

**Биоактивные метаболиты**

УДК 577.112:615.322

doi: 10.15389/agrobiologia.2019.1.169rus

**ТИОНИНЫ ПШЕНИЦЫ *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. — НОВЫЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ *Candida albicans* (С.Р. Robin) Berkhout\***

М.П. СЛЕЗИНА, Е.А. ИСТОМИНА, Т.И. ОДИНЦОВА

Растения служат источником биологически активных веществ, важнейшими из которых являются антимикробные пептиды (АМП). АМП — неотъемлемая часть защитного арсенала всех живых существ. Представители семейства тионинов, характерного только для растений, — эффективные ингибиторы растительных патогенов, в том числе бактерий и грибов, что открывает перспективы их практического использования в качестве биопестицидов для защиты растений от болезней. Однако действие тионинов на возбудителей заболеваний животных и человека, практически не изучено. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* — условно-патогенные микроорганизмы, которые встречаются у 70 % людей, не вызывая заболеваний (М. Dadar с соавт., 2018). Однако при ослаблении иммунитета они могут стать причиной серьезных болезней, частота которых значительно возросла в последние два десятилетия. Антимикотики, традиционно используемые для лечения инфекций, вызванных грибами рода *Candida*, не всегда эффективны и безопасны для человека. В связи с этим в мире ведется постоянный поиск новых природных антифунгальных агентов. В настоящем исследовании впервые из пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. с использованием хроматографии на хитине и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выделены два тионина — Тк-АМР-ВР и Тк-АМР-АР1 и методом автоматической деградации по Эдману установлена их аминокислотная последовательность. Цель работы состояла в выделении тионинов из семян высокоустойчивого к фитопатогенам вида пшеницы *T. kiharae*, определении первичной структуры этих тионинов и исследовании их антифунгальной активности против *Candida albicans*. Первичная структура Тк-АМР-ВР была подтверждена при анализе транскриптомов проростков пшеницы методом высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS). Исследование свойств тионина Тк-АМР-ВР впервые показало, что он обладает мощным фунгицидным действием на клетки *C. albicans* при очень низких концентрациях (МИК = 0,78 мкг/мл). По биологической активности в отношении *C. albicans* тионин пшеницы превосходит известные тионины других видов растений. Полученные в настоящей работе результаты позволяют рассматривать тионин пшеницы как перспективную молекулу для создания на ее основе лекарственных препаратов нового поколения для борьбы с микозами, вызванными *C. albicans*.

Ключевые слова: иммунитет растений, антимикробные пептиды, *Triticum kiharae* Dorof. et Migush., пшеница, тионины, микозы, *Candida albicans*.

Хотя у растений нет системы приобретенного иммунитета, как у высших позвоночных, они обладают врожденным иммунитетом, что позволяет им узнавать патогены и подавлять их рост в растительных тканях (1). Для ингибирования патогенов растения используют арсенал «химических средств» защиты, в том числе вторичные метаболиты и вещества белковой природы — антимикробные белки (АМБ) и пептиды (АМП) (2-4). Антимикробные пептиды — важнейшие компоненты врожденного иммунитета как у животных, так и у растений. Это короткие (менее 100 аминокислотных остатков), положительно заряженные, амфифильные полипептиды, которые различаются между собой по первичной и пространственной структуре, а также по так называемому цистеиновому мотиву — порядку расположения остатков цистеина в молекуле пептида (5-9). На основании сходства структуры выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки, гевеино- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды) (5-7). АМП могут использоваться на практике — в

\* Работа выполнена в рамках государственного задания № 0112-2019-0002. Установление нуклеотидных последовательностей генов тионинов методом NGS поддержано грантом РФФ (№ 16-16-00032).

сельском хозяйстве в качестве биопестицидов для защиты растений от болезней, а также в медицине при разработке на их основе лекарственных препаратов нового поколения. По сравнению с традиционными антибиотиками АМП имеют ряд преимуществ: действуют быстро, обладают широким спектром антимикробной активности, активны против изолятов патогенов, устойчивых к антибиотикам, не вызывают появления устойчивых форм патогенов, при совместном применении с антибиотиками усиливают эффект последних, обладают дополнительными полезными для человека активностями (например, подавляют развитие сепсиса).

