

УДК 577.112.083

АНТИФУНГАЛЬНАЯ И РЕАКТИВИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ГЛИЦИН/ГИСТИДИН-БОГАТОГО ЛИНЕЙНОГО ПЕПТИДА ИЗ КОЛОСЬЕВ ПЫРЕЯ ПОЛЗУЧЕГО (*Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski)

© 2023 г. Д. Ю. Рязанцев¹, *, Е. Ю. Ходжаев², А. Е. Куварина³,
А. С. Барашкова¹, Е. А. Рогожин^{1, 3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: rea21@list.ru

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Из колосьев пырея ползучего (*Elytrigia repens* L.) комбинацией методов твердофазной экстракции, аффинной хроматографии и аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ был выделен новый линейный пептид, не содержащий в своей структуре остатков цистеина. Идентификация его первичной структуры методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману позволила выявить наличие нескольких полиглициновых участков, состоящих из 6–8 остатков каждый, между которыми локализованы короткие фрагменты, состоящие из полярных аминокислотных остатков. С-концевой фрагмент молекулы представляет собой положительно заряженный сайт, обогащенный остатками аргинина и гистидина. Особенности структуры данного пептида определяют его функциональность. Так, проверка наличия антимикробных свойств у его рекомбинантного аналога, полученного путем гетерологической экспрессии синтетического гена в прокариотической системе, позволила определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК), а то получается московская пивоваренная компания тестируемых культур грибов лишь при достаточно высоких действующих концентрациях (52–104 мкМ). Однако соединение обладало регуляторными свойствами: при концентрации 25 мкМ отмечен реактивирующий эффект, обеспечивающий повышение уровня выживаемости пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200) к УФ-облучению. Полученные данные расширяют представление о функциональных особенностях защитных пептидов растений необычного структурного типа.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, реактивирующая активность, первичная структура, пырей ползучий

DOI: 10.31857/S0555109923010099, **EDN:** CVBXOI

Фундаментальные аспекты изучения молекулярных факторов врожденного иммунитета растений являются основой для решения последующих прикладных задач, направленных, в первую очередь, на повышение устойчивости культур растений к стрессовым факторам окружающей среды и, как следствие, увеличение урожайности и его качества [1]. Широко известной группой так называемых “молекулярных инструментов” иммунной системы растительного организма являются антимикробные пептиды (в более широком понимании — защитные), которые являются как компонентами конститутивного иммунитета, так и в некоторых случаях и индуцированного. На настоящий момент из растений выделено и охарактеризовано около тысячи антимикробных пептидов (АМП), большинство которых классифицировано на не-

сколько семейств согласно их структурным особенностям: дефензины, тионины, липид-переносящие белки, гевеино-подобные пептиды, циклотиды и ноттино-подобные пептиды, снакины, альфа-харпинины [2]. Однако существует целый ряд так называемых неклассифицированных АМП разнообразной структуры, среди которых можно выделить несколько групп молекул, обогащенных остатками определенных аминокислот: пролином (пролин-богатые), глицином/пролином (глицин-пролин-богатые), глицином/гистидином (глицин-гистидин-богатые) и собственно глицином (глицин-богатые) [2–4]. Зачастую такие пептиды обнаруживаются в единичных видах растений, не имеющих широкого распространения и способы их взаимодействия с мишенями (микробными патогенами) имеют преимущественно описательный характер.

Известно, что растения являются богатейшими источниками биологически активных метаболитов, в том числе белков и пептидов с антимикробными свойствами. При этом на долю злаков приходится достаточно ограниченное количество сообщений о наличии в них АМП. Большинство из них выделено из культурных растений пшеницы (*Triticum aestivum*, *T. turgidum*, *T. kiharae*, *T. monococcum*), кукурузы (*Zeamays*), риса (*Oryza sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*) и ячменя (*Hordeum vulgare*). При этом подавляющее большинство таких АМП относятся к представителям семейств дефензинов и тионинов [5, 6]. С другой стороны, имеются единичные сообщения о наличии активных АМП у диких злаков, например, сорного растения ежовника обыкновенного, или куриного проса (*Echinochloa crus-galli*) [7–9], а также галофитного колосняка песчаного (*Leymus arenarius*) [10–12].

Пырей ползучий (*Elytrigia repens*) – трудноискореняемое многолетнее сорное растение, наибольший вред от которого регистрируется в посевах культурных злаков, находит ограниченное применение в фитотерапии целого ряда инфекционных заболеваний человека, так как его корневища содержат такие вторичные метаболиты как производные кумариновой и гидроксикоричной кислот [13, 14], флавоноиды, дубильные вещества, а наземная биомасса богата белками лектинами [15]. При этом до настоящего времени отсутствуют данные о наличии в данном растении АМП.

