

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

На правах рукописи

Опарин Петр Борисович

α -Гарпинины - защитные пептиды растений

02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Василевский А.А.

Москва – 2014

Оглавление

| | |
|---|----|
| Обзор литературы..... | 4 |
| Введение. Иммуитет растений | 4 |
| Антимикробные пептиды растений..... | 6 |
| Дефензины | 8 |
| Тионины | 11 |
| Гевеиноподобные пептиды | 15 |
| Липид-переносящие белки..... | 16 |
| Ноттиноподобные пептиды..... | 18 |
| Макроциклические пептиды (циклотиды)..... | 20 |
| Ингибиторы α -амилаз..... | 21 |
| Ноттиноподобные ИАА..... | 22 |
| ИАА дефензинового типа..... | 23 |
| Ингибиторы протеаз..... | 23 |
| Ингибиторы сериновых протеаз..... | 26 |
| ИП семейства Кунитца. | 29 |
| ИП семейства Баумана-Бирка (ББИ)..... | 30 |
| ИП семейства тыквенных (Squash)..... | 33 |
| ИП семейства горчичные (MSI – от англ. Mustard (Sinapis) trypsin inhibitor) | 33 |
| ИП картофеля типа I (PI 1) | 34 |
| ИП картофеля типа II (PI 2)..... | 35 |
| Фитоцистатины, растительные ингибиторы цистеиновых протеаз..... | 35 |
| Злаковые ингибиторы трипсина/ α -амилаз..... | 36 |
| Ингибиторы аспаргатных и металлопротеаз..... | 36 |

| | |
|---|----|
| Заключение..... | 37 |
| Материалы и методы..... | 39 |
| 1. Материалы..... | 39 |
| 2. Оборудование..... | 40 |
| 3. Программное обеспечение..... | 43 |
| 4. Методы..... | 44 |
| 1. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ).... | 44 |
| 2. Масс-спектрометрия..... | 45 |
| 3. Восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом..... | 45 |
| 4. Алкилирование тиольных групп 4-винилпиридином..... | 45 |
| 5. Определение N-концевой аминокислотной последовательности..... | 46 |
| 6. Селективный гидролиз полипептидов..... | 46 |
| 7. Определение концентрации полипептидов. УФ-спектрофотометрия..... | 47 |
| 8. Полимеразная цепная реакция..... | 47 |
| 9. Рестрикция линейных фрагментов ДНК и плазмиды рЕТ-32b..... | 48 |
| 10. Лигирование линейных фрагментов ДНК и лианеризованной плазмиды рЕТ-32b..... | 48 |
| 11. Электрофорез в агарозном геле..... | 48 |
| 12. Выделение ДНК из агарозного геля..... | 48 |
| 13. Трансформация <i>E. coli</i> методом электропорации..... | 49 |
| 14. Трансформация <i>E. coli</i> методом теплового шока..... | 49 |
| 15. Выделение плазмидной ДНК..... | 50 |
| 16. Секвенирование ДНК..... | 50 |
| 17. Контролируемая экспрессия гибридного белка в клетках <i>E. coli</i> | 50 |
| 18. Выделение растворимой фракции белков из клеток <i>E. coli</i> | 51 |
| 19. Аффинная хроматография..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 20. Ферментативный гидролиз гибридного белка с использованием энтеропептидазы ... | 51 |
| 21. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле | 51 |
| 22. Тестирование ингибирующей активности..... | 52 |
| 23. Приготовление липосом | 52 |
| 24. Тестирование способности пептидов к взаимодействию с липидными везикулами ... | 53 |
| 25. Измерение антифунгальной активности..... | 53 |
| Результаты и обсуждения | 54 |
| 1. Выделение и структурная характеристика ингибитора трипсина из семян гречихи..... | 54 |
| 2. Получение рекомбинантных аналогов пептидов в бактериальной системе..... | 58 |
| 3. Структурные исследования полученных пептидов..... | 63 |
| 4. Исследование биологической активности полученных пептидов..... | 69 |
| 5. Получение производных, структура, активность. | 72 |
| Выводы | 77 |
| Список использованной литературы | 78 |

Обзор литературы

Введение. Иммуитет растений

Находясь в самом основании пищевой цепи, растения являются богатым источником питательных веществ для большого разнообразия животных, паразитических растений, фитопатогенных грибов и бактерий. Находясь, таким образом, в условиях постоянного биотического стресса, растения были вынуждены выработать эффективную систему защиты от широкого спектра естественных врагов. Растения в отличие от животных не имеют системы адаптивного иммунитета, равно как и подвижных специализированных иммунных клеток. Вместо этого они полагаются на систему врожденного или первичного иммунитета, где все живые клетки организма вовлечены в процесс распознавания патогена или повреждения тканей и генерации системного ответа на разных уровнях. Врожденный иммунитет растений можно условно разделить на две составляющие: паттерн-инициируемый иммунитет (PTI, от англ. PAMP-triggered immunity) и эффектор-инициируемый иммунитет (ETI, от англ. effector-triggered immunity).

PTI зависит от распознавания консервативных молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами (PAMPs, от англ. Pathogen-Associated Molecular Patterns) ¹, в качестве которых могут выступать фрагменты хитина ², флагеллин ³, фактор трансляции EF-Tu ⁴ и пр., трансмембранными рецепторами, расположенными на поверхности клетки и дальнейшей передача сигнала. Эти рецепторы известны как паттернраспознающие рецепторы (ПРР) и представляют собой трансмембранные мультидоменные рецептор-подобные киназы (РПК) ⁵ или рецептор-подобные белки (РПБ) ⁶. РПК содержат внеклеточный домен с лейцин-богатым повтором (LRR, от англ. Leucine-Rich Repeat) или LysM домен ⁷, трансмембранный домен и внутриклеточный киназный домен. РПБ имеют только внеклеточный и трансмембранный домены ⁶. Также к ПРР относятся рецепторы, распознающие молекулярные паттерны ассоциированные с повреждениями (DAMPs – от англ. Damage-Associated Molecular Patterns), такие как фрагменты собственных полисахаридов и белков, выделяющиеся в результате разрушения клеточной стенки, защитных и структурных белков экстрацеллюлярными ферментами патогена ⁸. Связывание внеклеточными доменами ПРР консервативных паттернов приводит к активации рецепторов и индукции PTI, включающий

резкое повышение цитоплазматического кальция и выделение активных форм кислорода с последующим запуском кальций-зависимых и MAP киназ и развитию системного ответа^{9,10}. РТИ растений схож с врожденным иммунитетом животных, к примеру флагеллин распознается как PAMP посредством LRR домена рецептора FLS2 у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*)¹¹ и Toll-подобного рецептора TLR-5 у позвоночных¹². В то же время эти два рецептора распознают различные участки молекулы флагеллина¹³, что указывает на независимое происхождение этих защитных систем у растений и животных в результате конвергенции¹⁴.

ETI построен на распознавании присутствующих у определенных патогенов эффекторных белков цитоплазматическими иммунными рецепторами. В задачу внутриклеточных рецепторов входит распознавание специализированных факторов патогенов, направленных на блокирование или модуляцию активности защитной системы хозяина, разрушение внутриклеточных структур клетки-хозяина или построение собственных, например экстрагаусторального матрикса грибов¹⁵. Фитопатогенные бактерии в процессе инвазии внедряют в клетку 15-30 эффекторных белков, используя систему секреции третьего типа (TTSS, от англ. Type Three Secretion System)¹⁶. Бактериальные эффекторные белки направлены на подавление иммунного ответа клетки и часто мимикрируют под эукариотические регуляторные белки¹⁶⁻¹⁸. Мутантный штамм фитопатогена *Pseudomonas syringae* с дефектной TTSS не способный к переносу эффекторов вызывал гораздо более быстрый ответ в клетках бобов по сравнению с диким типом¹⁹. Наиболее успешным патогенам удастся эффективно подавлять РТИ при помощи эффекторов TTSS, что делает возможным распространение патогена внутри организма²⁰. Цитоплазматические иммунные рецепторы растений представляют собой растворимые мультидоменные белки с нуклеотид связывающими лейцинбогатыми повторами (NB-LRR, от англ. Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat)²¹. Такие же домены содержат NOD-подобные иммунные рецепторы млекопитающих¹⁴. Растительные NB-LRR имеют вариабильную N-концевую область. Самая большая группа NB-LRR рецепторов растений содержит TIR-домен на N-конце и в структурно-функциональном плане крайне схожа с TOLL рецептором *Drosophila* sp. и Toll-подобными рецепторами (TLR) млекопитающих. Другая группа NB-LRR растений содержит CC-домен (CC, от англ. Coiled-Coil) на N-конце²². Связывание

эффектора может происходить напрямую через LRR домен рецептора^{23,24} или опосредовано через белок-кофактор, связывающийся с N-концевым TIR- или CC-доменами²⁵⁻²⁷. ETI как правило приводит к усилению РТИ, усилению устойчивости и гиперчувствительному ответу и, как правило, клеточной смерти. Подобная система высоко эффективна против биотрофных, но не некротрофных патогенов, убивающих клетки хозяина в ходе колонизации организма²⁸. Узнавание патогена служит пусковым механизмом для индукции защитных реакций и активации экспрессии защитных генов.

В ответ на повреждение тканей и/или конститутивно растения тканеспецифичным образом синтезируют целый ряд соединений, направленных на противодействие фитопатогенам и растительноядным животным. К ним в первую очередь относятся т.н. вторичные метаболиты (фитоалексины и фитоантисипины) и вещества полипептидной природы. Защитные полипептиды, в свою очередь, подразделяются на две основные группы: белки с молекулярной массой свыше 10 кДа и пептиды – менее 10 кДа²⁹. Ниже будут рассмотрены основные группы защитных пептидов (ЗП) растений.

Антимикробные пептиды растений

Первым антимикробным пептидом (АМП) выделенным из эукариот был пуротионин выделенный из пшеницы Боллом в 1942 г (Balls AK, Hale WS, Harris TH (1942) A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem* 19:279–88). На протяжении последующих тридцати лет не было сообщений об обнаружении подобных пептидов, исследования АМП из различных растительных тканей стали распространяться лишь в последнее время³⁰. К настоящему времени десятки антимикробных пептидов выделены из растений, прежде всего из семян³¹⁻³⁴. Рассмотрение их участия в защите от патогенов помимо возможности детального изучения на их примере врожденного иммунитета также несет и интерес на почве поиска новых антимикробных агентов для культивации мультирезистентных растений³⁵. К сожалению растительные АМП не достаточно охарактеризованы, большое же количество существующей физико-химической и структурной информации еще предстоит систематизировать. За частую в базах данных посвященных эукариотическим АМП большую часть внимания уделяют животным и,

разумеется, человеческим пептидам. В то же время растительные АМП, будучи крупной, многообразной и, во многом, самостоятельной группой, зачастую остаются без внимания. Тем не менее, существуют базы данных непосредственно растительных АМП, в частности «The PhytAMP»³⁶ (<http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php>) направлена на их структурно-функциональные исследования и рассмотрение потенциального применения. Она содержит ~300 последовательностей АМП, вырабатываемых растениями таких семейств как *Amaranthaceae*³⁷, *Poaceae*³⁸, *Brassicaceae*³⁹, *Solanaceae*⁴⁰, *Fabaceae*⁴¹ и *Violaceae*⁴². 69% из них были секвенированы напрямую, остальные же были предсказаны исходя из геномных данных. АМП обладают рядом общих физико-химических свойств: небольшим размером молекул (~30-90 аминокислотных остатков (а.о.)), основным характером и амфифильностью структуры. Большинство выделенных из растений АМП относятся к цистеинбогатым пептидам, содержащих четное число консервативных остатков цистеина (2 – 10), которые образуют внутримолекулярные дисульфидные связи, обеспечивая высокую стабильность молекул пептидов. По сходству аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива и пространственной структуры различают несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки, гевеино- и ноттиноподобные пептиды, макроциклические пептиды (циклотиды), также можно выделить несколько небольших малоисследованных групп с уникальными структурными характеристиками, таких как снакины⁴³ и шеферины⁴⁴. Помимо цистеина крайне распространенной аминокислотой среди АМП также является глицин, до 98,5% всех АМП содержат хотя бы один его остаток. Большинство растительных АМП являются катионными и имеют заряд от 0 до +10. Сравнительно небольшое количество пространственных структур АМП было получено к настоящему времени, однако, имеющиеся данные вполне очевидно свидетельствуют об общности организации отдельных семейств АМП с представителями других ЗП растений и далеких по таксономии групп пептидов.

Набор АМП, образующихся в растениях в ответ на инфекцию, с одной стороны, видоспецифичен, с другой, зависит от типа патогена. АМП обладают широким спектром антибиотического действия и ингибируют рост фитопатогенов в микромолярных концентрациях. Примерно половина всех АМП проявляют антифунгальные свойства, еще 33% – антибактериальные, порядка 10% обладают противовирусной активностью.

Механизм действия АМП растений мало изучен. Считается, что первичной мишенью их действия, как и в случае АМП животных, является цитоплазматическая мембрана патогенов^{45,46}. Предложено несколько моделей взаимодействия АМП с плазматическими мембранами микроорганизмов. Ингибирующий эффект связывают с нарушением целостности мембран, образованием пор и/или действием на внутриклеточные мишени.

Дефензины

Дефензины были обнаружены у всех живых существ от бактерий до млекопитающих. Первые представители растительных дефензинов были выделены из эндоспермов пшеницы⁴⁷ и ячменя⁴⁸ и были изначально отнесены к тионинам в качестве подсемейства. Дефензины растений являются наиболее изученными среди прочих растительных АМП⁴⁹⁻⁵¹. Они обнаруживаются, главным образом, в периферических слоях клеток различных тканей и органов, включая листья, клубни, цветки, стручки и семена⁵², что является косвенным доказательством того, что в растениях дефензины выполняют защитные функции. С использованием ряда биоинформатических методов в геноме арабидопсиса выявлено более 300 дефензиноподобных последовательностей⁵³. Растительные дефензины – короткие (~45-55 а.о.), основные полипептиды, содержащие 8 остатков цистеина (10 в дефензинах из цветков растений семейства Solanaceae)⁵¹. Основным структурным элементом в молекулах дефензинов – цистеинстабилизированный альфа-бета-мотив (CS $\alpha\beta$), состоящий из трех β -тяжей и одной параллельной им α -спирали, стабилизированных за счет четырех дисульфидных связей⁵⁴. Сходной структурой обладают также дефензины насекомых⁵¹ и многие нейротоксины скорпионов⁵⁵ (рисунок 1).

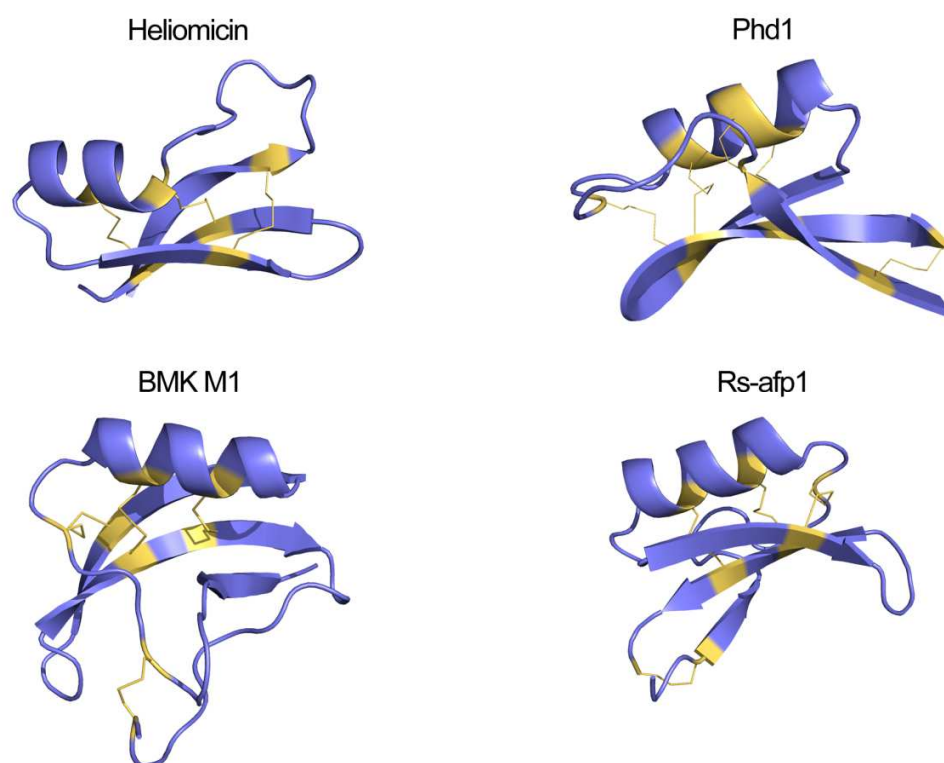


Рисунок 1. Пространственные структуры пептидов дефензинового типа. Heliomicin из бабочки-совки *Heliothis virescens*⁵⁶, растительные дефензины Phd1 из *Petunia Hybrida*⁵⁷ и Rs-afp1 из *Raphanus sativus*⁵⁸, нейротоксин BMK M1 из яда скорпиона *Mesobuthus martensii*⁵⁹. Желтым цветом показаны остатки цистеина.

У дефензинов выявлен целый спектр биологических активностей. Так показано, что дефензины ячменя и других злаков ингибируют трансляцию в бесклеточной системе⁴⁸. Некоторые дефензины обладают свойствами ингибиторов ферментов – α -амилаз и протеаз, считается, что такие дефензины участвуют в защите от насекомых-вредителей^{60,61}. Большинство исследованных дефензинов обладают антимикробной активностью – противогрибковой и антибактериальной. Первыми дефензинами, для которых была показана противогрибковая активность, были пептиды семян редьки Rs-AFP1 и Rs-AFP2³⁵. При проращении семян эти пептиды выделяются в окружающую среду, защищая проросток от заражения грибами. По действию на грибы дефензины подразделяют на две группы. Так называемые морфогенные растительные дефензины ингибируют удлинение гиф и увеличивают их ветвление, в то время как неморфогенные только ингибируют рост гиф, но не вызывают существенных морфологических нарушений³¹⁶². Активность дефензинов

зависит как от вида гриба, так и от характера конкретного дефензина, вырабатываемого в ответ на атаку патогена. Механизм действия противогрибковых дефензинов изучен мало, имеющиеся данные касаются лишь нескольких представителей семейства. Лучше всего изучены в этом плане дефензины редьки RsAFP и георгина DmAMP1, для которых идентифицированы специфические центры связывания на плазматической мембране грибов – сложные сфинголипиды (кислые маннозилдиинозитолфосфорилцерамиды для DmAMP1 и нейтральные глюкозилцерамиды для RsAFP2) ⁶³. Получены данные о том, что RsAFP2 индуцирует образование активных форм кислорода и вызывает апоптоз клеток дрожжей *Candida albicans* ⁶⁴. Исследования механизма действия дефензина гороха Psd1 показали, что он взаимодействует с циклином F, участвующим в регуляции клеточного цикла у *Neurospora crassa* ⁶⁵. Изучение взаимодействия растительного дефензина NaD1 цветков *Nicotiana glauca* с грибом *Fusarium oxysporum* с использованием флуоресцентных методов показало, что дефензин проникает в гифы гриба и аккумулируется в цитоплазме, вызывая гибель клеток. По всей видимости, он действует на некие внутриклеточные мишени ⁶⁶. Для дефензина люцерны MsDef1 показано, что он блокирует Ca²⁺ каналы клеток млекопитающих, и, возможно, аналогичным образом действует на грибы ⁶⁷. В подтверждение этой гипотезы стоит заметить, что Ca²⁺ в грибах является весьма важным регуляторным компонентом, участвуя в прорастании спор и росте гиф ⁶⁸. Процесс элонгации гиф контролируется градиентом Ca²⁺ на их концах, создаваемого селективными Ca²⁺ каналами ⁶⁹. Нарушение градиента Ca²⁺ приводит к морфологическим нарушениям ⁶⁸ сходным с теми, что наблюдаются в присутствии пептида MsDef1, подобным же эффектом обладают и известные блокаторы Ca²⁺ каналов, такие как лантан и ЭДТА ⁶⁸. Способность ингибировать Na⁺ каналы выявлена у дефензина кукурузы ⁷⁰. Дефензины также способны подавлять синтез белка в бесклеточной системе ⁴⁸.

Некоторые растительные дефензины обладают бактерицидной активностью. Например, дефензин Ct-AMP1 из клитории тройчатой *Clitoria ternatea* активен против *Bacillus subtilis* ⁶², дефензины из клубней картофеля и листьев шпината ⁷¹ ингибируют *Pseudomonas solanacearum* и *Clavibacter michiganense*, а дефензин пшеницы TAD1 действует на *Pseudomonas cichorii* ⁷². Механизм действия растительных дефензинов на бактерии остается невыясненным.

Кроме того, было также показано участие дефензинов в ответе на абиотический стресс^{72,73}, в процессах развития растения⁷⁴, для некоторых из них было показано токсическое действие на клетки животных и растений^{75–77}.

Тионины

Тионины – это семейство АМП небольшого размера (~45 а.о.), достаточно распространенное в царстве растений. Первоначально тионины были выделены из злаковых, но к настоящему времени обнаружено ~100 последовательностей генов тионинов в 15 видах растений⁷⁸.

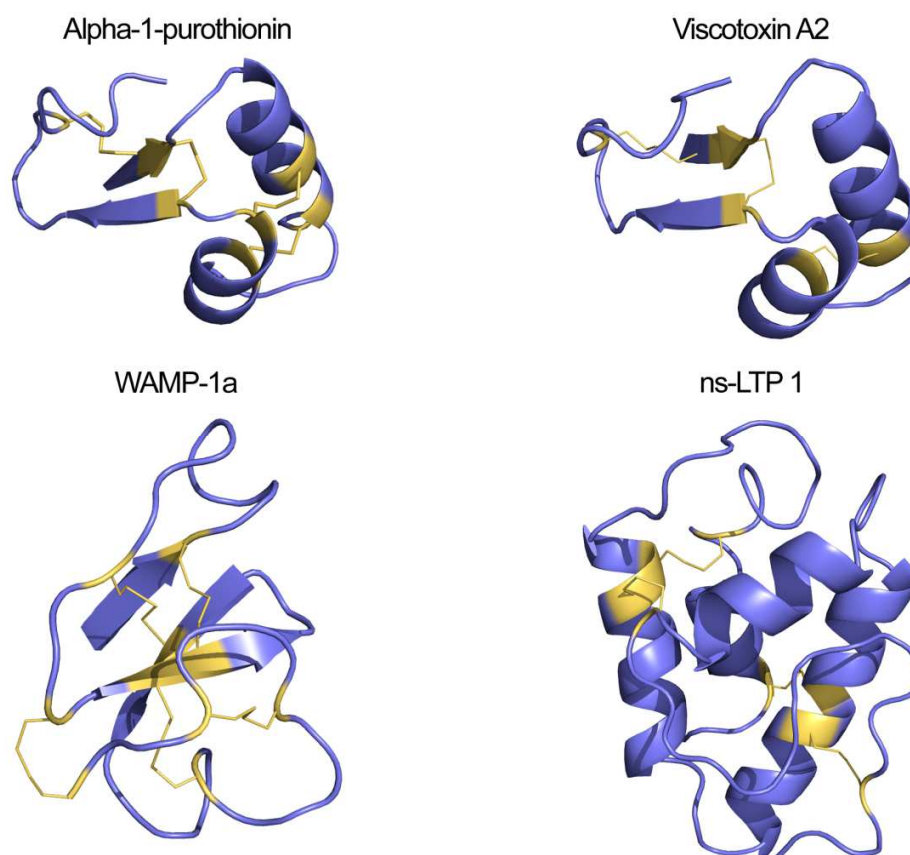


Рисунок 2. Пространственные структуры ЗП растений семейств тионинов, ЛПБ и гевеиноподобных. Alpha-1-purothionin из *Triticum aestivum*⁷⁹, Viscotoxin A2 из *Viscum album*, гевеиноподобный пептид WAMP-1a из *Triticum kiharae*⁸⁰, неспецифический ЛПБ первого подсемейства ЛПБ ns-LTP 1 из *Zea mays*⁸¹. Желтым цветом показаны остатки цистеина.

На основании первичной структуры тионины подразделяются на пять классов (I-V) ⁸². Тионины классов I, II и IV содержат по четыре дисульфидные связи, класса III и V – по три. Тионины класса I ⁸³ являются наиболее высокоосновными и не содержат кислотных а.о., к ним в частности относится первый описанный тионин – пуротионин из эндосперма пшеницы. Тионины класса II менее основны, были выделены из листьев и орехов *Pyralia pubera* и листьев ячменя *Hordeum vulgare* ^{84,85}. Класс III включает виско- и фотатоксины ⁸⁶⁻⁸⁸ из семейства Loganthaceae. Тионины класса IV – нейтральны и содержат мало заряженных а.о. К классу IV относят крамбин из абиссинской капусты *Crambe hispanica* ^{89,90}. Класс V довольно сильно отличается от остальных тионинов, второй и восьмой цистеины в его составе утрачены за счет точечной мутации и делеции соответственно. В результате разрушения первого и второго дисульфидных мостов стало возможным образование новой связи между вакантными остатками цистеина. Эти тионины нейтральны и обнаружены в зародышах пшеницы и эгилопса ^{91,92} (рисунок 2).

Пространственная структура тионинов хорошо изучена. Было показано, что, несмотря на различия в первичной структуре, тионины имеют достаточно близкую пространственную организацию. Их Г-образные амфипатические молекулы имеют жесткую структуру. Длинное плечо образовано двумя антипараллельными α -спиралями, а короткое – β -листом, состоящим из двух антипараллельных β -тяжей. Гидрофобные остатки сконцентрированы на внешней поверхности длинного плеча, в то время как гидрофильные остатки, главным образом, находятся на внутренней поверхности короткого плеча и внешней поверхности угла между плечами ⁹³.

Основной функциональной характеристикой тионинов является широкий спектр противогрибковой и антибактериальной активности *in vitro* ⁹⁴. Исследования показали, что спектр антимикробной активности тионинов включает разнообразные фитопатогенные грибы, а также грамположительные и грамотрицательные бактерии, хотя отдельные представители последних, такие как *Pseudomonas* и *Erwinia*, оказались нечувствительны к действию пептидов данного семейства. Способность тионинов индуцировать утечку внутриклеточного матрикса была показана на бактериях и дрожжах. Этот эффект снимался в присутствии некоторых двухзарядных катионов, таких как Ca^{2+} , Zn^{2+} или Fe^{2+} , в концентрации до 5 мМ, при этом присутствие катионов Mg^{2+} и Ba^{2+} в концентрации до 10 мМ

или одновалентных катионов в концентрации до 50 мМ не оказывало подобного действия. Кроме этого, тионины действуют в синергизме с другими цистеин-богатыми белками или пептидами (липид-переносящими белками, запасными 2S альбуминами, ингибиторами протеаз)⁹⁵. Помимо действия на микроорганизмы, тионины оказывают ингибирующее воздействие на культуры клеток млекопитающих и насекомых, а также растительные протопласты⁹⁶. Более того, тионины являются токсичными для насекомых⁹⁷ и млекопитающих⁹⁸ при введении их в гемолимфу или кровь, но не при пероральном применении. Большинство цитотоксических эффектов, вызываемых тионинами, принято связывать с повышением проницаемости клеточной мембраны. Помимо цитолитического действия тионинам также приписывается возможность оказывать иное действие на клетки, в частности для вискотоксинов предполагают прямое связывание с ДНК и РНК⁹⁹. Кроме того, было показано подавление активности рибонуклеотидредуктазы в присутствии пуротионинов¹⁰⁰ и необратимое ингибирование β-глюкоронидазы¹⁰¹. Предполагают, что, помимо защитной, тионины выполняют ряд других функций в растениях, а именно, участвуют в регуляции активности ферментов¹⁰⁰ и выступают в качестве запасных белков, накапливаясь в семенах¹⁰².

Механизм действия тионинов впервые был изучен на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, когда было показано, что тионин из семян пшеницы вызывает увеличение проницаемости клеточных мембран, о чем свидетельствует выделение в среду ионов K^+ и HPO_4^{2-} ¹⁰³. В исследованиях с грибом *Neurospora crassa* было установлено, что тионин из семян ячменя вызывает отток изоаминомасляной кислоты из гиф⁴⁵. Кроме того, этот пептид вызывает поступление Ca^{2+} и H^+ в гифы гриба и отток K^+ , что приводит к защелачиванию среды. Цитотоксический эффект тионинов классов I и IV на культуры клеток млекопитающих также связан с нарушением барьерной функции мембраны, свидетельством которого является отток из клеток уридина и Rb^+ ¹⁰⁴. Присутствие тионинов в концентрации, не оказывающей видимого действия на культуры клеток, приводило к подавлению трансляции такими антибиотиками как гидромицин В, неспособными в норме проникать через плазматическую мембрану¹⁰⁴. Также было показано, что одновременное применение тионинов и 2S альбуминов, которые обладают синергичным противогрибковым действием, вызывает увеличение оттока K^+ из гиф *Fusarium culmorum*⁹⁵.