Тионины — короткие (~ 5 кДа), обогащенные остатками цистеина пептиды, которые впервые были обнаружены в муке пшеницы (10). Позднее их нашли у разных одно- и двудольных растений. В настоящее время известно около 100 последовательностей тионинов из 15 видов растений (11). По числу остатков цистеина, образующих дисульфидные связи, тионины подразделяют на две основные группы — пептиды, содержащие соответственно 6 и 8 остатков цистеина (5). На основании особенностей структуры выделяют пять классов тионинов (12). Уже более 60 лет известно, что тионины ингибируют рост фитопатогенных бактерий и грибов *in vitro* (13). R. Fernandez de Caleyа с соавт. (14) впервые показали, что тионины подавляют рост фитопатогенных бактерий, и выдвинули предположение о защитной роли этих белков *in planta*. Дальнейшие исследования показали, что тионины ингибируют рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также ряда фитопатогенных грибов и оомицетов, причем IC<sub>50</sub> обычно составляет от 1 до 15 мкг/мл (11, 15, 16). В то же время биологическая активность тионинов в отношении патогенных, а также условно-патогенных микроорганизмов человека изучена недостаточно.

*Candida albicans* представляет собой дрожжеподобный грибок, который присутствует в нормальной микрофлоре 70 % людей (в ротовой полости, пищевом тракте, кишечнике, половых путях и на коже), не вызывая заболеваний (17). У людей с ослабленным иммунитетом (ВИЧ-инфицированных, онкобольных и пациентов после трансплантации органов) этот грибок может вызвать серьезные заболевания, включающие поражения слизистых оболочек и общие поражения организма (18–20). Инфекции, вызванные *Candida* spp., включают широкий спектр серьезных заболеваний, таких как инвазивный кандидоз (наличие грибов рода *Candida* в крови), хронический диссеминированный кандидоз, эндокардит, менингит и эндофтальмит (19).

При инвазивных микозах используют пять классов антимикотиков: азолы (производные имидазола и триазола), полиены (полиеновые антибиотики), алиламины, эхинокандины и фторпиримидины (21, 22). Однако лечение таких инфекций перечисленными лекарственными средствами в ряде случаев затруднено из-за ограниченного спектра активности, развития резистентности у патогена и фунгистатического, а не фунгицидного действия препаратов (23). Кроме того, многие из известных антимикотиков токсичны для клеток млекопитающих. Поэтому природные антибиотики (АМП, в частности тионины) могут рассматриваться как перспективные молекулы для борьбы с микозами человека и животных.

В настоящей работе мы исследовали тионины синтетического вида гексаплоидной пшеницы *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. Он обладает высокой устойчивостью к фитопатогенам, что связано с большим разнообразием АМП, выявленных нами в семенах растений этого вида, среди которых два тионина, названные Тк-АМП-ВР и Тк-АМП-АР (24). Ранее мы установили их короткие N-концевые аминокислотные последователь-

ности, и показали, что эти АМП эффективно ингибируют фитопатогенные грибы (24, собственные неопубликованные данные) и проявляют антимутагенную активность, защищая клетки человека от токсического воздействия ионов кадмия (25). В то же время полная первичная структура этих АМП оставалась неизученной, как и их способность ингибировать рост и развитие патогенов человека.

В представленной работе мы впервые установили первичную структуру двух тионинов пшеницы *T. kiharae*, последовательность одного из них — Тк-АМР-ВР — подтвердили методом NGS (next-generation sequencing) и показали, что этот тионин обладает фунгицидным действием на клетки *C. albicans* при очень низких концентрациях.

Цель исследования состояла в выделении тионинов из семян пшеницы *T. kiharae*, установлении их полной аминокислотной последовательности и изучении антифунгальной активности против *C. albicans*.

