

Олигопептид Pf_29ак – активный центр пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы из *Pseudomonas fluorescens*, ответственный за ее способность индуцировать устойчивость растений к патогенам

Джавахиya В.Г., Воинова Т.М., Шумилина Д.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии
Большие Вяземы, Московская обл., Россия, dzhavakhiya@yahoo.com

Обоснование цели исследования

В проведенных ранее исследованиях из штамма Pf197 *Pseudomonas fluorescens* был выделен белок MF3, относящийся к пептидил-пролил-цис/транс-изомеразам FKBP-типа и обладающий элиситорной активностью. Следующие эксперименты показали, что белок MF3 не оказывает прямого действия на фитопатогены, но способен повышать устойчивость филогенетически отдаленных групп растений к ряду вирусных и грибных патогенов, таких как вирус табачной мозаики (BTM), *Alternaria longipes*, *Bipolaris sorokiniana*, *Septoria nodorum* и пр. Широкий спектр действия, относительно низкая молекулярная масса (19,9 кДа) и очень высокая термостабильность белка MF3 делают перспективным его использование в качестве потенциального средства защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Целью данного исследования было определение консервативного фрагмента молекулы белка MF3, предположительно отвечающего за элиситорную активность этого белка, и проверка способности этого пептида индуцировать устойчивость растений табака к BTM.

Методы исследования

Белок MF3 нарабатывали при помощи рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)+pMF3. Выделение и очистку белка проводили согласно методикам, использованным в предыдущих работах. Выявление наиболее консервативных участков установленной ранее аминокислотной последовательности MF3 проводили с использованием биоинформационного ресурса PROSITE. Для проверки роли обнаруженного консервативного фрагмента в элиситорной активности, белок MF3 после предварительной денатурации подвергали трипсину в течение 1 ч при 37°C с последующей остановкой реакции путем инактивации трипсина; полноту гидролиза контролировали путем электрофореза в ПААГ. Олигопептид Pf_29ак, соответствующий выявленному фрагменту, был искусственно синтезирован сотрудниками Пушинского филиала Института биоорганической химии РАН.

Защитную активность MF3 и олигопептида оценивали в биотесте на отделенных листьях табака (*Nicotiana tabacum* L.) некрозообразующего сорта Xanthi. На одну из половинок каждого листа наносили препараты тестируемых веществ в буферных растворах: MF3, смесь пептидов, полученных из MF3 в результате трипсинолиза, или олигопептид Pf_29ак (5 листьев на вариант). Вторые (контрольные) половинки листьев обрабатывали дистиллированной водой или буферными растворами, аналогичными использованным для обработки соседних половинок (за исключением наличия анализируемых активных компонентов). Через 24 ч инкубации во влажной камере при 22°C, листья инокулировали разбавленным соком растений табака, инфицированных BTM или водой (проверка инфекционности препаратов BTM); степень разбавления подбирали так, чтобы количество некрозов, развивающихся на контрольных половинках, было в пределах 100-300. Через 3-4 суток инкубации листьев во влажной камере при 22°C подсчитывали число некрозов на каждой половине листа. Опыты закладывали в трехкратной повторности.

Результаты

1. Поиск генов, гомологичных гену, кодирующему белок MF3, выявил >45 сходных по составу генов, кодирующих аналогичные белки у разных организмов. Внутри MF3 были обнаружены 2 консервативных области, одна из которых содержит наиболее консервативный регион, состоящий из 29 аминокислотных остатков (рис. 1).

2. Связь элиситорной активности с этим консервативным регионом проверяли методом специфического протеолиза. С помощью программы Peptide Cutter был выбран фермент трипсин; в результате трипсинолиза белок MF3 должен был расщепиться, в том числе внутри исследуемого региона. Оценка элиситорной активности смеси триптических пептидов показала, что трипсинолиз лишил белок защитных свойств (рис. 2). На половинках листьев, обработанных нативным MF3, число некрозов было заметно меньшим, чем при обработке смесью триптических пептидов (рис. 3). 3. Исследование элиситорной активности синтетического пептида Pf_29ак показало, что предобработка листьев табака растворами Pf_29ак в трех концентрациях (0,5, 5 и 50 нМ) индуцировала устойчивость к BTM как обработанных, так и (в определенной степени) контрольных половинок листа, т.е. имел место трансламнарный эффект (рис. 4). Сравнение защитных свойств пептида и нативного белка показало, что синтетический пептид обладал не меньшей элиситорной активностью: при обработке листьев белком MF3 в концентрациях 5,9 и 59 нМ, степень защиты составляла 30 и 80-90%, соответственно; в то же время при обработке пептидом Pf_29ак у же при концентрации 5 нМ защитный эффект достигал 78,9%.