Изменение проницаемости клеток грибов для ионов и других небольших растворенных веществ может быть результатом прямого взаимодействия между фосфолипидами мембран и тионинами. Ряд экспериментов, направленных на изучение взаимодействия тионинов с клеточными мембранами, как искусственными, так и природными, показал, что действие тионинов направлено непосредственно на мембрану, а не на какие-либо рецепторы на поверхности клетки. Эксперименты с тионином из *Pyricularia pubera* показали, что преимущественной мишенью для данного пептида являются отрицательно заряженные фосфолипиды¹⁰⁵. В то же время стоит отметить, что он лизирует также и мембраны, состоящие преимущественно из нейтральных или катионных фосфолипидов^{106,107}. Физико-химический анализ взаимодействия этого тионина с фосфолипидными мембранами различного состава показал, что структурные нарушения, вызываемые им, увеличиваются при наличии в составе мембран фосфатидилсерина. Связывание тионина *Pyricularia pubera* с фосфатидилсерином липидного бислоя, по-видимому, происходит без встраивания тионина в мембрану¹⁰⁸. 2S альбумины, которые способны повышать антимикробную активность тионинов, также взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами, вызывая увеличение их проницаемости¹⁰⁹.

Было предложено три возможных механизма действия тионинов на клеточную мембрану. В первом случае предполагается, что тионины встраиваются в мембрану с образованием селективных ионных каналов^{110,111}. Другое предположение заключается в том, что тионины покрывают мембрану с образованием своеобразных пластов на ее поверхности, приводя тем самым к увеличению жесткости мембраны с одновременным увеличением ее текучести по краям покрытых пептидами участков. Массовое связывание пептида с поверхностью клетки таким образом будет вызывать дестабилизацию мембраны и, как следствие, разрушение клетки^{112,113}. В третьем случае также предполагается первоначальное выстилание мембраны пептидами, приводящее к увеличению жесткости покрытых участков мембраны. Одновременно с тем происходит оттягивание фосфолипидов от краев этих участков к центру, что приводит в результате к дестабилизации и нарушению целостности бислоя¹¹⁴. Несмотря на существующие экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу данных предположений, ни одно из них пока не является полностью подтвержденным.

Гевеиноподобные пептиды

Гевеиноподобные АМП объединены в одно семейство благодаря структурной гомологии с гевеином, 43-членным хитинсвязывающим пептидом, который был выделен из гевеи *Hevea brasiliensis*¹¹⁵. Они относятся к группе белков, способных связывать хитин (полимер N-ацетилглюкозамина, GlcNAc) и родственные соединения, содержащие GlcNAc или N-ацетилнейраминовую кислоту (NeuNAc)^{116,117}. Поскольку хитин не обнаружен в растениях, но широко распространен у грибов, насекомых и нематод, было выдвинуто предположение о том, что хитинсвязывающие белки участвуют в защите растений от патогенов и паразитов.

Все хитинсвязывающие белки растений содержат, по крайней мере, один хитинсвязывающий (гевеиновый) домен, который состоит из ~30-45 а.о. и включает несколько консервативных а.о. (остатки цистеина, глицина и ароматических аминокислот), образующих хитинсвязывающий сайт. Помимо гевеина к хитинсвязывающим белкам относятся некоторые лектины, хитиназы и ряд гевеиноподобных АМП^{116,117}. Гевеиноподобные АМП образуют отдельное семейство однодоменных хитинсвязывающих белков, представители которого различаются по числу остатков цистеина, образующих внутримолекулярные дисульфидные связи. Большинство из них содержат 4 дисульфидные связи и в этом плане сходны с хитинсвязывающими доменами хитиназ классов I и IV.

К гевеиноподобным АМП с 8 остатками цистеина относятся пептиды Pn-AMP1 и Pn-AMP2, выделенные из семян ипомеи *Pharbitis nil*¹¹⁸ и авезин овса¹¹⁹. В этом семействе есть и укороченные формы, содержащие лишь 6 остатков цистеина, образующих 3 дисульфидные связи. К ним относятся гевеиноподобные пептиды амаранта (Ac-AMP1 и Ac-AMP2 из семян *A. caudatus*¹²⁰, Ay-AMP из *A. hypochondriacus*¹²¹ и Ar-AMP из *A. Retroflexus*¹²², а также пептид IWF4, выделенный из межклеточной жидкости листьев сахарной свеклы¹²³. У этих пептидов отсутствует С-концевая область канонического гевеиноподобного домена. Описано также 4 гевеиноподобных пептида, содержащих 10 остатков цистеина, образующих 5 дисульфидных связей и различающихся по цистеиновому мотиву. Два из них выделены из коры деревьев эвкоммии вязолистной *Eucommia ulmoides* и бересклета европейского *Euonymus europaeus*¹²⁴, а два других – из семян злаковых – пшеницы *Triticum kiharae*¹²⁵ и колосняка *Leymus arenarius*¹²⁶. У пептидов Ee-CBP и WAMP-1a (рисунок 2) цистеиновый

мотив такой же, как у соответствующих хитиназ из *E. europaeus* и риса посевного *Oryza sativa*^{125,127}.

Спектр антимикробной активности гевеиноподобных пептидов достаточно широк. В ряде случаев показано ингибирование роста некоторых бактерий. Так, пептиды амаранта Ac-AMP1 и Ac-AMP2 ингибируют рост грамположительных бактерий, хотя неактивны в отношении грамотрицательных бактерий¹²⁰. Пептид WAMP-1a действует как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии¹²⁵. Для пептида Ee-SBP показано, что его противогрибковая активность возрастает в присутствии эндогенной Ee-хитиназы¹²⁷.

Механизм действия гевеиноподобных АМП мало изучен. Для одного представителя – Pn-AMP1 – показано, что в клетках дрожжей он вызывает деполяризацию актина¹²⁸. Большинство из вышеупомянутых пептидов связываются с хитином^{117,120,122,124}. Однако неизвестно, насколько их противогрибковая активность связана с действием на метаболизм хитина у грибов. Зависимость их активности от наличия в среде катионов, скорее, указывает на то, что они действуют на плазматическую мембрану, поскольку наблюдаемый антагонизм характерен для пептидов, действующих на мембраны. Растения табака и томата, экспрессирующие гевеиноподобные пептиды Pn-AMP, обладают повышенной устойчивостью к патогенам, содержащим и не содержащим хитин¹²⁹. Это означает, что присутствие хитина не является необходимым условием для проявления этими пептидами антимикробной активности.

Липид-переносящие белки

Изначально предполагалось, что так называемые липид-переносящие белки (ЛПБ) участвуют в переносе липидов между органеллами. Позднее было установлено также их участие в защите растений. Растительные ЛПБ – положительно заряженные, цистеинбогатые пептиды длиной ~70-95 а.о., обнаруженные в различных тканях большого числа одно- и двудольных растений. Впервые они были обнаружены в листьях шпината, колеоптилях кукурузы и алейроновом слое ячменя. Впоследствии было установлено, что они находятся во всех частях растения в эпидермальных и периферических слоях клеток^{130–132}.

Около 30% а.о. являются консервативными у ЛПБ из различных растительных источников. Консервативными являются 8 остатков цистеина и 12 гидрофобных и ароматических остатков^{133,134}. Методами рентгеноструктурного анализа в кристалле и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) было показано, что глобулярные молекулы ЛПБ представляют собой пучок из четырех α -спиралей, связанных подвижными петлями, с гидрофобным карманом, способным вмещать множество различных липидов¹³⁵⁻¹³⁹. Первые три спирали, расположенные параллельно продольной оси кармана, образуют полость гидрофобного кармана. Четвертая спираль перпендикулярна трем другим и вместе с C-концевой петлей закрывает образованный другими спиралями карман.

ЛПБ подразделяют на два подсемейства. ЛПБ, которые образуют первое подсемейство, называемое ЛПБ1, имеют молекулярную массу около 9 кДа и являются положительно заряженными. Они состоят из ~90-95 а.о., 8 из которых – остатки цистеина, расположенные в консервативных положениях. Эти остатки образуют четыре дисульфидные связи, которые стабилизируют третичную структуру белка (рисунок 2). В подсемейство ЛПБ2 входят пептиды с молекулярной массой около 7 кДа и длиной ~70 а.о. Они имеют отличный от ЛПБ1 цистеиновый мотив¹⁴⁰. У ЛПБ2 Cys5 образует связь с Cys1, а Cys6 – с Cys8, в то время как у ЛПБ1 образуются другие пары цистеинов: Cys5 с Cys8 и Cys6 с Cys1¹⁴¹. Кроме того, представители ЛПБ2 обладают более гибким гидрофобным карманом по сравнению с ЛПБ1, что позволяет им адаптировать свою структуру под большее количество различных липидов, в том числе стеролов¹⁴². Сходным цистеиновым мотивом обладают также некоторые ингибиторы протеаз, 2s-альбумины и ряд пролинбогатых белков¹⁴³.

ЛПБ из разных видов растений обладают различными антимикробными свойствами. Например, ЛПБ из семян лука высоко активен против широкого спектра фитопатогенных грибов, в то время как ЛПБ из семян редиса менее активен, а ЛПБ из семян кукурузы и пшеницы неактивны в отношении большинства грибов. Чувствительность антимикробной активности к присутствию в среде катионов также зависит от типа ЛПБ. На активность ЛПБ из семян лука практически не влияет присутствие катионов кальция и калия, в то время как активность ЛПБ из редиса резко снижается при добавлении в среду катионов. ЛПБ также обладают антибактериальной активностью. ЛПБ из листьев ячменя и шпината примерно в 10 раз более активны в отношении грамположительной бактерии *Clavibacter michiganensis* и в 3-

5 раз – против грамотрицательной бактерии *Pseudomonas solanacearum*, чем тионины пшеницы¹³¹. При этом ЛПБ из семян лука, редиса, кукурузы и пшеницы не вызывают лизис эритроцитов человека и не влияют на жизнеспособность фибробластов.

Антимикробная активность ЛПБ, по всей видимости, обусловлена взаимодействием с биологическими мембранами, в результате которого повышается их проницаемость¹⁴⁴. С другой стороны Асе-АМР1 из семян лука, проявляющий наибольшую, по сравнению с другими ЛПБ, антимикробную активность, не обладает липид-переносимой активностью³⁴, что указывает на возможность иного, не сопряженного с воздействием на мембрану, механизма действия. Также стоит отметить синергизм в действии ЛПБ с другими защитными белками растений. В частности было показано увеличение устойчивости моркови *Daucus carota* к фитопатогенам *Alternaria radicicola* и *Botrytis cinerea* при одновременной экспрессии ЛПБ пшеницы и хитиназы из ячменя¹⁴⁵. Для отдельных представителей была установлена ингибирующая активность в отношении аспартатных и цистеиновых протеаз¹⁴⁶.

Ноттиноподобные пептиды

Первыми открытыми ноттиноподобными пептидами были Mj-AMP1 и Mj-AMP2 из семян *Mirabilis jalapa*. Эти два антимикробных пептида длиной 36 и 37 а.о. содержат по шесть остатков цистеина, образующих три дисульфидные связи¹⁴⁷. В пространстве они формируют структуру типа “цистиновый узел” (в англоязычной литературе inhibitor cystine knot, ИСК). Организация дисульфидных связей для всех молекул этого типа следующая: C¹–C⁴, C²–C⁵, C³–C⁶. Пространственная структура пептидов с мотивом ИСК характеризуется наличием β-шпильки и своеобразного “узла” (отсюда их название): третья по счету дисульфидная связь (C³–C⁶) пронизывает кольцо, образованное двумя другими дисульфидными и атомами основной цепи, их соединяющими. Полипептиды с укладкой ИСК часто также называются ноттинами (от англ. knot – узел).

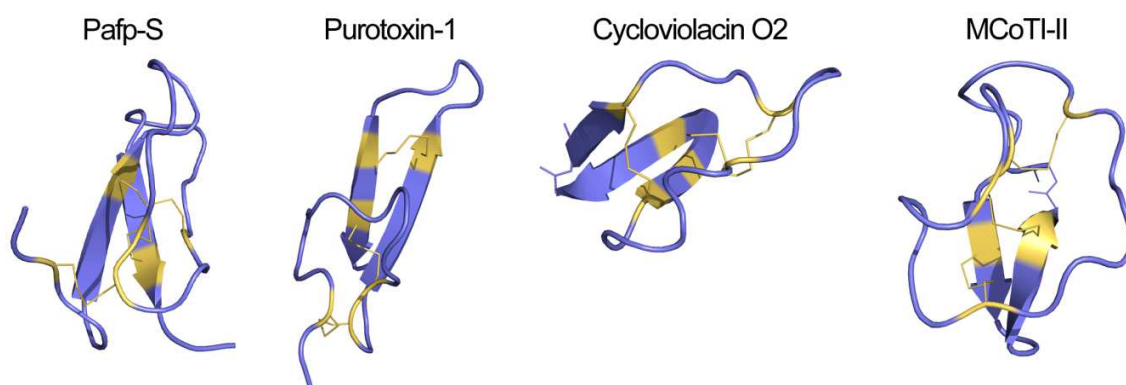


Рисунок 3. Пространственные структуры пептидов ноттинового типа. Ноттин Pafp-S из *Phytolacca americana*¹⁴⁸, Purotoxin-1 из яда паука *Geolycosa* sp.¹⁴⁹, циклотид cycloviolacin O2 из *Viola odorata*¹⁵⁰, макроциклический ингибитор трипсина MCoTI-II из *Momordica cochinchinensis*¹⁵¹. Желтым цветом показаны остатки цистеина.

На сегодняшний день известно свыше тысячи ноттинов с различной биологической функцией – ингибиторы протеаз, АМП, инсектицидные и антигельминтные пептиды, нейротоксины, нейрорегуляторы и т.д.^{147,152–155} (рисунок 3). По цистеиновому мотиву ноттиноподобные пептиды похожи на гевеиноподобные пептиды, при этом расположение дисульфидных связей аналогично таковому в структуре гевеина, включающей первые шесть остатков цистеина¹⁵⁶. Ноттиноподобные пептиды способны подавлять рост ряда фитопатогенных грибов и грамположительных бактерий. Mj-AMP1 и Mj-AMP2 активны против целого ряда фитопатогенных грибов и некоторых грамположительных бактерий, но неактивны против грамотрицательных бактерий. Несмотря на высокую гомологию пептидов из *Mirabilis jalapa*, они сильно различаются по степени выраженности противогрибковой активности. Кроме того, активность этих пептидов сильно снижается при наличии в среде двувалентных катионов¹⁴⁷. Пептид Pa-AMP-1 из семян *Phytolacca americana* также подавляет рост некоторых грибов и грамположительных бактерий и не влияет на рост грамотрицательных бактерий и дрожжей. В связи с этим, предполагается, что этот пептид взаимодействует со специфическими мембранными рецепторами, а не связывается непосредственно с клеточной мембраной¹⁵⁷. Для пептида PA1b из гороха *Pisum sativum*, проявляющего ярко выраженные инсектицидные свойства, показано, что он блокирует протонные АТФазы V-типа¹⁵⁸.

Макроциклические пептиды (циклотиды)

Циклотиды – семейство растительных пептидов с необычной циклической структурой, образующейся в результате замыкания основной цепи головой к хвосту, и формирующих укладку типа цистинового узла с участием трех дисульфидных связей¹⁵⁹. Такое сочетание приводит к образованию структуры в виде циклического цистинового узла (ССК – cyclic cystine knot), которая обеспечивает высокую стабильность пептидов к химическим и биологическим воздействиям. Кроме остатков цистеина, высококонсервативными являются также остатки глицина в положениях 2, 14 и 26 и остаток глутаминовой кислоты в положении 3, которые важны для стабилизации структуры. Существует мнение, что циклотиды являются подсемейством ноттинов, которые также содержат цистиновый узел (рисунок 3). Впервые циклотиды были выделены из растений семейств фиалковые (*Violaceae*) и мареновые (*Rubiaceae*), но впоследствии были также обнаружены в других семействах покрытосеменных растений, и, по всей видимости, являются широко распространенной группой пептидов¹⁶⁰. На основании структурных особенностей их подразделяют на три подсемейства. Два больших подсемейства “Мёбиуса” и “браслетоподобные” циклотиды названы так по признаку наличия или отсутствия в структуре поворота на 180°, вносимого пептидной связью X-Pro в основную цепь пептида¹⁵⁹. Меньшее подсемейство циклотидов, ингибирующая активность трипсина, имеет заметно отличающуюся от других циклотидов структуру¹⁶¹ (рисунок 3).

Циклотиды характеризуются широким спектром биологической активности. Отдельные представители проявляют антимикробную¹⁶², инсектицидную¹⁶³, противоопухолевую/цитотоксическую¹⁶⁴ активность, являются гемолитиками¹⁶⁵, действуют на вирус иммунодефицита человека¹⁶⁶.

Функция макроциклических пептидов в растениях точно неизвестна. В связи с тем, что они характеризуются высоким уровнем экспрессии в листьях и продуцируются в растениях в виде нескольких изоформ, циклотидам приписывается защитная функция^{162,163}. Пептиды калата В1, циркулин А и В и циклопсихотрид проявляют высокую активность против нескольких бактериальных и грибных штаммов¹⁶². При этом уровень антимикробной активности зависит от концентрации соли в среде, на основании чего предполагается, что взаимодействие циклотидов с мембраной клетки является электростатическим. Пептид калата

В1 оказывает ингибирующее действие на рост личинок хлопковой совки *Helicoverpa punctigera*, которое выражено сильнее, чем у большинства ингибиторов сериновых протеаз, продуцируемых многими растениями для защиты от насекомых¹⁶³. Механизм инсектицидного действия неизвестен, пептиды калата В1 и В2 не влияют на активность трипсина, химотрипсина и α -амилазы *Helicoverpa punctigera*, но обладают гемолитической активностью^{163,165}.

Несмотря на разнообразие биологических эффектов, проявляемых циклотидами, в их основе, по всей видимости, лежит взаимодействие с клеточными мембранами и нарушение их целостности. В ряде экспериментов с использованием различных модельных мембранных систем, а также в экспериментах с насекомыми было показано, что циклотиды нарушают функционирование мембран путем образования крупных пор¹⁶⁷.

Ингибиторы α -амилаз

Еще одним классом ЗП растений можно назвать ингибиторы гликозидаз, в частности ингибиторы α -амилаз (ИАА). Как правило, для проникновения внутрь организма хозяина фитопатогенам необходимо преодолеть многослойную полисахаридную клеточную стенку. Экстрацеллюлярные гидролитические ферменты, участвующие в деградации полисахаридов растительной клеточной стенки, выделяются патогенами на ранних стадиях заражения и являются важными факторами инвазивности. В ответ растения синтезируют набор ингибиторов полисахаридной и полипептидной природы, подавляющих активность пектиновых гидролаз, ксилоназ, целлюлаз и α -амилаз (АА). Пептидными ингибиторами являются только некоторые из ингибиторов α -амилаз, в то время как ингибиторы других групп представлены более крупными белками. АА (КФ 3.2.1.1; 1,4- α -D-глюкан-глюканогидролазы; гликогеназы) представляют собой семейство кальций-зависимых эндоамилаз, катализирующих гидролиз α -D-глюкановых связей в компонентах крахмала и других полисахаридах. АА играют ключевую роль в метаболизме углеводов растений, животных и микроорганизмов. АА состоят из одной полипептидной цепи, образующей три домена – А, В и С¹⁶⁸. Домен А является каталитическим и состоит из $(\beta/\alpha)_8$ бочки (Триозофосфатизомеразный бочонок, TIM barrel), являющейся структурным элементом

большого количества различных ферментов ¹⁶⁹. Домены В и С располагаются на противоположных сторонах домена А и участвуют в связывании ионов кальция и формируют дополнительный интерфейс для взаимодействия с субстратом. Домен А содержит четыре консервативных сайта тесно связанных с активным центром, в них располагаются кислотные остатки и остатки гистидина, непосредственно вовлеченные в распознавание и гидролиз полисахаридов ¹⁷⁰.

ИАА в растениях определяют устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам и определенным видам насекомых, основой рациона которых являются запасные полисахариды растений, а потому использующих α -амилазы в качестве основных пищеварительных ферментов ¹⁷¹. Растительные ИАА проявляют активность в отношении α -амилаз насекомых ^{172,173}, млекопитающих ^{174,175}, микроорганизмов ¹⁷⁶ и, гораздо реже, растений ¹⁷⁷. Кроме того существует ряд ингибиторов с двойной активностью, способных одновременно подавлять α -амилазы и протеолитические ферменты ¹⁷⁸. С момента открытия негативного влияния ИАА из фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* на развитие долгоносиков видов *Callosobruchus maculatus* и *Callosobruchus chinensis* началось изучение ИАА растений с точки зрения возможности их использования для контроля насекомых-вредителей ¹⁷⁹. В растениях насчитывается шесть отдельных структурных семейств ИАА. Для всех них были обнаружены сходные по первичной структуре неингибиторные полипептиды с разным уровнем гомологии ^{54,180–184}, что зачастую отражено в названиях отдельных семейств. Лектиноподобные, тауматин-подобные, СМ-ИАА и ИАА типа Кунитца являются достаточно крупными белками, в то время как два других семейства представлены пептидами структурно-родственными дефензинам и ноттинам. Лектиноподобные, тауматин-подобные белки и белки типа Кунитца, также встречаются среди других групп защитных белков растений, не являющихся ИАА и обладающих иной специфичностью ^{185–188}.

Ноттиноподобные ИАА

Данная группа ИАА обладает цистеиновым мотивом и пространственной структурой характерными для всех ноттиноподобных пептидов ¹⁸⁰. Пептид ААІ из семян *Amaranthus hypochondriacus* ¹⁵⁶ состоит из 32 а.о. и является самым маленьким из известных природных

ИАА. Ингибирование фермента происходит путем прямого блокирования центральной борозды, где располагается активный центр фермента. При связывании с α -амилазой ТМА из личинки жука *Tenebrio molitor* ААІ блокирует все четыре субсайта в субстрат-связывающей бороздке фермента. Три каталитических кислотных остатка в активном центре ТМА нековалентно связываются с остатком аргинина в N-концевой области молекулы ингибитора, которая, как было показано путем мутагенеза, является критической для проявления активности ААІ. Замена N-концевой последовательности из 7 а.о. хуветоксина-1, ноттиноподобного нейротоксина из паука *Haplopelma schmidtii*, последовательностью из ААІ приводит к появлению у полученной химеры ингибирующей активности в отношении ТМА¹⁶².

ИАА дефензинового типа

SI α -1, SI α -2, и SI α -3 из *Sorghum bicolor* представляют собой пептиды длиной 47-48 а.о., содержащие четыре дисульфидных связи. Изначально, как и АМП дефензинового типа были отнесены к группе γ -тионинов. Эти пептиды высоко активны в отношении α -амилаз из кишечника тараканов и саранчи, в значительно меньшей степени в отношении α -амилаз *Aspergillus oryzae* и человеческой слюны, в то же время они не ингибируют ферменты ячменя, свиной поджелудочной железы и *Bacillus* sp.¹⁸⁹. Пространственная структура SI α -1 представлена CS- $\alpha\beta$ -мотивом, так же как у растительных дефенинов и калиевых токсинов скорпионов¹⁹⁰.

Ингибиторы протеаз

Еще одной группой пептидов, задействованных в противостоянии фитпатогенам и травоядным животным, являются ингибиторы протеолитических ферментов (ИП). Среди них присутствуют ингибиторы всех механистических классов ферментов, но, соразмерно представленности самих классов ферментов в природе, ингибиторы сериновых и цистеиновых протеаз в настоящее время кажутся преобладающими. В настоящее время установлено, что экстрацеллюлярные протеазы имеют большое значение в процессе патогенеза¹⁹¹ наряду с такими ферментами как полигалактуроназы, пектатлиазы и ксиланазы.

Они участвуют в деградации структурных и запасных белков, инактивации ЗП и ферментов организма-хозяина. Первая внеклеточная протеаза была выделена в чистом виде из фитопатогенного гриба *Colletotrichum lindemuthianum* в 1973 г.¹⁹². В последние годы были выделены и в различной степени охарактеризованы экстрацеллюлярные протеазы многих фитопатогенных микроорганизмов. Среди них преобладают сериновые протеазы, хотя встречаются ферменты, относящиеся к другим классам. Сериновые протеазы фитопатогенов можно разделить на трипсиноподобные и субтилизин-подобные. К первой группе можно отнести ферменты, синтезируемые такими патогенами растений, как *Cochliobolus carbonum*¹⁹³, *Verticillium dahliae*^{194,195}, *Stagonospora (Septoria) nodorum*¹⁹⁶ и *Phytophthora infestans*¹⁹⁷; ко второй – *C. carbonum*¹⁹³, *P. Infestans*¹⁹⁷, *Acremonium typhium*¹⁹⁸, *Magnaporthe poae*¹⁹⁹, *Trichoderma harzianum*²⁰⁰ и *Fusarium oxysporum*²⁰¹. Аспаратные протеазы используются растительными патогенами видов *Botrytis cinerea*²⁰², *Glomerella cingulata*²⁰³, *Cryphonectria parasitica*²⁰⁴, *Aspergillus fumigatus*²⁰⁵. Экстрацеллюлярные металлпротеазы из семейства цинк-зависимых бактериальных ферментов выявлены у рода *Erwinia*^{206,207}. Цистеиновые протеазы в процессе инвазии синтезирует патогенный гриб *Pyrenopeziza brassicae*²⁰⁸. В пищеварительном тракте насекомых содержатся протеолитические ферменты, принадлежащие ко всем четырем механистическим классам протеаз, однако у представителей различных систематических групп имеются свои характерные особенности. Например, у насекомых отряда чешуекрылые (Lepidoptera), к которому относятся многие важные вредители сельского хозяйства, первоначальное расщепление белков в пищеварительном тракте осуществляется преимущественно сериновыми протеазами²⁰⁹. У представителей же отряда жесткокрылые (Coleoptera), основными являются цистеиновые протеазы²⁰⁹, к примеру у колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* мажорные пищеварительные ферменты представлены протеазами, близкими по свойствам катепсинам млекопитающих²¹⁰. В то же время этими насекомыми используется еще целый ряд пищеварительных ферментов других групп: аспаратная протеаза, напоминающая катепсин D²¹¹, сериновая протеаза типа химотрипсина, а также лейцинаминопептидаза и карбоксипептидаза А²¹². По всей видимости, негативное влияние ингибиторов протеолитических ферментов на насекомых связано в первую очередь с подавлением или значительным снижением эффективности переработки и усваивания белка пищи. Таким образом, по механизму действия ИП в отношении насекомых-вредителей являются антиметаболитами.

В 1972 г. было показано, что повреждение листьев томатов и картофеля колорадским жуком или его личинками вызывает быстрое увеличение содержания в растении ингибиторов трипсина и химотрипсина. Это увеличение не ограничивалось поврежденными листьями и распространялось на все надземные части растений, т.е. ответ носил системный характер²¹³. Подобным же образом, в ответ на механическое повреждение, в растениях происходит индукция синтеза и накопление ИП других механистических классов²¹⁴⁻²¹⁶. В 1976 г. было показано, что ингибиторы трипсина и химотрипсина, выделенные из семян гороха и сои, а также из клубней картофеля, подавляют активность протеаз, секретируемых фитопатогенным грибом *Fusarium solani*^{217,218}. Также ИП принимают участие в защите от фитопаразитических нематод²¹⁹ и моллюсков²²⁰. Помимо защиты от воздействия внешних протеолитических ферментов, ИП вовлечены в регуляцию активности внутриклеточных ферментов²²¹ и в противодействие абиотическому стрессу²²². ИП представляют собой очень большую и многообразную группу белков. Их классификация основывается на общности первичной структуры и пространственной организации отдельных представителей. В базе данных MEROPS²²³ (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=I) насчитывается более 70 семейств полипептидных ИП из различных природных источников от бактерий до человека²²⁴. Среди них есть как простые ингибиторы, имеющие только один реакционный центр, так и комплексные, способные одновременно связываться с двумя и более молекулами фермента. Отдельные части таких мультидоменных ИП как правило принадлежат к одному семейству ингибиторов, однако, есть и гетеротипичные ИП, содержащие домены, принадлежащие к разным семействам²²⁵⁻²²⁷. Существует ряд ИП с перекрестной активностью в отношении ферментов различного каталитического типа²²⁸. Так, представители семейства Кунитца в основном подавляют активность сериновых протеаз, но среди них есть также и ингибиторы цистеиновых и аспартатных протеаз²²⁹. К настоящему времени из растений выделено и охарактеризовано порядка 500 ИП, относящихся к 10 семействам²³⁰. За исключением цистатинов, все прочие семейства растительных ИП по большей части представлены ингибиторами сериновых протеаз, хотя ингибиторы из многих семейств могут подавлять активность ферментов других механистических классов, о чем подробнее будет сказано ниже.

