

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
имени академика А.С. САДЫКОВА**

На правах рукописи
УДК 547.96:577.112.5

УБАЙДУЛЛАЕВА ХУРШИДА АБДУЛЛАЕВНА

**«Выделение и структурно-функциональная характеристика
биоцидных белков из семян дыни и инжирного дерева»**

02.00.10 - Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Ташкент-2010

Работа выполнена в Институте генетики и экспериментальной биологии
растений АН Республики Узбекистан

Научный руководитель: кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Мавлонов Гафуржон Турдалиевич

Официальные оппоненты доктор биологических наук
Тилябаев Заитжон
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Пиякина Галина Александровна

Ведущая организация: Национальный университет
Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
химический факультет

Защита состоится “ _____ ” _____ 2010 г. в _____ ч. на заседании
Специализированного Совета Д.015.21.01 при Институте биоорганической
химии имени академика А.С. Садыкова АН РУз (100125, Ташкент, проспект
Мирзо Улугбека, 83, тел.: 262-35-40, факс: (99871-)262-70-63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2010 г.

**Ученый секретарь
Специализированного Совета,
кандидат химических наук**

Гафуров М.Б

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. Тенденции развития аграрной науки предусматривают широкое привлечение достижений современной геномики и протеомики. В частности, комплексная борьба с вредителями и болезнями сельскохозяйственных культур, сочетающая биологические методы повышения сопротивляемости растений и эффективные агротехнологии, позволяет уменьшить использование пестицидов, гарантирует урожайность, уменьшает экологический прессинг и содействует устойчивому ведению сельского хозяйства. В этой связи актуальным является изучение биоцидных белков, гены которых могут быть использованы в биотехнологии с целью конструирования генетически модифицированных сортов хлопчатника, имеющих повышенную резистентность к патогенам и вредителям.

Поиск биоцидных белков среди традиционных пищевых растительных источников, гены которых могут быть кандидатами для последующих целей биотехнологии, наиболее перспективен, так как исторически длительный контакт продуктов этих генов с организмом человека гарантирует безвредность использования в составе ген-модифицированного организма.

В связи с этим, выделение и установление структуры, а также характеристика биоцидных свойств и возможной токсичности является актуальной для приоритетных направлений современной науки о жизни.

Степень изученности проблемы. Интерес к биоцидным пептидам/белкам был наиболее высок в конце 90-годов прошлого столетия. Обязан этот интерес, в первую очередь, негативным явлениям, которые обусловили длительное, начиная с конца 40-х годов, широкомасштабное применение антибиотиков в медицине и в ветеринарии. Являясь компонентами неспецифической защитной системы, биоцидные белки ответственны за защиту хозяйской клетки от инфицирования, а также обеспечивают эффективность иммунной системы. Биологическая активность этих защитных белков направлена на уменьшение инфекционного титра (множественности) атакующего микроорганизма. Опубликовано множество данных в пользу целесообразности применения биоцидных белков в медицине, ветеринарии, сельскохозяйственной биотехнологии. В частности, получены трансгенные растения, содержащие гены тионинов, и есть убеждение, что они помогут снизить экологический прессинг пестицидов. В то же время, поиск новых источников биоцидных белков продолжается. Связано это с тем, что сфера их потенциального практического применения требует широкого круга этих белков с высокой биоцидной (антимикробной, инсектицидной, цитотоксической и т.п.) активностью и безвредностью для человека и животных.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Работа выполнена в рамках комплексной программы «Генинмар», финансируемой ГКНТ РУз 1999-2002 гг., и проекта 4ф-П-149

«Исследование структуры и функции генома хлопчатника с целью создания маркер - ассоциированной селекции»

Цель исследования заключалась в выделении и характеристике структуры и биологической активности белков, имеющих антимикробную, инсектицидную и цитотоксическую активность из дыни и инжирного дерева, а также изучение их потенциальной ценности в биотехнологии хлопчатника и других сельскохозяйственных растений и в медицине.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Выделение биоцидного белка из проростков и семян дыни, установление его частичной аминокислотной последовательности;
- Определение принадлежности биоцидного белка дыни к классу тионинов с помощью средств протеомики;
- Испытание инсектотоксичности, фунгицидности и возможной токсичности биоцидного белка дыни;
- Выделение биоцидного белка из латекса инжирного дерева, установление его частичной аминокислотной последовательности;
- Определение принадлежности биоцидного белка из латекса инжира к известному классу биоцидных белков средствами протеомики, а также характеристика его антигрибной активности;
- Выделение биоцидных веществ с цитотоксической активностью из повилики и их характеристика.

Объект и предмет исследования. Объектами исследований являются белки из флоэмной жидкости инжирного дерева, из семян и проростков дыни и гликозиды повилики. Предметом исследований является изучение биоцидной активности и структуры выделенных белков.

Методы исследований. В работе применены гельфильтрация, ионообменная и гидрофобная хроматография, ВЭЖХ, аминокислотный анализ, частичное N-концевое секвенирование по Эдману, полиакриламидный одно- и двумерный электрофорез, MALDI-TOF, Q-TOF MS/MS секвенирование из геля, идентификация белка по секвенированным фрагментам средствами биоинформатики, а также биотесты: антигрибная активность, определение цитотоксичности в культуре раковых клеток, определение токсичности на мышах. Результаты электрофореза обработаны с использованием программ: AlphaImager, Quantity I, α GelFox, Melanie7.

Гипотеза исследований. Выбранные в работе пищевые растительные источники (дыня, инжирное дерево) могут содержать биоцидные белки, не имеющие токсичности и других вредных действий для человека и животных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделение антигрибного PR-белка из латекса инжира, его биологическая характеристика, частичное секвенирование и идентификация средствами биоинформатики.

2. Выделение из семян и проростков дыни тионина с инсектицидной активностью, идентификация средствами протеомики.

3. Идентификация биоцидных фрагментов запасных белков сухих семян дыни средствами протеомики.

4. Изучение биоцидных гликозидов повилики и их конъюгатов с белками.

Научная новизна. Впервые из семян и проростков дыни выделен белок с молекулярной массой 7597 Да, который отнесен к тритионинам, а из латекса инжирного дерева - белок с молекулярной массой 6481 Да являющийся PR-белком. Определены молекулярная масса (по данным MALDI спектра) и установлены частичные последовательности аминокислот QTOF-MS/MS фрагментацией (для биоцидного белка дыни) и деградацией по Эдману (для биоцидного белка инжира). Определены изоэлектрические точки и принадлежность к известным классам белков с помощью средств биоинформатики. Показана фунгицидность белка инжирного дерева по отношению к возбудителям вилта хлопчатника. Показана инсектотоксичность биоцидного белка дыни по отношению к личинкам озимой совки, хлопковой совки и колорадского жука.

При выделении биоцидного тионина из сухих семян дыни методами протеомики показано, что фракция тионинов при традиционно применяемых методах содержит существенные примеси фрагментов запасных белков, часть которых имеет биоцидные активности.

При изучении повилики - высшего паразитического растения показано, что растения наряду с биоцидными дефенсинами, тионинами содержат другие биоцидные вещества, имеющие подобные активности и способные экранировать биологическую активность белков при тестировании в процессе выделения. Так, повилика содержит гликозиды с цитотоксической активностью в культуре раковых клеток.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Разработаны методы выделения, очистки и биотестирования биоцидных белков, применяемые к сухим семенам и различным тканям растений, изучены физико-химические характеристики и ценные для сельскохозяйственной биотехнологии биологические активности. Показано отсутствие токсичности для животных. Изученные белки имеют значение для получения трансгенных растений, устойчивых к болезням и вредителям.

