

УДК 547.963.32:577.112.083

## РИБОСОМ-ИНАКТИВИРУЮЩИЕ БЕЛКИ (RIPS) БУЗИНЫ ЧЕРНОЙ *SAMBUCUS NIGRA*\*

© *Х.Т. Агзамхужаева, Ю.И. Ощепкова\*\**, Ш.И. Салихов

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,  
ул. Мирзо Улугбека, 83, Ташкент, 100125 (Республика Узбекистан),  
e-mail: joshepkova05@rambler.ru*

Цель данной работы – изучение состава рибосом-инактивирующих белков из коры и ягод бузины черной *Sambucus nigra* L., произрастающей на территории Республики Узбекистан.

Исследован состав рибосом-инактивирующих белков в коре и ягодах бузины черной *Sambucus nigra* L., собранной в Ботаническом саду Республики Узбекистан. По данным ВЭЖХ-МС/МС секвенирования, в образце из коры установлено наличие 9-и RIP-2. На основе полученных аминокислотных последовательностей с применением программы CLUSTAL O (1.2.4) проведено сравнение аминокислотной последовательности идентифицированных RIP типа 2 и определены сходные и консервативные остатки, которые в дальнейшем помогут идентифицировать новые RIP. В ходе выполнения исследований с высокой долей вероятности идентифицирован триптический-пептид LSLVVLQMVSEAAAR, содержащий мотив активного центра RIP (EAAR). Масс-спектральные данные по этому фрагменту позволят в дальнейшем проводить идентификацию других RIP-1/2 из других образцов природного происхождения.

Из ягод выделено 2 RIP, один из которых находится в восстановленной форме, содержащей одну цепь. При установлении аминокислотной последовательности в выделенном RIP из ягод бузины черной с молекулярной массой 62 337 Да подтверждена наша гипотеза об идентификации по триптическому пептиду, содержащему активный центр RIP (EAAR).

*Ключевые слова:* *Sambucus nigra*, кора, ягоды, рибосом-инактивирующие белки, масс-спектр, *De novo* секвенирование.

### **Введение**

Сельскохозяйственные культуры часто страдают от атак грибов, вирусов и бактерий, которые негативно сказываются на выживании, производстве биомассы, урожайности и качестве продукции во всем мире [1, 2]. Известно, что растения владеют некоторыми специфическими метаболическими путями для синтеза большого количества ценных белков, и эти белки можно использовать для профилактики и лечения заболеваний [3]. Было высказано предположение, что такие белки, инактивирующие рибосомы (RIP) из растений, придают устойчивость к болезням [4]. RIPs могут каталитически инактивировать эукариотические рибосомы, которые ингибируют синтез белка при трансляции [5].

Белки, инактивирующие рибосомы (RIP), относятся к классу ферментов, обнаруженных в растениях, грибах, водорослях и бактериях. RIP проявляют активность рРНК N-β-гликозилазы, которая приводит к расщеплению остатка аденина в консервативном сайте 28S рРНК [6]. Расщепление этой единственной N-гликозидной связи необратимо и мешает ассоциации между факторами элонгации и рибосомой, вызывая ингибирование синтеза белка [7]. Эта инактивация происходит путем удаления специфического аденинового остатка из высококонсервативной (сарцин/рициновой) петли большой рибосомной РНК [1, 2].

---

*Агзамхужаева Хилола Тожимуродовна* – младший научный сотрудник лаборатории химии белков и пептидов, e-mail: micom.uz@gmail.com

*Ощепкова Юлия Игоревна* – доктор химических наук, профессор, заместитель директора, e-mail: joshepkova05@rambler.ru

*Салихов Шавкат Исмаилович* – заведующий лабораторией химии белков и пептидов, академик, e-mail: joshepkova05@rambler.ru

\* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20230311724s

\*\* Автор, с которым следует вести переписку.

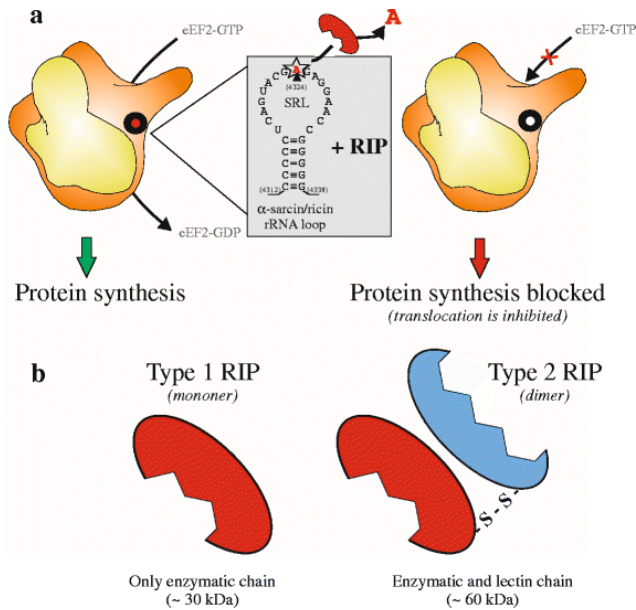


Рис. 1. Ферментативные и структурные свойства RIP. а – RIP распознают  $\alpha$ -сарцин/рициновую петлю (SRL), выделенную серым цветом, рРНК 28S на рибосомах. Депуринизация А 4234 под действием N-гликозилазы ингибирует роль эукариотического фактора элонгации 2 (eEF2) в стимулировании GTP-зависимой транслокации растущей белковой цепи из А-сайта в Р-сайт рибосомы, с последующей остановкой синтеза белка; б – структурное представление RIP типа 1 (одна ферментативная цепь) и RIP типа 2 (димерный белок, состоящий из ферментативной цепи и лектинового домена)

В зависимости от архитектуры домена RIP можно разделить на две основные категории – RIP типа 1 и RIP типа 2.

