

**АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ,
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ
НА ЭТАПЕ № 1**

«Структурные и функциональные исследования рекомбинантных PR-белков»

Соглашение № 8478 от 07 сентября 2012 г.

Тема: «Структура и рецепторные свойства дифензинов – низкомолекулярных патоген-индуцируемых защитных белков растений»

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук

Ключевые слова: фитоиммунитет, защитные белки, структура, механизмы действия, эффекторы, комплексы, внутримолекулярная передача сигнала, ЯМР, компьютерное моделирование

1. Цель проекта

1. Целью проекта является исследование молекулярных механизмов защитного действия низкомолекулярных патоген-индуцируемых белков растений.

2. Роль этапа проекта заключалась в получении бактериальных продуцентов, наработке и очистке защитных белков-дифензинов растений в гетерологичных системах экспрессии. Планировалась наработка защитных белков растений, обогащенных по ^{15}N и ^{13}C . Исследование пространственной структуры низкомолекулярных PR-белков с применением взаимодополняющих физических методов ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии и флуоресценции. Определение фунгицидной и бактерицидной активности рекомбинантных белков-дифензинов, а также их цитотоксичности (безопасности) для клеток животных и растений.

2. Основные результаты проекта (этапа проекта)

1-2. Получены бактериальные продуценты, наработаны и очищены защитные белки-дифензины растений в гетерологичных системах экспрессии. Разработана среда и протокол для наработки защитных белков растений, обогащенных по ^{15}N и ^{13}C . Начато исследование пространственной структуры низкомолекулярных PR-белков с применением метода ЯМР-спектроскопии, на спектрометре Bruker Avance III с рабочей частотой 600 МГц на ядрах ^1H используя 5-мм инверсный трех-ядерный датчик $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, оснащенный градиентной катушкой. На одномерном протонном спектре ЯМР наблюдается типичная картина, характерная для белков с жесткой трехмерной структурой. В высокопольной области спектра, в диапазоне примерно от 4.5 м.д. до 0.5 м.д., видны сигналы от алифатических протонов боковых цепей, а в низкопольной области, в диапазоне 6.4 – 10 м.д., резонируют амидные протоны основной цепи и ароматические протоны боковых цепей. Для получения представления о подвижности белка как целого был записан диффузионный спектр DOSY. Анализируя этот спектр, из диффузионных кривых затухания спектральных сигналов получены размеры белка, которые свидетельствуют об олигомеризации белка. Похожие результаты получены и методом ИК-спектроскопии. Установлено, что белок при хранении агрегирует, что проявляется в нарастании количества агрегационной бета-структуры. Полученные структурные данные использованы для коррекции протоколов очистки и выделения белка. Исследована фунгицидной и бактерицидной активность рекомбинантного белка-

дифензина. Показано, что дефензин не оказывает влияния на рост клеточной культуры *E.coli*, и существенно подавляет рост дрожжевых клеток.

3. К настоящему времени практически не идентифицирована структура малых цистеин-богатых белков-дефензинов. Поэтому проделанная работа отвечает критерии новоизны.

4. Молекулярные механизмы формирования иммунитета являются одной из центральных проблем современной физиологии и биохимии растений. В отличие от млекопитающих растения не обладают специализированными тканями и клетками, обеспечивающими специфичные иммунные реакции. Многие из защитных генов и механизмов защиты растений остаются неисследованными. Крайне мало информации о пространственной структуре сигнальных и защитных белков, а также о специфичности их действия, что существенно затрудняет идентификацию молекулярных механизмов их реакции на атаку фитопатогенов. Согласно сформировавшейся к настоящему времени точке зрения одним из ключевых этапов функционирования PR-белков является молекулярное распознавание ими молекулярных фрагментов патогенов и включение определенных защитных механизмов. К настоящему времени практически нет информации о природе сигнальных молекул данного каскада и механизмов отклика защитных белков на их появление. Исследуемая задача, также как используемые методы и подходы соответствуют мировому уровню.

3. Назначение и область применения результатов проекта (этапа проекта)

1. Актуальность выбранного направления исследований определяется современными тенденциями развития науки и техники. Находясь на стыке физико-химической молекулярной биологии, биофизики и биоинженерии, тематика исследования вписывается в приоритетные направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации «Живые системы», Программу «Индустрия наносистем и материалов», Программу фундаментальных научных исследований государственных академий на 2008-2012 годы (пункт 46 «Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов») и соответствует нескольким позициям биоинженерной, нанотехнологической и биомедицинской направленности, выделенным в Перечне критических технологий.

2. Одним из наименее изученных компонентов фитоиммунитета являются патоген-специфичные реакции, обеспечиваемые низкомолекулярными пептидами и белками (pathogenesis-related или PR-белки), которые синтезируются в ответ на различные виды инфекций. К настоящему времени достаточно мало известно о сигнальных механизмах регуляции экспрессии малых белков-дефензинов PR-12, обладающих фунгицидным действием. Вместе с тем, эти белки представляют собой перспективные инструменты для биотехнологии и удобные объекты для компьютерного моделирования и исследования методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) пространственной структуры и взаимодействий с целевыми лигандами, а также могут служить перспективными объектами для биотехнологических разработок.

