

Характеристика дефензиноподібних білків з проростків сосни звичайної

В. А. Ковальова, І. Т. Гут¹, Р. Т. Гут

Національний лісотехнічний університет України
Вул. Генерала Чупринки, 103, Львів, 79057, Україна

¹ Лондонський університет
Гавер стр., Лондон, WC1E 6 BT, Велика Британія

gout@gorest.lviv.ua

Два дефензиноподібних білки з молекулярними масами 11,3 і 9,8 кДа виділено із семиденних проростків сосни (*Pinus sylvestris* L.) методом іонообмінної хроматографії на фосфоцелюлозі. Ці білки пригнічували ріст міцелію фітопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* у концентрації 1 мкг/мл, а також викликали морфологічні зміни гіфів.

Ключові слова: сосна звичайна, дефензин, *Fusarium oxysporum*.

Вступ. Усі живі організми — від бактерій до рослин і ссавців — у процесі еволюційного розвитку виробили механізми захисту від несприятливих абіотичних і біотичних факторів довкілля. Серед найнебезпечніших біотичних факторів перше місце належить мікроорганізмам — потенціальним патогенам, які оточують рослини протягом усього онтогенетичного розвитку і часто є збудниками інфекційних хвороб. Синтез антимікробних білків (AMP) — це стратегія захисту від патогенів, що властива багатьом класам живих організмів [1]. AMP рослин представлені β -глюканазами, хітиназами, рибосомоінактивуючими білками, інгібіторами серинових і цистеїнових протеїназ, ліпідотранспортними білками тощо [2]. Одну з груп AMP складають «рослинні дефензини», які отримали цю назву через свою структурну і функціональну подібність до дефензинів ссавців і комах [3].

Рослинні дефензини — низькомолекулярні позитивно заряджені білки з високим вмістом цис-

теїну. Третинну структуру цих білків формують α -спіраль та три антипаралельних β -шари, з'єднані дисульфідними містками. Дефензинам притаманна протигрибкова і антибактеріальна активність [4, 5]. Експресія цих сполук може відбуватися як конститутивно, так й індукуватися у відповідь на дію патогену та інші стресові чинники [6].

При вивченні причин інгібуючого впливу дефензинів на патогенні гриби виявлено, що вони викликають зміну мембранного потенціалу клітинної мембрани гриба, посилюють поглинання Ca^{2+} клітиною та вихід K^+ [7]. Показано, що рослинні дефензини взаємодіють зі специфічними ліпідними компонентами плазматичної мембрани грибів. Так, дефензин RsAFP2 з *Raphanus sativus* зв'язується з глікозилцерамідами, а дефензин DmAMP1 з *Dhelia merskii* у високій концентрації виявлено у мембранних мікродоменах — рафтах. Не виключають можливості інтерналізації дефензинів та взаємодії їх з внутрішньоклітинними компонентами, що може бути основною причиною антифунгальної дії цих білків [8].

Перші рослинні дефензини виділено з насіння, де вони складають до 0,5 % загального вмісту білка. На цей час досліджено також дефензини, отримані з вегетативних і генеративних органів покритонасінних рослин, у яких вони експресуються у поверхневих шарах клітин, виконуючи тим самим роль першої лінії захисту найвразливіших для патогенів тканин [6]. Лише недавно гени, які кодують дефензиноподібні білки, ідентифіковано у геномах голонасінних з родів *Picea* та *Ginkgo* і показано їхню експресію у коренях проростків ялини [9]. Нещодавно білок, гомологічний уже відомим дефензинам з голонасінних, виявлено нами методом мас-спектрометрії в екстрактах проростків сосни звичайної [10].

Метою цієї роботи було виділення і дослідження властивостей дефензиноподібних білків з проростків сосни (*Pinus sylvestris* L.).

Матеріали і методи. *Екстракція термостабільних білків із проростків сосни P. sylvestris* L. Для виділення білків використано відсортоване життєздатне насіння сосни звичайної, отримане з Буського держлісгоспу Львівської області. Насіння пророщували в термостаті при температурі 26 °С у чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою. Семиденні проростки видаляли, заморожували у рідкому азоті та зберігали при температурі -70 °С до використання.

