

УДК 577.112

Структурно-функциональная характеристика рекомбинантных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы

И. В. Богданов, Е. И. Финкина, С. В. Баландин, Д. Н. Мельникова, Е. А. Стукачева,
Т. В. Овчинникова*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: ovch@ibch.ru

Поступила в редакцию 06.02.2015

РЕФЕРАТ Рекомбинантные изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3 липид-транспортирующего белка чечевицы получены путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Подтверждено, что структура данных белков стабилизирована четырьмя дисульфидными связями и содержит α -спиральные участки. Установлено, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3 обладают антимикробной активностью и способностью связывать жирные кислоты. Обе изоформы связываются со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3. Показано, что иммунологические свойства обеих изоформ имеют черты сходства с другими растительными аллергенными LTP, но Lc-LTP3 обладает менее выраженной иммуореактивностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллерген, антимикробная активность, гетерологичная экспрессия, изоформа, липид-транспортирующий белок, перекрестная реактивность, связывание липидов, чечевица.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия; ТНС – 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфоновая кислота; BSA – бычий сывороточный альбумин; ТФУ – трифторуксусная кислота; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ; GSH и GSSG – восстановленный и окисленный глутатион соответственно; LTP (lipid transfer proteins) – липид-транспортирующие белки; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7.4); TBS – трис-солевой буферный раствор (20 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.4); TBST – трис-солевой буферный раствор, содержащий 0.05% Твин-20; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

ВВЕДЕНИЕ

Липид-транспортирующие белки (LTP) растений составляют класс небольших катионных белков, пространственная структура которых содержит три или четыре α -спирали и стабилизирована четырьмя дисульфидными связями. Благодаря наличию в структуре гидрофобной впадины растительные LTP обладают способностью обратимо связывать и переносить разнообразные молекулы липидов [1]. Многие представители этого класса белков обладают антимикробной активностью и ингибируют рост и размножение фитопатогенных бактерий и грибов. Синтез LTP у растений индуцируется при воздействии различных стрессовых факторов, включая атаку фитопатогенных микроорганизмов, недостаток влаги, засоление почвы и др. [2]. Как полагают, растительные LTP принимают участие в защите растений

от воздействия абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды, в биосинтезе клеточной стенки, депонировании кутикулярного воска, модуляции роста растений и во многих других процессах [3].

Структура растительных LTP характеризуется высокой устойчивостью к термической денатурации и химической деградации, а также к ферментативному расщеплению. Считается, что многие LTP, обладающие повышенной устойчивостью к деградации ферментами пищеварительного тракта, являются сильными аллергенами, участвующими в развитии аллергических реакций на растительные пищевые продукты [4]. Многие LTP вызывают аллергию на латекс и пыльцу. Доминирующим аллергеном класса LTP, обладающим высокой алергизирующей способностью и участвующим в развитии перекрестных

аллергических реакций на растительные пищевые продукты и пыльцу, является основной аллерген персика Pru p 3 [5].

В настоящее время природные и рекомбинантные аллергены, в том числе принадлежащие к классу LTP, широко используются при создании современных тест-систем для проведения компонентной аллергодиагностики. Также ведутся исследования, направленные на создание на основе природных и рекомбинантных аллергенов вакцин, предназначенных для проведения превентивной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) [6]. Различные изоформы аллергенов, как правило, характеризуются разной иммунореактивностью. Поэтому актуальным представляется поиск и изучение изоформ со сниженной иммунореактивностью, способных служить основой для создания гипоаллергенных вариантов основных аллергенов, обладающих высокой клинической эффективностью и низким риском развития побочных реакций при проведении АСИТ [7].

Ранее в семенах чечевицы *Lens culinaris* нами было обнаружено подсемейство из восьми липид-транспортирующих белков (Lc-LTP1–8). Один из этих белков, а именно Lc-LTP2, был выделен и охарактеризован как белок, обладающий антимикробной активностью [8]. Было установлено, что Lc-LTP2, как и ряд других растительных LTP, является пищевым аллергеном, зарегистрированным нами в базе данных аллергенов IUIS под аббревиатурой Len c 3 [9]. Наша работа посвящена разработке способа получения и сравнительному исследованию структурно-функциональных и иммунологических свойств двух изоформ LTP чечевицы – Lc-LTP1 и Lc-LTP3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гетерологичная экспрессия LTP в клетках

Escherichia coli

Для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые белки, проводили ПЦР с кДНК чечевицы *L. culinaris* или персика *Prunus persica* и следующими парами ген-специфичных праймеров:

Lc-LTP1

5'-GCGAGATCTATTGATGGAAGAATGGCAATCTCATGCGGAACA-3' (прямой)

5'-GCGAATTTCGCGGATCCTTAGAACCTGATGGTG-3' (обратный);

Lc-LTP3

5'-GCGAGATCTGATCCGATGGCAGTCTCATGTGGAAC-3' (прямой)

5'-GCGAATTTCGCGGATCCTTCAAACTTATG-3' (обратный);

