

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Анастасия Васильевна Балакирева

**Протеиназы пшеницы и их активация в норме и при
биотическом стрессе**

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Андрей Александрович Замятнин

Москва – 2019

Оглавление

Введение	4
Обзор литературы.....	9
I. Запрограммированная клеточная смерть в растениях и проблемы ее классификации.....	9
II. Иммуитет растений	12
1. МТИ.....	13
2. ЕТИ.....	13
3. SAR и ISR	15
4. РНК сайленсинг.....	16
III. Вовлеченность протеиназ в иммуитет растений.....	16
1. Основные направления действия протеиназ в иммунном ответе растений.....	19
2. Протеиназы, вовлеченные в базальную защиту (МТИ).....	20
3. Протеиназы, участвующие в ЕТИ, ЗКС и РНК сайленсинге	22
IV. Папаин-подобные цистеиновые протеиназы: структура, специфичность, свойства.....	35
1. Понятие папаин-подобных цистеиновых протеиназ и их классификация	35
2. Механизм катализа папаин-подобными цистеиновыми протеиназами.....	36
3. Специфичность ППЦП	38
4. Синтез и активация протеиназ растений.....	38
5. Протеолитические каскады во время ЗКС	40
6. Исполнение сигнала, передаваемого протеиназами и приводящего к гибели клетки	41
7. Папаин-подобная цистеиновая протеиназа пшеницы – тритикаин- α	43
V. Применение протеиназ растений в биомедицине.....	44
1. Противоопухолевая активность растительных протеиназ	44
2. Свертывание крови	47
3. Заживление ран	50
4. Обработка ожогов	51
5. Уход за ротовой полостью.....	52
6. Антимикробные свойства	53
7. Расстройства пищеварения.....	54
Материалы и методы	57
1. Филогенетический анализ семейств протеиназ пшеницы.....	57
2. Используемые в работе материалы.....	58
3. Составы буферов и сред.....	59
4. Работа с клетками <i>E. coli</i>	59
5. Работа с нуклеиновыми кислотами	60

6. Рост растений и заражение патогенами	62
7. Продукция рекомбинантных белков в растениях <i>N. benthamiana</i>	63
8. Анализ экспрессии рекомбинантных белков в <i>N. benthamiana</i>	64
9. Фракционирование органелл клеток листьев <i>T. aestivum</i> путем дифференциального центрифугирования.....	65
10. Измерение нитратов во фракциях клеток листьев пшеницы	66
11. Подготовка образцов для масс-спектрометрии	66
12. Метод жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС)	66
13. Идентификация белков и определение сайтов, гидролизованных <i>in vivo</i> эндогенными протеиназами.....	67
Результаты работы	69
1. Деградом <i>Triticum aestivum</i> L. представлен различными семействами протеиназ....	69
2. Деградом пшеницы варьируется на уровне сортов	75
3. Заражение патогенами приводит к изменению составов протеиназ.....	76
4. Множество субстратов, расщепляемых протеиназами <i>in vivo</i> , увеличивается на фоне обоих типов заражения	77
5. Биотический стресс вызывает синтез и/или протеолитическую активацию протеиназ путем действия отличных от каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ	80
6. Активация тритикаина- α – многоступенчатый автокаталитический процесс, который, предположительно, регулируется цистатином	81
7. Тритикаин- α в основном накапливается в вакуоли, и его созревание происходит рН-зависимо	83
Обсуждение результатов	85
Выводы	92
Список сокращений	93
Список литературы	95

Введение

Актуальность проблемы

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из основных промышленных зерновых культур. Этот злак постоянно подвергается атакам различных патогенов, таких как бактерии, грибы, вирусы, а также травоядных насекомых и нематод. В растениях иммунный ответ на патогены практически всегда сопряжен с запрограммированной клеточной смертью (ЗКС) [1], в регуляцию которой вовлечены протеолитические ферменты (протеиназы) [2]. В рамках данной диссертации, совокупность всех протеиназ растения здесь и далее будет называться деградомом, как было предложено ранее [3]. Несмотря на важность протеиназ для иммунитета и процессов, связанных с ЗКС, деградом пшеницы до сих пор не был охарактеризован. При этом, иммунные ответы пшеницы на некоторые патогены, а также ответные реакции растения на абиотические стрессы, как правило, были описаны только в общих чертах, без акцентирования внимания на протеиназах [4]. Помимо этого, существует очень мало данных о том, когда и как происходит активация протеиназ в клетках пшеницы.

Степень разработанности темы

Наиболее широко изученной формой ЗКС является апоптоз у человека, который регулируется каспазами – Asp-специфичными цистеиновыми протеиназами [5]. Каспазы синтезируются в виде неактивных прокаспаз. Инициаторные каспазы подвергаются автокаталитическому процессингу и осуществляют активацию эффекторных каспаз посредством протеолитического каскада. Было предположено, что ЗКС растений так же, как и у животных, регулируется протеолитическими каскадами. И хотя каспазы в растениях отсутствуют, каспазо-подобная активность детектируется в растениях во время клеточной смерти. Такая активность приписывается протеиназам из различных семейств, например, субтилазам (S8) [6,7], протеасомным субъединицам (T1) [8], вакуолярным процессирующим протеиназам (VPE, C13) [9] и папаин-подобным цистеиновым протеиназам (C1A) [10].

Другой основной характеристикой ЗКС у растений является метакаспазная активность [11]. Метакаспазы гидролизуют пептидную связь после Arg и Lys, и было показано, что они участвуют в различных процессах, связанных с гибелью клеток [12–15]. Как и в случае каспаз, эти пептидазы чаще всего синтезируются в виде зимогенов и нуждаются в протеолитической активации. Однако стоит отметить, что, существуют лишь отрывочные данные о конкретной роли перечисленных выше протеиназ, факторах их активации, точной субстратной

специфичности и сигнальных путях, в которых они могли бы участвовать не только в пшенице, но и в растениях в целом.

Цель данной работы – охарактеризовать деградом *Triticum aestivum* L, оценить вариативность деградома на уровне сортов, исследовать факторы активации протеолитических ферментов пшеницы в норме и при биотическом стрессе; исследовать активацию *in vivo* папаин-подобной цистеиновой протеиназы – тритикаина- α .

Задачи работы

1. Провести биоинформатический анализ деградома пшеницы, идентифицировать все закодированные в геноме *T. aestivum* протеиназы, провести их классификацию и выделить уникальные для вида особенности;
2. Исследовать вариативность деградома пшеницы внутри вида путем сравнения протеиназ двух сортов при помощи жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС);
3. Оценить изменения в экспрессируемых протеиназах и в общей протеолитической активности в растениях пшеницы обоих сортов спустя 24 часа после заражения некротрофным *Stagonospora nodorum* и биотрофным *Puccinia recondita* Rob. ex Desm f. sp. tritici патогенами;
4. Идентифицировать активированные в ответ на заражение протеиназы, которые потенциально могут являться регуляторами раннего иммунного ответа пшеницы, при помощи ЖХ-МС/МС;
5. Исследовать характер процессинга и активации *in vivo* папаин-подобной цистеиновой протеиназы пшеницы – тритикаина- α .