RIP типа 1, такие как сапорин и трихосантин, представляют собой группу одноцепочечных белков с ферментативной активностью. RIP типа 2 представляют собой химерные белки, состоящие из А-цепи с активностью ингибирования синтеза белка и В-цепи с активностью связывания углеводов/лектинов [3]. Помимо хорошо охарактеризованной активности депуринирующих рибосом в «петле сарцина/рицина» *in vitro*, их физиологическая функция (функции) еще полностью не изучена, и вопрос о том, почему некоторые растения должны синтезировать RIP, остается открытым. В литературных источниках сообщается о различных RIP примерно у 50 видов растений, охватывающих 17 семейств. Некоторые семейства включают многие виды, продуцирующие RIP, в частности такие как *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae* и семейства, принадлежащие к надотряду *Caryophyllales* [4, 5].

Виды *Sambucus* широко используются как в пищевых, так и в медицинских целях. *Sambucus* принадлежат к семейству Adoxaceae и включают кустарники, а также небольшие деревья, произрастающие в Европе, Азии, Америке и Африке. Виды *Sambucus* имеют сложную смесь различных типов RIP и родственных лектинов. Наличие RIP и лектинов изучено в основном у *Sambucus ebulus* L. (бузина карликовая), *Sambucus nigra* L. (бузина европейская), *Sambucus sieboldiana* Blume ex Graebn. (бузина японская) и *Sambucus racemosa* L. (бузина красная). Было показано, что *Sambucus ebulus* L., *Sambucus nigra* L., *Sambucus sieboldiana* Blume ex Graebn и *Sambucus racemosa* L. содержат RIP типа 1, гетеродимерные RIP типа 2 (одна цепь А и одна цепь В), тетрамерные RIP типа 2 (две цепи А и две В-цепи), а также мономерные и гомодимерные чистые лектины (одна или две В-цепи соответственно).

RIP типа 1 состоят из одной полипептидной цепи, проявляющей ферментативную активность. Они были обнаружены в листьях *S. ebulus* (эбулитины  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ) [6] и плодах *S. nigra* (нигритины f1 и f2) [7].

RIP типа 2 могут быть гетеродимерными или тетрамерными. Гетеродимерные RIP типа 2 происходят из одного предшественника, включающего сигнальный пептид и два разных домена, разделенных линкерной последовательностью [8–10]. После посттрансляционного процессинга N-концевая область предшественника дает А-цепь с N-гликозидазной активностью, тогда как С-концевая область превращается в углеводсвязывающую В-цепь. После экспрессии обе цепи остаются связанными дисульфидным мостиком. Гетеродимерные RIP 2 типа были обнаружены в нескольких частях *S. ebulus*, *S. nigra*, *S. sieboldiana* и *S. racemosa*. *S. ebulus* содержит гетеродимерные RIP типа 2 в листьях (эбулин 1) [11], корневище [12] и плодах [13]. *S. nigra* содержит гетеродимерные RIP 2 типа во всех частях исследованного растения: коре (например, нигрин б) [14–17], листьях [18], плодах [19, 20] и семенах [21]. Кора *S. sieboldiana* и *S. racemosa* также содержит гетеродимерные RIP 2-го типа [8, 22].

Целью настоящих исследований было изучение состава рибосом-инактивирующих белков из коры, листьев и плодов бузины черной *Sambucus nigra* L., произрастающей на территории Республики Узбекистан.

### Экспериментальная часть

*Получение суммы RIP.* Кору бузины, листья и плоды лиофилизировали и измельчали в кофемолке. Измельченный материал экстрагировали буферной смесью 0.005 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=7.5, дополнительно содержащей 0.28 М NaCl (соотношение сырье : буфер 1 : 10).

Экстракцию проводили в течение ночи при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 4 °С. Экстракт центрифугировали 30 мин при 6000 об./мин и супернатант отделяли. pH супернатанта довели до 4.0 1 М уксусной кислотой и центрифугировали в течение 30 мин при 6000 об./мин.

Полученные супернатанты фракционировали с помощью дробного осаждения сульфатом аммония, насыщая раствор до 20 и 80% насыщения. Осадок, полученный при 80%-м насыщении, отделяли и растворяли в буфере и диализовали против 0.02 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер pH=7.5 с целью избавления от присутствующих ионов сульфата при 4 °С.