Ингибиторы сериновых протеаз

Почти треть всех известных в настоящее время протеаз могут быть классифицированы как сериновые протеазы, названные так по нуклеофильному остатку серина в активном центре. Этот механистический класс вначале был выделен по наличию каталитической триады Asp-His-Ser. Такая триада может находиться, по крайней мере, в четырех различных структурных окружениях, что соответствует четырем кланам сериновых протеаз, типичными представителями которых являются химотрипсин, субтилизин, карбоксипептидаза Y и Clp протеаза (по номенклатуре MEROPS²²³). Химотрипсин-подобные протеазы являются наиболее распространенными в природе и обнаружены у эукариот, прокариот, архей и вирусов²²⁴. Существуют также сериновые протеазы с альтернативными каталитическими триадами и диадами, такими как Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His и просто N-концевой остаток Ser. Каталитическая триада располагается в активном центре фермента таким образом, что Ser¹⁹⁵ (здесь и далее приведена общепринятая нумерация остатков для бычьего химотрипсиногена, предшественника зрелого химотрипсина) находится на одной его стороне, а Asp¹⁰² и His⁵⁷ – на противоположной. Каталитическая триада является частью протяженной сети водородных связей.

Исследования специфичности протеаз в основном сфокусированы на рассмотрении т.н. P₁/S₁ взаимодействия (по номенклатуре Шехтера и Бергера, где P₁-P_n – остатки полипептидного субстрата, расположенные последовательно от гидролизуемой связи до N-конца полипептида, остатки P₁'-P_n' – от гидролизуемой связи до C-конца, остатки S₁-S_n, S₁'-S_n' – соответствующие им остатки фермента²³¹). S₁-сайт представляет собой карман, смежный с остатком Ser¹⁹⁵ и сформированный остатками 189-192, 214-216, 224-228. Специфичность связывания, как правило, определяется остатками 189, 216 и 226. Так, например, Ser¹⁸⁹, Gly²¹⁶, Gly²²⁶ создают карман, обуславливающий специфичность химотрипсина. Asp¹⁸⁹ создает отрицательный заряд, необходимый для специфического взаимодействия трипсина с субстратом, содержащим Lys или Arg в положении P₁. В фермент-субстратном взаимодействии помимо S₁-сайта также участвуют т.н. полипептид-связывающий сайт и карманы, дополнительно связывающие боковые цепи субстрата. Полипептид-связывающий сайт включает в себя остатки 214-216 и формирует антипараллельный β-слой с остатками P₁-P₃ полипептидного субстрата. В химотрипсине водородные связи образуются между

кислородом карбонильной группы Ser²¹⁴ и NH-группой остатка P₁, NH-группой Trp²¹⁵ и карбонилем P₃ и между карбонилем Gly²¹⁶ и NH-группой P₃. Эти взаимодействия – характерная особенность химотрипсин-подобных протеаз, они являются определяющими для эффективного гидролиза субстрата. Интересно, что реакционная петля полипептидных ингибиторов сериновых протеаз так же образует антипараллельный β-слой с полипептид-связывающим сайтом, что, по всей видимости, является необходимым условием для проявления их ингибиторной активности^{232,233}.

Для ингибиторов сериновых протеаз известны как минимум три различных механизма реализации их функции²³⁴. Ингибиторы, входящие в группу «канонических», вступают в высокоспецифичное взаимодействие с активным центром фермента-мишени. Этот механизм был детально изучен и его принято называть стандартным. В стандартном механизме ингибитор имеет единственную вступающую в реакцию пептидную связь. Центральное место при таком типе ингибирования занимает остаток P₁. Так же, как и при взаимодействии фермента с обычным полипептидным субстратом, происходит образование антипараллельного β-слоя остатков полипептид-связывающего сайта с участком P₁-P₃ реакционной петли ингибитора. Молекула ингибитора в комплексе существует в равновесии с модифицированной формой, в которой расщеплена пептидная связь реакционного сайта, и может выходить из комплекса в любом из двух состояний²³⁵. Большинство растительных ИП являются каноническими.

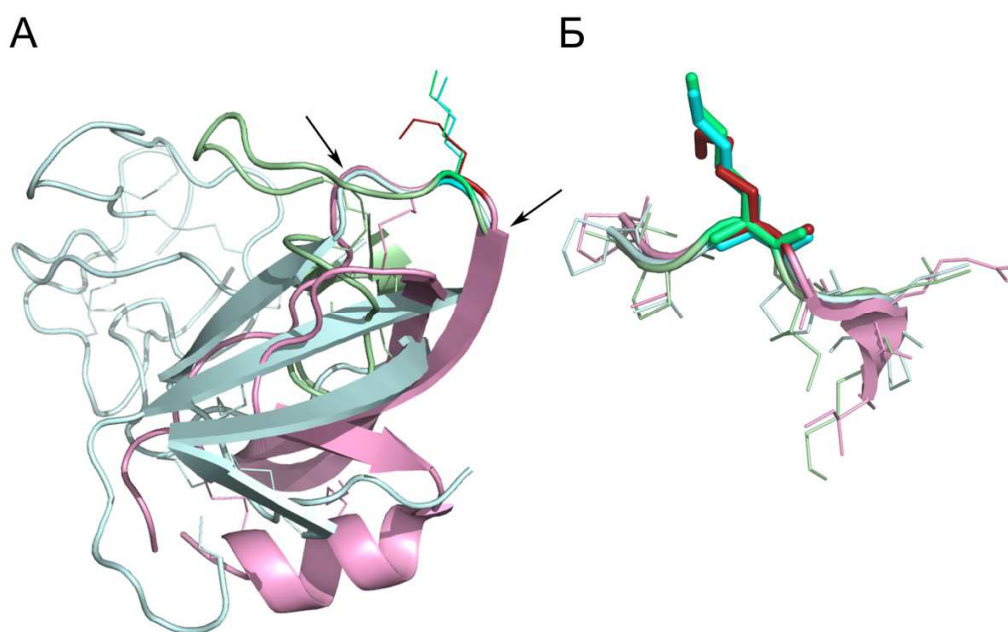


Рисунок 4. Пространственная структура канонической петли. А – суперпозиция пространственных структур ВРТИ (розовый), МСотІ-ІІ (светло-зеленый) и ББИ из *Oryza sativa* (светло-голубой) в комплексе с бычьим трипсином (фермент не показан), Б – суперпозиция канонических петель этих ингибиторов, остатки Р₁ показаны для каждого пептида соответствующим оттенком. Стрелками показаны границы масштабируемого участка петель (Р₃-Р₃').

«Неканонический» тип ингибирования характерен для некоторых ингибиторов, выделенных из кровососущих животных. Они вступают во взаимодействие с ферментами, участвующими в процессе свертывания крови, такими как тромбин и фактор Ха. При таком типе ингибирования блокирование фермента происходит не посредством петлевого участка, но путем проникновения в активный центр фермента короткой (3 а.о.) N-концевой последовательности ингибитора, которая образует параллельный β-слой с S₁-S₃ участком. N-концевой а.о. образует водородные связи с Ser¹⁹⁵ и блокирует S₁-сайт^{236,237}.

Третий тип ингибирования сериновых протеаз показан для семейства серпинов, в которое входят белки длиной порядка 400 а.о. Большинство известных серпинов – белки плазмы крови, участвующие в регуляции таких процессов как фагоцитоз, коагуляция и фибринолиз²³⁵. В данном случае, как и в случае с каноническим типом ингибирования, с активным центром фермента взаимодействует петлевой участок, но значительно более

протяженный ~30 а.о., что обуславливает его гораздо большую подвижность. Ферментативный гидролиз серпинов приводит к необратимым структурным изменениям и образованию ковалентной связи с ферментом^{238,239}.

ИП семейства Кунитца.

Ингибиторы семейства Кунитца являются широко распространенными среди высших растений, особенно среди таких семейств, как бобовые, злаки и пасленовые^{240,241}.

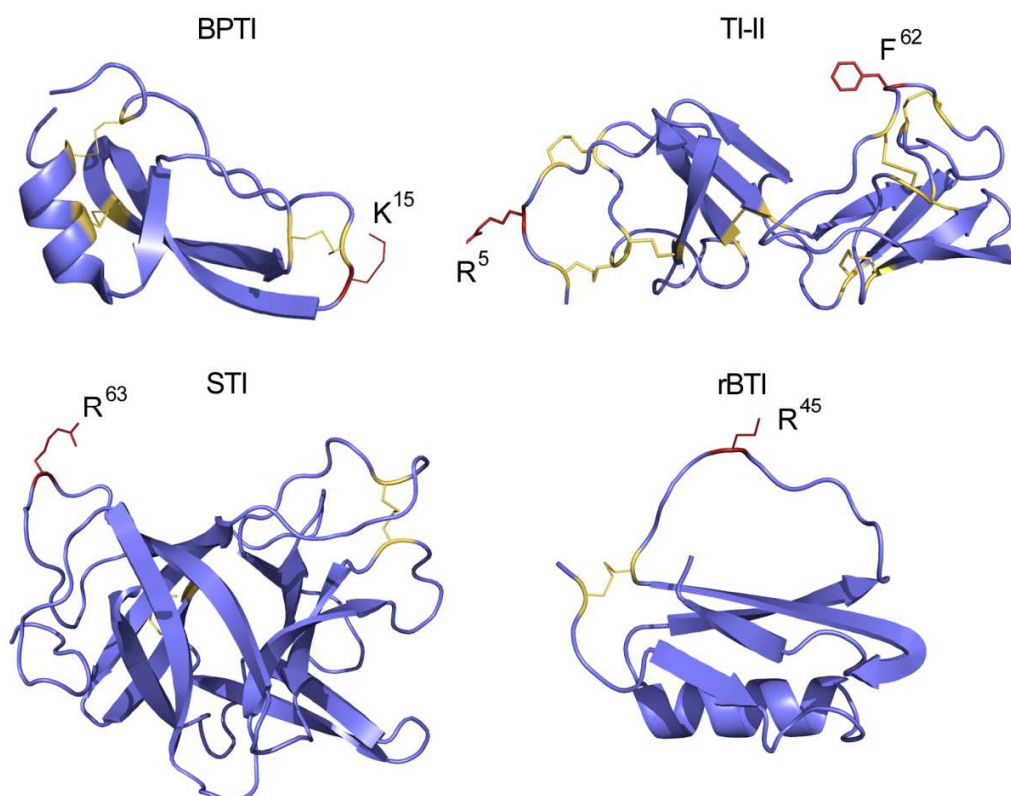


Рисунок 5. Пространственные структуры ИП семейства Кунитца и картофельных ингибиторов семейств PI 1 и PI 2. Бычий панкреатический ингибитор трипсина BPTI из *Bos taurus*²⁴², ингибитор трипсина STI из сои *Glycine max*²⁴³. TI-II – ИП с двумя реактивными сайтами семейства PI 2 из *Solanum esculentum*²⁴⁴, rBTI семейства PI 1 из *Fagopyrum esculentum*²⁴⁵. Желтым цветом показаны остатки цистеина. Остатки R₁ в ингибиторных петлях подписаны и показаны красным.

ИП этого семейства преимущественно ингибируют сериновые протеазы, но некоторые представители также способны подавлять аспаратные и цистеиновые^{229,246}. В структурном отношении они представляют собой белки массой ~20 кДа, состоящие из одной

полипептидной цепи, как правило содержат две (возможны другие варианты ²⁴⁷) дисульфидные связи и один реакционный сайт ^{248,249}. Укладка типа Кунитца является одним из вариантов фолда типа β -трефойл или β -трилистник (от англ. – beta-Trefoil), включающего почти десяток суперсемейств белковых доменов (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.c.hd.html>). Ингибитор трипсина из сои STI – первый хорошо изученный представитель семейства Кунитца ²⁵⁰. Этот полипептид с молекулярной массой ~20 кДа состоит из 12 антипараллельных β -тяжей, соединенных посредством протяженных петлевых участков. Шесть β -тяжей образуют короткую антипараллельную β -бочку, закрытую с одной стороны «крышкой», состоящей из еще шести попарно объединенными β -тяжами. Исследования кристаллической структуры комплекса трипсина с ингибитором из *Erythrina caffra* выявили, что в связывании с ферментом участвует один из петлевых участков, а также N-концевая область молекулы ингибитора ²⁵¹. Бычий панкреатический ингибитор трипсина (ВРТИ), один из наиболее изученных пептидных ингибиторов протеаз, также представитель ингибиторов семейства Кунитца животных, имеет несколько другую организацию. Он состоит из 58 а.о. и содержит три дисульфидные связи. Пространственная структура ВРТИ представлена тремя β -тяжами и двумя короткими спиралями – С-концевой α - и N-концевой 3_{10} -спиралью ²⁵² (рисунок 5).

ИП семейства Баумана-Бирка (ББИ)

Первым описанным и наиболее изученным на сегодняшний день представителем этого семейства является ингибитор из сои ^{253,254} (рисунок 6). Впоследствии ББИ были обнаружены во многих растениях семейств злаковые ²⁵⁵ и бобовые ^{256,257}. На основании структурных особенностей ББИ разделяют на подсемейства. Ингибиторы двудольных, как правило, представляют собой пептиды с молекулярной массой ~8 кДа и несут в своем составе два реакционных сайта, способных связывать активные центры трипсина, химотрипсина и эластазы из различных источников. Ингибиторы однодольных растений можно разделить на две группы. Представители первой имеют молекулярную массу ~8 кДа и содержат один реакционный сайт, представители второй – молекулярную массу ~16 кДа и содержат два реакционных сайта. Ингибиторы с двумя реакционными сайтами могут одновременно

связываться с двумя молекулами фермента, в том числе различной субстратной специфичности^{258,259}. Однако, аффинность одного из сайтов может сильно изменяться при связывании ферментом другого. Так, ингибитор из арахиса не ингибирует химотрипсин, если уже связан с трипсином и наоборот²⁶⁰. ББИ имеют в своем составе две гомологичных области, состоящие из трех β -тяжей. Последовательности реакционных сайтов находятся в составе β -шпильки, стабилизированной дисульфидным мостиком и имитирующей нормальный субстрат протеазы. Структура ингибиторов двудольных растений стабилизирована семью дисульфидными связями, в то время как ингибиторов однодольных с молекулярной массой 8 кДа – пятью²⁶¹. Структура реакционной петли для всех ББИ является высоко консервативной и представлена последовательностью из девяти а.о., стабилизированной одной дисульфидной связью: СТР₁ SXPPQC (P₁ – остаток, определяющий специфичность ингибитора; X – любой а.о.). Остатки P₃-P₂' ответственны за непосредственное взаимодействие с протеазой, а остатки пролина участвуют в поддержании необходимой конформации петли. Было показано, что замена пролина в положении P₃' приводит к полной утрате ингибирующей активности. Гидроксильные группы треонина и серина участвуют в формировании внутривителловых водородных связей, кроме того, метильная группа треонина принимает участие во взаимодействии ингибитора с активным сайтом фермента, при этом реализуется гидрофобный эффект^{262,263}.

Среди представителей семейства Баумана-Бирка ингибитор трипсина из подсолнечника SFTI-1 является одним из наиболее эффективных природных ингибиторов растительного происхождения. SFTI-1 интересен своим малым размером (14 а.о.) и циклической структурой пептидного остова. Так же как и прочие представители семейства ББИ, SFTI-1 имеет в своем составе реакционную петлю из девяти а.о., отличающуюся от классической заменой остатка Gln в положении P₅' на остаток Ile.

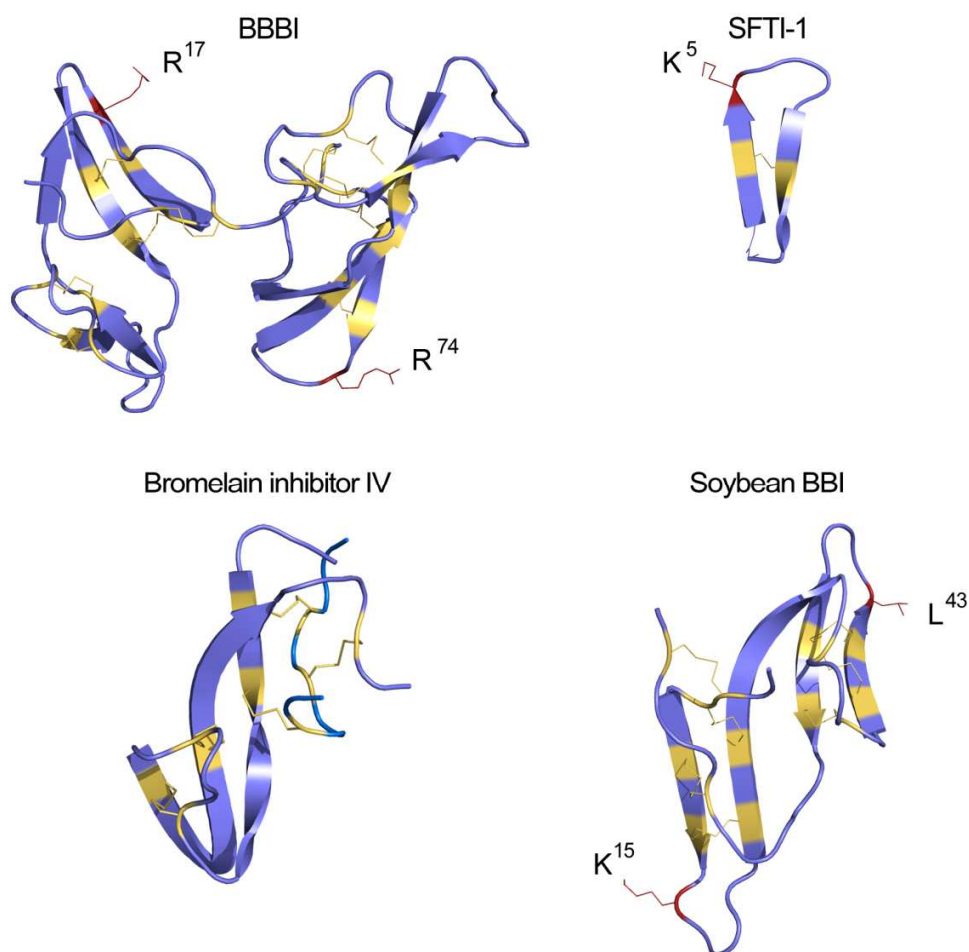


Рисунок 6. Пространственные структуры ИП семейства ББИ. 16 кДа ингибитор BBBI из *Hordeum vulgare*²⁶³ с двумя реакционными сайтами, циклический ББИ SFTI-1 из *Helianthus annuus*²⁶⁴, соевый ББИ с двумя реакционными сайтами из *Glycine max*²⁶⁵, ингибитор цистеиновых протеаз типа Баумана-Бирка ингибитор бромелаина IV из *Ananas comosus*²⁶⁶. Желтым цветом показаны остатки цистеина. Остатки P₁ в ингибиторных петлях подписаны и показаны красным. Голубым показана легкая цепь ингибитора бромелаина IV.

Остальные пять а.о. участвуют в формировании второй петли, замыкающей молекулу в цикл и, по сути, заменяющей дисульфидную связь. Установление пространственной структуры SFTI-1 методом кристаллографии показало, что молекула ингибитора представляет собой двух-тяжевой антипараллельный β-слой, реакционная петля расположена на его конце с поворотом между Gly¹ и Asp¹⁴. Небольшой размер и жесткая структура сводят к минимуму конформационные изменения и связанные с ними энтропийные потери при взаимодействии с активным сайтом фермента, что делает данный ингибитор значительно

эффективнее большинства известных аналогов ²⁶⁴. Кроме того сходной ББИ пространственной организацией обладают некоторые ингибиторы цистеиновых протеаз ²⁶⁶ (рисунок 6).

ИП семейства тыквенных (Squash)

Ингибиторы данного семейства были описаны только у растений и обнаружены в семенах ряда представителей семейства тыквенные (Cucurbitaceae) ^{267–270}, чем и обусловлено название группы. Они представляют собой небольшие 28-30 а.о. одноцепочечные пептиды массой 3-3,5 кДа, содержащие по три дисульфидные связи ²⁶⁷ и формирующие в пространстве структуру ногтинового типа ^{151,271,272}. Отдельные представители этой группы ИП имеют циклическую структуру, на основании чего они также выделяются в качестве подсемейства макроциклических АМП ^{270,273} (рисунок 7).

ИП семейства горчичные (MSI – от англ. Mustard (Sinapis) trypsin inhibitor)

Горчичные ингибиторы представляют собой группу небольших ~7 кДа пептидов, обнаруженных по большей части в семенах растений семейства крестоцветные ^{274–276}. Содержат четыре дисульфидные связи. Пространственная структура была установлена для предшественника ингибитора трипсина из *Arabidopsis thaliana* АТТр методом ЯМР ²⁷⁷ (рисунок 7). Этот пептид состоит из α -спирали и двух антипараллельных β -тяжей, соединенных посредством β -поворота. α -Спираль и ингибиторная петля связаны с β -слоем тремя дисульфидными связями, а четвертая связь соединяет N- и C-концы молекулы. MSI ингибируют преимущественно сериновые протеазы по стандартному механизму ²⁷⁸, но для RTI-2 из *Brassica napus* было показано ингибирование глутаматной протеазы из *Streptomyces griseus* ²⁷⁹.

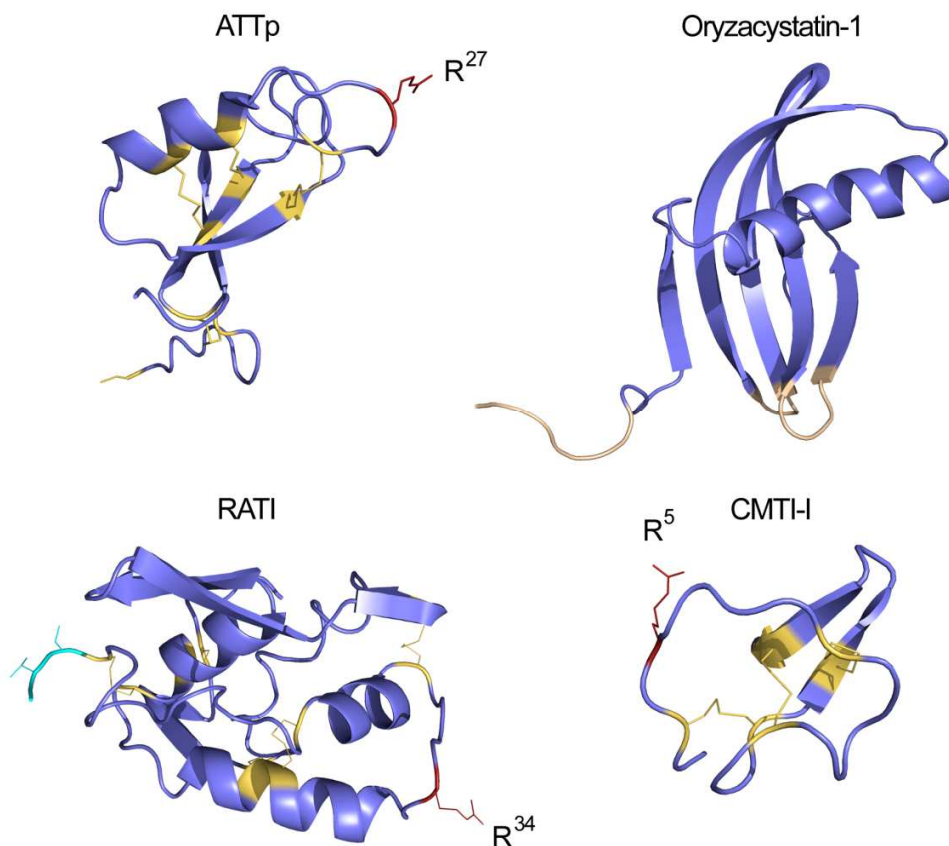


Рисунок 7. Пространственные структуры ИП других семейств. Ингибитор трипсина АТТр семейства MSI из *Arabidopsis thaliana*²⁷⁷, Oryzacystatin-I семейства фитоцистатинов из *Oryza sativa*²⁸⁰, бифункциональный ингибитор трипсина и α -амилаз РАТИ из *Eleusine coracana*²⁸¹, СМТИ-I семейства тыквенных ингибиторов из *Cucurbita maxima*²⁷¹. Желтым цветом показаны остатки цистеина. Остатки P_1 в ингибиторных петлях подписаны и показаны красным. Голубым показана N-концевой трипептид РАТИ, связывающийся с активным центром α -амилаз, бежевым – участки Oryzacystatin-I, участвующие во взаимодействии с цистеиновыми протеазами.

ИП картофеля типа 1 (PI 1)

PI 1 широко распространены в царстве растений и были описаны во многих видах, в том числе в плодах томата^{282,283}, клубнях картофеля²⁸⁴, флоэме тыквы²⁸⁵, в листьях пасленовых в ответ на повреждения²⁸⁶. PI 1 имеют молекулярную массу ~8 кДа. У ингибиторов из тыквы и клубней картофеля есть по одной дисульфидной связи, хотя в большинстве своем PI 1 не содержат дисульфидов²⁸⁷. Молекула гВТИ из семян гречихи

построена из α -спирали, двух антипараллельных β -тяжей, расположенной между ними ингибиторной петли и неупорядоченных структур в N- и C-концевых областях молекулы, зафиксированных дисульфидной связью²⁴⁵ (рисунок 5). Кроме ингибирования сериновых протеаз для PI 1 были показаны активность в отношении глутаматной протеазы V8 из *Staphylococcus aureus*²⁸² а также подавление роста опухолевых клеток²⁴⁵.

ИП картофеля типа II (PI 2)

Ингибиторы этой группы были обнаружены в цветах, плодах, листьях и флоэме растений семейства пасленовые^{288–291}. PI 2 имеют составную мультидоменную организацию и могут состоять из 2-8 повторяющихся структурных единиц. Картофельный ингибитор TI-II активный в отношении трипсина, химотрипсина и субтилизина состоит из двух структурно сходных доменов, каждый из которых способен к независимому связыванию молекулы фермента. Каждый домен состоит из небольшого упорядоченного фрагмента, образованного трехтяжным β -слоем, и нескольких протяженных петель, стабилизированных четырьмя дисульфидными мостами^{244,292} (рисунок 5).

Фитоцистатины, растительные ингибиторы цистеиновых протеаз.

Растительные цистатины, или фитоцистатины, являются семейством ингибиторов цистеиновых протеаз и входят в состав суперсемейства цистатинов наряду с еще тремя семействами²⁹³. Они были обнаружены в рисе²⁹⁴, кукурузе²⁹⁵, сое²⁹⁶, гвоздике²⁹⁷, ананасе²⁹⁸ и ряде других одно- и двудольных растений^{299–301}. Оризастатин 1 – цистатин из риса является небольшим белком (140 а.о.), состоящим из β -слоя из 5 β -тяжей обернутого вокруг центральной α -спирали²⁸⁰. В связывании с ферментом принимают участие три структурных элемента – две петли, несущие в своем составе консервативные мотивы Gln-X-Val-X-Gly и Pro(Leu)-Trp и непосредственно проникающие в активный сайт протеазы, и короткий N-концевой участок, содержащий консервативный остаток Gly и обуславливающего высокую специфичность в отношении цистеиновых протеаз^{302,303} (рисунок 7). Подобной структурой помимо цистатинов обладает также ингибитор пепсина SQAPI из тыквы³⁰⁴. Большинство растительных цистатинов имеют такую организацию, второе меньшее подсемейство

фитоцистатинов имеет мультидоменную организацию. К ним относят ингибиторы из листьев томата и клубней картофеля^{216,305}. Экспрессия генов цистатинов в организме растения как правило специфична и приурочена к определенным органам и тканям, стадиям развития и условиям окружающей среды^{296,306,307}.

Злаковые ингибиторы трипсина/α-амилаз

Злаковые ингибиторы трипсина/α-амилаз способны ингибировать сериновые протеазы и/или α-амилазы²⁸¹. Многие ингибиторы этого семейства имеют только антиамилазную активность, трипсин же ингибируют лишь некоторые представители³⁰⁸. Злаковые ингибиторы трипсина/α-амилаз состоят из одной цепи, содержащей пять дисульфидных связей, и имеют массу ~13 кДа²⁸⁹. Они состоят из четырех попарно объединенных α-спиралей и небольшого β-слоя. Два реакционных сайта располагаются на противоположных концах вытянутой молекулы³⁰⁸ (рисунок 7).

Ингибиторы аспартатных и металлопротеаз

Известно два семейства растительных ингибиторов протеаз других механистических классов: ингибиторы металлокарбокисептидаз (ИМ) из томата и картофеля и ингибиторы катепсина D из картофеля.

ИМ представляют собой пептиды длиной ~40 а.о. и массой ~4 кДа³⁰⁹. Они высоко активны в отношении металлопротеаз животных и микроорганизмов, однако не ингибируют ферменты из дрожжей и растений³¹⁰. В ответ на повреждения накапливаются в большом количестве в листьях наряду с ингибиторами других семейств¹⁷¹. Гомологичные им пептиды были обнаружены в тканях различных животных^{311–313}.

Аспартатные ИП были обнаружены в цветах подсолнечника³¹⁴, ячменя³¹⁵, клубнях картофеля^{316,317}. Картофельный ингибитор катепсина D является гомологом STI³¹⁶. Как и другие ИП семейства Кунитца, он способен ингибировать трипсин и химотрипсин³¹⁶.