Научная новизна

В данной работе впервые были идентифицированы и охарактеризованы протеиназы пшеницы *T. aestivum*, впервые предложена их классификация. Были обнаружены уникальные для вида группы протеиназ, которые не имеют близких гомологов в других организмах и имеют уникальную структуру.

Впервые были оценены различия между сортами пшеницы в отношении экспрессии протеолитических ферментов. Эти различия оказались значительными и составили ~40%.

Впервые была охарактеризована протеолитическая активность во время раннего ответа пшеницы на два различных типа заражения патогенами – некротрофной и биотрофной инфекциями. Оказалось, что ранний иммунный ответ пшеницы сопряжен не только с каспазо-

и метакаспазо-подобными активностями, но и, в большей степени, с другими, до сих пор не описанными активностями. Был предложен новый метод определения статуса активации протеиназ *in vivo*, основанный на ЖХ-МС/МС.

Была впервые произведена характеристика процесса активации *in vivo* папаин-подобной цистеиновой протеиназы – тритикаина- α .

Научная и практическая значимость

Результаты диссертационной работы имеют большое как фундаментальное, так и практическое значение. С точки зрения фундаментальной науки, данная работа представляет результаты, которые не только впервые показывают участие других, кроме каспазо- и метаскапазо-подобных протеиназ в иммунном ответе растений, но и предлагает новый метод для определения статуса процессинга протеиназ *in vivo*, основанного на ЖХ-МС/МС. С практической точки зрения, данные результаты могут быть использованы для создания более устойчивых к различным патогенам сортов пшеницы. Протеиназы – ключевые регуляторы ассоциированных с клеточной смертью растений процессов, и потому могут являться мишенями для их нокаута/индукции с целью повышения устойчивости растений к инфекциям.

Личный вклад автора

Диссертационная работа основана на собственных данных, полученных автором в период с 2016 по 2019 гг. Соискатель самостоятельно проводил анализ имеющейся литературы, планировал и проводил эксперименты, обработку и интерпретацию полученных данных. Соискатель самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и непосредственно осуществлял написание всех статей. Имена всех соавторов указаны в опубликованных работах.

Методология и методы исследования

В работе использовался широкий спектр современных молекулярно-биологических, биохимических, микробиологических и биоинформатических методов. Филогенетический анализ был проведен на основе протеома (релиз 39) *T. aestivum*, с использованием пакета HMMER 3.1b2. Идентификаторы доменов каждого семейства пептидаз были получены из базы данных Pfam [16]. Выращивание растений, их заражение *S. nodorum* и *P. recondita*, транзientная экспрессия рекомбинантных белков путем агроинфильтрации проводились согласно разработанным ранее протоколам. В ходе работы были проведены клонирование генов в экспрессионные вектора, продукция рекомбинантных белков в растениях *Nicotiana benthamiana*, анализ экспрессии при помощи вестерн-блоттинга и др. Для анализа локализации

тритикаина- α и характера его процессинга в клетках пшеницы, было проведено фракционирование органелл клеток пшеницы при помощи дифференциального центрифугирования [17]. Для оценки активности тритикаина- α в клетках *N. benthamiana* был использован метод – основанный на активности профайлинг белков (ABPP), основанный на специфическом ковалентном необратимом связывании активного центра папаин-подобных цистеиновых протеиназ с флуоресцентной пробой (MV202) [18]. Один из основных методов анализа данной работы – метод ЖХ-МС/МС без использования меток, который позволил детектировать протеиназы в здоровых и зараженных растениях пшеницы, провести сравнение деградомов между собой и определить сайты расщепления протеиназ. В данной работе был предложен новый метод определения статуса процессинга протеиназ *in vivo*, основанный на ЖХ-МС/МС. Метод заключается в определении полу-специфических пептидов, один конец которых получался в результате гидролиза использованной при приготовлении проб для масс-спектрометрии протеиназы (трипсина, AspN), а другой – неспецифический конец пептида, предположительно полученный в результате гидролиза эндогенными протеиназами *in vivo*. Обсчеты полученных спектров и поиск белков проводились в IdentiPy [19].

Положения, выносимые на защиту

1. *T. aestivum* обладает уникальным набором протеиназ, принадлежащих различным семействам, часть из которых не имеет близких гомологов в других растениях;
2. Деградомы разных сортов пшеницы обладают значительной вариативностью;
3. Биотрофная и некротрофная инфекции вызывают индукцию различных протеиназ и увеличение общей протеолитической активности в клетках, однако иммунный ответ сопряжен ферментами, относящимися к одним и тем же семействам пептидаз;
4. Активация протеиназ во время раннего иммунного ответа пшеницы практически не сопряжена с активностью каспазо- и метакаспазо-подобных ферментов;
5. Активация папаин-подобной протеиназы тритикаина- α является многоступенчатым, рН-зависимым, автокаталитическим процессом.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертационной работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, и 4 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

Результаты работы были представлены на международных конференциях: 43rd FEBS Congress (Чехия, Прага, 2018), на международной научной конференции "XII чтения памяти

академика Юрия Анатольевича Овчинникова", VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Россия, Москва, 2017), международной конференции "Toolkits for DNA vaccine design, an update" (Россия, Москва, 2016), международной конференции UK – Russia Young Medics Conference (Россия, Москва, 2019).

Диссертационная работа была апробирована 19 сентября 2019 года на заседании Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 112 страницах, содержит 6 таблиц и 18 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список использованных сокращений и список литературы.

Обзор литературы

I. Запрограммированная клеточная смерть в растениях и проблемы ее классификации

Многоклеточные организмы постоянно нуждаются в устранении избыточных или поврежденных клеток, которые образуются как в течение нормального развития организма, так и во время взаимодействия организма с окружающей средой. Например, в стрессовых условиях, ведущих к необратимому повреждению клеток, а также при заражении патогенными микроорганизмами. Клеточный процесс, направленный на последовательное удаление нежелательных клеток, известен как запрограммированная клеточная смерть (ЗКС). На сегодняшний день ЗКС наиболее подробно описана у животных. Рекомендации комитета по номенклатуре гибели клеток различают три основных типа ЗКС животных: апоптоз, аутофагия и некроз [20]. Апоптоз (от греческого «опадание листьев») является наиболее характерной и наиболее изученной формой ЗКС: это активный процесс, который подразумевает образование апоптотических телец, которые поглощаются другими клетками [21]. Аутофагическая ЗКС (от греческого «самопоедание») является нормальным для клеток процессом, который усиливается при голодании и приводит к вакуолизации цитоплазмы и усиленному образованию аутофагосом или аутолизосом с последующей гибелью клеток [20]. Некрозом (от греческого «смерть») называют предположительно нерегулируемый, пассивный аутолитический процесс, во время которого не образуются ни апоптотические тельца, ни аутофагосомы. Однако, существуют примеры регулируемого некроза, наиболее изученным типом которого является некроптоз [22]. Другие примеры регулируемого некроза включают партанатоз, окситоз, ферроптоз, NETоз, и др. [23]