Заморожені проростки (20 г) розтирали в ступці у рідкому азоті до порошкоподібного стану. Білки екстрагували 50 мМ сульфатною кислотою (3 мл/г сирої маси) протягом 1 год (4 °С). Екстракт фільтрували через марлю і центрифугували при 14000 g протягом 20 хв (4 °С) у центрифугі K-24 («Janetzki», Німеччина). До надосадової рідини додавали краплями 10 М NaOH до рН 7,8, витримували упродовж 30 хв при 4 °С і центрифугували (14000 g, 20 хв, 4 °С).

Білки надосадової рідини фракціонували поетапним осадженням сульфатом амонію спочатку при 35 % насичення (осад видаляли центрифугуванням при 14000 g, 30 хв, 4 °С), а потім при 80 %. Осад формувався протягом 18 год при 4 °С і після центрифугування (14000 g, 30 хв, 4 °С) супернатант видаляли, а осад розчиняли в буфері, що містив 20 мМ трис-НCl, рН 7,4, 10 мМ NaCl. Фракцію термостабільних білків отримували після прогрівання розчину протягом 10 хв при 85 °С, центрифугування (20000 g, 20 хв, 4 °С) та видалення осаду.

Іонообмінна хроматографія термостабільних білків на фосфоцелюлозі. Фракцію термостабільних білків діалізували проти буфера, який містив 20 мМ трис-НCl, рН 7,4, 100 мМ NaCl, і наносили на колонку (об'єм 4 мл) з фосфоцелюлозою P11 («Whatman», Велика Британія), зрівноваженою діалізічним буфером. Сорбовані білки елюювали лінійним градієнтом концентрацій хлориду натрію (0,1—1 М NaCl). Концентрацію білків у фракціях визначали за поглинанням при 280 нм на фотометрі BIOTECH («WPA», Велика Британія).

Білки отриманих фракцій аналізували електрофорезом у системі Леммлі [11]. Для цього до аліквот фракцій (50 мкл) додавали трихлороцтову кислоту до кінцевої концентрації 10 %, білки осаджували центрифугуванням і промивали холодним ацетоном. Осад розчиняли у денатурувальному буфері (62,5 мМ трис-НCl, рН 6,8, 1 %-й SDS, 2 %-й 2-меркаптоетанол, 10 %-й гліцерин) та розділяли електрофорезом у градієнті густини (5—22 %) ПААГ у присутності 0,1 %-го SDS. Гель фарбували сріблом [12].

Фракції, які містили білки з однаковою молекулярною масою, об'єднували, діалізували проти води та зберігали при -70 °С до використання.

Дослідження протигрибкової активності виділених білків. Культуру фітопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* люб'язно надано нам з Інституту біології лісу (Польща).

Протигрибкову активність білків досліджували згідно з роботою [13]. Розчини тестованих білків стерилізували через фільтр 0,22 мкм («Millipore», Франція) та в об'ємі 0,3 мл додавали окремо в пробірки з 3 мл рідкого 1,8 %-го картопляно-декстрозного агару при температурі 45 °С, швидко змішували і розливали у чашки Петрі (50 × 15 мм). Після охолодження агару шматочки міцелію *F. oxysporum* інокулювали в центр кожної чашки. Дистильовану воду використовували як контроль. Чашки інкубували упродовж 72 год при 23 °С, вимірювали площу міцелярної колонії та вираховували коефіцієнт інгібування росту колонії гриба згідно з роботою [13].

Дослідження спорідненості очищених на фосфоцелюлозі білків з проростків сосни до фосфотирозин-сефарози. 5 мкг білка інкубували з 40 мкл фосфотирозин-сефарози у 200 мкл буфера, що містив 20 мМ трис-НCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 %-й тритон X-100, 5 мМ EDTA, 20 мМ NaF, протягом 2 год при 4 °С і перемішуванні. Зв'язу-

