

На правах рукописи

Уткина Любовь Леонидовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ЭКСПРЕССИИ
НОВЫХ ГЕНОВ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЗЛАКОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории генетики растений Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Пухальский Виталий Анатольевич
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Карлов Геннадий Ильич
Центр молекулярной биотехнологии
РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва

кандидат биологических наук
Брускин Сергей Александрович
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Ведущее учреждение: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, г. Москва

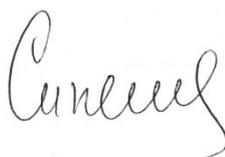
Защита диссертации состоится «___» _____ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3.

Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «___» _____ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На фоне стремительного роста населения земного шара проблема повышения урожайности сельскохозяйственных культур становится все более актуальной. Заболевания, вызванные различными патогенами (к которым относятся грибы, бактерии, вирусы, виоиды, а также насекомые и нематоды), наносят существенный урон урожаю, который может составлять от 30 до 70 % (с учетом потерь при хранении) (Oeke et al., 1994). Для защиты от патогенов в сельском хозяйстве применяют три основные стратегии: ротационное земледелие, традиционную селекцию, направленную на получение устойчивых форм, и, наконец, использование химических средств защиты растений. Традиционные методы селекции не всегда эффективны из-за их длительности и отсутствия в ряде случаев источников устойчивости. Использование средств химической защиты растений является дорогостоящим и представляет угрозу экологической безопасности. Кроме этого, возникают формы патогенов, устойчивые к пестицидам, в результате чего снижается их эффективность.

Альтернативной стратегией повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к патогенам и насекомым-вредителям, а также к другим стрессовым факторам окружающей среды абиотической природы (засухе, засоленности почвы и пр.) служит генетическая инженерия, которая позволяет встраивать гены, обуславливающие устойчивость, в геномы культурных растений. Важнейшим достижением в этой области было встраивание генов энтомотоксинов бактерии *Bacillus thuringiensis* в геномы культурных растений, что привело к созданию форм, устойчивых к насекомым-вредителям (Schuler et al., 1998). Еще более перспективным является усиление защитного потенциала самих растений как за счет усиления экспрессии собственных защитных генов, так и за счет встраивания генов защитных соединений из других видов растений, в частности, дикорастущих, которые, в отличие от культурных растений, более устойчивы к патогенным микроорганизмам и практически не изучены.

В ходе эволюции у растений выработалась сложная защитная система, важную роль в которой играют антимикробные пептиды (АМП) (García-Olmedo et al., 1997).

Антимикробные пептиды – это особая группа защитных соединений, которые представлены низкомолекулярными положительно заряженными полипептидами (молекулярная масса менее 10 кДа) амфифильной структуры. По гомологии аминокислотной последовательности, так называемого «цистеинового мотива», и

пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений (Broekaert et al., 1997). АМП обладают широким спектром антимикробного действия, разрушая мембраны патогенов, не вызывают появления устойчивых форм, и их гены могут быть непосредственно встроены в геном чувствительных к патогенам растений. Кроме того, использование для трансформации генов антимикробных пептидов растительного происхождения считается более предпочтительным, чем генов бактерий. Все это делает гены антимикробных пептидов перспективными для трансформации растений с целью повышения их устойчивости. Не менее важный аспект применения АМП состоит в разработке на их основе лекарственных препаратов нового поколения, что требует детального исследования их биологической активности.

Цели и задачи работы. Цель настоящей работы заключалась в исследовании структурной организации и функциональной значимости генов, кодирующих новые антимикробные пептиды злаков.

В процессе работы были решены следующие конкретные задачи:

1. Установление структуры кДНК и предшественников 4-Cys антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*.
2. Изучение экспрессии генов 4-Cys пептидов пшеницы в ответ на биотический и абиотический стресс.
3. Выделение и определение структуры 10-Cys антимикробных пептидов колосняка *Leymus arenarius*.
4. Установление структуры кДНК и предшественников 10-Cys антимикробных пептидов колосняка.
5. Установление структуры генов, кодирующих 4-Cys и 10-Cys пептиды пшеницы и колосняка.
6. Изучение межвидового полиморфизма генов антимикробных 4-Cys и 10-Cys пептидов у представителей семейства злаковых.
7. Разработка системы гетерологичной экспрессии 4-Cys и 10-Cys антимикробных пептидов пшеницы и колосняка.
8. Исследование антимуутагенного действия тионина пшеницы на клетки человека.

Научная новизна. Впервые получена полноразмерная кДНК, кодирующая 4-Cys антимикробные пептиды пшеницы *Triticum kiharae* и впервые выявлена уникальная модульная структура предшественников этих пептидов. Впервые

исследовано влияние стрессовых факторов биотической и абиотической природы на уровень экспрессии генов 4-Cys антимикробных пептидов пшеницы и показана индукция экспрессии этих генов в ответ на заражение патогенами, а также тепловой и солевой стресс. Из семян колосняка песчаного выделен новый антимикробный 10-Cys пептид, и определена его аминокислотная последовательность. Впервые показана гомология пептида колосняка с 10-Cys пептидом пшеницы. Впервые установлена структура геномной ДНК, кодирующей 10-Cys АМП пшеницы *T. kiharae*. Впервые исследован межвидовой полиморфизм генов антимикробных пептидов у разных представителей семейства злаковых на примере двух семейств генов, кодирующих 4-Cys и 10-Cys антимикробные пептиды. Впервые разработана система гетерологичной экспрессии генов 4-Cys и 10-Cys антимикробных пептидов растений. Впервые показано антимуtagenное действие тионина пшеницы на клетки человека.

Практическая и теоретическая значимость. Установленные в настоящей работе структуры генов антимикробных пептидов пшеницы могут быть использованы для создания генетических конструкций для трансформации растений с целью получения форм сельскохозяйственных культур, обладающих повышенной устойчивостью к фитопатогенам. Сами пептиды могут быть использованы в качестве прототипов для разработки новых антимикотиков, консервантов пищевых продуктов и антимутагенов.

Разработанные в настоящем исследовании системы гетерологичной экспрессии цистеин-содержащих пептидов в клетках прокариот могут быть использованы для создания технологии получения антимикробных и других цистеин-содержащих пептидов растений.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Гены 4-Cys антимикробных пептидов пшеницы кодируют длинные модульные предшественники, состоящие из пяти-семи пептидных доменов.
2. Экспрессия генов 4-Cys антимикробных пептидов пшеницы активируется в ответ на биотический и абиотический стресс.
3. Гены 10-Cys антимикробных пептидов злаковых кодируются предшественниками, состоящими из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена.
4. Гены 4-Cys и 10-Cys пептидов пшеницы присутствуют у разных представителей семейства злаковых, относящихся к родам *Aegilops*, *Leymus* и *Triticum*.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на 5-ом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), V съезде ВОГИС (Москва, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), 9-ой конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2009), 14-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2010), III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), Международной научной конференции, посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной АН Беларуси «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий» (Минск, 2010), XXIII Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011), 15-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2011), V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011). Результаты диссертации были доложены на отчетных сессиях (март, 2010; март, 2011) и межлабораторном семинаре «Генетика растений» (октябрь, 2011) ИОГен РАН.