Реализация результатов. Результаты работы будут применены в перспективных исследованиях по получению трансгенного хлопчатника, устойчивого к актуальным для Узбекистана патогенам и вредителям. Материалы используются при чтении лекций в международном тренинг центре при Институте генетики и ЭБР АН РУз по геномике растений.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на: международной научной конференции «Влияние физико-химических факторов на метаболические процессы в организме» (Андижан, 1997), международном симпозиуме по биотехнологии, коммерциализации и

безопасности (Ташкент, 2003), международной научной конференции «Химия и применение природных и синтетических биологически активных соединений» (Алматы, 2004), научной конференции молодых ученых, посвященной памяти академика С.Ю.Юнусова (Ташкент, 2005), международной конференции «Современные проблемы биохимии и эндокринологии» (Ташкент, 2006), международной научно-практической конференции «Перспективы физико-химической биологии и биотехнологии» (Андижан, 2007) и научной конференции Самаркандского отделения АН РУз «Актуальные проблемы естественных наук» (Самарканд, 2008).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликованы 2 статьи и 7 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 101 страницах, состоит из введения, обзора литературы (глава I), результатов и их обсуждений (глава II), экспериментальной части (глава III), заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 228 источников. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 8 таблицами.

Автор благодарит акад. РАН А.И.Мирошникову, докт.хим.наук В.А.Олейникову и канд. хим. наук И.В.Назимову (Институт биоорг. химии, РАН, г. Москва) за помощь по секвенированию и снятию MALDI спектров, профессора G.C.Sharma (Аграрный университет Алабамы, США) и господина M.Kirk (Университет Алабамы в Бирмингемме, США) за помощь в проведении протеомных экспериментов, канд.мед.наук Н.Н.Кузнецову (Институт биоорг. химии АН РУз) за определение цитотоксичности, а также Л.А.Ларину и канд.биол.наук В.А.Хохлачеву за предоставление тест-насекомых и штаммов тест-грибов (Институт генетики и ЭБР АН РУз).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы обобщены сведения по структурно-функциональным свойствам дефенсинов и тионинов, описано их строение и биологические функции, обсуждены данные по механизмам биологической активности растительных биоцидных белков. Обоснован поиск этих белков из выбранных источников.

В обсуждении полученных результатов приведены собственные результаты по выделению, очистке и характеристике фунгицидного белка из флоэмной жидкости инжирного дерева, тионина из семян и проростков дыни, а также сопутствующих этому тионину белков. Также приведены данные по гликозидам повилики, которые сопутствуют биоцидным белкам и имеют подобные активности.

В экспериментальной части приведено детальное описание методов, использованных при выполнении работы. Семена дыни (*Cucumis melo L.*) сорта Зар-Гулоби приобретены на местном рынке. Млечный сок (латекс) инжирного дерева (*Ficus carica L.*) собирали в ранние утренние часы в начале плодоношения дерева. Повилику (*Cuscuta*), собирали в фазе цветения.

Антигрибную активность фракций белков определяли по отношению к фитопатогенным штаммам грибов – возбудителей вилта хлопчатника *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum*. Инсектотоксичность фракций белков определяли по отношению к гусеницам (во втором ювенильном возрасте) озимой совки (*Scotia segetum*), хлопковой совки (*Heliothis armigera*) и колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*). Цитотоксическую активность фракций определяли в культуре клеток меланомы мышей (по степени подавления включения ³H–тимидина в ДНК). Острую токсичность белков определяли на белых беспородных мышах.

Количественное определение белка проводили твердофазным методом Бредфорда, стандарт - бычий сывороточный альбумин. Аминокислотный анализ белка проводили с помощью ВЭЖХ предколоночного фенилтиокарбамоильного производного белкового гидролизата на хроматографе System Gold (Beckman, США).

MALDI-TOF масс-спектры белков получали на приборе VISION 2000 (Termo Bioanalysis, США), матрица - синаповая кислота. N-концевую аминокислотную последовательность белка определяли с помощью автоматической деградации в секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США).

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad, США) используя гели, содержащие иммобилизованные амфолины ReadyStrip IPG (Bio-Rad, США), с диапазоном pH 3/10. Второе направление электрофореза проводили в денатурирующем полиакриламидном геле, в присутствии ДДС-Na, на приборе Dodeca Cell (Bio-Rad, США) в гелях (0.15x20x20 см) с градиентом концентрации T=7.5-18%, C=3.1%.

Тандемный масс-спектральный анализ белка из куска двумерного геля проводили с помощью Q-TOF2 масс-спектрометра (Micromass, Англия), спектры обрабатывали программой MassLynx MaxEnt3.

Поиск аналогов последовательностям изучаемых белков проводили с использованием программы BLAST по базе данных сервера <http://www.expasy.org>, сравнение последовательности исследуемого белка со структурой выявленных ортологов - с помощью программы ClustalX.

Результаты исследований и их обсуждение

Выделение и очистка хитин-связывающего противогрибного белка из латекса инжирного дерева

Особенность биологических функций латекса инжирного дерева (смесь флоэмной и ксилемной жидкостей) позволяет предполагать наличие различных типов протеаз и определяет необходимость применения эффективного ингибитора протеолитических ферментов. С целью полного предотвращения протеолиза и выделения интактного белка, мы использовали как агент, осаждающий и обратимо денатурирующий все белки, трихлоруксусную кислоту (ТХУК). Для этого, раневой латекс собирали прямо в раствор ТХУК, который предотвращал протеолиз и одновременно

осаждал белки. ТХУК – осажденные белки после удаления из фракции остатка кислоты высушивали и хранили для дальнейших экспериментов. Сумму белка из этого сухого экстракта по мере необходимости экстрагировали 50 мМ уксусной кислотой и экстракт подвергали аффинной хроматографии на колонке с хитином.

Хитин-связывающие белки занимают важное место среды защитных белков. Высокое сродство этих белков к хитиновому остову в растущих вегетативных телах грибов обуславливает их фунгицидную способность. Аффинная хроматография растворимых в 50 мМ уксусной кислоте белков латекса на колонке с хитином дала примерно 25 кратную очистку и увеличение биологической активности (табл.1). Дальнейшее разделение фракции хитин - связывающих белков с целью выделения катионных белков с помощью SP-сефадекса, как мы ожидали, также привело к увеличению антигрибной активности. Известно, что наибольшая часть описанных в литературе антимикробных белков являются катионными.

Для выделения гомогенного антигрибного белка и его структурной характеристики фракцию катионных белков разделяли с помощью обращенно – фазной ВЭЖХ. Как видно из рис.1, антигрибную активность проявляют фракции, соответствующие сильно гидрофобным пикам. Количество антигрибных фракций из пиков со временами удерживания 12,9 и 14,9 мин было недостаточным для дальнейшей химической характеристики. Фракция, элюируемая в пике с Rt 17,1 мин (выход 0,15%), была выбрана для структурно – функциональных характеристик (табл. 1).