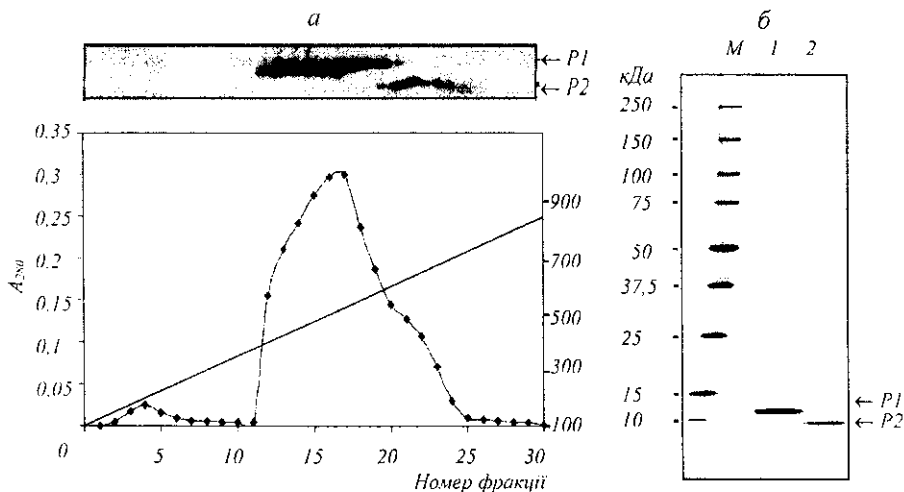


Рис. 1. Іонообмінна хроматографія термостабільних білків з проростків *P. sylvestris* на фосфоцелюлозі: а — фракціонування білків лінійним градієнтом концентрації (0,1—1 М) NaCl (об'єм фракції 0,6 мл; діагональна лінія — градієнт концентрації NaCl; на вставці представлено електрофоретичний профіль елюції антифунгальних білків лінійним градієнтом концентрації NaCl; гель пофарбовано сріблом); б — SDS-електрофорез у градієнті густини (5—22 %) ПААГ препаратів білків, виділених методом іонообмінної хроматографії (гель пофарбовано сріблом): 1 — білки, елюйовані 0,35—0,6 М NaCl; 2 — білки, елюйовані 0,65—0,8 М NaCl; М — маркери молекулярної маси)

вання з тирозин-сефарозою проводили в аналогічних умовах. Афінні сорбенти отримували згідно з роботою [14]. Сорбенти промивали тричі інкубаційним буфером, додавали денатурувальний буфер (100 мМ трис-НСl, рН 6,8, 2 %-й SDS, 4 %-й 2-меркаптоетанол, 20 %-й гліцерин) та розділяли електрофорезом у градієнті густини (5—22 %) ПААГ у присутності 0,1 %-го SDS. Гель фарбували сріблом.

Результати і обговорення. Відомо, що рослинні дефензини — це низькомолекулярні, багаті на цистеїн білки з високим позитивним зарядом та стійкістю до екстремальних значень рН і температури. Така висока стабільність молекул дефензинів зумовлена характерною для них структурою, відомою як Cys-стабілізований $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) мотив, що складається з α -спіралі та трьох антипаралельних β -ланцюгів, з'єднаних чотирма дисульфідними містками [15].

Для виділення дефензиноподібних білків з проростків сосни ми використали екстракцію сульфатною кислотою [16], поетапне осадження білків різними концентраціями сульфату амонію та термічну обробку. Отриману таким чином фракцію термостабільних білків розділили хроматографією на фосфоцелюлозі. Білки елювали з сорбенту лінійним градієнтом концентрації (0,1—1 М) хлориду натрію. В результаті отримано електрофоретично гомогенні препарати двох білків з молекулярними масами 11,3 (P1) і 9,8 (P2) кДа (рис. 1, б). Пік P1 елюювався у фракціях між 0,35—0,65 М NaCl, а пік P2 — при концентрації солі 0,6—0,8 М (рис. 1, а).

Отримані фракції білків P1 і P2 досліджували на активність проти *F. oxysporum*. Виявлено, що білок P1 у концентрації 25 мкг/мл у поживному середовищі на 95 % пригнічує ріст колонії (рис. 2), а P2 таку дію спричиняє в концентрації 10 мкг/мл. Інгибування елонгації гіфів на 70 % відбувається при концентрації 1 мкг/мл для P2 і 3 мкг/мл — для P1.