Декларация личного участия автора. Автор самостоятельно получила образцы кДНК и ДНК исследуемых видов злаковых, установила структуру генов антимикробных пептидов пшеницы и колосняка, провела анализ распространения исследуемых генов у разных видов злаковых, выделила пептид LAMP из семян колосняка, разработала систему гетерологичной экспрессии цистеин-богатых пептидов растений. Суммарное личное участие автора составило восемьдесят процентов.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 3 работы, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 11 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах и содержит следующие разделы: благодарности, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы. Работа включает 34 рисунка, 14 таблиц. В списке литературы 209 источников, в том числе 198 на иностранном языке.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы подробно рассмотрены основные семейства антимикробных пептидов растений, указаны характерные структурные особенности и функции пептидов этих семейств, описано строение кодирующих их генов. Также в этом разделе систематизированы данные о сайтах протеолитического расщепления белков-предшественников у растений; кратко описана систематика рода *Triticum* L. и происхождение полиплоидных пшениц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы семена и проростки *Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Leymus arenarius*, *Triticum aestivum*, *Triticum boeoticum*, *Triticum kiharae*, *Triticum monococcum*, *Triticum timopheevii*, *Triticum urartu*. Все образцы получены из коллекции Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Тотальную РНК выделяли из растительного материала с помощью набора реагентов Trizol RNA Prep 100 (Изоген, Россия). Для синтеза первой цепи кДНК использовался набор Mint (Евроген, Россия). Определение структуры полноразмерной кДНК предшественников пептидов проводили сочетанием методов 3'- и 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Секвенирование интересующих последовательностей ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН (www.genome-centre.narod.ru).

Определение изменения уровня экспрессии генов 4-Cys пептидов под действием биотических и абиотических стрессовых факторов проводили методом ОТ-ПЦР. Антимикробные свойства отдельного пептида определяли по степени ингибирования прорастания спор нескольких видов фитопатогенных грибов раствором пептида.

Экспрессию рекомбинантных полипептидов осуществляли в составе гибридного белка с тиоредоксином в клетках *Escherichia coli*. Чистоту целевого

полипептида подтверждали МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрией и N-концевым секвенированием по Эдману.

Поиск гомологов исследуемых генов 4-Cys и 10-Cys пептидов пшеницы у представителей родов *Triticum*, *Aegilops* и *Leymus* проводили путем амплификации кодирующей части генов со специфичных праймеров на матрице геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли из пятидневных проростков исследуемых видов с помощью набора реактивов для выделения ДНК Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва).

Процедуру выравнивания последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили с помощью программы, доступной на сервере genebee.msu.su (AliBee - Multiple Alignment). Поиск гомологичных последовательностей генов и предшественников проводили на сервере ncbi.nlm.nih.gov (BLASTP, BLASTN) и cerealsdb.uk.net. Определение сигнальной последовательности предшественника проводили с помощью программы SignalP 3.0 с сервера expsy.org.

Выделение пептидов проводили сочетанием разных видов высокоэффективной жидкостной хроматографии: аффинной, эксклюзионной и обращенно-фазовой.

Определение антимуtagenной активности пуротионина Tk-AMP-ВР и водных экстрактов растений определяли по количеству разрывов ДНК в обработанных и не обработанных антимутагеном клетках человека (перевиваемая линия RD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гены 4-Cys пептидов

Ранее в нашей лаборатории из семян *T. kiharae* были выделены два новых пептида Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2. Они высокогомологичны, имеют характерный цистеиновый мотив (четыре остатка цистеина, образующих два повтора CXXXC) и различаются только двумя аминокислотными заменами и

наличием трех дополнительных аминокислотных остатков у Tk-AMP-X1 на С-конце (рис. 1). Эти пептиды обладали высокой антимикробной активностью, ингибируя рост ряда фитопатогенных грибов в микромолярных концентрациях, что делает перспективным их применение против фитопатогенов.

Tk-AMP-X1 : **T**DDRC**E**RM**C**Q**H**YHDRREKKQ**C**MKG**C**RYG**E**SD
Tk-AMP-X2 : **A**DDRC**E**RM**C**Q**R**YHDRREKKQ**C**MKG**C**RYG
Мотив : CXXXXC-----CXXXXC

Рис. 1. Аминокислотные последовательности пептидов Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2. Остатки цистеина выделены серым, переменные остатки выделены полужирным шрифтом.

Клонирование кДНК, кодирующей 4-Cys пептиды, и установление структуры их предшественников

Были получены два класса последовательностей кДНК, различающихся по длине, структура которых была установлена. Последовательности первого класса представлены двумя формами и кодируют семь цистеин-содержащих пептидов. Последовательности второго класса представлены четырьмя формами и кодируют пять цистеин-содержащих пептидов.

Все полученные гены имеют одинаковую структуру: 5'-нетранслируемая область → область, кодирующая сигнальный пептид → область, кодирующая 4-Cys пептиды → 3'-нетранслируемая область.

Анализ полипептидных последовательностей, выведенных по последовательностям кДНК, показал, что их можно разделить на два класса:

1. Полипептидные последовательности длиной 247–266 остатков, образующие в процессе посттрансляционного процессинга пять цистеин-содержащих пептидов. Последовательности этого класса были названы S-последовательностями (от «short» – короткие).

2. Полипептидные последовательности длиной 346–362 остатка, образующие в процессе посттрансляционного процессинга семь цистеин-содержащих пептидов. Последовательности этого класса были названы L-последовательностями (от «long» – длинные).

При анализе полученных последовательностей предшественников были обнаружены несколько пептидов, ранее выделенных из тотального экстракта семян *T. kiharae*, но их полная структура установлена не была. Полученные нами данные позволили установить первичную структуру этих пептидов.

Клонирование геномной ДНК, кодирующей 4-Cys пептиды

Анализ геномной ДНК, кодирующей 4-Cys пептиды, выявил, что последовательности ДНК идентичны последовательностям кДНК. Эти данные свидетельствуют о том, что в кодирующей части генов 4-Cys пептидов нет интронов.

При амплификации с геномной ДНК *T. kiharae*, кроме генов предшественников S- и L-типов, была получена последовательность ДНК, кодирующая предшественник, содержащий шесть пептидов. Эту последовательность по аналогии с предшественниками других типов назвали M-последовательностью (от «medium» - средний). Надо отметить, что предшественник этого типа не был получен при амплификации с кДНК зачатков семян и проростков. Это может быть связано с тем, что полипептиды такого типа не экспрессируются на этих стадиях развития растений.

Как видно из рис. 2, все предшественники имеют одинаковую структуру: на N-конце каждого предшественника расположен сигнальный пептид длиной 25 аминокислотных остатков, за которым следуют несколько (пять-семь) цистеин-содержащих пептидов, разделенных сайтами специфического протеолиза, и С-концевой продомен. Все пептиды, образующиеся в результате расщепления предшественника, имеют цистеиновый мотив CXXXC(11–14X)CXXXC, за исключением одного пептидного домена, содержащего пять остатков цистеина.