Цель работы – выделение из колосьев пырея нового АМП, его структурный анализ и оценка биологической активности по отношению к спектру коллекционных условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжевых грибов.

МЕТОДИКА

Биологический материал. Колосья пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Desv. Ex. Nevski) были собраны в Подольском районе Московской области (Россия). Биоматериал хранили в прохладном месте при температуре воздуха 15–17°C.

Тест-культуры *Candida albicans* ATCC 2091, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37 и *A. niger* INA 00760 были взяты из коллекции НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Культура *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200 была взята из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (“ГОСНИИ Генетика”, Москва). Все культуры предварительно выращивали на среде Чапека в пробирках со скошенным питательным агаром, после чего клетки суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5×10^8 КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Для посева использовали пятисуточные культуры грибов и дрожжей.

Выделение АМП из колосьев пырея. Навеску колосьев (50 г) измельчали до состояния муки на кофемолке (“Bosch”, Германия) и проводили экстракцию смесью (1 М HCl, 1%-ная HCOOH, 1%-ная ТФУ и 1%-ный NaCl) в соотношении 1 : 10 (вес/об.) в течение 1.5 ч при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. После этого экстракт (около 420 мл) центрифугировали (“Eppendorf”, Германия) при 6000 g и 4°C в течение 10 мин, отфильтровали через бумажный фильтр и концентрировали на ротаторном испарителе (“IKA-WERKE”, Германия) до конечного объема около 150 мл. К полученному объему приливали около 1000 мл охлажденного ацетона (“Реахим”, Россия) и выдерживали в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день осадок отделяли центрифугированием при 3500 g, (4°C, 5 мин) и высушивали в течение 48 ч на воздухе при комнатной температуре. Подсушенный осадок переставляли в 0.1%-ном водном растворе ТФУ (~20 мл) и обессоливали методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Aquapore C₈ 10 × 100 мм (“Applied Biosystems”, США). Элюцию проводили ступенчатым градиентом концентрации (0–60%) ацетонитрила в 0.1%-ной водной ТФУ. Собранный элюат упаривали на вакуумной центрифуге (“Labconco”, США), а затем лиофилизировали.

Дальнейшее разделение белково-пептидного экстракта проводили методом псевдоаффинной хроматографии среднего давления на колонке (15 × 60 мм) с Heparin-HiTrapSephарозе (“GE-HealthCare”, США) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl (100, 500 и 1000 мМ) в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7.2, при скорости потока подвижной фазы 3 мл/мин и детекции поглощения при длине волны 280 нм. Элюированную с колонки 100 мМ NaCl фракцию затем рехроматографировали методом аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac 4.6 × 250 мм (“GraceVydac”, США) в линейном (5–50%) градиенте концентрации 80%-ного ацетонитрила в 0.1%-ной ТФУ за 50 мин с последующим дополнительным элюированием (50–75%) в течение 10 мин. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин, поглощение измеряли при 214 нм.

Рехроматографию активной фракции проводили на колонке ОФ-ВЭЖХ Luna 3.0 × 150 мм (“Phenomenex”, США) с элюцией линейным градиентом концентрации 80%-ного ацетонитрила в 0.1% ТФУ за 30 мин при скорости потока 0.7 мл/мин.

MALDI-TOF/TOF-MS–анализ АМП из колосьев пырея. Анализ АМП осуществляли с помощью установки Autospeed MALDI-TOF (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB) (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 20 мг/мл 80%-ного

ацетонитрила. Раствор анализируемого образца (0.8 мкл) смешивали с эквивалентным объемом матрицы и наносили на мишень. Анализ масс-спектров осуществляли с использованием утилиты mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool v. 5.5.0 (<http://www.mmass.org/>).

Определение первичной структуры АМП из колосьев пырея. Первичную структуру АМП из колосьев пырея исследовали методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману с использованием секвенатора белков и пептидов PPSQ-33A (“Shimadzu”, Япония) согласно протоколу фирмы-производителя. Для анализа брали 600 пмоль пептида, очищенного методом аналитической ОФ-ВЭЖХ, и растворяли в 30 мкл 50%-ного ацетонитрила с добавлением 0.1%-ной ТФУ. Идентификация полученных первый раз полностью фенилтиогидантоиновых производных аминокислот относительно калибровочного профиля проводили с использованием программного обеспечения (ПО) LabSolution (“Shimadzu”, Япония).