Таблица 1

Выход белков во фракциях латекса инжирного дерева

Фракция	Белок, мг	Противогрибная активность*
Экстракт сухого латекса в 50 мМ уксусной кислоте	1000,000	+
Элюат хитиновой колонки 0,5 М уксусной кислотой	41,225	++
Катионные белки, элюированные из SP-sephadex C-50	21,450	+++
ВЭЖХ- пик с Rt 17,1 мин	1,450	++++

*Подавление роста гриба *F.oxisporium* при дозе 20 мкг/диск: (+) – до 0,5 см; (++) - до 1,0 см; (+++) – до 2,0 см и (++++) – более 2,0 см вокруг диска.

Как показал полиакриламидный электрофорез, пик с Rt 17,1 мин представлен полипептидом с молекулярной массой 7-9 кДа (рис.2). Точная молекулярная масса белка, определенная с помощью масс-спектрометрии с лазерной ионизацией (MALDI-TOF), оказалась равной 6481,3 (рис.3).

Биологическая активность хитин-связывающего белка инжира

Противогрибная активность фракций противогрибного белка

контролировалась по подавлению роста двух грибов – возбудителей вилта хлопчатника, из них испытанный штамм *F.oxisporum* проявлял большую чувствительность (рис.4). Минимальная доза гомогенного белка в диске, которая показывает достоверное подавление роста на газоне гриба - 20 мкг.

Спектрофотометрическое определение противогрибной активности белковых фракций по задержке роста в суспензионной культуре тест – гриба показали аналогичный результат.

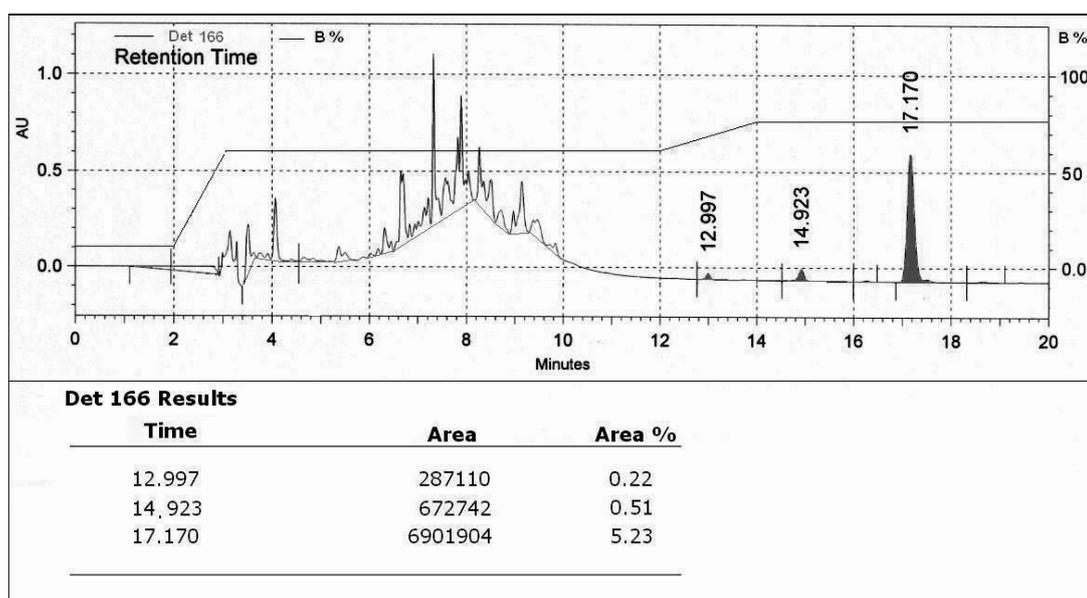


Рис.1. ВЭЖХ хитин-связывающей фракции на обращенно-фазной колонке. Пики с противогрибной активностью окрашены

Противогрибная активность изучаемого белка находится в сравнимых значениях с активностью описанных в литературе фунгицидных белков.

Выделенный гомогенный противогрибной белок не показал острую токсичность на мышах при внутривенном введении до дозы 50 мг/кг и при внутрибрюшинном введении до 100 мг/кг (максимально примененные дозы). Указанные дозы в 5 и 10 раз соответственно превышают концентрацию, при которой проявляется антигрибная активность. Следовательно, это позволяет считать испытуемый противогрибной белок нетоксичным для животных.

Структурная характеристика хитин-связывающего белка инжира

Принадлежность противогрибного белка к известным антибиотическим белкам определяли на основе его N-концевого секвенирования. 7 аминоконцевых остатков: RPDFFLE показывают, что белок не относится к растительным тионинам и дефенсинам, для которых характерна N-концевая структура: K(R)XССК(R)... или K(R)XСК(R)..., где остатки цистеина в положении 3 и 4 (тионины) и 3 (дефенсины) являются фиксированными. В нашем случае, в фрагменте из 7 остатков цистеин не обнаружен.

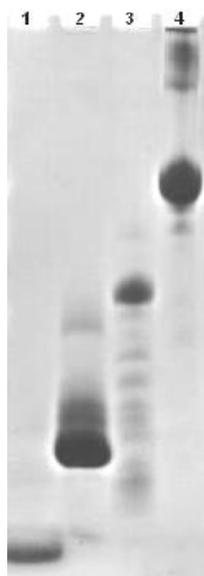


Рис. 2. Электрофорез противогрибного белка в 12%-ном ПАГ: 1- фракция, соответствующая пику Rt 17.1 мин (рис.1); 2- цитохром С (12,4 кДа); 3- ДНКаза I (31 кДа) и 4- альбумин человека (68 кДа)