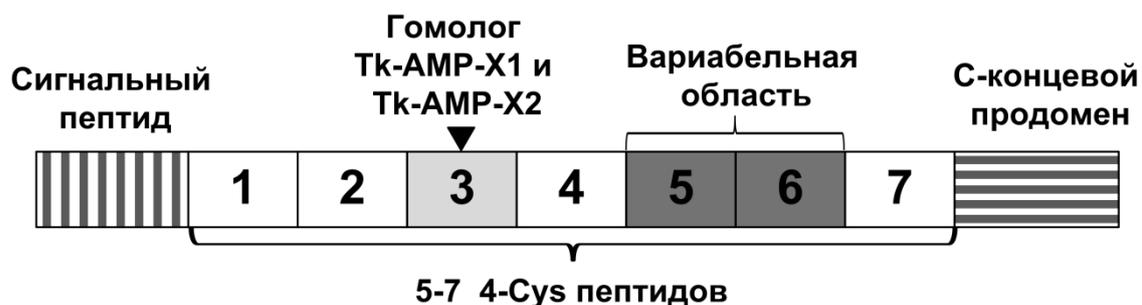


Рис. 2. Схема структуры предшественников 4-Cys пептидов, выведенных из нуклеотидных последовательностей.

В целом, можно сказать, что предшественники L-типа отличаются от S-типа наличием в составе двух дополнительных пептидных доменов (пятого и шестого), а от M-типа – наличием дополнительного шестого пептидного домена.

Установление сайтов специфического протеолитического расщепления предшественников 4-Cys пептидов

Анализ последовательностей предшественников и предсказание структур зрелых 4-Cys пептидов проводили на основании:

1. Известных структур пептидов Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2.
2. Известных N-концевых последовательностей пептидов, выделенных ранее из тотального экстракта семян пшеницы.
3. Гомологии последовательностей выведенных пептидов.
4. Данных масс-спектрометрического анализа тотального экстракта из семян пшеницы.
5. Описанных в литературе сайтов специфического протеолиза.

По гомологии аминокислотных последовательностей 4-Cys пептиды можно объединить в семь групп, при этом гомология внутри групп очень высокая (70–100 %), а между группами практически отсутствует (рис. 3). На основании анализа последовательностей пептидов можно предположить, какие аминокислотные остатки являются важными для сохранения структуры пептида или выполнения им своих функций. Например, пептиды пяти групп имеют остаток аспарагиновой кислоты в положении -2 к первому остатку

цистеина. Можно предположить, что этот остаток важен для функционирования пептида.

L-1-1		IRWCKEDCEWKAGQDTGKARE-CKREQCER
L-2-1 (M-1-1)		IRLCKKVC ^W DKAGE ^D DTGKARE-CKEQCER
S-1-1		IRWCEEDCDWKAGQDTGKARE-CKEQCER
S-2-1		IRWCKEDCDWKAGQDTGKARE-CKEQCERGR
S-3-1		IRWCKEDCEWKAGQDTGKARE-CKERCER
S-4-1		IRLCKKVC ^W DKAGE ^D DTGKARE-CKEQCERRRHGHEPQD
L-1-2 (S-3-2)	GRRHGHEPQDEDDGGIPDRCKRECESHEDMDSKLR---CTLECW ^R Q ^Q K	
S-4-2		GGIPDRCKRECESHEDMDSKLR---CTLECW ^R Q ^Q K
L-2-2 (M-1-2)		GDSFSDCVS ^Q CRGHGGWWGKERW ^D RCRRICR ^Q S ^Q E
S-1-2 (X3)		GDSFSDCVSKCRGHGGWWGKERWER ^Q ICR ^Q S ^Q E
S-2-2		GDSFSDCVSKCRGHGGWWGKERWER ^Q ICR ^Q S ^Q E
L-1-3		GDDRCERM ^C QHYHDRREKKQ---CMKGC ^R Y
L-2-3 (M-1-3) (X2)		A DDRCERM ^C Q ^R YHDRREKKQ---CMKGC ^R Y ^G
S-1-3 (S-2-3) (X1)		T DDRCERM ^C QHYHDRREKKQ---CMKGC ^R Y ^G ESD
S-3-3		GDDRCERM ^C R HYHDRREKKQ---CMKGC ^R Y
S-4-3		GDDRCERM ^C QHYHDRREKK ^P ---CMKGC ^R Y
L-1-4 (L-2-4, M-1-4)		GHEHGDRCCQTQCKRFRPGSYDRQ ^Q --CIEKCC ^Q Q ^Q
S-1-4 (S-2-4)		GHEHGDRCCQTQCKR ^L RPGSYDRQ ^Q --CIEKCC ^Q Q ^Q
S-3-4		GHEHGDRCC ^A QCKRFRPGSYDRQ ^Q --CIEKCC ^Q Q ^Q
S-4-4		GHEHGDRCCQTQCKR ^L RPGSYDRQ ^Q --CIE ^R CC ^Q Q ^Q
L-1-5 (L-2-5) (G7)		HHGGGGHGHGDRCCQAQCKRFRPGSYDRW ^Q --CTERC ^Q SH ^Q QD
L-1-6 (L-2-6) (G6)		HHGGG DQA HGDRCCQAQCKR ^Y PRGSYDRW ^Q --CTERC ^Q SH ^Q QD
M-1-5		HHGGGGHGHGDRCC TQ CKRFRPGSYDRW ^Q --CTERC ^Q SH ^Q QD
L-1-7 (L-2-7)		HHGGGGHGHGSSCEQKCCQ ^R YRHEYEKEQ--CVRDC ^K SGG ^H GGA
M-1-6		HHGGGGHGH ESS CEQKCCQ ^R H RHEY DR Q ^Q --CVRDC ^K SGG ^G GGA
S-1-5 (S-4-5)		HHGGGGHGHGSSCEQKCCQ ^R YRHEY DK Q ^Q --CVRDC ^K SGG ^G GGA
S-2-5 (S-3-5)		H HGSSCEQKCCQ ^R YRHEYEKEQ--CVRDC ^K SGG ^H GAGGRGRE

Рис. 3. Выравнивание выведенных аминокислотных последовательностей 4-Cys пептидов пшеницы *T. kiharae*. Замены аминокислотных остатков в группах выделены полужирным шрифтом.

Влияние биотических и абиотических стрессовых факторов на уровень экспрессии генов 4-Cys пептидов

Влияние биотического стресса на уровень экспрессии генов 4-Cys пептидов изучали на примере четырех фитопатогенных грибов: *Aspergillus niger*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum* и *Fusarium oxysporum*. Показано, что экспрессия изучаемых генов изменяется в зависимости от вида гриба. Наибольшее увеличение экспрессии наблюдается при заражении *F. oxysporum* – в среднем в 5,8 раза, индуцирование *A. niger* и *H. sativum* также

приводит к достоверному увеличению уровня экспрессии (в 2,7 и 2,2 раза соответственно). Заражение *F.graminearum* не приводит к достоверному увеличению уровня экспрессии (рис. 4). Можно предположить, что *F. graminearum*, который является специфическим патогеном злаковых, в процессе эволюции выработал механизмы, подавляющие индукцию защитных пептидов, в то время как заражение неспецифическими патогенами вызывает усиление экспрессии генов 4-Cys пептидов.