**Методика.** Тионины выделяли из семян *T. kiharae* (10 г), измельченных в кофемолке. Полученную муку экстрагировали 50 мл смеси кислот (1 М HCl и 5 % HCOOH, «Химмед», Россия) в течение 1 ч при постоянном перемешивании. После центрифугирования (10000 g, 15 мин) белково-пептидную фракцию осаждали из супернатанта пятью объемами охлажденного ацетона (осч, «Химмед», Россия) в течение ночи при 4 °С. Осадок подсушивали на воздухе, растворяли в 5 мл 50 мМ аммоний-бикарбонатного буфера (рН 7,8), центрифугировали (10000 g, 10 мин) и осадок отбрасывали. Супернатант перемешивали в течение 1 ч с 1 г хитина («Sigma», США), предварительно промытого двумя объемами 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ) (puriss. r.a., «Fluka», Швейцария), двумя объемами воды MQ и уравновешенного тремя объемами 50 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (хч, «Реахим», Россия). После иммобилизации белково-пептидной фракции на хитине хитин 3 раза промывали 20 мл 50 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> для удаления несвязавшихся компонентов, после чего связавшуюся с хитином белково-пептидную фракцию элюировали 30 мл 0,1 % ТФУ и разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ, High performance liquid chromatography, HPLC) на колонке Reprosil C<sub>18</sub> (4×250 мм, «Dr. Maisch GmbH», Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила (UHPLC Supergradient, «PanReac Quimica SLU», Испания): 10-50 % раствора Б (80 % ацетонитрил в 0,1 % ТФУ) в растворе А (0,1 % ТФУ), в течение 60 мин (скорость элюции 1 мл/мин, детекция при λ = 214 нм). Фракции анализировали масс-спектрометрически («Bruker Daltonik GmbH», Германия).

Для выделения индивидуальных компонентов фракцию, содержащую тионины, подвергали рехроматографии на колонке Luna C<sub>18</sub> (4,6×150 мм, «Phenomenex, Inc.», США) в градиенте концентрации ацетонитрила (20-50 % раствора Б в растворе А) в течение 30 мин (скорость элюции 0,75 мл/мин, детекция при λ = 214 нм).

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводили, как описано ранее (24). Для этого 10 мкг высушенного пептида растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 6 М гидрохлорид гуанидина и 2 мМ EDTA (BioUltra, «Sigma-Aldrich», США) в 0,5 М Tris-HCl буфере (рН 8,5). Затем к раствору добавляли 2 мкл 1,4 М водного раствора дитиотреитола (BioUltra, «Sigma-Aldrich», США). Полученную реакционную смесь вортицировали и инкубировали 4 ч при 40 °С, после чего добавляли 2 мкл 4-винилпиридина (M<sub>w</sub> ~ 60000, «Sigma-Aldrich», США). Смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем разбавляли 100 мкл 0,1 % ТФУ и наносили на колонку Luna C<sub>18</sub> (4,6×150 мм, «Phenomenex,

Inc.), США). Продукты реакции разделяли в градиенте концентрации ацетонитрила (0-50 % в 0,1 % ТФУ) в течение 30 мин.

РНК выделяли из проростков пшеницы с использованием набора Plant RNA Isolation Aid («Ambion, Inc.», США). Качество полученного препарата РНК проверяли с помощью анализатора Agilent 2100 Bioanalyzer («Agilent», США). Тотальную РНК очищали от фракции рибосомальной РНК, несвязанных рибонуклеотидов и возможных остатков геномной ДНК с использованием готовых реактивов фирмы «Illumina, Inc.» (США) по протоколу производителя.

Библиотеки кДНК получали, как описано (26). Секвенирование библиотек кДНК проводили на приборе Genome Analyzer IIx («Illumina, Inc.», США). Сборку транскриптомов осуществляли с помощью программы Trinity (версия 2.1.0) (27) с цифровой нормализацией на 50-кратное покрытие.

Для поиска транскриптов предшественников тионинов применяли разработанный нами алгоритм, описанный ранее (26).

Масс-спектры снимали на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) Ultraflex II TOF/TOF («Bruker Daltonik GmbH», Германия) в линейном режиме или режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Матрицей служила 2,5-дигидроксibenзойная кислота (Ultra pure, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мг/мл в 50 % (объем/объем) ацетонитриле, содержащем 0,1 % (объем/объем) ТФУ. Для калибровки прибора использовали стандартный набор пептидов и белков в диапазоне молекулярных масс 700-66000 Да («Sigma-Aldrich», США).

