

Отримання рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної та його антифунгальна активність

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

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

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

Нещодавно нами очищено ендogenous дефензин із проростків сосни звичайної, а також клоновано кДНК, яка кодує дефензин 1 (*PsDef1*, *Pinus sylvestris* дефензин 1). Фрагмент кДНК дефензину 1, який кодує зрілу форму цього білка, клоновано у вектор рЕТ42a(+) та індуковано його експресію у бактеріальній системі *Escherichia coli*. Оптимізовано умови продукування рекомбінантного білка *PsDef1*, злитого з глутатіон-S-трансферазою, у розчинній формі. Після афінного очищення цього білка на глутатіон-сефарозі та протеолізу фактором X₀ отримано біологічно активний препарат рекомбінантного *PsDef1*, антифунгальна активність якого співмірна з такою ендogenous дефензину 1 сосни звичайної.

Ключові слова: рекомбінантний дефензин *PsDef1*, експресія, афінне очищення, антифунгальна активність.

Вступ. Дефензини – це еволюційно консервативні молекули вродженого імунітету рослин, молюсків, комах і тварин, які характеризуються невеликим розміром (< 10 кДа), амфіпатичною, багатою на -шари структурою, стабілізованою дисульфідними зв'язками [1, 2]. Ці секреторні білки (пептиди) синтезуються у вигляді попередників з наступним відщепленням сигнального пептиду, їхньому основному домену притаманні антимикробні властивості [3].

Дефензини широко розповсюджені у царстві рослин, їх виділяють з насіння, вегетативних та генеративних органів багатьох видів покритонасінних. Гени цих захисних білків експресуються конститутивно або під дією чинників біотичної природи у поверхневих шарах клітин, виконуючи роль першої лінії захисту від патогену [4, 5]. Рослинним дефензинам властивий широкий спектр

біологічних активностей: антифунгальна [3, 5, 6], антибактеріальна [7], інгібування протеїназ та -амілаз [8, 9], блокування Ca²⁺ - і Na⁺ - каналів [10].

Окрім дослідження властивостей рослинних дефензинів *in vitro*, існує багато прикладів експресії генів дефензинів у трансгенних рослинах, що сприяло підвищенню їхньої стійкості до інфікування, яка зберігається протягом декількох поколінь. Конститутивна експресія дефензину редиски *RsaAFP2* у тютюні та томатах підсилює їхню стійкість до грибів, які уражають листя, *Alternaria longipes* та *A. solani* відповідно. Експресія дефензину *Medicago sativa* в картоплі забезпечує стійкість її до патогенного гриба *Verticillium dahliae* за польових умов [11].

Необхідно відзначити, що роботи, присвячені вивченню ролі дефензинів у захисті рослинних організмів, здебільшого виконують на модельній рослині *Arabidopsis thaliana* та на сільськогосподарських культурах [12]. Дослідження механізмів

стійкості рослин з тривалим життєвим циклом, до яких належать деревні породи, є несистематичними [13]. Нещодавно нами вперше очищено дефензин з проростків сосни звичайної, який було названо PsDef1 (*Pinus sylvestris* дефензин 1), та досліджено його антифунгальні властивості [14, 15]. Зі створеної нами бібліотеки кДНК семиденних проростків сосни звичайної вперше ідентифіковано кДНК PsDef1 (Асс. No. EF455616), що дозволило розрахувати амінокислотну послідовність дефензину 1 сосни звичайної і провести порівняльний аналіз його первинної структури та властивостей з представниками різних груп рослинних дефензинів [16, 17].

Однією з умов подальшого всебічного вивчення молекулярних механізмів інгібуючої дії рослинних дефензинів на фітопатогенні гриби та ролі дефензину 1 у захисті хвойних деревних порід від фітозахворювань є наявність білка у препаративній кількості та специфічних антитіл. Високий вихід певного білка можна отримати за рахунок його експресії у прокаріотній системі в клітинах *Escherichia coli*. Клонування нами зрілої форми дефензину 1 сосни звичайної відкрило можливість одержання рекомбінантного білка та дослідження його функціональних властивостей, результати реалізації цього завдання наведено у даній публікації.

Матеріали і методи. Для клонування та експресії рекомбінантних білків у клітинах *E. coli* використано плазмиду *pET42a(+)* («Novagen», США) та штами бактерій *E. coli* XL-1-Blue і BL21(DE3). Культури фітопатогенних грибів *Fusarium oxysporum* УКМ F-52897, *F. solani* УКМ F-50639, *Botrytis cinerea* УКМ F-16753, *Alternaria alternata* УКМ F-16752 і фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* УКМ В-1075 люб'язно надано Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Культуру некротрофного гриба *Heterobasidion annosum* люб'язно надано В. О. Крамарцем (НЛТУ України). Культуру ооміцету *Pythium dimorphum* отримано з Інституту лісових досліджень («ІВЛ», Польща).