*Электрофорез белков в ПААГ.* Электрофорез белков проводили в 12% ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [23].

*Масс-спектрометрический анализ образца экстракта коры.* Для создания масс-спектров белковую экстракцию проводили с использованием 96% этанола и 70% водного раствора муравьиной кислоты по стандартной методике, рекомендованной Bruker для проведения MALDI-TOF. Полученный супернатант (1 мкл), содержащий белковый экстракт, наносили на ячейку 96-луночного MSP-чипа (MSP 96 target polished steel BC, micro Scout Target). На поверхность супернатанта в чипе наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор  $\alpha$ -Циано-4-гидроксикоричной кислоты ( $\alpha$ -HCCA) с 50% содержанием ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты (TFA)) и высушивали при комнатной температуре.

Чип с нанесенными на него образцами помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр microflex LT.

После позиционирования чипа в ионизационной камере и достижения необходимых значений рабочих параметров прибора проводили калибровку с помощью нанесенного калибровочного стандарта. После этого приступали к сбору спектров в ручном или автоматическом режиме, устанавливая необходимые параметры. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц). Анализируемый диапазон масса/заряд составлял 10000–80000 Да.

*Инкубирование образца с использованием дитиоэритритола.* Высушенный образец растворяли в 35 мкл раствора, содержавшего 6М гуанидингидрохлорида и 3 мМ ЭДТА в 0.5 М Трис-HCl pH 8.5 и добавляли 5 мкл изопропанола. Пробирку встряхивали на вортексе и осаждали центрифугированием, затем добавляли 2 мкл 0.7 М дитиоэритритола в изопропаноле (на 10 мкл изопропанола 0.5 мг 1,4-дитиоэритритола), реакционную смесь оставляли в термостате при 40 °С на 24 ч. По истечении этого времени в реакционную смесь добавляли 30 мкл 0.1% ТФУ для остановки реакции, центрифугировали и полученный образец анализировали на MALDI-TOF масс-спектрометре.

*Трипсинолиз белка.* Дисульфидные мостики восстанавливали, добавляя 2 мкл дитиотреитола (0.1 М в воде) и инкубируя образцы при 80 °С в течение 20 мин. Затем сульфгидрильные группы алкилировали, добавляя 3 мкл йодацетамида (0.25 М в воде) и инкубируя в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. Избыток йодацетамида нейтрализовали путем добавления 20 мкл дитиотреитола (0.2 М в воде) и инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч. Расщепление трипсином осуществляли с использованием соотношения фермента к субстрату 1 : 50, инкубируя в течение ночи при 37 °С. Ферментативный гидролиз останавливали добавлением 50 мкл муравьиной кислоты (10% по объему в воде). Образцы хранили при -20 °С до проведения анализа. Непосредственно перед инъекцией образцы центрифугировали при 15000 об./мин в течение 10 мин при 4 °С и надосадочную жидкость сохраняли для анализа.

*ВЭЖХ-МС/МС анализ.* Анализ ВЭЖХ-МС/МС проводили с использованием UPLC Acquity I Class Plus (Waters, MA, USA) в сочетании с Vion IMS QToF (Waters, MA, USA). Образцы хранили охлажденными до 4 °С в автосэмплере, а температура термостата колонки составляла 40 °С. Была установлена колонка Waters Acquity UPLC с белком ВЕН С4 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм, 300 Å), которая была отмечена значительно меньшим удержанием белка в колонке по сравнению с колонкой с лигандом С18. Подвижная фаза А представляла собой 0.1% муравьиной кислоты в воде (об./об.), а в качестве подвижной фазы В использовали ацетонитрил, содержащий 0.1% муравьиной кислоты. Скорость потока устанавливали равной 0.4 мл/мин. Для каждого анализа вводили 10 мкл образца. Градиент начинался при 80% растворителя А и уменьшался до 70% в течение 3 мин, после чего следовал линейный градиент от 70 до 40%. Для генерации исходных ионов использовали положительную ионизацию электрораспылением (ESI). Режим регистрации был MS E,

который был предоставлен Waters. Массовое сканирование варьировалось от 500 м/з до 2000 м/з. Время сканирования составляло 0.2 с, в течение которого низкая энергия столкновения CID была установлена на уровне 6 эВ, а линейное изменение высокой энергии столкновения начиналось с 20 эВ до 30 эВ. Температура десольватации и температура источника составляли 400 и 100 °С, соответственно. Скорость потока газа десольватации и скорость потока конического газа составляли 650 л/ч и 50 л/ч, соответственно. Капиллярное напряжение составляло 3.2 кВ. Сбор и обработка данных проводились с использованием Unify 1.9.3.

### Обсуждение результатов

Из лиофилизованных и измельченных коры, листьев и плодов бузины черной *Sambucus nigra* получены экстракты, предположительно содержащие рибосом-инактивирующие белки.

Полученные экстракты были проанализированы электрофоретическим методом в 12% ПААГ. Было обнаружено, что во всех экстрактах присутствуют в разной степени выраженные полосы в интервале 30.0–67.0 кДа, соответствующие RIP. Наиболее ярко выраженные полосы, соответствующие RIP-2 в интервале молекулярных масс 60–67 кДа, содержатся в экстрактах, полученных из коры бузины черной *Sambucus nigra*.