Расчет поверхностного заряда АМП колосьев пырея проводили с помощью ПО GPMW версия 12.5 (“Light House Data”, Дания).

Круговой дихроизм (КД). Пептид растворяли в 40 мкл воды MQ (pH 5.7), а также отдельно в буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.5) для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-810 (“Jasco”, Япония) и анализировали с использованием ПО CONTINLL как описано ранее [16].

Спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения активных соединений в диапазоне 200–800 нм снимали с использованием спектрофотометра UV-1800 (“Shimadzu”, Япония) с применением кварцевых кювет объемом 2 мл с длиной оптического пути 1 см.

Получение рекомбинантного аналога АМП из колосьев пырея. Для получения рекомбинантного аналога АМП была произведена сборка генетической конструкции для последующей экспрессии синтетического гена, кодирующего данный пептид, в прокариотической системе. Нуклеотидная последовательность была получена из аминокислотной методом обратной трансляции с использованием таблицы частоты использования кодонов для *E. coli*. На 5'-конец полученных последовательностей были добавлены сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I и кодон ATG, кодирующий метионин, на 3'-конец – стоп-кодон и сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Hind*III. Фрагмент, кодирующий целевой АМП был собран посредством ПЦР-амплификации синтетических олигонуклеотидов (“Евроген”, Россия) с помощью высокоточной полимеразы Phusion-HotStart II DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США) и клонирован в вектор *pJET12blunt*

(“Invitrogen”, США): arAMPg1f: TAGGGTAC-CATGGGAGGTGGAGGTGGA; arAMPg1r: CATAAGCTTTTAAGCAGTGTGTCTATGTCT; arAMPg1-1: TAGGGTACCATGGGAGGTGGAG-GTGGAGGTGGAGGTTATCCAGGTCACG-GAGGTGGAGGTGGAGGATATCCTGGTCAT-GGAGGAGGTGGT; arAMPg1-2: CATAAGCTTTTAAGCAGTGTGTCTATGTCTGTGTCTATGTCTATGTCTACCACCACCTCCTCCAC-CACCTCCTCCATGACCAGGATATCCT.

После отбора клонов методом ПЦР и подтверждения идентичности последовательности нуклеотидов методом дидезоксисеквенирования (“Евроген”, Россия) полученный фрагмент был переклонирован в вектор *pET32b* и в итоге была проведена трансформация клеток *E. coli* штамма Origami. Целевой пептид ассоциирован в составе химерной конструкции с оригинальным белком *E. coli* – тиоредоксином, способствующим, в частности, правильному процессу пространственной укладки пептида. Полученным штаммом *E. coli*, несущим плазмиду, кодирующую гибридный белок, была инокулирована среда LB. К 50 мл ночной культуры бактерий добавляли свежую среду LB (1 л) и подращивали до достижения OD₆₀₀ = 0.6, после чего добавляли индуктор экспрессии ИПТГ до концентрации 1 мМ. Культуру выращивали 5 ч, клетки отделяли центрифугированием, а затем суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ дигидрофосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, 10 мМ имидазол, pH 8.0) и разрушали методом ультразвуковой дезинтеграции. Для высокоспецифичного выделения гибридного белка осветленный лизат наносили на Ni-NTA-агарозу, после промывки лизирующим и промывочным (50 мМ дигидрофосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, 20 мМ имидазол, pH 8.0) буферами. Белок элюировали буфером следующего состава: 50 мМ дигидрофосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, 250 мМ имидазол, pH 8.0. Гидролиз целевого рекомбинантного пептида от тиоредоксина осуществляли бромцианом по карбоксильной группе остатка метионина, расположенного в полипептидной цепи непосредственно перед N-концевым остатком АМП. Согласно методике [17], к раствору фьюжн-белка в элюирующем буфере после металл-аффинной хроматографии (~15 мл с концентрацией 1.6 мг/мл) добавляли 12 мкл 8 М раствора бромциана в 80%-ном ацетонитриле. Гидролиз проводили в течение 18 ч в темноте, после чего раствор упаривали на вакуумной центрифуге SpeedVac (“Savant”, США). Финальное разделение продуктов реакции осуществляли путем полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке JupiterC₅ 10 × 250 мм 300 Анг (“Phenomenex”, США) в линейном градиенте (10–70%) концентрации ацетонитрила в 0.1%-ной ТФУ, при скорости потока подвижной фазы 4.5 мл/мин и детектировании поглощения при 280 нм.