Растения так же обладают ЗКС, и многие аспекты их жизни сопряжены с ней, от прорастания семени, репродуктивного развития до старения всего растения. Растения активируют ЗКС в листьях, лепестках, чашелистиках, чтобы метаболизировать питательные вещества перед тем, как удалять ненужные ткани. Классификация форм ЗКС у растений до настоящего времени является предметом дискуссий. Традиционно принято считать, что апоптоз у растений отсутствует, потому что не происходит образования апоптотических телец. Аналогично, вопрос, существует ли аутофагический ЗКС у растений, довольно неоднозначен. Аутофагические процессы у животных делятся на три типа: макроаутофагия, микроаутофагия и опосредованная шаперонами аутофагия [24]. У растений наблюдали только микроаутофагию. С одной стороны, во время микроаутофагии растения способны

образовывать аутофагосомо-подобные структуры посредством слияния специальных канальцев [25]. Кроме того, растения продуцируют связанные с аутофагией белки (белки ATG), которые также связаны с аутофагией у животных [26]. С другой стороны, эти аутофагические везикулы полностью отличаются по происхождению от структуры аутофагосом животных, и аутофагическая ЗКС у растений может не совпадать с таковой у животных. Кроме того, существует мега-аутофагия, специфичная только для растений [27]: она подразумевает утечку гидролаз из вакуоли и приводит к лизису обширной части цитоплазмы. Другой специфический для растений тип аутофагии включает появление литических компартментов из пластид [28].

Сложно классифицировать ЗКС растений, базируясь только лишь на основе морфологических и молекулярных особенностей. Поэтому, многие исследователи в настоящее время предпочитают проводить различие между видами ЗКС с функциональной точки зрения, т.е. ЗКС развития (рЗКС) и ЗКС, вызванной окружающей средой (оЗКС) [29]. рЗКС запускается во время развития растения, а оЗКС – в ответ на внешние раздражители, такие как патогены. рЗКС активируется внутренними стимулами и хорошо организована во времени и пространстве. Участие ЗКС в развитии растений включает, например, дифференцировку трахеальных элементов, развитие эндосперма и алейроновых клеток в злаках, образование трихом, дифференцировку женского гаметофита, переход от двуполого к однополному цветку, реакцию на самосовместимость [30], а также конкретные типы морфогенеза листьев, как у растений апоногетона с фенестрированными листьями [31], и т.д.

рЗКС, как правило, аутолитичен, как это происходит при трахеальном образовании ксилемы [32], где для функциональности сосуда требуется клиренс цитоплазмы. Под аутолитической формой подразумевается разрыв тонопласта с последующей быстрой элиминацией цитоплазмы, которая вызывает гибель клетки, тогда как неаутолитическая ЗКС – если эти события происходят в уже мертвых клетках [33]. Фактически, некоторые исследования показали, что аутолитическая ЗКС происходит во время дифференцировки трахеальных элементов, и отдельные аутолизисные процессы происходят только после прекращения ЗКС [34]. Тем не менее, рЗКС может также включать подобные аутофагии особенности, как это происходит во время процессов эмбриогенеза и прорастания [35].

оЗКС запускается внешними воздействиями, например, атакой патогенов и абиотическим стрессом, таким как тепловой стресс, повышенная соленость, засуха и наводнения. В таких случаях растения могут активировать гиперчувствительный ответ (ГО), который представляет собой гибель растительной клетки в месте атаки, активируемой в ответ

на биотрофных патогенов. ГО ограничивает возможность того, что биотрофные патогены будут использовать растительные метаболические источники для роста, и, следовательно, предотвращает распространение патогенных микроорганизмов по всему растению.

Идентификация мутантов, имитирующих повреждения, демонстрирующих аберрантные фенотипы ГО, показала, что в таких мутантах ГО активирован конститутивно (при отсутствии патогенов) и неконтролируемо распространяется, не ограничиваясь местом заражения. Это ясно демонстрирует активный характер гибели клеток [36]. Интересно, что ГО, по-видимому, также характеризуется признаками аутофагии, проявляющихся в окружающих клетках, которые удаляют «сигналы смерти», чтобы ограничить ЗКС в месте атаки, таким образом ингибируя гибель клеток растения. В этом случае, по-видимому, события аутофагии происходят параллельно, без непосредственного участия в ЗКС [37].

Чтобы справиться с неблагоприятными условиями окружающей среды, растительные клетки определенных тканей могут подвергаться оЗКС, приводящей к морфологическим перестройкам, таким как образование аэренхимы в корнях при затоплении. Заболачивание снижает доступ кислорода к корням растений из-за потери воздушного пространства между частицами почвы. Образование аэренхимы происходит, когда клетки коркового слоя подвергаются ЗКС, которое, таким образом, оставляет продольные воздушные каналы, которые позволяют воздуху распространяться от побега к корням. У толерантных к аноксии видов, таких как рис, образование аэренхимы является определяющим [31]. Абиотические стрессы, такие как засуха, наводнение, тепловой стресс и тяжелые металлы в почве, обычно влияют на метаболизм растений, ухудшая фотосинтез, уменьшая синтез белка и, следовательно, обмен белка и увеличивая приток электронов в электрон-транспортной цепи. Нарушение этих путей увеличивает производство активных форм кислорода и азота (АФК и АФА) в клетке. Когда растение не в состоянии противодействовать метаболическому дисбалансу, оно активирует ЗКС, вероятно, в качестве последнего средства для самосохранения путем удаления поврежденных клеток.

АФК и АФА также являются хорошо известными молекулярными сигналами, которые запускают ЗКС как при защитных реакциях растений на стресс, так и в нормальном развитии организма [38]. В ответ на биотические и абиотические стрессы наблюдается двухфазная тенденция продукции АФК. Эта особенность, по-видимому, регулируется активацией систем, продуцирующих АФК, таких как NADPH-оксидаза плазматической мембраны, наблюдаемой в ответ на патогенные микроорганизмы и некоторые стрессы, например, засоление почвы [37]. Несколько растительных гормонов также участвуют в индукции как рЗКС, так и оЗКС:

салициловая кислота необходима для гибели клеток при ГО, этилен для образования аэренхимы и при старении тканей, гиббереллин – при образовании эндосперма/алеярона и т.д. [29]

Последние данные свидетельствуют о том, что в осуществлении рЗКС и оЗКС участвуют разные гены [39]. Требуется определение специфических паттернов экспрессии генов, активированных во время ЗКС, которые могут дополнять морфологический и биохимический критерии идентификации подтипов ЗКС. Кроме того, пост-трансляционные модификации белков, участвующих в активации ЗКС, могут служить еще одним молекулярным признаком, необходимым для передачи сигналов ЗКС в определенных контекстах [40]. Одной из таких особенностей является S-нитрозилирование цитозольного фермента, связывающего пероксид водорода, аскорбатпероксидазы (АП), в клетках ТВУ-2, подвергающихся ЗКС вследствие теплового стресса. В этом контексте S-нитрозилирование АП первоначально инактивирует фермент и способствует его убиквитинированию и деградации с помощью протеасомы. Устранение АП приводит к всплескам АФК, которые запускают ЗКС [40].