Заключение

Растительные ЗП, таким образом, представляют собой достаточно многообразную (как в функциональном, так и в структурном отношении) и повсеместно распространенную группу защитных полипептидов. В приведенной выше классификации перечислены наиболее изученные на данный момент семейства. Помимо них существует множество ЗП, выделенных из различных растительных источников и, по всей видимости, не относящихся ни к одному из описанных семейств, которым еще предстоит пополнить эту систему.

Несмотря на то, что количество реализующихся пространственных решений организации ЗП не так велико, они способны выполнять большой набор различных задач, объединенных единственной общей целью – защитой организма растения от неблагоприятных условий среды. В приведенных выше примерах хорошо видно, что устроенные сходным образом молекулы могут выполнять совершенно различные функции. При этом стоит отдельно отметить структурное родство некоторых семейств растительных ЗП с пептидами, выделенными из крайне далеких от растений таксонов и выполняющих совершенно иные функции. Например, цитолитические пептиды скорпионов и нейротоксины пауков похожие соответственно на дефензины и ноттиноподобные пептиды растений. В то же время существует и обратная взаимосвязь, когда сходной функцией обладают представители разных групп. В связи с этим возникает закономерный вопрос о происхождении подобных явлений. Стало ли появление структурно сходных молекул, выполняющих разную функцию, результатом конвергенции между исходно различными полипептидами? Либо же наоборот, имеющиеся функциональные различия между сходно устроенными пептидами возникли в процесс дивергентного расхождения в ходе эволюции некоего общего предка?

К сожалению, несмотря на успехи в изучении ЗП, по-прежнему непонятно, каким образом на молекулярном уровне реализуются различные биологические эффекты отдельных пептидов. Так, для большинства известных АМП существуют только предположительные схемы реализации защитной функции, как правило, сводящиеся к непосредственному воздействию на клеточную мембрану и нарушению ее целостности. В то же время все больше данных указывает на наличие внутриклеточных мишеней действия для представителей различных семейств АМП.

Как бы то ни было, изучение ЗП, очевидно, представляет интерес не только с точки зрения фундаментальной науки для установления взаимосвязи функции и определяющих ее структурных детерминант, а также механизмов молекулярной эволюции и межвидовой коэволюции в системе патоген-хозяин, но и в связи с возможностью их использования в сельскохозяйственной биотехнологии, медицине и промышленности.

Материалы и методы

1. Материалы

Агар, агароза, бактотриптон, дрожжевой экстракт (Becton Dickinson, Франция); ампициллин (Красфарма, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия); уксусная кислота, глицерин (Химмед, Россия); энтеропептидаза (энтерокиназа, КФ 3.4.21.9; ИБХ РАН); плазида pET-32b (Novagen, США); рестриктазы *Bam*HI, *Eco*RI и *Kpn*I, ДНК-лигаза фага T4, полинуклеотидкиназа, Taq полимеразы, аденозин-5'-трифосфат (АТФ), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), лигазный буфер, буфер Multicore, буфер *Bam*HI, набор реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, набор реактивов Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega); трис-(гидроксиметил) аминотетан (Трис), бромфеноловый синий, бромциан, додецилсульфат натрия (ДСН), 2-меркаптоэтанол, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), бычий трипсин, бычий химотрипсин, человеческая эластаза, субтилизин, N-α-бензоил-DL-аргинил-*n*-нитроанилид гидрохлорид (BAPNA), N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-*n*-нитроанилид, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Leu-*n*-нитроанилид, пироглутамил-Ala-Ala-Leu-*n*-нитроанилид (GlpAALpNA), пироглутамил-Phe-Ala-*n*-нитроанилид (GlpFAPNA) диметилсульфоксид (ДМСО), CaCl₂, K₂HPO₄, MgSO₄, MgCl₂, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaOH, ¹⁵NH₄Cl, глюкоза, гуанидингидрохлорид, 1,4-дителиотреилол (ДТТ), тритон X-100, набор стандартных полипептидов ProteoMass peptide and protein MALDI-MS calibration kit (0,7-66 кДа), α-циано-4-оксикоричная кислота (CHCA), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), isogro ¹⁵N, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma, США); эндопротеиназа Glu-C (Boehringer Mannheim GmbH, Германия), тиамин гидрохлорид (Veropharm, Россия); HCl, ацетат натрия, имидазол, Кумасси G-250 и R-250, метанол, персульфат аммония (ПСА), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), трифторуксусная кислота (ТФУ), этанол, изопропанол, хлораформ (Merck, Германия); стандарты для электрофореза (Amersham, США), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG) (Avanti polar lipids inc., США).

2. Оборудование

Автоматические пипетки на 20, 200, 1000 мкл (Gilson, Франция), вакуумный концентратор (Savant, США), встряхиватель пробирок (модель MS1, Ika Works, США), градиентный хроматограф (Kontron instruments, Италия), дегазер ERC-3415 α (ERC INC, Италия), детектор 535 (Kontron instruments, Италия), источник питания EPC 500 (Pharmacia Fine Chemicals, США), градиентный хроматограф (модель 1525, Waters, США), детектор (модель 2489, Waters, США), колбы стеклянные (Симас, Россия), лабораторный pH-метр PHM63 (Radiometer, Дания), масс-спектрометр M@LDI-LR (Micromass, Великобритания), набор шприцов на 10, 100, 500, 1000 мкл (Hamilton, США), настольные весы (Sartorius, США), спектрофотометр Ultraspec II (ЛКВ, Франция), спектрофотометр U-3210 (Hitachi, Япония), секвенатор белков Procise 492 (Applied Biosystems, США), низкотемпературный холодильник (Sanyo, Япония), встряхиватель пробирок ВП-2 (Украина), встряхиватель с термостатом (Thermomixer 5436; Eppendorf), центрифуга (модель 5414; Eppendorf), центрифуга Minifuge GL (Heraeus Christ, США), шпатели (Биолаб, Россия), прибор для лиофильной сушки FreeZone 2,5 (Labconco, США), колонки для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ): Jupiter C₅ (250×10 мм), Jupiter C₅ (250×21,2 мм), Jupiter C₅ (150×4,6 мм), Luna C₁₈ (150×2 мм) (Phenomenex, США), ReproSil-Pur C₁₈ (250×4 мм; Dr. Maisch, Германия), Vydac 218TP54 C₁₈ (4,6×250 мм; Separations Group, США), термостатический циркулятор Multitemp2 (ЛКВ, Швеция), система для электропорации Cellject (Eurogentec, Бельгия), ультразвуковой дезинтегратор Ultrasonic processor (Cole Parmer, США), камера для агарозного электрофореза (170×120 мм; Helicon, Россия), камера для полиакриламидного электрофореза 2050 MIDGET (ЛКВ), термостат Certomat H (Sartorius AG, Германия), шейкер innova 2000 (New Brunswick Scientific, США), миниэкструдер (Avanti polar lipids inc., США).

Расходные материалы. Пробирки объемом 0,4, 1,7, 4, 15, 50 мл (Eppendorf, Германия), парафиновая пленка Microseal A Film (MJ Research, США), наконечники для пипеток (QSP, США), чашки Петри (Симас, Россия), сорбент для аффинной хроматографии TALON Superflow (Clontech, США), одноразовые спектрофотометрические кюветы (Sarstedt, Германия), набор бумажных фильтров (GE Healthcare, СК).

Бактериальные штаммы: *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1 Blue, DH5 α , BL21 (DE3) (Promega, США).

Штаммы грибов: *Fusarium graminearum* F-1668, *Colletotrichum graminicola* F-1185, *Fusarium verticillioides* F-670, *Diplodia maydis* F-2832 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, Россия).

Буферные растворы. Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм), полученной на установке Millipore (США). Для биологических испытаний использовалась стерилизованная с помощью автоклавирования вода.

1. Растворы для хроматографических разделений:

А1: 0,1% ТФУ в воде;

Б1: 0,1% ТФУ в ацетонитриле;

2. Раствор матрицы для МАЛДИ масс-спектрометрии:

10 мг/мл СНСА в 50%-ном ацетонитриле и 0,1% ТФУ.

3. Буфер для проведения реакции восстановления дисульфидных связей дитиотреитолом:

6 М гуанидингидрохлорид, 3 мМ ЭДТА, 0,5 М Трис-НСl (рН 8,5).

4. Питательные среды:

LB: 1% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6).

Твердая LB: LB с добавлением 1,5 % агара.

«Минимальная» среда M9: 337,5 мг/л тиамин, 1 мМ MgSO₄, 0,1 мМ CaCl₂, 0,2% глюкозы, 0,1% ¹⁵NH₄Cl, 0,6% NaH₂PO₄, 0,3% K₂HPO₄, 0,05% NaCl.

5. Буферные растворы для практической молекулярной биологии:

Буфер для полимеразной цепной реакции (ПЦР, 10 \times ; ИБХ РАН, Россия): 0,5 М Трис-НСl (рН 8,6), 0,5 М KCl, 15 мМ MgCl₂, 1% Твин.

Буфер для лигирования T4 DNA (10 \times ; Promega): 300 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 100 мМ MgCl₂, 100 мМ ДТТ, 10 мМ АТФ.

Буфер для проведения рестрикции MultiCore (10×; Promega).

6. Буферные растворы для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле:

ТАЕ-буфер: 40 мМ Трис-ацетат (рН 7,6), 1 мМ ЭДТА.

Буфер для нанесения образцов: 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола, 30% глицерина.

7. Буферные растворы для аффинной хроматографии:

Стартовый буфер: 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 300 мМ NaCl.

«Промывочный» буфер: 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 0,1% Тритон X-100, 500 мМ NaCl, 5% глицерин, 5 мМ имидазол.

Элюирующий буфер: 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазол.

8. Буферные растворы для электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ электрофорез):

Буфер для концентрирующего геля (5%): 0,8 мл 30%-ного раствора смеси акриламид/бисакриламид (в соотношении 29:1), 1,25 мл 0,5 М Трис-НСl (рН 6,8), 2,95 мл H₂O, 50 мкл 10% ДСН, 5 мкл ТЕМЕД, 17 мкл 10% ПСА.

Буфер для разделяющего геля (15%): 3,6 мл H₂O, 3,6 мл 50% глицерина, 4,5 мл 1,5 М Трис-НСl (рН 8,8), 6 мл 30%-ного раствора смеси акриламид/бисакриламид (в соотношении 29:1), 180 мкл 10% ДСН, 12 мкл ТЕМЕД, 60 мкл 10% ПСА.

Электродный буфер: 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 250 мМ глицин, 0,1% ДСН.

Буфер для приготовления образцов (2×): 4 мкл 10% ДСН, 2,5 мл 1,5 М Трис-НСl (рН 8,8), 2,5 мл 50% глицерина, 0,9 мл H₂O, 0,1 мл 0,5 М ЭДТА, 2% 2-меркаптоэтанола, 0,1 мл 0,05% бромфеноловый синий.

Раствор для окрашивания ПААГ: 0,06% красителя Кумасси R250, 10% уксусной кислоты, 30% изопропилового спирта.

Раствор для отмывки краски: 7% уксусной кислоты, 10% этанола.

9. Буферные растворы для приготовления компетентных клеток:

Буфер RF1: ацетат калия 1М 12 ml, KCl 1М 40 ml, CaCl₂ 1М 4 ml, 100% глицерин 48ml - довести до 380 ml (рН=5.8).

Буфер RF2: MOPS 0,2 М 5ml, KCl 1M 1ml, CaCl₂ 1M 7,5 ml, 100% глицерин 12ml - довести до 100 ml (pH=6,5-6,8).

Буфер SOB: бактотриптон 20 г/л, дрожжевой экстракт 5,5 г/л, NaCl 20 mM, KCl 1mM, 20 mM Mg²⁺ (MgCl₂+MgSO₄).

10. Буфер для липосом:

110 mM NaCl, 50 mM Na_xH_xPO₄ (pH=7,2)

3. Программное обеспечение

Программа сбора и обработки данных МАЛДИ масс-спектрометрии MassLynx 4.0 (Waters, США), программа для обработки хроматограмм KromaSystem 2000 (BioTek Instruments, США) и Breeze 2 (Waters, США), программа для работы с полипептидными последовательностями GPMW 4.0 (Lighthouse data, Дания), программа для поиска 3D структур (<http://www.rcsb.org/pdb>) молекулярно-графическая система PyMOL (DeLano Scientific, США), программы для работы с растровыми и векторными изображениями Adobe Photoshop CS3, Adobe Illustrator CS3 (Adobe Systems, США), программа для обработки сиквенсов EditSeq (DNASTAR, США; <http://www.dnastar.com/>).

4. Методы

1. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ)

1. Разделение активной фракции, полученной в результате аффинной и ионообменной хроматографии, проводили на колонке ReproSil-Pur C₁₈ (250×4 мм, Dr. Maisch) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 10% до 48%) в присутствии 0,1% ТФУ.

2. Разделение продуктов восстановления/алкилирования пептидов проводили на той же колонке в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 10% до 40%) в присутствии 0,1% ТФУ.

3. Разделение продуктов гидролиза пептидов бромцианом проводили на той же колонке в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0% до 32%) в присутствии 0,1% ТФУ.

Все перечисленные выше хроматографические разделения проводились в течение 60 мин со скоростью элюции 0,7 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 214 нм.

4. Аналитическое разделение продуктов гидролиза гибридных белков с тиоредоксином проводили на колонке Jupiter C₅ (150×4,6 мм, Phenomenex) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0% до 60%) в присутствии 0,1% ТФУ в течение 60 мин со скоростью элюции 1 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 210 и 280 нм. Полупрепаративное разделение осуществляли в таком же градиенте на колонке Jupiter C₅ (250×10 мм, Phenomenex) со скоростью элюции 5 мл/мин или Jupiter C₅ (250×21,2 мм, Phenomenex) со скоростью элюции 10 мл/мин.

5. Сравнение хроматографических подвижностей рекомбинантных и природных пептидов проводили на колонке Luna C₁₈ (150×2 мм, Phenomenex) в градиенте концентрации ацетонитрила (от 15% до 45%) в течение 60 мин, со скоростью элюции 0,25 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 210 и 280 нм.

2. Масс-спектрометрия

Измерение молекулярных масс, а также оценку индивидуальности полученных веществ проводили с помощью масс-спектрометрии (МС). Использовали метод времяпролетной (time-of-flight, TOF) матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) (matrix-assisted laser desorption/ionization) МС, т.е. десорбционный метод «мягкой» ионизации МАЛДИ, тип масс-анализатора времяпролетный. При нанесении образцов использовали наиболее распространенный метод «высушенной капли» (“dried-droplet”). В качестве матрицы использовали СНСА (10 мг/мл) в 70%-ном ацетонитриле и 0,1% ТФУ. Калибровку приборов M@LDI-LR (Micromass, Manchester, Великобритания) и Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия) проводили с использованием набора стандартов ProteoMass peptide and protein MALDI-MS calibration kit (700-66000 Да). Масс-спектры анализировались с помощью программы Bruker Data Analysis for TOF.

3. Восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом

Реакции восстановления дисульфидов и алкилирования тиолов вели согласно модифицированной методике {Thomsen, 1988 #1771}. Учитывались практические советы и теоретические соображения, приведенные в работе (140). 10 нмоль пептида BWI-2c растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 6 М гуанидингидрохлорид, 3 мМ ЭДТА, 0,5 М Трис-НСl (рН 8,5). Затем добавляли 2 мкл 1,4 М ДТТ в воде, т.е. заведомо 100-кратный избыток по отношению к дисульфидным связям и тщательно перемешивали с последующим кратковременным центрифугированием при 10 тыс.об./мин для осаждения капель на дно пробирки. Пробирки тщательно продували азотом. Пробы инкубировали в течение 4 ч при 40°C на встряхивателе. По окончании реакции проводили алкилирование образовавшихся тиольных групп как описано ниже, продукты реакции выделяли методом ОФ-ВЭЖХ.

4. Алкилирование тиольных групп 4-винилпиридином

К восстановленному образцу добавляли 4 мкл 50%-ного 4-винилпиридина в изопропанолe, т.е. более чем 10-кратный избыток по отношению к ДТТ, встряхивали, центрифугировали. Невосстановленный образец высушивали на вакуумном концентраторе и растворяли в 40 мкл буфера, использовавшегося для реакции с ДТТ, после чего сразу добавляли 4 мкл раствора винилпиридина. Пробы инкубировали 15-20 мин при комнатной

температуре в темноте в атмосфере азота, после чего проводили хроматографическое разделение продуктов методом ОФ-ВЭЖХ согласно описанной выше методике с использованием колонки ReproSil-Pur C₁₈. При этом сначала изократически элюировали побочные продукты реакции и остатки реагентов, сильно поглощающие в УФ-области до установления ровной базовой линии, затем выделяли модифицированный компонент в градиентном режиме.

5. Определение N-концевой аминокислотной последовательности.

Определение N-концевой последовательности очищенных пептидных компонентов проводили методом ступенчатой деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе Procise 492 (Applied Biosystems, США) по методике фирмы-изготовителя. Остатки цистеина определялись в виде пиридилэтилированного производного.

6. Селективный гидролиз полипептидов

Селективную фрагментацию полипептидных последовательностей для разных целей осуществляли по остаткам метионина с использованием бромциана; по остаткам глутаминовой кислоты с помощью эндопротеиназы Glu-C, по остаткам аргинина и лизина с помощью бычьего панкреатического трипсина. Для гидролиза гибридных белков использовалась энтеропептидаза человека (легкая цепь).

6.1. Расщепление полипептидов бромцианом

Высушенные на вакуумном концентраторе 1–3 нмоль полипептидов растворяли в 80%-ной водной ТФУ до концентрации 0,1–1 мкг/мкл. Раствор 5 М бромциана в ацетонитриле (Sigma-Aldrich, США) прибавляли с заведомо 100-кратным избытком по отношению к остаткам метионина, пробы перемешивали и оставляли на 18 ч при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали разбавлением смеси 10-ю объемами воды, пробы высушивали на вакуумном концентраторе, растворяли в 0,1% ТФУ. Продукты реакции разделяли по методу ОФ-ВЭЖХ на аналитической колонке Vydac 218TP54 C₁₈ (4,6×250 мм) с последующим анализом фрагментов с помощью МАЛДИ-МС.

6.2. Ферментативный гидролиз полипептидов

Очищенный высушенный полипептидный препарат растворяли в соответствующем буфере (50 мМ гидрокарбоната аммония (pH 8) – Glu-C; 50 мМ Tris HCl (pH 8) для бычьего трипсина). В раствор добавляли фермент в массовом соотношении к пептиду 1:50. Гидролиз вели в течение 4 ч при термостатировании (37°C), продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на аналитической колонке Vydac 218TP54 C18 (4,6×250 мм). Отобранные фракции анализировали с помощью МС.

7. Определение концентрации полипептидов. УФ-спектрофотометрия

Для получения спектров поглощения веществ в УФ-области некоторое их количество высушивали лиофильно, после чего растворяли в 0,5 мл воды. В работе использовали спектрофотометр U-3210 (Hitachi, Япония); длина оптического пути (толщина кюветы) составляла 1 см, раствором сравнения служила чистая вода.

Концентрацию белка определяли, используя расчетный молярный коэффициент поглощения при 280 нм, по формуле:

$$C = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon, \text{ где}$$

C – концентрация пептида в моль/л,

A₂₈₀ – оптическая плотность раствора при 280 нм,

A₃₂₀ – оптическая плотность раствора при 320 нм,

ϵ – молярный коэффициент поглощения при 280 нм. Расчетные значения молярного коэффициента поглощения при 280 нм для полипептидов с известной аминокислотной последовательностью получали с помощью программы GPMW (Lighthouse data, Дания).

8. Полимеразная цепная реакция

Реакционная смесь (200 мкл) содержала буфер для ПЦР, смесь четырех dNTPs (0,2 мМ каждого), праймерные олигонуклеотиды (до конечной концентрации 0,5-1 мкМ), 1-10 нг матричной ДНК и 2,5 единицы Taq-полимеразы. Условия ПЦР: денатурация (93°C) – 20 сек; отжиг (T_m°C) – 20 сек; элонгация (72°C) – 30 сек, 25 циклов. Для разных задач условия

реакции и компоненты смеси могли варьировать. ПЦР проводили в автоматических амплификаторах.

9. Рестрикция линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-32b

Рестрикцию проводили в буфере MultiCore (Promega) или *VamH1* с двойным избытком фермента *Kpn1*, оптимальном для работы ферментов *VamH1* и *Kpn1*. Для расщепления 1 мкг ДНК использовали 4 единицы активности каждой рестриктазы. Стандартная реакционная смесь (20 мкл) содержала 2 мкл 10× буфера для рестрикции и по 2 мкл стокового раствора каждого фермента. Реакцию проводили в течение 3 ч при 37°C. В качестве контроля проводили рестрикцию плазмиды каждым из ферментов по отдельности.

10. Лигирование линейных фрагментов ДНК и лианеризованной плазмиды pET-32b

Реакционная смесь (15 мкл) содержала: 1,5 мкл 10× буфера для лигирования, 10 мМ АТФ, 10 нг плазмиды, расщепленной по сайтам *VamH1* и *Kpn1*, 10 нг линейных фрагментов ДНК, расщепленных по тем же сайтам рестрикции, и 1 мкл раствора ДНК-лигазы фага T4. Лигазную смесь инкубировали в течение ночи при температуре 16°C на водяной бане.

11. Электрофорез в агарозном геле

11.1 Приготовление образцов

На несмачиваемую поверхность наносили 1 мкл буфера для нанесения образцов. Пипеткой отбирали 3-7 мкл анализируемого раствора ДНК и смешивали с буфером, получившуюся каплю переносили в лунку в геле.

11.2 Электрофорез

Использовался 1%-ный агарозный гель с лунками нужного объема. Электрофорез проводился в буфере TAE в камере для агарозного электрофореза (170×120 мм; Helicon) при напряжении 139 В и силе тока 190 мА.

12. Выделение ДНК из агарозного геля

Необходимую ДНК детектировали в виде светящихся полос при облучении УФ-светом, вырезали соответствующие кусочки геля скальпелем и помещали их в 1,5 мл-пробирки.

Выделение ДНК из геля проводилось с использованием набора реактивов Wizard Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) в соответствии с методикой фирмы-производителя.

13. Трансформация E. coli методом электропорации

13.1 Приготовление компетентных клеток

Из замороженной музейной культуры (-70°C) стерильной микробиологической петлей переносили несколько мкг клеток в 50 мл-пробирку, содержащую 5 мл среды LB. Клетки растили при 37°C на качающейся платформе до оптической плотности 0,6-0,8 ед. при 600 нм (OD_{600}). После этого 1 мл ночной культуры клеток переносили в колбу с 200 мл жидкой среды LB и инкубировали при 37°C до достижения оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,4-0,6$. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 4 тыс.об./мин. Осадок ресуспендировали в холодной воде (4°C) и снова центрифугировали; операцию повторяли 2 раза. Затем к клеткам добавляли 1 мл 10%-ного глицерина, ресуспендировали и переносили в 1,5-мл пробирки по 90 мкл суспензии. Пробирки замораживали в жидком азоте, хранили при -70°C .

13.2 Электропорация

45 мкл размороженных на льду компетентных клеток помещали в кювету для электропорации и добавляли 3 мкл лигазной смеси. Параметры электроимпульса выставляли согласно рекомендациям фирмы-производителя электропоратора Cellject (Eurogentec). После импульса к клеткам сразу же добавляли 700 мкл охлажденной на льду среды LB, суспензию переносили в 1,5 мл-пробирку, инкубировали 5 мин на льду, а затем 1 ч при 37°C . Весь объем суспензии переносили на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением ампициллина (70 мкг/мл) в качестве селективного фактора. Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи.

14. Трансформация E. coli методом теплового шока

14.1 Приготовление компетентных клеток

С чашки без антибиотика с заранее рассеянными клетками смывали колонии в SOB комнатной температуры и переносили в 300 ml SOB с добавлением 1M MgSO_4 и доращивали до до оптической плотности 0.8-1.2 при 600nm. RF1, RF2 и 1M MgSO_4 охлаждали на льду. Нарощенные клетки центрифугировали 10' 4000 тыс.об./мин, после чего осадок

ресуспендировали в 150 ml RF1 и снова центрифугировали 10' 4000 тыс.об./мин. Осадок ресуспендировали 15 ml RF2, аликвотили по 100 mkl и замораживали в жидком азоте.

14.2 Трансформация

Компетентные клетки, размороженные на льду, и лигазную смесь смешивали в объемном соотношении 10 к 1, инкубировали 30' на льду, после чего помещали на 1,5' на 42°C. Затем добавляли 900 мкл LB без антибиотика и ставили на 37°C на 45'. По истечении указанного времени центрифугировали 10' 4000 тыс.об./мин, осадок ресуспендировали в малом объеме LB и размазывали на чашку с антибиотиком.

15. Выделение плазмидной ДНК

5 мл ночной культуры *E. coli* центрифугировали при 6 тыс.об./мин, супернатант сливали. Процедура препаративного выделения плазмидной ДНК проводилась с использованием набора реактивов Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) в соответствии с методикой фирмы-производителя.

16. Секвенирование ДНК

150 нг очищенной плазмидной ДНК смешивали с 3,2 пкмоль праймера pET-HindSeq (5'-CTTCCTTTCGGGCTTTG-3') и высушивали при 65°C на воздухе. Образцы подвергались секвенированию по методу Сэнгера в Центре коллективного пользования «Геном» на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

17. Контролируемая экспрессия гибридного белка в клетках *E. coli*

Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидой, несущей ген гибридного белка, разбавляли жидкой питательной средой LB с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) в 200 раз. Клетки инкубировали при 37°C и перемешивании (200 об./мин) до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$, после чего добавляли индуктор (ИПТГ) в концентрации 0,2 мМ. Экспрессию проводили при комнатной температуре в течение 16 ч.

18. Выделение растворимой фракции белков из клеток E. coli

После проведения экспрессии клетки (200 мл культуры) осаждали центрифугированием (10 мин, 4,5 тыс.об./мин), ресуспендировали в 25 мл стартового буфера для аффинной хроматографии с добавлением 5% глицерина. Разрушение клеточных оболочек проводилось с использованием ультразвукового дезинтегратора Ultrasonic processor (Cole Parmer) при постепенном увеличении амплитуды от 25 до 33% с шагом в 2%.

19. Аффинная хроматография

Клеточный лизат наносили в стартовом буфере на колонку TALON Superflow (Clontech) со скоростью потока 1 мл/мин. Для исключения возможности неспецифической сорбции колонку промывали «промывочным» буфером. Для получения связавшейся фракции использовали элюирующий буфер. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 280 нм. Отобрали по 50 мкл из клеточного лизата, не связавшейся белковой фракции и очищенного белка в качестве образцов для последующего проведения электрофореза в ДСН-ПААГ.

20. Ферментативный гидролиз гибридного белка с использованием энтеропептидазы

Полученный гибридный белок подвергали обессоливанию на колонке Jupiter C₅ (4,6×150 мм, Phenomenex). Элюцию осуществляли ступенчатым повышением концентрации ацетонитрила (от 0% до 70%) в присутствии 0,1% ТФУ со скоростью потока элюента 1 мл/мин. Образец белка высушивали на вакуумном концентраторе, перерастворяли в воде, добавляли Трис-НСl (рН 8,0) до концентрации 20 мМ, конечная концентрация гибридного белка составляла 1 мг/мл. К раствору белка добавляли необходимое количество раствора энтеропептидазы (ИБХ РАН) из расчета 1 единица фермента на 1 мг белкового субстрата. Смесь инкубировали при 37°C в течение 16 ч.

21. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

Денатурирующий гель-электрофорез проводили в 15%-ном разделяющем ПААГ. Перед нанесением в образцы добавляли буферный раствор, содержащий краску в соотношении 1:1, и кипятили на водяной бане 15 мин. Электрофорез проводили в камере для

полиакриламидного электрофореза 2050 MIDGET (LKB) при силе тока 15мА в концентрирующем геле и 30 мА в разделяющем геле. После окончания электрофореза (выхода красителя из геля) проводили окрашивание белков с помощью Кумасси R-250. Для этого гель выдерживали в течение 2 ч в растворе для окрашивания ПААГ. Отмывку от избытка красителя проводили в нескольких сменах раствора для отмывки краски.

22. Тестирование ингибирующей активности

Препараты пищеварительных ферментов из кишечника жуков *Blattella germanica*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* и гусеницы бабочки *Galleria mellonella* были приготовлены в соответствии с ³¹⁸. Протеолитическая активность экстрактов измерялась спектрофотометрически согласно ³¹⁸. Для определения активности ферментов использовались следующие хромогенные субстраты: N- α -бензоил-DL-аргинил-*n*-нитроанилид гидрохлорид (BAPNA) для трипсиноподобных ферментов, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-*n*-нитроанилид для химотрипсина, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Leu-*n*-нитроанилид для эластазы, пироглутамил-Ala-Ala-Leu-*n*-нитроанилид (GlpAALpNA) для субтилизина и пироглутамил-Phe-Ala-*n*-нитроанилид (GlpFAPNA) для цистеиновых протеаз. Трипсин растворяли в 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) до конечной концентрации 0,5 nM. Химотрипсин, эластазу и субтилизин растворяли в 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), до концентраций 1мкг/мл, 10 мкг/мл, и 50 мкг/мл, соответственно. Ферменты инкубировались 10' при 37°C в присутствии различных концентраций пептидов. Остаточная ферментативная активность определялась с использованием соответствующих хромогенных субстратов (конечная концентрация всех субстратов была 0,5 мг/мл). Кинетику высвобождения *n*-нитроанилида измеряли при помощи спектрофотометра по поглощению при 405 нм. Константы ингибирования были рассчитаны согласно оригинальной методике ³¹⁹.

