

ГЕВЕИНОПОДОБНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ РАСТЕНИЙ

©2017 г.

А. А. СЛАВОХОТОВА^{1, 2},
А. А. ШЕЛЕНКОВ², Я. А. АНДРЕЕВ^{1, 3},
Т. И. ОДИНЦОВА²

¹*Институт биоорганической химии им. Академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

²*Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН*

³*Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Институт
молекулярной медицины*

I. Введение. II. Общая характеристика гевеиноподобных пептидов. III. Гевеин: свойства, структура и функции. IV. Гевеин как аллерген при латексно-фруктовом синдроме. V. Другие гевеиноподобные пептиды с 8 остатками цистеина. VI. Гевеиноподобные пептиды с 6 остатками цистеина. VII. Гевеиноподобные пептиды с 10 остатками цистеина. VIII. Механизм действия гевеиноподобных пептидов. IX. Применение гевеиноподобных пептидов в биотехнологии и медицине. X. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всего жизненного цикла растения подвергаются атаке микроорганизмов и вредителей. В результате длительного эволюционного процесса растения выработали целый арсенал средств защиты, входящих в систему врожденного иммунитета. Важнейшими компонентами «химической» защиты являются вторичные метаболиты, а также антимикробные белки и пептиды. В последнее время защитным (антимикробным) пептидам уделяется большое внимание. К антимикробным пептидам (АМП) относят короткие полипептиды, которые образуются в клетках живых организмов постоянно

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды, а.о. – аминокислотный остаток.

Адрес для корреспонденции: annslav82@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект 16-15-00167, Т.И. Одинцова благодарит за поддержку Российский фонд фундаментальных исследований, грант №15-29-02480.

или в ответ на атаку патогенов. Они встречаются у всех организмов, не только растений, но также у животных и микроорганизмов. АМП являются компонентами врожденного иммунитета, одного из древнейших механизмов устойчивости, обеспечивающего быструю и не требующую значительных энергетических затрат «первую линию обороны». Несмотря на то, что АМП сильно различаются по структуре, можно выделить ряд общих свойств, характерных для всех АМП. К ним относятся, прежде всего, небольшая молекулярная масса (до 10 кДа), наличие антимикробной активности, а также положительный заряд молекулы и амфифильность ее структуры, что, наряду с другими перечисленными выше особенностями, позволяет пептидам взаимодействовать с мембранами патогенов. Подавляющее большинство АМП, выделенных из растений, являются цистеин-богатыми и содержат от 2 до 12 остатков цистеина, образующих дисульфидные связи, что способствует компактности их структуры, а также устойчивости к химическому и протеолитическому расщеплению. О роли АМП в устойчивости свидетельствуют многочисленные работы, показывающие, что трансгенные растения, экспрессирующие гены АМП, становятся более устойчивыми к фитопатогенам, и также в самом растении в ответ на биотический и абиотический стресс наблюдается усиление экспрессии генов, кодирующих АМП. Интересно, что АМП были найдены во всех органах растений [1], причем те из них, которые экспрессируются в растениях конститутивно, как правило, встречаются в периферических слоях клеток, покрывающим поверхность органа. Анализ транскриптомных и геномных данных свидетельствует о том, что в растениях присутствуют сотни АМП-подобных последовательностей, однако, экспрессия их генов и синтез функциональных АМП подтверждены лишь для отдельных пептидов [2–4].

Следует отметить, что возросший интерес к растительным АМП связан с их уникальными свойствами и, прежде всего, с механизмом их действия. Считается, что основной мишенью АМП является цитоплазматическая мембрана микроорганизмов, целостность которой нарушают растительные пептиды. Поэтому, в отличие от традиционных антибиотиков, вызывающих образование устойчивых форм патогенов, выработка устойчивости к АМП сводит их к минимуму. Также к достоинствам АМП можно отнести широкий спектр действия и способность быстро убивать клетки-мишени. Все перечисленное делает АМП очень перспективным объектом для исследования и практического использования при создании устойчивых форм сельскохозяйственных растений и разработки лекарственных препаратов нового поколения [5–7].

Растительные АМП представляют собой чрезвычайно гетерогенные по структуре молекулы, которые в зависимости от сходства аминокислотных последовательностей, пространственной структуры, а также количества и расположения остатков цистеина в молекуле (так называемого «цистеинового мотива») принято классифицировать по семействам. В настоящее время выделяют следующие семейства АМП растений: дефензины, тионины, липид-переносящие белки, альфа-гарпинины, гевеиноподобные пептиды, снакины, ноттины и циклотиды [8]. Данный обзор посвящен интенсивно изучаемому в последнее время семейству гевеиноподобных пептидов.

II. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕВЕИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Семейство гевеиноподобных АМП получило свое название от гевеина, выделенного из млечного сока гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis* Moll. Arg.). В настоящее время это немногочисленное семейство насчитывает около 20 представителей, которые были выделены из различных однодольных и двудольных растений (табл.). Гевеиноподобные АМП имеют ряд особенностей: прежде всего, это короткие основные пептиды длиной 29–45 аминокислотных остатков (а.о.), которые обогащены остатками цистеина и глицина. Классические гевеиноподобные АМП, включая сам гевеин, имеют 8 остатков цистеина, но существует немало форм, содержащих 6 или 10 цистеинов. Шесть из этих остатков занимают в молекуле пептида достаточно консервативное положение и образуют цистеиновый мотив, который можно выразить следующей формулой: $C^1X_{4-5}C^2X_4C^3C^4X_5C^5X_6C^6$, где С – цистеин, а Х – любой а.о. кроме цистеина. При этом замыкание дисульфидных связей происходит между следующими остатками цистеина: C^1-C^4 , C^2-C^5 , C^3-C^6 .

Основной особенностью всех гевеиноподобных пептидов является присутствие в их структуре консервативного хитин-связывающего сайта, имеющего аминокислотную последовательность SXFGY/SXYGY, где Х – остаток любой аминокислоты. Хитин-связывающий сайт характерен не только для гевеиноподобных АМП, но и для других белков, способных связывать хитин, который представляет собой полимер N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), а также родственные ему соединения, содержащие GlcNAc или N-ацетилнейраминовую кислоту (NeuNAc) [9]. Хитин входит в состав клеточной стенки патогенов растений – грибов, насекомых и нематод, но он отсутствует у самих растений [8]. Считается, что

Таблица. Антимикробная активность гевениноподобных пептидов

Название пептида (номер в базе данных Uniprot)	Растение, из которого был выделен пептид	Патогены, на которые действует пептид
1	2	3
Гевенино-подобные пептиды с 8 остатками цистеина		
Гевенин (P02877)	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Botrytis cinerea</i> (IC ₅₀ = 500 мкг/мл), <i>Fusarium culmorum</i> (IC ₅₀ = 600 мкг/мл), <i>Fusarium oxysporum</i> (IC ₅₀ = 1250 мкг/мл), <i>Phycometes blakesleeana</i> (IC ₅₀ = 300 мкг/мл), <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (IC ₅₀ = 350 мкг/мл), <i>Pyricularia oryzae</i> (IC ₅₀ = 500 мкг/мл), <i>Septoria nodorum</i> (IC ₅₀ = 500 мкг/мл), <i>Trichoderma hamatum</i> (IC ₅₀ = 90 мкг/мл).
Pn-AMP1 (P81591)	<i>Pharbitis nil</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (IC ₅₀ = 38 мкг/мл), <i>B. cinerea</i> (IC ₅₀ = 16 мкг/мл), <i>Colletotrichum langenarium</i> (IC ₅₀ = 10 мкг/мл), <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (IC ₅₀ = 11 мкг/мл), <i>Fusarium oxysporum</i> (IC ₅₀ = 10 мкг/мл), <i>Rhizoctonia solani</i> (IC ₅₀ = 26 мкг/мл), <i>Phytophthora capsici</i> (IC ₅₀ = 5 мкг/мл), <i>Phytophthora parasitica</i> (IC ₅₀ = 3 мкг/мл), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IC ₅₀ = 14 мкг/мл).
Pn-AMP2	<i>P. nil</i>	<i>B. subtilis</i> (IC ₅₀ = 20 мкг/мл), <i>B. cinerea</i> (IC ₅₀ = 2 мкг/мл), <i>C. langenarium</i> (IC ₅₀ = 4 мкг/мл), <i>S. sclerotiorum</i> (IC ₅₀ = 3 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ = 2,5 мкг/мл), <i>R. solani</i> (IC ₅₀ = 75 мкг/мл), <i>P. capsici</i> (IC ₅₀ = 0,6 мкг/мл), <i>P. parasitica</i> (IC ₅₀ = 2 мкг/мл), <i>Pythium spp.</i> (IC ₅₀ = 2,5 мкг/мл), <i>S. cerevisiae</i> (IC ₅₀ = 8 мкг/мл).
Fa-AMP1 (P0DKH7)	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> (IC ₅₀ = 14 мкг/мл), <i>Curtobacterium accumfaciens</i> (IC ₅₀ = 13 мкг/мл), <i>Erwinia carotovora</i> (IC ₅₀ = 11 мкг/мл), <i>Agrobacterium radiobacter</i> (IC ₅₀ = 24 мкг/мл), <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (IC ₅₀ = 20 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ = 19 мкг/мл), <i>Geotrichum candidum</i> (IC ₅₀ = 36 мкг/мл).
Fa-AMP2 (P0DKH8)	<i>F. esculentum</i>	<i>Cl. michiganensis</i> (IC ₅₀ = 17 мкг/мл), <i>C. accumfaciens</i> (IC ₅₀ = 15 мкг/мл), <i>E. carotovora</i> (IC ₅₀ = 15 мкг/мл), <i>A. radiobacter</i> (IC ₅₀ = 17 мкг/мл), <i>A. rhizogenes</i> (IC ₅₀ = 24 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ = 29 мкг/мл), <i>G. candidum</i> (IC ₅₀ = 25 мкг/мл).
Продолжение табл. см. на сл. стр.		

Продолжение табл.