Pru p 3

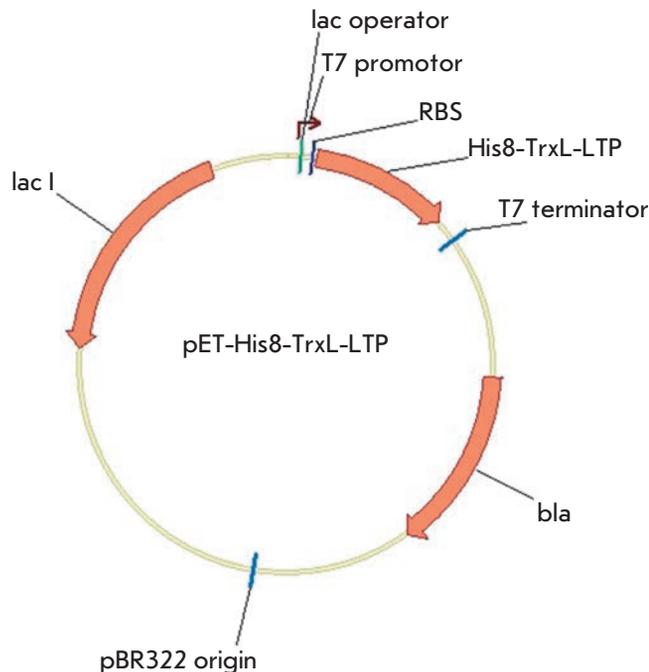


Рис. 1. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pET-His8-TrxL-LTP. Плазмидный вектор включает промотор бактериофага T7, lac-оператор, сайт связывания рибосомы (RBS), последовательность, кодирующую гибридный белок (His8-TrxL-LTP, где LTP – Lc-LTP1, Lc-LTP3 или Pru p 3), терминатор транскрипции T7, bla – ген устойчивости к β-лактамам антибиотикам, lacI – ген репрессора lac

5'-GCGGGATCCATGATAACATGTGGCCAAG-3' (прямой)

5'-GCGGAATTCTCACTTCACGGTGGCGCAGTT-3' (обратный).

Экспрессионные кассеты, включающие T7-промотор, сайт связывания рибосомы, стартовый кодон (ATG), последовательности, кодирующие гистиновый октамер и модифицированный тиоредоксин А (M37L), сайты расщепления (Ile-Asp-Gly-Arg-Met, Asp-Pro-Met или Met) и зрелые белки Lc-LTP1 (GenBank AY793553), Lc-LTP3 (GenBank AY793555) и Pru p 3 (GenBank AY792996), были собраны в результате нескольких последовательных этапов ПЦР и лигированы с BglIII/XhoI-фрагментом низкокопийного плазмидного вектора pET-31b(-) (Novagen) размером 5.25 т.п.н. В результате были получены экспрессирующие плазмиды pET-His8-TrxL-Lc-LTP1, pET-His8-TrxL-Lc-LTP3 и pET-His8-TrxL-Pru-p-3 длиной 6047, 6043 и 6021 п.н. соответственно (рис. 1). Этими плазмидными векторами были трансформированы клетки *E. coli* штамма BL-21(DE3), несущего ген T7-РНК-полимеразы.

Клетки штаммов-продуцентов культивировали в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы, до $A_{600} \sim 0.7$. Синтез LTP индуцировали, добавляя в среду изопропилтио- β -D-галактопиранозид до конечной концентрации 0.2 мМ, после чего клетки выращивали в заполненных на четверть питательной средой колбах емкостью 2 л в течение 4–5 ч при температуре 25°C (в случае Lc-LTP3 и Pru p 3) или 37°C (в случае Lc-LTP1), используя термостатируемый орбитальный инкубатор и частоту перемешивания 220 об/мин.

Выделение и очистка рекомбинантных LTP

Клеточные осадки, полученные в результате центрифугирования, ресуспендировали в буферном растворе А (50 мМ трис-НСl, 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол, рН 7.8), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, в соотношении 1 : 5 (об/об). Клетки разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора, проводя на льду восемь циклов озвучивания по 45 с. В случае Lc-LTP3 и Pru p 3 использовали полученный с помощью центрифугирования осветленный клеточный лизат. Металлохелатную хроматографию проводили на колонке с Ni^{2+} -сефарозой при скорости потока 0.7 мл/мин. Гибридные белки элюировали буферным раствором А, содержащим 0.5 М имидазола. Lc-LTP1 выделяли из телец включения, которые дважды промывали буфером А, содержащим 1% Тритон-Х100, после чего солиubilizировали в буфере А, содержащем 6 М гидрохлорид гуанидина. Металлохелатную хроматографию проводили в той же буферной системе, содержащей 6 М гидрохлорид гуанидина. Все элюаты диализовали против 3 л подкисленной воды (рН 3.0) в течение ночи при температуре 4°C. Полученные диализаты лиофильно высушивали. Гибридные белки расщепляли с помощью реакции с бромцианом. Для этого гибридные белки растворяли в 80% ТФУ в концентрации 10–20 мг/мл, добавляли 100-кратный мольный избыток бромциана и инкубировали в темноте в течение 16–20 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды, после чего упаривали образцы на вакуумном концентраторе. Очистку целевых белков проводили с помощью повторной металлохелатной хроматографии на той же колонке в той же буферной системе, содержащей 6 М гидрохлорид гуанидина. Последнюю стадию очистки рекомбинантных белков проводили на колонке Reprosil-Pur C_{18} -AQ (Dr. Maisch GmbH) в присутствии 0.1% ТФУ при скорости потока 2 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин. Рефолдинг очищенного Lc-LTP1 проводили в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ NaCl, 0.8 мМ

KCl, 1 мМ EDTA), содержащем 1 М мочевины, 0.8 М L-аргинин и 2 мМ GSH/0.2 мМ GSSG [10]. Для проведения рефолдинга рекомбинантный белок растворяли в этом буферном растворе в концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. После этого проводили ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C_{18} (Phenomenex) в присутствии 0.1% ТФУ, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин. Полученные на разных стадиях выделения фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ в триглицериновой системе по методу Лэммли [11].

Масс-спектрометрия, микросеквенирование по Эдману и КД-спектроскопия

Молекулярную массу рекомбинантных LTP определяли на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Reflect III (Bruker), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 (Applied Biosystems). Спектры кругового дихроизма измеряли при комнатной температуре с помощью спектрополяриметра J-810 (Jasco) в кювете с оптическим путем 0.01 см в диапазоне длин волн 180–250 нм с шагом 1 нм, используя водные растворы рекомбинантных белков в концентрации 1 мг/мл.

