

Экспрессия дефензина-1 *Apis mellifera* L. и его взаимодействие с мицеллами додецилфосфатидилхолина по данным ЯМР-спектроскопии

Научный руководитель – Бочаров Эдуард Валерьевич

Тальдаев А.Х.¹, Черная Е.М.²

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail*: t-amir@bk.ru; 2 -
Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail*: emchernaya@gmail.com

В условиях стремительно растущего потребительского спроса эффективность агропромышленности определяет уровень благосостояния населения. В связи с этим, в настоящее время большое внимание уделяется повышению качества и продуктивности сельского хозяйства. Одной из самых важных составляющих эффективного функционирования агропромышленности является поддержание популяции насекомых-опылителей, среди которых наиболее значимыми считаются медоносные пчелы (*Apis mellifera* L.). Неотъемлемой частью защиты пчел-опылителей является профилактика вирусных и бактериальных инфекций насекомых. Последнее стало возможным в том числе благодаря детальным исследованиям биологии пчел. Антимикробные пептиды из группы дефензинов играют важную роль в формировании иммунного ответа пчел, защищая их от потенциально опасных патогенов [1]. Изучение структуры и механизма активности дефензинов медоносной пчелы может пролить свет на молекулярные основы иммунитета насекомых-опылителей и в дальнейшем может помочь в разработке эффективных мер для поддержания численности пчелосемей.

В качестве объекта данной работы был выбран дефензин-1 медоносной пчелы. Как и другие дефензины, дефензин-1, наиболее вероятно, содержит мотив цистинового узла, в котором несколько β -тяжей стабилизированы тремя дисульфидными связями. Предполагают также, что антимикробная активность дефензина-1 обусловлена взаимодействием с клеточной мембраной бактерий, как было показано для ранее изученных представителей семейства [2]. Однако пространственная структура и механизм антибактериальной активности дефензина-1 до сих не были изучены. В рамках данного исследования мы планируем изучить структурно-функциональные характеристики дефензина-1 в мембраноподобном окружении мицелл додецилфосфатидилхолина (ДФХ) методом ЯМР-спектроскопии в растворе.

На данный момент была разработана методика получения рекомбинантного дефензина-1. Он был гетерологически экспрессирован в *E. coli* в виде 6xHis-SUMO-дефензин фьюжн-белка, очищен методом аффинной хроматографии и расщеплен с использованием Ulp1 протеиназы, после чего была проведена окончательная хроматографическая очистка. Молекулярная масса белка была подтверждена с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Рекомбинантный белок подвергли первичному анализу методом ЯМР-спектроскопии. Полученные ¹H,¹H-NOESY ЯМР-спектры позволили предположить, что в водном окружении дефензин-1 имеет устойчивый «дисульфидный кор», образованный несколькими β -тяжами (рис. 1А). Уширение сигналов в полученных спектрах также свидетельствует о частичной неупорядоченности пептида. Данные наблюдения частично согласуются с предсказаниями третичной структуры, полученные с помощью AlphaFold3 (AF3; рис. 1Б). В предсказанной конформации дефензин-1 содержит мотив цистинового узла (рис. 1В), а N- и C-конец имеют α -спиральную конформацию. При взаимодействии с мембраной неупорядоченные участки дефензина-1, наиболее вероятно, приобретают структуру α -спирали. Об этом свидетельствует обужение сигналов и появление характерных H^N_j-H^N_{j+3} NOE-контактов в ¹H,¹H-NOESY ЯМР-спектрах, полученных в окружении мицелл ДФХ (рис.

1А). Предполагаемая структурная реорганизация дефензина-1 типична для неупорядоченных мембраноактивных антимикробных пептидов [3]. Полученные результаты станут первым шагом к получению полноатомной пространственной структуры дефензина-1 медоносной пчелы в воде и в мембраномоделирующих условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-26-00381, <https://rscf.ru/project/25-26-00381/>.

Источники и литература

- 1) Danihlák J., Aronstein K., Petřivalský M. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology // Journal of Apicultural Research. 2015. Т. 54, № 2. С. 123–136.
- 2) Shafee T. M. A. и др. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function // Cell. Mol. Life Sci. 2017. Т. 74, № 4. С. 663–682.
- 3) Sato H., Feix J. B. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2006. Т. 1758, № 9. С. 1245–1256.

Иллюстрации

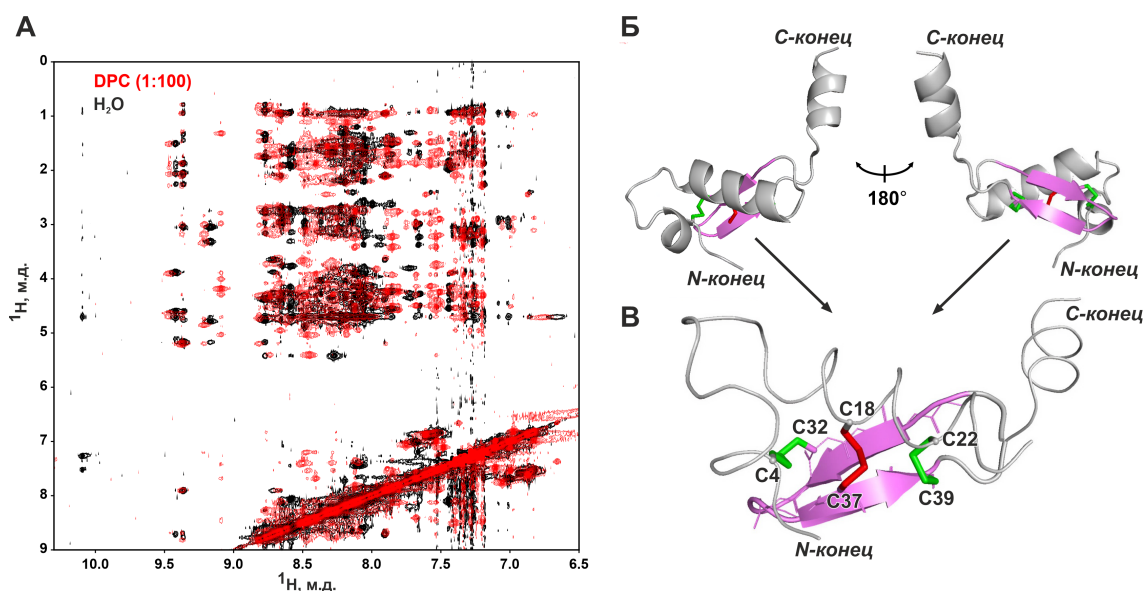


Рис. : 1. Данные о структуре и взаимодействии с мицеллами ДФХ дефензина-1. А – ^1H , ^1H -NOESY ЯМР-спектры дефензина-1 в воде (черный) и в окружении мицелл ДФХ в соотношении пептид:детергент 1:100 (красный); Б – пространственная структура дефензина-1 в водном окружении, предсказанная с помощью АФЗ. В – мотив цистинового узла в структуре дефензина-1 согласно предсказанию АФЗ (дисульфиды, образующие «цистиновое кольцо», показаны зеленым цветом; дисульфид, пересекающий «цистиновое кольцо», показан красным; β -тяжи обозначены розовым).