Клонування кДНК зрілої форми дефензину 1 сосни звичайної. кДНК зрілої форми (основного домену) дефензину 1 сосни (mPsDef1) клонували за

допомогою вектора *pET42a(+)* у клітинах *E. coli* штаму XL-1 Blue. Фрагмент ДНК, який кодує mPsDef1, отримано в полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР) з використанням як матриці рекомбінантного вектора *pET23d/PsDef1*.

Прямим праймером слугував CR765 (5'-CCAT TCCATGGGAATGTGCAAAACCCCGAG-3'), який містив нуклеотидні послідовності для ендонуклеази рестрикції *NcoI*, двох додаткових амінокислот Met і Gly замість Arg та N-кінцевого фрагмента зрілої форми дефензину 1 сосни.

Зворотний праймер CR764 (5'-CATGAG AATTCTCAAGGGCAGGGTTTGTA-3') включав послідовності для ендонуклеази рестрикції *EcoRI*, стоп-кодону та 3'-кінцевого кодуючого фрагмента вищезазначеного клону. Умови ПЛР наведено у роботі [17].

Продукти ПЛР аналізували в 1,5 %-му агарозному гелі в трис-боратному буфері, pH 8,3 (50 мМ трис-Н₃ВО₃, 2 мМ ЕДТА) за напруги 20 Вт/см². Ампліфікований продукт елюювали з гелю за допомогою набору фірми «Qiagen» (США). Отриману ДНК і вектор *pET42a(+)* гідролізували рестриктазами *NcoI/EcoRI*. ДНК осаджували за стандартною методикою [18]. Для зшивання рестрикованих фрагментів ДНК використали ДНК-лігазу фага Т4 («Fermentas», Литва). Лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* штаму XL-1 Blue.

Наявність вставки у векторі визначали рестрикцією ендонуклеазами *XhoI* та *EcoRI* і ПЛР з праймерами CR765 та CR764. Нуклеотидну послідовність клонованих фрагментів отримано за допомогою автоматичного ДНК-секвенатора ABI 73™.

Експресія рекомбінантного дефензину 1 сосни в бактеріальній системі E. coli. Клітини *E. coli* штаму BL21(DE3), трансформовані вектором *pET42a/mPsDef1*, нарощували в середовищі LB за присутності канаміцину (50 мкг/мл) і температури 37 °С при інтенсивному перемішуванні (220–250 об/хв) до досягнення оптичної густини $A_{600} = 0,6$. Для індукції експресії рекомбінантного білка до суспензії клітин додавали розчин ізопропіл-β-тіогалактозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 0,4 мМ. Після інкубації протягом додаткових 2 год клітини збирали центрифугуванням при

4000 g упродовж 20 хв, осад промивали охолодженим ЗФР, заморожували та зберігали при $t = -70^\circ\text{C}$.

Очищення рекомбінантного *PsDef1*, кон'югованого з глутатіон-S-трансферазою (GST), на афінному сорбенті. Всі етапи очищення здійснювали за $t = 4^\circ\text{C}$. Клітинні осад ($\sim 2,5$ г) ресуспендували та лізували в 15 мл буфера такого складу (А): 10 mM трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 1 %-й тритон X-100, 1 mM ФМСФ за присутності «коктейлю» інгібіторів протеїназ («Roche», Франція). Клітини руйнували механічним розтиранням у гомогенізаторі, отриманий лізат центрифугували при 17000 g протягом 20 хв. До надосадової рідини додавали 50 %-ву суспензію глутатіон-сефарози («Amersham», Велика Британія), зрівноважену буфером А, та інкубували протягом 2 год при перемішуванні. Глутатіон-сефарозу інтенсивно промивали 50 mM трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl з 0,05 % Твін-20 тричі по 5 хв і ще двічі – 50 mM трис-HCl, pH 8,0.

Білки елюювали з афінного сорбенту 50 mM розчином відновленого глутатіону в 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl при перемішуванні протягом 5 хв. Глутатіон-сефарозу осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв упродовж 1 хв. Вказану операцію повторювали тричі. Одержані елюати об'єднували, для видалення глутатіону діалізували проти буфера, що містив 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM ДТТ. Вимірювали концентрацію GST-кон'югованих білків за Бредфордом. Зберігали при $t = -20^\circ\text{C}$ за присутності 50 % гліцерину.

Отримання рекомбінантного *PsDef1*. Для виокремлення рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної (рек*PsDef1*) із химерного поліпептиду GST-*PsDef1* використано фактор X_a («Sigma», США). Протеолізу піддавали GST-кон'югований білок, сорбований на глутатіон-сефарозі, зрівноважений буфером, що містив 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 . Фактор X_a додавали до суспензії сорбенту в кількості 2 мкг на 100 мкг білка. Реакцію проводили за кімнатної температури упродовж 5 год при перемішуванні. Сорбент осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 1 хв. Надосадову рідину відбирали і наносили на колонку для ультрацентрифугування

Centricon YM 30 («Millipore», США), центрифугували протягом 20 хв при 10000 g. Фільтрат збирали, вимірювали концентрацію білка за Бредфордом і аналізували DS-Na-електрофорезом у 15 %-му ПААГ у трис-трициновій буферній системі [19].