Таким образом, ЗКС является часто универсальным средством и неотъемлемой частью практически любых физиологических и патологических процессов растений. Иммуитет не является исключением. Далее будут рассмотрены основные этапы установления иммуитета растений и их особенности.

II. Иммуитет растений

Растения постоянно подвергаются атакам фитопатогенов, вследствие чего существуют различные типы иммуитных ответов [41]. На сегодняшний день наиболее изученным типом иммуитета у живых организмов является иммуитная система животных. Это очень сложная система, которая имеет свои отличительные особенности, такие как высокая адаптивность, обеспечиваемая практически бесконечным числом антиген-связывающих рецепторов, которые циркулируют по всему организму и синтезируются в лимфоцитах при обнаружении патогена [42]. Эта иммуитная система запоминает все антигены, которые когда-либо встречались, с помощью долгоживущих клеток памяти, а также увеличивает количество лимфоцитов, экспрессирующих специфические антигенсвязывающие рецепторы. Это позволяет осуществить быстрый и эффективный вторичный иммуитный ответ [43]. Растительная иммуитная система так же сложна, однако по сравнению с животной иммуитной системой она характеризуется важными особенностями, такими как высокая специфичность,

низкая самореактивность и долговременная память, возникших в растениях независимо от животных [44]. Растения не имеют кровеносной системы, но обладают клеточными стенками, которые особенно важны для определения уникальных свойств иммунитета растений.

1. МТИ

Активация иммунного ответа в растении происходит при столкновении с фитопатогеном. Фитопатогены продуцируют ограниченное число связанных с микробами (патогенами) молекулярных структур или паттернов (microbe(pathogen)-associated molecular patterns, МАРП или РАРП), таких как олигомеры хитина, флагеллин, липополисахариды и пептидогликаны, которые распознаются специальными рецепторами PRR (pattern-recognition receptors) [45]. Эти рецепторы содержат богатые лейцином повторы (leucine-rich repeats, LRR) и являются рецептор-подобными киназами или белками (receptor-like kinase (protein), RLK или RLP). Такие PRR рецепторы растений очень похожи на Toll-подобные рецепторы, обнаруженные у животных. LRR RLK как растений, так и животных способны распознавать разные эпитопы одного и того же белка, например, флагеллина [46,47]. Они, в частности, подтверждают гипотезу конвергентной эволюции рецепторов у растений и животных и независимое появление активируемого паттернами патогена иммунитета [48]. PRR узнают МАРП через LRR домен и индуцируют базовую или активируемую паттернами МАРП защиту (МАРП-triggered immunity, МТИ). МТИ приводит к активации каскада митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и последующему запуску экспрессии защитных генов (Рис.1). Также происходят как биохимические изменения в клетках растений, например, образование АФК, АФА, увеличение концентрации Ca^{2+} во внеклеточных компартментах и т.д.; так и структурные укрепления клеток, такие как закрытие устьиц и отложение каллозы в плазмодесмах [49]. Каллоза укрепляет клеточную стенку и препятствует проникновению патогена в здоровые клетки (Рис.1) [50].

2. ЕТИ

Следует отметить, что в результате эволюции фитопатогенов защитный механизм растений МТИ перестал быть препятствием для большого числа патогенов. Во-первых, только очень небольшое количество вирулентных молекул запускает его, и, во-вторых, патогены изобрели способы избежать системы МТИ посредством эмиссии эффекторных молекул. Такие эффекторы, непосредственно проникающие в клетку, являются «авирулентными» сигналами для PRR и нацелены на деактивацию связанных с иммунитетом белковых молекул. Один из таких защитных белков – RIN4 из *A. thaliana* – является мишенью одновременно для

нескольких известных эффекторов из *Pseudomonas syringae*, таких как AvrRpm1, AvrB, AvrRpt2 [51]. Изменения в состоянии белка RIN4 контролируются белками устойчивости хозяина (R-белки) – внутриклеточными рецепторами, которые способны распознавать эффекторы [52]. Это явление называется «Моделью охраны», при которой R-белки являются «стражами» мишеней эффекторов патогена. Если же охраняемая мишень действует в качестве корецептора для стража, когда он присутствует, и неактивна, когда страж отсутствует, то это явление называется «Моделью приманки» [53]. В растениях существует большое количество R белков, т.к. эффекторы патогенов полиморфны у разных организмов, а белки R специфичны для каждого из них [54]. R-белки содержат переменный N-конец, нуклеотид-связывающий сайт и C-концевой LRR-домен, что делает R-белки сходными с белками животного нуклеотид-связывающего олигомеризационного домена (NOD)-подобного рецептора (NOD-like receptor, NLR) [55]. Связывание лиганда с R белком приводит к изменениям в их конформации (при помощи шаперонов HSP90) и последующей активации [56]. Активный R белок индуцирует вызванный эффекторами иммунный ответ (effector-triggered immunity, ETI) – тип иммунитета растений, возникший в результате гонки вооружений между фитопатогенами и растениями.

Следует отметить, что первый контакт с патогеном происходит в апопласте (внеклеточном пространстве), на поверхности клетки, которая заполнена системно или локально экспрессируемыми протеиназами [57]. Хотя почти все апопластные протеиназы принадлежат к семейству папаин-подобных цистеиновых протеиназ (ППЦП) С1А, разные протеиназы относятся к разным путям, которые могут быть отнесены либо к МТИ, либо к ЕТИ. Столкновение с патогеном в апопласте имеет решающее значение для его распознавания и дальнейшей передачи сигнала для вызова соответствующего иммунного ответа.

ЕТИ приводит к активации биосинтеза основных гормонов иммунитета растений – жасмоновой кислоты (ЖК)/этилена и салициловой кислоты (СК) в хлоропластах, которые запускают экспрессию генов защитных белков (pathogenesis-related, PR белков), и белков, связанных с системной приобретенной устойчивостью (systemic acquired resistance, SAR) (Рис.1). ЕТИ часто приводит к ГО – местному сопротивлению в зараженном сайте. Во время ГО происходит синтез антимикробных молекул, таких как хитиназа и β -1,3-глюконаза, и, если такие молекулы не преуспевают, то ГО приводит чаще всего к ЗКС инфицированных клеток [58].

Стоит отметить, что фитопатогены используют две разные стратегии при заражении растительной клетки: биотрофные патогены питаются живой клеткой, например, вирусы,

бактерии, грибы, нематоды и оомицеты; в то время как некротрофы уничтожают растительную клетку, чтобы питаться ее содержимым. ЗКС клетки, инфицированной биотрофными патогенами, является эффективной стратегией защиты. Хорошо известно, что каспазы в растениях отсутствуют, поэтому регуляцию ЗКС приписывают протеолитическим ферментам из разных семейств, таким как β -субъединица 26S протеасомы PBA1 [8], метакаспазы [14], ППЦП [59], VPE [60], субтилазы [7,61] и др. Соответствующие протеолитические ферменты и, в частности, их участие в ЕП и ЗКС будут обсуждены далее.