1	2	3
Гевеино-подобные пептиды с 6 остатками цистеина		
Ac-AMP1 (Q9S8Z6), Ac-AMP2 (Q9S8Z7)	<i>Amaranthus caudatus</i>	Грибы: <i>Alternaria brassicola</i> ($IC_{50} = 7$ мкг/мл), <i>Ascochyta pisi</i> ($IC_{50} = 8$ мкг/мл), <i>B. cinerea</i> ($IC_{50} = 10$ мкг/мл), <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ($IC_{50} = 8$ мкг/мл), <i>F. culmorum</i> ($IC_{50} = 2$ мкг/мл), <i>Trichoderma hamatum</i> ($IC_{50} = 7$ мкг/мл), <i>Verticillium dahliae</i> ($IC_{50} = 6$ мкг/мл). Грамположительные бактерии: <i>Bacillus megaterium</i> ($IC_{50} = 40$ мкг/мл), <i>Sarcina lutea</i> ($IC_{50} = 250$ мкг/мл).
Ay-AMP	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>Trichoderma</i> sp. ($IC_{50} = 0,24$ мкг/мл), <i>C. albicans</i> ($IC_{50} = 0,33$ мкг/мл), <i>G. candidum</i> ($IC_{50} = 0,61$ мкг/мл), <i>A. candidus</i> ($IC_{50} = 1,27$ мкг/мл), <i>A. alternate</i> ($IC_{50} = 2,26$ мкг/мл), <i>P. chrysogenum</i> ($IC_{50} = 2,66$ мкг/мл), <i>A. schraceus</i> ($IC_{50} = 7,87$ мкг/мл), <i>F. solani</i> ($IC_{50} = 11,88$ мкг/мл).
Ag-AMP (Q5I2B2)	<i>A. retroflexus</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Helminthosporium sativum</i> , <i>A. consorsiale</i> . Индуцирует морфологические изменения у <i>F. culmorum</i> , <i>H. sativum</i> , <i>R. solani</i> .
IWF4	<i>Beta vulgaris</i>	Ингибирующая активность против роста спор <i>C. beticola</i> .
GAFF	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>P. sasakii</i> , <i>A. alternata</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> .
aSG1-3, aSR1-3	<i>Alternanthera sessilis</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> .
AMP-1.1a (2KUS.A), AMP-1.2a (CBJ21248.1), AMP-2.1 (CBJ21249.1), AMP-2.2a (CBJ21249.1)	<i>Stellaria media</i>	<i>A. solani</i> , <i>A. consorsiale</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>B. sorokiniana</i> , <i>R. solani</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>T. basicola</i> .
SmAMP3 (COHU5.1)	<i>S. media</i>	<i>A. niger</i> ($IC_{50} = 5,4$ мкМ), <i>B. sorokiniana</i> ($IC_{50} = 2,0$ мкМ), <i>B. cinerea</i> ($IC_{50} = 1,6$ мкМ), <i>F. solani</i> ($IC_{50} = 3,7$ мкМ) и <i>A. alternata</i> ($IC_{50} = 5,0$ мкМ).
Окончание табл. см. на сл. стр.		

Окончание табл.

1	2	3
Гевинно-подобные пептиды с 10 остатками цистеина		
EAFP1 (P83596)	<i>Eucommia ulmoides</i>	<i>A. lycopersici</i> (IC ₅₀ =155мкг/мл), <i>F. moniliforme</i> (IC ₅₀ =56мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ =46мкг/мл), <i>C. gossypii</i> (IC ₅₀ =55мкг/мл).
EAFP2	<i>E. ulmoides</i>	<i>A. lycopersici</i> (IC ₅₀ =109 мкг/мл), <i>F. moniliforme</i> (IC ₅₀ =18 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ =94 мкг/мл), <i>C. gossypii</i> (IC ₅₀ =56 мкг/мл).
Ее-CBP (Q7Y238)	<i>Euphymus europaeus</i>	<i>A. brassicicola</i> (IC ₅₀ =0,6 мкгМ), <i>B. cinerea</i> (IC ₅₀ =0,2 мкгМ), <i>F. culmorum</i> (IC ₅₀ =0,6 мкгМ), <i>F. oxysporum f.sp. cubense</i> (IC ₅₀ =3 мкгМ), <i>F. oxysporum f.sp. matthiola</i> (IC ₅₀ =1 мкгМ), <i>M. eumysae</i> (IC ₅₀ =1,2 мкгМ), <i>N. crassa</i> (IC ₅₀ =0,4 мкгМ), <i>P. exigua</i> (IC ₅₀ =6,6 мкгМ), <i>P. cryptogea</i> (IC ₅₀ =5 мкгМ), <i>P. ultimum</i> (IC ₅₀ =6,6 мкгМ), <i>R. solani</i> (IC ₅₀ =5 мкгМ), <i>T. hamatum</i> (IC ₅₀ =20 мкгМ).
WAMP (P85966)	<i>Triticum kiharae</i>	<i>B. sorokiniana</i> (IC ₅₀ =5 мкг/мл), <i>B. cinerea</i> (IC ₅₀ =20 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ =5 мкг/мл), <i>F. solani</i> (IC ₅₀ =5 мкг/мл), <i>F. verticillioideis</i> (IC ₅₀ =30 мкг/мл), <i>N. crassa</i> (IC ₅₀ =10 мкг/мл).
LAMP	<i>Leymus arenarius</i>	<i>B. sorokiniana</i> (IC ₅₀ =4,6 мкг/мл), <i>F. oxysporum</i> (IC ₅₀ =2,7 мкг/мл).

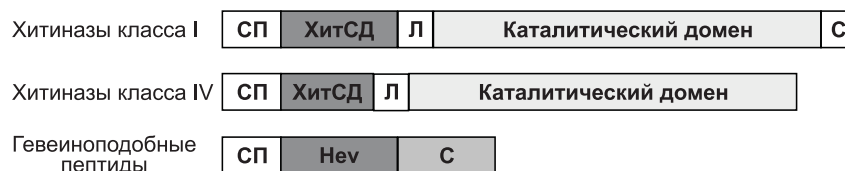


Рис. 1. Особенности строения предшественников гевеиноподобных АМП и хитиназ класса I и IV.

СП – N-концевой сигнальный пептид, ХитСД – хитинсвязывающий домен, Hev – зрелый гевеиноподобный пептид, Л – линкерная или «шарнирная» область, С – С-концевой продомен.

хитин-связывающие белки участвуют в защите растений от действия различных патогенов, содержащих хитин [1]. К хитин-связывающим белкам растений относят также лектины, хитиназы классов I и IV, а также несколько белков, индуцируемых поранением [9]. Во всех этих белках присутствует, по меньшей мере, один хитин-связывающий домен, состоящий из 30–43 а.о. и содержащий сайт из консервативных остатков аминокислот, указанный выше. Из перечисленных хитин-связывающих белков наибольшее сходство с гевеиноподобными АМП имеют хитиназы класса I и IV, представляющие собой мономерные ферменты с молекулярной массой 25–35 кДа [1] и действующие как эндохитиназы, образуя хитоолигосахариды с различной степенью полимеризации. Помимо хитин-связывающего домена, предшественники этих хитиназ содержат N-концевой гидрофобный сигнальный пептид, «шарнирную» (линкерную) область, богатую пролином, и каталитический домен. Особенности строения предшественников гевеиноподобных АМП и хитиназ класса I и IV показаны на рис. 1. Интересно, что при удалении хитин-связывающего домена сохраняется антифунгальная и каталитическая активности хитиназы класса I, но при этом они намного ниже, чем у интактного фермента [10]. Следовательно, хитин-связывающий домен не является абсолютно необходимым для подавления роста гриба, но, по-видимому, обеспечивает эффективное взаимодействие между ферментом и субстратом.

Таким образом, основными структурными характеристиками, на основании которых пептид может быть отнесен к семейству гевеиноподобных АМП, являются небольшой размер (29–45 а.о.), положительный заряд молекулы, обогащенность остатками глицина и цистеина (6, 8 или 10), наличие характерного цистеинового мотива и хитин-связывающего сайта.

III. ГЕВЕИН: СВОЙСТВА, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

Гевеин был впервые описан еще в 1960 г. [11]. Этот короткий цистеин-богатый пептид был отнесен к основным компонентам вакуолярных структур (так называемых «лутоидов») млечного сока гевеи (*Hevea brasiliensis*) семейства Молочайные (*Euphorbiaceae*). Уже в 1975 г. была установлена аминокислотная последовательность гевеина [12], которая неожиданно оказалась очень сходной с хитин-связывающим агглютинином (UDA) крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) [13, 14]. Известно, что UDA накапливается в больших количествах в подземных органах крапивы и ингибирует *in vitro* рост многих грибов, содержащих хитин [15]. Оказалось, что гевеин имел ряд особенностей, сходных с UDA. Подобно хитин-связывающему домену UDA, гевеин содержал 8 остатков цистеина, образующих характерный цистеиновый мотив (рис. 2А), был способен специфично связываться с хитином, а также обладал антифунгальной активностью *in vitro* против ряда хитин-содержащих фитопатогенных грибов [16]. Антифунгальная активность гевеина сохранялась даже после воздействия высоких температур (90°C в течение 10 мин). Однако в отличие от лектинов гевеин не проявлял агглютинирующих свойств [16]. Гевеин ингибировал рост гиф, однако его активность была низкой по сравнению с другими известными гевеиноподобными пептидами (табл.).

В 1990 г. была установлена структура кДНК, кодирующей гевеин [17]. Оказалось, что предшественником гевеина являлся достаточно протяженный белок (210 а.о.), состоящий из сигнального пептида (17 а.о.), собственно гевеина (43 а.о.), линкера (6 а.о.) и С-концевого домена (144 а.о.; рис. 2Б). С помощью системы трансляции *in vitro* и экспериментов по транслокации доменов гевеина в составе гибридного белка было доказано, что N-концевой пептид действительно представляет собой сигнальный пептид и отвечает за транспорт прогевеина в шероховатый эндоплазматический ретикулум [18]. После этого сигнальный пептид отщепляется, а оставшийся предшественник подвергается дальнейшему процессингу, в ходе которого отщепляются 6 а.о. между зрелым гевеином и С-концевым доменом [18]. С помощью масс-спектрометрии были обнаружены минорные компоненты, содержащие на С-конце гевеина один или два дополнительных а.о. Это свидетельствовало о том, что процессинг, скорее всего, включает отщепление N-концевой области С-концевого домена, а затем происходит отщепление 4–6 а.о. от С-конца зрелого гевеина [19].

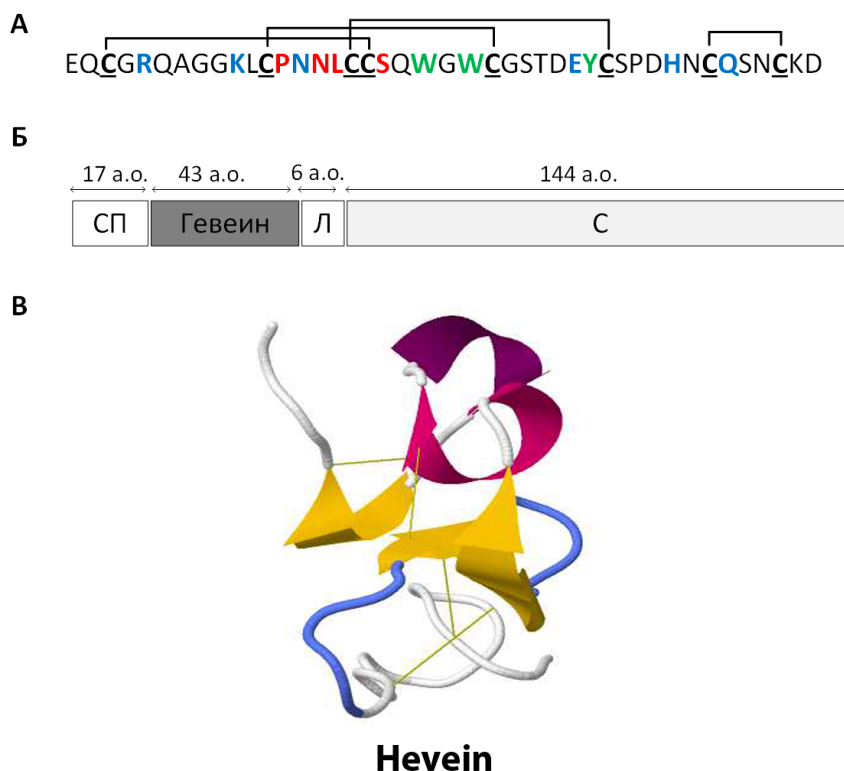


Рис. 2. Первичная (А) и пространственная (В; 1HEV в базе данных PDB) структура гевеина и его предшественника (Б); остатки цистеина выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты, дисульфидные связи, показаны черными линиями, а.о. Ser-19 и петля (13–16 а.о.), играющие ключевую роль в связывании гевеина с олигосахаридами, – красным цветом, а.о. Arg-5, Lys-10, Asn-14, Glu-29, His-35 и Gln-38, участвующие во взаимодействии с иммуноглобулином Е, – синим, а а.о. Trp-21, Trp-23, Tyr-30, важные для взаимодействия и с олигосахарами, и с иммуноглобулином Е, – зеленым; Гевеин – зрелый пептид гевеина.