Визначення антимікробної активності препарату рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної. Для дослідження активності препарату рекомбінантного білка проти фітопатогенних грибів шматочки міцелію гриба поміщали в центр чашки Петрі (діаметром 90 15 мм) з 1,8 %-м картопляно-декстрозним агаром. Коли діаметр колонії гриба сягав 3 см, стерильні диски з фільтрувального паперу поміщали на агар на відстані 0,5 см від краю колонії. Аліквоти (100 мкл) з різною концентрацією білка наносили на паперові диски. Як контроль використовували дистильовану воду. Чашки інкубували за $t = 23^\circ\text{C}$, доки міцелій не охоплював диски з контрольним розчином і не формувалися зони інгібування біля дисків з розчинами білків.

Кількісну оцінку антифунгальної активності дефензину сосни проводили згідно з роботою [20]. Спори виділяли із спорюючих культур грибів, які вирощували на 1,8 %-му картопляно-декстрозному агарі. Суспензію спор фільтрували через подвійний шар стерильної марлі. В лунки 96-коміркового стерильного планшета додавали по 80 мкл суспензії спор ($2 \cdot 10^4$ спор в 1 мл) у картопляно-декстрозній бражці та по 20 мкл стерильного розчину дефензину різної концентрації (0,2; 0,5; 1; 5; 10 мкг/мл). Планшети інкубували в темноті за температури 23°C . Контрольна проба містила 20 мкл стерильної дистильованої води. Через 48 год вимірювали оптичну густину суспензії в кожній комірці при 595 нм.

Результати і обговорення. Однією з характерних особливостей рослинних дефензинів є наявність сигнального пептиду, який відщеплюється при процесингу білка [3]. Отримана нами кДНК *PsDef1* кодує білок, який складається з 83 амінокислотних залишків (а. з.): 33 – з них входять до складу N-кінцевого сигнального пептиду, а 50 – утворюють основний домен дефензину.

Для експресії рекомбінантного дефензину нами обрано бактеріальну систему *E. coli*, зважаючи на те, що вона є економічно вигідною і дозволяє швид-

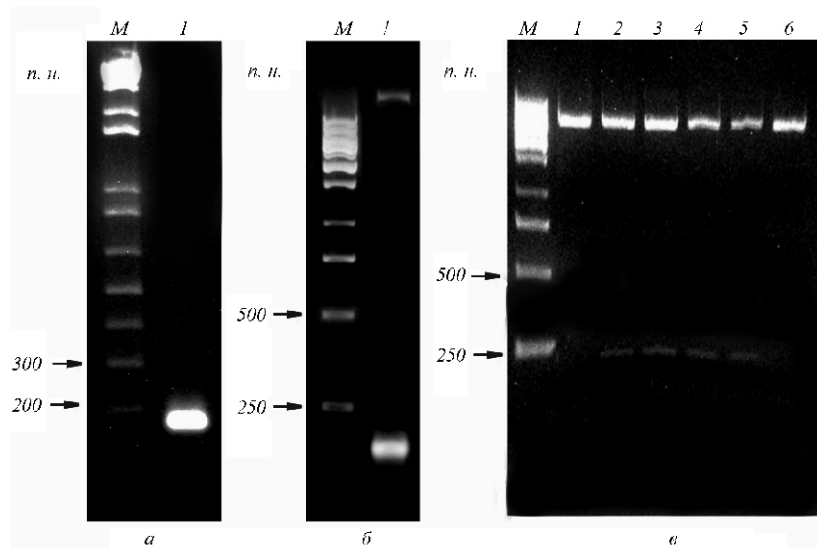


Рис. 1. Клонування фрагмента ДНК, який кодує зрілу форму дефензину 1 сосни звичайної (а: 1 – продукти ПЛР, одержані ампліфікацією кДНК PsDef1; М – 1 kb Plus DNA Ladder «GibcoBRL»; б: 1 – аналіз плазмиди pET42a/mPsDef1 за допомогою ПЛР; М – 1 kb DNA Ladder «Fermentas»; в: 1–6 – рестрикційний аналіз плазмиди pET42a/mPsDef1 ендонуклеазами XhoI і NcoI; М – 1 kb DNA Ladder «Fermentas»)

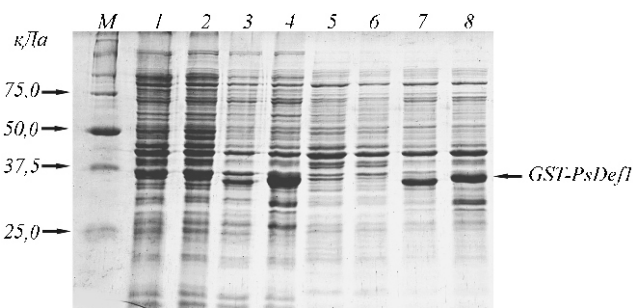


Рис. 2. Електрофореграма результатів експресії GST-PsDef1 у клітинах *E. coli* штаму BL21(DE3): 1–4 – фракції сумарних білків клітин; 5–8 – фракції тритон-розчинних білків; 1, 2, 5, 6 – культури без індукування експресії; 3, 4, 7, 8 – клітини через 2 год після індукування експресії ПТТГ; 1, 3, 5, 7 – клітини, трансформовані вектором без вставки; 2, 4, 6, 8 – клітини, трансформовані рекомбінантним вектором; М – маркери молекулярної маси. Кількість білка на кожній з доріжок еквівалентна 100 мкл суспензії клітин

ко отримати білок у препаративній кількості. Оскільки з низки робіт відомо, що в прокариотній системі еукаріотна сигнальна послідовність не упізнається [21, 22], ми клонували фрагмент ДНК, який кодує зрілу форму PsDef1.