23. Приготовление липосом

Навеску липида 10 мг растворяли в 150 мкл смеси хлороформ-метанол (v/v - 2/1) и выпаривали на роторном испарителе с охлаждением на водяной бане. Упаренные липиды высушивали на лиофильной сушке в течение ночи. Высушенное вещество ресуспендировали в 2 мл буфера для липосом и озвучивали 15' на ультразвуковой бане. После этого полученную эмульсию пропускали через экструдер с фильтром с диаметром пор 1 мкм 30 раз.

24. Тестирование способности пептидов к взаимодействию с липидными везикулами

Лиофильно высушенные пептиды растворяли в 150 мкл того же раствора, что использовался для приготовления липидных везикул. Затем к одному образцу добавили 150 мкл суспензии мультиламеллярных липидных везикул с концентрацией 10 мг/мл по липиду, а к другому – 150 мкл буфера для липосом. Образцы инкубировали в течение 1 часа при 37°C, центрифугировали со скоростью 14000 об/мин, после чего супернатант разделяли методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅ (150×4,6 мм) в линейном градиенте концентрации раствора В (от 0 до 60%) в течение 60 мин со скоростью элюции 1 мл/мин.

25. Измерение антифунгальной активности

Тестирование фунгицидной активности пептида проводили методом серийных разведений в 96-луночных планшетах. В каждую лунку планшета вносили 10 мкл пептида соответствующего разведения и 90 мкл картофельно-декстрозного бульона, содержащего ~10⁴ спор грибов/мл. Контроль за прорастанием спор производили с помощью измерения оптического поглощения при длине волны 620 нм.

Результаты и обсуждения

1. Выделение и структурная характеристика ингибитора трипсина из семян гречихи

В ходе работы по поиску новых растительных ингибиторов сериновых протеаз сотрудниками Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, а также Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН из семян гречихи культурной *Fagopyrum esculentum* был выделен ряд веществ полипептидной природы, обладавших ингибиторной активностью в отношении трипсина^{320,321}. Для этого были последовательно осуществлены следующие операции: на первом этапе работы из гомогенизированных сухих семян гречихи в фосфатном буфере была экстрагирована полипептидная фракция, которая после высаливания сульфатом аммония была на следующем этапе разделена методом аффинной хроматографии на трипсин-сефарозе 4В, что позволило отделить фракцию компонентов, связывающих трипсин. Далее методом ионообменной хроматографии на анионообменной смоле Mono-Q и катионообменной смоле Mono-S были выделены несколько фракций, обладавших трипсин-ингибирующей активностью. Дальнейшая работа велась с фракцией катионных ингибиторов, удерживаемых на смоле Mono-S.

Поскольку протеолитические ферменты могут инактивироваться некоторыми веществами небелковой природы, которые представлены в растениях, например, фенольными соединениями и полиаминами, был проведен анализ выделенных соединений для подтверждения их белковой природы. После инкубации полученных фракций с пепсином, они не проявляли активности в отношении трипсина, что свидетельствует в пользу того, что выделенные ингибиторы являются полипептидами. Перечисленные эксперименты были проведены в лаборатории белков растений НИИ ФХБ (заведующий – д.б.н., проф. М.А. Белозерский). Дальнейшая работа проводилась нами в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН (заведующий – академик РАН, проф. Е.В. Гришин).

Следующим этапом очистки функционально активного соединения была выбрана ОФ-ВЭЖХ. Молекулярная масса вещества из мажорной фракции, с которой велась дальнейшая работа, измеренная с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии, составила 5182,0 Да. Этот пептид получил название BWI-2с.

Поскольку молекулы пептидных ингибиторов из растений, как правило, являются дисульфид-связанными, мы проанализировали выделенный пептид BWI-2с на предмет содержания S-S-мостов. Для этого с полученным пептидом провели реакцию алкилирования тиольных групп винилпиридином в нативной форме и с предварительным восстановлением дитиотреитолом (см. Материалы и методы). Продукты реакций выделили по методу ОФ-ВЭЖХ на аналитической колонке. По разнице масс нативной и модифицированной молекулы (молекулярная масса присоединяемого остатка винилпиридина составляет 105,1 Да) можно судить о числе свободных тиольных групп (когда модификация проводится без предварительного восстановления) и общем числе остатков цистеина (когда сначала проводят восстановление, а затем модифицируют тиольные группы). Разница полученных чисел дает число остатков полуцистина. Масса алкилированного без предварительного восстановления BWI-2с не изменилась. Масса восстановленного и алкилированного пептида составила 5606,5 Да. Расчет количества остатков цистеина производился по формуле: $X = (\text{масса алкилированного пептида} - \text{масса исходного пептида}) / (\text{масса винилпиридина} + 1) = 5606,5 \text{ Да} - 5182,0 \text{ Да} / 106,1 \text{ Да} = 4$, где X – искомое число остатков цистеина. Таким образом было установлено, что BWI-2с содержит в своем составе четыре остатка полуцистина, образующих две внутримолекулярные дисульфидные связи.

Далее методом секвенирования по Эдману была установлена последовательность из двадцати N-концевых а.о. ингибитора. Присутствие в составе данной последовательности остатка метионина позволило провести селективный гидролиз полипептидной цепи бромцианом. Полученные продукты реакции были разделены с помощью ОФ-ВЭЖХ и проанализированы масс-спектрометрически. Полная аминокислотная последовательность пептида была установлена путем секвенирования полученных фрагментов и сопоставления их последовательностей с уже имеющейся N-концевой (рисунок 8).

Таким образом было определено, что BWI-2с представляет собой пептид, состоящий из 41 а.о., четыре из которых являются остатками цистеина, образующими две внутримолекулярные дисульфидные связи и формирующими мотив $CXXXCX_nCXXXC$, где X – любой а.о. Так как масса пептида измеренная методом масс-спектрометрии совпадает с массой, рассчитанной исходя из аминокислотной последовательности, можно утверждать, что других модификаций пептид не содержит.

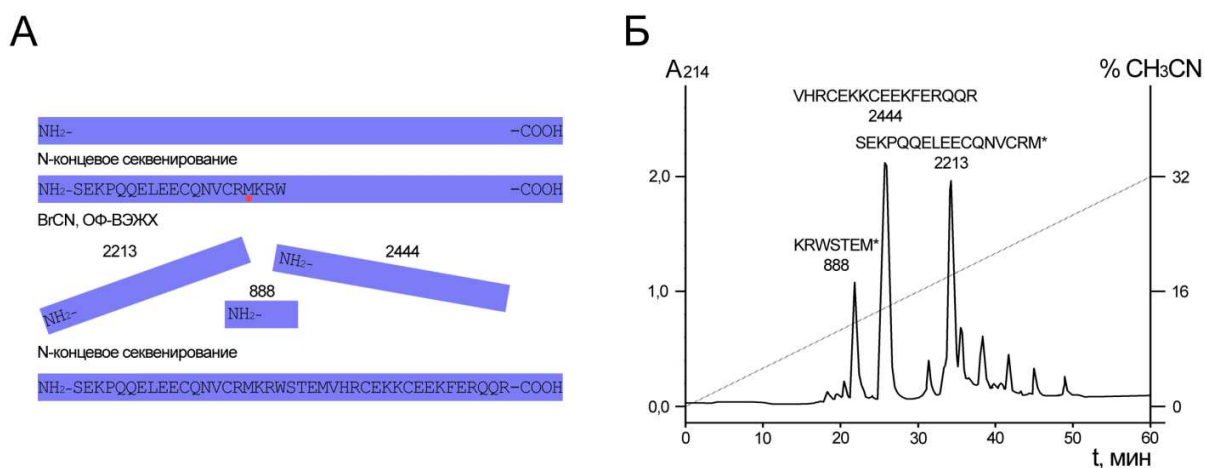


Рисунок 8. А – схема установления аминокислотной последовательности пептида BWI-2с. Б – профиль хроматографического разделения продуктов гидролиза BWI-2с бромцианом в градиенте концентрации ацетонитрила (показан пунктирной линией). Числами обозначены массы соответствующих фрагментов.

В семенах гречихи содержится также ряд гомологов BWI-2с, также проявляющих ингибиторную активность в отношении сериновых протеаз^{322,323}. Сравнение первичной структуры BWI-2с с уже известными по базе данных белковых последовательностей выявило лишь небольшое сходство (31%) с вицилиноподобным белком из гречихи³²⁴. Вицилины (7S глобулины) являются широко распространенной среди высших растений группой запасных белков. Вместе с легуминами (11S глобулины) они входят в состав крупного суперсемейства купинов, включающих про- и эукариотические белки с различными функциями^{325,326}. По всей видимости мультидоменные 7S и 11S глобулины происходят от однодоменного предкового гермиоподобного белка³²⁷. Современные гермины, также относящиеся к суперсемейству купинов, участвуют в системе противостояния биотическому стрессу³²⁸. Цистеиновый мотив типа C¹X₃C²X_nC³X₃C⁴ был обнаружен у еще одного пептидного ингибитора трипсина VhTI из вероники плющелистной *Veronica hederifolia*³²⁹ (рисунок 9). Для последнего методом рентгенографического анализа была установлена пространственная структура, которая оказалась уникальной (не была прежде описана ни для одного известного семейства) для ингибиторов протеолиза и была представлена двумя антипараллельными α-спиралями, каждая из которых содержала по одному характерному мотиву. Подобный

цистеиновый мотив также присутствует и в ряде ЗП растений: MiAMP из *Macadamia integrifolia*³³⁰, МВР-1 из *Zea mays*³³¹, С2 из *Cucurbita maxima*³³², BWI-2a/b из *F. esculentum*³³³ (рисунок 9). Кроме того подобное же расположение цистеинов в аминокислотной последовательности было описано для ряда растительных АМП ранее выделенных из различных растительных источников в нашей лаборатории.

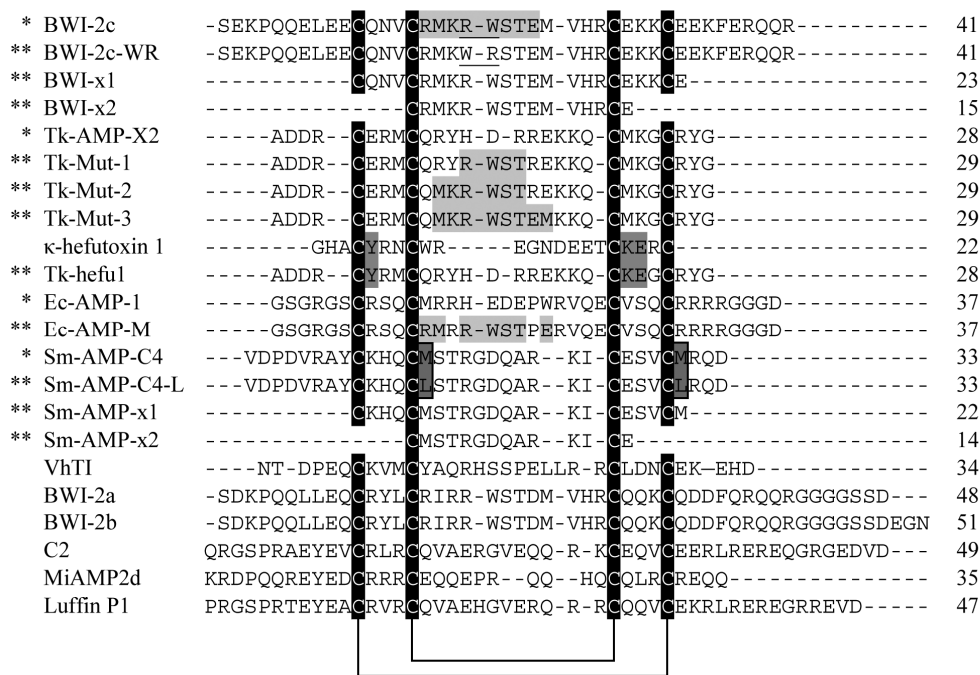


Рисунок 9. Аминокислотные последовательности α-гарпининов, их производных и структурно родственных пептидов. Справа указаны длины аминокислотных последовательностей. Черным цветом закрашены остатки цистеина, снизу показано расположение S-S связей. Светло-серым цветом закрашены а.о. пептида BWI-2c, перенесенные в состав его производных, серым цветом – а.о., перенесенные из κ-хефутоксина 1 в Tk-hefu1, темно-серым – остатки метионина в Sm-AMP-C4 и соответствующие им остатки лейцина в Sm-AMP-C4-L. Подчеркиванием отмечена пара аргинин-триптофан в составе BWI-2c и его мутанта BWI-2c-WR. * – Природные пептиды, исследовавшиеся в данной работе, ** – их производные.

На основании фрагментарных структурных данных нами было сделано предположение, что все они, подобно VhTI, будут адаптировать в пространстве сходную структуру типа α-спильки. Известные семейства АМП, равно как и семейства ингибиторов протеаз, не имеют представителей с подобной организацией, что указывает на возможную принадлежность BWI-2c и VhTI, а также АМП с двумя CX₃C мотивами, к отдельному, еще не описанному

семейству ЗП растений. Для изучения этой предполагаемой группы наряду с BWI-2с были выбраны следующие пептиды: Tk-AMP-X2 из пшеницы гексаплоидной *Triticum kiharae*, Sm-AMP-C4 из звездчатки средней *Stellaria media* и Ec-AMP-1 из ежовника обыкновенного *Echinochloa crus-galli* (рисунок 9). На приведенной ниже схеме видно, что представленные пептиды имеют достаточно низкую степень сходства первичной структуры. Для некоторых из них, так же как и для BWI-2с, были обнаружены гомологичные последовательности в вицилиноподобных белках. Кроме того для всех этих пептидов характерно высокое содержание заряженных остатков в цепи и общий положительный заряд молекулы.

2. Получение рекомбинантных аналогов пептидов в бактериальной системе

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

С помощью обратной трансляции *in silico* (программа EditSeq) с использованием наиболее часто используемых у *E. coli* кодонов были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие BWI-2с, Tk-AMP-X2 и Ec-AMP-1. Каждая последовательность была дополнительно оптимизирована с целью предотвращения формирования шпилечных структур, в 5'- и 3'-концевых областях были добавлены сайты

рестрикции *Kpn1* и *VamH1*, соответственно, для клонирования в экспрессионный вектор, в 5'-концевые области были введены последовательности, кодирующие сайт, узнаваемый энтеропептидазой. Полные последовательности были затем разделены на короткие олигонуклеотиды, из которых далее методом ПЦР были получены синтетические гены, кодирующие соответствующие пептиды. Визуализацию продуктов синтеза осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для проведения экспрессии в бактериальной системе полученные ПЦР-продукты генов пептидов были встроены в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen). Этот вектор находит широкое применение в биотехнологии для наработки дисульфид-содержащих пептидов и белков в бактериальной системе экспрессии и поэтому был выбран для наработки перечисленных объектов. Основная особенность данной системы – возможность синтеза искомого продукта в виде гибрида с белком-помощником тиоредоксином (Trx), который является природной тиол-дисульфид изомеразой *E. coli* и, помимо высокого уровня экспрессии, обеспечивает возможность правильного замыкания дисульфидных связей в целевом продукте. Кроме того, системой предусматривается включение в последовательность гибридного белка олигогистидинового участка для проведения очистки с помощью металл-хелат-аффинной хроматографии. Регуляторные области гена гибридного белка позволяют проводить контролируемую экспрессию с использованием ИПТГ в качестве индуктора. Плазмида также содержит ген устойчивости к антибиотику ампициллину, что позволяет контролировать ее наличие в клетках за счет выращивания на селективной среде. Итак, в состав гибридных белков Trx-4-Cys-peptide были включены следующие вспомогательные последовательности: Trx – белок-помощник, олигогистидиновый участок, необходимый для селективного выделения белка с помощью аффинной хроматографии, а также сайт, узнаваемый энтеропептидазой, для отделения целевого пептида от белка-помощника. Плазмиду pET-32b, а также синтетические гены подвергли рестрикции ферментами *Kpn1* и *VamH1*, после чего провели лигирование по липким концам.

Следующим этапом работы была трансформация клеток *E. coli* BL21 (DE3) полученными векторами и проведение качественной оценки возможности экспрессии соответствующих генов: индукция экспрессии ИПТГ с последующей визуализацией результатов с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Аналитические опыты по экспрессии

проводили в трех независимых повторах (использовали три различных клонa *E. coli*, полученные при трансформации). Условия аналитического опыта (концентрация индуктора ИПТГ 0,2 мМ, инкубация культуры при 25°C в течение 18 ч) были выбраны исходя из опыта подобных работ в лаборатории.

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

Далее для каждого пептида отбирали один из экспрессионных клонов и проводили препаративную наработку целевых продуктов. Индукцию экспрессии осуществили в культуре объемом 1 л в условиях аналитического опыта. Для выделения гибридного белка из фракции растворимых компонентов клеток *E. coli* использовали метод аффинной хроматографии, основанной на селективном металл-хелатном взаимодействии олигогистидинового участка экспрессированного продукта и ионов Co^{2+} на неподвижной фазе TALON Superflow (Clontech). Очищенный гибридный белок анализировали с использованием электрофореза, концентрацию определяли по спектру поглощения в УФ-области. Выход гибридного белка для всех трех пептидов составил ~40 мг с 1 л культуры.

Для перевода гибридного белка в буфер, используемый для ферментативного гидролиза энтеропептидазой, проводили процедуру обессоливания белка по методу ОФ-ВЭЖХ в ступенчатом градиенте ацетонитрила, после чего белок высушивали на вакуумном концентраторе. Высушенный белок растворяли в 50 мМ Трис-НСl до конечной концентрации ~1 мг/мл, добавляли энтеропептидазу из расчета 1 единица фермента на 1 мг белка. Гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Продукты протеолиза разделяли при помощи ОФ-ВЭЖХ (рисунок 10). Концентрацию полученных пептидов оценивали по спектру поглощения в УФ-области. Выход пептидов составлял от 5 до 7 мг с 1 л бактериальной культуры.

Полученные рекомбинантные аналоги анализировали при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии. Измеренные средние молекулярные массы пептидов составили 5182,0 Да, 3519,0 Да и 4274,7 Да для BWI-2с, Тк-АМР-Х2 и Ес-АМР-1, соответственно, что совпадало с результатами измерений масс природных пептидов, а также с расчетным значениям.

Автоматическое секвенирование по Эдману показало идентичность N-концевых аминокислотных последовательностей рекомбинантных пептидов натуральным. Хроматографические подвижности природных и рекомбинантных пептидов также не отличались.

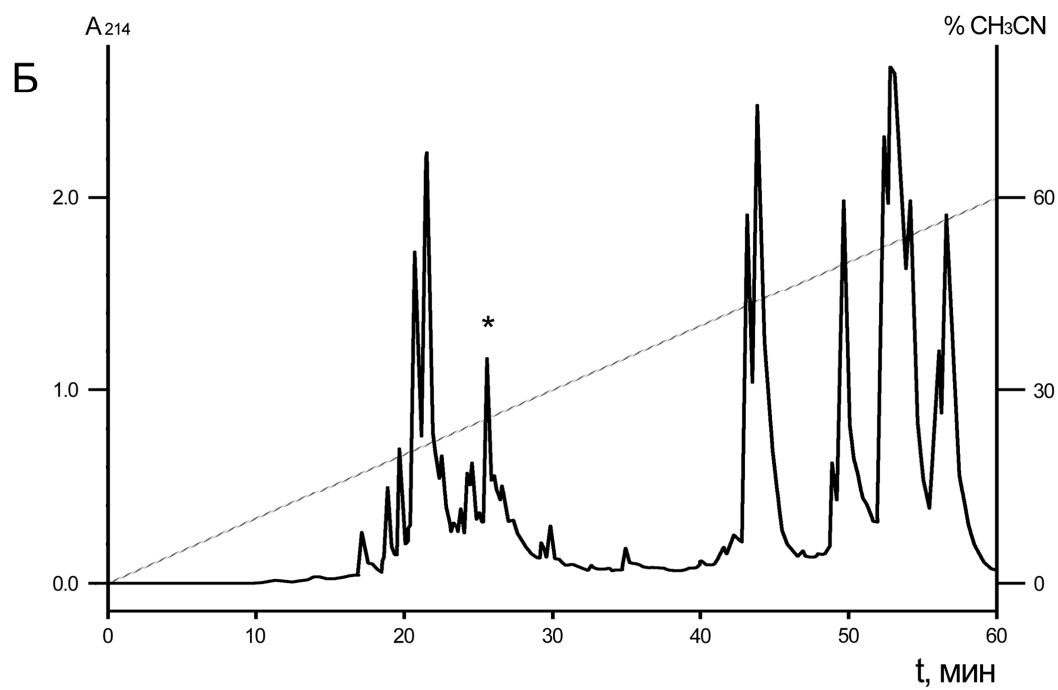
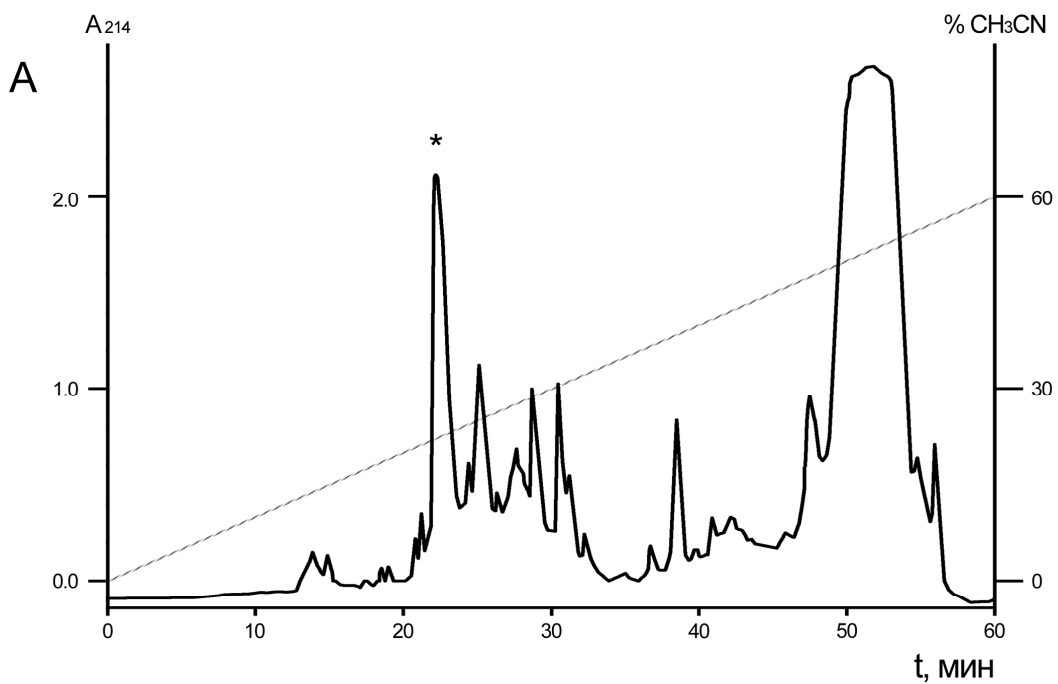


Рисунок 10. Профили хроматографических разделений гибридных белков: А – Trx-BWI-2с, гидролизованного энтеропептидазой, Б – Trx-Sm-AMP-C4-L, гидролизованного бромцианом, в градиенте концентрации ацетонитрила (показан пунктирной линией). Звездочками отмечены фракции, содержавшие целевые пептиды.

Пептид Sm-AMP-C4 не удалось получить с достаточно высоким выходом в описанной системе, что было обусловлено неспецифическим гидролизом гибридного белка энтеропептидазой в N-концевой области пептида, похожей на сайт щепления данного фермента. Поэтому нами было принято решение о получении мутантного пептида Sm-AMP-L, в котором остатки метионина были заменены остатками лейцина, как наиболее близкими по физико-химическим свойствам и стереометрии. Это позволило заменить в результирующей гибридной конструкции сайт щепления энтеропептидазой на один остаток метионина и провести специфический гидролиз белка BrCN (рисунок 10).

Корректность синтеза Sm-AMP-L проверялась масс-спектрометрически и N-концевым секвенированием. Стоит отметить, что хроматографические подвижности пептидов Sm-AMP-C4 и Sm-AMP-L были близки, что соответствовало ожиданиям. Выход продукта составил ~4,5 мг с 1 литра культуры. Для изучения пространственной структуры пептидов могут быть использованы методы ЯМР и кристаллографии. Метод ЯМР обладает важным преимуществом: он позволяет определить структуру пептида в растворе без каких бы то ни было изменений, которые могут произойти с молекулой в кристалле. Одни и те же ядра атомов молекулы в различных окружениях дают различные сигналы ЯМР. Отличие такого сигнала ЯМР от сигнала стандартного вещества позволяет определить т.н. химический сдвиг, который обусловлен химическим строением изучаемого вещества. В основе явления ЯМР лежат магнитные свойства атомных ядер, состоящих из нуклонов с полуцелым спином 1/2, 3/2, 5/2. Ядра с чётными массовым и зарядовым числами (чётно-чётные ядра) не обладают магнитным моментом, в то время как для всех прочих ядер магнитный момент отличен от нуля. Для увеличения разрешающей способности метода получают многомерные ЯМР-спектры. Для этого в состав молекул, как правило, вводят следующие изотопы: ^{13}C и ^{15}N .

С применением разработанной системы экспрессии нами был получен изотопно-меченые пептиды BWI-2с, Tk-AMP-X2, Sm-AMP-L и Ec-AMP-1 содержащий в своем составе изотоп ^{15}N . Для этого клетки штамма-продуцента, выращивались на «минимальной» среде

М9, содержащей в качестве источника азота $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Дальнейшие выделение и очистка пептидов происходили согласно вышеописанной схеме. Поскольку в использовавшейся среде не было никаких других источников азота, полученный пептид содержит только ^{15}N , что было подтверждено методом МАЛДИ масс-спектрометрии: разница масс исходных и меченых пептидов была равна общему числу атомов азота для каждого пептида. Выход продуктов составил ~3-4 мг пептида с 1 л бактериальной культуры.

Таким образом, выбранная система наработки синтетических аналогов целевых пептидов отвечает всем заявленным для данной работы условиям. В дальнейшем разработанная схема применялась при синтезе производных Тк-АМР-Х2 и Ес-АМР-1.

3. Структурные исследования полученных пептидов

С использованием изотопномеченых производных методом ЯМР в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии были установлены пространственные структуры всех четырех пептидов в растворе (рисунок 11). Как и ожидалось ранее, все они представляют собой α -спиральные шпильки, где две антипараллельные α -спирали соединены посредством коротких петлевых последовательностей и стабилизированы двумя дисульфидами. В то время как спиральные участки молекул были жестко фиксированы, петлевые, а также N- и С-концевые оставались достаточно подвижными (рисунок 11). Ингибитор трипсина VhTI и рибосом-инактивирующий пептид luffin P1³³⁴ – еще два примера подобной пространственной организации среди ЗП растений. Очевидно, что все эти пептиды обладают не только общей структурой, но и общей защитной функцией. Все эти факты вкуче дают основания для отнесения всех их к отдельному семейству ЗП растений, получившему название α -гарпининов (от англ. " α -hairpinins"). Ингибиторы трипсина VhTI и BWI-2с кроме прочего составляют отдельное семейство полипептидных ингибиторов протеаз в базе MEROPS – I73.

Сравнение пространственных структур α -гарпининов показало, что ингибиторы протеаз имеют ряд отличий от АМП, по-видимому связанных с различной функциональной нагрузкой. Во-первых различным оказалось взаиморасположение α -спиралей: в ингибиторах а также у пептида luffin P1 они практически параллельны друг другу, в то время как у АМП

они располагаются под углом $\sim 45^\circ$. Во-вторых различным оказалось распределение а.о. У АМП поверхность молекулы большей частью гидрофильна, а гидрофобные остатки сконцентрированы в коровой части, у ингибиторов, и гидрофобные, и гидрофильные области распределены более или менее диффузно по всей поверхности без какой-либо видимой закономерности (рисунок 12). Для АМП наблюдается амфифильность спиральных участков молекул, каждая спираль имеет две четко разграниченные гидрофобную и гидрофильную поверхности. В целом это коррелирует с известными литературными данными и указывает на мембран-специфичность этих АМП. Положительный заряд и наличие протяженных гидрофобных областей в составе спиральных участков, по всей видимости, необходимо для первичного связывания с отрицательно заряженными фосфолипидами цитоплазматической мембраны и последующим встраиванием внутрь липидного бислоя.