Рослинні дефензини мають досить варіабельний амінокислотний склад, що і знайшло відображення у біологічній активності цих білків. Згідно із структурною та функціональною гомологією, дефензини класифіковано в чотири групи [6]. Представники групи I пригнічують ріст широкого кола фітопатогенних грибів, вони зупиняють елонгацію гіфів та посилюють їхнє галуження — це так звана морфогенна група. Дефензини групи II (неморфогенні) інгібують ріст гіфів гриба, але не викликають морфологічних змін останніх. Рослинним дефензинам з групи III властива антибактеріальна активність, також вони інгібують α -амілази і протеїнази *in vitro* та синтез білків у безклітинних системах, але не виявляють фунгістатичних властивостей. Дефензини групи IV, виділені з листя *Spinacia oleracea*, суттєво відрізнялися за амінокислотним складом від перших трьох груп і поєднували у собі функціональні властивості II і III груп [16].

Для класифікації виділених з проростків сосни білків проведено мікроскопічне дослідження міцелію *F. oxysporum*, вирощеного на середовищі з цими білками. Показано (рис. 3), що обидва білки викликають морфологічні зміни міцелію гриба: по-

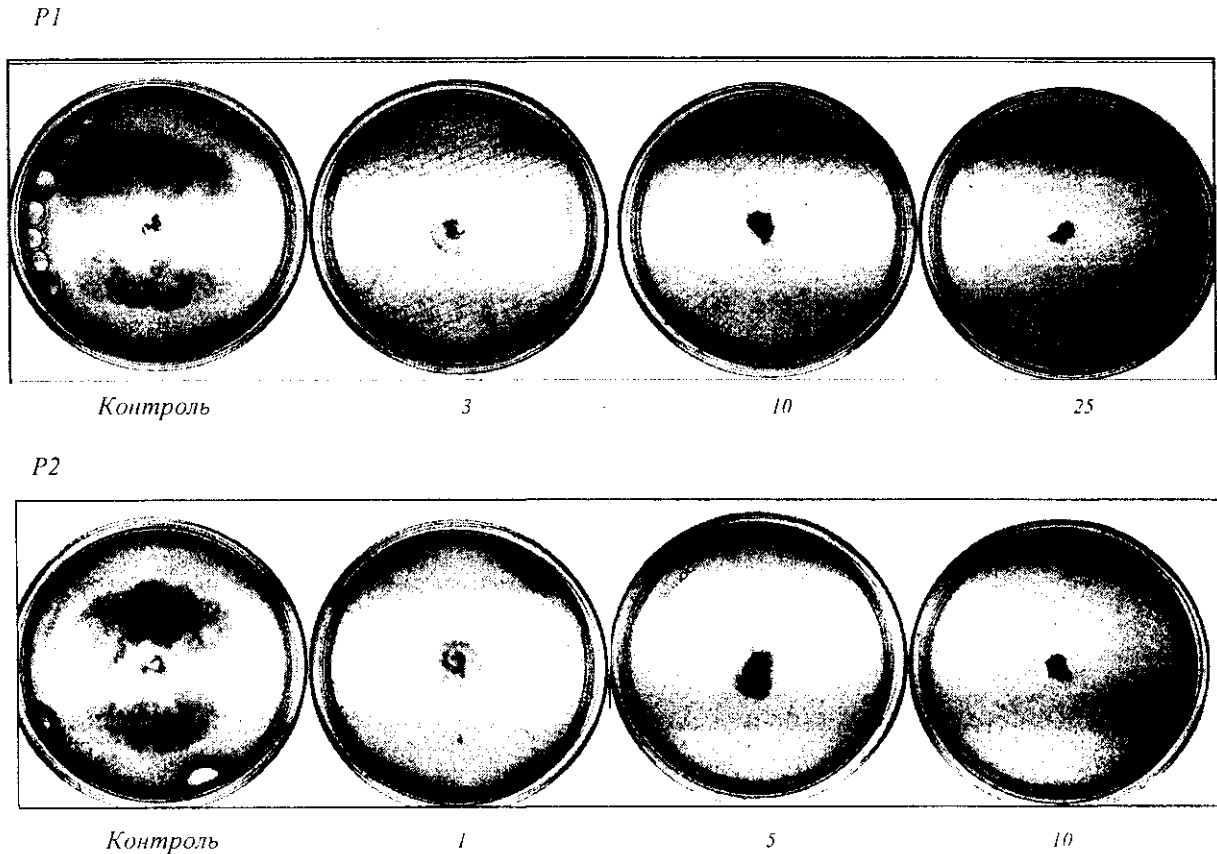


Рис. 2. Вплив препаратів білків P1 і P2 з проростків сосни звичайної на ріст міцелію *F. oxysporum* залежно від концентрації білка (мкг/мл) у картопляно-декстрозному агарі



Рис. 3. Вплив препаратів білка P1 (3 мкг/мл) і P2 (1 мкг/мл) з проростків сосни звичайної на морфологію міцелію фітопатогенного гриба *F. oxysporum*

товщення гіфів та посилення їхнього брунькування. За своїми протигрибковими властивостями виділені білки близькі до таких представників морфогенної групи дефензинів, як Rs-AFP2 з *R. sativus* [3] та Hs-AFP1 з *Heuchera sanguinea* [5].

У попередніх дослідженнях серед пептидів з екстрактів проростків сосни звичайної, які зв'язу-