Сыворотки и антитела

В работе использовали сыворотки пациентов ($n = 20$) с аллергией, собранные на базе Центра молекулярной диагностики ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Из их числа были отобраны сыворотки 9 пациентов с аллергическими реакциями на растительные продукты, содержащие специфические IgE к рекомбинантному Pru p 3. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки индивидов, не страдающих аллергией. Уровни общих IgE в сыворотках пациентов с аллергией определяли с помощью набора Total IgE HRP EIA (Dr. Fooke) согласно инструкции производителя.

Поликлональные анти-Lc-LTP2-антитела были получены в результате иммунизации кроликов. На первом этапе получения гипериммунной сыворотки кроликам подкожно вводили рекомбинантный Lc-LTP2 (150 мкг/кролика) с полным адъювантом Фрейнда, затем половинные дозы антигена с неполным адъювантом Фрейнда и на последнем этапе рекомбинантный белок в PBS. Поликлональные анти-Lc-LTP2-антитела очищали, используя метод дробного осаждения белков сульфатом аммония. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки, полученные от этих же кроликов до иммунизации.

Иммуноблоттинг

Экстракт из семян чечевицы получали согласно [8]. После проведения SDS-электрофореза в 15% ПААГ осуществляли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в буфере, содержащем 20% метанола и 0.1% SDS. На первом этапе мембрану инкубировали в 1% растворе обезжиренного молока в TBS. Мембрану промывали раствором TBST, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в растворе поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител в 1% растворе молока в TBS (разведение 1 : 200). После промывания мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в 1% растворе молока в TBS. Отмытую буфером TBST мембрану обрабатывали раствором TMB для мембран (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали, промывая мембрану водой, для удаления остатков субстрата.

Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA)

Рекомбинантные LTP (0.5 мкг) вносили в лунки 96-луночного планшета (Costar) в 50 мкл TBS и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки тем же буферным раствором TBST планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с 1% раствором BSA в TBS. Далее планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C с сыворотками пациентов с аллергией, приготовленными с помощью серийных разведений (1 : 2–1 : 16) в TBS. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgE человека (Sigma) и инкубировали планшет при температуре 37°C в течение 1 ч. Связавшиеся антитела выявляли после промывки лунок TBST, используя TMB для ELISA (Sigma). Ферментативную реакцию останавливали добавлением 4 н. H₂SO₄ и анализировали полученные данные, измеряя оптическую плотность в лунках при 450 нм.

При проведении ELISA с поликлональными кроличьими анти-Lc-LTP2-антителами после блокирования свободных сайтов связывания в тех же условиях планшет инкубировали с раствором поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител в TBS (разведения 1 : 500–1 : 64000) в течение 1 ч при 37°C. После промывки TBST в лунки вносили раствор конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антивидовых антител к IgG кролика (Sigma) в TBS и инкубировали планшет при 37°C в течение 1 ч. Детекцию проводили также с помощью TMB.

В экспериментах по ингибированию связывания специфических IgE проводили сорбцию меньшего

количества рекомбинантных белков (0.2 мкг), сыворотки пациентов предварительно инкубировали с рекомбинантным Pru p 3 в концентрации 0.02–200 мкг/мл в течение 3 ч при температуре 37°C.

Антимикробная активность

Тест-культуры бактерий *Agrobacterium tumefaciens* A281, *Clavibacter michiganensis* Ac-1144 и *Pseudomonas syringae* B-1546 инокулировали в жидкую среду LB и инкубировали при перемешивании при 30°C до достижения клетками A₆₀₀ = 1.0–1.5. Тест-культуры грибов *Aspergillus niger* F-2259, *Fusarium solani* F-142, *Alternaria alternata* F-3047, *Botrytis cinerea* F-3700 и *Neurospora crassa* F-184 выращивали на картофельно-сахарозном агаре при комнатной температуре до начала активной споруляции. В лунки 96-луночного планшета вносили аликвоты (110 мкл) бактериальных культур (4 × 10⁴ КОЕ/мл) или суспензии спор (10⁴ спор/мл) в питательной среде и добавляли по 10 мкл стерильных белковых растворов различной концентрации в 0.1% ТФУ. Каждый вариант теста проводили в трех повторах. Планшет инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C. Рост культуры оценивали, измеряя оптическую плотность в лунках при 620 нм. В качестве отрицательного контроля использовали 0.1% ТФУ. Концентрации белков (IC₅₀), обеспечивающие 50% подавление роста культуры, определяли через 24 или 48 ч после начала инкубации бактериальных или грибковых культур соответственно. Прорастание спор и морфологию гиф оценивали с помощью светового инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus) спустя 12 и 24 ч после начала инкубации спор в жидкой питательной среде с растворами белков.

Связывание жирных кислот

Спектры флуоресценции были получены с помощью спектрофлуориметра F-4000 (Hitachi) при температуре 25°C. Спектральная ширина щели монохроматоров возбуждения и эмиссии составляла 5 нм. Флуоресценцию ТНС возбуждали при 320 нм и регистрировали в диапазоне 330–450 нм. Максимум интенсивности флуоресценции детектировали при 437 нм. Раствор ТНС в концентрации 3 мкМ в буферном растворе (175 мМ D-маннит, 0.5 мМ K₂SO₄, 0.5 мМ CaCl₂, 5 мМ MES, pH 7.0) в отсутствие или с добавлением стеариновой кислоты (до концентрации 65 мкМ) инкубировали в кювете в течение 1 мин при постоянном перемешивании, после чего снимали спектр флуоресценции. Затем добавляли рекомбинантные LTP до концентрации 2.5 мкМ, инкубировали в течение 2 мин и снимали спектры флуоресценции [12]. Результаты выражали в процентах от интенсивности флуоресценции комплекса



Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ LTP чечевицы и основного аллергена персика Pru p 3. Серым цветом выделены консервативные аминокислотные остатки, скобками показана организация дисульфидных связей. Сверху показаны α -спиральные участки структуры Lc-LTP2 [20]. Звездочками и красным цветом выделены аминокислотные остатки, входящие в конформационные эпитопы Pru p 3 [21]