Антифунгальная активность. Активность определяли методом диско-диффузионного анализа с использованием стерильных бумажных дисков (бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76, Россия), смоченных раствором тестируемого пептида и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином в концентрации 40 мкг/диск (“НИИ Пастера”, Россия).

Определение реактивирующей активности. Реактивирующую активность определяли с использованием культуры *S. cerevisiae* ВКПМ У-1200. При определении биологической активности индивидуального пептида дрожжевые клетки подвергали УФ-облучению (с лампой БУВ-30 мощностью 30 Вт) при длине волны 253.7 нм. Лиофильно высушенный пептид растворяли в 0.3 мл физиологического раствора, добавляли равный объем облученной дрожжевой суспензии, инкубировали в течение 15 мин, а затем готовили разведения суспензий для посева на сусло-агар в 5 повторностях. В качестве контроля использовали суспензии клеток, инкубированных только с физиологическим раствором. Подсчет колоний проводили через 2 сут инкубации при температуре 28°C [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной кислотной экстракции измельченного растительного материала с последующим концентрированием и осаждением суммарного белка ацетоном из 50 г сырой массы было получено 2.1 г осадка. После обессоливания методом ОФ-ВЭЖХ, при котором происходила очистка от низкомолекулярных органических примесей небелковой природы, общий вес обогащенного белково-пептидного осадка в виде лиофилизата составил приблизительно 560 мг, что составляло 1.2% от массы сырого растительного материала.

Согласно оптимизированной универсальной схеме, многократно применённой при выделении АМП из различных видов растений [19], первой стадией грубого фракционирования была псевдоаффинная хроматография на гепарин-сефарозе, которая способна сорбировать молекулы, имеющие положительный заряд [20]. В результате ступенчатого элюирования вещества, имеющего различное сродство к неподвижной фазе были собраны три суммарные фракции (100 мМ, 500 мМ и 1 М NaCl), каждая из которых после обессоливания методом ОФ-ВЭЖХ (см. “Методика”) была проверена на наличие антифунгальных свойств. В результате наибольший диаметр зоны ингибирования роста тестового штамма *A. niger* был отмечен для фракции 100 мМ, которая впоследствии была подвергнута дальнейшему разделению методом аналитической ОФ-ВЭЖХ. По итогам разделения был

получен хроматографический профиль с набором индивидуальных пиков, элюирующихся с колонки преимущественно в интервале 30–50 мин (рис. 1). Стоит отметить, что ограниченное число фракций, которые были получены в результате хроматографического разделения, по всей видимости, связано с присутствием запасных белков, что ранее также было показано для зерна как культурных злаков, так и диких [21, 22]. Ввиду того, что подобные растительные белки имеют молекулярные массы в довольно широком диапазоне, введение дополнительной стадии хроматографической очистки, например гель-фильтрации, далеко не всегда приводит к положительному результату. Проверка собранных фракций показала наличие антифунгальной активности на качественном уровне единственного компонента со временем удерживания 44 мин. По данным масс-спектрометрического анализа для данной фракции был измерен набор сигналов [M + H] в диапазоне 3491.0–4196.0 Да с двумя преобладающими по интенсивности сигналами 3879.3 и 3951.0 соответственно (рис. 2). Последующая рехроматография этой фракции позволила локализовать основное соединение со средней молекулярной массой 3878.3 Да и чистотой 92.5% (данные не приведены). Полученное значение молекулярного веса данного вещества позволило предположить его полипептидную природу, которая была в дальнейшем подтверждена методом автоматической деградации по Эдману. Была установлена первичная структура данной молекулы, состоящая из 43 аминокислотных остатков, не имеющая остатков цистеина и состоящая преимущественно из полиглициновых повторов (рис. 3).

Стоит также отметить, что для пептида характерно наличие двух идентичных мотивов Tug-Pro-Gly-His в N-концевом и центральном фрагментах молекулы, а также поли-Arg/His-последовательности на С-конце. Характерно, что присутствие обилия остатков положительно заряженных аминокислот в структуре пептида, названного ER-GRP, в сочетании, предположительно, с отсутствием стабилизированной пространственной структуры обеспечивает высокий положительный заряд молекулы. Так, при нейтральном значении pH (7.0) его расчетное значение составляло +5.33, тогда как при физиологически нейтральном (5.5) оно доходило до +10.1. Эти расчеты позволили отнести новый АМП колосьев пырея к группе высокоосновных молекул. Поиск гомологий среди аминокислотных последовательностей по базам данных NCBI с применением алгоритма BLASTP среди аннотированных структур царства Растения (Viridiplantae) не выявил гомологичных структур. Среди наиболее близких аналогов ER-GRP можно отметить два представителя группы шеферинов (I и II) плодов сорного растения пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris*) семейства Капустные (*Bras-*