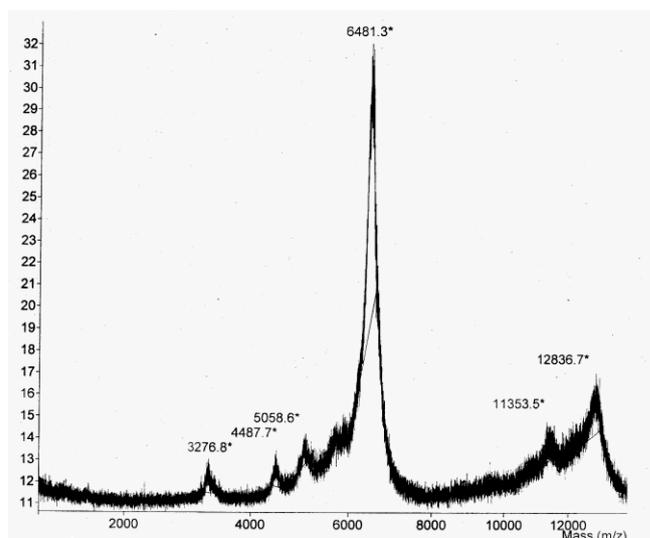


Рис. 3. MALDI-TOF спектр противогрибного белка

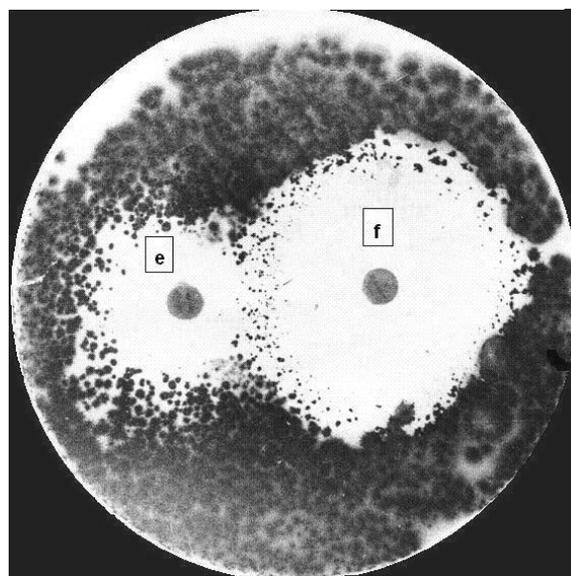
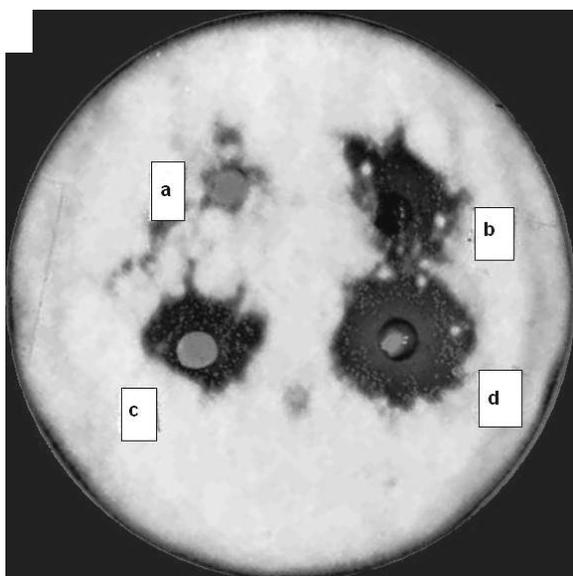


Рис.4. Подавление роста грибов-возбудителей вилта хлопчатника – *V.dahliae* («а»-5 мкг, «б»-10 мкг, «с»-20 мкг, «д»-50 мкг) и *F.oxisporum* («е»-20 мкг и «ф»-50 мкг) гомогенным противогрибным белком (фракция ВЭЖХ с временем удерживания 17.1 мин, по рис.1)

Поиск соответствия по базе данных показал аналогию со следующими гипотетическими предшественниками белков: «Hhal_2123» из *Halorhodospira halophila* (номер в базе данных [A1WYX5](#), 54% идентичности); «HIPL2» из *Arabidopsis thaliana* (номер в базе данных [Q94F08](#), 65% идентичности); «USP-A» - универсальным стрессовым белком «А» из *Arabidopsis thaliana* (номер в базе данных 2GM3A, 84% идентичности). На рис.5 показано сравнение секвенированного участка противогрибного белка с вышеприведенными структурами. Особого внимания заслуживает соответствие с доменом в «универсальном стрессовом белке», структура которого консервативна от бактерий до растений.

Противогрибная активность выделенного белка может быть объяснена его хитин-связывающей способностью. В то же время, сравнение структуры секвенированного фрагмента со структурами известных хитин-связывающих белков, например с наиболее изученным гевеином, не показал аналогии.

FLAFP	1	RPDFFLE	-----	7
A1WYX5	40	RPDFFLE	GFTMVDFDEQQRR	60
Q8LGG8	124	RPDFF	LVVGSRGLGRFQKVFVG	144
94F08	467	RPDYFL	CADVKGKDTYEEVDII	487

Рис. 5. Сравнение частичной аминокислотной последовательности противогрибного белка (FLAFP) с аналогами, найденными по базе данных. Слева и справа от последовательностей - номера остатков, соответственно N- и C- концов сравниваемых участков, идентичные остатки помещены в рамку

Выделение и очистка инсектотоксического белка из проростков дыни

Тонко измельченные гипокотили экстрагировали 0,1М уксусной кислотой, осветляли центрифугированием (10000g, 10 мин) и фракционировали согласно схеме: удаление крупных белков высаливанием при 50%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; осаждение тионина при 90%-ном насыщении соли; диализ и катионообменная хроматография на SP-сефадексе; ВЭЖХ катионной фракции. Так как данный поиск проводили с целью выделения инсектотоксического белка, при всех этапах контролировали инсектотоксичность фракций на личинках озимой совки (табл.2).

Как видно из рис.6, белок с инсектицидной активностью выходит в более гидрофобной фракции при ВЭЖХ (окрашенный пик). Эта фракция имела высокую токсичность при испытании на личинках озимой совки: при добавлении в корм минимальная концентрация, приводящая к гибели половины насекомых, была 0,01% (табл.2).

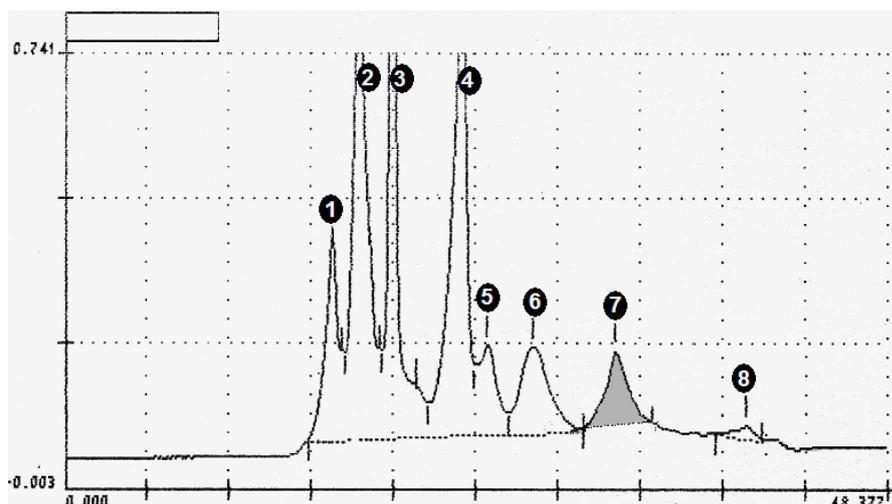


Рис.6. ВЭЖХ суммы катионных белков проростков дыни на обращенно-фазной колонке. Пик инсектицидного белка окрашен

Таблица 2

Выход белков и инсектотоксичность во фракциях проростков дыни

Фракция	Белок, мг	Токсичность*/ (% гибели личинок)
Экстракт гипокотилей	1650,0	5/(30)
Высаливание 90% (NH ₄) ₂ SO ₄	540,0	1/(50)
Сумма катионных белков	235,0	0,2/(50)
ВЭЖХ – 6	17,5	5/(10)
ВЭЖХ – 7	10,7	0,01/(50)
ВЭЖХ – 8	2,5	5/(10)

*Концентрация фракции белка (%) в корме, приводящая к гибели личинок озимой совки (*S.segetum*), процент гибели личинок указан в скобках.

Биологическая активность белка из проростков дыни

Инсектицидность фракций белка испытана после тщательного удаления возможных примесей токсических реагентов. Белок добавляли в искусственный агаризованный корм (агар-0,8% в картофельно-машевом отваре) для выращивания гусениц тест-насекомых.

Инсектицидность определяли также, путем микроинъекций в тело гусениц (белок в стерильной апиrogenной воде вводили под эпидермис гусениц с помощью шприцов типа Hamilton) до 1 мкл на одну гусеницу. Учет летальности проводили четыре раза в день в течение 5 дней. Как видно из табл. 3 и 4, гомогенный белок имеет высокую токсичность для гусениц испытываемых насекомых. Так, при добавлении в искусственный корм минимальная концентрация белка в корме, приводящая к гибели половины насекомых, была равна 0,01 – 0,02%, а при микроинъекции в тело личинок минимальная доза, приводящая к гибели насекомого, равна 10-20 мкг.