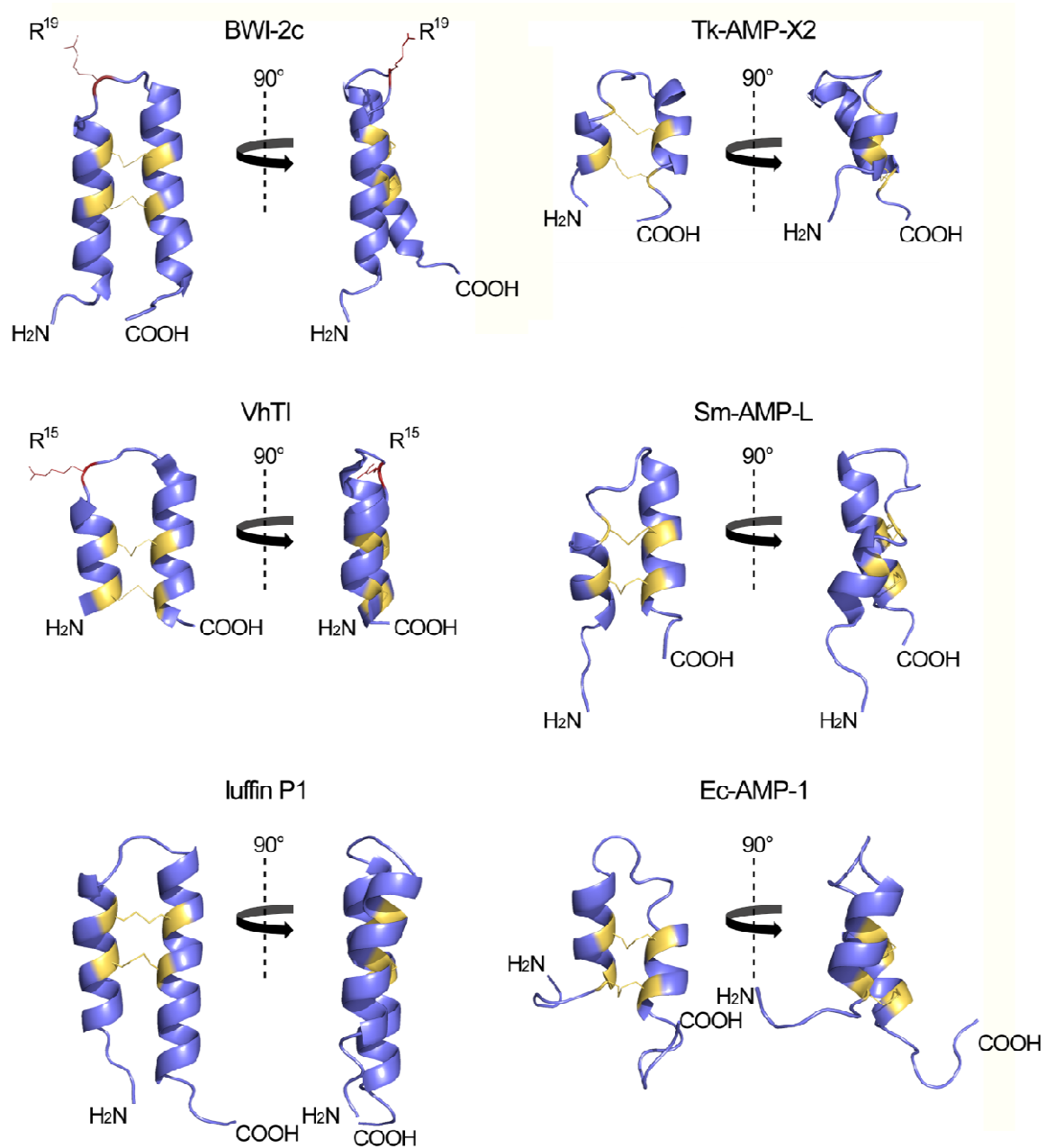


Рисунок 11. Пространственные структуры α -гарпининов в ленточном представлении. Желтым цветом обозначены остатки цистеина. Красным – остатки P₁ ингибиторов BWI-2c и VhTI.

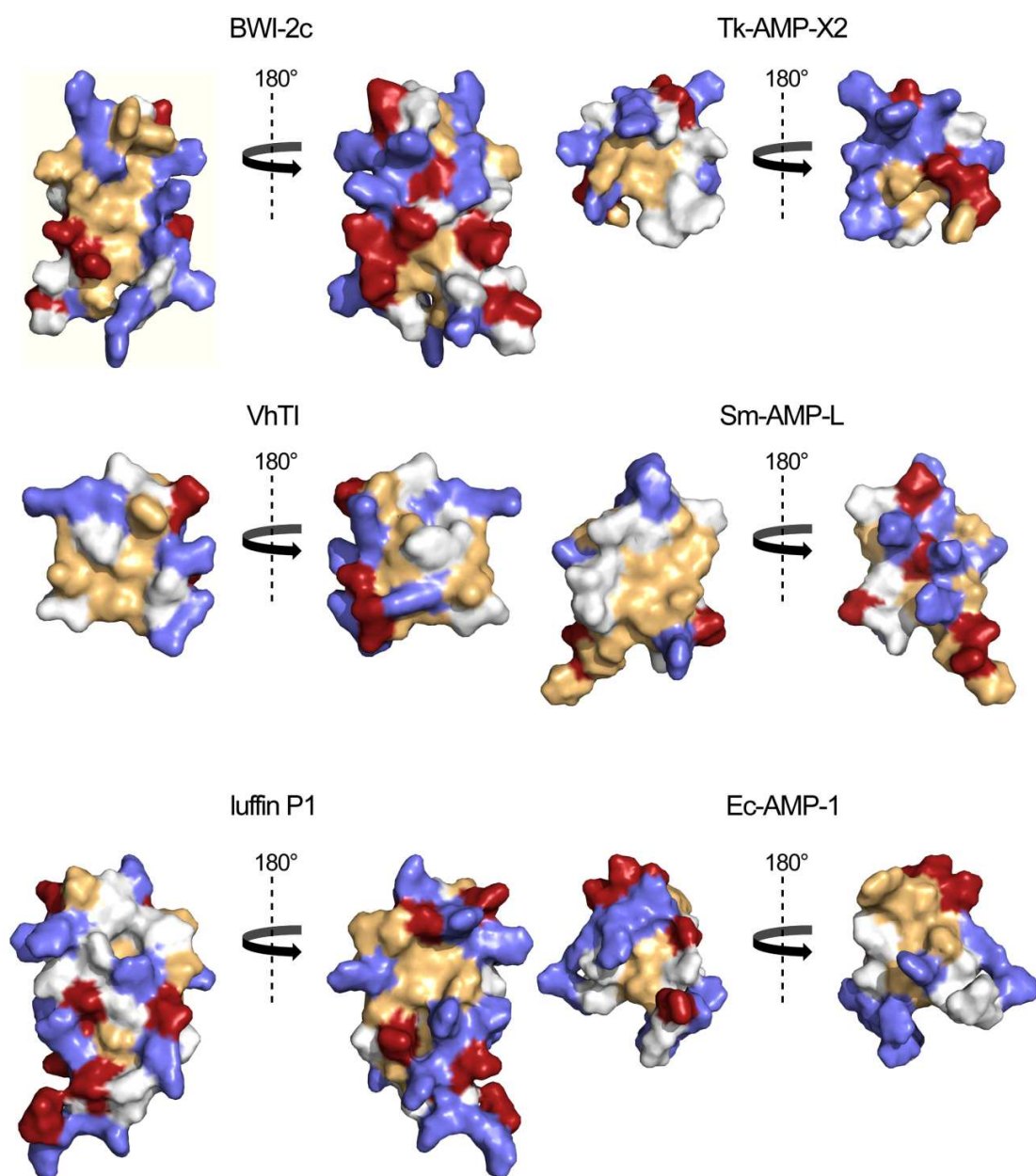


Рисунок 12. Пространственные структуры α -гарпининов в глобулярном представлении. Синим цветом отмечены положительно заряженные а.о., красным – отрицательно заряженные а.о., бежевым – гидрофобные а.о., белым – все остальные.

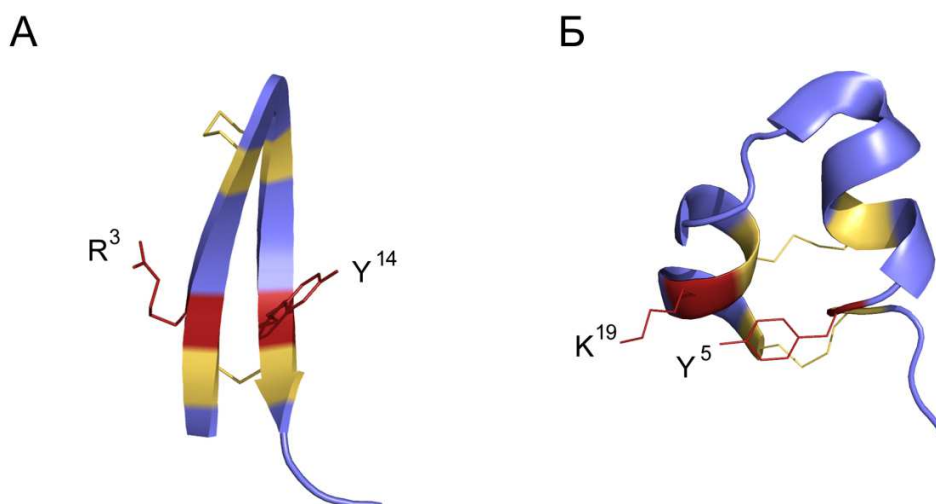


Рисунок 13. Пространственные структуры гомезина (А) и κ-хефутоксин 1 (Б). Остатки функциональной диады подписаны и показаны красным цветом, остатки цистеина – желтым.

Как отмечалось ранее ряд АМП растений с пока что неизвестной, но предположительно сходной структурой обладают цистеиновым мотивом типа $C^1X_3C^2X_nC^3X_3C^4$, что дает основания предполагать их принадлежность к α-гарпининам. Однако, подобным цистеиновым мотивом обладают также пептиды, не относящиеся к α-гарпининам и формирующие в пространстве иную структуру, в частности АМП гомезин из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*³³⁵ (рисунок 13) и tachypleusin I из *Tachypleus tridentatus*³³⁶. Эти пептиды не образуют α-спиральной укладки, напротив, их молекулы образованы двумя антипараллельными β-тяжами. Из этого следует, что наличие характерного цистеинового мотива в данном случае не является достаточным условием принадлежности того или иного пептида к семейству α-гарпининов.

В то же время несколько блокаторов калиевых каналов из ядов беспозвоночных животных, таких как, κ-хефутоксин 1 (рисунок 13) из яда скорпиона *Heterometrus fulvipes*³³⁷ и OmTx1–3 из яда скорпиона *Opisthacanthus madagascariensis*³³⁸, flf14a-c из конуса *Conus austini*³³⁹, имеют не только сходный цистеиновый мотив, но и пространственную укладку α-гарпининового типа. Таким образом можно говорить, что фолд α-гарпининового типа является достаточно универсальным структурным элементом, используемым различными живыми организмами для реализации целого набора биологических функций.

Еще одним примером подобного фолда является искусственный АМП, полученный на основе пуротионина РрТН из *P. Pubera*³⁴⁰. Как отмечалось выше, АМП семейства тионинов построены из двух коротких α -спиралей и β -слоя. В экспериментах с рядом производных РрТН было показано, что α -спиральный кор молекулы является основным носителем антимикробной активности. Так, фрагмент РрТН-7-32 (цифры соответствуют номерам а.о. в полном размере РрТН), представляющий собой молекулу α -гарпининового типа с характерным цистеиновым мотивом, обладал практически такой же антимикробной активностью и сродством к искусственным анионным мембранам как и исходный РрТН. При этом фрагмент РрТН-7-19, соответствующий участку между внутренними остатками цистеина, не проявлял активности в отношении ни одного из тестируемых штаммов патогенов и не связывался с модельными мембранами. Стоит отметить, что многие α -гарпинины экспрессируются в составе крупных белков-предшественников, которые могут содержать один (*Z. mays*) или несколько (2 в *C. maxima*, 4 в *M. integrifolia*)^{330,332} таких пептидов. Эти предшественники могут входить в состав крупных запасных белков вицилинового типа или экспрессироваться независимо (рисунок 14). При этом стоит отметить, что в процессе созревания вицилины подвергаются ограниченному протеолизу специфическими растительными протеазами. Как правило на первом этапе созревания эти запасные белки специфически гидролизуются по остаткам N. Для АМП α -гарпининового типа характерно отсутствие остатков N в цепи зрелых пептидов (при этом BWI-2с и VhTI содержат по одному остатку N), при этом в составе белков-предшественников *O. sativa*, *S. bicolor*, *C. maxima*, *Z. mays*, *M. integrifolia* остатки N находятся в линкерных участках между α -гарпининовыми последовательностями. По всей видимости белки-предшественники α -гарпининов процессируются по тому же принципу, что и вицилиновые белки. Однако, ввиду наличия нескольких дополнительных раундов поцессинга с участием в том числе и неспецифических экзопептидаз, точно предсказать последовательность зрелых пептидов на основании последовательности предшественника не представляется возможным.

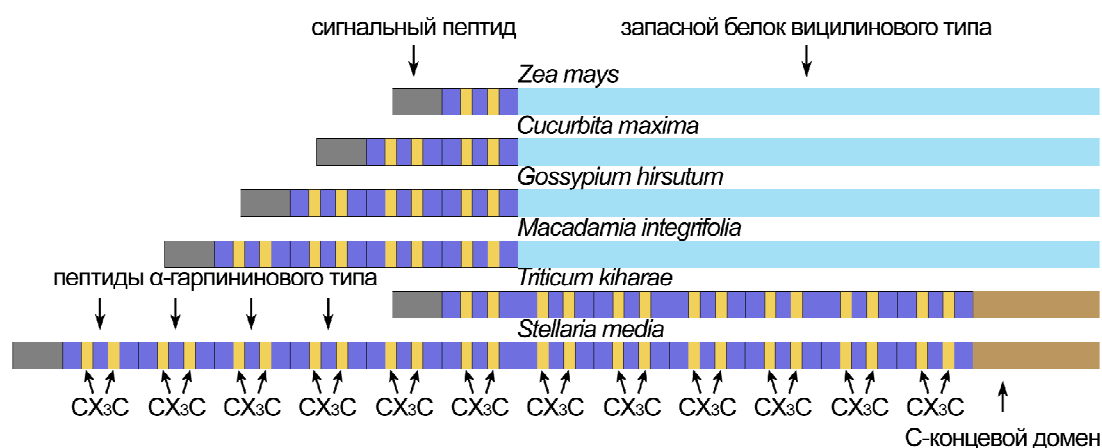


Рисунок 14. Структура предшественников α -гарпининов из разных растений. Отмечены составные элементы.

В связи с этим крайне интересным представляется вопрос об эволюция α -гарпининов. Кажется весьма вероятным, что некие предковые растительные белки-предшественники приобрели α -гарпининовый домен, который затем мультиплицировался в некоторых растениях. Ввиду структурного сходства и частой перекрестной активности между представителями различных семейств ЗП растений достаточно сложно говорить о возможных эволюционных путях возникновения отдельных типов активности, пространственной укладки или целых групп пептидов. Для установления подобных взаимосвязей среди ЗП необходимы более тщательные исследования.

Разнообразие растительных источников α -гарпининов и принадлежность их к далеким систематическим единицам предположительно указывает на повсеместное распространение этого семейства пептидов по крайней мере среди высших растений. Учитывая также низкую степень сходства первичной структуры α -гарпининов представляется возможным и независимое происхождение такой структуры у неродственных пептидов в процессе конвергентной эволюции, о чем в том числе может свидетельствовать и

4. Исследование биологической активности полученных пептидов

Тестирование активности рекомбинантного BWI-2с, проводившееся в лаборатории белков растений НИИ ФХБ, показало, что он проявляет ингибирующую активность в

отношении препарата трипсиноподобного фермента из кишечника бабочки *Galleria melonella*. В то же время цистеиновые протеазы жуков *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* и *Blatella germanica* не ингибировались вовсе. BWI-2с с высокой эффективностью ингибировал бычий панкреатический трипсин ($K_i=1.74 \times 10^{-10}$ М). В то же время он не проявлял никакой активности в отношении сериновых протеаз других семейств (химотрипсин, эластаза, субтилизин). Таким образом, BWI-2с является специфическим ингибитором трипсиноподобных сериновых протеаз.

Для определения положения функционально важного остатка P₁ было проведено расщепление трипсином пептида с последующим разделением продуктов гидролиза на ОФ-ВЭЖХ и N-концевым секвенированием. В результате было установлено, что гидролиз молекулы ингибитора трипсином происходит по связи R¹⁹-W²⁰. Таким образом, аргинин R¹⁹ является искомым остатком P₁. Отметим, что его положение в последовательности совпадает с остатком P₁ (R¹⁵) у гомологичного VhTI.

Tk-AMP-X2, Sm-AMP-L и Ec-AMP-1 также тестировались на предмет наличия ингибирующей активности в отношении перечисленных ферментов, однако, ни один из них не проявлял видимой активности в отношении ни одного из апробированных ферментов. Очевидно, их механизм действия не сопряжен с подавлением активности протеаз.

Антифунгальная активность рекомбинантных пептидов тестировалась на нескольких видах грибов: *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides*, *Diplodia maydis*. Опыт показал, что BWI-2с до концентрации 30 мкг/мл не влияет на прорастание спор фитопатогенов. Для остальных пептидов антифунгальная активность варьировала как по видоспецифичности так и по эффективной концентрации необходимой для подавления прорастания спор и роста гиф. Тем не менее, все АМП проявляли активность в микромолярном диапазоне концентраций, что вообще характерно для антифунгальных пептидов. При этом стоит обратить внимание, что все апробированные пептиды не приводили к гибели клеток патогенов, а лишь подавляли их рост и нарушали процесс нормального развития, т.е. изученные АМП являются фунгистатиками. Результаты тестирования приведены в таблице 1.

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

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

Поскольку клеточные мембраны по-прежнему рассматриваются как наиболее вероятные мишени воздействия АМП, нами было предложено определить степень сродства α -гарпининов к модельным мембранам различного химического состава. Для этого были получены липосомы диаметром ~1 мкм, состоящие из DOPC и смеси DOPE/DOPG (массовое соотношение 3:1). Образцы пептидов осаждали с липосомами обоих типов после чего сравнивали остаточное количество пептидов в супернатанте с контрольными образцами – раствором соответствующего пептида в буфере для липосом. В качестве положительного контроля сравнения использовался линейный цитолитический пептид латарцин из яда паука *Lachesana tarabaei*³⁴⁰, в качестве отрицательного – модулятор рецептора P₂X₃ пуротоксин 1 (PT1) ноттинового типа из яда *Geolycosa* sp.³⁴¹. В результате было показано, что α -

гарпининовые АМП связываются с DOPE/DOPG липосомами практически нацело, с DOPC липосомами связывалось ~50% образца, в то же время BWI-2с не связывается с ними вовсе.

5. Получение производных, структура, активность.

Полученные данные указывают на то, что в рамках единого α -гарпининового фолда могут реализовываться различные биологические активности. Таким образом, представляется возможным использование данного типа пространственной укладки для создания молекул с заданной структурой и функцией. Подобный подход, получивший название скаффолд-инженерии, в последние годы рассматривается как один из наиболее перспективных вариантов рационального дизайна белков и уже имеет ряд удачных примеров использования. В частности такие широко распространенные в природе белковые фолды как TIM, Ig, 10FN³ применяются в качестве каркаса для создания новых белков с заданной функцией³⁴²⁻³⁴⁴.

В ходе данной работы нами был разработан и получен набор производных α -гарпининов для установления отдельных функциональных детерминант и возможности их сочетания между собой в составе одной молекулы. На первом этапе было предложено получить укороченные по внешним и внутренним цистеинам варианты АМП (Sm-AMP-X1, Sm-AMP-X2) и ингибитора (BWI-X1, BWI-X2) (рисунок 9), чтобы установить минимальную активную составляющую для обоих типов пептидов. Получение укороченных производных в рекомбинантной системе экспрессии было затруднено ввиду сложности отделения от гибридного белка и очистки целевого продукта. В связи с этим было предложено получить их путем химического синтеза. Твердофазный пептидный синтез был осуществлен в лаборатории протеомики ИБХ РАН. Полученные линейные пептиды далее окислялись кислородом воздуха в течение суток при комнатной температуре и непрерывном перемешивании в 50 mM Tris HCl pH 8.0 с последующей очисткой при помощи ОФ-ВЭЖХ. Контроль корректности замыкания дисульфидных связей осуществлялся сочетанием методов селективного гидролиза полипептидной цепи, ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Для этого все пептиды были последовательно гидролизованы по специфическим сайтам между всех остатков цистеина в цепи. Фрагменты были очищены ВЭЖХ и измерены на предмет соответствия их реальных молекулярных масс с расчетными.

BWI-2c и VhTI являются каноническими ингибиторами протеаз. Для ингибиторов этого типа известна основополагающая роль в связывании с активным центром фермента короткой ингибиторной петли, которая в случае α -гарпининов соответствует межспиральному участку молекулы. АМП в большинстве достаточно чувствительны к действию гидролаз. В связи с этим, было предложено привнести трипсин-ингибирующую активность в состав молекулы АМП путем пересадки фрагмента петлевого участка ингибитора. В результате в рекомбинантной системе экспрессии были получены мутантные пептиды Tk-M-1-3, производные Tk-AMP и BWI-2c (рисунок 9), с выходом ~5 мг с 1 л культуры.

Также был сконструирован мутантный пептид Ec-AMP-M (рисунок 9) – производная Ec-AMP-1 с заменами в петлевом участке, подобранными таким образом, чтобы с минимальным изменением аминокислотного состава добиться сходства с аналогичным участком ингибитора BWI-2c. Ec-AMP-M был получен химическим синтезом в лаборатории протеомики ИБХ РАН с последующим замыканием дисульфидных связей по вышеописанной схеме. Выход активного в отношении трипсина Ec-AMP-M был незначительным, ввиду низкой эффективности замыкания дисульфидов и большого количества побочных продуктов. В связи с этим было предложено получить его рекомбинантный аналог, что и было сделано согласно вышеописанной схеме. Для всех мутантных пептидов проводилось определение соотношения различных элементов вторичной структуры методом спектроскопии кругового дихроизма (таблица 2), расчеты были проведены в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Было показано, что отдельные модификации приводят к существенным структурным изменениям, как например, в случае Tk-Mut-2, практически полностью утратившего спиральную структуру. Полученные химерные пептиды и укороченные производные BWI-2c тестировались на бычьим панкреатическим трипсином. Было показано, что Ec-AMP-M и BWI-X1 обладают трипсин-ингибирующей активностью. Ввиду того что эти пептиды достаточно быстро гидролизуются, константы ингибирования для них не были определены. Однако было установлено, что в условиях стандартного эксперимента 50% ингибирование фермента наступало при молярном соотношении фермент: ингибитор – ~1:20 и ~1:10 для BWI-X1 и Ec-AMP-M соответственно, для сравнения для BWI-2c 50% ингибирование наступало при соотношении 2:1. BWI-X2 был неактивен, что по всей видимости связано с изменением организации молекулы и утратой характерной структуры.

Очевидно, N-концевая спираль молекулы утратила свою структуру ввиду недостаточного (<4) количества а.о. вовлеченных в нее, что в свою очередь привело к дестабилизации петлевого участка молекулы. Снижение активности BWI-X1 по сравнению с исходным BWI-2с скорее всего так же связаны с общей дестабилизацией структуры ингибитора.

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

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

Все варианты пептидов Tk-Mut также не проявляли активности в отношении трипсина. Sm-AMP-X1, Sm-AMP-X2 тестировались на фитопатогенных грибах в сравнении с Sm-AMP-C4-L (). Для укороченных производных Sm-AMP-C4 также было отмечено снижение активности по сравнению с исходным пептидом. Это может быть вызвано изменением заряда молекулы, утратой одной из спиралей или наличием в составе утраченных фрагментов функционально важных остатков. Однако для обоих вариантов молекулы наблюдалась сохранение активности в микромолярных концентрациях в отношении ряда патогенов, что

указывает на возможность реализации антифунгальной функции даже в рамках минимального дисульфид-стабилизированного фрагмента, такого как Sm-AMP-X2.

Для многих блокаторов калиевых каналов известно, что критическими для проявления активности является пара а.о., так называемая диада Y-K/R^{345,346}, хотя известны и другие варианты³⁴⁷. Структурные аналоги α -гарпининов, обнаруженные в ядах скорпионов *H. fulvipes* и *O. madagascariensis*, содержат подобные пары остатков в составе спиральных участков молекул в положениях +1 по отношению к первому и третьему остаткам цистеинов. Еще один химерный пептид, названный Tk-hefu1, был получен путем переноса функциональной диады K-Y из молекулы к-хефутоксина 1 из яда *H. fulvipes* в состав Tk-AMP-X2 по соответствующим положениям. Tk-hefu1 был получен в бактериальной системе экспрессии с выходом ~4 мг с 1 л культуры *E. coli*.

Электрофизиологическое тестирование исходных и мутантного пептидов проводилось в лаборатории токсикологии Католического университета (г. Лёвен, Бельгия) на панели потенциал-зависимых калиевых каналов (Kv's) различных семейств: Shaker (Kv1.1–Kv1.6, Shaker IR), Shab (Kv2.1), Shaw (Kv3.1) и erg (hERG). Эффекты Tk-hefu на различных изоформах каналов приведены на рисунке 15. Tk-hefu в концентрации 40 мкМ блокировал ток через каналы Kv1.2, Kv1.3 и Kv1.6 на $8,3 \pm 1,3\%$, $58,4 \pm 1,6\%$ и $7,3 \pm 2,3\%$, соответственно. В то же время Tk-AMP-X2 не проявлял активности в отношении перечисленных каналов вплоть до концентрации 250 мкМ. Концентрация полумаксимального ингибирования Tk-hefu1 (IC₅₀) для Kv1.3 составила $34,0 \pm 2,8$ мкМ и оказалось даже несколько ниже, чем соответствующее значение для исходного к-хефутоксина 1 – 40 мкМ. Тем самым, был достигнут преследуемый результат – молекула АМП приобрела новую активность, прежде ей не присущую.

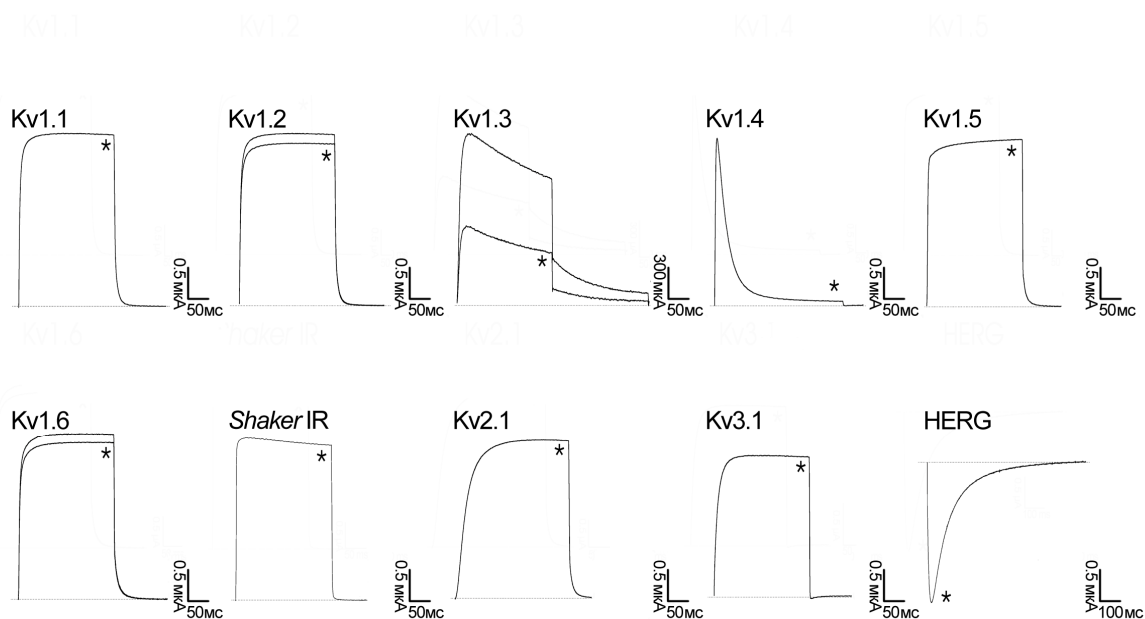


Рисунок 15. Эффекты Tk-heful на различных изоформах потенциал-зависимых калиевых каналов. Кривые отображают токи через соответствующие типы каналов в контроле и при аппликации 40 мкМ токсина (обозначены звездочками).