Интересно, что кДНК, кодирующая С-концевой домен гевеина, имела высокое сходство с кДНК генов белков картофеля WIN1, WIN2, индуцируемых поранением. Поранение растения и обработка фитогормонами (этиленом и абсцизовой кислотой) индуцировало накопление транскриптов гевеина в листьях, стеблях и млечном соке, но не в корнях [17]. В связи с этим необходимо упомянуть об исходной функции гевеина в самом растении гевеи. Было обнаружено, что гевеин специфически взаимодействует с гликопротеиновыми рецепторами

на поверхности каучуковых частиц, что вызывает сближение частиц и коагуляцию латекса [20]. Коагуляция необходима для «пломбирования» пореза в стволе каучукового дерева, возникающего вследствие естественного поранения или сделанного специально для получения латекса. В результате образовавшаяся рана быстро затягивается и, соответственно, устраняется возможность попадания и распространения патогенных микроорганизмов по растению. Таким образом, гевеин, вызывая описанный каскад реакций, активно участвует в защите тканей ствола каучукового дерева [20].

В 2005 году было обнаружено 5 новых генов, кодирующих предшественники гевеина [21]. Эти гены были высоко консервативными в транскрибируемых областях и различались лишь промоторными последовательностями. Оказалось, что хотя все обнаруженные промоторы и были функциональными, лишь самый длинный из них обеспечивал высокий уровень экспрессии гетерологичной вставки в различных тканях трансгенного риса. Было установлено, что при механическом повреждении и грибной инфекции этот промотор вызывал усиленную экспрессию трансгена [21].

Пространственная структура гевеина была определена методами ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и рентгеноструктурного анализа [22, 23]. Оба метода показали, что гевеин содержит характерный структурный мотив, включающий альфа спираль – $\beta 1 - 2$ - альфа спираль – $\beta 3$, при этом центральный β -лист с анти-параллельными β -цепями окружен двумя малыми спиралями, которые стабилизированы дисульфидными мостиками (рис. 2В). С помощью различных методов, включающих ЯМР, молекулярное моделирование и изотермическую титрационную калориметрию, изучалось взаимодействие гевеина с сахарами [24-26]. В результате было установлено, что Trp-21, Trp-23, Tyr-30, Ser-19 и а.о. с 13 по 16 играют ключевую роль в связывании гевеина с олигосахаридами [24, 27]. Более того, было показано, что минимальное число мономерных звеньев полимера $(\text{GlcNAc})_n$, с которыми может связываться гевеин в соотношении 1:1, равно 2. При увеличении числа мономеров до 5 или 8 соотношение гевеин/олигосахарид в растворе становится равным 2:1 [24]. Интересно, что при существенном укорачивании молекулы гевеина и замене одного из ключевых остатков Ser-19 на Asp сохранялась способность связываться с олигомерами, однако константа связывания существенно уменьшается [28].

IV. ГЕВЕИН КАК АЛЛЕРГЕН ПРИ ЛАТЕКСНО-ФРУКТОВОМ СИНДРОМЕ

При обзоре работ, посвященных гевеину, нельзя не затронуть значительное количество исследований, связанных со способностью данного пептида вызывать аллергию. Как было отмечено выше, гевеин входит в состав натурального латекса, представляющего собой концентрированный и стабилизированный млечный сок гевеи бразильской. Природный латекс широко применяется при получении натуральных каучуков, а также для изготовления различных латексных изделий. Первые случаи аллергии на латекс были описаны еще в 1927 г., однако начиная с 80-х г.г. наблюдался резкий подъем частоты встречаемости данного типа аллергии, прежде всего, у медицинских работников, пользующихся перчатками из латекса [29]. К 2002 г. доля медицинского персонала, подверженного данной аллергии, достигла 36% [30], но к 2008 г. в развитых странах этот показатель несколько снизился благодаря использованию перчаток с низким содержанием аллергенов [31]. Однако в группе риска все еще находятся больные (дети и взрослые) с различными заболеваниями, для лечения которых необходимы частые повторные хирургические вмешательства, а также использование катетеров, дренажных трубок и других приспособлений, содержащих латекс [31]. Интересно, что у 30–50% лиц, страдающих латексной аллергией, обнаруживаются также аллергические реакции на определенные растительные продукты, главным образом, на свежие фрукты (бананы, авокадо, орехи, киви и др.), вследствие этого данный вид аллергии был назван латексно-фруктовым синдромом [31]. Было установлено, что при латексно-фруктовом синдроме основными аллергенами являются гевеин и его белок-предшественник (прогевеин), поскольку они вызывают аллергию у 70% пациентов [32, 33]. Перекрестную аллергическую реакцию между латексом и некоторыми фруктами вызывают эндохитиназы класса I, а точнее, наличие у них хитинсвязывающего домена, последовательность которого гомологична последовательности гевеина [34]. Всего насчитывается около 12 белков-аллергенов, вызывающих латексно-фруктовый синдром [35], среди которых эндо- β -1,3-глюканаза [36], профилин [37], пататиноподобные белки [38], неспецифический липид-переносящий белок [39] и др.

Одним из методов борьбы с аллергией является эффективная аллерген-специфическая иммунотерапия с использованием изоформ аллергенов или модифицированных белков, обладающих пониженной способностью связываться с иммуноглобулином E (IgE) [40].

Для создания подобных соединений, имеющих к тому же минимальный риск возникновения системных побочных эффектов, необходима идентификация связанных с IgE эпитопов. При изучении линейных эпитопов гевеина в нескольких независимых работах было показано, что критичные для взаимодействия с иммуноглобулином Е области располагаются на N- и С-концах пептида [41, 42]. Также было установлено, что для связывания с IgE решающее значение имеет третичная структура аллергена, поскольку при замене в гевеине остатков Cys на Ser или Ala не происходило распознавание иммуноглобулинами Е мутантных форм пептида [43]. Были определены а.о., непосредственно участвующие во взаимодействии с IgE: Arg-5, Lys-10, Glu-29, Tyr-30, His-35, Gln-38 [44] (рис. 2А). Учитывая полученные данные, были сконструированы различные мутантные формы гевеина, в которых все или некоторые из критичных а.о. были заменены на аланин. Это существенно снизило их способность связываться с IgE, а также снизило чувствительность к ним при скарификационных тестах кожных проб [44]. К списку а.о., участвующих во взаимодействии с IgE, позже были добавлены Trp-21, Trp-23 [45] и Asn-14 [46] (рис. 2А). Дальнейшее исследование природных изоформ гевеина и мутантных форм с химически модифицированными остатками ароматических аминокислот показало, что существует несколько конформаций эпитопа гевеина, однако точный механизм распознавания гевеина иммуноглобулином Е остается до сих пор неизвестным [47]. Вместе с тем, считается, что полученные мутантные аналоги гевеина с пониженной способностью к связыванию с IgE могут быть использованы как кандидаты для использования в иммунотерапии, более того, такие соединения должны обладать пониженным риском развития системных или анафилактических побочных эффектов при лечении аллергии.

V. ДРУГИЕ ГЕВЕИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С 8 ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА

Помимо гевеина к гевеиноподобным пептидам с 8 остатками цистеина (8C-Неv-пептиды) относят молекулы, выделенные из различных растений, принадлежащих семействам Злаковые (*Poaceae*), Вьюнковые (*Convolvulaceae*) и Гречишные (*Polygonaceae*). Прежде всего, следует отметить два коротких (около 40 а.о.) антифунгальных пептида, выделенных из семян ипомеи нил (*Pharbitis nil*) семейства Вьюнковые [48]. Пептиды Pn-AMP1 и Pn-AMP2 имеют идентичную первичную структуру, за исключением наличия на С-конце молекулы

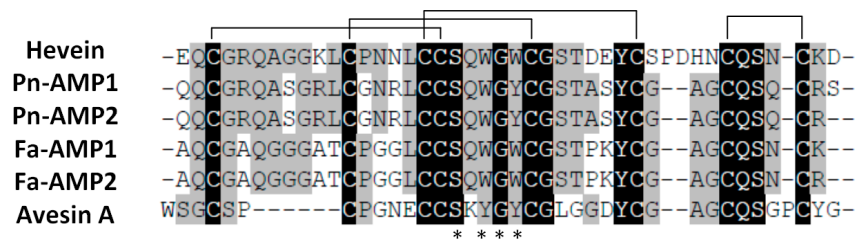


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей гевеина (Hevein, Номер в базе данных Uniprot P02877), Pn-AMP2, Pn-AMP1 (P81591), Fa-AMP1 (P0DKH7), Fa-AMP2 (P0DKH8) и Avesin A [50]; идентичные а.о. показаны белыми буквами на черном фоне, консервативные а.о. – черными буквами на сером фоне, а.о., входящие в состав хитинсвязывающего сайта, – звездочками.

Pn-AMP1 дополнительного остатка серина (рис. 3). Оба пептида обладают выраженной антифунгальной активностью по отношению к грибам, как содержащим в своей клеточной стенке хитин, так и не содержащим его. Было показано, что эти пептиды очень быстро проникали внутрь гиф грибов и сосредотачивались у септы и кончиков гиф, что вызывало деполяризацию актина и разрушение кончиков гиф, а затем последующий разрыв мембраны и нарушение целостности цитоплазмы [48]. Предшественники пептидов ипомеи содержат N-концевой сигнальный пептид, зрелый белок и C-концевой домен. Транскрипты, кодирующие Pn-AMP1 и Pn-AMP2, были обнаружены только в семенах.

Кроме пептидов из ипомеи, к 8С-Нев-пептидам относятся пептиды из гречихи (Fa-AMP1, Fa-AMP2) [49] и пептид из овса (Avesin A) [50]. Интересно, что к 2003 г. Avesin A был первым гевеиноподобным пептидом, выделенным из злаков [50]. Все перечисленные пептиды являются короткими (до 40 а.о.) и содержат, помимо 8 цистеинов, 10 остатков глицина, и так же, как и все гевеиноподобные пептиды, хитин-связывающий сайт (рис. 3). Следует отметить, что пептиды гречихи были идентичны друг другу, за исключением последнего а.о.: у пептида Fa-AMP2 присутствует замена Lys-40 → Arg-40 (рис. 3). Оба пептида в микромолярных концентрациях подавляли рост фитопатогенных грибов и действовали против грамположительных и грамотрицательных бактерий (табл.) [49].

VI. ГЕВЕИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С 6 ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА

Самыми короткими молекулами, проявляющими антифунгальную активность и способными связываться с хитином, являются 6-цистеиновые гевеиноподобные пептиды (6С-Неv-пептиды), имеющие 3 дисульфидных связи и общую длину 29–30 а.о. Подавляющее большинство 6С-Неv-пептидов было выделено из растений семейства Амарантовые (*Amaranthaceae*), однако некоторые представители были получены из растений семейства Гвоздичные (*Caryophyllaceae*). У молекул этих пептидов по сравнению с 8С-Неv-пептидами делетирована С-концевая область. Размер делеции составляет примерно 10 а.о., причем в них входят 2 остатка цистеина, которые у 8С-Неv-пептидов образуют четвертую дисульфидную связь.

