха Pis s 3 и способ получения указанного аллергена // Заявка на патент РФ №2016129503 (045849) от 19.07.2016.

Тезисы докладов:

- 7) Finkina E.I., Melnikova D.N., **Bogdanov I.V.**, Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Study of molecular and immunological features of novel plant lipid transfer proteins // The FEBS Journal. Abstract of the 38th FEBS Congress. Saint Petersburg, Russia, July 6-11, **2013**, p.133. DOI 10.1111/febs.12340.
- 8) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Овчинникова Т.В. Новый липид-транспортирующий белок из гороха *Pisum sativum*. // *Acta Naturae*. – Москва. – **2014**. – Спецвыпуск № 1. – С. 57-58.
- 9) **Богданов И.В.**, Овчинникова Т.В. Новый липид-транспортирующий белок из семян гороха *Pisum sativum* L. как пищевой аллерген // *Acta Naturae*. – Сочи. – **2016**. – Спецвыпуск. – том № 2. – С. 167.
- 10) Мельникова Д.Н., **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Овчинникова Т.В. Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов // *Acta Naturae*. – Сочи. – **2016**. – Спецвыпуск. – том № 1. – С. 215.
- 11) Финкина Е.И., **Богданов И.В.**, Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Получение ¹⁵N-меченного рекомбинантного липид-транспортирующего белка чечевицы // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 7-10 февраля **2011**. – С. 169.
- 12) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Баландин С.В., Рыбалко А.Е., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения totally меченного стабильными изотопами липид-транспортирующего белка чечевицы // Труды Шестого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 21-25 марта **2011**. – Т.1. – С. 232-233.
- 13) Гизатуллина А.К., **Богданов И.В.**, Минеев К.С., Шенкарев З.О., Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. Получение и исследование пространственной структуры рекомбинантных липид-транспортирующих белков чечевицы // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «Х тения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» – Москва, 14-17 ноября **2011**. – С. 15.
- 14) Гизатуллина А.К., **Богданов И.В.**, Минеев К.С., Шенкарев З.О., Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. Пространственная структура рекомбинантного липид-транспортирующего белка из семян чечевицы *Lens culinaris* // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXIV зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 7-9 февраля **2012**. – С. 34.
- 15) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Баландин С.В., Стукачева Е.А., Овчинникова Т.В. Получение и характеристика рекомбинантных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы // Труды международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – Москва, 20-22 марта **2012**. – С. 34-35.
- 16) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Стукачева Е.А., Овчинникова Т.В. Поиск новых растительных аллергенов класса LTP // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXV зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 11-15 февраля **2013**. – С. 53.
- 17) **Богданов И.В.**, Финкина Е.И., Стукачева Е.А., Овчинникова Т.В. Выделение и структурная характеристика новых растительных аллергенов // Труды Седьмого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 19-22 марта **2013**. – Т.1. – С. 175-176.
- 18) Финкина Е.И., Ланина П.А., **Богданов И.В.**, Мельникова Д.Н., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Биотехнологическое получение рекомбинантного липид-транспортирующего белка чечевицы и его меченных стабильными изотопами аналогов // Труды Седьмого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 19-22 марта **2013**. – Т.1. – С. 382-383.
- 19) **Богданов И.В.**, Еремян А.А., Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения и характеристика основного аллергена персика // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXVI зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 10-14 февраля **2014**. – С. 76.
- 20) Гизатуллина А.К., Минеев К.С., **Богданов И.В.**, Шенкарев З.О., Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. Исследование структуры липид-транспортирующего белка Lc-LTP2 из семян чечевицы *Lens culinaris* в комплексе с молекулами лизолипида LPPG методами ЯМР-спектроскопии // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXVI зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 10-14 февраля **2014**. – С. 9.

- 21) **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Получение и исследование новых растительных аллергенов класса LTP // Труды международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». – Москва, 18-20 марта **2014**. – С. 209.
- 22) **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Овчинникова Т.В. Изучение нового липид-транспортирующего белка гороха Ps-LTP1 // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXVII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 9-12 февраля **2015**. – С. 57.
- 23) Фипкина Е.И., **Богданов И.В.**, Стукачева Е.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Гетерологичная экспрессия и исследование свойств изоформ аллергена чечевицы Len с 3 // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXVII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 9-12 февраля 2015. – С. 68.
- 24) **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Исследование функциональной активности липид-транспортирующего белка гороха посевного *Pisum sativum* L // Труды V международной конференции ФизТехБио. – Долгопрудный, 29-30 апреля **2015**. – С. 59-60.
- 25) Мельникова Д.Н., Минеев К.С., Рычкова М.Е., Фипкина Е.И., **Богданов И.В.**, Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. Исследование структурно-функциональных и иммунологических свойств липид-транспортирующего белка укропа // Труды Восьмого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 17-20 марта **2015**. – Т.1. – С. 156-158.
- 26) **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Овчинникова Т.В. Структурно-функциональные и иммунологические свойства нового липид-транспортирующего белка гороха *Pisum sativum* L // Тезисы устных докладов участников Восьмого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 17-20 марта **2015**. – Т.1. – С. 128-130.
- 27) Фипкина Е.И., **Богданов И.В.**, Стукачева Е.А., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Сравнительное исследование свойств трех изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы // Труды Восьмого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 17-20 марта **2015**. – Т.1. – С. 178-180.
- 28) Мельникова Д.Н., **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Овчинникова Т.В. Новые растительные липид-транспортирующие белки // Тезисы устных докладов участников VII Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Новосибирск, 12-17 июля **2015**. – С. 169.
- 29) **Богданов И.В.**, Мельникова Д.Н., Фипкина Е.И., Овчинникова Т.В. Изучение структурно-функциональных свойств и иммунологическая характеристика нового липид-транспортирующего белка гороха // Труды VII Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Новосибирск, 12-17 июля **2015**. – С. 321.
- 30) **Богданов И.В.** Конструирование панели рекомбинантных аналогов клинически значимых растительных аллергенов с целью создания биочипа для компонентной алергодиагностики и алерговакцин для аллерген-специфической иммунотерапии // Тезисы устных докладов участников осеннего финала программы «У.М.Н.И.К.» РАН. – Москва, 13 ноября **2015**. – С. 51–52.
- 31) **Богданов И.В.**, Шенкарев З.О., Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., Румынский Е.И., Арсеньев А.С., Овчинникова Т.В. Исследование нового липид-транспортирующего белка гороха посевного *Pisum sativum* // Тезисы устных докладов участников XXVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 8-11 февраля **2016**. – С. 6.
- 32) **Богданов И.В.**, Зазыкина А.Д., Звездина Ю.К., Романова Т.В., Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения клинически значимых растительных аллергенов // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников XXVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 8-11 февраля **2016**. – С. 129.
- 33) Зазыкина А.Д., Звездина Ю.К., Пивоваров В.Д., Романова Т.В., **Богданов И.В.**, Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. Получение клинически значимых растительных аллергенов с целью создания биочипа для компонентной алергодиагностики // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов». – Москва, 15-17 марта **2016**. – С. 5-6, 122-123.
- 34) Фипкина Е.И., Мельникова Д.Н., **Богданов И.В.**, Овчинникова Т.В. Исследование растительных белков, связанных с патогенезом // Тезисы докладов и стендовых сообщений участников IV Российского симпозиума с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений». – Казань, 20-23 сентября **2016**. – С. 154.