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

Выводы

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

Список использованной литературы

- (1) Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. A. J. (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23, 4–15.
- (2) Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., Molinaro, A., Kaku, H., and Shibuya, N. (2014) Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E404–13.
- (3) Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 251–6.
- (4) Felix, G., and Boller, T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* 278, 6201–8.
- (5) Shiu, S. H., and Bleecker, A. B. (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci. STKE* 2001, re22.
- (6) Fritz-Laylin, L. K., Krishnamurthy, N., Tör, M., Sjölander, K. V, and Jones, J. D. G. (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 611–23.
- (7) Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.-M., and Chai, J. (2012) Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* 336, 1160–4.
- (8) Boller, T., and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- (9) Sheikh, A. H., Raghuram, B., Jalmi, S. K., Wankhede, D. P., Singh, P., and Sinha, A. K. (2013) Interaction between two rice mitogen activated protein kinases and its possible role in plant defense. *BMC Plant Biol.* 13, 121.
- (10) Cai, G., Wang, G., Wang, L., Pan, J., Liu, Y., and Li, D. (2014) ZmMKK1, a novel group A mitogen-activated protein kinase kinase gene in maize, conferred chilling stress tolerance and was involved in pathogen defense in transgenic tobacco. *Plant Sci.* 214, 57–73.
- (11) Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5, 1003–11.

- (12) Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–103.
- (13) Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4, 1247–53.
- (14) Ausubel, F. M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973–9.
- (15) Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. (2003) Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 41, 641–667.
- (16) Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 425–49.
- (17) Mudgett, M. B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 509–31.
- (18) Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., and Martin, G. B. (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 601–11.
- (19) Jakobek, J. L., Smith, J. A., and Lindgren, P. B. (1993) Suppression of Bean Defense Responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 5, 57–63.
- (20) Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y. H., Pumphlin, N., Jones, J., and He, S. Y. (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313, 220–3.
- (21) Bent, A. F., and Mackey, D. (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45, 399–436.
- (22) Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R. W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 809–34.
- (23) Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004–14.
- (24) Bryan, G. T., Wu, K. S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H. P., McAdams, S. A., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R., and Valent, B. (2000) tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* 12, 2033–46.
- (25) Axtell, M. J., and Staskawicz, B. J. (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112, 369–77.

- (26) Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S. T., Li, D., and Staskawicz, B. J. (2005) Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. *Plant Cell* 17, 1292–305.
- (27) Kim, H.-K., Lee, S.-K., Cho, J.-I., Lee, S., An, G., Jwa, N.-S., Kim, B.-R., Cho, Y.-C., Han, S.-S., Bhoo, S.-H., Lee, Y.-H., Hong, Y.-K., Yi, G., Park, D.-S., Hahn, T.-R., and Jeon, J.-S. (2005) Characterization of rice mutants with enhanced susceptibility to rice blast. *Mol. Cells* 20, 385–91.
- (28) Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–27.
- (29) Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Schoofs, H. M., Terras, F. R., Thevissen, K., Osborn, R. W., Rees, S. B., and Broekaert, W. F. (1994) Gene-encoded antimicrobial peptides from plants. *Ciba Found. Symp.* 186, 91–101; discussion 101–6.
- (30) Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., and Osborn, R. W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108, 1353–8.
- (31) Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S. B., and Broekaert, W. F. (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368, 257–62.
- (32) Terras, F. R., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., and Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267, 15301–9.
- (33) Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Gupta, V. S., and Ranjekar, P. K. (1998) Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382–7.
- (34) Cammue, B. P., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I. J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R. W., Guerbet, F., and Kader, J. C. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109, 445–55.
- (35) Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Vanderleyden, J. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7, 573–88.
- (36) Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., and Fliss, I. (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res.* 37, D963–8.
- (37) Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., and Egorov, T. (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* 66, 2426–31.

- (38) Odintsova, T. I., Egorov, T. A., Musolyamov, A. K., Odintsova, M. S., Pukhalsky, V. A., and Grishin, E. V. (2007) Seed defensins from *T. kiharae* and related species: genome localization of defensin-encoding genes. *Biochimie* 89, 605–12.
- (39) Neumann, G. M., Condrón, R., and Polya, G. M. (1996) Purification and mass spectrometry-based sequencing of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) 6 kDa proteins. Identification as antifungal proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 47, 437–46.
- (40) Lay, F. T., Schirra, H. J., Scanlon, M. J., Anderson, M. A., and Craik, D. J. (2003) The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J. Mol. Biol.* 325, 175–88.
- (41) Wang, S. Y., Wu, J. H., Ng, T. B., Ye, X. Y., and Rao, P. F. (2004) A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* 25, 1235–42.
- (42) Chen, B., Colgrave, M. L., Daly, N. L., Rosengren, K. J., Gustafson, K. R., and Craik, D. J. (2005) Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. *J. Biol. Chem.* 280, 22395–405.
- (43) Daneshmand, F., Zare-Zardini, H., and Ebrahimi, L. (2013) Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits. *Nat. Prod. Res.* 27, 2292–6.
- (44) Park, C. J., Park, C. B., Hong, S. S., Lee, H. S., Lee, S. Y., and Kim, S. C. (2000) Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Mol. Biol.* 44, 187–97.
- (45) Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G. W., Brownlee, C., Osborn, R. W., and Broekaert, W. F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* 271, 15018–25.
- (46) Andreu, D., and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415–33.
- (47) Colilla, F. J., Rocher, A., and Mendez, E. (1990) gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 270, 191–4.
- (48) Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., and de Haro, C. (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194, 533–9.
- (49) Carvalho, A. de O., and Gomes, V. M. (2009) Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30, 1007–20.

- (50) Lay, F. T., and Anderson, M. A. (2005) Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* 6, 85–101.
- (51) Thomma, B. P., Cammue, B. P., and Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Planta* 216, 193–202.
- (52) Farrokhi, N., Whitelegge, J. P., and Brusslan, J. A. (2008) Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol J* 6, 105–134.
- (53) Silverstein, K. A. T., Graham, M. A., Paape, T. D., and VandenBosch, K. A. (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 600–610.
- (54) Bruix, M., Jiménez, M. A., Santoro, J., González, C., Colilla, F. J., Méndez, E., and Rico, M. (1993) Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 32, 715–24.
- (55) Song, J., Gilquin, B., Jamin, N., Drakopoulou, E., Guenneugues, M., Dauplais, M., Vita, C., and Menez, A. (1997) NMR solution structure of a two-disulfide derivative of charybdotoxin: structural evidence for conservation of scorpion toxin alpha/beta motif and its hydrophobic side chain packing. *Biochemistry* 36, 3760–3766.
- (56) Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P., and Vovelle, F. (2001) Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry* 40, 11995–2003.
- (57) Janssen, B. J. C., Schirra, H. J., Lay, F. T., Anderson, M. A., and Craik, D. J. (2003) Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry* 42, 8214–22.
- (58) Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., and Borremans, F. (1998) Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by 1H NMR. *J. Mol. Biol.* 279, 257–70.
- (59) He, X. L., Li, H. M., Zeng, Z. H., Liu, X. Q., Wang, M., and Wang, D. C. (1999) Crystal structures of two alpha-like scorpion toxins: non-proline cis peptide bonds and implications for new binding site selectivity on the sodium channel. *J. Mol. Biol.* 292, 125–35.
- (60) Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V, Ary, M. B., de Sa, M. F. G., and Bloch, C. (2002) Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins-Structure Funct. Genet.* 48, 311–319.
- (61) Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B., and Polya, G. M. (2000) Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* 159, 243–255.

- (62) De Bolle, M. F., Eggermont, K., Duncan, R. E., Osborn, R. W., Terras, F. R., and Broekaert, W. F. (1995) Cloning and characterization of two cDNA clones encoding seed-specific antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. *Plant Mol Biol* 28, 713–721.
- (63) Thevissen, K., Warnecke, D. C., Francois, E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferkel, K. K. A., and Cammue, B. P. A. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279, 3900–3905.
- (64) Aerts, A. M., Francois, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q. T., Cammue, B. P. A., and Thevissen, K. (2007) The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 243–247.
- (65) Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R., and Kurtenbach, E. (2007) Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46, 987–996.
- (66) Van der Weerden, N. L., Hancock, R. E. W., and Anderson, M. A. (2010) Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *J. Biol. Chem.* 285, 37513–37520.
- (67) Spelbrink, R. G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T. J., Shah, D. M., and Hockerman, G. H. (2004) Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.* 135, 2055–2067.
- (68) Jackson, S. L., and Heath, I. B. (1993) Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol Rev* 57, 367–382.
- (69) Tsien, R. W., and Tsien, R. Y. (1990) Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 6, 715–760.
- (70) Kushmerick, C., Castro, M. D., Cruz, J. S., Bloch, C., and Beirao, P. S. L. (1998) Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett.* 440, 302–306.
- (71) Segura, A., Moreno, M., Molina, A., and Garcia-Olmedo, F. (1998) Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett* 435, 159–162.
- (72) Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S., and Imai, R. (2002) A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 46–53.
- (73) Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., Francois, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., Lebrun, M., Berthomieu, P., and Marques, L. (2006) A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J.* 47, 329–342.

- (74) Stotz, H. U., Thomson, J. G., and Wang, Y. (2009) Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav* 4, 1010–1012.
- (75) Pitta, M. G. D., and Galdino, S. L. (2010) Development of Novel Therapeutic Drugs in Humans from Plant Antimicrobial Peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 236–247.
- (76) De Zelicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., and Delavault, P. (2007) Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. *Planta* 226, 591–600.
- (77) Anaya-Lopez, J. L., Lopez-Meza, J. E., Baizabal-Aguirre, V. M., Cano-Camacho, H., and Ochoa-Zarzosa, A. (2006) Fungicidal and cytotoxic activity of a Capsicum chinense defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol. Lett.* 28, 1101–1108.
- (78) Stec, B. (2006) Plant thionins--the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 63, 1370–1385.
- (79) Rao, U., Stec, B., and Teeter, M. M. (1995) Refinement of purothionins reveals solute particles important for lattice formation and toxicity. Part 1: alpha1-purothionin revisited. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 51, 904–13.
- (80) Dubovskii, P. V, Vassilevski, A. A., Slavokhotova, A. A., Odintsova, T. I., Grishin, E. V, Egorov, T. A., and Arseniev, A. S. (2011) Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 14–8.
- (81) Shin, D. H., Lee, J. Y., Hwang, K. Y., Kim, K. K., and Suh, S. W. (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 3, 189–99.
- (82) Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., and Osborn, R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 297–323.
- (83) Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47, 479–491.
- (84) Vernon, L. P., Evett, G. E., Zeikus, R. D., and Gray, W. R. (1985) A Toxic Thionin from Pyricularia-Pubera - Purification, Properties, and Amino-Acid Sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 238, 18–29.
- (85) Bohlmann, H., and Apel, K. (1987) Isolation and Characterization of Cdnas Coding for Leaf-Specific Thionins Closely Related to the Endosperm-Specific Hordothionin of Barley (Hordeum-Vulgare-L). *Mol. Gen. Genet.* 207, 446–454.
- (86) Stein, G. M., Pfuller, U., and Schietzel, M. (1999) Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (Viscum album L.) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Res.* 19, 2925–2928.

- (87) Stein, G. M., Bussing, A., Schaller, G., Pfuller, U., and Schietzel, M. (1998) Thionins from mistletoe: Viscotoxin-associated effects on human granulocytes. *Ann. Oncol.* 9, 87.
- (88) Sauviat, M. P. (1990) Effect of Phoratoxin-B, a Toxin Isolated from Mistletoe, on Frog Skeletal-Muscle Fibers. *Toxicon* 28, 83–89.
- (89) Schraderfischer, G., and Apel, K. (1994) Organ-Specific Expression of Highly Divergent Thionin Variants That Are Distinct from the Seed-Specific Crambin in the Crucifer *Crambe Abyssinica*. *Mol. Gen. Genet.* 245, 380–389.
- (90) Schmidt, A., Teeter, M., Weckert, E., and Lamzin, V. S. (2011) Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 424–8.
- (91) Castagnaro, A., Segura, A., and Garciaolmedo, F. (1995) High Conservation among Sequences Encoding Type-V Thionins in Wheat and Aegilops. *Plant Physiol.* 107, 1475–1476.
- (92) Castagnaro, A., Marana, C., Carbonero, P., and Garciaolmedo, F. (1992) Extreme Divergence of a Novel Wheat Thionin Generated by a Mutational Burst Specifically Affecting the Mature Protein Domain of the Precursor. *J. Mol. Biol.* 224, 1003–1009.
- (93) Clore, G. M., Nilges, M., Sukumaran, D. K., Brunger, A. T., Karplus, M., and Gronenborn, A. M. (1986) The three-dimensional structure of alpha1-purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *Embo J* 5, 2729–2735.
- (94) Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., Giese, H., Hiller, C., Reimann-Philipp, U., Schrader, G., Barkholt, V., and Apel, K. (1988) Leaf-specific thionins of barley—a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *Embo J* 7, 1559–1565.
- (95) Terras, F., Schoofs, H., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B., and Broekaert, W. F. (1993) Synergistic Enhancement of the Antifungal Activity of Wheat and Barley Thionins by Radish and Oilseed Rape 2S Albumins and by Barley Trypsin Inhibitors. *Plant Physiol* 103, 1311–1319.
- (96) Florack, D. E., and Stiekema, W. J. (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* 26, 25–37.
- (97) Kramer, K. J., Klassen, L. W., Jones, B. L., Speirs, R. D., and Kammer, A. E. (1979) Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Toxicol Appl Pharmacol* 48, 179–183.
- (98) Evett, G. E., Donaldson, D. M., and Vernon, L. P. (1986) Biological properties of *Pyrularia* thionin prepared from nuts of *Pyrularia pubera*. *Toxicon* 24, 622–625.

- (99) Li, S. S., Gullbo, J., Lindholm, P., Larsson, R., Thunberg, E., Samuelsson, G., Bohlin, L., and Claeson, P. (2002) Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochem. J.* 366, 405–413.
- (100) Johnson, T. C., Wada, K., Buchanan, B. B., and Holmgren, A. (1987) Reduction of purothionin by the wheat seed thioredoxin system. *Plant Physiol* 85, 446–451.
- (101) Diaz, I., Carmona, M. J., and Garcia-Olmedo, F. (1992) Effects of thionins on beta-glucuronidase in vitro and in plant protoplasts. *FEBS Lett* 296, 279–282.
- (102) Castro, M. S., and Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* 12, 13–18.
- (103) Hernandez-Lucas, C., Fernandez de Caleyra, R., and Carbonero, P. (1974) Inhibition of brewer's yeasts by wheat purothionins. *Appl Microbiol* 28, 165–168.
- (104) Carrasco, L., Vazquez, D., Hernandez-Lucas, C., Carbonero, P., and Garcia-Olmedo, F. (1981) Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 116, 185–189.
- (105) Osorio e Castro, V. R., and Vernon, L. P. (1989) Hemolytic activity of thionin from *Pyricularia pubera* nuts and snake venom toxins of *Naja naja* species: *Pyricularia* thionin and snake venom cardiotoxin compete for the same membrane site. *Toxicon* 27, 511–517.
- (106) Richard, J. A., Kelly, I., Marion, D., Auger, M., and Pezolet, M. (2005) Structure of beta-purothionin in membranes: a two-dimensional infrared correlation spectroscopy study. *Biochemistry* 44, 52–61.
- (107) Wang, F., Naisbitt, G. H., Vernon, L. P., and Glaser, M. (1993) *Pyricularia* thionin binding to and the role of tryptophan-8 in the enhancement of phosphatidylserine domains in erythrocyte membranes. *Biochemistry* 32, 12283–12289.
- (108) Wall, J., Golding, C. A., Van Veen, M., and O'Shea, P. (1995) The use of fluoresceinphosphatidylethanolamine (FPE) as a real-time probe for peptide-membrane interactions. *Mol Membr. Biol* 12, 183–192.
- (109) Onaderra, M., Monsalve, R. I., Mancheno, J. M., Villalba, M., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., and Rodriguez, R. (1994) Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *Eur J Biochem* 225, 609–615.
- (110) Llanos, P., Henriquez, M., Minic, J., Elmorjani, K., Marion, D., Riquelme, G., Molgo, J., and Benoit, E. (2004) Neuronal and muscular alterations caused by two wheat endosperm proteins, puroindoline-a and alpha1-purothionin, are due to ion pore formation. *Eur Biophys J* 33, 283–284.
- (111) Hughes, P., Dennis, E., Whitecross, M., Llewellyn, D., and Gage, P. (2000) The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol Chem* 275, 823–827.

- (112) Richard, J. A., Kelly, I., Marion, D., Pezolet, M., and Auger, M. (2002) Interaction between beta-Purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a (31)P-NMR and infrared spectroscopic study. *Biophys J* 83, 2074–2083.
- (113) Thevissen, K., Terras, F. R., and Broekaert, W. F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Env. Microbiol* 65, 5451–5458.
- (114) Stec, B., Markman, O., Rao, U., Heffron, G., Henderson, S., Vernon, L. P., Brumfeld, V., and Teeter, M. M. (2004) Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J Pept Res* 64, 210–224.
- (115) Vanparijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., and Peumans, W. J. (1991) Hevein - an Antifungal Protein from Rubber-Tree (*Hevea-Brasiliensis*) Latex. *Planta* 183, 258–264.
- (116) Beintema, J. J. (1994) Structural Features of Plant Chitinases and Chitin-Binding Proteins. *Febs Lett.* 350, 159–163.
- (117) Raikhel, N. V, Lee, H. I., and Broekaert, W. F. (1993) Structure and Function of Chitin-Binding Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 591–615.
- (118) Koo, J. C., Lee, S. Y., Chun, H. J., Cheong, Y. H., Choi, J. S., Kawabata, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Ha, K. S., Bae, D. W., Han, C. D., Lee, B. L., and Cho, M. J. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1382, 80–90.
- (119) Li, S. S., and Claeson, P. (2003) Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. *Phytochemistry* 63, 249–255.
- (120) Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R. G., Debolle, M. F. C., Proost, P., Vandamme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J., and Cammue, B. P. A. (1992) Antimicrobial Peptides from *Amaranthus-Caudatus* Seeds with Sequence Homology to the Cysteine Glycine-Rich Domain of Chitin-Binding Proteins. *Biochemistry* 31, 4308–4314.
- (121) Rivillas-Acevedo, L. A., and Soriano-Garcia, M. (2007) Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10156–10161.
- (122) Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., and Egorov, T. (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* 66, 2426–2431.
- (123) Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., and Mikkelsen, J. D. (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* 113, 83–91.

- (124) Van den Bergh, K. P. B., Proost, P., Van Damme, J., Coosemans, J., Van Damme, E. J. M., and Peumans, W. J. (2002) Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *Febs Lett.* 530, 181–185.
- (125) Odintsova, T. I., Vassilevski, A. A., Slavokhotova, A. A., Musolyamov, A. K., Finkina, E. I., Khadeeva, N. V., Rogozhin, E. A., Korostyleva, T. V., Pukhalsky, V. A., Grishin, E. V., and Egorov, T. A. (2009) A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. *Febs J.* 276, 4266–4275.
- (126) Utkina, L. L., Zhabon, E. O., Slavokhotova, A. A., Rogozhin, E. A., Shiian, A. N., Grishin, E. V., Egorov Ts, A., Odintsova, T. I., and Pukhal'skii, V. A. (2010) [Heterologous expression of a synthetic gene encoding a novel hevein-type antimicrobial peptide of *Leymus arenarius* in *Escherichia coli* cells]. *Genetika* 46, 1645–1651.
- (127) Van den Bergh, K. P. B., Rouge, P., Proost, P., Coosemans, J., Krouglova, T., Engelborghs, Y., Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. M. (2004) Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *Planta* 219, 221–232.
- (128) Koo, J. C., Lee, B., Young, M. E., Koo, S. C., Cooper, J. A., Baek, D., Lim, C. O., Lee, S. Y., Yun, D. J., and Cho, M. J. (2004) Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol.* 45, 1669–1680.
- (129) Lee, O. S., Lee, B., Park, N., Koo, J. C., Kim, Y. H., Prasad, D. T., Karigar, C., Chun, H. J., Jeong, B. R., Kim, D. H., Nam, J., Yun, J. G., Kwak, S. S., Cho, M. J., and Yun, D. J. (2003) Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* 62, 1073–1079.
- (130) Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., and Mikkelsen, J. D. (1996) New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid transfer proteins. *Plant Mol Biol* 31, 539–552.
- (131) Segura, A., Moreno, M., and Garcia-Olmedo, F. (1993) Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett* 332, 243–246.
- (132) Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., Devries, S., and Somerville, C. (1994) Tissue-Specific Expression of a Gene Encoding a Cell Wall-Localized Lipid Transfer Protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 105, 35–45.
- (133) Cheng, C. S., Chen, M. N., Lai, Y. T., Chen, T., Lin, K. F., Liu, Y. J., and Lyu, P. C. (2008) Mutagenesis study of rice nonspecific lipid transfer protein 2 reveals residues that contribute to structure and ligand binding. *Proteins-Structure Funct. Genet.* 70, 695–706.
- (134) Lullien-Pellerin, V., Devaux, C., Ihorai, T., Marion, D., Pahin, V., Joudrier, P., and Gautier, M. F. (1999) Production in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis of a 9-kDa nonspecific lipid transfer protein from wheat. *Eur. J. Biochem.* 260, 861–868.

- (135) Lerche, M. H., Kragelund, B. B., Bech, L. M., and Poulsen, F. M. (1997) Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: The structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* 5, 291–306.
- (136) Sodano, P., Caille, A., Sy, D., dePerson, G., Marion, D., and Ptak, M. (1997) H-1 NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *Febs Lett.* 416, 130–134.
- (137) Gomar, J., Sodano, P., Sy, D., Shin, D. H., Lee, J. Y., Suh, S. W., Marion, D., Vovelle, F., and Ptak, M. (1998) Comparison of solution and crystal structures of maize nonspecific lipid transfer protein: A model for a potential in vivo lipid carrier protein. *Proteins-Structure Funct. Genet.* 31, 160–171.
- (138) Lee, J. Y., Min, K., Cha, H., Shin, D. H., Hwang, K. Y., and Suh, S. W. (1998) Rice non-specific lipid transfer protein: The 1.6 angstrom crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J. Mol. Biol.* 276, 437–448.
- (139) Tassin, S., Broekaert, W. F., Marion, D., Acland, D. P., Ptak, M., Vovelle, F., and Sodano, P. (1998) Solution structure of Ace-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry* 37, 3623–3637.
- (140) Yeats, T. H., and Rose, J. K. (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci* 17, 191–198.
- (141) Cheng, H. C., Cheng, P. T., Peng, P., Lyu, P. C., and Sun, Y. J. (2004) Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. *Protein Sci.* 13, 2304–2315.
- (142) Cheng, C. S., Samuel, D., Liu, Y. J., Shyu, J. C., Lai, S. M., Lin, K. F., and Lyu, P. C. (2004) Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochemistry* 43, 13628–13636.
- (143) Jose-Estanyol, M., Gomis-Ruth, F. X., and Puigdomenech, P. (2004) The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol Biochem* 42, 355–365.
- (144) Kader, J. C. (1996) Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 627–654.
- (145) Jayaraj, J., and Punja, Z. K. (2007) Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Rep* 26, 1539–1546.
- (146) Sawano, Y., Hatano, K., Miyakawa, T., Komagata, H., Miyauchi, Y., Yamazaki, H., and Tanokura, M. (2008) Proteinase inhibitor from ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol.* 146, 1909–19.

- (147) Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderleyden, J., and Broekaert, W. F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem* 267, 2228–2233.
- (148) Gao, G. H., Liu, W., Dai, J. X., Wang, J. F., Hu, Z., Zhang, Y., and Wang, D. C. (2001) Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry* 40, 10973–8.
- (149) Grishin, E. V., Savchenko, G. A., Vassilevski, A. A., Korolkova, Y. V., Boychuk, Y. A., Viatchenko-Karpinski, V. Y., Nadezhdin, K. D., Arseniev, A. S., Pluzhnikov, K. A., Kulyk, V. B., Voitenko, N. V., and Krishtal, O. O. (2010) Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain. *Ann. Neurol.* 67, 680–3.
- (150) Göransson, U., Herrmann, A., Burman, R., Haugaard-Jönsson, L. M., and Rosengren, K. J. (2009) The conserved glu in the cyclotide cycloviolacin O2 has a key structural role. *Chembiochem* 10, 2354–60.
- (151) Heitz, A., Hernandez, J. F., Gagnon, J., Hong, T. T., Pham, T. T., Nguyen, T. M., Le-Nguyen, D., and Chiche, L. (2001) Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* 40, 7973–83.
- (152) Bulet, P., and Stocklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett* 12, 3–11.
- (153) Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J. C., Kaas, Q., Heitz, A., and Chiche, L. (2008) KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Res.* 36, D314–9.
- (154) Norton, R. S., and Pallaghy, P. K. (1998) The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36, 1573–1583.
- (155) Craik, D. J., Daly, N. L., and Waine, C. (2001) The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 39, 43–60.
- (156) Chagolla-Lopez, A., Blanco-Labra, A., Patthy, A., Sanchez, R., and Pongor, S. (1994) A novel alpha-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *J Biol Chem* 269, 23675–23680.
- (157) Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., and Broekaert, W. F. (1997) Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J Biol Chem* 272, 32176–32181.
- (158) Chouabe, C., Eyraud, V., Da Silva, P., Rahioui, I., Royer, C., Soulage, C., Bonvallet, R., Huss, M., and Gressent, F. (2011) New mode of action for a knottin protein bioinsecticide: pea albumin 1 subunit b (PA1b) is the first peptidic inhibitor of V-ATPase. *J Biol Chem* 286, 36291–36296.

- (159) Craik, D. J., Daly, N. L., Bond, T., and Waine, C. (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.* 294, 1327–1336.
- (160) Gruber, C. W., Elliott, A. G., Ireland, D. C., Delprete, P. G., Dessein, S., Goransson, U., Trabi, M., Wang, C. K., Kinghorn, A. B., Robbrecht, E., and Craik, D. J. (2008) Distribution and Evolution of Circular Miniproteins in Flowering Plants. *Plant Cell* 20, 2471–2483.
- (161) Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J. C., Gracy, J., Chau, P. T., Ha, P. T., Hernandez, J. F., and Le-Nguyen, D. (2004) Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Curr Protein Pept Sci* 5, 341–349.
- (162) Tam, J. P., Lu, Y. A., Yang, J. L., and Chiu, K. W. (1999) An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8913–8918.
- (163) Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D., and Anderson, M. (2001) Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10614–10619.
- (164) Lindholm, P., Goransson, U., Johansson, S., Claeson, P., Gullbo, J., Larsson, R., Bohlin, L., and Backlund, A. (2002) Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther* 1, 365–369.
- (165) Henriques, S. T., Huang, Y. H., Rosengren, K. J., Franquelim, H. G., Carvalho, F. A., Johnson, A., Sonza, S., Tachedjian, G., Castanho, M. A., Daly, N. L., and Craik, D. J. (2011) Decoding the membrane activity of the cyclotide kalata B1: the importance of phosphatidylethanolamine phospholipids and lipid organization on hemolytic and anti-HIV activities. *J Biol Chem* 286, 24231–24241.
- (166) Hallock, Y. F., Sowder 2nd, R. C., Pannell, L. K., Hughes, C. B., Johnson, D. G., Gulakowski, R., Cardellina 2nd, J. H., and Boyd, M. R. (2000) Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. *J Org Chem* 65, 124–128.
- (167) Barbeta, B. L., Marshall, A. T., Gillon, A. D., Craiks, D. J., and Anderson, M. A. (2008) Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1221–1225.
- (168) Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., and Glockshuber, R. (1998) Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 278, 617–28.
- (169) Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature* 255, 609–614.

- (170) Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.* 94, 137–55.
- (171) Ryan, C. A. (1990) Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425–449.
- (172) Da Silva, M. C. M., Del Sarto, R. P., Lucena, W. A., Rigden, D. J., Teixeira, F. R., Bezerra, C. de A., Albuquerque, E. V. S., and Grossi-de-Sa, M. F. (2013) Employing in vitro directed molecular evolution for the selection of α -amylase variant inhibitors with activity toward cotton boll weevil enzyme. *J. Biotechnol.* 167, 377–85.
- (173) Liu, Y.-J., Cheng, C.-S., Lai, S.-M., Hsu, M.-P., Chen, C.-S., and Lyu, P.-C. (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins* 63, 777–86.
- (174) Capocchi, A., Muccilli, V., Cunsolo, V., Saletti, R., Foti, S., and Fontanini, D. (2013) A heterotetrameric alpha-amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochemistry* 88, 6–14.
- (175) Ponnusamy, S., Zinjarde, S., Bhargava, S., Rajamohanan, P. R., and Ravikumar, A. (2012) Discovering Bisdemethoxycurcumin from *Curcuma longa* rhizome as a potent small molecule inhibitor of human pancreatic α -amylase, a target for type-2 diabetes. *Food Chem.* 135, 2638–42.
- (176) Fakhoury, A. M., and Woloshuk, C. P. (2001) Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal alpha-amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14, 955–61.
- (177) Weselake, R. J., Macgregor, A. W., and Hill, R. D. (1983) An endogenous alpha-amylase inhibitor in barley kernels. *Plant Physiol.* 72, 809–12.
- (178) Yamagata, H., Kunimatsu, K., Kamasaka, H., Kuramoto, T., and Iwasaki, T. (1998) Rice bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 978–85.
- (179) Pueyo, J. J., Morgan, T. D., Ameenuddin, N., Liang, C., Reeck, G. R., Chrispeels, M. J., and Kramer, K. J. (1995) Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored product insect pests*. *Entomol. Exp. Appl.* 75, 237–244.
- (180) Carugo, O., Lu, S., Luo, J., Gu, X., Liang, S., Strobl, S., and Pongor, S. (2001) Structural analysis of free and enzyme-bound amaranth alpha-amylase inhibitor: classification within the knottin fold superfamily and analysis of its functional flexibility. *Protein Eng.* 14, 639–46.
- (181) Workman, P. (2004) Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 393–6.