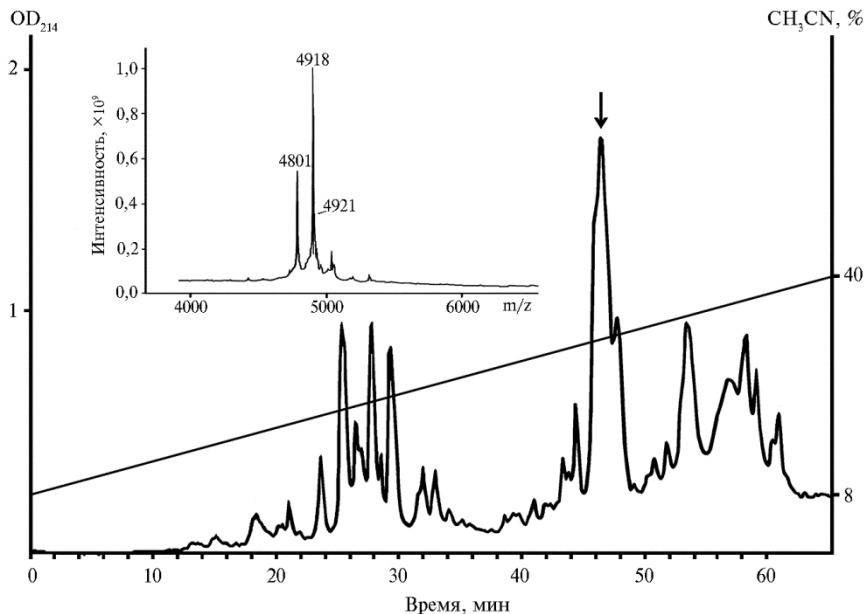
При установлении аминокислотной последовательности восстановленные и алкилированные тионины упаривали на вакуумном концентраторе Savant SpeedVac Concentrator («Thermo Fisher Scientific», США) до объема 50 мкл. Первичную структуру определяли методом ступенчатой деградации по Эдману на секвенаторе Procise 492 («Applied Biosystems, Inc.», США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Поиск гомологичных последовательностей проводили с использованием баз данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)/EMBL-Bank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Антифунгальную активность изучали, используя 3-суточную культуру *S. albicans*, выращенную на агаре Сабуро. Клетки гриба суспендировали в жидкой питательной среде Сабуро ( $1 \times 10^6$  кл/мл). Образец пептида растворяли в питательной среде до концентрации 200 мкг/мл и готовили серию из десяти 2-кратных разведений. В лунки 96-луночных полистироловых планшетов для биологических испытаний («BioCell», США) вносили по 50 мкл суспензии гриба и 50 мкл раствора пептида. Отрицательным контролем служила питательная среда, положительным — 50 мкл суспензии гриба и 50 мкл питательной среды. Плашки инкубировали в течение 72 ч при 28 °С. Затем контрольный образец (без пептида) разбавляли жидкой средой Сабуро (1:1000) и 100 мкл наносили на агар Сабуро в чашках Петри. Чашки инкубировали при 28 °С в течение 48 ч. Рост гриба в контроле принимали за 100 %. Аналогичным образом анализировали опытные образцы, содержащие разные концентрации пептида. Определяли минимальную ингибирующую концентрацию пептида (МИК), при которой происходило полное (100 %) подавление роста гриба. Эксперимент проводили в 3 повторностях.

**Результаты.** Тионины пшеницы выделяли в несколько этапов: на первом этапе белково-пептидную фракцию экстрагировали смесью кислот

(24), на втором — АМП иммобилизовали на хитине (28), на третьем — АМП разделяли методом ОФ-ВЭЖХ и получали фракцию тионинов; на заключительном этапе индивидуальные тионины очищали с применением рехроматографии. На рисунке 1 приведен профиль хроматографического разделения АМП пшеницы на обращенно-фазовой колонке Reprosil C<sub>18</sub>.



**Рис. 1.** Разделение антимикробных пептидов, выделенных из семян пшеницы *Triticum kiharae*, методом ОФ-ВЭЖХ (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография) на колонке Reprosil C<sub>18</sub> (4×250 мм, «Dr. Maisch GmbH», Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила. Фракция, содержащая тионины, отмечена стрелкой. На вставке приведен масс-спектр этой фракции (МАЛДИ-ТОФ масс-спектрометр, «Bruker Daltonik GmbH», Германия). Описание условий хроматографии и масс-спектрометрии см. в разделе «Методика».

Масс-спектрометрический анализ показал, что смесь тионинов элюируется со временем удерживания 46,35 мин. В этой фракции были обнаружены компоненты с молекулярными массами 4918 Да, 4801 Да и 4921 Да, причем первые два преобладали (см. рис. 1). Для очистки тионинов провели рехроматографию содержащей тионины фракции на колонке Luna C<sub>18</sub> (данные не представлены). В результате были очищены два пептида с молекулярными массами 4918 Да и 4801 Да.