Возможная токсичность фракции белка на белых беспородных мышах со средней массой 20 г. испытана путем однократной, внутривентриальной инъекции или per os. Учет летальности проводили ежедневно в течение 30 дней. При подборе дозы для мышей ориентировались на данные по инсектицидности на личинках тест насекомых (летальная доза 10 мкг/личинку соответствует, с учетом средней массы личинок, 50 мкг/г). Токсичность на мышах была испытана при 10 и 100 кратных летальных дозах, определенных на личинках насекомых:

10 кратная доза – 10 мг/мышь = 0,5 г/кг;

100 кратная доза – 100 мг/мышь = 5,0 г/кг.

Как показали опыты, независимо от способа введения в организм (внутрибрюшинная инъекция или через рот) инсектицидный белок не обладает острой токсичностью на мышах.

Таблица 3

Токсичность белка из проростков дыни при добавлении в искусственный корм

Фракции	Токсичность*		
	<i>H.armigera</i>	<i>S.segetum</i>	<i>L.decemlineata</i>
Сумма белков	0,050	0,050	0,050
Гомогенный белок	0,010	0,010	0,020

*концентрация (%) в корме, приводящая к гибели 50% насекомых.

Таблица 4

Токсичность белка из проростков дыни при микроинъекции

Фракции	Токсичность**		
	<i>H.armigera</i>	<i>S.segetum</i>	<i>L.decemlineata</i>
Сумма белков	50	50	50
Гомогенный белок	10	10	20

**доза (мкг) на одну личинку, приводящая к гибели 100% насекомых

Химическая характеристика инсектотоксического белка из дыни

Точная молекулярная масса изучаемого белка по данным MALDI масспектрометрии оказалась равной 7597,2 Да (рис. 7). Аминокислотный состав выделенного вышеописанным способом гомогенного белка, как приведен в табл. 5, показал, что изучаемый белок является тритионином, содержащим 6 остатков цистеина в молекуле белка, образующих 3 дисульфидных мостика.

Заслуживает внимания также содержание остатков основных аминокислот – аргинина и лизина, соответственно 5 и 6 остатков. Эти данные согласуются с литературными данными по аминокислотному составу растительных тионинов. Еще одной особенностью аминокислотного состава тионина дыни является наличие триптофана (1 остаток), что характерно для

тионина 2.1 арабидопсиса. В то же время тетраioniны однодольных не содержат триптофан.

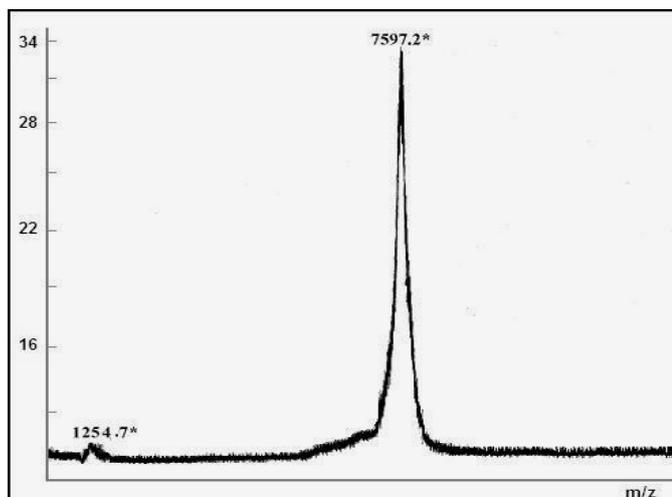


Рис. 7. MALDI-TOF спектр инсектицидного белка дыни

Таблица 5

Аминокислотный состав инсектицидного белка дыни

Амино-кислота	Моль %	Остатки	Амино-кислота	Моль %	Остатки
Cys-OH	8,99-9,35	6	Arg	7,28 - 7,95	5
Asx*	6,10 – 6,49	4	Tyr	5,58 - 6,09	4
Glx*	6,75 – 7,05	5	Val	4,10 - 4,38	3
Ser	4,13 – 4,45	3	Met	1,67 - 2,01	1
Gly	8,68 – 9,01	6	Ile	7,84 - 8,60	5
Thr	4,45 - 4,96	3	Leu	8,75 - 9,25	6
Ala	4,35 - 5,03	3	Phe	2,10 - 2,75	2
Pro	4,22 - 4,57	3	Trp**	1,75 - 2,01	1
His	1,19 - 1,47	1	Lys	8,97 - 9,28	6

*Asx = Asp + Asn; Glx = Glu + Gln; **Trp рассчитан по данным щелочного гидролиза;

Так как однозначная идентификация белка возможна только по последовательности аминокислот, в дальнейшем предприняли попытку секвенирования инсектотоксического белка проростков дыни с использованием средств протеомики.

Изучение биоцидных белков проростков и сухих семян дыни методами протеомики

Как показал двумерный электрофорез, главными сопутствующими полипептидами экстракта проростков дыни являются низкомолекулярные полипептиды с pI 4-6, поэтому с целью эффективного обогащения фракции тионином, имеющим катионный характер, использовали ионообменную

хроматографию на SP-сефадексе. Двумерный электрофорез фракции катионных белков, полученный данным методом, представлен на рис.8А.

Идентификация средствами протеомики белковых пятен, соответствующих низкомолекулярным белкам (табл.6), показала, что они соответствуют фрагментам более крупных белков, вероятно образованных в результате действия эндопротеаз. В двумерной электрофореграмме ВЭЖХ – гомогенного тионина также наблюдаются отдельные слабые пятна (1-5%) с кислыми значениями рI на уровне той же молекулярной массы, что и сам тионин (рис.8Б). Это объясняется образованием окисленных по остатку Cys или Met молекулярных форм тионина, которые имеют кислые значения рI.

Семена растений привлекательны для исследователей при поиске физиологически активных белков/пептидов как источник, наиболее богатый белками. В литературе имеется много данных по выделению тионинов и дефенсинов из семян различных растений. По нашим данным фракция катионных, низкомолекулярных белков из семян дыни в зоне вероятного нахождения тионинов (рН 8,0 – 9,5 и Mr 5-10 кДа) наблюдается группа из нескольких пятен (рис. 8А).