кДНК mPsDef1 отримано в ПЛР на матриці кДНК PsDef1 за присутності специфічних праймерів. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР виявив наявність ампліфікованої ДНК відповідної довжини – 174 п. н. (рис. 1, а). Ампліфікований продукт клонували у вектор pET42a(+), яким трансформували клітини *E. coli* штаму XL-1 Blue. ПЛР з відповідними праймерами (рис. 1, б) та рестрикційним аналізом з використанням ендонуклеаз

NcoI та XhoI підтверджено наявність клонованого фрагмента у чотирьох із шести клонів (рис. 1, в). Рекомбінантний вектор pET-42a/mPsDef1 просеквеновано для перевірки на відповідність нуклеотидній послідовності дефензину 1 сосни та згідно з результатами відібрано клон, який використано в подальшій роботі.

Рекомбінантним вектором експресії pET42a/mPsDef1 трансформували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3), паралельно проводили трансформацію клітин вектором без клонованого фрагмента. Резистентні до канаміцину трансформанти перевіряли на здатність до синтезу рекомбінантних білків за присутності 1 мМ ПТТГ. Аналіз електрофоретичних спектрів лізатів індукованих клітин, трансформованих вектором з кДНК mPsDef1, показав наявність рекомбінантного білка очікуваної молекулярної маси – ~ 35,5 кДа (рис. 2) як у фракції сумарних білків, так і серед тритон-розчинних білків, де його вміст становив біля 15 %. Окрім цього, виявлено присутність GST-PsDef1 у фракції детергент-нерозчинних білків.

Оскільки показано, що синтезований білок може накопичуватися і в розчинному стані, і у вигляді тілець включення, ми оптимізували умови культивування для досягнення максимального рівня продуктивності синтезу тритон-розчинного рекомбінантного дефензину. Дослідженням впливу температурного режиму на вміст розчинного GST-PsDef1 визначено, що оптимальною темпера-

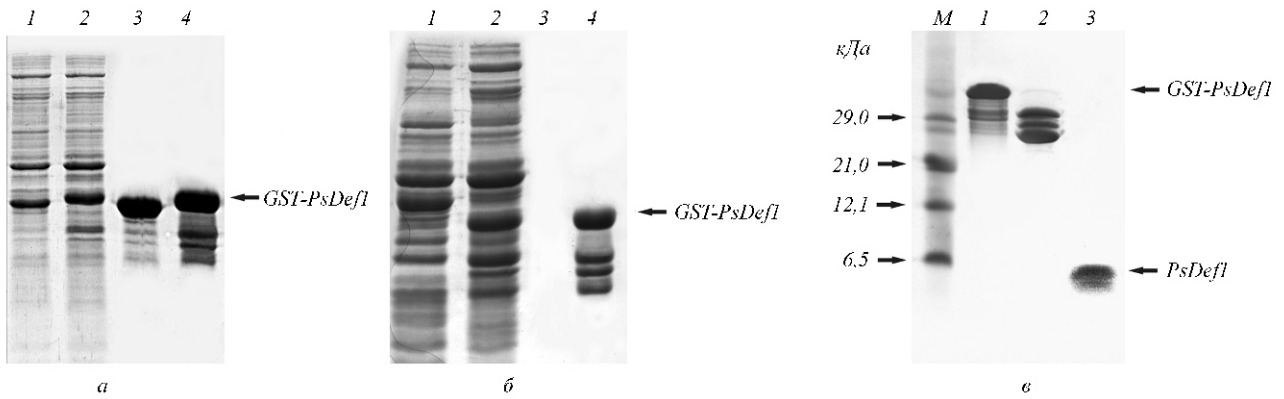


Рис. 3. Отримання рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної з лізатів клітин *E. coli* BL21(DE3): а – очищення рекомбінантного GST-PsDef1 на афінному сорбенті (1, 2 – фракції тритон-розчинних білків клітин, трансформованих векторами *pET42a* та *pET42a-PsDef1* відповідно; 3 – препарат GST; 4 – препарат GST-PsDef1); б: 1, 2 – тритон-розчинні білки бактерій, трансформованих вектором *pET42a/mDef1* до індукції синтезу білка і на 3-ю год після індукції експресії рекомбінантних білків ІПТГ відповідно; 3, 4 – білки, сорбовані на глутатіон-сефарозі з лізатів неіндукованих та індукованих клітин відповідно (електрофорез білків у 12 %-му ПААГ у системі Лемлі); в: електрофореграма протеолітичного розщеплення рекомбінантного білка GST-PsDef1 фактором X_a (1, 2 – білки, іммобілізовані на глутатіон-сефарозі, до і після протеолізу відповідно; 3 – препарат рекPsDef1). Розділення у 15 %-му DS-Na-ПААГ у трис-трициновій буферній системі; забарвлення кумасі G-250