Для идентификации выделенных соединений на спектрометре Bruker MicroFlex проведен масс-спектральный MALDI-TOF белкового состава, полученного из коры и обнаружены белки в диапазоне масс 61–63.0 кДа, по массе соответствующие RIP-2 (рис. 3). Так как RIP-2 состоит из двух субъединиц, для подтверждения присутствия в экстракте RIP была проведена инкубация образца в присутствии DTT. В присутствии DTT происходит восстановление дисульфидных мостиков.

Проведенный повторный масс-спектральный MALDI-TOF показал, что инкубация с DTT (50 mM) приводит к исчезновению сигнала в диапазоне масс 61–63.0 кДа и увеличению сигнала в диапазоне 30–32 кДа, что соответствует распаду RIP-2 на две субъединицы и свидетельствует о дисульфидной природе выделенных RIP (рис. 4).

Для получения более подробной информации о содержащихся в экстрактах коры RIP-2 и проведения сравнительного анализа с RIP, выделенными ранее из видов *Sambucus*, было проведено ВЭЖХ-МС/МС секвенирование белков из экстракта коры после реакции трипсинолиза. По данным ВЭЖХ-МС/МС секвенирования установлено наличие в образце из коры 9-и RIP-2 (табл.).

Кора бузины черной *Sambucus nigra* L. содержит сложную смесь RIP 2-го типа; среди которых идентифицированы Nigrin b [24], SNAI [25], SNAI' [17], SNAIf и SNLRP [15].

Nigrin b имеет структуру и ферментативную активность, аналогичную таковой у ридина и других белков, инактивирующих рибосомы (RIP), и при этом гораздо менее токсичен для клеток и животных. Цепь А в данном белке отвечает за ингибирование синтеза белка за счет каталитической инактивации 60S рибосомных субъединиц путем удаления аденина из положения 4324 28S рРНК. В-цепь представляет собой галактозоспецифический лектин, который облегчает связывание нигрина b с клеточной мембраной, предшествующее эндоцитозу.

SNAI' очень похож на SNAI, но в нем отсутствует дополнительный остаток цистеина, который участвует в образовании дисульфидного мостика между В-цепями SNAI.

SNAI' представляет собой димер из двух пар [A-s-s-B], тогда как SNAI представляет собой тетрамер из четырех таких пар. Открытие SNAI' не только демонстрирует, что наличие или отсутствие единственного цистеинового остатка оказывает глубокое влияние на молекулярный анализ структуры RIP типа 2, но также дополнительно иллюстрирует сложность смеси RIP типа 2 в коре бузины.

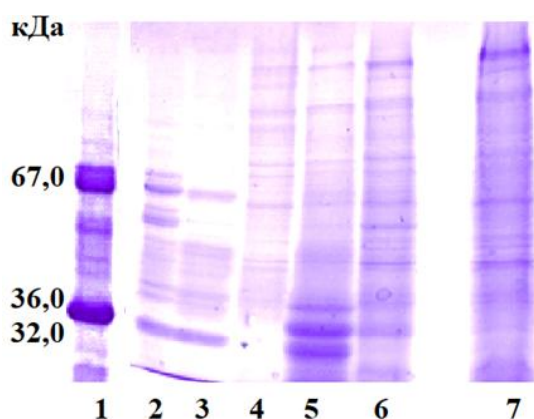


Рис. 2. Электрофореграмма маркеров: 1 – БСА 67.0 кДа, эритропоэтин – 32.0–36.0 кДа, 2 – экстракт из плодов *Sambucus nigra*; 3 – 80% насыщение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  экстракта из коры *Sambucus nigra*; 4 – 20% насыщение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  экстракта из коры *Sambucus nigra*; 5 – экстракт из коры *Sambucus nigra*; 6 – экстракт из листьев *Sambucus nigra*; 7 – 80% насыщение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  экстракта из листьев