3-5. Оценку или прогноз влияния полученных результатов на развитие научно-технических и технологических направлений, разработку новых технических решений, на изменение структуры производства и потребления товаров и услуг в соответствующих секторах рынка и социальной сферы можно будет только после завершения работы по проекту. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что дефензины растений относятся к древнейшим естественным антибиотикам. Они представляют собой малые цистеин-богатые белки основной природы, активные против широкого круга грибов, в том числе патогенов человека. Действие этих белков связано с разрушением мембран грибов и, возможно, ряда бактерий, однако механизм этого действия не изучен. Предполагается, что некоторые из дефензинов взаимодействуют с липидными компонентами, специфичными для мембраны грибов. Структурные различия между сложными липидами мембран грибов и растений, возможно, объясняют избирательную активность в отношении грибов при

отсутствии фитотоксичности. Основным отличием растительных и грибных мембран может быть наличие дополнительной 9-метильной группы в полиненасыщенных жирных кислотах сфинголипидов (глюкозил церамидов) мембран грибов. Некоторые отличия могут быть обнаружены в структуре гликоинозитол фосфоцерамидов. В то время как грибы содержат фосфогликоманнан, растительные компоненты этого ряда включают глюкуроновую кислоту, связанную с инозитолом. Кроме того, эргостерол грибов отличается по структуре от ситостерола и стигмастерола растений наличием ненасыщенной С-7,8 связи и модификациями боковой цепи. Предполагается, что специфичные компоненты сконцентрированы в мембранных рафтах. Именно эти участки могут служить мишенями дефензинов на клеточных поверхностях грибов, вызывая локальные повреждения с образованием ион-проницаемых каналов.

Поэтому по результатам работы по проекту возможна коммерциализация полученных результатов в качестве средств защиты растений и для фармакологического применения для разработки новых лекарственных средств.

4. Достижения молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта)

В проекте принимал участие молодой исследователь Топоркова Я.Ю., к.б.н., мнс. При ее непосредственном участии удалось получить разработать методы выделения и очистки дефензина, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других, похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

В проекте принимал участие молодой исследователь Коннова Т.А., к.б.н., мнс. При ее непосредственном участии удалось получить протоколы гетерологической экспрессии дефензина в бактериальных культурах, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других, похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

В проекте принимал участие молодой исследователь Горина С.С., аспирант. При ее непосредственном участии удалось разработать протоколы гетерологической экспрессии кемокинов – структурных аналогов дефензина, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других, похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

В проекте принимал участие молодой исследователь Мухамедова Л.Н., аспирант. При ее непосредственном участии удалось разработать протоколы гетерологической экспрессии дефензина и его наработки в больших объемах, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других, похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

В проекте принимал участие молодой исследователь Шлыкова Л.В., аспирант. При ее непосредственном участии удалось разработать протоколы гетерологической экспрессии дефензина в среде M10 для обогащения белка ядрами 15N, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других, похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

В проекте принимал участие молодой исследователь Сафина А.Ф., аспирант. При ее непосредственном участии удалось разработать протоколы исследования антигрибковой активности дефензина, соответствующие мировому уровню в области молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты для наработки других,

похожих белков и продолжить исследования в направлении гетерологической экспрессии белков для задач биотехнологии и молекулярной биологии.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий

В сентябре 2012 года бывшие студентки К(П)ФУ Шлыкова Л.В. и Сафина А.Ф. были зачислены в аспирантуру в КИББ КазНЦ РАН. Это традиционный, отработанный в течении нескольких лет способ повышения квалификации выпускников К(П)ФУ – выполнение курсовых и дипломных работ с последующим поступлением в аспирантуру. Как правило после окончания аспирантуры эти молодые исследователи продолжают работать в институте на научных должностях.

6. Перспективы развития исследований

КИББ КазНЦ РАН имеет НОЦы с различными ВУЗами г. Казани. Однако для выполнения данного проекта НОЦ не требуется.

7. Вклад приглашенного руководителя в проект (этап проекта)

Роль приглашенного руководителя работ, имеющего большой опыт в применении методов ЯМР и компьютерного моделирования к исследованию межмолекулярных взаимодействий белков, их структуры и динамики, заключалась в координации всей работы, обучении современным методикам применения метода ЯМР высокого разрешения к белковой проблематике, консультациям по обогащению белковых образцов магнито-активными ядрами, организации всестороннего анализа данных ЯМР, в совместном обсуждении комплекса полученных данных и разработке перспективных путей использования ЯМР высокого разрешения для научных задач, решаемых в Казанском институте биохимии и биофизики. Большое значение имел опыт приглашенного исследователя в организации работы по выделению и очистке белков. В КИББ КазНЦ РАН введен в эксплуатацию ЯМР-спектрометр AVANCE III 600, фирмы Bruker. Однако, несмотря на то, что город Казань является признанным центром магнитного резонанса в мире, соответствующего опыта его применения для исследования структуры белков и межбелковых взаимодействий у нас нет. Для преодоления этих трудностей и решения задач, поставленных в проекте, мы приглашаем одного из ведущих специалистов в области изучения структуры, динамики и межмолекулярных взаимодействий белков методом ЯМР высокого разрешения.

Отрицательных аспектов совместной работы нет. Несмелова И.В. Дважды в течении 2012 года приезжала в Казань. Общая продолжительность пребывания составила – 1 месяц. Организовано 2 семинара под руководством приглашенного исследователя, на которых были рассмотрены современные тенденции применения метода ЯМР в структурных исследованиях. Были проведены организационные мероприятия по более эффективной работе по проекту. Практически ежедневно контакты с приглашенным исследователем продолжаются в интерактивной форме.

Ответственный исполнитель работ по проекту
заведующий лабораторией, д.х.н., проф.

_____ Ю.Ф. Зуев

Руководитель организации-исполнителя:
Директор КИББ КазНЦ РАН,
академик РАН

_____ А.Н. Гречкин

20 декабря 2012 г.

М.П.