Аминокислотные последовательности восстановленных и алкилированных тионинов были определены методом автоматического секвенирования по Эдману (рис. 2). Для сравнения также приведены депонированные в GenBank аминокислотные последовательности тионинов гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* и диплоидных видов *T. urartu* и *T. monococcum* — предполагаемых доноров генома А полиплоидных видов пшеницы, а также тионинов ячменя и ржи. Длина полипептидной цепи у обоих выделенных нами пуротионинов составляет 45 аминокислотных остатков. Тионин *T. kiharae* с молекулярной массой 4918 Да соответствовал по массе и времени элюции с обращенно-фазовой колонки тионину Tk-AMP-VP, охарактеризованному нами ранее по N-концевой аминокислотной последовательности (24). Определение полной аминокислотной последовательности этого пептида подтвердило его идентичность тионину Tk-AMP-VP. Второй пептид с молекулярной массой 4801 Да оказался новым и не описанным ранее. Установление его аминокислотной последовательности и ее сравнение с известными тионинами злаков показало, что он также пред-

ставляет собой тионин, но в отличие от Тк-АМР-ВР относится к семейству  $\alpha$ -тионинов. Этот тионин был обозначен нами Тк-АМР-АР1. Оба тионина *T. kiharae*, как и другие тионины злаков, содержат по 8 остатков цистеина (см. рис. 2). Проведенное нами алкилирование невосстановленных пептидов винилпиридином не привело к изменению их молекулярной массы, следовательно, в их молекулах нет свободных сульфгидрильных групп, а все SH-группы образуют дисульфидные связи, что является характерным признаком АМП растений.

Вид	Аминокислотная последовательность	Пептид
<i>Triticum kiharae</i>	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	Тк-АМР-ВР
<i>T. kiharae</i>	KS <b>CCR</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> AGV <b>CR</b> CKLT <b>ASGLS</b> CPK <b>GFFK</b>	Тк-АМР-АР1
<i>T. aestivum</i> (CAA65312.1)	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	$\beta$ -пуротионин
<i>T. aestivum</i> (CAA65313.1)	KS <b>CCR</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> AGV <b>CR</b> CKLT <b>SSGLS</b> CPK <b>GFFK</b>	$\alpha_B$ -пуротионин
<i>T. urartu</i> (ACL11920.1)	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	$\beta$ -пуротионин
<i>T. urartu</i> (ACL11926.1)	KS <b>CCK</b> STLGRD <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	$\beta$ -пуротионин
<i>T. monococcum</i> (ACL11901.1)	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	$\beta$ -пуротионин
<i>T. monococcum</i> (ACL11917.1)	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>	$\beta$ -пуротионин
<i>Secale cereale</i> (CAA65316.1)	KS <b>CCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> R <b>TR</b> GARGA <b>QKLC</b> AN <b>F</b> CR <b>CKLT</b> SS <b>TS</b> CPK <b>EFFK</b>	пуротионин
<i>Hordeum vulgare</i> (AAA32966.1)	KS <b>CCR</b> STLGRN <b>CYNLC</b> R <b>V</b> RARGA <b>QKLC</b> AGV <b>CR</b> CKLT <b>SSGK</b> CP <b>TGFFK</b>	$\alpha$ -хордоотионин
<i>H. vulgare</i> (1206255A)	KS <b>CCR</b> STLGRN <b>CYNLC</b> R <b>V</b> RARGA <b>QKLC</b> AN <b>A</b> CR <b>CKLT</b> SGL <b>K</b> CP <b>SSFFK</b>	$\beta$ -хордоотионин

**Рис. 2.** Аминокислотные последовательности выделенных тионинов *Triticum kiharae* и тионинов других видов злаков. Множественное выравнивание выполнено в программе CLUSTAL W2. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank. В выравнивании белыми буквами на черном фоне обозначены остатки цистеина, серым цветом выделены различающиеся аминокислотные остатки.

Аминокислотная последовательность пуротионина Тк-АМР-ВР пшеницы *T. kiharae* была подтверждена нами при анализе транскриптомов проростков методом NGS. Для поиска транскриптов предшественников тионинов в массиве данных (data set) секвенирования использовался алгоритм, разработанный нами ранее (26). В результате у пшеницы обнаружили 15 транскриптов, кодирующих предшественники тиониноподобных пептидов, которые состоят из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. У одного предшественника последовательность зрелого пептида полностью совпадала с выделенным из зерновок пуротионином Тк-АМР-ВР (рис. 3). Помимо этого транскрипта был найден транскрипт Тк-амр-ар2, кодирующий близкий гомолог пуротионина Тк-АМР-АР1.