белок-ТНС согласно формуле: $((F - F_0)/F_C) \times 100\%$, где F_0 – интенсивность флуоресценции ТНС в растворе; F и F_C – интенсивности флуоресценции комплекса белок-ТНС в присутствии и без добавления липида соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геномах растений липид-транспортирующие белки представлены семействами генов, кодирующих различные изоформы LTP. Обнаружение нескольких изоформ липид-транспортирующего белка в одном растении дает основания для более глубокого изучения биологической роли каждой из них. Было высказано предположение, что экспрессия генов тех или иных изоформ LTP определяется прежде всего влиянием на растение окружающей среды, а синтез множественных изоформ LTP является одним из элементов защиты от воздействия различных абиотических и биотических стрессовых факторов [13]. Это предположение получило подтверждение при изучении дифференциальной экспрессии генов изоформ LTP в различных органах и тканях растений в условиях абиотического и биотического стресса на примере кунжута [14], арабидопсиса [15], перца [16], клещевины [17], винограда [18] и томата [19]. При этом было показано, что для биосинтеза отдельных изоформ LTP в растениях характерна тканеспецифичность, и гены определенных изоформ экспрессируются на различных стадиях онтогенеза растения.

Ранее в проросших семенах чечевицы нами были обнаружены восемь белков, принадлежащих к классу липид-транспортирующих белков и названных Lc-LTP1–8 [8]. Было показано, что биосинтез выделенных изоформ липид-транспортирующего белка чечевицы Lc-LTP2, 4, 7, 8 происходит на ранней стадии развития проростков и, возможно, обусловлен участием этих белков в защите от патогенов или транспорте липидов при переходе растения в фазу активного метаболизма при прорастании семян. Биологическая роль изоформ Lc-LTP1, 3, 5, 6 пока остается невыясненной.

Структурно-функциональные свойства одного из LTP чечевицы, а именно Lc-LTP2, были подробно изучены. Этот белок имеет характерную для представителей класса LTP пространственную структуру, включающую четыре α -спирали [20]. Гидрофобные аминокислотные остатки в белке обращены внутрь глобулы и формируют гидрофобную впадину, способную вмещать в себя липидные лиганды. Lc-LTP2 связывает липиды, обладает антимикробной активностью и является основным аллергеном чечевицы, зарегистрированным под аббревиатурой Len с 3 [9].

Данная работа посвящена получению и сравнительному изучению структурно-функциональных и иммунологических свойств двух других изоформ LTP чечевицы. Для проведения сравнительного исследования были выбраны изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, наиболее заметно отличающиеся от Lc-LTP2 по аминокислотной последовательности (степень гомологии 72 и 77% соответственно) (рис. 2). Эти белки состоят из 93 аминокислотных остатков, включая восемь консервативно расположенных остатков цистеина, и имеют изоэлектрические точки в щелочной области pH (9.53 и 8.32 для Lc-LTP1 и Lc-LTP3 соответственно). В структуре этих белков присутствуют аминокислотные остатки, составляющие конформационные эпитопы доминантного аллергена класса LTP – Pru p 3 персика, что дает основание полагать, что обе изоформы LTP чечевицы обладают свойствами аллергенов.

Получение и характеристика рекомбинантных изоформ LTP чечевицы

Рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3 были получены способом, аналогичным описанному для Lc-LTP2 [9]. Выделение и очистку рекомбинантных белков проводили в несколько стадий, используя растворимую (Lc-LTP3) и нерастворимую (Lc-LTP1) клеточные фракции. Гибридный белок His8-TrxL-Lc-LTP3 в ходе экспрессии накапливался преимущественно в растворимой форме в цитоплазме. His8-TrxL-Lc-LTP1, имеющий изоэлектрическую точку в бо-

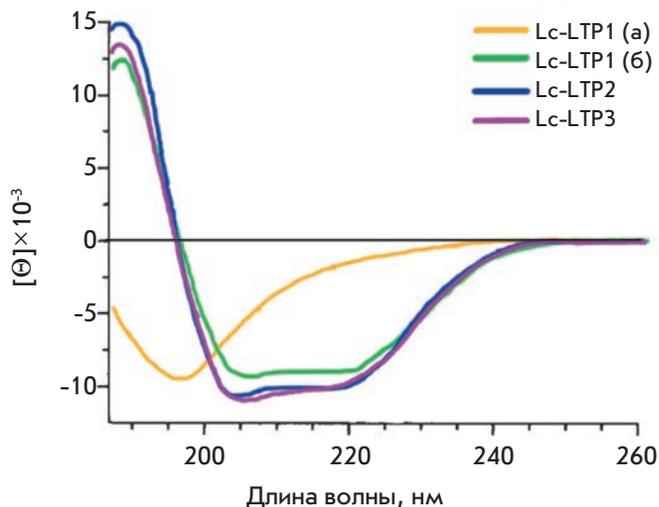


Рис. 3. КД-спектры рекомбинантных ЛТР чечевицы. а и б – КД-спектры рекомбинантного Lc-LTP1 до и после рефолдинга