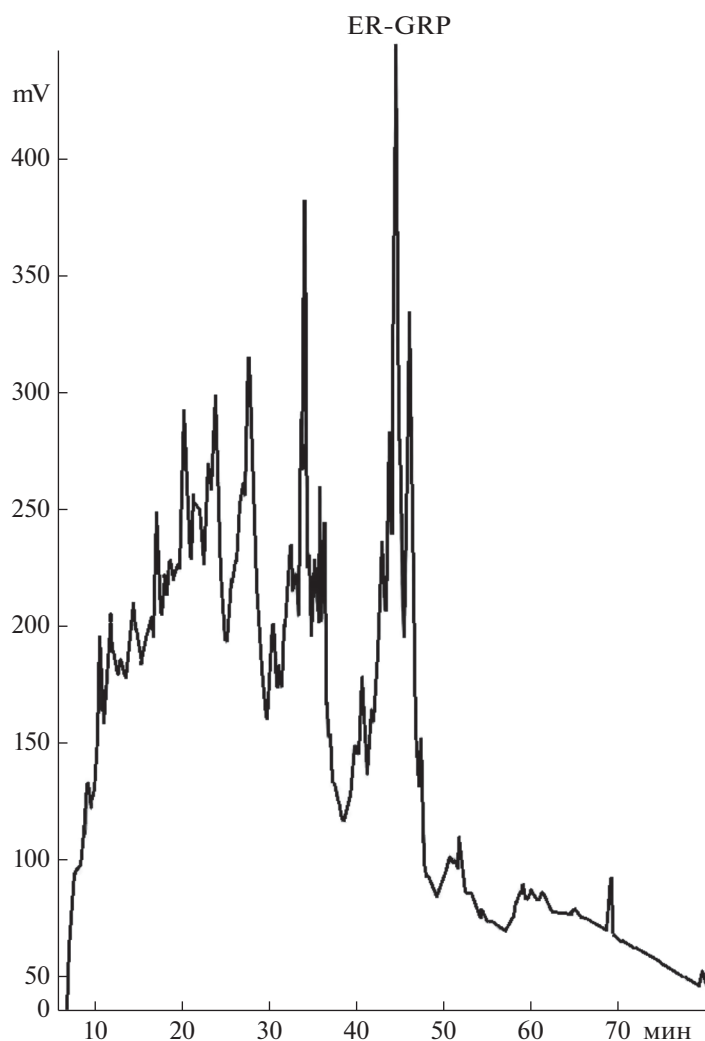


Рис. 1. Профиль ОФ-ВЭЖХ фракции, полученной при элюировании 100 мМ NaCl с колонки Heparin-Sepharose в результате аффинной хроматографии. Отмечен пик, соответствующий пептиду ER-GRP.