турую для нарощування індукованих клітин *E. coli* є 37 °C, зниження її до 28–30 °C, що часто використовується для коректного укладання поліпептидного ланцюга рекомбінантного продукту, призводить до суттєвого зменшення концентрації тритон-розчинного рекомбінантного білка. Такий же ефект спостерігали при збільшенні тривалості культивування. Нами встановлено, що найбільший вихід GST-PsDef1 у розчинному стані досягається при культивуванні клітин *E. coli* протягом 2 год за температури 37 °C і концентрації ІПТГ 0,4 мМ.

Використання вектора експресії *pET42a* передбачало отримання рекомбінантного PsDef1, злитого з GST, тому подальше його афінне очищення проводили на глутатіон-сефарозі. Як видно з рис. 3, а, в електрофоретичному спектрі афінно очищених препаратів GST і GST-PsDef1, окрім мажорних білків, присутні мінорні смуги декількох білків, спектри яких подібні в обох зразках. Щоб відкинути вірогідність неспецифічної сорбції білків з лізатів бактерій на глутатіон-сефарозі, ми провели інкубацію сорбенту з тритон-розчинними білками неіндукованих клітин і, як видно з рис. 3, б (доріжка 3), таких білків не виявлено. На користь того, що мінорні смуги не є білками – партнерами рекомбінантних білків, свідчать такі факти: домішки не усувались промиванням сорбенту 0,5 М NaCl,

елювалися з глутатіон-сефарози 50 мМ відновленим глутатіоном разом з мажорним білком і, як впливає зі спектрів тритон-розчинних білків (рис. 3, б, доріжки 1 і 2), відповідні смуги з'являються після індукції експресії рекомбінантних білків. Можна припустити, що мінорні білки – це продукти або деградації, або неповної трансляції GST-PsDef1. Афінно очищений на глутатіон-сефарозі препарат рекомбінантного білка включає біля 75 % GST-PsDef1.

Отриманий нами рекомбінантний білок GST-PsDef1 з молекулярною масою ~ 35,5 кДа містить у своєму складі, крім амінокислотної послідовності зрілої форми дефензину 1 сосни звичайної (51 а. з.), також 220 а. з. GST і ділянку з додаткових 58 а. з. Конструкція плазмиди *pET42a* передбачає видалення фрагмента, який кодується вектором, у вигляді білка, злитого з GST, при протеолітичному розщепленні рекомбінантного білка фактором X_a . Фактор X_a – це серинова протеїназа, яка розпізнає і гідролізує після специфічної амінокислотної послідовності Ile Glu Gly Arg. Оскільки фрагмент кДНК PsDef1 клоновано по центрах рестрикційних ендонуклеаз *NcoI* та *EcoRI*, то внаслідок гідролізу гібридного білка цією протеїназою ми б отримали рекPsDef1, який би складався з 52 а. з.: 49 а. з. відповідної послідовності кДНК,

гліцин (за рахунок кодону вектора), склад олігонуклеотидної затравки визначив додатковий метіонін і гліцин замість аргініну.

Нами досліджено два варіанти протеолітичного розщеплення рекомбінантного PsDef1, злитого з GST: а) реакція відбувалася у розчині афінно очищених на глутатіон-сефарозі білків, GST-білкові фрагменти видаляли рехроматографією, фермент відокремлювали від цільового білка ультрацентрифугуванням з використанням Centricon YM 30 («Millipore»); б) протеоліз проводили на сорбенті – фактор X_a додавали до суспензії глутатіон-сефарози з іммобілізованим рекомбінантним білком, у ході реакції цільовий білок переходив у розчин, протеїназу видаляли, як і в першому варіанті. Експериментально порівнявши обидва варіанти, ми віддали перевагу другому через його швидкість, економічність і більший вихід цільового білка.

Кількість фактора X_a брали з розрахунку 20 мкг на 1 мг білка, кон'югованого з GST. Виявлено, що повне протеолітичне розщеплення GST- PsDef1 зазначеним ферментом за специфічним сайтом відбувається при кімнатній температурі протягом 5 год (рис. 3, в). Про це свідчить відсутність відповідної білкової смуги на доріжці 2 і поява мажорної смуги, яка за уявною молекулярною масою ~30 кДа збігається з розміром білкового фрагмента після відщеплення рекPsDef1.

Отже, провівши гідроліз рекомбінантного дефензину 1 сосни звичайної, злитого з GST, фактором X_a , отримано електрофоретично гомогенний препарат рекPsDef1, вихід якого становив 10 % від кількості іммобілізованого на глутатіон-сефарозі білка, що сягає 85 % від максимально можливого виходу.