Выводы

Аминокислотная последовательность белка MF3 содержит участок, повреждение которого приводит к потере индуцирующей активности. Этот фрагмент соответствует наиболее консервативной части последовательности и состоит из 29 аминокислот. Искусственно синтезированный гипотетический олигопептид Pf_29ак в эквивалентных концентрациях обладает такой же защитной активностью, как и нативная молекула MF3. Иными словами, активный центр молекулы MF3, ответственный за его элиситорные свойства, представлен фрагментом, состоящим, по крайней мере, из 29 аминокислот.

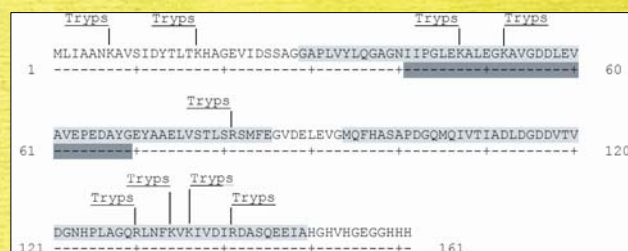


Рис. 1. Сайте действия трипсина (Tryps) на белок MF3. Светло-серым цветом выделены консервативные области, темно-серым – наиболее консервативный фрагмент (Pf_29ак).

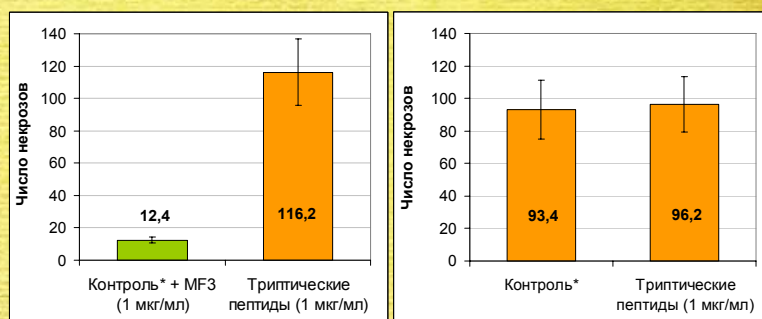


Рис. 2. Влияние предобработки листьев табака продуктами трипсинолиза белка MF3 на их поражение вирусом табачной мозаики. Для столбцов, показанных одинаковым цветом, статистические различия несутельны ($p > 0,05$). * Буфер, в котором проводили трипсинолиз, с добавлением инактивированного трипсина.

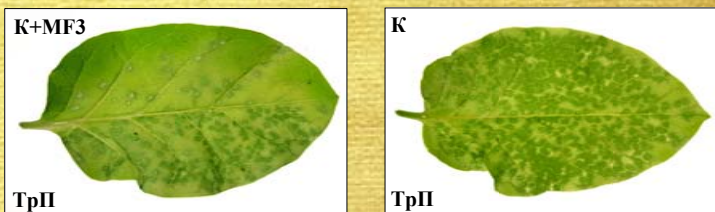


Рис. 3. Эффект элиминации элиситорной активности белка MF3 в отношении к поражению листьев табака вирусом табачной мозаики, после обработки белка трипсином, расщепляющим консервативную последовательность Pf_29ак. К – буфер, в котором проводили трипсинолиз, с добавлением инактивированного трипсина, MF3 – нативный белок (1мкг/мл или 59 нМ), ТрП – триптические пептиды, образующиеся после трипсинолиза MF3 (1 мкг/мл).

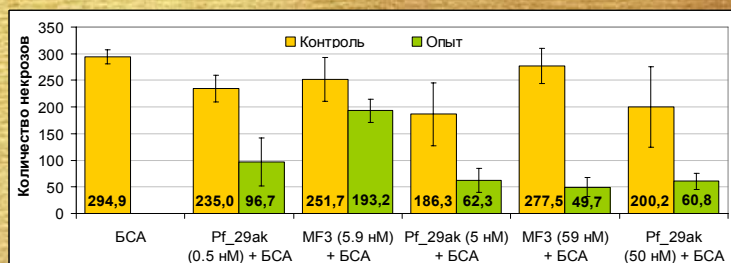


Рис. 4. Влияние предобработки листьев табака различными концентрациями пептида Pf_29ак и белка MF3 на количество некрозов, образующихся после поражения вирусом табачной мозаики ($p < 0,05$). BCA – бычий сывороточный альбумин (0,1%). Контроль включал предобработку BCA, опыт – исследуемыми препаратами.