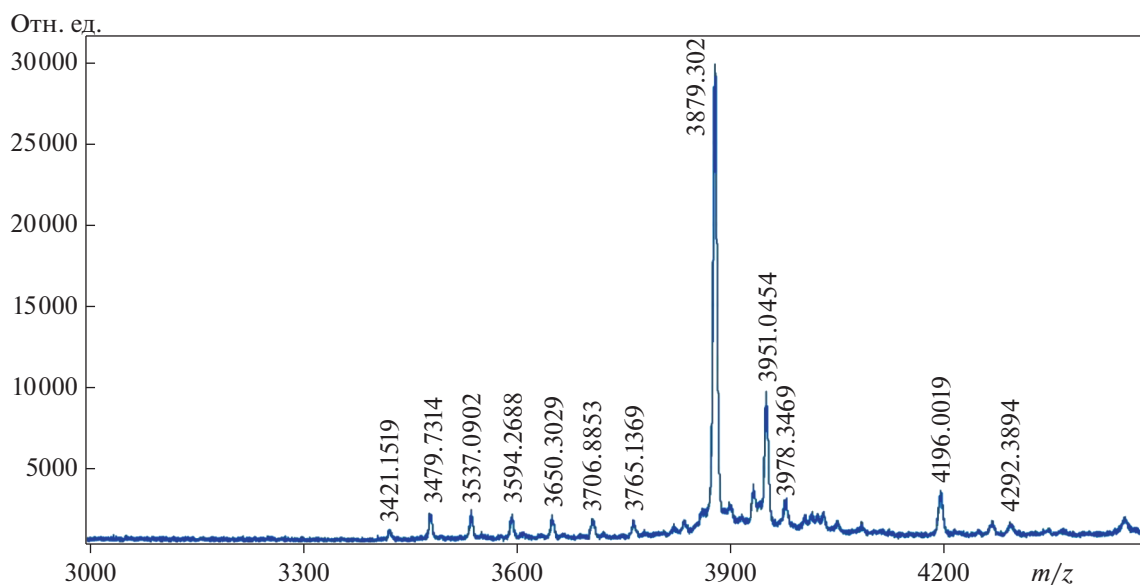


Рис. 2. MALDI-масс-спектрометрический анализ фракции, содержащей АМП ER-GRP.

ER-GRP	GGGGGGGGYPGHGGGGG—GGYPGHGGGGGGGGGGRHRRHRRHHTA	43
Shepherin I	-----GYGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG-----	28
Shepherin II	GYHGGHGGHGGGYNGGGGHGGHGGGYNGGGGHGGGGHG	38

Рис. 3. Выравнивание полных аминокислотных последовательностей АМП колосьев пырея (ER-GRP) и ближайших гомологов – шеферинов I и II из плодов пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*).

sicaceae) (рис. 3) [20]. Спектральное определение упорядоченных элементов вторичной структуры рекомбинантного аналога АМП колосьев пырея методом КД показало преимущественное формирование неупорядоченного клубка как в водном, так и в солевом растворе, которое с высокой долей вероятности обеспечивается многочисленными пространственными поворотами полипептидной цепи за счет присутствия остатков глицина.

Таким образом, по совокупности имеющихся данных о структуре пептида можно утверждать, что он обладает уникальной аминокислотной последовательностью и может быть отнесен к структурной группе неклассифицированных АМП растений – глицин/гистидин-богатым пептидам [23]. Характерно, что для некоторых глицин-богатых растительных белков методом молекулярной динамики была предсказана пространственная укладка по типу чередования альфа-спиральных участков, бета-поворотов и элементов неупорядоченного клубка [24].

Для исследования функциональной активности путем гетерологической экспрессии в прокариотической системе был получен рекомбинантный аналог пептида ER-GRP, который изначально был экспрессирован в виде химерного белка с тиоредоксином *E. coli*. Селективный химический протеолиз очищенного белка после аффинной хроматографии осуществляли по карбоксильной группе остатка метионина, локализованного в

линкерном участке между двумя полипептидами, с последующей очисткой целевого пептида препаративной ОФ-ВЭЖХ. В результате из одного литра бактериальной культуры расчетный выход рекомбинантного ER-GRP составил 4.6 мг.

Оценка биологической активности нового АМП из колосьев пырея (*E. repens*) осуществляли, в первую очередь, по его способности ингибировать рост тестовых культур условно патогенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжевых грибов *in vitro*. Стоит отметить, что пептид ER-GRP проявил слабые антимикробные свойства. Так, при воздействии на *C. albicans* ATCC 2091 зона подавления роста культуры была отмечена при концентрации 104 мкМ (диаметр составил 9 мм). По отношению к *A. niger* INA 00760 и *A. fumigatus* КПБ F-37 при 52 мкМ, а диаметр зоны ингибирования составил 12 и 10 мм соответственно. При этом двукратное увеличение нагрузки приводило к значительному возрастанию регистрируемого антимикробного эффекта: 25 для первой культуры и 22 мм – для второй (рис. 4). Таким образом, условно патогенные грибы рода *Aspergillus* оказались более чувствительными к действию исследуемого пептида, по сравнению с дрожжевой культурой. В сравнительном аспекте наиболее близкие к ER-GRP гомологи, шаферины I и II из пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*) обладали более выраженным антифунгальным эффектом, в первую очередь, по отношению к дрожжевым культурам рода *Candida* в широком диапазоне