лися з фосфотирозин-сефарозою, методом мас-спектрометрії нами визначено білок з молекулярною масою біля 10 кДа, гомологічний дефензину SPI1 з *Picea abies* [10]. Тому доцільним було дослідити спорідненість виділених білків до цього сорбенту. Встановлено, що лише один з цих білків (P2) зв'язується з фосфотирозин-сефарозою (рис.

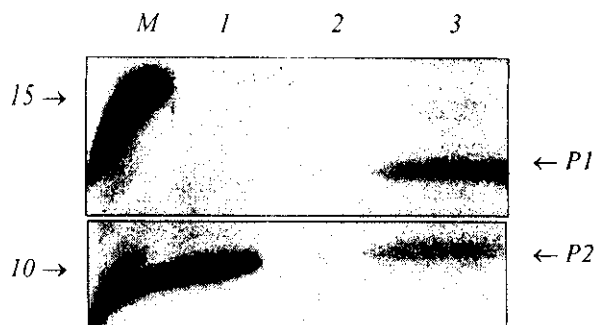


Рис. 4. Спорідненість виділених з проростків сосни звичайної білків з протигрибковою активністю до фосфотирозин-сефарози (електрофорез білків у градієнті густини (5–22 %) ПААГ у присутності 0,1 %-го SDS; гель пофарбовано сріблом): 1 — рТуг-сефароза; 2 — Туг-сефароза; 3 — препарати білків P1 і P2; M — маркери молекулярної маси

4), що дає підстави припустити, виходячи з досліджених властивостей цього білка, ідентичність P2 раніше виявленому білку.

Виділені з проростків сосни білки P1 і P2 подібні за своєю антифунгальною активністю, але відрізняються за спорідненістю до рТуг-сефарози. Відомо, що дефензини у геномі *Arabidopsis thaliana* представлені мультигенною родиною з 13 генів. У ялини європейської також виявлено два дефензини (SPI1 та SPI1B), первинна структура яких відрізняється за трьома амінокислотними залишками [9]. Можливо, що білки P1 і P2 є продуктами різних генів, які кодують дефензиноподібні білки у сосни, але, можливо, що вони належать і до різних груп AMP. Також не можна виключити того, що білок P1 є результатом посттрансляційної модифікації P2. Потрібно зазначити, що виділені білки за своєю молекулярною масою 9,8 і 11,3 кДа відрізняються від класичних рослинних дефензинів (5–7 кДа), хоча і у геномі *Arabidopsis* виявлено два гени, що кодують білки з 122 і 129 амінокислотних залишків, які, крім характерного для рослинних дефензинів домену (gamma-thionin), містять і сигнальний пептид [6]. Подальші дослідження первинної структури виділених з проростків сосни білків дозволять визначити їхнє місце серед антифунгальних білків рослин.