лее щелочной области значений рН, накапливался как в растворимой, так и в нерастворимой формах. Однако в растворе в основном присутствовали укороченные в С-концевой области формы His8-TrxL-Lc-LTP1, которые, по-видимому, образовывались в результате протеолитического расщепления Lc-LTP1. В связи с этим экспрессию гибридного белка проводили при более высокой температуре и выделяли его из нерастворимой клеточной фракции. Очистку гибридных белков проводили с помощью металлохелатной хроматографии в неденатурирующих или денатурирующих условиях, используя для элюции ступенчатый градиент имидазола. Гибридные белки расщепляли бромцианом в кислой среде, после чего продукты реакции разделяли с помощью повторной металлохелатной хроматографии. Окончательную очистку рекомбинантных белков осуществляли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Вторичную структуру рекомбинантных белков изучали с помощью метода КД-спектроскопии. Спектр кругового дихроизма Lc-LTP3 был схож с КД-спектром Lc-LTP2 и представлял собой кривую, характерную для белков с высоким содержанием α-спиральной структуры. КД-спектр рекомбинантного Lc-LTP1 имел принципиально другую форму и указывал на то, что белок не структурирован (рис. 3). В связи с этим был проведен рефолдинг очищенного Lc-LTP1 при низкой температуре в мягких денатурирующих условиях в присутствии 1 М мочевины, L-аргинина, который препятствует агрегации белков, и пары окисленного и восстановленного глутатионов. Продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ. Анализ КД-спектра Lc-LTP1, прошедшего стадию

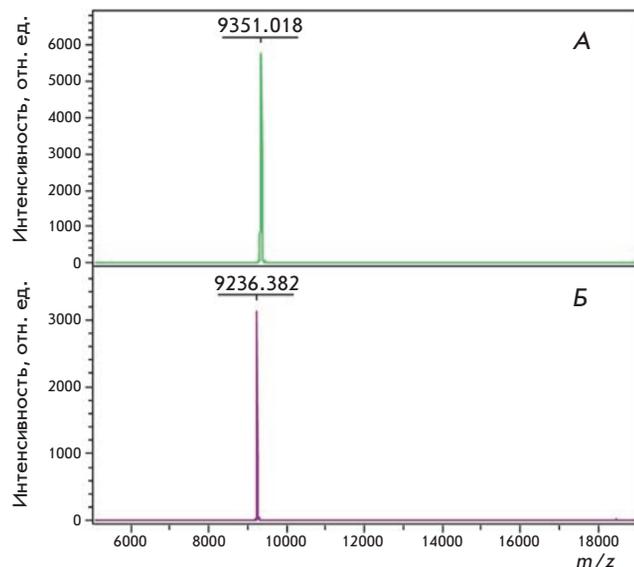


Рис. 4. MALDI-TOF-масс-спектры рекомбинантных Lc-LTP1 (А) и Lc-LTP3 (Б)

рефолдинга, показал, что белок принял характерную для ЛТР растений конформацию.

Препараты рекомбинантных белков анализировали с помощью SDS-электрофореза. Было показано, что в отсутствие β-меркаптоэтанола белки Lc-LTP1 и Lc-LTP3 находятся как в димерной, так и в мономерной форме, что характерно для белков класса ЛТР [9]. Добавление восстанавливающего агента приводило к разрыву дисульфидных связей и разрушению димеров. Гомогенность полученных препаратов и идентичность рекомбинантных ЛТР природным белкам подтверждены с использованием методов времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ и автоматического микросеквенирования по Эдману. Масс-спектрометрический анализ показал, что молекулярные массы рекомбинантных Lc-LTP1 (9351.02) и Lc-LTP3 (9236.38) соответствуют расчетным массам ЛТР, структура которых стабилизирована четырьмя дисульфидными связями (9350.93 и 9235.65 соответственно) (рис. 4). Измеренные значения *m/z* соответствуют массам протонированных молекулярных ионов $[M+H]^+$. Выход рекомбинантных белков составлял не менее 3 и 5 мг/л культуры в пересчете на чистые Lc-LTP1 и Lc-LTP3 соответственно. Рекомбинантный Prc p 3 получали так же, как Lc-LTP3, и его выход составил 4 мг/л культуры.

Функциональная активность рекомбинантных изоформ ЛТР чечевицы

Известно, что многие представители класса ЛТР обладают антимикробной активностью, и предполагаемой мишенью их антимикробного действия является цитоплазматическая мембрана [22]. Как полагают,

Таблица 1. Антимикробная активность рекомбинантных LTP чечевицы

Микроорганизм	IC ₅₀ , мкМ		
	Lc-LTP1	Lc-LTP2	Lc-LTP3
Бактерии			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40	20–40	40
<i>Clavibacter michiganensis</i>	40	> 40	> 40
<i>Pseudomonas syringae</i>	> 40	> 40	> 40
Грибы			
<i>Alternaria alternata</i>	40	> 40	40
<i>Aspergillus niger</i>	5–10	10	10
<i>Botrytis cinerea</i>	20–40	10–20	> 40
<i>Fusarium solani</i>	20–40	> 40	40
<i>Neurospora crassa</i>	40	20–40	20–40

катионные LTP растений взаимодействуют с анионными компонентами цитоплазматической мембраны, что приводит к ее дестабилизации и нарушению проницаемости [20].

Сравнительное исследование антимикробной активности трех изоформ LTP чечевицы проведено с использованием грамотрицательных бактерий *A. tumefaciens* и *P. syringae* и грамположительной бактерии *C. michiganensis*, а также грибов *A. alternata*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. solani* и *N. crassa*. Установлено, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, обладают противогрибковой и слабовыраженной антибактериальной активностью и не характеризуются специфичностью антимикробного действия (табл. 1). Наиболее чувствительной к действию всех трех белков оказалась культура *A. niger*, возбудителя черной гнили растений. Показано, что рекомбинантные Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, ингибируют прорастание спор фитопатогенных грибов, рост и развитие мицелия, но не влияют на морфологию гиф. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в степени выраженности антимикробной активности трех изоформ LTP чечевицы, несмотря на заметные различия в первичной структуре и кислотно-основных свойствах данных белков. На основании этого было высказано предположение, что не только неспецифическое электростатическое взаимодействие LTP с мембраной имеет значение для проявления антимикробного эффекта.

