

РАЗНООБРАЗИЕ ХАРПИНОПОДОБНЫХ ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ СЕМЯН ЕЖОВНИКА (*Echinochloa crusgalli* L.)

Д. Ю. Рязанцев^{1,*}, Е. А. Рогожин^{1,**}, В. О. Цветков², Л. Г. Яруллина³,
А. Н. Смирнов⁴, член-корреспондент РАН С. К. Завриев^{1,***}

Поступило 15.06.2018 г.

Представлены результаты исследования структуры и функции харпиноподобных пептидов (альфа-харпининов) группы EcAMP семян ежовника (*E. crusgalli*) и возможности их участия во врождённом иммунитете к биотическим стрессам.

Ключевые слова: харпиноподобные пептиды, защитные пептиды, врожденный иммунитет растений, антигрибная активность, *Echinochloa crusgalli*.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841109-111>

Защитные пептиды являются неотъемлемыми компонентами врождённого конститутивного иммунитета растений к разнообразным стрессам. При этом представители некоторых семейств таких пептидов (дефензины, тионины, липидпереносящие белки) также синтезируются в ответ на действие на растение индукторов [1]. Харпиноподобные пептиды растений — относительно новое, недавно открытое семейство защитных пептидов растений, включающее в настоящее время более двух десятков выделенных и охарактеризованных молекул. Пространственная структура этих пептидов стабилизирована двумя дисульфидными связями и включает два параллельных или антипараллельных альфа-спиральных домена, соединённых бета-поворотом, и подвижные N- и C-концевые участки [2, 3]. Для большинства таких пептидов установлено, что они синтезируются в виде единого белка-предшественника с так называемой модульной структурой с последующим процессингом (гидролизом) на этапе посттрансляционного «созревания» [4, 5]. У этих пептидов обнаружена достаточно разнообразная биологическая активность:

антимикробная (антифунгальная и антибактериальная [4–7]), рибосоминактивирующая, ДНК-связывающая [8], а также способность ингибировать активность трипсина и трипсиноподобных протеиназ [2, 9].

В серии предыдущих исследований [3, 7, 10] мы выделили и описали три харпиноподобных пептида группы EcAMP (EcAMP1–3) семян ежовника (*E. crusgalli* L.), обладающих разным количественным уровнем и спектром антимикробной активности. В настоящем сообщении представлены результаты экспериментов, продолжающих эти исследования.

Мы идентифицировали новый харпиноподобный пептид, названный EcAMP4, для которого методом автоматической деградации по Эдману определили его полную аминокислотную последовательность, насчитывающую 38 а.о. (SRGGRCERKRRHSDWQTRQRC LQQCEQ RERQEEGGRD³⁸). Мы также обнаружили укороченную форму этого пептида — EcAMP4.1, отличающуюся отсутствием семи C-концевых остатков, аналогично тому, что было ранее показано для его гомолога — альфа-харпинина EcAMP2 (форма EcAMP2.1, [7]). Выравнивание первичной структуры этого полипептида относительно уже известных молекул из ежовника показало достаточно низкую степень их сходства (рис. 1), что предполагало наличие принципиальных различий между ними по уровню биологической активности, прежде всего антимикробной. Ранее для всех выделенных пептидов EcAMP1–3 мы показали [10] наличие единого белка-предшественника, обладающего модульной структурой, из которого в результате посттрансляционного процессинга за счёт сайт-специфического протеолиза

¹ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

² Башкирский государственный университет, Уфа

³ Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра
Российской Академии наук

⁴ Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

* E-mail: d.yu.ryazantsev@gmail.com

** E-mail: rea21@list.ru

*** E-mail: szavriev@ibch.ru

Альфа-харпинин	Последовательность а.о.	Заряд при pH
EcAMP1	GSGRGSCRSQCMRRHEDEPWRVQECVSQCRRR-RGGGD---	+4,0
EcAMP2	----DRCSQQC--QHHRDPDRKQQCMRECRRH--QGRSD--	+3,5
EcAMP2.1	----DRCSQQC--QHHRDPDRKQQCMRECRRH-----	+3,5
EcAMP3	--GADRCRERCERRHRGDWQKGQRCLMECRRRE-QEED---	+2,0
EcAMP4	SRG-GRCKERK--RRHSDWQTRQRCLQQCEQRERQEEGGRD	+4,0
EcAMP4.1	SRG-GRCKERK--RRHSDWQTRQRCLQQCEQRER-----	+6,0

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей альфа-харпининов группы EcAMP семян ежовника (*E. crusgalli*). Идентичные остатки цистеина отмечены белым шрифтом на чёрном фоне, идентичные аминокислотные остатки и консервативные замены обозначены серым фоном.