Таким чином, нами вперше виділено дефензиноподібні білки з представника класу голонасінних та досліджено деякі їхні властивості. Висока активність цих білків проти патогенного гриба *F. oxysporum* дає можливість використовувати їх у селекційних програмах підвищення стійкості хвойних культур до інфекційних хвороб.

V. A. Kovalyova, I. T. Gout, R. T. Gout

Characterization of defensin-like proteins from Scots pine seedlings

Summary

Two defensin-like proteins with molecular weight of 11.3 and 9.8 kDa were isolated from 7-day-old Scots pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.) by the ion exchange chromatography on phosphocellulose. These proteins inhibited the growth of mycelium of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* at concentration mkg/ml, and also caused the morphological changes of hyphae.

Key words: Scots pine, defensin, *Fusarium oxysporum*.

В. А. Ковалева, И. Т. Гут, Р. Т. Гут

Характеристика дефензиноподобных белков из проростков сосны обыкновенной

Резюме

Два дефензиноподобных белка с молекулярными массами 11,3 и 9,8 кДа выделены из семидневных проростков сосны (*Pinus sylvestris* L.) методом ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе. Эти белки ингибировали рост мицелия фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* в концентрации 1 мкг/мл, а также вызывали морфологические изменения гифов.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, дефензин, *Fusarium oxysporum*.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.*—1995.—13.— P. 61—92.
2. Selitrennikoff C. P. Antifungal proteins // *Appl. Environ. Microbiol.*—2001.—67.—P. 2883—2894.
3. Terras F. R. G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N. V., Osborn R. W., Kester A., Rees S. B., Torrekenes S., Van Leuven F., Vanderleyden J., Cammue B. P. A., Broekaert W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.). Their role in host defense // *Plant Cell.*—1995.—7.—P. 573—588.
4. Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C., Terras F. R. G., Proost P., Damme J. V., Rees S. B., Vanderleyden J., Broekaert W. F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 2228—2233.
5. Osborn R. W., Desamblanx G. W., Thevissen K., Goderis I., Torrekenes S., vanLeuven F., Attenborough S., Rees S. B., Broekaert W. F. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae // *FEBS Lett.*—1995.—368.—P. 257—262.
6. Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A., Thevissen K. Plant defensins // *Planta.*—2002.—216.—P. 193—202.
7. Thevissen K., Ghazi A., DeSamblanx G. W., Brownlee C., Osborn R. W., Broekaert W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins // *J. Biol. Chem.*—1996.—271.—P. 15018—15025.
8. Thevissen K., Ferket K. K. A., Francois I. E. J. A., Cammue B. P. A. Interaction of antifungal plant defensins with fungal membrane components // *Peptides.*—2003.—24.—P. 1705—712.
9. Fossdal C. G., Nagy N. E., Sharma P., Lonneborg A. The putative gymnosperm plant defensin polypeptide (SPI1) accumulates after seed germination, is not readily released, and

- the SPI1 levels are reduced in *Pythium dimorphum*-infected spruce roots // *Plant Mol. Biol.*—2003.—52.—P. 291—302.
10. Kovalyova V. A., Cramer R., Gout I. T., Gout R. T. The analysis of tyrosine phosphorylation in the process of seed germination of Scots pine // *Укр. біохім. журн.*—2005.—77, № 2.—С. 119—120.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—15.—P. 680—685.
12. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // *Anal. Chem.*—1996.—68.—P. 850—858.
13. Lam Y. W., Wang H. X., Ng T. B. A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2000.—279.—P. 74—80.
14. Sundberg L., Porath J. Preparation of adsorbents for bio-specific affinity chromatography: attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes // *J. Chromatogr.*—1974.—90.—P. 87—98.
15. Fant F., Vranken W., Broekaert W., Borremans F. Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ^1H NMR // *J. Mol. Biol.*—1998.—279.—P. 257—270.
16. Ozaki Y., Wada K., Hase T., Matsubara H., Natanishi T., Yoshizumi H. Amino acid sequence of a purothionin analogue of barley flour // *J. Biochem.*—1980.—87.—P. 549—555.
17. Segura A., Moreno M., Molina A., Garcia-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) // *FEBS Lett.*—1998.—435.—P. 159—162.

УДК 577.112.083

Надійшла до редакції 25.11.05