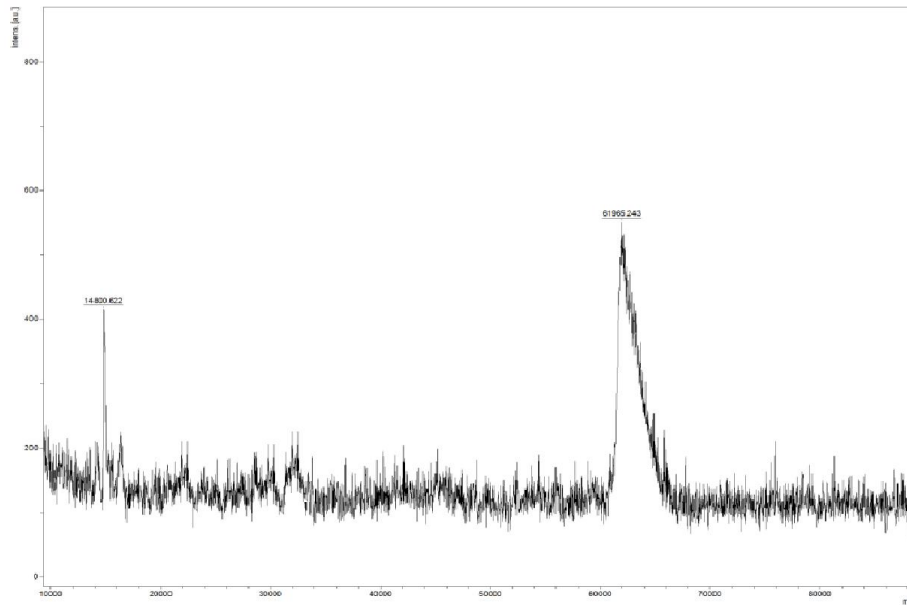


Рис. 3. Масс-спектральный MALDI-TOF анализ масс белков экстракта коры *Sambucus nigra*, определенная с помощью анализа MALDI-TOF MS

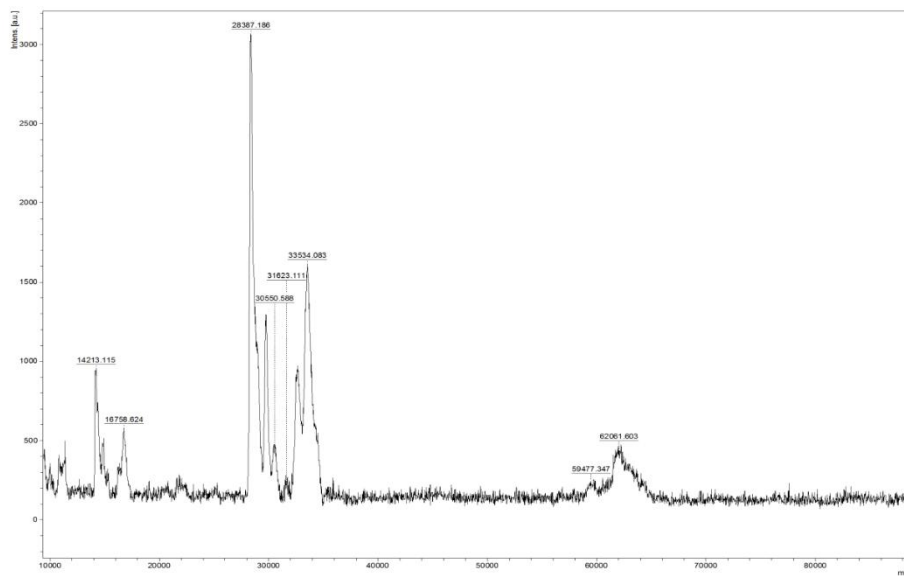


Рис. 4. Масс-спектральный MALDI-TOF анализ масс белков экстракта коры *Sambucus nigra* на спектрометре Bruker MicroFlex после инкубации с DTT

Идентифицированные белки коры *Sambucus nigra* по данным ВЭЖХ-МС/МС секвенирования

Наименование белка	Mr, Da
rRNA N-glycosidase (O04367)	62337
rRNA N-glycosidase (Q8GT32)	62173
Nigrin b rRNA N-glycosidase (P33183)	62300
rRNA N-glycosidase (Q945S2)	62242
rRNA N-glycosidase SNLRP (O04072)	62734
rRNA N-glycosidase (O04071)	62348
Ribosome-inactivating protein SNAI' (P93543)	62598
Ribosome-inactivating protein SNAIf (O22415)	62752
Ribosome-inactivating protein SNAI (Q41358)	63102

SNAIf – специфический агглютинин Neu5Ac(alpha2-6)Gal/GalNAc, представляющий собой белок 2 типа, инактивирующий рибосомы. В-цепь данного белка связывается с клеточными рецепторами и, вероятно, облегчает вход в клетку А-цепи; В-цепи также ответственны за агглютинацию клеток (активность лектина). Участвует в защите растений от насекомых.

SNLRP – это первый пример RIP типа 2 с функционально неактивной В-цепью. Молекулярное моделирование белка подтвердило [16], что его А-цепь полностью активна, тогда как В-цепь содержит два функционально неактивных участка связывания углеводов. Эти результаты не только впервые демонстрируют наличие инактивирующего рибосомы белка 2 типа с неактивной В-цепью, но также открывают интересные перспективы для синтеза иммунотоксинов с улучшенной селективностью.

На основе полученных аминокислотных последовательностей с применением программы CLUSTAL O (1.2.4) проведено сравнение аминокислотной последовательности идентифицированных RIP типа 2 и определены сходные и консервативные остатки, которые в дальнейшем помогут идентифицировать новые RIP (рис. 1 электронного приложения).

Затем на основании выравнивания белковых последовательностей автоматически с помощью Uniprot построена кладограмма, подтверждающая отношения сестринского родства между таксонами.

Полученная кладограмма показывает, что укоренение произошло между {O04367; O04072; O04071; P93543; O22415; Q41358} и {P33183; Q945S2}. Ветвь, содержащая таксон Q8GT32, стоит особняком между двумя укорененными множествами (рис. 2 электронного приложения).