3. SAR и ISR

Индукцированная устойчивость растений представлена в двух формах: системной приобретенной устойчивостью (systemic acquired resistance, SAR) и индуцированной системной устойчивостью (induced systemic resistance, ISR). SAR, в первую очередь, связана с зависимой от СК передачей сигналов, тогда как ISR – с передачей сигналов, опосредованных ЖК/этиленом [62]. Оба типа индуцированной устойчивости делают неинфицированные части растений более устойчивыми к широкому спектру патогенов растений. Несмотря на отсутствие системы кровообращения растений, мобильные иммунные сигналы могут передаваться от локально резистентного инфицированного сайта к дистальным здоровым участкам, вызывая SAR и защищая весь растения от захватчика. У растений *Nicotiana benthamiana* L., зараженных вирусом табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV), SAR длился 20 дней после заражения TMV к другим патогенным микроорганизмам [63]. Иммунные сигналы, такие как метилсалициловая кислота (MeCK), производные липидов азелаиновой, жасмоновой кислот и глицерол-3-фосфат, проходят через апопласт и флоэму [48]. Белки переноса липидов DIR1 и AZI1 транспортируют мобильные иммунные молекулы [64]. В результате MeCK преобразуется обратно в СК, и происходит накопление СК во флоэме, устанавливающее SAR. Впоследствии накопление СК приводит к индукции экспрессии генов PR белков в дистальных тканях, синтез β -1,3-глюканазы, хитиназы, дефензинов, протеиназ и т.д., и установлению иммунной памяти (Рис.1) [48].

SAR индуцирует полное перепрограммирование клеток путем запуска экспрессии генов 14 классов PR белков, которые включают основной регулятор SAR – NPR1 [65] и устанавливают длительный иммунитет через праймирование клеток – сенсibilизированное состояние, которое обеспечивает более быстрый и более эффективный ответ на вторичную атаку патогена. Предполагается, что клеточный прайминг связан с накоплением MAP киназ МРК3 и МРК6 [66]. Кроме того, известно, что гены R-белков образуют кластеры, поэтому было высказано предположение, что после инфицирования трансгенеративная иммунная

память достигается за счет событий дупликации этих генов и гипометилирования участков хроматина, где эти кластеры расположены [67].

ISR, а также передача сигналов ЖК/этилена, связаны с защитой от травоядных животных [68] и ризобактерий [62]. ISR не подразумевает синтез PR белков, и синтез СК может быть индуцирован PAMP. У *A. thaliana* SAR наиболее эффективен против биотрофных патогенов, ложных и мучнистых рос, а также вирусов, чувствительных к СК-зависимой защите. SAR ингибирует рост растений, тогда как ISR более активен в отношении нектротрофных патогенов и способствует росту растений [62].

4. РНК сайленсинг

РНК сайленсинг – это защитный путь иммунитета, используемый растениями против атак вирусами и грибами [69]. РНК сайленсинг подразумевает использование малых интерферирующих РНК (миРНК) для специфической инактивации транскриптов патогена [70]. Сайленсинг действует по двум направлениям: транскрипционное замалчивание генов (transcriptional gene silencing, TGS) и пост-транскрипционное замалчивание генов (post-transcriptional gene silencing, PTGS) [71]. PTGS подразумевает элиминацию вирусной мРНК с помощью РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RNA-induced silencing complex, RISC) посредством образования комплекса миРНК-мРНК. Белок Dicer расщепляет дцРНК, высвобождая миРНК, синтезируемую с вирусного генома при помощи РНК-зависимой РНК-полимеразы (РНК-вирусы) или РНК-полимеразы II (ДНК-вирусы) [71]. Метилирование цитозина ДНК происходит во время TGS, являясь главным эпигенетическим событием в защитном ответе на вирусы [72]. РНК-полимераза IV синтезирует гетерохроматическую оцРНК, которая превращается в дцРНК и расщепляется РНК-зависимой РНК-полимеразой 2 и включается в РНК-индуцированный транскрипционный комплекс (RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS), который действует в качестве направляющей цепи для образования вирусного гетерохроматина и метилирования [73]. Интересно отметить, что сигнальные факторы сайленсинга РНК (оцРНК и микроРНК) могут перемещаться из клетки в клетку через плазмодесмы и в дистальные части растения через флоэму, подобно молекулам MeСК (Рис.1) [74].

III. Вовлеченность протеиназ в иммунитет растений

Появление различных иммунных ответов растений неразрывно связана со стратегиями патогенов и напрямую зависит от них [41]: коэволюция и гонка вооружений между растениями и патогенами привела к сложным иммунным реакциям, которые необходимо

жестко регулировать. Эндогенные растительные протеиназы играют важную роль в организации иммунных процессов [10].

Геномы растений кодируют значительное количество протеиназ: в совокупности всех протеиназ организма – деградоме – *Arabidopsis thaliana* L. содержится более 800 протеиназ из 60 семейств, а в деградоме риса (*Oryza sativa* L.) содержится более 600 [75]. Основной функцией протеиназ является протеолиз. Протеиназы гидролизуют неправильно свернутые, поврежденные и вредные белки и снабжают клетки аминокислотами. Протеиназы осуществляют как ограниченный (внесение малого числа разрывов в последовательность белка), так и полный протеолиз (полное разрушение белка), что подразумевает возникновение/переключение или потерю функций белков, соответственно [76]. Это делает протеиназы ключевыми фигурами в поддержании клеточного гомеостаза. Кроме того, протеиназы играют регуляторную роль в различных процессах, которые необходимы для роста, развития, размножения, иммунного ответа, эмбриогенеза, фотосинтеза, ЗКС и т.д. [75] Протеиназы обычно синтезируются в виде зимогенов, которые определяют укладку и функцию зрелой пептидазы.

Согласно базе данных MEROPS [78], растительные протеиназы делят на семь классов согласно каталитическому механизму: сериновые, цистеиновые, аспарагиновые, аспартатные, треониновые, глутаматные и металлопротеиназы. Сериновые протеиназы являются наиболее распространенными в растениях: они включают 14 семейств и девять кланов [78]. Семейство S8 содержит субтилазы, которые на сегодняшний день являются наиболее хорошо описанными сериновыми протеиназами. Они участвуют во многих важных для жизнедеятельности процессах, таких как иммунитет, симбиоз, ЗКС, дифференцировка клеток и т.д. [79] Цистеиновые протеиназы делятся на 15 семейств из пяти кланов [79]: кланы SA и SE содержат протеиназы с подобной папаину укладкой, тогда как CD клан содержит каспазо-подобные протеиназы [75]. Цистеиновые протеиназы играют важную роль в ЗКС и в реакциях на биотические и абиотические стрессы [2], цветение [80], эмбриогенез [81] и др. Металлопротеиназы участвуют в нодуляции, деградации пластид, развитии толерантности к стрессовым температурам, регуляции роста меристемы и мейозе [75,82]. Функция аспарагиновых протеиназ еще не выяснена; однако предполагается, что они вовлечены в процессы старения [83], размножения растений [84] и реакции на стресс [85]. Треониновая протеиназа *A. thaliana* из субъединицы β -типа семейства T1 (PBA1) является β -субъединицей 26S протеасомы и участвует в убиквитин-зависимой деградации белка [8]. Глутаматные и аспарагиновые протеиназы недостаточно изучены, чтобы определить их роль в растениях.