Первые 6С-Неv-пептиды (Ас-АМР1, Ас-АМР2) были выделены в 1992 г. из семян амаранта хвостатого (*Amaranthus caudatus* L.) [51]. Оба этих пептида имели идентичные первичные структуры и различались только наличием у Ас-АМР2 дополнительного остатка аргинина на С-конце (рис. 4А). Было установлено, что за счет хитин-связывающего сайта эти пептиды обратимо связываются с хитином. Следует отметить, что Ас-АМР1 и Ас-АМР2 ингибировали рост фитопатогенных грибов при намного меньших действующих концентрациях (табл.), чем многие известные к тому времени антифунгальные хитин-связывающие белки. Эти пептиды ингибировали рост грамположительных бактерий, но были неактивны против грамотрицательных (табл.), а антимикробная активность этих пептидов существенно снижалась в присутствии катионов [51].

В 2007 г. из амаранта печального (*A. hypochondriacus*) был выделен пептид, идентичный Ас-АМР2, который был обозначен, как Ау-АМР [52]. На основании гипотезы монофилетического происхождения амарантов было предположено, что Ау-АМР и Ас-АМР2 обладают идентичными последовательностями вследствие доместикации амаранта гибридного (*A. hybridus*), который, возможно, является общим предком хвостатого и печального амарантов. В пользу этой гипотезы свидетельствует также тот факт, что неспецифический липид-переносящий пептид, выделенный из амаранта печального, имеет последовательность, идентичную последовательности пептида из амаранта хвостатого [52]. Ау-АМР имеет антифунгальные свойства, идентичные Ас-АМР2 (табл.), и способен связываться с хитином [52].

Еще один 6С-Неv-пептид, Аг-АМР, выделенный из амаранта запрокинутого (*A. retroflexus*), отличается от Ас-АМР2 всего тремя заменами а.о. (рис. 4А) [53]. Интересно, что этот пептид был получен

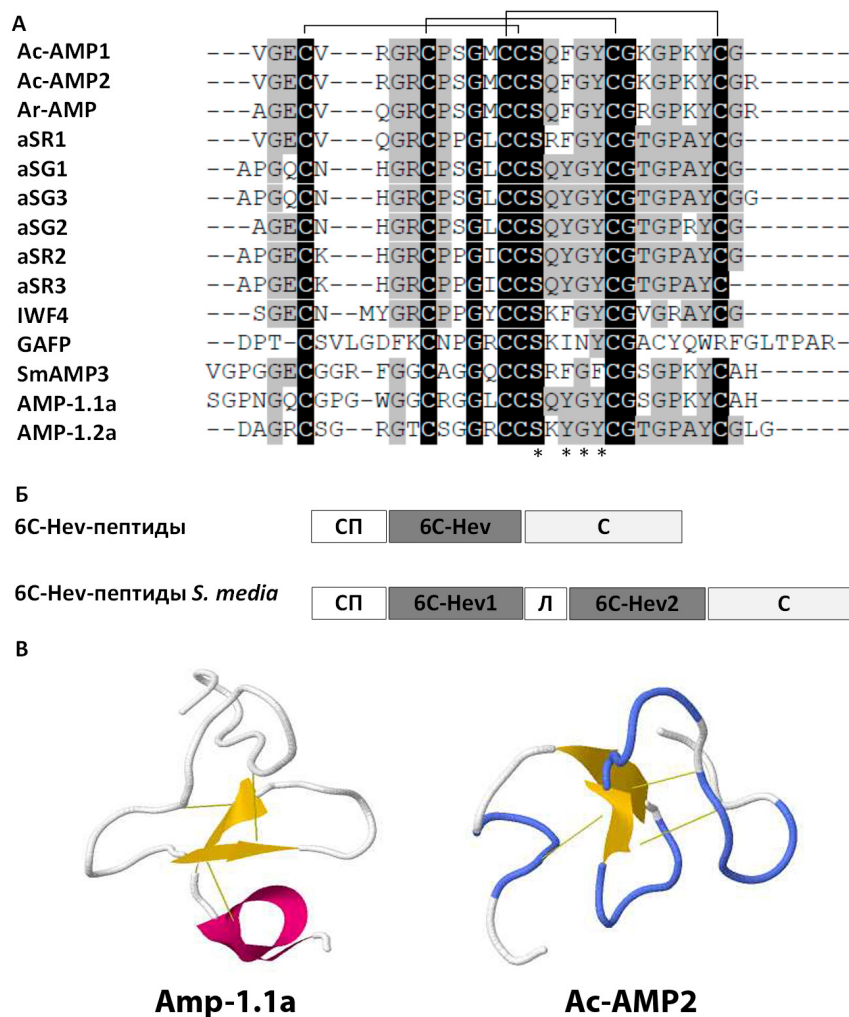


Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей (A) таких 6C-гевеиноподобных пептидов растений, как Ac-AMP1 (Q9S8Z6), Ac-AMP2 (Q9S8Z7), Ar-AMP (Q5I2B2), IWF4 [56], aSG1-3, aSR1-3 [54], AMP-1.1a (CBJ21248.1) и AMP-1.2a (CBJ21248.1), типичная структура их предшественников и сравнение ее с предшественником 6C-Hev-пептидов *S. media* (Б) и пространственная структура (В) Ac-AMP2 (1MMC) и AMP1.1a (2KUS); 6C-Hev – зрелый 6C-Hev-пептид; 6C-Hev1 – первый зрелый 6C-Hev-пептид *S. media* (AMP-1.1a); 6C-Hev2 – второй зрелый 6C-Hev-пептид *S. media* (AMP-1.2a).

из семян, потерявших всхожесть, потому что они были собраны почти за 20 лет до начала эксперимента. При этом он сохранил свою антимикробную активность по отношению к фитопатогенным грибам и грамположительным бактериям (табл.). В частности, его микромолярные концентрации ингибировали развитие на проростках ячменя гельминтоспориозной гнили, вызванной *Helminthosporium sativum*, (табл.) [53].

Из многолетнего травянистого растения альтернантеры сидячей (*Alternanthera sessilis* L.), также принадлежащей к семейству Амарантовые, были выделены 6 высоко гомологичных 6С-Нев-пептидов [54]. При сравнении с Ас-АМР1 оказалось, что эти пептиды имели сходную структуру предшественника и несколько замен (рис. 4А). Методом ЯМР была установлена пространственная структура пептида aSG1, а также было установлено, что, как и у других гевеиноподобных пептидов, ароматические а.о., входящие в состав хитин-связывающего сайта, непосредственно взаимодействовали с хитином патогенов [54].

Предшественники всех описанных 6С-Нев-пептидов имели характерные для гевеиноподобных пептидов структуры (рис. 4Б): N-концевой сигнальный пептид (около 25 а.о), собственно зрелый пептид (приблизительно 30 а.о.) и C-концевой продомен (примерно 34 а.о.). Гены 6С-пептидов различных видов амаранта обладали высоким сходством нуклеотидных последовательностей. При этом гены, кодирующие пептиды Ас-АМР1 и Ас-АМР2, были обнаружены, помимо амаранта хвостатого, также у амаранта запрокинутого [53]. Интересно, что транскрипты Ас-АМР выявлялись в развивающихся семенах, но отсутствовали в корнях, листьях и листьях под воздействием стресса [55].

В межклеточной жидкости листьев сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), также принадлежащей к семейству Амарантовые, был обнаружен еще один 6С-Нев-пептид, обозначенный как IWF4 [56]. Этот пептид имел по сравнению с Ас-АМР 10 замен а.о. (рис. 4А), обладал более высоким сродством к хитину, чем хитин-связывающие хитиназы, и эффективно ингибировал прорастание спор фитопатогенного гриба *Cecrospora beticola* (табл.). Предшественник IWF4 имел ту же структуру, что и вышеописанные 6С-пептиды, (рис. 4Б) и экспрессировался только в надземных частях растений [56].

Из листьев лекарственного растения гинкго билоба (*Ginkgo biloba*) семейства Гинкговые был выделен еще один 6С-Нев-пептид, обозначенный как GAFP [57]. Он содержал 38 а.о. и его первичная структура существенно отличалась от структуры пептидов семейства Амарантовые (рис. 4А). GAFP действовал против таких грибов, как

Pellicularia sasakii, *Alternaria alternata*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, при этом повышалась проницаемость мембран гиф, вызывая быстрое защелачивание среды.

Наконец, из листьев сорного растения звездчатки средней (*Stellaria media* L.), относящейся к семейству Гвоздичные, был выделен и охарактеризован пептид, обозначенный как Sm-AMP3 [58]. Этот 6С-Нев-пептид имел длину 35 а.о., достаточно сильно отличался от Ac-AMP1 своей аминокислотной последовательностью (рис. 4А) и обладал высокой антифунгальной активностью по отношению к ряду фитопатогенных грибов, но не бактерий (табл.). Было показано, что в условиях *in vitro* SmAMP3 был способен связывать хитин. Интересно, что данный пептид конститутивно экспрессировался во всех надземных органах и семенах звездчатки, что может свидетельствовать о его важной роли в иммунитете растения. Следует отметить, что предшественники 6С-Нев-пептидов, выделенные также из семян звездчатки средней, оказались гомологичны пептиду SmAMP3, и имели, в отличие от всех вышеописанных предшественников, модульную структуру. Так, помимо сигнального и зрелого пептидов и С-концевого продомена, характерных для данного семейства, они содержали дополнительный домен, представляющий собой еще один 6С-Нев-пептид, а также линкер, связывающий его с первым зрелым пептидом (GenBank: CBJ21248.1; CBJ21249.1; рис. 4Б) [1]. При процессинге такого препептида образовывались два зрелых 6С-Нев-пептида AMP-1.1a и AMP-1.2a (рис. 4А), которые, как было показано, обладали высокой антифунгальной активностью, но действовали на разные патогены [59]. Это, вероятно, позволяло растению обеспечивать устойчивость к широкому кругу фитопатогенов (табл.) [60].

Методом ЯМР была установлена пространственная структура таких 6С-Нев-пептидов, как Ac-AMP2, AMP-1.1a и aSG1 (номера в базе данных RSCB PDB 1MMC, 2KUS) [54, 61] (рис. 4В). Характерный для всех гевеиноподобных пептидов цистеиновый мотив образует в пространственной структуре узел, в котором кольцо из двух дисульфидных связей и атомов основной цепи «прошито» третьим дисульфидом. При этом основным структурным элементом пептида Ac-AMP2 являлся антипараллельный бета-лист (Met-13–Lys-23), включающий в себя два бета-тяжа, N-концевой участок с неупорядоченной структурой и С-концевой бета-поворот (Gly-24–Cys-28) [61]. Было установлено, что N-концевой участок связан двумя дисульфидными связями с двумя основными бета-тяжами, а С-концевая область, содержащая поворот спирали, третьей дисульфидной связью с первой бета-цепью [8].