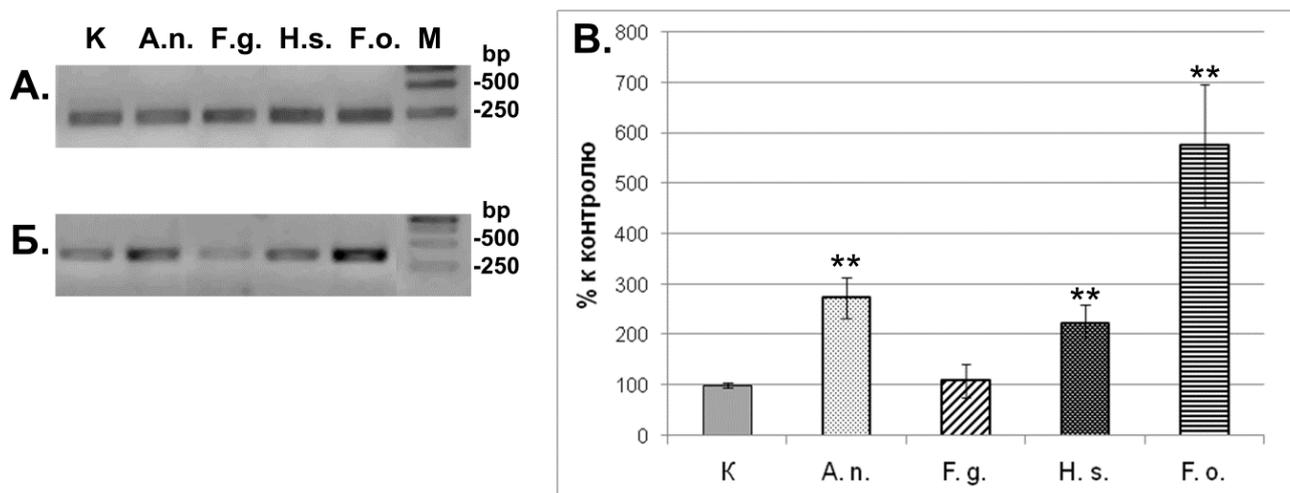


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии генов 4-Cys пептидов пшеницы *T. kiharae* при заражении грибными патогенами. А. Уровень мРНК β -актина. Б. Уровень мРНК генов 4-Cys пептидов. В. Результаты оценки уровня мРНК 4-Cys пептидов по отношению к контролю, данные приведены в % к среднему контролю \pm стандартное отклонение ($n=6$). Достоверность отличий от контроля определяли тестом *t*-Стьюдента. Статистически достоверные отличия отмечены ** - $p<0,01$. К- контроль, А.п. – *Aspergillus niger*, F.g. – *Fusarium graminearum*, H.s. – *Helminthosporium sativum*, F.o – *Fusarium oxysporum*, М – ДНК-маркер.

Для изучения воздействия абиотического стресса на экспрессию генов 4-Cys пептидов были выбраны температурный и солевой стрессы разной интенсивности. Для исследования температурного стресса растения выращивали на холоде (+4 °C), при комнатной температуре (+22 °C – контроль) и при повышенной температуре (+37 °C). Исследование действия солевого стресса проводили на проростках, выращенных в солевом растворе (100 мМ NaCl, 200 мМ NaCl, контроль – вода). В результате проведенных исследований оказалось, что повышение уровня экспрессии исследуемых генов индуцируется повышенной температурой (+37 °C) – в 2,8 раза (рис. 5А), а также повышенной концентрацией соли (200 мМ) – в 2,1 раза (рис. 5Б). В проростках, выращенных

при пониженной температуре, уровень экспрессии генов был пониженным, а при действии солевого раствора при концентрации NaCl 100 мМ достоверных отличий от контроля не наблюдалось.

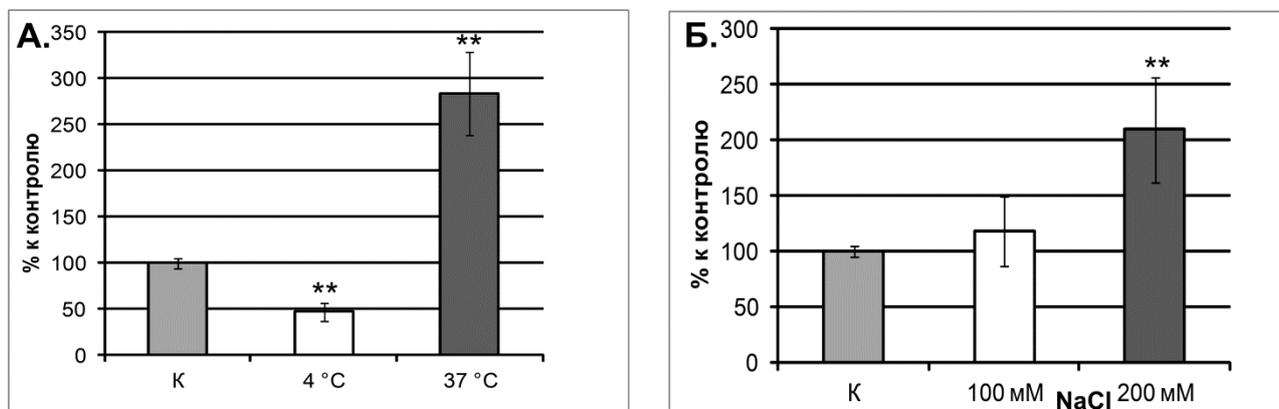


Рис. 5. Изменение уровня экспрессии генов 4-Cys пептидов пшеницы *T. kiharae* в условиях абиотического стресса. А. Действие температурного стресса. Б. Действие солевого стресса. Данные приведены в % к среднему контролю \pm стандартное отклонение (n=6). Достоверность отличий от контроля определяли тестом t-Стьюдента. Статистически достоверные отличия отмечены ** - $p < 0,01$. К- контроль.

Изменение уровня экспрессии генов 4-Cys пептидов при выращивании растений в разных температурных режимах может быть связано с общим изменением уровня метаболизма. Причины повышения уровня экспрессии генов при увеличении концентрации соли в среде требуют дальнейших исследований.