образуются зрелые пептиды, что также свойственно для их гомологов из культурных злаков [11]. При анализе последовательности аминокислот белка-предшественника EcAMP ежовника мы обнаружили 7 мотивов, удовлетворяющих структуре харпиноподобных пептидов по расположению цистеинов и суммарному положительному заряду [10]. Интересно, что один из предсказанных мотивов (С4) мы смогли идентифицировать как пептид EcAMP4. Таким образом, из 7 предсказанных пептидов из одного предшественника в настоящее время уже обнаружено 4.

В дальнейшем мы провели сравнительные исследования функций всех четырёх полноразмерных форм антимикробных пептидов группы EcAMP и их двух укороченных форм (EcAMP2.1 и EcAMP4.1), оценив их антигрибковую активность в отношении ряда модельных фитопатогенов (грибов и оомицетов) и способность этих молекул к ингибированию бычьего трипсина и химотрипсина ("Sigma—Aldrich", США), а также неспецифической сериновой протеазы, секретируемой оомицетом *Phytophthora infestans* [12] (табл. 1). Все исследуемые пептиды ежовника группы EcAMP обладали разным уровнем противогрибковой активности (по показателю ИК₅₀), что предполагает наличие прямой структурно-функциональной взаимосвязи между пространственной локализацией определённых а.о. У нового гомолога EcAMP4 мы также обнаружили способность к подавлению роста тестируемых грибов по типу фунгистатического действия. Характерно, что для

его укороченной формы EcAMP4.1 с отсутствующей частью С-концевого фрагмента, в отличие от таковой у EcAMP2.1, мы зарегистрировали значительное снижение количественного уровня антигрибковой активности, что, скорее всего, обусловлено снижением суммарного положительного заряда пептида на две единицы. Ранее [13] было показано, что локальные аминокислотные замены в предположительно функциональном (петлевом) участке структуры альфа-харпининов способны ключевым образом влиять на наличие определённых биологических свойств, например способности к блокировке работы калиевых каналов. Кроме того, нарушение пространственной организации (в том числе за счёт формирования элементов вторичной структуры) приводит к существенному снижению (вплоть до полной утраты) способности пептидов этого семейства к реализации ингибирующего эффекта по отношению к эукариотическим микроорганизмам [5, 8].

Несмотря на наличие среди гомологов альфа-харпининов растений отдельных пептидов, проявляющих свойства ингибиторов сериновых протеиназ (трипсина и трипсиноподобных форм), у представителей группы EcAMP мы обнаружили отсутствие этой способности, за исключением слабого действия EcAMP4 на трипсин и химотрипсин (данные не представлены). Укороченный вариант EcAMP4.1 полностью утратил эти свойства, что даёт возможность предположить, что за этот тип активности ответственен не только петлевой участок молекулы, непосред-

Таблица 1. Антифунгальная активность харпиноподобных пептидов EcAMP ежовника против ряда фитопатогенных грибов и оомицетов *in vitro* (ИК₅₀, мкМ)

Патоген	Пептид					
	EcAMP1	EcAMP2	EcAMP2.1	EcAMP3	EcAMP4	EcAMP4.1
<i>F. graminearum</i>	4,5 ± 0,4	48,0 ± 4,2	50,4 ± 5,6	5,5 ± 0,3	6,9 ± 0,6	12,3 ± 1,3
<i>F. oxysporum</i>	8,5 ± 0,9	36,2 ± 0,3	38,1 ± 3,4	9,6 ± 0,95	7,7 ± 0,8	14,0 ± 1,2
<i>B. sorokiniana</i>	18,2 ± 1,7	н. д.	н. д.	15,0 ± 1,6	н. д.	н. д.
<i>P. infestans</i>	16,3 ± 1,5	24,0 ± 2,6	24,0 ± 2,2	12,4 ± 1,1	9,9 ± 1,1	18,1 ± 1,9

M ± *m*, *n* = 3, н. д. — нет данных.