VII. ГЕВЕИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С 10 ОСТАТКАМИ ЦИСТЕИНА

Наряду с укороченными 6С-Нев-пептидами с делетированной четвертой дисульфидной связью был выделен ряд пептидов, имеющих десять остатков цистеина и, соответственно, пять дисульфидных связей. Первые 10-цистеиновые гевеиноподобные пептиды (10С-Нев-пептиды) были выделены в 2002 г. из коры эвкоммии вязолистной (*Eucommia ulmoides*) семейства Эвкоммиевые и обозначены как EAFP1 и EAFP2 [62]. Они содержали 41 а.о., имели на N-конце остаток пироглутаминовой кислоты и различались лишь заменой одного а.о. (Asn-27→Ala). Следует отметить, что восемь основных остатков цистеина имели консервативное расположение, как у гевеина, в то время как дополнительная пятая дисульфидная связь была образована между вторым и девятым остатками цистеина в его молекуле Cys-7–Cys-37 (рис. 5А). Присутствие пяти дисульфидных связей в молекуле пептидов из эвкоммии делало их чрезвычайно стабильными. Так, они сохраняли антифунгальную активность даже после кипячения в течение 30 мин и легко образовывали кристаллы. Пептиды обладали широким спектром антифунгальной активности: они действовали на восемь основных патогенных грибов, поражающих хлопок, пшеницу, картофель, томат и табак. При этом ингибирующая активность наблюдалась по отношению к грибам, как содержащим хитин, так и не содержащим его. Действующая концентрация колебалась в диапазоне $IC_{50}=18–155$ мкг/мл, а антифунгальный эффект сильно снижался в присутствии ионов кальция [62] (табл.).

Методами рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР была определена пространственная структура пептида EAFP2 в кристаллическом состоянии и в растворе [63, 64] (рис. 5Б). Оба метода показали сходные результаты, а именно, что третичная структура пептида EAFP2 представляла собой компактную глобулу, состоящую из 3_{10} спирали (Cys-3–Arg-6), α -спирали (Gly-26–Cys-30) и трех участков антипараллельных β -тяжей (Cys-16–Ser-18; Tyr-22–Gly-24; Arg-36–Cys-37). Хитин-связывающий сайт пептида EAFP2 имел сходную конформацию с аналогичными доменами других гевеиноподобных пептидов, при этом характерной ее особенностью являлось то, что окружавшие сайт а.о. формировали гидрофобную поверхность. Интересно, что пятая дисульфидная связь соединяла первые десять N-концевых остатков с C-концевыми в положениях 35–41, и в результате их сближения на поверхности молекулы образовывался кластер положительно заряженных аминокислотных остатков Arg-6, Arg-9, Arg-36 и Arg-40 [63, 64].

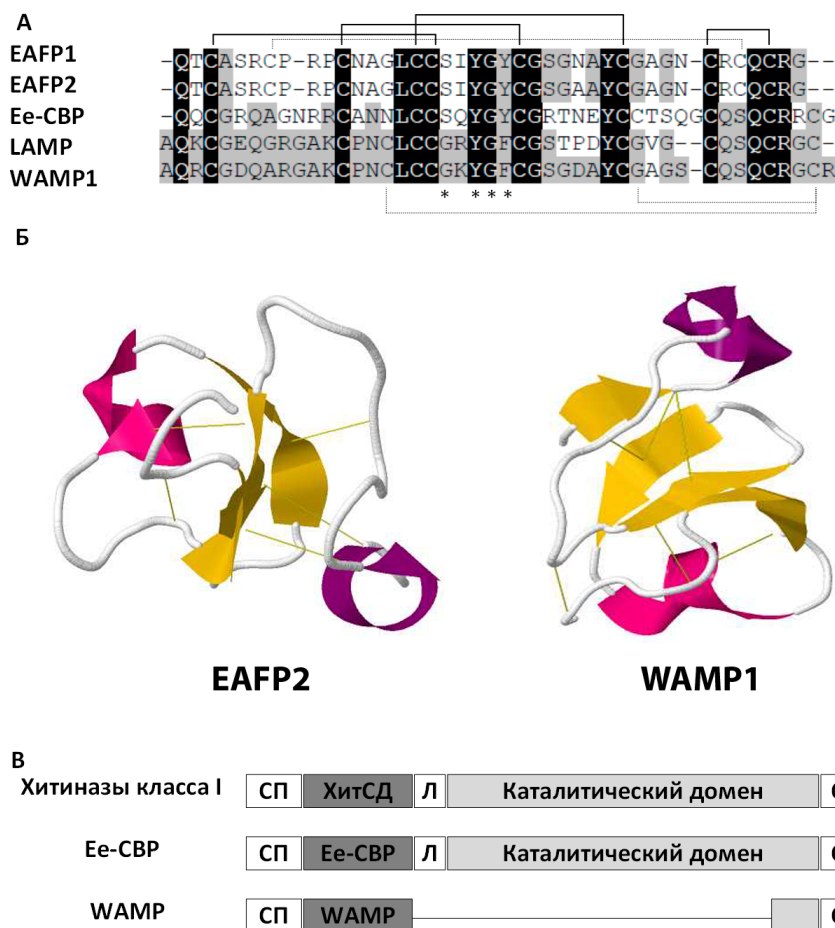


Рис. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей (А) таких 10С-Нев-пептидов растений, как EAFP1 (P83596), EAFP2 (P83597), Ee-CBP (Q7Y238), LAMP (P86521) и WAMP-1 (H6S4F1), сравнение структуры предшественников EeCBP и WAMP с предшественником хитиназ класса I (Б) и пространственные структуры (В) EAFP2 (1P9Z), и WAMP1 (2LB7); образование дополнительной пятой дисульфидной связи показано пунктирными линиями; Ee-CBP, WAMP – зрелые пептиды Ee-CBP и WAMP.

Еще один 10С-Нев-пептид (Ее-СВР) был выделен из коры и листьев бересклета европейского (*Euonymus europaeus*) семейства Бересклетовые. Пятая дисульфидная связь этого пептида располагалась в С-концевой части молекулы, соединяя седьмой и десятый остатки цистеина (Cys-32–Cys-44) [65] (рис. 5А). Так же, как и пептидам из эвкоммии, эта связь придавала Ее-СВР повышенную стабильность. Он сохранял антифунгальную активность после кипячения в течение 10 мин, длительного хранения и в широком диапазоне pH (от 2 до 11). Ее-СВР обладал высокой антифунгальной активностью, которая превышала активность 6С-пептида Ас-АМР2 из амаранта, одного из наиболее активных гевеиноподобных антимикробных пептидов (табл.). Так, Ее-СВР подавлял рост гриба *B. cinerea* при концентрации менее 1 мкг/мл. Пептид обладал также антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям [65].

Интересно, что из листьев и коры бересклета европейского одновременно с пептидом Ее-СВР была выделена хитиназа класса I (Ее-chitinase) [66]. Оказалось, что последовательности предшественников Ее-СВР и хитиназы Ее-chitinase обладали большим сходством (около 70%), но в отличие от Ее-СВР у хитиназы в хитин-связывающем домене присутствовало всего 8 остатков цистеина, образующих 4 дисульфидные связи. Размер предшественников 10С-Нев-пептида и хитиназы был практически одинаков, а различия в основном были сосредоточены в линкере между гевеиноподобным и С-концевым доменами. Следует отметить, что по сравнению с другими пептидами семейства Ее-СВР обладал самым протяженным предшественником, включавшим такой же длинный, как и у хитиназ класса I/IV, С-концевой продомен (рис. 5В). Этот продомен состоял из собственно каталитического хитиназного домена и линкера, по которому осуществлялся протеолиз. Если у хитиназы в результате процессинга отрезался лишь короткий С-концевой пропептид, то у Ее-СВР процессингу подвергался весь С-концевой домен. При исследовании антимикробной активности было обнаружено, что пептид Ее-СВР обладал большей активностью, чем хитиназа. Впервые было установлено, что при совместном действии Ее-СВР и Ее-chitinase наблюдался синергизм, и антимикробная активность многократно усиливалась. Для того, чтобы установить, наблюдался ли данный эффект *in planta*, проводилась обработка растения фитогормоном (метилжалсмонатом), после чего транскрипты Ее-СВР и Ее-chitinase обнаруживались в коре и в листьях бересклета, при этом уровень экспрессии обоих транскриптов значительно увеличивался. Анализ экстрактов листьев и коры подтвердил присутствие 10С-Нев-пептида и хитиназы в

исследуемых органах, что также свидетельствовало о совместном действии Ee-CBP и Ee-chitinase [66].

Другими пептидами, имеющими 10 остатков цистеина, являются пептиды WAMP и LAMP, выделенные из семян высокоустойчивого вида пшеницы *Triticum kiharae* L. и дикорастущего злака колосняка песчанного (*Leymus arenarius* L.) [67, 68]. Расположение четырех дисульфидов в структуре пептида WAMP точно соответствовало их локализации в хитин-связывающем домене хитиназ класса I, выделенных из злаков. При этом пятая дисульфидная связь в пептидах располагалась между третьим и десятым остатками цистеина (Cys-16–Cys-44; нумерация по пептиду WAMP), вследствие чего оказывались сближенными N- и C-концевые участки полипептидной цепи, богатые основными а.о. (рис. 5A). Таким образом формировался кластер из положительно заряженных а.о.. С другой стороны молекулы располагался гидрофобный кластер, содержащий хитин-связывающий сайт. Следует отметить, что пептиды WAMP и LAMP имели уникальные хитин-связывающие сайты, особенность которых заключалась в том, что консервативный остаток серина в положении 20 был заменен на остаток глицина (Ser-20 → Gly-20), при этом три других консервативных остатка ароматических аминокислот (Tyr-22, Phe-24, Tyr-31) оставались неизменными (рис. 5A). Интересно, что данная замена не повлияла на способность WAMP и LAMP *in vitro* связываться с полимерным хитином, однако при этом пептид WAMP утрачивал способность связывать пента-*N*-ацетилхитопентозу [1, 69]. Был разработан метод гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* для получения рекомбинантных аналогов пептидов WAMP и LAMP в количествах, необходимых для тестирования антимикробной активности и определения их пространственной структуры. Было установлено, что в микромолярных концентрациях эти пептиды действовали на широкий круг микроорганизмов, при этом антимикробная активность наблюдалась по отношению к грибам, как содержащим в клеточных стенках хитин, так и не содержащим его (табл.). Кроме того, пептид WAMP действовал против грамположительных и грамотрицательных бактерий [67]. При исследовании структуры методом ЯМР-спектроскопии было показано, что WAMP обладал характерной для всех гевеиноподобных пептидов трехмерной структурой [69]. Две дисульфидные связи (между первым и четвертым, вторым и пятым остатками цистеина) были расположены практически перпендикулярно друг другу и образовывали ноттиноподобное ядро, а общая пространственная структура молекулы включала четыре антипараллельных β-тяжа

(2–3, 18–20, 24–26 и 37–39 а. о.) и два коротких спиральных участка (спираль 3_{10} – остатки 6–8 и α -спираль 29–32 а. о.) [69] (рис. 5Б).

Было установлено, что пептид WAMP обладал типичным для гевеиноподобных АМП белком-предшественником, состоящим из сигнального и зрелого пептидов и С-концевого продомена (рис. 5В) [70]. При сравнении предшественника WAMP с хитиназой и с предшественником 10С-Неv-пептида Ее-СВР выяснилось, что С-концевой домен предшественника WAMP сильно редуцирован. Несмотря на обширную делецию (около в 700 п.н.), в структуре препропептида WAMP сохранилась небольшая часть хитиназного домена, обладающая высоким сходством с аналогичными доменами хитиназ класса I. Помимо этого домена высокое сходство последовательностей наблюдалось между гевеиновым доменом хитиназы и областью зрелого пептида WAMP (рис. 5В). Учитывая это, а также сходство пространственных структур пептида WAMP и хитиназ класса I/IV, было высказано предположение, что ген WAMP мог эволюционно произойти от генов хитиназ. Отбор этих генов в процессе эволюции, возможно, произошел вследствие наличия выраженной антимикробной активности у пептидов WAMP, что повысило устойчивость растений к фитопатогенам [70].