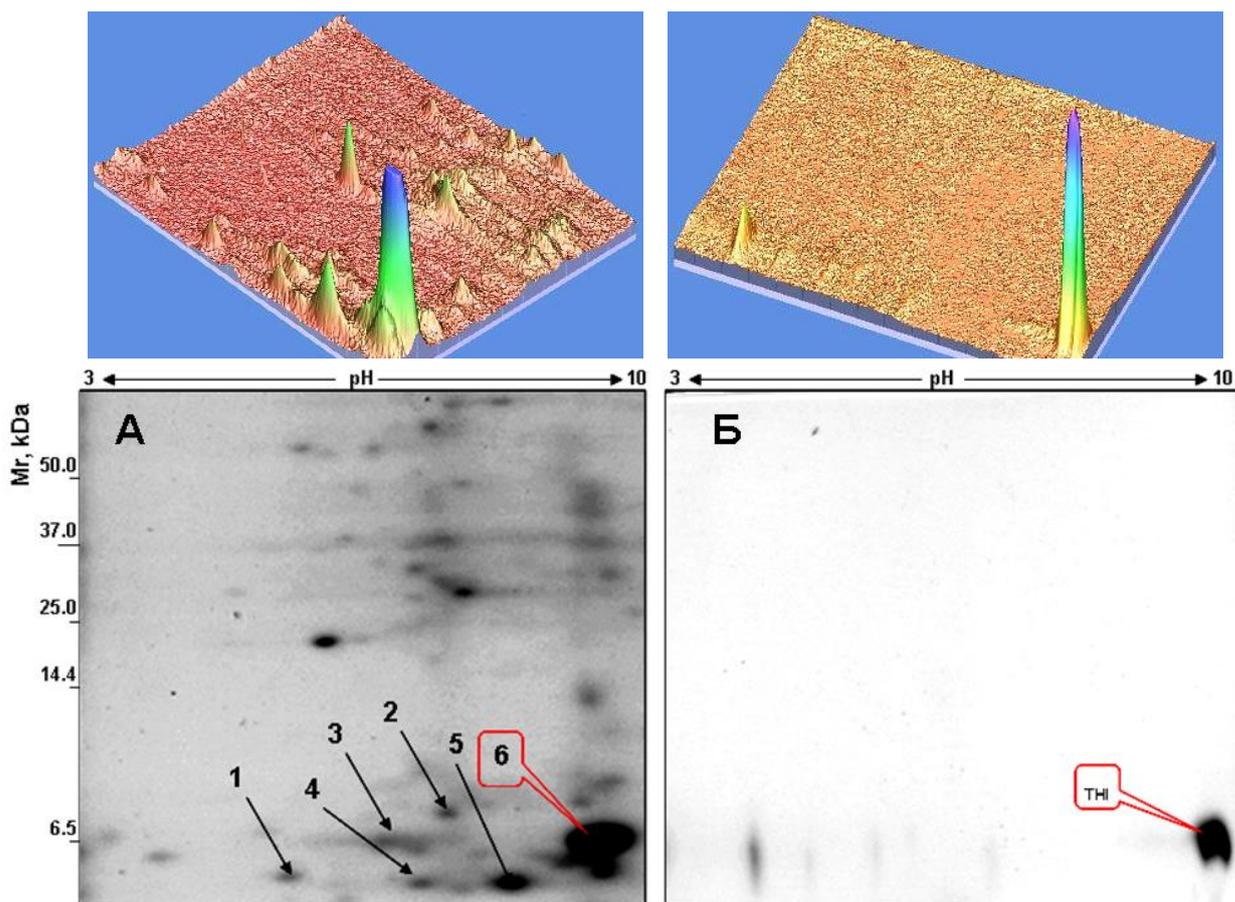


Рис. 8. Двумерный электрофорез катионной фракции экстракта проростков дыни (А) и гомогенного инсектотоксического белка (Б). В верхней части - трехмерное изображение соответствующих гелей

Таблица 6

Q-TOF-MS/MS секвенирование белков, сопутствующих тионину проростков дыни из двумерного геля и их идентификация (по рис.8)

№	Последовательность фрагментов	Инвентарный номер в базе данных и название белка	Mr, kDa	pI	Значение “e”, Идентичность (%)
1	LSYGSLSDVSGLQVK; LFAWLPLTGMR	AF326781 актин; фактор конденсации хромосом.	5,5	5,8	3e-06 (90)
2	LLEEEFNTECTSK; PDEFIMFQR; ESIR;	Q9CAU0 Сериновая карбоксипептидаза.	8,0	7,7	6e-04 (91)
3	VPTVDVSVVDLTVR; AGIALNDNFVK	Q9SSU3-1 Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа.	7,0	6,9	8e-06 (93)
4	VPTVDVSVVDLTVR; LSQMPSVSFTLGDR; AGIALNDNFVK;	Q9SSU3-1 Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа.	5,0	7,3	4e-10 (91)
5	VEEEEEGGEIVFGGVDFK; PVWYNMVEQGLVK; EQVFIEATR	Q94IA2 Аспарагиновая протеиназа сои.	5,0	8,5	1e-06 (94)
6	CMVVTGCQNSDTCR; ICCPNQAR; NGQSVCR;	Q42596 Тионин 2.1 арабидопсиса	7,0	9,4	1e-04 (90)

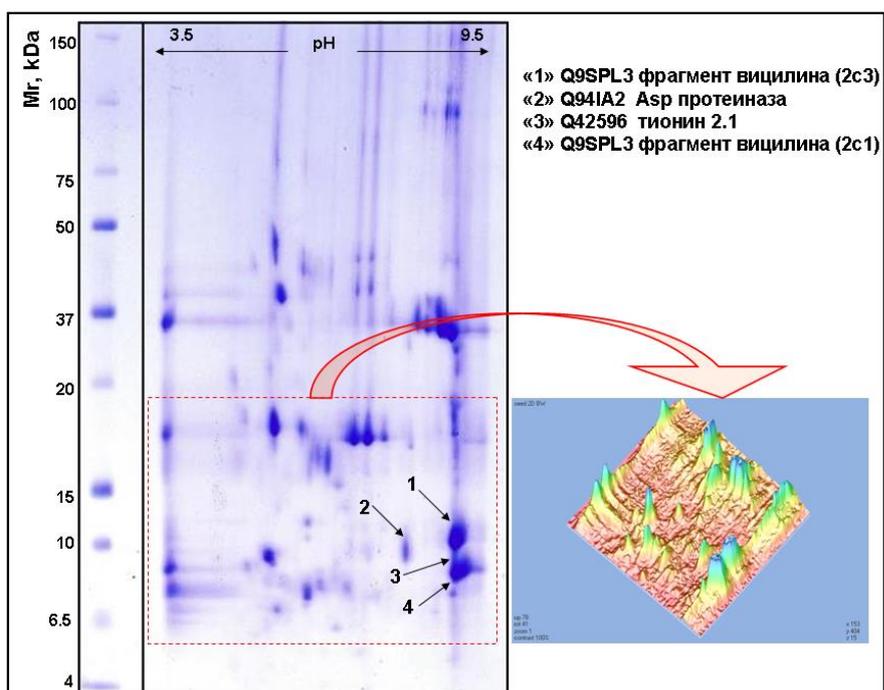


Рис.9. Двумерный электрофорез уксуснокислого экстракта сухих семян дыни, справа - трехмерное изображение для выделенной части геля

Последующая идентификация белков из этих пятен средствами протеомики (рис.9) показала, что наиболее близко расположенные к тионину сопутствующие полипептиды представлены фрагментами запасного белка – вицилина из семян ореха Макадамии, которые имеют антимикробную

активность, богаты Cys, и только данные по структуре позволят дифференцировать их с тионинами и дефенсинами (табл.7).

Таблица 7.

Масс-спектральное секвенирование белков сухих семян дыни из двумерного геля и их идентификация (по рис.9).