Тк-амр-вр	<u>MGSKGLKGV</u> MVCLLILGLVLEQVQVEG <b>KSCCK</b> STLGRN <b>CYNLC</b> RARGA <b>QKLC</b> ANV <b>CR</b> CKLT <b>SGLS</b> CPK <b>DFFK</b>
Тк-амр-ар2	<u>MGSKGLKGV</u> MVCLLILGLVLEQVQVEG <b>KSCCR</b> STLGRN <b>CYNLC</b> R <b>S</b> RGA <b>QKLC</b> ST <b>V</b> CR <b>CKLT</b> SGL <b>S</b> CPK <b>GFFK</b>
Тк-амр-вр	<u>LVLESNSDEPDTMEYCNL</u> GCRRSSLCDYMVNAAADDEEMKLYVEQCGDACVNFNCNADAGLTSLDA
Тк-амр-ар2	<u>LALESNSDEPDTIEYCNL</u> GCRRSSVCDYMVNAAADDEEMKLYVENCGDACVNFNCNGDAGLTSLDA

**Рис. 3.** Аминокислотные последовательности предшественников тионинов пшеницы *T. kiharae*. Сигнальный пептид выделен подчеркиванием, зрелый пептид — жирным шрифтом, С-концевой продомен — подчеркиванием и курсивом. В зрелом пептиде белыми буквами на черном фоне обозначены остатки цистеина, серым цветом выделены различающиеся аминокислотные остатки.

Сравнение последовательностей полученных пуротионинов с такими тионинов других видов злаков показало, что последовательность Тк-АМР-ВР *T. kiharae* совпадает с последовательностью  $\beta$ -пуротинина *T. aestivum*, а также с одной из двух известных последовательностей  $\beta$ -пуротионинов *T. urartu* и *T. monococcum* (см. рис. 2). Известно, что у гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* три тионина, обозначенные как пуротионины  $\beta$ ,  $\alpha_B$  и  $\alpha_D$ . Их кодируют гены *pur A1*, *pur B1* и *pur D1*, расположенные соответственно на длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D (29). Поскольку ген  $\beta$ -пуротинина связан с геномом А, выявленное нами сходство последовательностей этих тионинов у носителей генома А — *T. kiharae* (AAGGDD),

*T. aestivum* (AABBDD), *T. urartu* (A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>) и *T. monococcum* (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) неудивительно. Последовательности  $\alpha$ -пуротионинов также высококонсервативны: у Tk-AMP-AP1 *T. kiharae* и  $\alpha$ -пуротионина *T. aestivum* последовательности различаются одной заменой в положении 34 (Ser→Ala).

Поскольку тионин Tk-AMP-BP *T. kiharae* получили в количестве, достаточном для биологических испытаний, именно его использовали для анализа ингибирующей активности против *C. albicans*. Проведенные исследования показали, что этот тионин при очень низкой концентрации (МИК = 0,78 мкг/мл) способен полностью ингибировать рост *C. albicans*, то есть он обладает мощным фунгицидным действием в отношении этого патогена. Следует отметить, что активность тионинов других видов растений была ниже. Так, тионин арабидопсиса подавлял рост *C. albicans* на 80 % лишь при концентрации 2,5 мкг/мл (18), а тиониноподобный белок *Capsicum annuum* проявлял еще меньшую активность (IC<sub>50</sub> = 10 мкг/мл) (30). Механизм действия тионина пшеницы на клетки *C. albicans* неизвестен. Считается, что биологическая активность тионинов связана с непосредственным взаимодействием с мембранами клеток-мишеней, и были предложены три модели такого взаимодействия (11). Исследования действия пуротионинов на *Rhizoctonia solani* показали, что лизис клеток этого гриба вызван резким увеличением проницаемости мембран (31), по всей видимости, за счет образования пор (32). Можно предположить, что аналогичный механизм реализуется и в случае гриба *C. albicans*, однако подобное предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Итак, из зерновок пшеницы *Triticum kiharae* нами впервые выделены два пуротионина Tk-AMP-BP и Tk-AMP-AP1 и определена их полная аминокислотная последовательность. Последовательность пуротионина Tk-AMP-BP была подтверждена при анализе транскриптомов проростков методом NGS. Впервые показано, что пуротионин Tk-AMP-BP обладает мощным фунгицидным действием на клетки *Candida albicans*, действуя в очень низких концентрациях (МИК = 0,78 мкг/мл) и превосходя по активности тионины других видов растений. Высокая фунгитоксичность тионина пшеницы в отношении *C. albicans* открывает перспективы использования этого антимикробного пептида для создания на его основе новых лекарственных препаратов для борьбы с кандидозами.