Были изучены виды пшеницы и эгилопса, которые использовались при создании *T. kiharae*. Геном *T. kiharae* имеет формулу A^bA^bGGDD . Было показано, что виды *T. monococcum* и *T. urartu*, являющиеся донорами генома А, не содержат гомологов гена *wamp*. В то же время виды *Ae. tauschii* (донор генома D), *T. timopheevii* (донор генома G) содержат гены-гомологи, кодирующие предшественники, отличающиеся от предшественников, кодирующихся геном *wamp*, единичными заменами а.о. или небольшими делециями, сосредоточенными, в основном, в области сигнального пептида и С-концевого продомена. Самым консервативным доменом таких генов-гомологов была область зрелого пептида, имевшая, однако, одно неконсервативное положение (34 а.о.), в котором в зависимости от исследуемого вида встречались такие а.о., как Ala, Lys, Glu, Asn (рис. 6А).

Было показано, что в ответ на солевой стресс наблюдалась активация экспрессии гена *wamp*, в то время как в ответ на температурный стресс (повышение/понижение температуры) изменение его экспрессии не наблюдалось. Выяснилось, что накопление транскриптов *wamp* происходило в ответ на заражение фитопатогенным грибом *F. oxysporum*, тогда как в ответ на заражение *A. niger* включалось репрограммирование транскрипции и альтернативное полиаденилирование [70].

VIII. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГЕВЕИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ

До недавнего времени считалось, что основной механизм действия гевеиноподобных пептидов связан с их способностью взаимодействовать с хитином клеточных стенок патогенов. На примере Ac-AMP, а также синтетического укороченного мутантного гевеина (Hev32), было показано, что взаимодействие с гидрофобными С-Н группами сахара гриба осуществлялось с помощью π -электронов остатков ароматических аминокислот хитин-связывающего домена [26, 28, 71, 72]. Было установлено, что 8С-Hev-пептид Pn-AMP1 быстро проникал в гифу гриба, вызывал деполяризацию актина в цитоскелете, разрыв мембраны и нарушение целостности цитоплазмы, в результате чего прекращался рост гиф грибов (*Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*) [73]. Однако следует отметить, что за этот процесс в клеточной стенке грибов отвечают скорее маннаны, а не хитин [73]. Было высказано предположение, что гевеиноподобные АМП и хитиназы могут работать совместно, направленно действуя на грибы, поскольку они имеют структурное сходство и общую мишень действия. Это было показано на примере 10С-Hev-пептида Ee-CBP [66]. Однако подробно описать механизм действия и установить в организме патогена молекулярную мишень, на которую направлена основная активность гевеиноподобных АМП, удалось при изучении 10С-Hev-пептида WAMP.

Следует отметить, что ранее из семян кукурузы (*Zea mays* L.) были выделены хитиназы класса IV, ChitA и ChitB, и было установлено, что они обладали высокой антимикробной активностью по отношению к фитопатогенным грибам рода *Fusarium* и *Bipolaris* [74]. Было показано также, что, в свою очередь, некоторые фитопатогенные грибы секретируют белки, направленно действующие на эти хитиназы и расщепляющие пептидную связь между хитин-связывающим и хитиназным доменами, что инактивировало хитиназы, и, соответственно, ослабляло защиту растения от патогена (рис. 6А) [75]. Одним из модифицирующих хитиназы белков являлся фермент, секретируемый грибом *F. verticillioides* и обозначенный Fv-cmr. После установления первичной структуры этот фермент был отнесен к классу фунгализинов, семейству M36 металлопротеаз [75]. Было показано, что Fv-cmr расщеплял не только хитиназы класса IV кукурузы (ChitA и ChitB), но и *A. thaliana* (AtchitIV3, AtchitIV5). Расщеплению подвергалась консервативная пептидная связь между остатками глицина и серина, расположенная в области между двумя доменами хитиназ. В результате хитиназы теряли свою активность и не могли действовать на патогены (рис. 6А) [75].

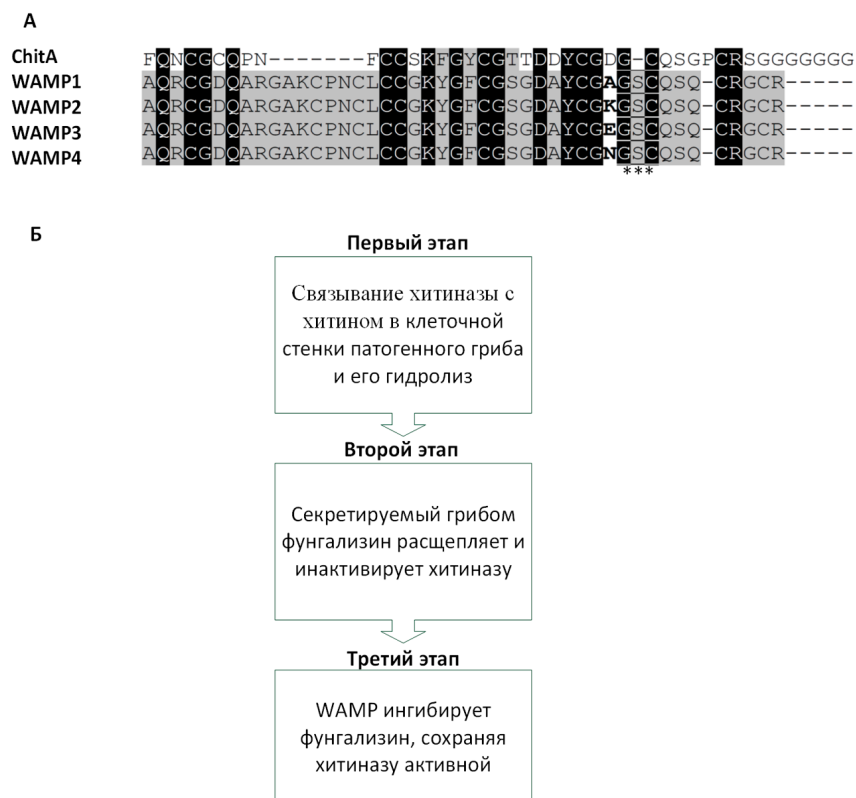


Рис. 6. Механизм действия пептидов WAMP.

А – сравнение хитинсвязывающего домена хитиназы ChitA (D0EM57) и пептидов WAMP-1 (H6S4F1), WAMP-2 (H6S4F4), WAMP-3 (H6S4F5) и WAMP-4 (H6S4F6). Неконсервативное 34 положение в пептидах WAMP выделено жирным; сайт протеолиза фермента фунгализина помечен звездочкой.

Б – модель взаимодействия растения и патогена (см. пояснения в тексте).

Было высказано предположение, что WAMP может также быть мишенью фунгализина, поскольку структуры пептида WAMP и растительных хитиназ обладали высоким сходством. Однако оказалось, что при совместной инкубации *in vitro* этого пептида и очищенной протеазы Fv-cmr не происходило протеолиза. Отсутствие протеолиза наблюдалось и при действии протеазы Fv-cmr на пептиды-гомологи WAMP, имеющие вместо остатка Ala в неконсервативном положении 34 остатки Lys (WAMP2), Glu (WAMP3) или Asn (WAMP4; рис. 6А), даже в условиях пролонгированной инкубации. Предполагается, что наблюдаемая устойчивость связана с присутствием дополнительного остатка Ser-36 на участке, который должен подвергнуться протеолизу, однако этот а.о. отсутствует, как в структуре хитиназы, так и других гевеиноподобных пептидов. Более того, когда к фунгализину и WAMP добавляли хитиназу ChitA, то и она оставалась интактной. Изменение свойств ChitA не наблюдали и при замене WAMP на гомолог WAMP34K, однако в присутствии двух других гомологов (WAMP34E, WAMP34N) хитиназа подвергалась частичному или полному протеолизу. Таким образом, оказалось, что а.о. в положении 34 является одним из ключевых при связывании с фунгализином, и в зависимости от его природы может наблюдаться или не наблюдаться ингибирование фермента.

Была предложена модель взаимодействия растения и патогена (рис. 6Б). В ответ на атаку патогенного гриба растение экспрессирует хитиназу, которая способна связывать хитин гиф и расщеплять его. В свою очередь, гриб вырабатывает фунгализин, который специфически расщепляет и инактивирует хитиназу, подавляя осуществление ее функции. Тогда растение начинает экспрессировать гевеиноподобные пептиды (WAMP), связывающиеся с фунгализином и ингибирующие его активность. При этом фунгализин не может расщеплять хитиназу, и хитиназа остается интактной и способной осуществить расщепление хитина гриба и подавить действие патогена.

Поскольку и WAMP, и хитиназы экспрессируются в проростках пшеницы в ответ на заражение грибами рода *Fusarium* [70, 76], можно предложить, что показанный *in vitro* синергизм WAMP и хитиназ реализуется также *in planta*. Является описанный механизм действия специфичным лишь для пептидов WAMP или же он характерен и для других гевеиноподобных АМП, остается невыясненным [77].

IX. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕВЕИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Благодаря наличию выраженной антимикробной активности по отношению к фитопатогенам, гевеиноподобные пептиды применяют, прежде всего, для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к патогенным микроорганизмам. Так, на основе кДНК, кодирующей гевеин, была создана векторная конструкция для получения трансгенной индийской горчицы (*Brassica juncea*), устойчивой к грибу *A. brassicae* [78]. В результате биологических испытаний, проводимых в теплицах, было выяснено, что полученные трансгенные растения обладали всеми признаками устойчивости к альтернариозу: более длительными инкубационным и латентным периодами, меньшим размером некрозов и меньшей степенью развития болезни [78]. Помимо зрелого гевеина использовался и его предшественник, который был экспрессирован в трансгенных томатах. Интересно, что при этом не наблюдалось процессинга и не образовывался зрелый гевеин. Однако полученные растения приобретали устойчивость к фитопатогену *Trichoderma hamatum*, выражающуюся в замедлении роста гриба [79].

Для создания трансгенных растений использовалась также промоторная область гена, кодирующего гевеин. Промотор гевеина (HEV2.1) был использован для создания конструкций, позволяющих экспрессировать репортерный белок β -глюкуронидазу (GUS) в трансгенной гевее. Интересно, что экспрессию GUS в корнях и стеблях трансгенных растений наблюдали только в клетках-латиферах (клетки, в которых нарабатывается латекс), а в листьях – во всех клетках [80]. В последнее время предпринимаются попытки использовать промотор гевеина (pHevP) для создания трансгенных растений гевеи, продуцирующих повышенное количество рекомбинантных белков, используемых в фармацевтике: протамина I человека и предсердного натрийуретического пептида [81, 82]. Предполагается, что, поскольку латекс продуцируется в гевее в больших объемах, то и гетерологические белки можно продуцировать в больших количествах. При этом для получения целевых белков не нужно будет использовать всё растение, а достаточно лишь сделать надрез в коре дерева, не повреждающий камбий, и собрать выделяемый сок, содержащий целевой белок [80–82].