В ходе выполнения исследований с высокой долей вероятности идентифицирован триптический-пептид, содержащий мотив активного центра RIP (EAAR). Масс-спектральные данные по этому фрагменту позволят в дальнейшем проводить идентификацию других RIP типа 1/2 из других образцов природного происхождения (рис. 3 электронного приложения).

Полученные данные De novo секвенирования пептида LSLVVLQMVSEAAAR позволяют идентифицировать RIP из других источников.

Экстракт ягод по данным гель-электрофореза содержит слабо выраженные полосы в диапазоне молекулярных масс, в которых находятся RIP 1 и 2 типа. По данным секвенирования белков ВЭЖХ-МС/МС секвенирования после реакции трипсинолиза установлено наличие в образце из ягод только 2 RIP 2 типа, при чем один из Lectin O04366 с мол.массой 35191 Да в восстановленной форме, содержащей одну цепь (рис. 5).

При установлении аминокислотной последовательности в выделенном RIP из ягод бузины черной с молекулярной массой 62337 Да подтверждена наша гипотеза об идентификации по триптическому пептиду, содержащему активный центр RIP (EAAR).



a

b

Рис. 5. а) Сравнение аминокислотной последовательности идентифицированных RIP б) ВЭЖХ-МС/МС секвенирование экстракта ягод после реакции трипсинолиза

Таким образом, в ходе выполнения исследований с высокой долей вероятности идентифицирован триптический-пептид, содержащий мотив активного центра RIP (EAAR). Масс-спектральные данные по этому фрагменту позволят в дальнейшем проводить идентификацию других RIP-1/2 из других образцов природного происхождения. Полученные данные De novo секвенирования пептида LSLVVLQMVSEAAAR позволят идентифицировать RIP из других источников.

### Выводы

Исследован состав рибосом-инактивирующих белков в коре и ягодах бузины черной *Sambucus nigra* L, произрастающей на территории Республики Узбекистан. По данным ВЭЖХ-МС/МС секвенирования в образце из коры установлено наличие 9-и RIP-2. Из ягод выделено 2 RIP, один из которых находится в восстановленной форме, содержащей одну цепь. В ходе выполнения исследований с высокой долей вероятности идентифицирован триптический-пептид LSLVVLQMVSEAAAR, содержащий мотив активного центра RIP (EAAR). Масс-спектральные данные по этому фрагменту позволят в дальнейшем проводить идентификацию других RIP-1/2 из других образцов природного происхождения.

### Список литературы

1. Peumans W.J., Hao Q., Van Damme E.J.M. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // FASEB J. 2001. Vol. 15. Pp. 1493–1506.
2. Stirpe F., Battelli M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems // Cell. Mol. Life Sci. 2006. Vol. 63. Pp. 1850–1866.
3. Van Damme E.J.M., Hao Q., Barre A., Vandenbussche F., Desmyter S., Rougé P. et al. Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes // Crit. Rev. Plant Sci. 2001. Vol. 20. Pp. 395–465.
4. Stirpe F., Barbieri L. Ribosome-inactivating proteins up to date // FEBS Lett. 1986. Vol. 195. Pp. 1–8. DOI: 10.1016/0014-5793(86)80118-1.
5. Kwon S.Y., An C.S., Liu J.R., Kwak S-S., Lee H.S., Lim J.K., Paek K.H. Molecular cloning of a cDNA encoding ribosome-inactivating protein from *Amaranthus viridis* and its expression in *E. coli*. // Mol. Cells. 2000. Vol. 10. Pp. 8–12. DOI: 10.1007/s10059-000-0008-6.
6. de Benito F.M., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Soriano F., Arias J., Mendez E., Girbes T. Ebulitins: A new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1 // FEBS Lett. 1995. Vol. 360. Pp. 299–302. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00130-2.
7. de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Citores L., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.) // FEBS Lett. 1998. Vol. 428. Pp. 75–79. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00496-7.
8. Rojo M.A., Yato M., Ishii-Minami N., Minami E., Kaku H., Citores L., Girbes T., Shibuya N. Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldia*) // Arch. Biochem. Biophys. 1997. Vol. 340. Pp. 185–194. DOI: 10.1006/abbi.1997.9927.
9. van Damme E.J., Barre A., Rouge P., Van L.F., Peumans W.J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*) // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 237. Pp. 505–513.
10. Pascal J.M., Day P.J., Monzingo A.F., Ernst S.R., Robertus J.D., Iglesias R., Perez Y., Ferreras J.M., Citores L., Girbes T. 2.8-A crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1 // Proteins. 2001. Vol. 43. Pp. 319–326. DOI: 10.1002/prot.1043.
11. Girbes T., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Munoz R., Rojo M.A., Arias F.J., Garcia J.R., Mendez E., Calonge M. Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. Pp. 18195–18199.
12. Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Argueso P., Jimenez P., Testera A., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.) // Cell. Mol. Biol. 1997. Vol. 43. Pp. 485–499.
13. Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Miguel F.J., Argueso P., Jimenez P., Mendez E., Girbes T. Presence of polymerized and free forms of the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein ebulin and a structurally related new homodimeric lectin in fruits of *Sambucus ebulus* L. // Planta. 1998. Vol. 204. Pp. 310–319. DOI: 10.1007/s004250050261.
14. Girbes T., Citores L., Ferreras J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Munoz R., Arias F.J., Calonge M., Garcia J.R., Mendez E. Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. // Plant Mol. Biol. 1993. Vol. 22. Pp. 1181–1186. DOI: 10.1007/BF00028990.
15. de Benito F.M., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two-chain 64-kDa ribosome-inactivating protein from the bark of elder (*Sambucus nigra* L.) // FEBS Lett. 1997. Vol. 413. Pp. 85–91. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00882-X.