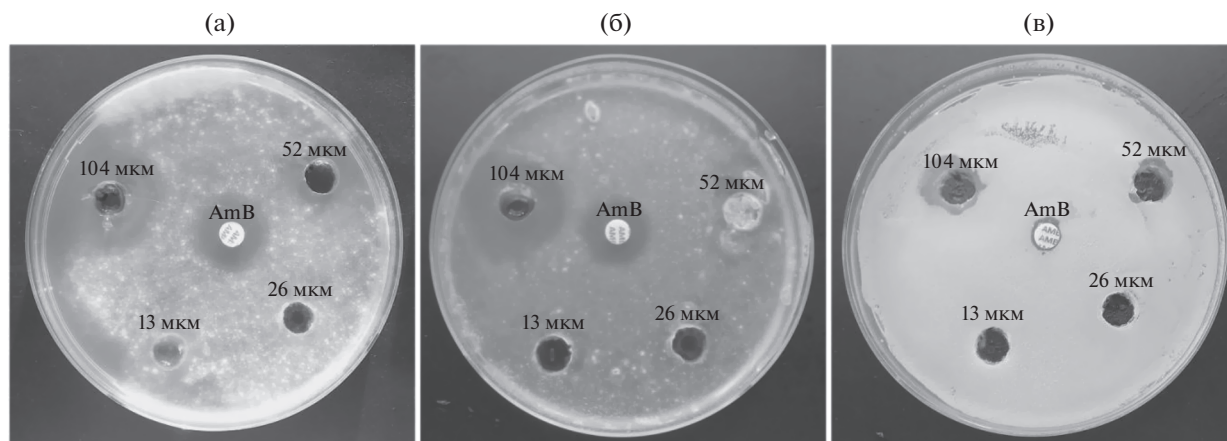


Рис. 4. Диско-диффузионный метод определения антифунгальной активности ER-GRP в отношении следующих культур: *Aspergillus niger* INA 00760 (а), *A. fumigatus* КПБ F-37 (б), *Candida albicans* ATCC 2091 (в).

Таблица 1. Реактивирующее действие АМП из колосьев пырея на подвергнутые стрессу клетки дрожжей *S. cerevisiae**

ER-GRP (конечная концентрация, мкМ)	КОЕ/мл, (выживаемость, %)		
	до стресса (K1) (%)	после стресса и инкубации с физ. р-ром (K2) (%)	после стресса и инкубации с пептидом (%)
52.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.025×10^6 (0.042)
26.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.022×10^6 (0.0367)
13.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.016×10^6 (0.0267)
7.5	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.015×10^6 (0.025)

* Доза УФ-облучения суспензии *S. cerevisiae* – 80 Дж/м².

действующих концентраций (1.56–50 мкМ) [25] и одновременно слабым эффектом против условно патогенных грибов, в частности, из рода *Aspergillus* [20].

При проверке пептида ER-GRP на способность к реактивирующему действию, обеспечивающему повышение уровня выживаемости пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200) после УФ-облучения в пределах концентраций 7.5–52 мкМ, при 26 мкМ наблюдали ее достоверное увеличение в среднем в 1.46 раза по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1). Характерно, что в случае аппликации биологически активного пептида растительного происхождения реактивирующее действие на культуру *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1200, подвергшуюся жесткому воздействию УФ-облучения, было выражено значительно меньше, чем при использовании реактивирующего фактора из *Luteococcus japonicus* sbsp. *casei*, который по химической природе также представлял короткий линейный пептид [26].

Таким образом, выделен и охарактеризован новый пептид из колосьев пырея ползучего (*E. repens*) не содержащий в своей структуре остатков цистеина, а имеющий ряд чередующихся полиглициновых участков между которыми локализованы фрагменты, состоящие из полярных аминокислотных остатков. С-концевой фрагмент молекулы представляет собой положительно заряженный сайт, обогащенный остатками аргинина и гистидина. Функциональная характеристика данного пептида позволила установить наличие двух типов биологической активности – слабой антифунгальной и более выраженной реактивирующей, что является в достаточной степени уникальным примером участия одной и той же молекулы в иммунитете растений к стрессовым факторам как биотической, так и абиотической природы. Полученные данные расширяют представление о функциональных особенностях защитных пептидов растений необычного структурного типа, и позволит в дальнейшем обозначить подходы к их классификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van der Weerden N.L., Bleackley M.R., Anderson M.A. // Cell. Mol. Life Sci. 2013. V. 70. № 19. P. 3545–3570. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
2. Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. // Pharmaceuticals (Basel). 2015. V. 8. № 4. P. 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
3. SarikaIquebal M.A., Rai A. // Peptides. 2012. V. 36. № 2. P. 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.012>
4. Das K., Datta K., Karmakar S., Datta S.K. // Protein Pept. Lett. 2019. V. 26. № 10. P. 720–742. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190619112438>
5. Stec B. // Cell. Mol. Life Sci. 2006. V. 63. № 12. P. 1370–1385. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5574-5>
6. Parisi K., Shafee T.M.A., Quimbar P., van der Weerden N.L., Bleackley M.R., Anderson M.A. // Semin. Cell. Dev. Biol. 2019. V. 88. P. 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>
7. Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Бабаков А.В., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 403–409.
8. Рязанцев Д.Ю., Рогожин Е.А., Цветков В.О., Ярулина Л.Г., Смирнов А.Н., Завриев С.К. // Доклады Академии Наук. 2019. Т. 484. № 1. С. 104–106.
9. Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Yu.V., Musolyatov A.Kh., Yalpani N., Egorov Ts.A., Grishin E.V. // Biochimie. 2008. V. 90. P. 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.007>
10. Уткина Л.Л., Жабон Е.О., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1–7.
11. Slavokhotova A.A., Shelenkov A.A., Odintsova T.I. // Plant Mol. Biol. 2015. V. 89. № 3. P. 203–214. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0346-6>
12. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 7. E. 1029. <https://doi.org/10.3390/biom10071029>