Функціональна активність рекомбінантних білків залежить від правильної укладки поліпептидного ланцюга. Третинна структура рослинних дефензинів складається з -спіралі та потрійного антипаралельного -шару, які стабілізовані чотирма дисульфідними зв'язками, тобто активність може втрачатися внаслідок невідповідного формування -Cys-Cys-пар. Дослідження механізмів дії дефензинів рослин, виконане групою Брекєрта [23], показали важливу роль двох ділянок Rs-AFP2 для взаємодії з рецептором на мембрані гриба. До скла-

ду цих ділянок входять амінокислотні залишки, розташовані в різних місцях ланцюга, наприклад, одну з них формували Thr10, Ser12, Leu28 і Phe49. Заміни амінокислот сайт-скерованим мутагенезом, які порушували просторову будову дефензину, призводили до втрати антифунгальної активності.

Далі GST-PsDef1 перевіряли на активність щодо грибів з роду *Fusarium*. За концентрації рекомбінантного білка в живильному середовищі < 50 мкг/мл активності не виявлено. Отриманий протеолітичним розщепленням гібридного білка препарат рекPsDef1 тестували на антифунгальну активність, наносячи певні його кількості на стерильні паперові диски. Антифунгальна дія проявилася у формуванні зон інгібування росту міцелію грибів *H. annosum* та *F. solani* (рис. 4, див. уклею).

Оскільки ми отримали візуальне підтвердження пригнічення росту грибів препаратом рекомбінантного білка, то завдання наступного етапу полягало в кількісному визначенні активності препарату рекPsDef1. Для кількісної оцінки застосовано мікроспектрофотометричний метод, де оптичну густину суспензії спор грибів вимірювали після 48 год інкубації в картопляно-декстрозній бражці, яка містила різні концентрації рекомбінантного дефензину. За найбільшої концентрації препарату – 4 мкг/мл, яку використано в досліді, відбувалося пригнічення росту грибів *F. solani* на 81 %, *F. oxysporum* – 50 %, *H. annosum* – 71 %, *Botrytis cinerea* – 85 %, *Pythium dimorphum* – 84 %, тобто спостерігалася диференційована активність рекомбінантного білка щодо різних грибів. Відомо, що іноді активність рослинного дефензину відносно різних видів мікроорганізмів може різнитися на порядок [24].

Активність антимікробних препаратів характеризується величиною IC_{50} , значення якої для рекPsDef1 ми визначили щодо *F. solani*, *F. oxysporum*, *H. annosum*, *B. cinerea* та *P. dimorphum* – це відповідно: 1,4; 4,0; 2,6; 1,2 та 2,0 мкг/мл. Нещодавно в бактеріальній системі *E. coli* експресовано дефензин PgD1 *Picea glauca*, амінокислотна послідовність якого на 80 % ідентична PsDef1. Очищений рекомбінантний білок PgD1 за концентрації 14 мкг/мл пригнічував ріст *F. oxysporum* на 95,2 %, тобто його активність співмірна з активністю дефензину 1 сосни звичайної [25].

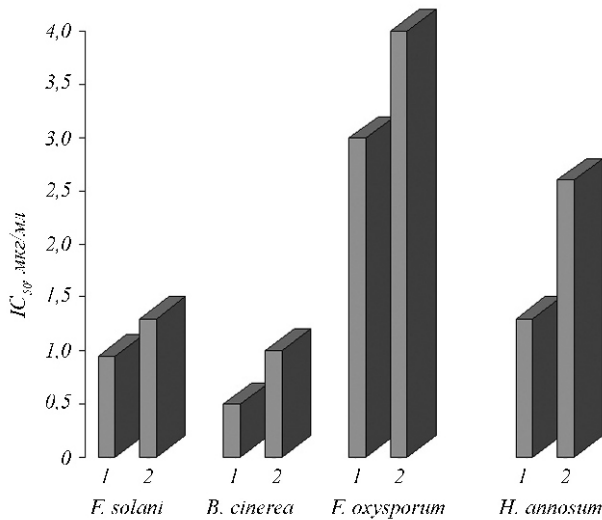


Рис. 5. Порівняльний аналіз антифунгальної активності очищених препаратів дефензину сосни ендогенного (1) і рекомбінантного (2)

У попередніх роботах [15, 26] нами досліджено антифунгальну активність ендогенного дефензину сосни, що дозволило порівняти значення IC_{50} для рекомбінантного дефензину і дефензину, очищеного з проростків сосни. Результати представлено у вигляді діаграми на рис. 5. З цього рисунка видно, що активність рекомбінантного білка є нижчою в 1,5–2 рази, що, ймовірно, є результатом часткового протеолізу рекPsDef1 у чутливому до фактора X_a внутрішньому мотиві Gly-Arg44.

Таким чином, нам вперше вдалося отримати рекомбінантний дефензин сосни з високою антифунгальною активністю. Це відкриває можливості для дослідження його біохімічних, структурних і функціональних властивостей, створення специфічних антитіл до дефензину 1 та з'ясування механізму дії рослинних дефензинів на патогенні організми.