Помимо антимикробной активности практически все известные LTP растений обладают способностью связывать и переносить разнообразные липиды. Это обусловлено наличием в структуре LTP гидрофоб-

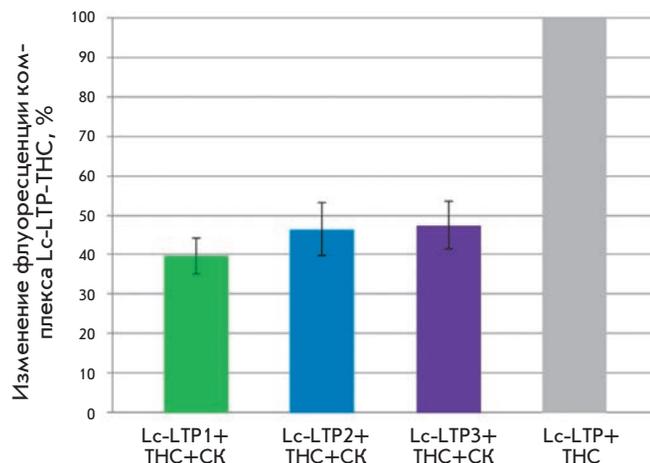


Рис. 5. Изменение флуоресценции комплексов рекомбинантных LTP и THC в присутствии стеариновой кислоты (СК). Lc-LTP соответствует одной из трех изоформ

ной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Растительные LTP связывают широкий спектр лигандов, включая жирные кислоты с длиной цепи C10–C18, ацильные производные кофермента А, фосфо- и галактолипиды, простагландин В₂, молекулы органических растворителей и некоторые лекарственные средства [23]. Эффективность связывания различных липидных лигандов зависит от размера гидрофобной впадины белка. Считается, что участие LTP во многих процессах в растении обусловлено их способностью связывать и переносить различные липиды.

Ранее методом ЯМР-спектроскопии было показано, что в структуре рекомбинантного Lc-LTP2 имеется гидрофобная впадина, обеспечивающая взаимодействие белка с молекулами димиристоилфосфатидилглицерина [20]. В настоящей работе было проведено исследование взаимодействия трех рекомбинантных LTP чечевицы со стеариновой кислотой с использованием флуоресцентного зонда THC, увеличение флуоресценции которой происходит при попадании ее в гидрофобное окружение. Было показано, что добавление к раствору THC неправильно свернутого Lc-LTP1, не прошедшего стадию рефолдинга, не влияло на интенсивность ее флуоресценции. Добавление же рекомбинантных Lc-LTP2 и Lc-LTP3, а также Lc-LTP1, прошедшего стадию рефолдинга, значительно увеличивало интенсивность флуоресценции THC. Это свидетельствовало об образовании комплексов THC с белками и о наличии в структуре всех трех LTP гидрофобной впадины, способной вмещать в себя гидрофобные молекулы. Добавление каждо-

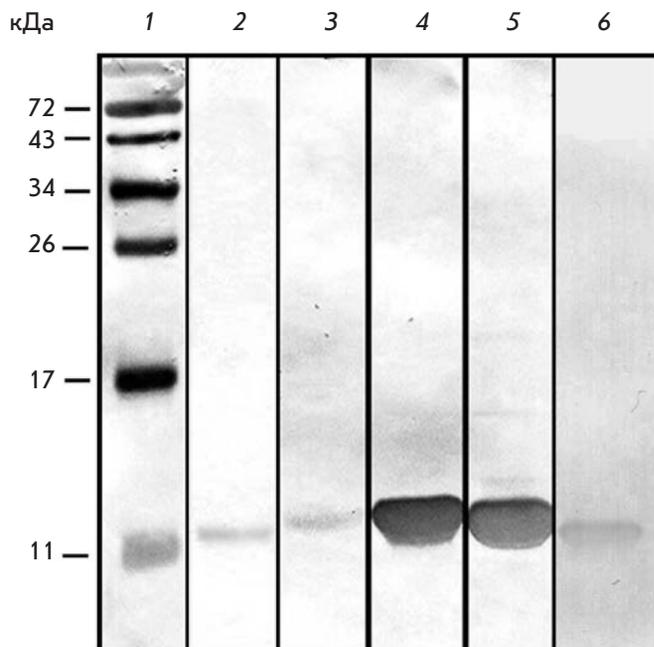


Рис. 6. Иммуноблоттинг с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител: 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – экстракт семян чечевицы; 3–5 – рекомбинантные Lc-LTP1, 2, 3 соответственно; 6 – рекомбинантный Pru p 3

го из трех рекомбинантных ЛТР чечевицы к смеси ТНС и стеариновой кислоты приводило к менее значительному увеличению интенсивности флуоресценции и свидетельствовало о существовании конкуренции между молекулами жирной кислоты и ТНС за сайты связывания в исследуемых белках (рис. 5). Таким образом, показано, что все три изоформы обладают способностью связывать жирные кислоты. При этом было отмечено отсутствие существенной разницы в эффективности связывания жирной кислоты тремя белками, обусловленное, возможно, сходством размеров гидрофобных впадин трех изоформ ЛТР чечевицы.

Иммунологические свойства рекомбинантных изоформ ЛТР чечевицы

ЛТР из различных растений охарактеризованы как аллергены. Зачастую развитие аллергических реакций обусловлено перекрестной реактивностью между доминирующим аллергеном класса ЛТР Pru p 3 персика и гомологичными аллергенными белками из различных растительных продуктов и пыльцы. Ранее нами было показано, что Lc-LTP2 чечевицы, зарегистрированный в базе данных аллергенов IUIS как Len s 3, является пищевым аллергеном.