16. van Damme E.J., Barre A., Rouge P., Van L.F., Peumans W.J. Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. Pp. 8353–8360.
17. van Damme E.J., Roy S., Barre A., Citores L., Mostafapous K., Rouge P., Van L.F., Girbes T., Goldstein I.J., Peumans W.J. Elderberry (*Sambucus nigra*) bark contains two structurally different Neu5Ac( $\alpha$ 2,6) Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 245. Pp. 648–655.
18. Ferreras J.M., Citores L., Iglesias R., Jiménez P., Girbés T. *Sambucus* Ribosome-Inactivating Proteins and Lectins // Toxic Plant Proteins, Plant Cell Monographs. Springer-Verlag; Berlin, Germany, 2010. Vol. 18. Pp. 107–131.
19. Citores L., deBenito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Jimenez P., Argueso P., Farias G., Mendez E., Girbes T. Isolation and characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein from fruits of elder (*Sambucus nigra* L) // J. Exp. Bot. 1996. Vol. 47. Pp. 1577–1585. DOI: 10.1093/jxb/47.10.1577.
20. Girbes T., Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M. A non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein co-exists with a structure-related monomeric lectin (SNA III) in elder (*Sambucus nigra*) fruits // Biochem. J. 1996. Vol. 315. P. 343.
21. Citores L., Iglesias R., Munoz R., Ferreras J.M., Jimenez P., Girbes T. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) seed proteins inhibit protein synthesis and display strong immunoreactivity with rabbit polyclonal antibodies raised against the type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b // J. Exp. Bot. 1994. Vol. 45. Pp. 513–516. DOI: 10.1093/jxb/45.4.513.
22. Rojo M.A., Citores L., Jimenez P., Ferreras J.M., Arias F.J., Mendez E., Girbes T. Isolation and characterization of a new D-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. // Protein Pept. Lett. 2003. Vol. 10. Pp. 287–293. DOI: 10.2174/0929866033478979.
23. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. Pp. 680–685.
24. Girbés T., Citores L., Ferreras J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Muñoz R., Arias F.J., Calonge M., García J.R., Méndez E. Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. // Plant Mol. Biol. 1993. Vol. 22. Pp. 1181–1186.
25. Van Damme E.J.M., Barre A., Rougé P., Van Leuven F., Peumans W.J. The NeuAc( $\alpha$ -2,6)-Gal/GalNAc-Binding Lectin from Elderberry (*Sambucus Nigra*) Bark, a type-2 Ribosome-Inactivating Protein with an Unusual Specificity and Structure // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 235. Pp. 128–137

Поступила в редакцию 21 июля 2022 г.

После переработки 7 июля 2023 г.

Принята к публикации 23 августа 2023 г.

**Для цитирования:** Агзамхужаева Х.Т., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И. Рибосом-инактивирующие белки (RIPs) бузины черной *Sambucus nigra* // Химия растительного сырья. 2023. №3. С. 117–125. DOI: 10.14258/jcrpm.20230311724.

*Agzamkhuzhaeva Kh.T., Oshchepkova Yu.I.\**, *Salikhov Sh.I.* RIBOSOME-INACTIVATED PROTEINS (RIPS) OF THE BLACK ELDER *SAMBUCUS NIGRA*

*Institute of Bioorganic Chemistry, acad. A.S. Sadykov Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, ul. Mirzo Ulugbeka, 83, Tashkent, 100125 (Republic of Uzbekistan), e-mail: joshepkova05@rambler.ru*

The aim of this work is to study the composition of ribosome-inactivating proteins from the bark and berries of the black elderberry *Sambucus nigra* L., growing on the territory of the Republic of Uzbekistan.

The composition of ribosome-inactivating proteins in the bark and berries of black elder *Sambucus nigra* L., collected in the Botanical Garden of the Republic of Uzbekistan, was studied. According to HPLC-MS/MS sequencing, the bark sample revealed the presence of 9 RIP-2. Based on the obtained amino acid sequences using the CLUSTAL O (1.2.4) program, the amino acid sequence of the identified type 2 RIPs was compared and similar and conserved residues were identified, which will further help identify new RIPs. In the course of the studies, the tryptic peptide LSLVVLQMVSEAAAR containing the RIP active site motif (EAAR) was identified with a high degree of probability. Mass spectral data on this fragment will allow further identification of other RIP-1/2 from other samples of natural origin.