13. Koetter U., Kaloga M., Schilcher H. // Part I. Planta Med. 1993. V. 59. № 3. P. 279–280.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-959672>
14. Beydokhti S.S., Sendker J., Brandt S., Hensel A. // Fito-terapia. 2017. V. 117. P. 22–27.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.12.010>
15. Кароматов И.Д. // Биология и интегративная медицина. 2017. № 6. С. 122–128.
16. Provencher S.W., Glöckner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33–37.
<https://doi.org/10.1021/bi00504a006>
17. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // Anal. Biochem. 2010. V. 407. № 1. P. 144–146.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>
18. Воробьева Л.И., Рогожин Е.А., Ходжаев Е.Ю., Володяшкин Р.А., Самойленко В.А. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 684–695.
19. Barashkova A.S., Rogozhin E.A. // BMC Plant Methods. 2020. V. 16. E. 143.
<https://doi.org/10.1186/s13007-020-00687-1>
20. Park C.J., Park C.B., Hong S.S., Lee H.S., Lee S.Y., Kim S.C. // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1023/a:1006431320677>
21. Hilton H., Gaut B.S. // Genetics. 1998. V. 150. № 2. P. 863–872.
<https://doi.org/10.1093/genetics/150.2.863>
22. Gorinstein S., Jaramillo N.O., Medina O.J., Rogrigues W.A., Tosello G.A., Paredes-Lopez O. // J. Protein Chem. 1999. V. 18. № 6. P. 687–693.
<https://doi.org/10.1023/a:1020610424625>
23. Czolpinska M., Rurek M. // Front Plant. Sci. 2018. V. 8. № 9. E. 302.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00302>
24. Pelegrini P.B., Murad A.M., Silva L.P., Dos Santos R.C., Costa F.T., Tagliari P.D. et al. // Peptides. 2008. V. 29. № 8. P. 1271–1279.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.013>
25. Remuzgo C., Oewel T.S., Daffre S., Lopes T.R., Dyszy F.H., Schreier S. et al. // Amino Acids. 2014. V. 46. № 11. P. 2573–2586.
<https://doi.org/10.1007/s00726-014-1811-2>
26. Рогожин Е.А., Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Герасимов Е.С. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 137–143.

Antifungal and Reactivation Activity of a Novel Glycine/histidine-rich Linear Peptide from Dog-grass (*Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski) EARS

D. Yu. Ryazantsev^{a, *}, E. Yu. Khodzaev^b, A. E. Kuvarina^c, A. S. Barashkova^a, and E. A. Rogozhin^{a, c}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^c Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: rea21@list.ru

Using a combination of solid-phase extraction, affinity chromatography, and analytical reverse-phase HPLC, a new linear peptide was isolated from dog-grass (*Elytrigia repens*) ears, which does not contain cysteine residues. Identification of its primary structure by Edman automated degradation made it possible to reveal the presence of several polyglycine regions, each consisting of 6–8 residues, between which short fragments consisting of polar amino acid residues are localized. The C-terminal fragment of the molecule is a positively charged site enriched in arginine and histidine residues. The structural features of this peptide determine its functionality. Thus, checking the presence of antimicrobial properties in its recombinant analogue, obtained by heterologous expression in a prokaryotic system, made it possible to determine the MIC for the tested fungal cultures only at sufficiently high active concentrations (52–104 µM). However, this compound had regulatory properties: at a concentration of 25 µM, a reactivating effect was noted, which increased the level of survival of *Saccharomyces cerevisiae* to UV-irradiation. The data obtained expand the understanding of the functional features of plant defense peptides of an unusual structural type.

Keywords: antimicrobial peptides, reactivation activity, primary structure, dog-grass