Поиск генов-гомологов 4-Cys пептидов у разных представителей семейства злаковых

Поскольку генетика злаковых очень сложна, а в образовании полиплоидных пшениц участвовали не менее пяти диплоидных видов, то для исследования распространения генов-гомологов 4-Cys пептидов были выбраны виды, принимавшие участие в образовании *T. kiharae* (*T. timopheevii*, *Ae. tauschii*), и диплоидные виды – доноры геномов (*T. monococcum*, *T. urartu*, *Ae. speltoides*). Кроме этого, была проанализирована пшеница мягкая – *T. aestivum*, которая является основной злаковой культурой в мире, но менее устойчива к фитопатогенам, чем *T. kiharae*. Мы предполагаем, что это явление может быть связано, в том числе, и с различиями в генах семейства 4-Cys пептидов. Также для анализа распространения генов 4-Cys среди злаковых был

взял колосняк песчаный *Leymus arenarius*, который не является близкородственным видом для вида *T. kiharae*.

Путем амплификации с геномной ДНК с использованием праймеров, специфичных к консервативным участкам генов 4-Cys пептидов, было показано наличие генов 4-Cys пептидов во всех видах, кроме *Ae. speltoides* – донора генома В.

Как видно из рис. 6, все предшественники, выведенные по нуклеотидным последовательностям, образуют три больших кластера по числу содержащихся в них 4-Cys пептидов. На основании полученных данных можно высказать предположение о принадлежности генов, кодирующих тот или иной тип предшественника, к определенным геномам.

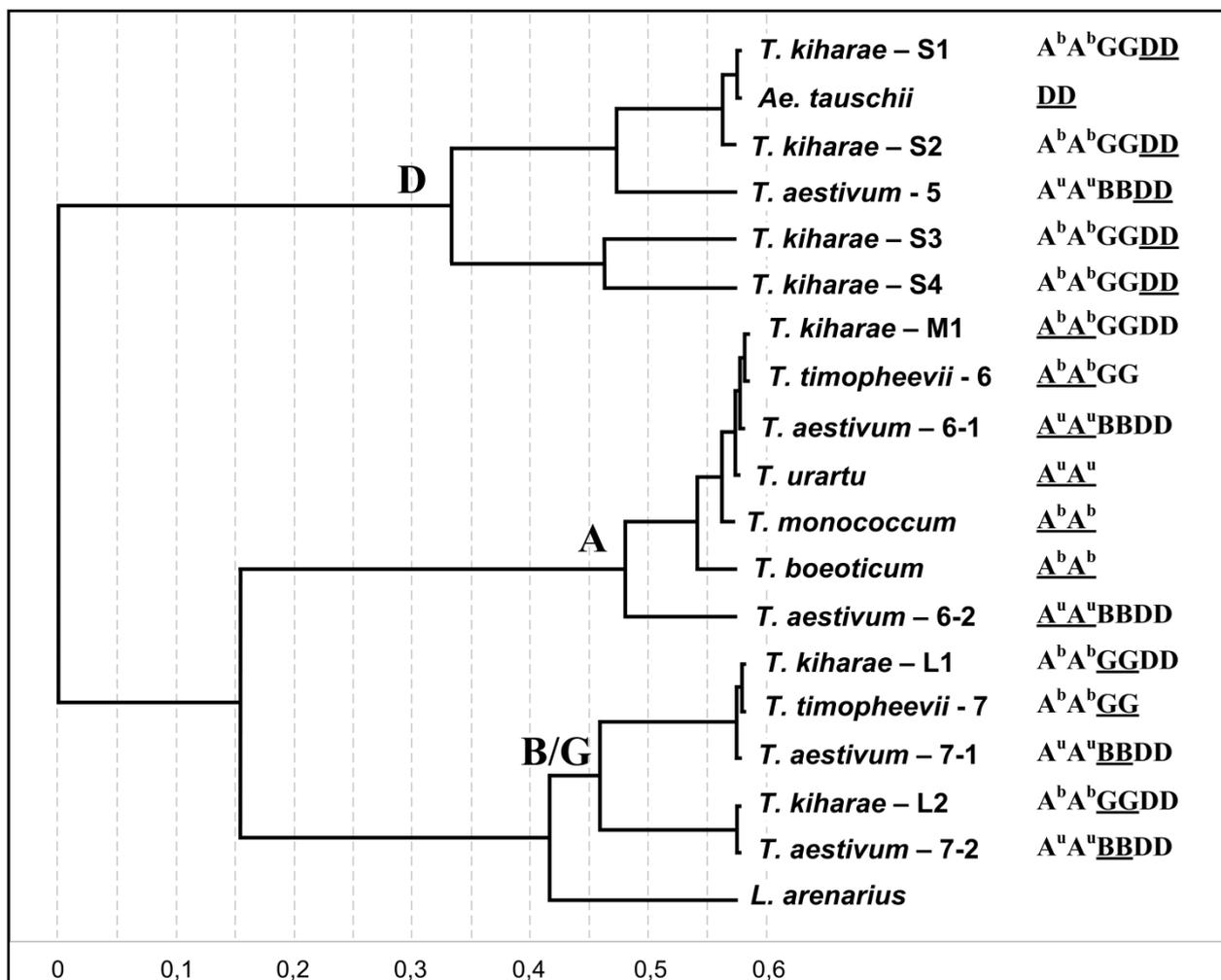


Рис. 6. Филогенетический анализ видов семейства злаковых, основанный на гомологии последовательностей предшественников 4-Cys пептидов. В правой колонке указан геномный состав вида.

Так, гены, кодирующие предшественники S-типа, связаны с геномом D, так как это единственный тип предшественника, обнаруженный у *Ae. tauschii*, и этот тип предшественника обнаружен во всех проанализированных видах, имеющих в составе своего генома геном D (*T. kiharae*, *T. aestivum*).

Гены, кодирующие предшественники M-типа, находятся в геноме A, так как все диплоидные виды, имеющие геном A (*T. urartu*, *T. boeoticum*, *T. monococcum*), имеют гены, кодирующие предшественник M-типа. Кроме этого, все проанализированные полиплоидные виды также имеют гены, кодирующие такой тип предшественника.

Гены, кодирующие предшественники L-типа, связаны с родственными геномами B и G, так как они присутствуют во всех полиплоидах, имеющих данные геномы (*T. kiharae*, *T. aestivum*, *T. timopheevii*). Отсутствие близких гомологов этих генов в диплоидном виде *Ae. speltooides* – доноре генома B, может объясняться тем, что современный вид *Ae. speltooides* отличается от диплоидного вида, принимавшего участие в образовании тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii* и гексаплоидного вида *T. aestivum*.

Кроме непосредственного клонирования целевых генов, нами был проведен поиск последовательностей, гомологичных генам 4-Cys пептидов, в базах данных, доступных на сервере NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Гомологичные последовательности были обнаружены в ячмене, кукурузе, рисе, сорго, картофеле. Очевидно, что подобные белки-предшественники, содержащие несколько пептидных доменов, широко распространены у растений, прежде всего у злаков. Можно предположить, что биосинтез длинных предшественников, расщепляющихся на несколько коротких пептидов, обеспечивает быстрый синтез нескольких активных соединений с разной специфичностью действия, что усиливает и расширяет спектр защиты растения.