№	Последовательность фрагментов	Инвентарный номер в базе данных и название белка	Mr, kDa	pI	Значение “e”, Идентичность (%)
1	LSYGSLSDVSGLQVK; LFAWLPLTGMR	Q9SPL3 антимикробный пептидный фрагмент вицилина ореха	9,8	9,3	3e-06 90
2	LLEEEFNCTSK; PDEFIMFQR;	Q9CAU0 Сериновая карбоксипептидаза	8,2	7,9	6e-04 (91)
3	CMVVTGCQNSDTCR; ICCPNQAR; NGQSVCR;	Q42596 Тионин 2.1 Арабидопсис	7,5	9,4	1e-04 90
4	LSYGSLSDVSGLQVK; LFAWLPLTGMR	Q9SPL3 антимикробный фрагмент вицилина ореха	6,8	9,2	3e-06 90

Изучение биоцидных растительных веществ небелковой природы, сопутствующих биоцидным белкам

При поиске высокоактивных биоцидных белков надежным источником является объект с уже описанным подобным свойством. Повилика (*Cuscuta*) – паразитическое растение, известна в народной медицине как противоопухолевое средство. Испытание экстрактов повилики трех распространенных в Узбекистане видов: *Cuscuta europea*, *Cuscuta lupuliformis* и *Cuscuta attenuate*, показала, что они имеют цитотоксическую активность в культуре раковых клеток КМЛ (меланома мышей). Как показали испытания, цитотоксические компоненты лучше экстрагируются полярными растворителями. Хроматографическое фракционирование (табл.8) активных компонентов дали положительные результаты с применением гидрофобных носителей – фенил сефарозы и обращено-фазного силикагеля (C₁₈-Ultrasphere). Компоненты, полученные с помощью препаративной высоко эффективной хроматографией (фракции «ВЭЖХ 1 – 3»), имели высокую цитотоксичность. Выходы данных фракций из сырой массы повилики составляли соответственно 0,04, 0,12 и 0,18%.

Характеристика полученных хроматографически гомогенных фракций показала, что фракции ВЭЖХ 1,2 и 3 представлены компонентами с молекулярными массами соответственно 304; 469 и 645 (MALDI-TOF). Как видно из табл. 8, цитотоксичность тионина была ниже, чем у фракций гликозидов и активность белка и гликозидов не проявляют синергизма. Тем не менее, более высокая удельная активность гликозидов требует особого внимания при оценке результатов тестирования биоцидных белков.

Ингибирование синтеза ДНК компонентами экстракта *S. europa* в культуре раковых клеток

Фракция	Доза, мкг/мл	Включение ¹⁴ C-тимидина, имп/мин	Ингибирование синтеза ДНК*, %
Экстракт (50% этанол)	100	19700 ± 1200	41,7
Элюат фенол-сефарозы	100	4500 ± 800	86,7
ВЭЖХ-1	100	14300 ± 1000	57,7
ВЭЖХ-2	100	4050 ± 800	88,0
ВЭЖХ-3	100	3450 ± 600	89,8
Катионные белки**	100	26400 ± 2000	21,9
Смесь ВЭЖХ-3 с катионными белками 1:10	100	23500 ± 2000	30,5
Смесь ВЭЖХ-3 с катионными белками 1:1	100	5250 ± 1000	84,5
Карбоплатин (позитивный контроль)	30	17100 ± 1000	49,4
Контроль (без испытуемого вещества)	0	33800 ± 2500	0

*подавление включения ³H-тимидина в ДНК, % относительно контроля по формуле: $100 - [(включение\ метки\ с\ образцом / включение\ в\ контроле) \times 100\%]$

**фракция получена аналогично тионину проростков дыни.

ВЫВОДЫ:

1. Впервые из флоэмной жидкости (латекса) инжирного дерева выделен фунгицидный белок с молекулярной массой 6481 Да, подавляющий рост грибов возбудителей вилта хлопчатника. На основании частичной аминокислотной последовательности с помощью средств протеомики белок отнесен к PR-4 белкам.
2. Впервые из проростков и семян дыни выделен инсектотоксический белок с молекулярной массой 7597 Да, который эффективно подавляет рост личинок озимой и хлопковой совок, а также колорадского жука. QTOF-MS/MS секвенированием и с помощью средств протеомики белок отнесен к тритионам.
3. Показано, что семена дыни, наряду с тионином, содержат биоцидные фрагменты запасного белка вицилина с близкими к тионину молекулярными массами и изоэлектрическими точками.
4. Показано, что повилика наряду с тионином содержит биоцидные гликозиды с большей активностью, чем тионин, что требует тщательной очистки фракций при оценке биологической активности биоцидных белков.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Мавлонов Г.Т., Рахманов М.И., Абидова М.Х., **Убайдуллаева Х.А.**, Бабаева Д.А., Абдукаримов А.А. Влияние физико-химических факторов на метаболические процессы в организме // Материалы международной конференции. 2-часть. - Андижан, 1997. -С. 157-158.
2. Mavlonov G.T., Abdurakhmonov I.Y., Rakhmanov M.I., **Ubaydullaeva Kh.A.**, Kuznetsova N.N., Abdukarimov A. Biocidal Protein and Peptides: Their Study and Their Significance For Plant Genetic Engineering // International Workshop on Biotechnology Commercialization and Security. 2003. October 14-17. -С. 19.
3. Мавлонов Г.Т., **Убайдуллаева Х.А.**, Кузнецова Н.Н., Садилов А.А., Абдукаримов А. Исследование антираковых компонентов повилики-*Cuscuta L* // Химия и применение природных и синтетически активных соединений. Труды международной научной конференции. -Алматы, 2004. -С. 201-203.
4. **Убайдуллаева Х.А.**, Якубов Д.И., Мавлонов Г.Т. Оптимизация биотестов и фракционирования антимикробных белков растений и насекомых // академик С.Ю.Юнусов хотирасига бағишланган ёш олимлар илмий анжумани. -Ташкент, 2005. -С. 48.
5. Мавлонов Г.Т., **Убайдуллаева Х.А.**, Абдурахмонов И.Ю., Абдукаримов А. Применение методов протеомики для идентификации и количественной оценки защитных белков растений // Материалы научно-практической конференции «Современные проблемы биохимии и эндокринологии» . -Ташкент, 2006. -С. 166.
6. Мавлонов Г.Т., **Убайдуллаева Х.А.**, Абдурахмонов И.Ю., Абдукаримов А. Экспрессия белков растений под воздействием различных элиситоров // Материалы научно-практической конференции «Физикавий-кимёвий биология ва биотехнологиянинг истиқболлари». - Андижон, 2007. -С. 93-94.
7. Мавлонов Г.Т., **Убайдуллаева Х.А.**, Рахманов М.И., Абдурахмонов И.Ю., Абдукаримов А. Хитин-связывающий противогрибный белок из млечного сока *Ficus carica* // Химия природных соединений. 2008. - №2.- С. 171-173.
8. Мавлонов Г.Т., **Убайдуллаева Х.А.**, Кадряева Г.В., Кузнецова Н.Н. Цитотоксические компоненты *Cuscuta* // Химия природных соединений. 2008. -№3.-С. 327-328.
9. **Убайдуллаева Х.А.**, Абдурахмонов И.Ю., Мавлонов Г.Т. Идентификация низкомолекулярных белков семян дыни методами протеомики // Сборник материалов Республиканской научно-практической конференции молодых ученых «Табиий фанларнинг долзарб муаммолари».-Самарқанд, 2008. -С. 151.

РЕЗЮМЕ

диссертации Убайдуллаевой Хуршиды Абдуллаевны на тему «**Выделение и структурно-функциональная характеристика биоцидных белков из семян дыни и инжирного дерева**», на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Ключевые слова: Биоцидные белки, дефенсины, тионины, протеомика.

Объекты исследования: Семена и проростки дыни, латекс инжирного дерева, повилика.

Цель работы: выделение и характеристика структуры и биологической активности белков, имеющих антимикробную, инсектицидную активность из дыни и инжирного дерева, а также изучение их потенциальной ценности в биотехнологии хлопчатника и других сельскохозяйственных растений.