2 RIPs were isolated from berries, one of which is in a reduced form containing one chain. Establishing the amino acid sequence in the isolated RIP from black elderberries with a molecular mass of 62337 Da confirmed our hypothesis of identification by the tryptic peptide containing the RIP active center (EAAR).

*Keywords:* *Sambucus nigra*, bark, berries, ribosome-inactivating proteins, mass spectrum, *De novo* sequencing.

---

\* Corresponding author.



**References**

1. Peumans W.J., Hao Q., Van Damme E.J.M. *FASEB J.*, 2001, vol. 15, pp. 1493–1506.
2. Stirpe F., Battelli M.G. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, vol. 63, pp. 1850–1866.
3. Van Damme E.J.M., Hao Q., Barre A., Vandebussche F., Desmyter S., Rougé P. et al. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2001, vol. 20, pp. 395–465.
4. Stirpe F., Barbieri L. *FEBS Lett.*, 1986, vol. 195, pp. 1–8. DOI: 10.1016/0014-5793(86)80118-1.
5. Kwon S.Y., An C.S., Liu J.R., Kwak S.-S., Lee H.S., Lim J.K., Paek K.H. *Mol. Cells*, 2000, vol. 10, pp. 8–12. DOI: 10.1007/s10059-000-0008-6.
6. de Benito F.M., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Soriano F., Arias J., Mendez E., Girbes T. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 360, pp. 299–302. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00130-2.
7. de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Citores L., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. *FEBS Lett.*, 1998, vol. 428, pp. 75–79. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00496-7.
8. Rojo M.A., Yato M., Ishii-Minami N., Minami E., Kaku H., Citores L., Girbes T., Shibuya N. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, vol. 340, pp. 185–194. DOI: 10.1006/abbi.1997.9927.
9. van Damme E.J., Barre A., Rouge P., Van L.F., Peumans W.J. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, pp. 505–513.
10. Pascal J.M., Day P.J., Monzingo A.F., Ernst S.R., Robertus J.D., Iglesias R., Perez Y., Ferreras J.M., Citores L., Girbes T. *Proteins*, 2001, vol. 43, pp. 319–326. DOI: 10.1002/prot.1043.
11. Girbes T., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Munoz R., Rojo M.A., Arias F.J., Garcia J.R., Mendez E., Calonge M. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, pp. 18195–18199.
12. Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Argueso P., Jimenez P., Testera A., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. *Cell. Mol. Biol.*, 1997, vol. 43, pp. 485–499.
13. Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Miguel F.J., Argueso P., Jimenez P., Mendez E., Girbes T. *Planta*, 1998, vol. 204, pp. 310–319. DOI: 10.1007/s004250050261.
14. Girbes T., Citores L., Ferreras J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Munoz R., Arias F.J., Calonge M., Garcia J.R., Mendez E. *Plant Mol. Biol.*, 1993, vol. 22, pp. 1181–1186. DOI: 10.1007/BF00028990.
15. de Benito F.M., Citores L., Iglesias R., Ferreras J.M., Camafeita E., Mendez E., Girbes T. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 413, pp. 85–91. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00882-X.
16. van Damme E.J., Barre A., Rouge P., Van L.F., Peumans W.J. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, pp. 8353–8360.
17. van Damme E.J., Roy S., Barre A., Citores L., Mostafapous K., Rouge P., Van L.F., Girbes T., Goldstein I.J., Peumans W.J. *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 245, pp. 648–655.
18. Ferreras J.M., Citores L., Iglesias R., Jiménez P., Girbés T. *Toxic Plant Proteins, Plant Cell Monographs*. Springer-Verlag; Berlin, Germany, 2010, vol. 18, pp. 107–131.
19. Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M., Jimenez P., Argueso P., Farias G., Mendez E., Girbes T. *J. Exp. Bot.*, 1996, vol. 47, pp. 1577–1585. DOI: 10.1093/jxb/47.10.1577.
20. Girbes T., Citores L., de Benito F.M., Iglesias R., Ferreras J.M. *Biochem. J.*, 1996, vol. 315, p. 343.
21. Citores L., Iglesias R., Munoz R., Ferreras J.M., Jimenez P., Girbes T. *J. Exp. Bot.*, 1994, vol. 45, pp. 513–516. DOI: 10.1093/jxb/45.4.513.
22. Rojo M.A., Citores L., Jimenez P., Ferreras J.M., Arias F.J., Mendez E., Girbes T. *Protein Pept. Lett.*, 2003, vol. 10, pp. 287–293. DOI: 10.2174/0929866033478979.
23. Laemmli U.K. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
24. Girbés T., Citores L., Ferreras J.M., Rojo M.A., Iglesias R., Muñoz R., Arias F.J., Calonge M., García J.R., Méndez E. *Plant Mol. Biol.*, 1993, vol. 22, pp. 1181–1186.
25. Van Damme E.J.M., Barre A., Rougé P., Van Leuven F., Peumans W.J. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 235, pp. 128–137.

Received July 21, 2022

Revised July 7, 2023

Accepted August 23, 2023

**For citing:** Agzamkuzhaeva Kh.T., Oshchepkova Yu.I., Salikhov Sh.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 3, pp. 117–125. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230311724.