Примечательно, что растительные протеиназы широко используются в биотехнологии и биомедицине благодаря своим уникальным свойствам, таким как широкий диапазон рабочих температур и значений pH. Среди биомедицинских применений растительных протеиназ – противоопухолевая терапия, свертывание крови, заживление ран и ожогов, уход за полостью рта и лечение расстройств пищеварения [86]. Более подробно биотехнологическое применение протеиназ будет рассмотрено ниже.

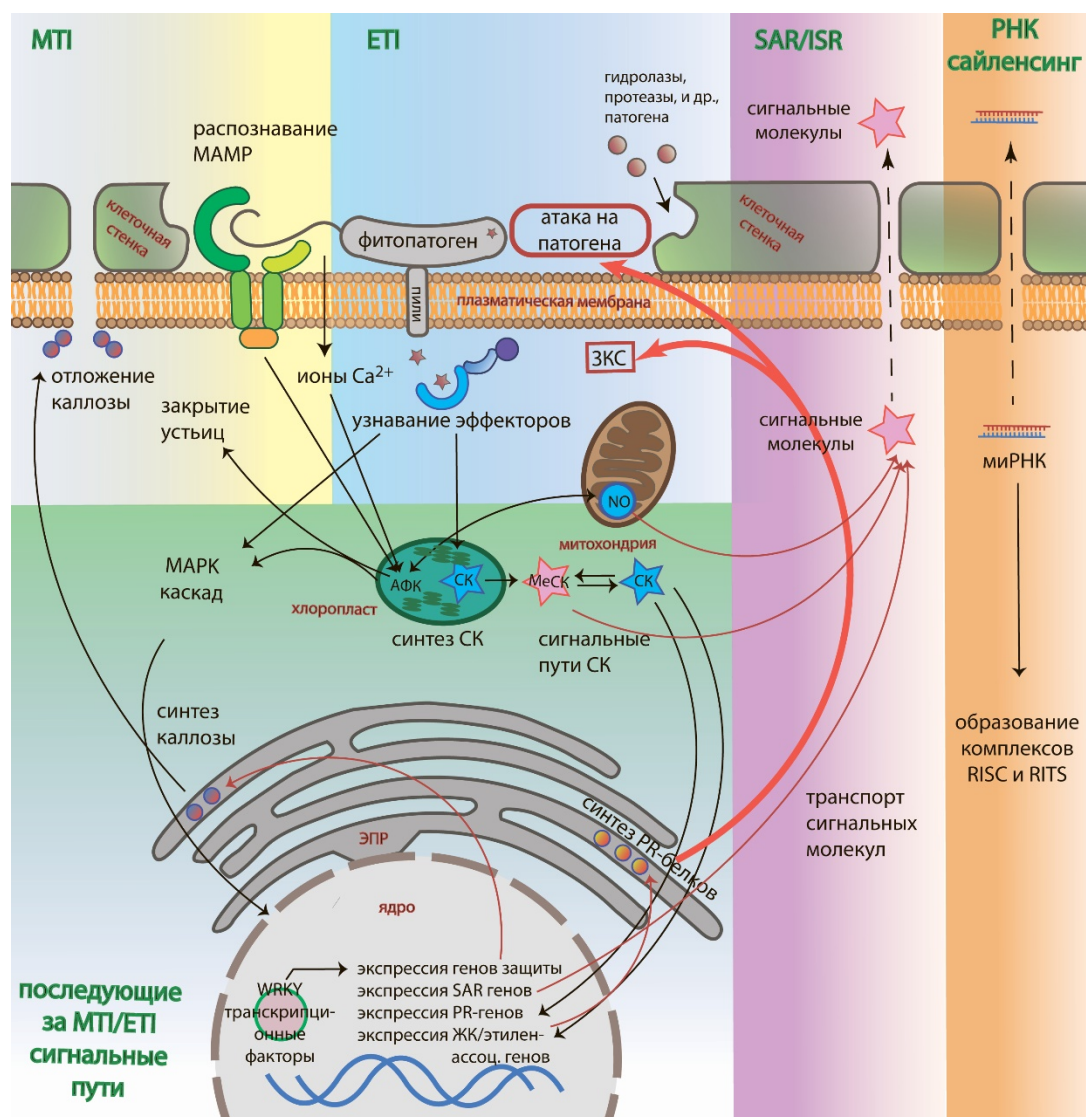


Рисунок 1. Механизмы защиты растений от патогенов. MAMP запускают MPT путем повышения концентрации ионов кальция в цитоплазме, образования АФК и АФА, отложения каллозы в плазмодесмах и закрытию устьиц [77]. Эффекторы запускают ETI посредством связывания с R-белками (NB-LRR), которые индуцируют сигнальные пути, регулируемые салициловой кислотой, и последующую индукцию PR-, ЖК/этилен-, ISR- и SAR-ассоциированных генов. PR белки, такие как хитиназа, β-1,3-глюконаза, протеиназы и т.д., либо непосредственно атакуют патоген, либо индуцируют ЗКС инфицированной клетки. СК превращается в MeСК, который транспортируется в дистальные части растения, так же, как и другие сигнальные молекулы, устанавливая SAR или ISR. miRNK также транспортируются в дистальные части растения через плазмодесмы. Названия иммунных процессов окрашены в зеленый цвет. Названия клеточных компартментов окрашены в красный цвет.

С точки зрения иммунитета было показано, что протеиназы из разных семейств участвуют почти в каждой стадии установления иммунитета, начиная с взаимодействий с патогенами в межклеточном пространстве – апопласте – и заканчивая их участием в SAR и передаваемой из поколения в поколение иммунной памяти [10].

1. Основные направления действия протеиназ в иммунном ответе растений

Протеиназы выполняют различные функции в отношении защиты растений. Во-первых, протеиназы активируют различные сигнальные процессы, осуществляя контролируемый протеолиз PRR и R-белков, также известный как отщепление эктодомена [87]. Хотя точные механизмы действия протеиназ и их субстратов еще недостаточно выяснены, единственным известным примером отщепления эктодомена в растениях является расщепление хитинового рецепторной киназы 1 *A. thaliana* CERK1 неизвестной пептидазой [88].

Во-вторых, протеиназы способны высвобождать сигнальные пептиды, которые воспринимаются PRR как связанные с повреждением молекулярные структуры (damage-associated molecular patterns, DAMP), активирующие иммунитет. Например, аспаратная протеиназа CDR1 генерирует пептиды, похожие на PAMP или гормон системин, которые активируют базальный иммунитет [89]. Более того, рекомбинантные последовательности доменов C1A протеиназ из ячменя могут напрямую запускать иммунный ответ на атаку членистоногих-фитофагов (жесткокрылых и акарид) и уменьшать повреждения листьев [90].