Методы исследования: ионообменная и гидрофобная хроматография, ВЭЖХ, секвенирование по Эдману, двумерный электрофорез, MALDI-TOF, Q-TOF MS/MS секвенирование из геля, идентификация белка средствами биоинформатики, определение: антигрибной активности, цитотоксичности в культуре раковых клеток и токсичности на мышах.

Полученные результаты и их новизна: из семян и проростков дыни выделен белок с молекулярной массой 7597 Да, который отнесен к тритионинам, а из латекса инжирного дерева - белок с молекулярной массой 6481 Да, являющийся PR-белком. Показана фунгицидность PR-белка инжира по отношению к грибам – возбудителям вилта хлопчатника (*F.oxysporium*, *V.dahliae*) и инсектотоксичность тионина дыни по отношению к личинкам озимой совки (*Scotia segetum*), хлопковой совки (*Heliotis armigera*) и колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*).

Показано, что фракции тионинов сопутствуют существенные примеси фрагментов запасных белков, часть которых имеет биоцидные активности.

Показано, что растения наряду с биоцидными дефенсинами и тионинами содержат другие вещества, имеющие подобные биоцидные активности и способные экранировать биологическую активность белков при тестировании и в процессе выделения. В частности, повилика содержит гликозиды с цитотоксической активностью в культуре раковых клеток.

Практическая значимость: разработаны методы выделения, очистки и биотестирования биоцидных белков, изучены их физико-химические характеристики и ценные для сельскохозяйственной биотехнологии биологические активности. Показано отсутствие токсичности для животных. Изученные белки имеют значение для получения трансгенных растений, устойчивых к болезням и вредителям.

Степень внедрения и экономическая эффективность: результаты рекомендованы как исходные данные при получении трансгенного, патоген- и вредитель- устойчивого хлопчатника.

Область применения: сельскохозяйственная биотехнология, геномика и протеомика, биоорганическая химия, учебный процесс.

Кимё фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевнанинг 02.00.10 - Биоорганик кимё ихтисослиги бўйича «**Қовун уруғи ва анжир дарахтидан биоцид оксилларни ажратиш ва уларнинг структура - функционал тавсифи**» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: Биоцид оксиллар, дефенсинлар, тионинлар, протеомика.

Тадқиқот объектлари: Қовун уруғи ва ниҳол-ўсимтаси, анжир дарахтининг латекси, зарпечак (*Cuscuta L.*).

Ишнинг мақсади: антимикроб, инсектицид фаолликка эга ўсимлик оксилларини ажратиш, ҳамда уларнинг ғўза ва бошқа қишлоқ хўжалик ўсимликлари биотехнологияси мақсадлари учун аҳамиятини ўрганиш.

Тадқиқот методлари: ион алмашиниш ва гидрофоб хроматография, ЮССХ, Эдман усулида кетма-кетликни аниқлаш, икки ўлчамли электрофорез, MALDI-TOF, Q-TOF MS/MS орқали гелдан оксилни секвенслаш, оксилларни биоинформатика ёрдамида идентификациялаш, фунгицид фаолликни, рақ хужайраларида цитозаҳарлиликни ва сичконларда заҳарлиликни аниқлаш.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: қовун уруғи ва ниҳол-ўсимтасидан тритионинлар гуруҳига мансуб молекуляр оғирлиги 7597 Да ва анжир дарахти латексидан PR-гуруҳига мансуб 6481 Да молекуляр оғирликка эга оксил ажратиб олинди. Анжирнинг PR-оксили ғўза вилти кўзгатувчилари *F.oxysporium* ва *V.dahliae* замбуруғларига қарши фунгицид фаолликка эгаллиги ҳамда қовун тионини кузги тунлам (*Scotia segetum*), ғўза кўсаги қурти (*Heliotis armigera*) ва колорадо кўнғизи (*Leptinotarsa decemlineata*) личинкаларига қарши инсектотоксик хусусиятга эгаллиги кўрсатилди. Қовун тионини фракцияси уруғ заҳира оксилларининг бир нечта фрагментлари билан аралашгани ва улар ҳам биоцид фаолликка эгаллиги кўрсатилди.

Ўсимликлар дефенсин ва тионинлар қаторида биоцид фаолликка эга бошқа моддалар ҳам тутиши, улар оксилларни ажратиш жараёнида биотестлар натижаларига таъсир қилиши, шу ўринда, зарпечак мисолида, рақ хужайраларига цитотоксик таъсир қиладиган гликозидлар тионинларнинг ушбу фаоллигини экранлаштириши мумкинлиги кўрсатилди.

Амалий аҳамияти: биоцид оксилларни ажратиш ва тозалаш методлари ишлаб чиқилди, уларнинг физик-кимёвий тавсифи ва қишлоқ хўжалиги биотехнологияси учун аҳамияти ўрганилди. Ҳайвонлар учун заҳарли эмаслиги кўрсатилди. Ўрганилган оксиллар зараркунандаларга ва касалликларга чидамли трансген ўсимликлар олишда муҳим аҳамиятга эга.

Тадбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: натижалар зараркунандаларга ва патогенларга чидамли трансген ғўза ўсимлиги олиш жараёни учун дастлабки маълумот сифатида тавсия қилинди.

Кўлланиш соҳаси: қишлоқ хўжалиги биотехнологияси, геномика ва протеомика, биоорганик кимё, ўқув жараёни.

RESUME

The thesis of Hurshida Abdullaevna Ubaydullaeva on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in chemistry on specialty 02.0010 – Bioorganic chemistry subject: “**Isolation and structural-functional characterization of biocidal proteins from melon seed and fig tree**”.

Key words: Biocidal proteins, defensins, thionins, proteomics.

Subjects of research: melon seeds and seedlings, fig latex and dodder (*Cuscuta* L.).

Purpose of work: Isolation, structural-functional characterization of antimicrobial and insecticidal proteins, having potential importance for the biotechnology of cotton and the other agricultural crops.

Methods of research: ion exchange and hydrophobic chromatography, HPLC, partial N-terminal sequencing, 1D and 2D PAGE, MALDI-TOF, Q-TOF MS/MS sequencing from 2D gels, protein identification using bioinformatics tools, determination of a fungicidal activity, cytotoxicity in cancer cell culture and in mice.

The results obtained and their novelty: A 7597 Da protein, classified as tri-thionin, was isolated from dry seeds and seedlings of melon, while 6481 Da protein, classified as PR-protein, was isolated from the latex of fig tree. A fungicidal activity of a PR-protein of isolated from the latex of fig tree against cotton wilt pathogens (*F. oxysporium*, *V.dahliae*) and a toxicity of melon thionin against plant pest larvae (*Scotia segetum*, *Heliotis armigera*, *Leptinotarsa decemlineata*) were determined. It is determined that a thionin fraction from the melon seeds has contained considerable amount of seed storage protein fragments, which some of them have biocidal activity. In addition to thionins and defensins plants contain other biocidal substances which could overlap with biological activity of proteins during the isolation and functional testing processes. In particular, dodder consists glycosides with cytotoxic activity in the cancer cell culture.

Practical value: The methods of isolation, purification and functional testing of biocidal proteins were developed, physical and chemical characteristics of plant biocidal proteins and their properties of biological importance in agricultural biotechnology were studied. The absence of toxicity for animals demonstrate their potential significance for future development of disease- and pest – resistant transgenic plants.

Degree of embed and economical effectivity: results recommended as an initial data for obtaining transgenic pathogen- and pest-resistant cotton.

Field of application: agricultural biotechnology, genomics and proteomics, bioorganic chemistry, educational process.