Гетерологичная экспрессия гена пептида Tk-AMP-X3 в клетках *E. coli*

Для наработки пептида Tk-AMP-X3 в достаточных для биологических испытаний количествах была использована экспрессия гена этого пептида в клетках *E. coli* в составе гибридного белка с нативным белком бактерий – тиоредоксином, что позволяет повысить выход пептида и обеспечить

правильный фолдинг. В результате был получен рекомбинантный пептид Тк-АМР-ХЗ в количестве, достаточном для биологических испытаний. Выход пептида составил 11 мг/л культуры.

Пептид Тк-АМР-ХЗ был протестирован на антимикробную активность в отношении ряда фитопатогенов: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Aspergillus niger*, *Phoma betae*. Оказалось, что этот пептид не ингибирует рост исследованных микроорганизмов в концентрациях менее 100 мкМ. Возможно, патогены, чувствительные к этому пептиду, не были включены в испытания. Не исключена и вероятность того, что не все пептиды, входящие в состав мультидоменного предшественника, обладают антимикробной активностью, а выполняют в клетке какие-либо иные функции.

Гены 10-Cys пептидов

Выделение и определение структуры пептида LAMP из семян колосняка песчаного

Выделение антимикробных пептидов колосняка песчаного проводили сочетанием различных типов хроматографии: аффинной, эксклюзионной и обращенно-фазовой. В результате были получены два пептида, различающиеся наличием остатка аргинина на С-конце молекулы, названные нами LAMP-1a и LAMP-1b (от “*Leymus antimicrobial peptide*”).

Определение числа остатков цистеина в молекуле пептида LAMP-1a показало, что она содержит 10 остатков, образующих 5 дисульфидных связей. Путем секвенирования по Эдману в сочетании с масс-спектрометрией была установлена полная аминокислотная последовательность пептидов LAMP-1a/b, состоящих из 43/44 аминокислотных остатков:

AQKCGEQGRGAKCPNCLCCGRYGFSGSTPDYCGVGCQSQCRGC(R).

Сравнение аминокислотной последовательности выделенного пептида LAMP-1a с другими антимикробными пептидами растений выявило сходство с гевеином и гевеиноподобными АМП. Наибольшая гомология аминокислотной последовательности пептида LAMP-1a наблюдалась с гевеиноподобным

пептидом WAMP-1a, выделенным ранее в лаборатории из зерновок пшеницы *T. kiharae*. По сравнению с пептидом пшеницы в пептиде колосняка выявлены 8 замен, из которых 5 консервативных, и одна делеция остатка серина. Пептид колосняка, как и пептид пшеницы, относится к новому структурному типу 10-Cys антимикробных пептидов растений.

Гетерологичная экспрессия гена пептида LAMP в клетках *E. coli* и тестирование его антифунгальной активности

Для исследования биологических свойств пептида LAMP-1a было необходимо получить его в значительных количествах. Для этого была проведена экспрессия синтетического гена этого пептида в клетках *E. coli*.

В результате был получен рекомбинантный пептид LAMP-1a в количестве, достаточном для биологических испытаний (2 мг/л культуры).

Исследование биологической активности пептида LAMP-1a выявило его высокую антифунгальную активность. Пептид подавлял прорастание спор грибов *F. oxysporum* и *B. sorokiniana* в микромолярных концентрациях (табл. 1). Для сравнения параллельно проводили испытания биологической активности выделенного ранее гомологичного пептида WAMP-1a.

Таблица 1. Антифунгальная активность пептидов LAMP-1a и WAMP-1a.

Гриб	IC ₅₀ , мкМ (инкубация 24ч/48 ч)	
	LAMP-1a	WAMP-1a
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,1 / 6,0	2,9 / 5,9
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	2,7 / 5,6	2,1 / 6,2

Следует отметить, что хотя пептиды колосняка и пшеницы высоко гомологичны, они, тем не менее, несколько различаются по биологической активности. Можно предположить, что эти различия связаны с неконсервативными заменами Gly28, Asp29 и Ala30 на Thr, Pro и Asp соответственно, а также с делецией остатка серина между Cys-7 и Cys-8, которые были обнаружены в аминокислотной последовательности пептида LAMP-1a.

Клонирование кДНК, кодирующей пептид LAMP, и установление структуры его предшественника

Были получены две последовательности кДНК, названные *lamp-1* и *lamp-2*, кодирующие пептид LAMP-1 и его гомолог LAMP-2. Анализ этих последовательностей показал, что они высококонсервативны и гомологичны ранее установленным последовательностям кДНК *wamp-1* и *wamp-2*, кодирующим пептиды WAMP пшеницы *Triticum kiharae*. кДНК *lamp-1* и *lamp-2* кодируют два предшественника длиной 106 и 109 аминокислотных остатков, названные Lamp-1 и Lamp-2 соответственно (рис. 7).

```
Lamp-1 (1) MKPYMST---RATRVAAILLAVVLAAMLATVNGAQKCGEQGRGAKCPNCLCCGRYGFCG
Lamp-2 (1) MKPYMSTTVLRATRVAAILMAVVLA AVLATAVNGDQMCGEQGRGAKCPNCLCCGRYGFCG
Wamp-1 (1) MKPHMSATVLRAPRVAAILLAVVLAAVLATAVNGAQRCGDQARGAKCPNCLCCGKYGFCG

Lamp-1 (58) STPDYCGVG-CQSQCRGCRDDVMGQTLLGESDSTRAPATSSLSA-----TTAGGP
Lamp-2 (61) STPDYCGVG-CQSQCRGCRDDVMGQTLLGESDSTRAPATSSLSA-----TTAGGP
Wamp-1 (61) SGDAYCGAGSCQSQCRGCRDDVVGOALPAEPGSTRATAASSASARGLNLTATTGGP
```

Рис. 7. Последовательности предшественников пептида LAMP-1 и его гомолога LAMP-2. Подчеркнута последовательность сигнального пептида, последовательности зрелых пептидных доменов выделены полужирным шрифтом, замены выделены серым.

Оба предшественника состоят из сигнального пептида (31 и 34 аминокислотных остатка для Lamp-1 и Lamp-2 соответственно), пептидного домена длиной 44 аминокислотных остатка и С-концевого домена. Было установлено, что сигнальные пептиды предшественников, кроме делеции трех аминокислотных остатков, различаются тремя заменами. Зрелый пептид LAMP-1 идентичен пептидам LAMP-1a/b, выделенным ранее из семян колосняка. Зрелый пептид LAMP-2 отличается от пептида LAMP двумя заменами: Ala1 на Asp и Lys3 на Met. С-концевые домены предшественников идентичны.

Сравнение последовательностей предшественников Lamp с установленной ранее последовательностью предшественника Wamp-1 выявило высокую степень их гомологии (более 75 %). При этом наиболее вариабельной областью является С-концевой домен.

сплайсинга пре-мРНК, обратной транскрипции и встраивания полученной последовательности в геном. Отбор этих генов в процессе эволюции произошел из-за наличия антимикробной активности у продуктов этих генов (LAMPs и WAMPs), что повысило устойчивость растений к патогенам.