- (182) Brych, S. R., Blaber, S. I., Logan, T. M., and Blaber, M. (2001) Structure and stability effects of mutations designed to increase the primary sequence symmetry within the core region of a beta-trefoil. *Protein Sci.* 10, 2587–99.
- (183) Vigers, A. J., Roberts, W. K., and Selitrennikoff, C. P. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 4, 315–23.
- (184) Lee, S.-C., Gepts, P. L., and Whitaker, J. R. (2002) Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6618–27.
- (185) Armijo, G., Salinas, P., Monteoliva, M. I., Seguel, A., García, C., Villarroel-Candia, E., Song, W., van der Krol, A. R., Álvarez, M. E., and Holuigue, L. (2013) A salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26, 1395–406.
- (186) Guo, P., Wang, Y., Zhou, X., Xie, Y., Wu, H., and Gao, X. (2013) Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests. *Plant Sci.* 211, 17–22.
- (187) Munis, M. F. H., Tu, L., Deng, F., Tan, J., Xu, L., Xu, S., Long, L., and Zhang, X. (2010) A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 38–44.
- (188) Cândido, E. de S., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., Grossi-de-Sá, M. F., and Franco, O. L. (2011) Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J.* 25, 3290–305.
- (189) Bloch Jr., C., and Richardson, M. (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett* 279, 101–104.
- (190) Bloch Jr., C., Patel, S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J., Carr, M. D., Sadler, P. J., and Thornton, J. M. (1998) 1H NMR structure of an antifungal gamma-thionin protein SIalpha1: similarity to scorpion toxins. *Proteins-Structure Funct. Genet.* 32, 334–349.
- (191) Ball, A. S. (1991) Degradation by *Streptomyces viridosporus* T7A of plant material grown under elevated CO₂ conditions. *FEMS Microbiol Lett* 68, 139–142.
- (192) Ries, S. M., Albersheim, P. (1973) Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathol.*
- (193) Murphy, J. M., and Walton, J. D. (1996) Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of ALP1. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 9, 290–7.

- (194) Bidochka, M. J., St Leger, R. J., Stuart, A., and Gowanlock, K. (1999) Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology* 145 (Pt 4, 955–63.
- (195) Dobinson, K. F., Lecomte, N., and Lazarovits, G. (1997) Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* 43, 227–33.
- (196) Carlile, A. J., Bindschedler, L. V, Bailey, A. M., Bowyer, P., Clarkson, J. M., and Cooper, R. M. (2000) Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 538–50.
- (197) Gvozdeva, E. L., Ievleva, E. V, Gerasimova, N. G., Ozeretskovskaia, O. L., and Valueva, T. A. [Exoproteinases of the oomycete *Phytophthora infestans*]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 40, 194–200.
- (198) Reddy, P. V, Lam, C. K., and Belanger, F. C. (1996) Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiol.* 111, 1209–18.
- (199) Sreedhar, L., Kobayashi, D. Y., Bunting, T. E., Hillman, B. I., and Belanger, F. C. (1999) Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. *Gene* 235, 121–9.
- (200) Dunaevsky, Y. E., Gruban, T. N., Beliakova, G. A., and Belozersky, M. A. (2000) Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. *Biochem. Biokhimiia* 65, 723–7.
- (201) Michielse, C. B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B. J. C., and Rep, M. (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol.* 10, R4.
- (202) Movahedi, S., Norey, C. G., Kay, J., and Heale, J. B. (1991) Infection and pathogenesis of cash crops by *Botrytis cinerea*: primary role of an aspartic proteinase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 306, 213–6.
- (203) Clark, S. J., Templeton, M. D., and Sullivan, P. A. (1997) A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. *Microbiology* 143 (Pt 4, 1395–403.
- (204) Choi, G. H., Pawlyk, D. M., Rae, B., Shapira, R., and Nuss, D. L. (1993) Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*. *Gene* 125, 135–41.
- (205) Reichard, U., Eiffert, H., and Röchel, R. (1994) Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 32, 427–436.

- (206) Zhang, Y., Bak, D. D., Heid, H., and Geider, K. (1999) Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *J. Mol. Biol.* 289, 1239–51.
- (207) Ghigo, J. M., and Wandersman, C. A fourth metalloprotease gene in *Erwinia chrysanthemi*. *Res. Microbiol.* 143, 857–67.
- (208) Ball, A. M., Ashby, A. M., Daniels, M. J., Ingram, D. S., and Johnstone, K. (1991) Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38, 147–161.
- (209) Wolfson, J. L., and Murdock, L. L. (1990) Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16, 1089–102.
- (210) Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., and Yelle, S. (1993) Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Lett.* 331, 173–6.
- (211) Brunelle, F., Nguyen-Quoc, B., Cloutier, C., and Michaud, D. (1999) Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 88–98.
- (212) Novillo, C., Castañera, P., and Ortego, F. (1997) Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36, 181–201.
- (213) Green, T. R., and Ryan, C. A. (1972) Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science* 175, 776–7.
- (214) Hildmann, T., Ebnet, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., and Prat, S. (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157–70.
- (215) Graham, J. S., and Ryan, C. A. (1981) Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1164–70.
- (216) Bolter, C. J. (1993) Methyl Jasmonate Induces Papain Inhibitor(s) in Tomato Leaves. *Plant Physiol.* 103, 1347–1353.
- (217) Mosolov, V. V., Fedurkina, N. V., Valueva, T. A., and Sokolova, E. V. (1976) An alcohol-soluble trypsin inhibitor from beans. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 12, 37–44.
- (218) Shul'mina, A. I., Cherniak, V. I., Magretova, N. N., Malova, E. L., and Dronova, L. A. (1976) Physico-chemical properties of a protein-inhibitor of serine proteinases from the potato. *Biokhimiia (Moscow, Russ.)* 41, 1229–34.
- (219) Urwin, P. E., Troth, K. M., Zubko, E. I., and Atkinson, H. J. (2001) Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Mol. Breed.* 8, 95–101.

- (220) Walker, A. J., Urwin, P. E., Atkinson, H. J., Brain, P., Glen, D. M., and Shewry, P. R. (1999) Transgenic Arabidopsis leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *Transgenic Res.* 8, 95–103.
- (221) Grudkowska, M., and Zagdanska, B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol* 51, 609–624.
- (222) Shan, L., Li, C., Chen, F., Zhao, S., and Xia, G. (2008) A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant. Cell Environ.* 31, 1128–37.
- (223) Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and O'Brien, E. A. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* 134, 95–102.
- (224) Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227–33.
- (225) Richardson, R. T., Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., Moore, P. A., Ruben, S. M., French, F. S., and O'Rand, M. (2001) Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene* 270, 93–102.
- (226) Trexler, M., Bányai, L., and Patthy, L. (2001) A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3705–9.
- (227) Trexler, M., Bányai, L., and Patthy, L. (2002) Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Biol. Chem.* 383, 223–8.
- (228) Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378, 705–16.
- (229) Heibges, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. (2003) Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics* 269, 535–41.
- (230) De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., and Ceci, L. R. (2002) PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res.* 30, 347–8.
- (231) Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157–62.
- (232) Huber, R., and Bode, W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* 11, 114–122.
- (233) Laskowski, M., and Qasim, M. A. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim Biophys Acta* 1477, 324–337.

- (234) Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., and Oleksy, A. (2005) The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J.* 24, 1303–10.
- (235) Otlewski, J., Krowarsch, D., and Apostoluk, W. (1999) Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* 46, 531–65.
- (236) Folkers, P. J., Clore, G. M., Driscoll, P. C., Dodt, J., Köhler, S., and Gronenborn, A. M. (1989) Solution structure of recombinant hirudin and the Lys-47---Glu mutant: a nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 28, 2601–17.
- (237) Szyperski, T., Güntert, P., Stone, S. R., and Wüthrich, K. (1992) Nuclear magnetic resonance solution structure of hirudin(1-51) and comparison with corresponding three-dimensional structures determined using the complete 65-residue hirudin polypeptide chain. *J. Mol. Biol.* 228, 1193–205.
- (238) Carrell, R., Lomas, D., Stein, P., and Whisstock, J. (1997) Dysfunctional variants and the structural biology of the serpins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 425, 207–22.
- (239) Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R. M., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Gerard, R. D., and Goldsmith, E. J. (1992) Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 355, 270–3.
- (240) Ishikawa, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T., and Nakamura, K. (1994) A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.* 35, 303–12.
- (241) Laskowski, M., and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593–626.
- (242) Scheidig, A. J., Hynes, T. R., Pelletier, L. A., Wells, J. A., and Kossiakoff, A. A. (1997) Crystal structures of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): engineering of inhibitors with altered specificities. *Protein Sci.* 6, 1806–24.
- (243) De Meester, P., Brick, P., Lloyd, L. F., Blow, D. M., and Onesti, S. (1998) Structure of the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor (STI): implication for the interactions between members of the STI family and tissue-plasminogen activator. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54, 589–97.
- (244) Barrette-Ng, I. H., Ng, K. K.-S., Cherney, M. M., Pearce, G., Ghani, U., Ryan, C. A., and James, M. N. G. (2003) Unbound form of tomato inhibitor-II reveals interdomain flexibility and conformational variability in the reactive site loops. *J. Biol. Chem.* 278, 31391–400.
- (245) Wang, L., Zhao, F., Li, M., Zhang, H., Gao, Y., Cao, P., Pan, X., Wang, Z., and Chang, W. (2011) Conformational changes of rBTI from buckwheat upon binding to trypsin: implications for the role of the P(8)' residue in the potato inhibitor I family. *PLoS One* 6, e20950.

- (246) Ritonja, A., Krizaj, I., Mesko, P., Kopitar, M., Lucovnik, P., Strukelj, B., Pungercar, J., Buttle, D. J., Barrett, A. J., and Turk, V. (1990) The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267, 13–5.
- (247) Krauchenco, S., Nagem, R. A. P., da Silva, J. A., Marangoni, S., and Polikarpov, I. (2004) Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie* 86, 167–72.
- (248) Koide, T., IKENAKA, T., and Tsunasawa, S. (1973) Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.* 32, 408–416.
- (249) Lehle, K., Wrba, A., and Jaenicke, R. (1994) *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. *J. Mol. Biol.* 239, 276–84.
- (250) Wilson, K. A., Papastoitisis, G., Hasegawa, P. M., and Tan-Wilson, A. L. (1988) Survey of the Proteolytic Activities Degrading the Kunitz Trypsin Inhibitor and Glycinin in Germinating Soybeans (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 88, 355–60.
- (251) Onesti, S., Brick, P., and Blow, D. M. (1991) Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.* 217, 153–176.
- (252) McBride, J. D., Watson, E. M., Brauer, A. B., Jaulent, A. M., and Leatherbarrow, R. J. (2002) Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. *Biopolymers* 66, 79–92.
- (253) BOWMAN, D. E. (1946) Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63, 547–50.
- (254) BIRK, Y., GERTLER, A., and KHALEF, S. (1963) A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem. J.* 87, 281–4.
- (255) Odani, S., Koide, T., and Ono, T. (1986) Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. *J. Biochem.* 100, 975–83.
- (256) Norioka, S., and Ikenaka, T. (1983) Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. *J. Biochem.* 94, 589–99.
- (257) Tanaka, A. S., Sampaio, M. U., Marangoni, S., de Oliveira, B., Novello, J. C., Oliva, M. L., Fink, E., and Sampaio, C. A. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. *Biol. Chem.* 378, 273–81.
- (258) Raj, S. S. S., Kibushi, E., Kurasawa, T., Suzuki, A., Yamane, T., Odani, S., Iwasaki, Y., Yamane, T., and Ashida, T. (2002) Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 Å resolution. *J. Biochem.* 132, 927–33.

- (259) Birk, Y. (1985) The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int. J. Pept. Protein Res.* 25, 113–31.
- (260) Tur-Sinal, A., Birk, Y., Gertler, A., and Rigbi, M. (1972) A basic trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Biochim. Biophys. Acta* 263, 666–72.
- (261) Prakash, B., Selvaraj, S., Murthy, M. R., Sreerama, Y. N., Rao, D. R., and Gowda, L. R. (1996) Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. *J. Mol. Evol.* 42, 560–9.
- (262) Brauer, A. B. E., Nievo, M., McBride, J. D., and Leatherbarrow, R. J. (2003) The structural basis of a conserved P2 threonine in canonical serine proteinase inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20, 645–56.
- (263) Song, H. K., Kim, Y. S., Yang, J. K., Moon, J., Lee, J. Y., and Suh, S. W. (1999) Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 293, 1133–44.
- (264) Korsinczky, M. L., Schirra, H. J., Rosengren, K. J., West, J., Condie, B. A., Otvos, L., Anderson, M. A., and Craik, D. J. (2001) Solution structures by ¹H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. *J. Mol. Biol.* 311, 579–91.
- (265) Voss, R. H., Ermler, U., Essen, L. O., Wenzl, G., Kim, Y. M., and Flecker, P. (1996) Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation. *Eur. J. Biochem.* 242, 122–31.
- (266) Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M., and Takahashi, K. (1996) Solution structure of bromelain inhibitor IV from pineapple stem: structural similarity with Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor from soybean. *Biochemistry* 35, 5379–84.
- (267) Hara, S., Makino, J., and Ikenaka, T. (1989) Amino acid sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* LINN.) seeds. *J. Biochem.* 105, 88–91.
- (268) Lee, C. F., and Lin, J. Y. (1995) Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the melon *Cucumis melo*. *J. Biochem.* 118, 18–22.
- (269) Hamato, N., Koshihara, T., Pham, T. N., Tatsumi, Y., Nakamura, D., Takano, R., Hayashi, K., Hong, Y. M., and Hara, S. (1995) Trypsin and elastase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* LINN.) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *J. Biochem.* 117, 432–7.
- (270) Felizmenio-Quimio, M. E., Daly, N. L., and Craik, D. J. (2001) Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J. Biol. Chem.* 276, 22875–82.

- (271) Nilges, M., Habazettl, J., Brünger, A. T., and Holak, T. A. (1991) Relaxation matrix refinement of the solution structure of squash trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 219, 499–510.
- (272) Le Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., Castro, B., Boigegrain, R. A., Favel, A., and Coletti-Previero, M. A. Molecular recognition between serine proteases and new bioactive microproteins with a knotted structure. *Biochimie* 72, 431–5.
- (273) Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.-C., Gracy, J., Chau, P. T. T., Ha, P. T., Hernandez, J.-F., and Le-Nguyen, D. (2004) Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 341–349.
- (274) Menegatti, E., Tedeschi, G., Ronchi, S., Bortolotti, F., Ascenzi, P., Thomas, R. M., Bolognesi, M., and Palmieri, S. (1992) Purification, inhibitory properties and amino acid sequence of a new serine proteinase inhibitor from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *FEBS Lett.* 301, 10–4.
- (275) Ascenzi, P., Ruoppolo, M., Amoresano, A., Pucci, P., Consonni, R., Zetta, L., Pascarella, S., Bortolotti, F., and Menegatti, E. (1999) Characterization of low-molecular-mass trypsin isoinhibitors from oil-rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) seed. *Eur. J. Biochem.* 261, 275–84.
- (276) Volpicella, M., Schipper, A., Jongmsa, M. A., Spoto, N., Gallerani, R., and Ceci, L. R. (2000) Characterization of recombinant mustard trypsin inhibitor 2 (MTI2) expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 468, 137–41.
- (277) Zhao, Q., Chae, Y. K., and Markley, J. L. (2002) NMR solution structure of ATTp, an *Arabidopsis thaliana* trypsin inhibitor. *Biochemistry* 41, 12284–96.
- (278) Ceciliani, F., Bortolotti, F., Menegatti, E., Ronchi, S., Ascenzi, P., and Palmieri, S. (1994) Purification, inhibitory properties, amino acid sequence and identification of the reactive site of a new serine proteinase inhibitor from oil-rape (*Brassica napus*) seed. *FEBS Lett.* 342, 221–4.
- (279) De Leo, F., Volpicella, M., Sciancalepore, M., Gallerani, R., and Ceci, L. R. (2006) One of the three proteinase inhibitor genes newly identified in the *Brassica napus* genome codes for an inhibitor of glutamyl endopeptidase. *FEBS Lett.* 580, 948–54.
- (280) Nagata, K., Kudo, N., Abe, K., Arai, S., and Tanokura, M. (2000) Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Biochemistry* 39, 14753–60.
- (281) Gourinath, S., Alam, N., Srinivasan, A., Betzel, C., and Singh, T. P. (2000) Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and alpha-amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56, 287–93.
- (282) Margossian, L. J., Federman, A. D., Giovannoni, J. J., and Fischer, R. L. (1988) Ethylene-regulated expression of a tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at the reactive site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8012–6.

- (283) Wingate, V. P., Broadway, R. M., and Ryan, C. A. (1989) Isolation and characterization of a novel, developmentally regulated proteinase inhibitor I protein and cDNA from the fruit of a wild species of tomato. *J. Biol. Chem.* 264, 17734–8.
- (284) RYAN, C. A., and BALLS, A. K. (1962) An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 1839–44.
- (285) Murray, C., and Christeller, J. T. (1995) Purification of a trypsin inhibitor (PFTI) from pumpkin fruit phloem exudate and isolation of putative trypsin and chymotrypsin inhibitor cDNA clones. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 376, 281–7.
- (286) Lee, J. S., Brown, W. E., Graham, J. S., Pearce, G., Fox, E. A., Dreher, T. W., Ahern, K. G., Pearson, G. D., and Ryan, C. A. (1986) Molecular characterization and phylogenetic studies of a wound-inducible proteinase inhibitor I gene in *Lycopersicon* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 7277–81.
- (287) Cai, M., Gong, Y., Kao, J. L., and Krishnamoorthi, R. (1995) Three-dimensional solution structure of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34, 5201–11.
- (288) Iwasaki, T., Kiyohara, T., and Yoshikawa, M. (1971) Purification and partial characterization of two different types of proteinase inhibitors (inhibitors II-a and II-b) from potatoes. *J. Biochem.* 70, 817–26.
- (289) Christeller, J., and Laing, W. (2005) Plant serine proteinase inhibitors. *Protein Pept. Lett.* 12, 439–47.
- (290) Pearce, G., Johnson, S., and Ryan, C. A. (1993) Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase isoinhibitors of the potato inhibitor II family. *Plant Physiol.* 102, 639–44.
- (291) Atkinson, A. H., Heath, R. L., Simpson, R. J., Clarke, A. E., and Anderson, M. A. (1993) Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell* 5, 203–13.
- (292) Barrette-Ng, I. H., Ng, K. K.-S., Cherney, M. M., Pearce, G., Ryan, C. A., and James, M. N. G. (2003) Structural basis of inhibition revealed by a 1:2 complex of the two-headed tomato inhibitor-II and subtilisin Carlsberg. *J. Biol. Chem.* 278, 24062–71.
- (293) Turk, V., and Bode, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 285, 213–9.
- (294) Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Arai, S., and Suzuki, K. (1988) The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. Expression of oryzacystatin cDNA and its truncated fragments in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 7655–9.

- (295) Abe, M., Abe, K., Kuroda, M., and Arai, S. (1992) Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. *Eur. J. Biochem.* 209, 933–7.
- (296) Botella, M. A., Xu, Y., Prabha, T. N., Zhao, Y., Narasimhan, M. L., Wilson, K. A., Nielsen, S. S., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. (1996) Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 112, 1201–10.
- (297) Kim, J. Y., Chung, Y. S., Paek, K. H., Park, Y. I., Kim, J. K., Yu, S. N., Oh, B. J., and Shin, J. S. (1999) Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Mol. Cells* 9, 392–7.
- (298) Ryan, S. N., Laing, W. A., and McManus, M. T. (1998) A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry* 49, 957–63.
- (299) Brown, W. M., and Dziegielewska, K. M. (1997) Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. *Protein Sci.* 6, 5–12.
- (300) Pernas, M., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., and Salcedo, G. (1998) A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Mol. Biol.* 38, 1235–42.
- (301) Sakuta, C., Oda, A., Konishi, M., Yamakawa, S., Kamada, H., and Satoh, S. (2001) Cysteine proteinase gene expression in the endosperm of germinating carrot seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2243–8.
- (302) Björk, I., Brieditis, I., and Abrahamson, M. (1995) Probing the functional role of the N-terminal region of cystatins by equilibrium and kinetic studies of the binding of Gly-11 variants of recombinant human cystatin C to target proteinases. *Biochem. J.* 306 (Pt 2, 513–8.
- (303) Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V., and Bode, W. (1989) Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett.* 243, 234–8.
- (304) Headey, S. J., Macaskill, U. K., Wright, M. A., Claridge, J. K., Edwards, P. J. B., Farley, P. C., Christeller, J. T., Laing, W. A., and Pascal, S. M. (2010) Solution structure of the squash aspartic acid proteinase inhibitor (SQAPI) and mutational analysis of pepsin inhibition. *J. Biol. Chem.* 285, 27019–25.
- (305) Walsh, T. A., and Strickland, J. A. (1993) Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. *Plant Physiol.* 103, 1227–34.

- (306) Felton, G. W., and Korth, K. L. (2000) Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 309–14.
- (307) Huang, Y.-J., To, K.-Y., Yap, M.-N., Chiang, W.-J., Suen, D.-F., and Chen, S.-C. G. (2001) Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol. Plant.* 113, 384–391.
- (308) Odani, S., Koide, T., and Ono, T. (1983) The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 258, 7998–8003.
- (309) Hass, G. M., and Hermodson, M. A. (1981) Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry* 20, 2256–60.
- (310) Haukioja, E., and Neuvonen, S. (1985) Induced Long-Term Resistance of Birch Foliage against Defoliators: Defensive or Incidental? *Ecology* 66, 1303.
- (311) Arolas, J. L., Lorenzo, J., Rovira, A., Castellà, J., Aviles, F. X., and Sommerhoff, C. P. (2005) A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 280, 3441–8.
- (312) Liu, Q., Yu, L., Gao, J., Fu, Q., Zhang, J., Zhang, P., Chen, J., and Zhao, S. (2000) Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase A inhibitor. *Mol. Biol. Rep.* 27, 241–6.
- (313) Normant, E., Martres, M. P., Schwartz, J. C., and Gros, C. (1995) Purification, cDNA cloning, functional expression, and characterization of a 26-kDa endogenous mammalian carboxypeptidase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12225–9.
- (314) Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I., and Kobayashi, H. (2000) Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 931–9.
- (315) Kervinen, J., Tobin, G. J., Costa, J., Waugh, D. S., Wlodawer, A., and Zdanov, A. (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *EMBO J.* 18, 3947–55.
- (316) Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V., and Baudys, M. (1989) Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* 251, 94–8.
- (317) Petek, M., Turnšek, N., Gašparič, M. B., Novak, M. P., Gruden, K., Slapar, N., Popovič, T., Štrukelj, B., and Jongsma, M. A. (2012) A complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79, 153–81.

- (318) Vinokurov, K. S., Elpidina, E. N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D. P., Dunaevsky, Y. E., and Belozersky, M. A. (2006) Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145, 126–137.
- (319) Bieth, J. G. (1995) Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics. *Methods Enzym.* 248, 59–84.
- (320) Tsybina, T. A., Dunaevsky, Y. E., Musolyamov, A. K., Egorov, T. A., and Belozersky, M. A. (2001) Cationic inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds. *Biochem.* 66, 941–947.
- (321) Tsybina, T., Dunaevsky, Y., Musolyamov, A., Egorov, T., Larionova, N., Popykina, N., and Belozersky, M. (2004) New protease inhibitors from buckwheat seeds: properties, partial amino acid sequences and possible biological role. *Biol Chem* 385, 429–434.
- (322) Tsybina, T. A., Dunaevsky, Y. E., Musolyamov, A. K., Egorov, T. A., and Belozersky, M. A. (2001) Cationic inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds. *Biochem. Biokhimiia* 66, 941–7.
- (323) Tsybina, T. A., Dunaevsky, Y. E., Popykina, N. A., Larionova, N. I., and Belozersky, M. A. (2004) Cationic inhibitors of serine proteinases from buckwheat seeds: study of their interaction with exogenous proteinases. *Biochem. Biokhimiia* 69, 441–4.
- (324) Choi, S. Y., Sohn, J. H., Lee, Y. W., Lee, E. K., Hong, C. S., and Park, J. W. (2007) Characterization of buckwheat 19-kD allergen and its application for diagnosing clinical reactivity. *Int Arch Allergy Immunol* 144, 267–274.
- (325) Dunwell, J. M. (1998) Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 15, 1–32.
- (326) Dunwell, J., and Gane, P. (1998) Microbial relatives of seed storage proteins: conservation of motifs in a functionally diverse superfamily of enzymes. *J. Mol. Evol.* 46, 147–54.
- (327) Shutov, A. D., and Kakhovskaia, I. A. [Evolution of seed storage globulins and cupin superfamily]. *Mol. Biol. (Mosk).* 45, 579–85.
- (328) Dunwell, J. M., Khuri, S., and Gane, P. J. (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 153–79.
- (329) Connors, R., Konarev, A. V, Forsyth, J., Lovegrove, A., Marsh, J., Joseph-Horne, T., Shewry, P., and Brady, R. L. (2007) An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica* (*Veronica hederifolia* L.). *J Biol Chem* 282, 27760–27768.
- (330) Marcus, J. P., Green, J. L., Goulter, K. C., and Manners, J. M. (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J.* 19, 699–710.

- (331) Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G., and Marshak, D. R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem* 267, 18814–18820.
- (332) Yamada, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (1999) Multiple functional proteins are produced by cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor by vacuolar processing enzyme. *J Biol Chem* 274, 2563–2570.
- (333) Park, S. S., Abe, K., Kimura, M., Urisu, A., and Yamasaki, N. (1997) Primary structure and allergenic activity of trypsin inhibitors from the seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *FEBS Lett* 400, 103–107.
- (334) Ng, Y.-M., Yang, Y., Sze, K.-H., Zhang, X., Zheng, Y.-T., and Shaw, P.-C. (2011) Structural characterization and anti-HIV-1 activities of arginine/glutamate-rich polypeptide Luffin P1 from the seeds of sponge gourd (*Luffa cylindrica*). *J. Struct. Biol.* 174, 164–72.
- (335) Mattei, B., Miranda, A., Perez, K. R., and Riske, K. A. (2014) Structure-Activity Relationship of the Antimicrobial Peptide Gomesin: The Role of Peptide Hydrophobicity in Its Interaction with Model Membranes. *Langmuir*.
- (336) Kushibiki, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kumaki, Y., Kikukawa, T., Mizuguchi, M., Demura, M., Kawabata, S.-I., and Kawano, K. (2014) Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* 1844, 527–34.
- (337) Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B. C., Ranganathan, S., Bowie, H. J., Kini, R. M., and Gopalakrishnakone, P. (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J Biol Chem* 277, 30040–30047.
- (338) Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., and Ferrat, G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem J* 388, 263–271.
- (339) Zugasti-Cruz, A., Aguilar, M. B., Falcon, A., Olivera, B. M., and Heimer de la Cotera, E. P. (2008) Two new 4-Cys conotoxins (framework 14) of the vermivorous snail *Conus austini* from the Gulf of Mexico with activity in the central nervous system of mice. *Peptides* 29, 179–185.
- (340) Vila-Perelló, M., Tognon, S., Sánchez-Vallet, A., García-Olmedo, F., Molina, A., and Andreu, D. (2006) A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. *J. Med. Chem.* 49, 448–51.
- (341) Kabanova, N. V., Vassilevski, A. A., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Korolkova, Y. V., Pluzhnikov, K. A., Romanov, R. A., Grishin, E. V., and Kolesnikov, S. S. (2012) Modulation of P2X3 receptors by spider toxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2868–75.

- (342) Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Sterner, R. (2000) Directed evolution of a (beta alpha)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9925–30.
- (343) Carter, P. J. (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 343–57.
- (344) Lipovsek, D. (2011) Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Eng. Des. Sel.* 24, 3–9.
- (345) Aguilar, M. B., Pérez-Reyes, L. I., López, Z., de la Cotera, E. P. H., Falcón, A., Ayala, C., Galván, M., Salvador, C., and Escobar, L. I. (2010) Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels. *Peptides* 31, 1287–91.
- (346) Stehling, E. G., Sforça, M. L., Zanchin, N. I. T., Oyama, S., Pignatelli, A., Belluzzi, O., Polverini, E., Corsini, R., Spisni, A., and Pertinhez, T. A. (2012) Looking over toxin-K(+) channel interactions. Clues from the structural and functional characterization of α -KTx toxin Tc32, a Kv1.3 channel blocker. *Biochemistry* 51, 1885–94.
- (347) Zhu, L., Gao, B., Luo, L., and Zhu, S. (2012) Two dyad-free Shaker-type K⁺ channel blockers from scorpion venom. *Toxicon* 59, 402–7.