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

Production of Scots pine recombinant defensin 1 and its antifungal activity

Summary

Recently we have purified an endogenous defensin from Scots pine germs, and cloned cDNA encoding defensin 1 (PsDef1, *Pinus sylvestris* defensin 1). The cDNA region encoding a mature form of Scots pine defensin 1 was cloned into a vector pET 42a(+), and the expression of recombinant GST/PsDef1 in the *Escherichia coli* bacterial system was induced. The conditions of production of

soluble GST-proteins were optimized. After purification of the recombinant protein by affinity chromatography on Glutathione-Sepharose column and proteolytic cleavage with Factor Xa, the functionally active preparation of recombinant PsDef1 was obtained. Its antifungal activity is similar to that of endogenous Scots pine defensin 1.

Keywords: recombinant defensin PsDef1, expression, affinity purification, antifungal activity.

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

Получение рекомбинантного дефензина 1 сосны обыкновенной и его антифунгальная активность

Резюме

Ранее нами очищен эндогенный дефензин из проростков сосны обыкновенной, а также клонирована кДНК, кодирующая дефензин 1 (PsDef1, *Pinus sylvestris* дефензин 1). Фрагмент кДНК дефензина 1, кодирующий зрелую форму этого белка, клонирован в вектор pET42a(+) и индуцирована его экспрессия в бактериальной системе *Escherichia coli*. Оптимизированы условия продукции рекомбинантного белка PsDef1, слитого с глутатион-S-трансферазой, в растворимой форме. После аффинной очистки этого белка на глутатион-сефарозе и протеолиза фактором X_a получен биологически активный препарат рекомбинантного PsDef1, антифунгальная активность которого сопоставима с таковой эндогенного дефензина 1 сосны обыкновенной.

Ключевые слова: рекомбинантный дефензин PsDef1, экспрессия, аффинная очистка, антифунгальная активность.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Broekaert W., Cammue B., DeBolle M., Thevissen K., DeSamblanx G., Osborn R. Antimicrobial peptides from plants // *Crit. Rev. Plant Sci.*—1997.—**16**.—P. 297–323.
2. Погрібний П. В. Ендогенні пептидні антибіотики як фактори імунітету тварин // *Біополімери і клітина*.—1998.—**14**, № 6.—С. 512–518.
3. Thomma B., Cammue B., Thevissen K. Plant defensins // *Planta*.—2002.—**216**.—P. 193–202.
4. Broekaert W., Terras F., Cammue B., Osborn R. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system // *Plant Physiol.*—1995.—**108**.—P. 1353–1358.
5. Almeida M., Cabral K., Zingali R., Kurtenbach E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds // *Arch. Biochem. Biophys.*—2000.—**378**.—P. 278–286.
6. Terras F., Schoofs H., de Bolle M., Van Leuven F., Rees S., Vanderleyden J., Cammue B. P., Broekaert W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds // *J. Biol. Chem.*—1992.—**267**.—P. 15301–15309.
7. Segura A., Moreno M., Molina A., Garcia-Olmedo F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) // *FEBS Lett.*—1998.—**435**.—P. 159–162.
8. Bloch C., Richardson M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds or sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) have sequence

- homologies with wheat – purothionins // FEBS Lett.–1991.–**279**.–P. 101–104.
9. *Wijaya R., Neumann G., Condron R., Hughes A., Polya G.* Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin // *Plant Sci.*–2000.–**159**.–P. 243–255.
 10. *Lay F. T., Anderson M. A.* Defensin – components of the innate immune system in plants // *Curr. Prot. Pept. Sci.*–2005.–**6**.–P. 85–101.
 11. *Gao A. G., Hakimi S. M., Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J., Rommens C. M.* Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide // *Nat. Biotechnol.*–2000.–**18**.–P. 1307–1310.
 12. *Thomma B., Broekaert W.* Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. Biochem.*–1998.–**36**.–P. 533–537.
 13. *Asiegbu F., Nahalkova J., Li G.* Pathogen-inducible cDNAs from the interactions of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Plant Science.*–2005.–**168**.–P. 365–372.
 14. *Ковальова В. А., Гут Р. Т.* Виділення білків із фунгіцидною активністю з проростків сосни звичайної // *Физиология и биохимия культурных растений.*–2007.–**39**, № 2.–С. 114–120.
 15. *Ковальова В. А., Гут І. Т., Гут Р. Т.* Характеристика двох дефензиноподібних білків з проростків сосни звичайної // *Біополімери і клітина.*–2006.–**22**, № 2.–С. 126–131.
 16. *Ковальова В. А., Гут Р. Т.* Створення та аналіз бібліотеки генів сосни звичайної // *Наук. вісн. НЛТУ України.*–2007.–Вип. 17.3.–С. 30–34.
 17. *Ковальова В. А., Гут І. Т., Киямова Р. Г., Філоненко В. В., Гут Р. Т.* Клонування та аналіз кДНК дефензина 1 сосни звичайної // *Біополімери і клітина.*–2007.–**23**, № 5.–С. 398–404.
 18. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.–М.: Мир, 1984.–480 с.
 19. *Schagger H., von Jagow G.* Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton // *Anal. Biochem.*–1987.–**166**.–P. 368–379.
 20. *Broekaert W., Terras F., Cammue B., Vanderleyden J.* An automated quantitative assay for fungal growth inhibition // *FEMS Microbiol. Lett.*–1990.–**69**.–P. 55–60.
 21. *Xu H., Reddy A. S. N.* Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein // *Plant. Mol. Biol.*–1997.–**34**.–P. 949–959.
 22. *Da-Hui L., Gui-Liang J., Ying-Tao Z., Tie-Min A.* Bacterial expression of a *Trichosanthes kirilowii* defensin (TDEF1) and its antifungal activity on *Fusarium oxysporum* // *Appl. Gen. Mol. Biotech.*–2007.–**74**.–P. 146–151.
 23. *Thevissen K., Osborn R., Acland D., Broekaert W.* Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity // *Mol. Plant-Microbe Interact.*–2000.–**31**.–P. 54–61.
 24. *Osborn R., Desamblanx G., Thevissen K., Goderis I., Torrekenes S., Van Leuven F., Attenborough S., Rees S., Broekaert W.* Isolation and characterization of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae* // *FEBS Lett.*–1995.–**368**.–P. 257–262.
 25. *Pervieux I., Bourassa M., Laurans F., Hamelin R., Seguin A.* A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments // *Physiol. Mol. Plant Pathol.*–2004.–**64**.–P. 331–341.
 26. *Kovaleva V., Gout R.* Isolation and the antifungal activity of defensin-like protein from Scots pine roots // *Joint conf. UIFRO «Population genetics and genomics of forest trees: from gene function to evolutionary dynamics and conservation»: Abstract Book.*–Madrid, 2006.–P. 188–189.