Подтверждением происхождения генов *lamp* и *wamp* от генов хитиназ является сходство аминокислотных последовательностей пептидов LAMP и WAMP и хитин-связывающих доменов хитиназ класса I (рис. 8А). Полученные результаты позволяют сделать предположение о ходе эволюции хитин-связывающих белков. Наличие высококонсервативного хитин-связывающего домена в различных белках предполагает их происхождение от общего предка за счет дубликации и слияния генов.

Идентификация генов-гомологов *wamp* у представителей родов *Triticum* и *Aegilops*

Для поиска генов-гомологов *wamp* у представителей родов *Triticum* и *Aegilops* были использованы следующие диплоидные виды: *Ae. speltoides* (геном BB), *Ae. tauschii* (геном DD), *T. monococcum* (геном A^bA^b), *T. urartu* (геном A^uA^u), которые считаются донорами геномов полиплоидных пшениц. Также был проанализирован тетраплоидный вид *T. timopheevii* (геном A^bA^bGG), который является родительской формой для *T. kiharae*.

Кроме этого, была проанализирована геномная ДНК *T. kiharae*, кодирующая пептиды WAMPs. Для этого вида были получены три последовательности ДНК: *wamp-1*, *wamp-2*, *wamp-3*. Последовательности *wamp-1* и *wamp-2* полностью совпадали с соответствующими последовательностями кДНК, что свидетельствует о том, что в кодирующей части генов нет интронов.

В результате путем ПЦР-амплификации с геномной ДНК с использованием праймеров, специфичных к генам *wamp*, было установлено, что виды *T. monococcum* и *T. urartu* (доноры геномов А) не содержат близких гомологов генов *wamp*. В других исследованных видах были обнаружены близкие гомологи генов *wamp* (рис. 9).

Кроме этого, была проанализирована база данных геномных последовательностей *T. aestivum* (сорт Chinese Spring) для поиска гомологов генов *wamp*. Были обнаружены три гомологичные последовательности, названные *wamp-1.2*, *wamp-2* и *wamp-3.1*.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *wamp* показало, что они являются высоконсервативными, особенно области, кодирующие зрелые пептидные домены, а наибольшая вариабельность наблюдается в 3'-нетранслируемых областях.

Анализ распределения генов *wamp* среди видов *Triticum* и *Aegilops* (рис. 9) позволяет сделать предположение о принадлежности определенных генов к определенным геномам. Так, высокогомологичные гены *wamp-1* (*T. kiharae*), *wamp-1.1* (*Ae. tauschii*) и *wamp-1.2* (*T. Aestivum*), вероятнее всего, связаны с геномом D. Ген *wamp-2* относится к геному В или G. *Wamp-3* и *wamp-3.1*, скорее всего, кодируются геномами G и В соответственно.

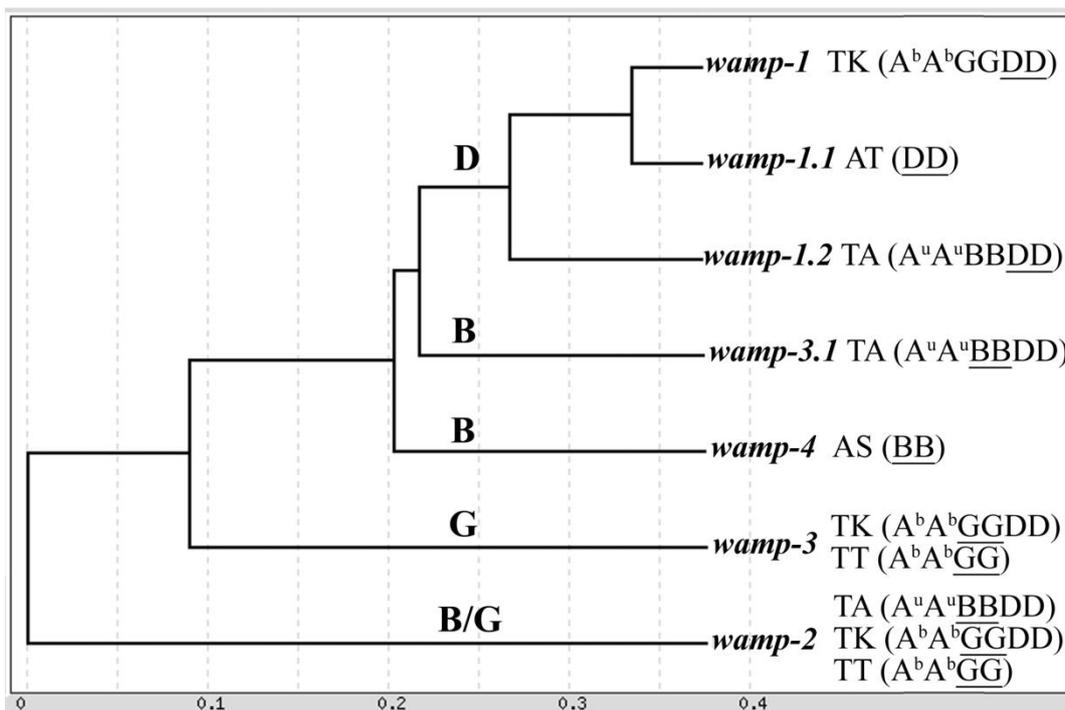


Рис. 9. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей генов *wamp*. TK - *T. kiharae*; TT - *T. timopheevii*; TA - *T. aestivum*; AT - *Ae. tauschii*; AS - *Ae. speltoides*.

Определение антимуtagenного действия пуротионина Tk-AMP-BP на клетки человека

Кроме направлений, сосредоточенных на решении фундаментальной проблемы иммунитета растений и защиты растений от патогенов, было проведено исследование антимуtagenных эффектов антимикробных пептидов растений, на примере одного из тионинов *T. kiharae*, на клетки человека (перевиваемая линия RD). Поиску новых лекарственных агентов, а также соединений, обладающих антиоксидантными свойствами или активизирующих собственную защитную систему клеток, в настоящее время уделяется большое внимание, поэтому обнаружение новых активных молекул имеет важное значение для медицины.

В данной работе впервые исследовали антимуtagenные свойства индивидуального АМП на примере β -пуротионина Tk-AMP-BP, выделенного из семян пшеницы *T. kiharae*. Параллельно проверяли антимуtagenную активность водного экстракта, полученного из проростков этого же вида пшеницы, а также экстракты алоэ и зеленого чая. В качестве мутагена использовался хлорид кадмия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании оптимальной концентрации антимуtagenа (концентрации, вызывающей максимальный эффект) самой высокой активностью обладал пуротионин: коэффициент защиты от мутагенного действия хлористого кадмия достигал 85–88 % при микромолярных концентрациях пептида (8–32 мкг/мл), тогда как уровень защиты, достигаемый при использовании экстракта этого же вида пшеницы в исследованном диапазоне концентраций не превышал 73 %. Водные экстракты алоэ и зеленого чая, широко известные своими антимуtagenными свойствами и использованные в качестве контроля, также обеспечивали более низкий уровень защиты.