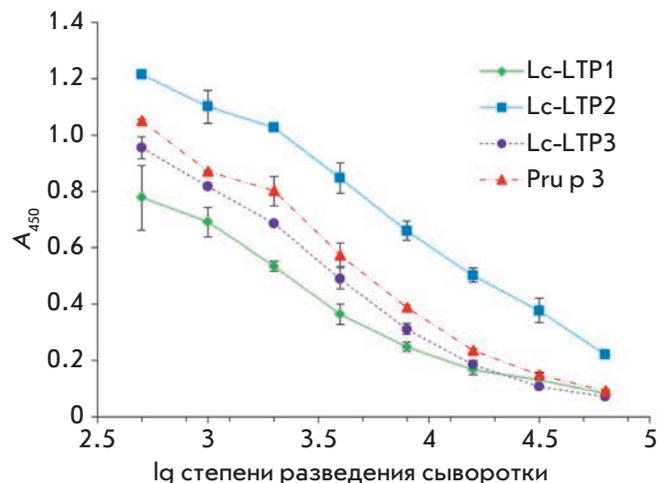


Рис. 7. ELISA с использованием поликлональных кроличьих анти-Lc-LTP2-антител

Этот аллерген связывается со специфическими IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающими схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3, что может быть причиной развития перекрестных аллергических реакций [9]. В представленной работе проведено сравнительное исследование иммунологических свойств и перекрестной реактивности двух других изоформ ЛТР чечевицы. Для этого были использованы полученные поликлональные кроличьи анти-Lc-LTP2-антитела и сыворотки пациентов с пищевой аллергией, содержащие специфические IgE к рекомбинантному Pru p 3.

Взаимодействие кроличьих поликлональных анти-Lc-LTP2 IgG с тремя изоформами ЛТР чечевицы и Pru p 3 персика было исследовано методами иммуноблоттинга (рис. 6) и ELISA (рис. 7). Результаты иммуноблоттинга, проведенного с использованием предварительно восстановленных рекомбинантных ЛТР, показали, что поликлональные кроличьи анти-Lc-LTP2-антитела связываются со всеми тремя изоформами ЛТР чечевицы и с Pru p 3 персика. С наибольшей эффективностью анти-Lc-LTP2-антитела взаимодействовали, как и следовало ожидать, с Lc-LTP2, хуже всего – с Lc-LTP1, хотя наименьшее структурное сходство с Lc-LTP2 имеет Pru p 3 персика (степень гомологии всего 55%). Результаты ELISA принципиально не отличались от результатов иммуноблоттинга, хотя в данном случае использовались нативные белки. Наибольшая эффективность связывания с анти-Lc-LTP2-антителами наблюдалась в случае Lc-LTP2, наименьшая – в случае Lc-LTP1. Полученные результаты свидетельствовали

Таблица 2. Характеристика сывороток пациентов с пищевой аллергией

№	Пол	Общие IgE, МЕ/мл	Специфические IgE* (ELISA), A ₄₅₀				Аллергизирующие продукты
			Lc-LTP1	Lc-LTP2	Lc-LTP3	Pru p 3	
1	М	794	1.4 ± 0.09	1.26 ± 0.19	1.28 ± 0.1	1.35 ± 0.14	Орехи
2	Ж	556	0.7 ± 0.12	0.77 ± 0.11	0.84 ± 0.07	0.85 ± 0.05	Орехи
3	М	525	1.08 ± 0.04	1.08 ± 0.11	1.07 ± 0.02	1.09 ± 0.03	Орехи
4	Ж	479	0.53 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.82 ± 0.05	Кунжут, соевые бобы
5	М	417	0.28 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.32 ± 0.06	0.27 ± 0.01	Орехи, фрукты
6	Ж	407	0.77 ± 0.07	0.93 ± 0.02	0.29 ± 0.08	1.01 ± 0.07	Орехи, томаты
7	Ж	302	0.33 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.31 ± 0.1	0.33 ± 0.02	Орехи
8	М	71	0.6 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.4 ± 0.01	0.81 ± 0.02	Горох
9	Ж	25	0.46 ± 0.05	0.53 ± 0.14	0.45 ± 0.04	0.64 ± 0.02	Орехи

*Данные получены при использовании разведений сывороток 1 : 2.

о сходстве структурной организации всех LTP и, по крайней мере, о частичном сходстве их линейных и конформационных антигенных детерминант.

Способность рекомбинантных белков связываться со специфическими IgE из сывороток пациентов с аллергией на фрукты, орехи и бобовые была показана с помощью ELISA (табл. 2). Все три изоформы LTP чечевицы связывались со специфическими IgE, но, как показал анализ большинства сывороток пациентов, их иммунореактивность была ниже, чем у Pru p 3. IgE-иммунореактивность рекомбинантного Lc-LTP3 была ниже, чем у остальных двух изоформ. Это свидетельствовало о том, что все три изоформы LTP чечевицы обладают свойствами аллергенов, и что Lc-LTP3, по предварительным данным, является наименее аллергенной изоформой LTP чечевицы. Возможной причиной менее выраженной иммунореактивности Lc-LTP3 являлось то, что в его структуре присутствует меньшее, чем в других LTP чечевицы, число аминокислотных остатков (7 из 13), составляющих конформационные эпитопы Pru p 3 персика (рис. 2).

Перекрестная реактивность рекомбинантных изоформ LTP чечевицы была исследована с помощью ELISA с использованием в качестве ингибитора связывания с IgE рекомбинантного Pru p 3 (рис. 8). Ингибирование связывания с IgE наблюдалось в случае всех трех LTP чечевицы. Полученные результаты свидетельствовали о том, что изоформы Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и Lc-LTP2, содержат эпитопы, сходные с основным аллергеном персика Pru p 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами получены рекомбинантные изоформы липид-транспортирующего белка чечевицы – Lc-LTP1 и Lc-LTP3, и проведено сравнительное исследование структурно-функциональных и им-