Авторы выражают благодарность Е.О. Жабон за проведение биологических испытаний.

ФГБУН Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН,

119333 Россия, Москва, ул. Губкина, 3,  
e-mail: omey@list.ru, mer06@yandex.ru, odintsova2005@rambler.ru ✉

Поступила в редакцию  
17 июля 2018 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, V. 54, № 1, pp. 169-177

## THIONINS OF WHEAT *Triticum kiharae* Dorof. et Migush. ARE NOVEL POTENT INHIBITORS OF *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout

M.P. Slezina, E.A. Istomina, T.I. Odintsova

Vavilov Institute of General Genetics RAS, 3, ul. Gubkina, Moscow, 119333 Russia, e-mail omey@list.ru, mer06@yandex.ru, odintsova2005@rambler.ru (✉ corresponding author)

ORCID:

Slezina M.P. orcid.org/0000-0003-1653-5993

Odintsova T.I. orcid.org/0000-0002-5563-9755

Istomina E.A. orcid.org/0000-0001-6426-6009

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors are grateful to E.O. Zhabon for executed biological tests.

## Abstract

Plants serve as a source of biologically active compounds, the most important of which are antimicrobial peptides (AMPs). AMPs represent an integral part of the defense arsenal of all living beings. Members of the thionin family found only in plants are effective inhibitors of plant pathogens, including bacteria and fungi, which opens up prospects for their practical application as bio-pesticides to protect plants from diseases. However, the effect of thionins on animal and human pathogens has not been sufficiently studied. Yeast-like fungi of the genus *Candida* are opportunistic pathogenic microorganisms that occur in 70 % of people without causing disease (M. Dadar et al., 2018). However, in immune-compromised individuals, they can cause a number of serious diseases, the frequency of which has increased significantly in the last two decades. Antimycotics traditionally used to treat *Candida* infections are not always effective and safe for humans. In this regard, the world is constantly searching for new natural antifungal agents. The aim of this work was to isolate thionins from the kernels of the highly pathogen-resistant wheat species *Triticum kiharae* Dorof. et Migush., determine their primary structure, and assay antifungal activity against *Candida albicans*. For the first time from the wheat *T. kiharae* using chromatography on chitin and reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), 2 thionins Tk-AMP-BP and Tk-AMP-API were isolated, and their amino acid sequences were determined by automated Edman degradation. The primary structure of Tk-AMP-BP was confirmed by transcriptome high-throughput sequencing (NGS) of wheat seedlings. The study of antimicrobial activity of Tk-AMP-BP showed that it has potent fungicidal effect on *C. albicans* cells at very low concentrations (MIC = 0.78 µg/ml). The biological activity of the wheat thionin against *C. albicans* was higher than that of thionins from other plant species. The results obtained in this work allow us to consider the wheat thionin as a promising molecule for the development on its basis of next-generation drugs to treat *C. albicans* infections.

Keywords: plant immunity, antimicrobial peptides, *Triticum kiharae* Dorof. et Migush., wheat species, thionins, mycoses, *Candida albicans*.