УДК 577.112.083

Надійшла до редакції 16.05.08

Рисунок до статті В. А. Ковальнової та співавт.

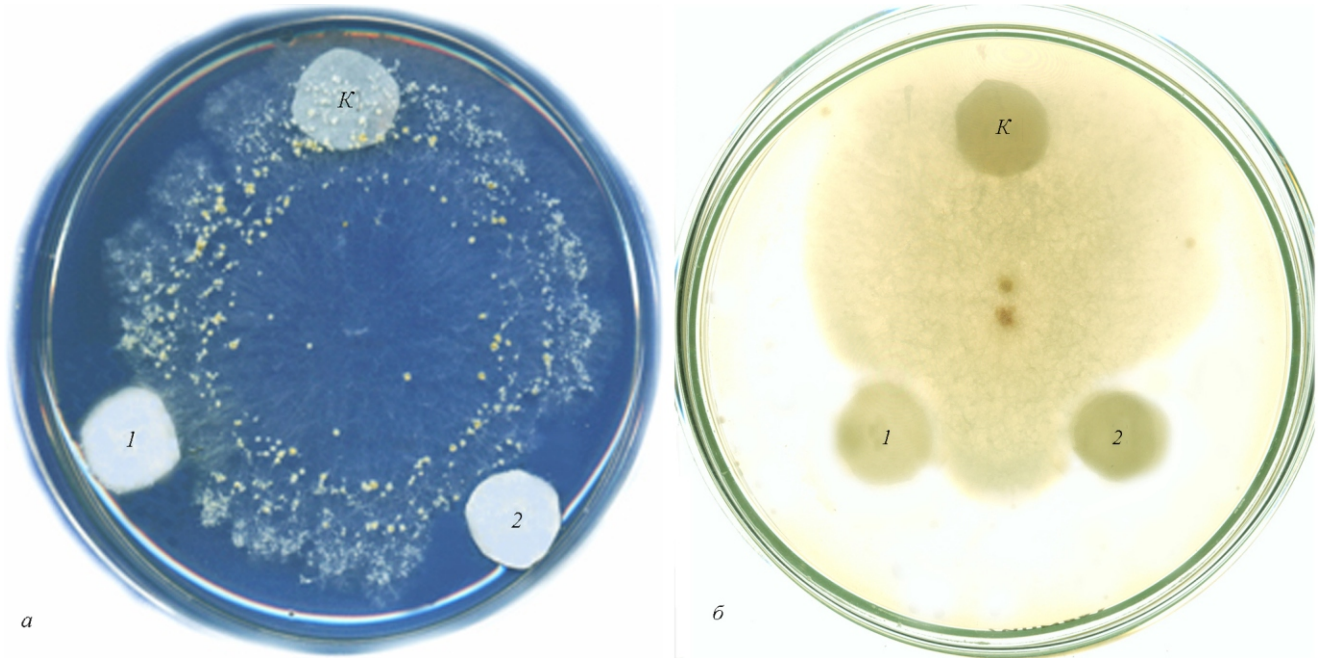


Рис. 4. Інгібуючий ефект препарату рекPsDef1 на ріст грибів *Heterobasidion annosum* (а) та *Fusarium solani* (б); К – стерильна дистильована вода; 1 – 5 мкг препарату; 2 – 10 мкг препарату