В-третьих, протеиназы регулируют большое количество сигнальных путей МТИ, ЕТИ, SAR, ISR и РНК сайленсинга. Несмотря на то, что ряд протеиназ уже идентифицирован как так или иначе участвующий в иммунитете растений, точные механизмы действия большинства протеиназ, их субстратов и сигнальных путей, которые они регулируют, остаются неохарактеризованными. Доменные архитектуры известных примеров ассоциированных с иммунитетом протеиназ приведены на Рис.2, в то время как известные субстраты, локализация и роль в ответе – в Таблицах 1 и 2. Также стоит упомянуть, что в случае МТИ и ЕТИ сигналы, полученные от обоих путей через PRR или R-белки, передаются дальше через MAPK каскад и последующий синтез мобильных сигнальных молекул. Таким образом, одна протеиназа может участвовать в различных типах защиты или в общих частях путей.

2. Протеиназы, вовлеченные в базальную защиту (МТИ)

Как описано выше, эндогенные протеиназы могут продуцировать MAMP- или DAMP-подобные пептиды, которые воспринимаются рецепторами PRR. Было показано, что 12-аминокислотный пептид GmSubPer из *Glycine max* L., является частью уникальной субтилазы и действует как PAMP, вызывая повышение pH и иммунный ответ путем индукции экспрессии генов, связанных с защитой, таких как Cyp93A1, Chib-1b, PDR12 и *achs* [91]. Другим увлекательным примером регуляторного расщепления пептида протеиназой является гидролиз proRALF23 субтилазой SBT6.1 (S1P) в *A. thaliana* [92]. Расщепление proRALF23 S1P приводит ингибированию продукции АФК, индуцированной elf18 (эпитоп EF-Tu, MAMP) и функции рецептора EF-Tu, который увеличивает восприимчивость к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC30000 (*PstDC3000*). Это делает S1P негативным регулятором иммунитета растений. Аспаргатовая протеиназа CDR1 также способна генерировать PAMP- или системин-подобные пептиды и индуцировать защитный ответ базальной системы и SAR [89]. Рецепторы PRR также могут быть мишенями протеиназ растений, и не только с точки зрения гидролиза эктодоменов. Субтилаза томата P69C способна расщеплять трансмембранный белок LRP, который, возможно, участвует в иммунитете [93]. Цистеиновые протеиназы *A. thaliana* из семейства C19 AtUBP12 и AtUBP13, по-видимому, являются негативными регуляторами иммунитета растений: они способны подавлять Cf-9–опосредованный ГО в *N. benthamiana* после заражения *PstDC3000* через возможное деубиквитинирование PRR [94].

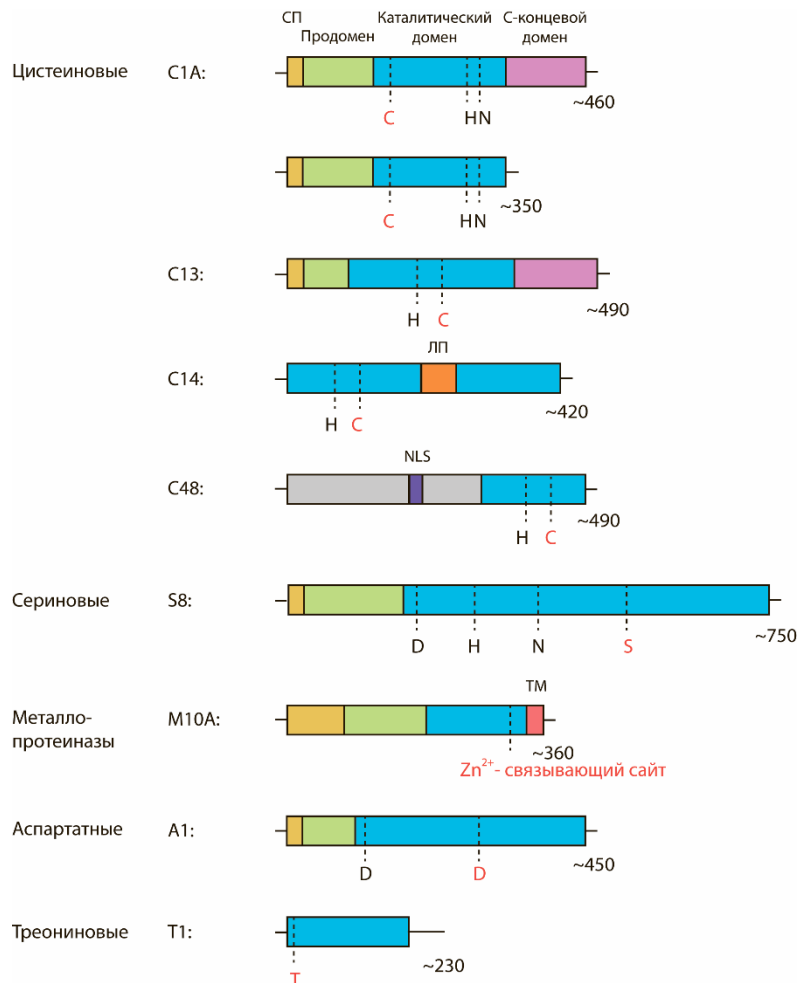


Рисунок 2. Доменная архитектура ассоциированных с иммунитетом растений протеиназ из разных семейств. Красным обозначены каталитические аминокислотные остатки. СП – сигнальный пептид, ЛП – линкерный пептид, NLS – сигнал ядерной локализации, ТМ – трансмембранная область, области в сером – области низкой сложности.

Общепринятым признаком МТИ является накопление каллозы в плазмодесмах, которое блокирует транспорт между клетками и таким образом изолирует инфицированные клетки [49]. Это происходит после распознавания flg22 с помощью FLS2-BAK1-BIK1 комплекса и продукции АФК, которые способствуют регулируемому синтезу каллозы. Синтез каллозы происходит скорее не через один консервативный нисходящий каскад, а через его собственный уникальный множественный механизм [95]. Сверхэкспрессия аспартатной протеиназы 13 из *Vitis quinquangularis* (VqAP13) в растениях *A. thaliana* повышает устойчивость к *PstDC3000* и приводит к еще большему накоплению каллозы в инфицированном сайте, чем в растениях дикого типа, что свидетельствует об участии VqAP13 в передаче сигналов МТИ. Экспрессия VqAP13 была повышена при обработке растений СК и этиленом и подавлена обработкой метил-ЖК и при инфицировании *Botritis cinerea*, что предполагает участие протеиназы в защите от некротрофного типа инфекции [96].

Другим признаком МТИ является закрытие устьиц, которое происходит в ответ на повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} и последующее накопление H_2O_2 и NO в клетках [97]. Цистеиновые протеиназы VPE необходимы для индуцированного эффектором закрытия устьиц у *N. benthamiana*. VPE локализуются в вакуоли и контролируют слияние плазматической мембраны и мембраны вакуоли во время индуцированного TMV ЗКС [98]. VPE опосредует индуцируемое эффектором закрытие устьиц путем регуляции накопления NO в защитных клетках [9]. Также известно, что патоген *PstDC3000* использует фактор вирулентности коронатин для активного открытия устьиц, а также оксалат, который продуцируется многими видами грибов [99]. Это делает VPE-зависимое закрытие устьиц важным защитным механизмом.