Механизм антимуtagenного действия пуротионина не ясен. Можно предположить непосредственное взаимодействие тионина с ионами кадмия, хотя отсутствие свободных сульфгидрильных групп в молекуле пуротионина исключало образование хелатных комплексов с ионами этого металла. Тем не

менее, связывание кадмия за счет каких-либо иных взаимодействий нельзя было исключить.

Можно предположить, что защитное действие пуротионина связано с непосредственным взаимодействием с ДНК. В пользу этого предположения свидетельствует обнаружение в молекулах тионинов НТН (helix-turn-helix) мотива, характерного для ДНК-связывающих белков, к которым относятся регуляторы транскрипции. За счет этого участка (НТН домена) происходит связывание НТН ДНК-связывающих белков с большой бороздкой молекулы ДНК.

Следует также упомянуть возможность влияния пуротионина Tk-AMP-VP на антиоксидантный статус клетки. В пользу этого предположения свидетельствуют данные об участии пуротионинов в окислительно-восстановительных реакциях в клетке. Нельзя исключить участие пуротионинов в активации сигнальных систем, индуцирующих защитные реакции клеток. Так, показано, что некоторые тионины (вискотоксины) обладают иммуномодулирующим действием на клетки млекопитающих.

Таким образом, впервые показано, что пуротионин Tk-AMP-VP пшеницы защищает клетки млекопитающих от воздействия тяжелых металлов, однако установление механизма протекторного действия этого пептида на ДНК требует дальнейших исследований.

Выводы

1. Впервые обнаружено три класса генов, кодирующих сложные, модульные предшественники 4-Cys антимикробных пептидов пшеницы *T. kiharae*. 4-Cys пептиды пшеницы образуются из предшественников, содержащих от пяти до семи пептидных доменов. При этом белок-кодирующие области генов 4-Cys пептидов не содержат интронов.

2. Экспрессия генов 4-Cys пептидов пшеницы усиливается в ответ на заражение фитопатогенными грибами, а также солевой и тепловой стресс. Уровень экспрессии этих генов зависит от вида гриба.

3. Выявлены гены-гомологи 4-Cys и 10-Cys антимикробных пептидов у различных представителей родов *Triticum* и *Aegilops*. На основании гомологии последовательностей ДНК установлена принадлежность определенных генов, входящих в семейства 4-Cys и 10-Cys антимикробных пептидов, к А, В(G) и D геномам полиплоидной пшеницы.

4. Впервые из семян колосняка песчаного *Leymus arenarius* выделен и охарактеризован новый антимикробный пептид LAMP-1, определена его аминокислотная последовательность и биологическая активность.

5. Установлена структура двух кДНК, кодирующих антимикробный пептид LAMP-1 и его гомолог LAMP-2. Пептиды LAMP синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Предшественники 10-Cys пептидов колосняка высокогомологичны предшественникам 10-Cys пептидов пшеницы WAMP.

6. Предложен механизм происхождения генов 10-Cys пептидов от предковых генов хитиназ класса I.

7. Разработана система гетерологичной экспрессии цистеин-содержащих антимикробных пептидов растений в клетках *E. coli*.

8. Впервые показано антимуутагенное действие тионина Tk-AMP-ВР пшеницы *Triticum kiharae* на клетки человека (перевиваемая линия RD) в отношении хлорида кадмия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Utkina L.L.**, Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Korostyleva T.V., Pukhalskiy V.A., Musolyamov A.K., Egorov T.A. Novel antimicrobial peptides from seeds of *Triticum kiharae* and *Leymus arenarius* // Annual Wheat Newsletter. 2009. Vol. 55. P. 181-183.

2. **Уткина Л.Л.**, Жабон Е.О., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.Н., Гришин Е.В., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. Гетерологичная экспрессия синтетического гена нового гевеиноподобного пептида *Leymus arenarius* в клетках *Escherichia coli* // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1645-1651.

3. Одинцова Т.И., Васильева И.М., Коростылева Т.В., **Уткина Л.Л.**, Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.Н., Пухальский В.А., Засухина Г.Д. Антимуутагенная активность β-пуротионина Tk-AMP-ВР пшеницы // Генетика. 2011. Т. 47. № 9. С. 1267-1270.

Тезисы конференций:

1. **Уткина Л.Л.**, Славохотова А.А., Коростылева Т.В., Андреев Я.А., Василевский А.А., Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. Гетерологичная экспрессия генов, кодирующих новые защитные пептиды зерновок пшеницы Кихара (*Triticum kiharae*) и колосняка песчаного (*Leymus arenarius*) в клетках *Escherichia coli*. // В сб.: «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: 5-ый Московский международный конгресс. Т 1. 2009. С. 357-358.
2. **Уткина Л.Л.**, Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А., Кудрявцев А.М. Экспрессия гена нового антимикробного пептида колосняка песчаного *Leymus arenarius* в прокариотической системе. // В сб.: V съезд ВОГИС. Ч. II. 2009. С. 385.
3. Коростылева Т.В., Андреев Я.А., **Уткина Л.Л.**, Одинцова Т.И., Пухальский В.А. Исследование экспрессии генов семейства антимикробных пептидов WAMP-1 пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. в ответ на абиотический стресс. // В сб.: V съезд ВОГИС. Т. 1. 2009. С. 249.
4. **Уткина Л.Л.**, Славохотова А.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А., Егоров Ц.А. Выделение пептида LAMP из семян колосняка песчаного (*Leymus arenarius* L.) и гетерологичная экспрессия кодирующего его гена в клетках *Escherichia coli*. // В сб.: IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2009. С. 300.
5. **Уткина Л.Л.**, Славохотова А.А. Выделение и гетерологичная экспрессия пептида из семян солевыносливого представителя семейства злаковые – колосняка песчаного (*Leymus arenarius*) // В сб.: «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», 9-ая научная конференция молодых ученых. 2009. С. 38-39.
6. **Уткина Л.Л.**, Андреев Я.А. Структурная организация генов антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*. // В сб.: «Биология – наука XXI века»: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2010. Т. 2. С. 191.
7. **Уткина Л.Л.**, Андреев Я.А., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. Структура генов новых антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*. // В сб.: «Симбиоз-Россия 2010» III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов, Нижний Новгород, 2010. С. 113-114.
8. Коростылева Т.В., Славохотова А.А., **Уткина Л.Л.**, Андреев Я.А., Жабон Е.О., Рогожин Е.А., Одинцова Т.И. Исследование нового структурного типа антимикробных пептидов злаков. // В сб.: «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий», Международная научная конференция, посвященная 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной АН Беларуси, Минск, 2010 г. С. 58.
9. **Уткина Л.Л.**, Андреев Я.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. Гены новых антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*. // В сб.: «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», XXIII Международная зимняя молодежная научная школа, Москва, 2011 г. С. 73.
10. **Уткина Л.Л.**, Пухальский В.А., Андреев Я.А. Модульные предшественники антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*. // В сб.: «Биология – наука XXI века»: 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2011. С. 58.
11. **Уткина Л.Л.**, Андреев Я.А., Пухальский В.А., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. Модульные предшественники новых антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae*. // В сб.: V Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2011. С. 293.