## REFERENCES

1. Dangl J.L., Jones J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 2001, 411: 826-833 (doi: 10.1038/35081161).
2. Selitrennikoff C.P. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 2883-2894 (doi: 10.1128/aem.67.7.2883-2894.2001).
3. Manners J.M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. *Genome Biology*, 2007, 8: 225-234 (doi: 10.1186/gb-2007-8-9-225).
4. Sels J., Mathys J., De Coninck B.M.A., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, 2008, 46(11): 941-950 (doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011).
5. Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G.W., Osborn R.W., Nielson K. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, 16(3): 297-323 (doi: 10.1080/07352689709701952).
6. Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, 1998, 47(6): 479-491 (doi: 10.1002/(sici)1097-0282(1998)47:6<479::aid-bip6>3.0.co;2-k).
7. Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A., Alamillo J.M., Lopez-Solanilla E., Berrocal-Lobo M., Poza-Carrion C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.*, 2001, 498(2-3): 219-222 (doi: 10.1016/s0014-5793(01)02456-5).
8. Egorov T.S.A., Odintsova T.I. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2012, 38(1): 7-17 (in Russ.).
9. Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* (Basel), 2015, 8(4): 711-757 (doi: 10.3390/ph8040711).
10. Balls A.K., Hale W.S., Harris T.H. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 1942, 58: 360-361.
11. Stec B. Plant thionins — the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, 63(12): 1370-1385 (doi: 10.1007/s00018-005-5574-5).
12. Bohlmann H., Apel K. Isolation and characterization of cDNAs coding for leaf-specific thionins closely related to the endosperm-specific hordothionin of barley *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, 207(2-3): 446-454 (doi: 10.1007/BF00331614).
13. Stuart L.S., Harris T.H. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein isolated from unbleached wheat flour. *Cereal Chemistry*, 1942, 19: 288-300.
14. Fernandez de Caleyra R., Gonzalez-Pascual B., Garcia-Olmedo F., Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 1972,



- 23(5): 998-1000.
15. Bohlmann H., Broekaert W.F.A The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, 13: 1-16 (doi: 10.1080/07352689409701905).
  16. Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30(10): 1713-1719 (doi: 10.1007/s10529-008-9756-8).
  17. Dadar M., Tiwari R., Karthik K., Chakraborty S., Shahali Y., Dhama K. *Candida albicans* — biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control — an update. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117: 128-138 (doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028).
  18. Bozhko A.V., Kotova A.L. *Materialy II Vsesoyuznoi konferentsii «Aktual'nye voprosy klinicheskoi mikrobiologii v neinfektsionnoi klinike»* [Proc. of II All-Union Conference «Actual issues of clinical microbiology in non-infectious diseases clinic». Part 2]. Barnaul, 1988, chast' 2: 154-156 (in Russ.).
  19. Antinori S., Milazzo L., Sollima S., Galli M., Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 2016, 34: 21-28 (doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.029).
  20. Kim J.Y. Human fungal pathogens: why should we learn? *J. Microbiol.*, 2016, 54(3): 145-148 (doi: 10.1007/s12275-016-0647-8).
  21. Bassetti M., Peghin M., Timsit J.F. The current treatment landscape: candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(suppl 2): ii13-ii22 (doi: 10.1093/jac/dkw392).
  22. Robbins N., Wright G.D., Cowen L.E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(5): FUNK-0002-2016 (doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016).
  23. Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 2015, 58(S2): 2-13 (doi: 10.1111/myc.12330).
  24. Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides*, 2005, 26: 2064-2073 (doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.007).
  25. Odintsova T.I., Vasil'eva I.M., Korostyleva T.V., Utkina L.L., Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Shiyan A.N., Pukhal'skii V.A., Zasukhina G.D. *Genetika*, 2011, 47(9): 1267-1270 (in Russ.).
  26. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina EA, Korostyleva T.V., Kasianov A.S., Kovtun A.S., Makeev V.J., Shcherbakova L.A., Kudryavtsev A.M. Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: a focus on structural diversity and role in induced resistance. *Peer J.*, 2019, 7: e6125 (doi: 10.7717/peerj.6125).
  27. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652 (doi: 10.1038/nbt.1883).
  28. Oita S., Ohnishi-Kameyama M., Nagata T. Binding of barley and wheat alpha-thionins to polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(5): 958-964 (doi: 10.1271/bbb.64.958).
  29. Sánchez-Monge R., Delibes A., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F. Homoeologous chromosomal location of the genes encoding thionins in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.*, 1979, 54(2): 61-63 (doi: 10.1007/BF00265470).
  30. Taveira G.B., Mathias L.S., da Motta O.V., Machado O.L., Rodrigues R., Carvalho A.O., Teixeira-Ferreira A., Perales J., Vasconcelos I.M., Gomes V.M. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*, 2014, 102(1): 30-39 (doi: 10.1002/bip.22351).
  31. Oard S., Rush M.C., Oard J.H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(1): 169-180 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x).
  32. Llanos P., Henriquez M., Minic J., Elmorjani K., Marion D., Riquelme G., Molgo J., Benoit E. Neuronal and muscular alterations caused by two wheat endosperm proteins, puroindoline-a and alpha-purothionin, are due to ion pore formation. *Eur. Biophys. J.*, 2004, 33(3): 283-284 (doi: 10.1007/s00249-003-0353-4).