Помимо гевеина для создания трансгенных растений использовались также и другие 8С-Неv-пептиды [85]. Так, кДНК, кодирующая пептид Pn-AMP2, была удачно экспрессирована в растениях табака

под контролем 35S промотора, в результате чего была достигнута их повышенная устойчивость к оомицету *Phytophthora parasitica*, вызывающему фитофтороз [84]. Были созданы трансгенные растения томата, экспрессирующие пептид Pn-AMP2 и обладающие повышенной устойчивостью к фитопатогенным грибам *P. capsici* и *F. oxysporum* [85]. Поскольку в клеточных стенках *F. oxysporum* содержался хитин, а в тех же клетках *P. capsici* он отсутствовал, был сделан вывод, что наличие хитина не является необходимым условием для проявления антифунгальной активности пептида Pn-AMP2 [85].

6С-Неv-пептид Ас-AMP2 был использован для создания трансгенных растений табака [86] и томата [87]. При создании трансгенных растений табака использовались два типа конструкций: одна с геном дикого типа, кодирующим Ас-AMP2, а другая с мутантным геном, не содержащим нуклеотидной последовательности, кодирующей С-концевой пропептид. В полученных с помощью обеих конструкций трансгенных растениях вместо исходного пептида Ас-AMP2 была обнаружена его изоформа с делетированным остатком Arg на С-конце, присутствующая только во внутриклеточной жидкости. Эту изоформу пептида удалось выделить из трансгенных растений табака и определить ее антимикробную активность *in vitro*. Оказалось, что она обладала антифунгальной активностью, сходной с Ас-AMP2. При этом трансгенные растения не обладали повышенной устойчивостью ни к *B. cinerea*, ни к *A. longipes*, по отношению к которым выделенный изопептид проявлял активность [86].

Гены, кодирующие 6С-Неv-пептиды звездчатки (SmAMP1, SmAMP2), были использованы для экспрессии в растениях табака в целях обеспечения повышенной устойчивости к грибной инфекции [60]. Стоит напомнить, что предшественники данных гевеиноподобных АМП имеют модульную структуру и содержат два зрелых пептида в одной кассете. Было установлено, что в полученных трансгенных растениях предшественники SmAMP подвергались процессингу, в результате чего образовывались пептиды SmAMP1 и SmAMP2. Наибольшая устойчивость у полученных растений табака наблюдалась по отношению к фитопатогенным грибам *Bipolaris sorokiniana* и *Thielaviopsis basicola*.

Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геveiноподобные пептиды представляют собой сравнительно немногочисленное семейство АМП, интерес к которому особенно возрос в последнее время. Благодаря высокому содержанию остатков цистеина, образующих характерный для этих АМП мотив, геveiноподобные пептиды являются очень стабильными соединениями, устойчивыми к нагреванию и действию протеаз. Хитин-связывающий сайт обеспечивает способность этих пептидов связываться с хитином, основным компонентом клеточных стенок патогенов, отсутствующим у растений. Геveiноподобные АМП были найдены у одно- и двудольных растений, принадлежащих к различным семействам. Практически все геveiноподобные пептиды действуют в микромолярных концентрациях на широкий круг фитопатогенов, к которым нередко относятся не только грибы, но и бактерии. Эти и другие особенности пептидов семейства делают их важными компонентами врожденного иммунитета растений. На примере двух геveiноподобных пептидов было показано, что они действуют совместно с защитными белками хитиназами. Причем было установлено, что пептид WAMP ингибировал секретируемую металлопротеазу патогенного гриба, что защищало хитиназу растения от деградации ферментом патогена. Однако до настоящего времени остается невыясненным вопрос, является ли этот механизм универсальным для всех пептидов семейства или же он характерен только для некоторых из них. Геveiноподобные АМП были использованы в биотехнологии для создания трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к фитопатогенам. Получено несколько таких растений, экспрессирующих различные геveiноподобные пептиды. Делаются попытки использовать промоторные области генов этих пептидов для наработки больших количеств медицинских препаратов. Приведенные выше данные показывают, что геveiноподобные АМП представляют собой особое семейство, изучение которого является перспективным как с фундаментальной, так и с практической точек зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Ц. А., Одинцова Т. И. (2012) Защитные пептиды иммунитета растений, *Биоорганическая химия*, **38**, 7–17.
2. Silverstein, K. A., Moskal, W. A., Jr., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., and VandenBosch, K. A. (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants, *Plant J.*, **51**, 262–280.
3. Slavokhotova, A. A., Shelenkov, A. A., and Odintsova, T. I. (2015) Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly, *Plant Mol. Biol.*, **89**, 203–214.
4. Slavokhotova, A. A., Shelenkov, A. A., Korostyleva, T. V., Rogozhin, E. A., Melnikova, N. V., Kudryavtseva, A. V., and Odintsova, T. I. (2017) Defense peptide repertoire of *Stellaria media* predicted by high throughput next generation sequencing, *Biochimie*, **135**, 15–27.
5. Costa, F. T., Neto, S. M., Bloch, C., Jr., and Franco, O. L. (2007) Susceptibility of human pathogenic bacteria to antimicrobial peptides from sesame kernels, *Curr. Microbiol.*, **55**, 162–166.
6. Oard, S. V., and Enright, F. M. (2006) Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi, *Plant Cell Rep.*, **25**, 561–572.
7. Loeza-Angeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Lara-Zarate, L., Villagomez-Gomez, E., Lopez-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2008) Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1713–1719.
8. Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., and Tan, W. L. (2015) Antimicrobial Peptides from Plants, *Pharmaceuticals (Basel)*, **8**, 711–757.
9. Beintema, J. J. (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins, *FEBS Lett.*, **350**, 159–163.
10. Iseli, B., Boller, T., and Neuhaus, J. M. (1993) The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity, *Plant Physiol.*, **103**, 221–226.
11. Archer, B. L. (1960) The proteins of *Hevea brasiliensis* Latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein, *Biochem. J.*, **75**, 236–240.
12. Walujono, K., Scholma, R. A., Beintema, J. J., Mariono, A., Hahn, and A. M. (1975) Amino acid sequence of hevein, *Proc. Int. Rubber Conference, Kuala Lumpur*, **II**, 518–531.
13. Chapot, M. P., Peumans, W. J., and Strosberg, A. D. (1986) Extensive Homologies between Lectins from Non-Leguminous Plants, *FEBS Letters*, **195**, 231–234.
14. Peumans, W. J., De Ley, M., Broekaert, W. F. (1983) An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes, *FEBS Letters*, **177**, 99–103.
15. Broekaert, W. F., Vanparijs, J., Leyns, F., Joos, H., and Peumans, W. J. (1989) A Chitin-Binding Lectin from

- Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties, *Science*, **245**, 1100–1102.
16. Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., and Peumans, W. J. (1991) Hevein – an Antifungal Protein from Rubber-Tree (*Hevea Brasiliensis*) Latex, *Planta*, **183**, 258–264.
 17. Broekaert, I., Lee, H. I., Kush, A., Chua, N. H., and Raikhel, N. (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **87**, 7633–7637.
 18. Lee, H. I., Broekaert, W. F., and Raikhel, N. V. (1991) Co- and post-translational processing of the hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *J. Biol. Chem.*, **266**, 15944–15948.
 19. Soedjanaatmadja, U. M., Hofsteenge, J., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., and Beintema, J. J. (1994) Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences, *Biochim. Biophys. Acta*, **1209**, 144–148.
 20. Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H. L., and Kush, A. (1994) Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex, *J. Biol. Chem.*, **269**, 9278–9283.
 21. Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L., Pappusamy, A., Jones, H., Ruengsri, N., Tharreau, D., Chrestin, H., Montoro, P., and Narangajavana, J. (2005) Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice, *Biochim. Biophys. Acta*, **1727**, 151–161.
 22. Andersen, N. H., Cao, B., Rodriguezromero, A., and Arreguin, B. (1993) Hevein – Nmr Assignment and Assessment of Solution-State Folding for the Agglutinin-Toxin Motif, *Biochemistry*, **32**, 1407–1422.
 23. Rodriguez, A., Tablero, M., Barragan, B., Lara, P., Rangel, M., Arreguin, B., Possani, L., and Sorianogarcia, M. (1986) Crystallization of Hevein – a Protein from Latex of *Hevea Brasiliensis* (Rubber Tree), *Journal of Crystal Growth*, **76**, 710–714.
 24. Asensio, J. L., Canada, F. J., Siebert, H. C., Laynez, J., Poveda, A., Nieto, P. M., Soedjanaamadja, U. M., Gabius, H. J., and Jimenez-Barbero, J. (2000) Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains, *Chemistry & Biology*, **7**, 529–543.
 25. Colombo, G., Meli, M., Canada, J., Asensio, J. L., and Jimenez-Barbero, J. (2004) Toward the understanding of the structure and dynamics of protein-carbohydrate interactions: molecular dynamics studies of the complexes between hevein and oligosaccharidic ligands, *Carbohydrate Research*, **339**, 985–994.
 26. Aboitiz, N., Vila-Perello, M., Groves, P., Asensio, J. L., Andreu, D., Canada, F. J., and Jimenez-Barbero, J. (2004) NMR and modeling studies of protein-carbohydrate interactions: Synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitoooligosaccharides, *Chem-biochem*, **5**, 1245–1255.

27. Mareska, V., Tvaroska, I., Kralova, B., and Spiwok, V. (2015) Molecular simulations of hevein/(GlcNAc)(3) complex with weakened OH/O and CH/pi hydrogen bonds: implications for their role in complex stabilization, *Carbohydrate Research*, **408**, 1–7.
28. Chavez, M. I., Vila-Perello, M., Canada, F. J., Andreu, D., and Jimenez-Barbero, J. (2010) Effect of a serine-to-aspartate replacement on the recognition of chitin oligosaccharides by truncated hevein. A 3D view by using NMR, *Carbohydrate Research*, **345**, 1461–1468.
29. Ownby, D. R. (2002) A history of latex allergy, *J Allergy Clin Immunol*, **110**, S27–32.
30. Bousquet, J., Flahault, A., Vandenplas, O., Ameille, J., Duron, J. J., Pecquet, C., Chevie, K., and Annesi-Maesano, I. (2006) Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**, 447–454.
31. Radauer, C., Adhami, F., Furtler, I., Wagner, S., Allwardt, D., Scala, E., Ebner, C., Hafner, C., Hemmer, W., Mari, A., and Breiteneder, H. (2011) Latex-allergic patients sensitized to the major allergen hevein and hevein-like domains of class I chitinases show no increased frequency of latex-associated plant food allergy, *Mol. Immunol.*, **48**, 600–609.
32. Chen, Z., Duser, M., Flagge, A., Maryska, S., Sander, I., Raulf-Heimsoth, M., and Baur, X. (2000) Identification and characterization of cross-reactive natural rubber latex and *Ficus benjamina* allergens, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **123**, 291–298.
33. Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Yip, E., and Palosuo, T. (1995) Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen, *Clin. Exp. Allergy*, **25**, 659–665.
34. Blanco, C. (2003) Latex-fruit syndrome, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **3**, 47–53.
35. Wagner, S., and Breiteneder, H. (2002) The latex-fruit syndrome, *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 935–940.
36. Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W. J., Van Damme, E. J., Bienvenu, F., Bienvenu, J., and Rouge, P. (2009) Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3beta-glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome, *Mol. Immunol.*, **46**, 1595–1604.
37. Ganglberger, E., Radauer, C., Wagner, S., Riordain, G., Beezhold, D. H., Brehler, R., Niggemann, B., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E., and Breiteneder, H. (2001) Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **125**, 216–227.
38. Schmidt, M. H., Raulf-Heimsoth, M., and Posch, A. (2002) Evaluation of patatin as a major cross-reactive allergen in latex-induced potato allergy, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **89**, 613–618.
39. Beezhold, D. H., Hickey, V. L., Kostyal, D. A., Puhl, H., Zuidmeer, L., van Ree, R., and Sussman, G. L. (2003) Lipid transfer protein from

- Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **90**, 439–445.
40. Ferreira, F., Wallner, M., Breiteneder, H., Hartl, A., Thalhamer, J., and Ebner, C. (2002) Genetic engineering of allergens: future therapeutic products, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **128**, 171–178.
 41. Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K. J., Fink, J. N., Sussman, G. L., and Kurup, V. P. (1997) IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein, *J. Immunol.*, **159**, 5724–5732.
 42. Beezhold, D. H., Kostyal, D. A., and Sussman, G. L. (1997) IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen, *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 114–121.
 43. Drew, A. C., Eusebius, N. P., Kenins, L., de Silva, H. D., Suphioglu, C., Roland, J. M., and O'Hehir R, E. (2004) Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity, *J. Immunol.*, **173**, 5872–5879.
 44. Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airenne, K. J., Laitinen, O. H., Repo, S., Pentikainen, O. T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M. S., Palosuo, T., Kulomaa, M. S., and Alenius, H. (2004) Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes, *J. Immunol.*, **172**, 2621–2628.
 45. Reyes-Lopez, C. A., Hernandez-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernandez-Arana, A., and Rodriguez-Romero, A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 123–130.
 46. Reyes-Lopez, C. A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernandez-Santoyo, A., and Rodriguez-Romero, A. (2006) A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition, *FEBS Lett.*, **580**, 2483–2487.
 47. Pedraza-Escalona, M., Becerril-Lujan, B., Agundis, C., Dominguez-Ramirez, L., Pereyra, A., Riano-Umbarila, L., and Rodriguez-Romero, A. (2009) Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies, *Mol. Immunol.*, **46**, 668–676.
 48. Koo, J. C., Lee, S. Y., Chun, H. J., Cheong, Y. H., Choi, J. S., Kawabata, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Ha, K. S., Bae, D. W., Han, C. D., Lee, B. L., and Cho, M. J. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1382**, 80–90.
 49. Fujimura, M., Minami, Y., Watanabe, K., and Tadera, K. (2003) Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1636–1642.
 50. Li, S. S., and Claeson, P. (2003) Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds, *Phytochemistry*, **63**, 249–255.

51. Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R., De Bolle, M. F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J., and et al. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins, *Biochemistry*, **31**, 4308–4314.
52. Rivillas-Acevedo, L. A., and Soriano-Garcia, M. (2007) Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10156–10161.
53. Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., and Egorov, T. (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds, *Phytochemistry*, **66**, 2426–2431.
54. Kini, S. G., Nguyen, P. Q., Weissbach, S., Mallagaray, A., Shin, J., Yoon, H. S., and Tam, J. P. (2015) Studies on the Chitin Binding Property of Novel Cysteine-Rich Peptides from *Alternanthera sessilis*, *Biochemistry*, **54**, 6639–6649.
55. De Bolle, M. F., David, K. M., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., and Broekaert, W. F. (1993) Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*, *Plant. Mol. Biol.*, **22**, 1187–1190.
56. Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., and Mikkelsen, J. D. (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves, *Plant Physiol.*, **113**, 83–91.
57. Huang, X., Xie, W., and Gong, Z. (2000) Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from Ginkgo biloba, *FEBS Lett.*, **478**, 123–126.
58. Rogozhin, E. A., Slezina, M. P., Slavokhotova, A. A., Istomina, E. A., Korostyleva, T. V., Smirnov, A. N., Grishin, E. V., Egorov, T. A., and Odintsova, T. I. (2015) A novel antifungal peptide from leaves of the weed *Stellaria media* L., *Biochimie*, **116**, 125–132.
59. Slavokhotova, A. A., Shelenkov, A. A., Korostyleva, T. V., Rogozhin, E. A., Melnikova, N. V., Kudryavtseva, A. V., Odintsova, T. I. (2017) Defense peptide repertoire of *Stellaria media* predicted by high throughput next generation sequencing, *Biochimie*, **135**, 15–27.
60. Shukurov, R. R., Voblikova, V. D., Nikonorova, A. K., Komakhin, R. A., Komakhina, V. V., Egorov, T. A., Grishin, E. V., and Babakov, A. V. (2011) Transformation of tobacco and Arabidopsis plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens, *Transgenic Res.*, **21**, 313–325.
61. Martins, J. C., Maes, D., Loris, R., Pepermans, H. A., Wyns, L., Willem, R., and Verheyden, P. (1996) H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*, *J. Mol. Biol.*, **258**, 322–333.
62. Huang, R. H., Xiang, Y., Liu, X. Z., Zhang, Y., Hu, Z., and Wang, D. C. (2002) Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif

- from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv, *FEBS Lett.*, **521**, 87–90.
63. Huang, R. H., Xiang, Y., Tu, G. Z., Zhang, Y., and Wang, D. C. (2004) Solution structure of *Eucommia* antifungal peptide: a novel structural model distinct with a five-disulfide motif, *Biochemistry*, **43**, 6005–6012.
 64. Xiang, Y., Huang, R. H., Liu, X. Z., Zhang, Y., and Wang, D. C. (2004) Crystal structure of a novel antifungal protein distinct with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Oliver at an atomic resolution, *J. Struct. Biol.*, **148**, 86–97.
 65. Van den Bergh, K. P., Proost, P., Van Damme, J., Coosemans, J., Van Damme, E. J., and Peumans, W. J. (2002) Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.), *FEBS Lett.*, **530**, 181–185.
 66. Van den Bergh, K. P., Rouge, P., Proost, P., Coosemans, J., Krouglova, T., Engelborghs, Y., Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. (2004) Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.), *Planta*, **219**, 221–232.
 67. Odintsova, T. I., Vassilevski, A. A., Slavokhotova, A. A., Musolyamov, A. K., Finkina, E. I., Khadeeva, N. V., Rogozhin, E. A., Korostyleva, T. V., Pukhalsky, V. A., Grishin, E. V., and Egorov, T. A. (2009) A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif, *FEBS J.*, **276**, 4266–4275.
 68. Уткина Л.Л., Жабон Е.О., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.Н., Гришин Е.В., Егоров Т.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. (2010) Гетерологичная экспрессия синтетического гена нового ге-веиноподобного пептида *Leymus arenarius* в клетках *Escherichia coli*, *Генетика*, **46**, 1645–1651.
 69. Dubovskii, P. V., Vassilevski, A. A., Slavokhotova, A. A., Odintsova, T. I., Grishin, E. V., Egorov, T. A., and Arseniev, A. S. (2011) Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **411**, 14–18.
 70. Andreev, Y. A., Korostyleva, T. V., Slavokhotova, A. A., Rogozhin, E. A., Utkina, L. L., Vassilevski, A. A., Grishin, E. V., Egorov, T. A., and Odintsova, T. I. (2012) Genes encoding hevein-like defense peptides in wheat: distribution, evolution, and role in stress response, *Biochimie*, **94**, 1009–1016.
 71. Muraki, M. (2002) The importance of CH/pi interactions to the function of carbohydrate binding proteins, *Protein Pept. Lett.*, **9**, 195–209.
 72. Chavez, M. I., Andreu, C., Vidal, P., Aboitiz, N., Freire, F., Groves, P., Asensio, J. L., Asensio, G., Muraki, M., Canada, F. J., and Jimenez-Barbero, J. (2005) On the importance of carbohydrate-aromatic interactions for the molecular recognition of oligosaccharides by proteins: NMR studies of the structure and binding affinity of AcAMP2-like peptides with non-natural naphthyl and fluoroaromatic residues, *Chemistry*, **11**, 7060–7074.
 73. Koo, J. C., Lee, B., Young, M. E., Koo, S. C., Cooper, J. A., Baek, D., Lim, C. O., Lee, S. Y., Yun, D. J.,

- and Cho, M. J. (2004) Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1669–1680.
74. Naumann, T. A., Wicklow, D. T., and Price, N. P. (2011) Identification of a chitinase-modifying protein from *Fusarium verticillioides*: truncation of a host resistance protein by a fungalysin metalloprotease, *J. Biol. Chem.*, **286**, 35358–35366.
75. Naumann, T. A., and Price, N. P. (2012) Truncation of class IV chitinases from *Arabidopsis* by secreted fungal proteases, *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 1135–1139.
76. Caruso, C. C., G; Caporale, C; Leonardi, L; Bertini, L; Magro, P; Buonocore, V. (1990) Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*, *Plant Science*, **140**, 87–97.
77. Slavokhotova, A. A., Naumann, T. A., Price, N. P., Rogozhin, E. A., Andreev, Y. A., Vassilevski, A. A., and Odintsova, T. I. (2014) Novel mode of action of plant defense peptides – hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases, *FEBS J.*, **281**, 4754–4764.
78. Kanrar, S. V., JC; Kirti, PB; Chopra, VL. (2002) Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*, *Plant Science*, **162**, 441–448.
79. Lee, H. I., and Raikhel, N. V. (1995) Prohevein is poorly processed but shows enhanced resistance to a chitin-binding fungus in transgenic tomato plants, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **28**, 743–750.
80. Montoro, P. L., S; Baptiste, C; Marteaux, B; Pujade-Renaud, V; Leclercq, J; Alemanno, L. (2008) Expression of the HEV2.1 gene promoter in transgenic *Hevea brasiliensis*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **94**, 55–63.
81. Sunderasan, E. B., BE; Azharuddin, A; AROKIAJ, P. (2012) Genetic Transformation of *Hevea brasiliensis* with Human Atrial Natriuretic Factor, *Journal of Rubber Research*, **15**, 255–264.
82. Sunderasan, E. S., SS; Badaruddin, BE; Azharuddin, A; AROKIAJ, P. (2010) Hevea genetic transformation for enhanced recombinant pharmaceutical production by the use of hevein promoter In *National Biotechnology Seminar*, Kuala Lumpur, Malaysia.
83. Berthelot, K., Peruch, F., and Lecomte, S. (2016) Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins, *Biochimie*, **127**, 258–270.
84. Koo, J. C., Chun, H. J., Park, H. C., Kim, M. C., Koo, Y. D., Koo, S. C., Ok, H. M., Park, S. J., Lee, S. H., Yun, D. J., Lim, C. O., Bahk, J. D., Lee, S. Y., and Cho, M. J. (2002) Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants, *Plant Mol. Biol.*, **50**, 441–452.
85. Lee, O. S., Lee, B., Park, N., Koo, J. C., Kim, Y. H., Prasad, D. T., Karigar, C., Chun, H. J., Jeong, B. R., Kim, D. H., Nam, J., Yun, J. G., Kwak, S. S., Cho, M. J., and Yun, D. J. (2003) Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathoge-

- nic fungi in tomato, *Lycopersicum esculentum*, *Phytochemistry*, **62**, 1073–1079.
86. De Bolle, M. F., Osborn, R. W., Goderis, I. J., Noe, L., Acland, D., Hart, C. A., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Broekaert, W. F. (1996) Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.*, **31**, 993–1008.
87. Ляпкова Н.С., Лоскутова Н.А., Майсурия А.Н., Мазин В.В., Кораблева Н.П., Платонова Т.А., Ладыженская Э.П., Евсюнина А.С. (2001) Получение генетически модифицированных растений картофеля, несущих ген защитного пептида амаранта, *Прикладная биохимия и микробиология*, **37**, 349–354.