ственно взаимодействующий с активным центром ферментов [9].

Таким образом, мы обнаружили и охарактеризовали новый пептид семейства альфа-харпинов и обобщили полученные ранее результаты по структурно-функциональному анализу харпиноподобных пептидов группы EcAMP из семян ежовника (*E. crusgalli*) с точки зрения их участия во врождённом иммунитете к биотическим стрессовым факторам окружающей среды (болезням и насекомым-вредителям). Данное семейство насчитывает не менее четырёх катионных пептидов (EcAMP1–EcAMP4), кодируемых единым белком-предшественником модульной структуры и имеющих относительно невысокую степень сходства по аминокислотной последовательности. Изученные пептиды проявляли антимикробные свойства по отношению к группе фитопатогенных мицелиальных грибов и оомицетов в микромолярном диапазоне действующих концентраций. При этом эффект ингибирования был обусловлен исключительно цитостатическим действием. Кроме того, мы изучили их способность к ингибированию ферментов группы сериновых протеиназ (трипсина и химотрипсина). Эти опыты показали, что исследуемые пептиды были неактивны или проявляли слабое ингибирующее действие. Для двух из четырёх идентифицированных харпиноподобных пептидов мы выявили формы, содержащие укороченный (на 5 и 7 а.о. соответственно) С-концевой фрагмент, что может являться следствием их ограниченного протеолиза карбоксипептидазами самого растения.

Проведённое аналитическое исследование позволяет сформировать новый взгляд на комплексную роль альфа-харпинов семян ежовника

в конститутивном иммунитете растения к биотическим стрессам.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 14–50–00131.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., et al. // *Folia Microbiol.* 2014. V. 59. P. 181–196.
2. Connors R., Konarev A. V., Forsyth J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 27760–27768.
3. Nolde S. B., Vassilevski A. A., Rogozhin E. A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 25145–25153.
4. Marcus J. P., Green J. L., Goulter K. C., et al. // *Plant J.* 1999. V. 19. P. 699–710.
5. Slavokhotova A. A., Rogozhin E. A., Musolyamov A. K., et al. // *Plant Mol. Biol.* 2014. V. 84. P. 189–202.
6. Duvick J. P., Rood T., Rao A. G., et al. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 18814–18820.
7. Rogozhin E. A., Ryazantsev D. Y., Grishin E. V., et al. // *Peptides.* 2012. V. 38. P. 33–40.
8. Sousa D. A., Porto W. F., Silva M. Z., et al. // *Molecules.* 2016. V. 21. E1062.
9. Oparin P. B., Mineev K. S., Dunaevsky Y. E., et al. // *Biochem. J.* 2012. V. 446. P. 69–77.
10. Ryazantsev D. Yu., Rogozhin E. A., Dimitrieva T. V., et al. // *Biochimie.* 2014. V. 99. P. 63–70.
11. Utkina L. L., Andreev Y. A., Rogozhin E. A., et al. // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 3594–3608.
12. Яруллина Л. Г., Касимова Р. И., Ибрагимов Р. И. и др. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. С. 85–93.
13. Berkut A. A., Usmanova D. R., Peigneur S., et al. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 14331–14340.

DIVERSITY OF HAIRPIN-LIKE DEFENSE PEPTIDES FROM BARNYARD GRASS (*Echinochloa crusgalli* L.) SEEDS

D. Yu. Ryazantsev, E. A. Rogozhin, V. O. Tsvetkov, L. G. Yarullina,
A. N. Smirnov, Corresponding Member of the RAS S. K. Zavriev

Received June 15, 2018

The results of structural and functional analyses of harpin-like peptides from the EcAMP group isolated from the barnyard grass (*E. crusgalli*) seeds are summarized from the viewpoint of their participation in plant innate immunity to environmental biotic stress factors.

Keywords: hairpin-like peptides, defense peptides, plant innate immunity, antifungal activity, *Echinochloa crusgalli*.