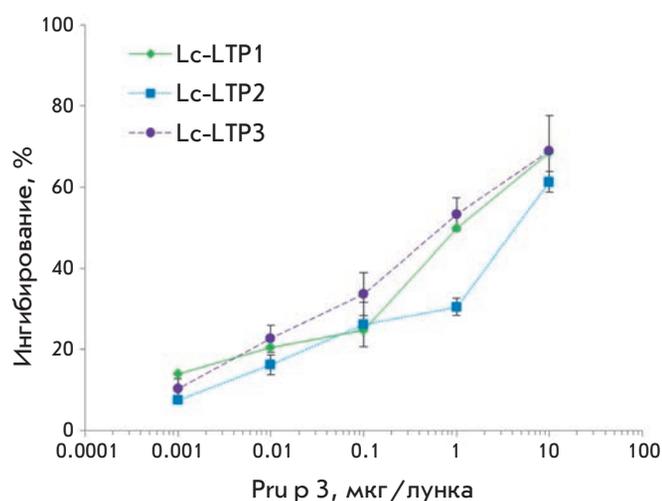


Рис. 8. Ингибирование рекомбинантным Pru p 3 связывания LTP чечевицы со специфическими IgE из сыворотки пациента № 3 с пищевой аллергией

мунологических свойств четырех липид-транспортирующих белков. Несмотря на существенные различия в аминокислотных последовательностях трех изоформ LTP чечевицы, значительной разницы в их функциональных свойствах не выявлено. Показано, что все три белка содержат α-спиральные участки и характеризуются наличием гидрофобной впадины, обеспечивающей способность LTP связывать жирные кислоты. Все изоформы LTP чечевицы обладают антимикробной активностью, характеризующейся низкой специфичностью. Поиск природных лигандов различных изоформ LTP чечевицы, а также выявление факторов, влияющих на индукцию их биосинтеза, откроют путь к более глубокому пониманию функциональной роли множественности изоформ LTP.

В то же время выявлены различия в иммунореактивности трех изоформ ЛТР чечевицы. Показано, что Lc-LTP1 и Lc-LTP3, так же как и депонированный в базу данных аллергенов IUIS Len с 3, способны связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией, распознающие схожие эпитопы основного аллергена персика Pru p 3. Однако у Lc-LTP3 иммунореактивность менее выражена, чем у других изоформ. Дальнейшее изучение структурной организации и аллергенных свойств Lc-LTP3 позволит установить ключевые аминокислотные остатки, замена которых приводит к снижению им-

мунореактивности растительных ЛТР, а также создаст предпосылки для получения гипоаллергенных аналогов липид-транспортирующих белков и их использования для аллерговакцинации. ●

Авторы выражают благодарность Г.А. Шипулину и сотрудникам Центра молекулярной диагностики ЦНИИЭ Роспотребнадзора за предоставленные сыворотки пациентов с пищевой аллергией.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-08-00956).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kader J.C. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 627–654.
- Sun J.-Y., Gaudet D., Lu Z.-X., Frick M., Puchalski B., Laroche A. // Mol. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. № 3. P. 346–360.
- Salcedo G., Sanchez-Monge R., Barber D., Diaz-Perales A. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1771. P. 781–791.
- Pastorello E.A., Pompei C., Pravettoni V., Farioli L., Calamari A.M., Scibilia J., Robino A.M., Conti A., Iametti S., Fortunato D., et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112. P. 775–783.
- Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Gonzalez-Muñoz M., Pacios L.F., Compés E., Garcia-Carrasco B., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Diaz-Perales A. // Mol. Immunol. 2009. V. 46. № 4. P. 722–728.
- Ferreira F., Briza P., Infuhr D., Schmidt G., Wallner M., Wopfner N., Thalhamer J., Achatz G. // Inflamm. Allergy Drug Targets. 2006. V. 5. № 1. P. 5–14.
- Ferreira F., Hirtenlehner K., Jilek A., Godnik-Cvar J., Breiteneder H., Grimm R., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breitenbach M., et al. // J. Exp. Med. 1996. V. 183. № 2. P. 599–609.
- Финкина Е.И., Баландин С.В., Серебрякова М.В., Потапенко Н.А., Тагаев А.А., Овчинникова Т.В. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 533–543.
- Finkina E.I., Akkerdaas J., Balandin S.V., Santos Magadán S., Knulst A., Fernandez-Rivas M., Asero R., van Ree R., Ovchinnikova T.V. // Int. Arch. Allergy Immunol. 2012. V. 157. P. 51–57.
- Wan L., Zeng L., Chen L., Huang Q., Li S., Lu Y., Li Y., Cheng J., Lu X. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 48. № 2. P. 307–313.
- Laemmli U.R. // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
- Buhot N., Gomes E., Milat M.L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J., Delrot S., Coutos-Thevenot P., Blein J.P. // Mol. Biol. Cell. 2004. V. 15. № 11. P. 5047–5052.
- Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. // Trends Microbiol. 1995. V. 3. № 2. P. 72–74.
- Choi A.M., Lee S.B., Cho S.H., Hwang I., Hur C.-G., Suh M.C. // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. P. 127–139.
- Thoma S., Hecht U., Kippers A., Botella J., De Vries S., Somerville C. // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 35–45.
- Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. № 6. P. 915–928.
- Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. // Biochem. 1992. V. 3. P. 500–508.
- Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.H., Delrot S., Coutos-Thévenot P. // Mol. Plant Microbe Interact. 2003. V. 16. № 5. P. 456–464.
- Trevino M.B., O'Connell M.A. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 1461–1468.
- Gizatullina A.K., Finkina E.I., Mineev K.S., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Telezhinskaya I.N., Balandin S.V., Shenkarev Z.O., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochim. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 439. № 4. P. 427–432.
- Pacios L.F., Tordesillas L., Cuesta-Herranz J., Compés E., Sánchez-Monge R., Palacín A., Salcedo G., Díaz-Perales A. // Mol. Immunol. 2008. V. 45. № 8. P. 2269–2276.
- Regente M.C., Giudici A.M., Villalain J., De la Canal L. // Lett. Appl. Mic. 2005. V. 40. P. 183–189.
- Carvalho A.O., Gomes V.M. // Peptides. 2007. V. 28. № 5. P. 1144–1153.