3. Протеиназы, участвующие в ETI, ЗКС и РНК сайленсинге

Как бы отмечено ранее, эффекторы возникли в результате коэволюции растений и патогенов. Эффекторы авирулентны и, в первую очередь, предназначены для активации транскрипции хозяина, действуя в качестве транскрипционных факторов и влияя на упаковку хроматина и регуляцию высвобождения питательных веществ для выживания патогена [51]. Кроме того, был сделан вывод о том, что один доминантный ген устойчивости хозяина (Cf) ответственен за фенотип устойчивости на определенный патоген, несущий и экспрессирующий единственный доминантный ген авирулентности (Avr) [100]. Эта модель известна как «ген для гена», подразумевая, что каждый продукт доминантного Avr гена прямо или косвенно распознается продуктом соответствующего доминантного Cf гена устойчивости хозяина. Например, при взаимодействии *Cladopsorium fulvum* и томата, продукты пяти Avr генов (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 и Avr9) *C. fulvum* запускают ГО в растениях томата, несущих Cf-2, Cf-4, Cf-4E, Cf-5 и Cf-9 гены, соответственно [101].

Таблица 1. Протеиназы, участвующие в ответе ЕТІ и ЗКС.

Растение	Протеиназа	Семейство	Локализация после инфицирования	Патоген	Идентифицированные субстраты	Ингибирован эффектором	Функция/фенотип	Ссылка
<i>A. thaliana</i>	AtMC1, AtMC2	Cys, C14B	Цитоплазма, ядро	<i>PstDC3000</i>	-	-	Подавление ГО клеток при инфицировании авирулентным патогеном; AtMC1 и AtMC2 антагонистически контролируют гибель, опосредованную LSD1	[14]
	AtMC9	Cys, C14B	Ядро, цитозоль, апопласт	-	GRI белок, РЕРСК1, AtSerpin1	-	Гибель клеток ксилемы, деградация содержимого сосудистых клеток после разрушения мембраны вакуоли	[102–105]
	CathB	Cys, C1A	Вакуоль, апопласт	<i>PstDC3000</i>	-	-	Важен для ГО и устойчивости к болезням, вызванным бактериальными патогенами, положительная регулирующая роль при старении	[59]
	RD21	Cys, C1A	Везикулы ЭПР и вакуоль	<i>B. cinerea</i>	-	-	Положительный регулятор клеточной смерти; является мишенью ингибиторов AtSerpin1, AtWSCP; расщепляется протеиназами PttMC13 и PttMC14	[17,106,107]
	RD19A	Cys, C1A	Вакуоль, ядро	<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	-	RRS1-R-опосредованная резистентность, ингибированная эффектором PopP2	[108]
	VPE	Cys, C13	Везикулы, вакуоль	<i>PstDC3000</i>	Запасные белки (12S глобулины and 2S альбумины)	-	Активирует вакуолярные ферменты и дезинтегрирует вакуолярную мембрану, высвобождая гидролитические ферменты во время ЗКС в ходе ГО, вызванного инфекцией TMV	[8,99,109]
	AtCEP1	Cys, C1A	ЭПР	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	-	-	Ограничение распространения мучнистой росы, контролирующей поздние стадии эпидермальной ЗКС	[110]
	PBA1	TGO, T1B	Цитозоль, ядро	<i>PstDC3000</i>	-	-	Каспаза-3-подобная (DEVДазная) активность при слиянии вакуолярной и плазматической мембран, регулируемого протеасомой	[8]
	AtSBT5.2(a и b)	Ser, S8	Эндосомы	<i>PstDC3000</i>	-	-	Независимое от протеолитической активности ингибирование ГО, опосредованного MYB30	[111]
<i>Picea abies</i> H. Karst.	mcII-Pa	Cys, C14	Цитозоль, ядро	-	TSN	-	Вызывает аутофагию, которая запускает механизмы ЗКС во время терминальной дифференцировки эмбриональных клеток саспенсора и участвует в дальнейшем ее развитии	[13,112]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	P69B	Ser, S8	Апопласт	<i>Phytophthora infestans</i> <i>P. syringae</i>	-	Казал-подобные ингибиторы EPII и EPI10	Защита апопласта, субстрат для протеиназ S12-, S13-MMP, положительный регулятор ЗКС	[113,114]
	P69C	Ser, S8	Апопласт	<i>P. syringae</i>	LRP белок	-	Расщепление LRP белка	[93]

	SI2-, SI3-MMPs	Metallo, M10A	Апопласт	<i>B. cinerea</i> <i>PstDC3000</i>	P69B	-	Внеклеточный каскад при гибели эпидермальных клеток	[114]
	RCR3	Cys, C1A	Апопласт	<i>C. fulvum</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Globodera</i> <i>AΦKtochien</i> <i>sis</i>	-	Avr2, EpiCs, Gr-VAP1	Внеклеточная защита; корцептор к Cf-2 для распознавания эффектора <i>C. fulvum</i>	[115,116]
	PIP1	Cys, C1A	Плазматическая мембрана, апопласт	<i>C. fulvum</i> , <i>P. infestans</i> , <i>P. syringae</i>	-	Avr2, EpiCs	Широкий диапазон внеклеточной защиты	[115,117]
	CYP1	Cys, C1A	Апопласт	Вирус желтой курчавости листьев томата	-	V2	Участие в ГО	[118]
	C14	Cys, C1A	Апопласт	<i>P. infestans</i>	-	EpiC ингибиторы, AVRb1b2	Внеклеточная защита в гаусториальных клетках	[119]
	SI-SBT3	Ser, S8	Апопласт	<i>P. infestans</i>	-	-	Каспаза-3–подобная активность (DEVДазная), ГО-подобная индукция ЗКС	[120]
<i>Populus tremula x tremuloides</i>	PttMC13, PttMC14	Cys, C14B	Цитоплазматическое агрегаты	-	RD21, TSN, PASPA3	-	Метакаспазы II типа, гомологи AtMC9, участие стрессовых гранул в пути метакаспазы-TSN и ЗКС сосудистых и волокнистых клеток ксилемы, гидролиз RD21, TSN, PASPA3 в ходе посмертных аутолитических процессов	[15]
<i>Solanum tuberosum L.</i>	StSBTC-3	Ser, S8	Апопласт	<i>P. infestans</i>	-	-	Каспаза-3–подобная активность (DEVДазная), ГО-подобная индукция ЗКС	[120]
<i>Avena sativa L.</i>	Saspase	Ser, S8	Апопласт	<i>Cochliobolus victoriae</i>	РубисКО	-	Протеолиз РубисКО в викторин-индуцированной активности ЗКС, IETДазная и LEHДазная	[121]
<i>Nicotiana tabacum L.</i>	Phytaspase	Ser, S8	Цитозоль, апопласт	Вирус табачной мозаики	VirD2 из <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	Активированный в ГО, индуцированном вирусом табачной мозаики; расщепление VirD2 предотвращает транспорт белка в ядро; VEИДазная, IETДазная, LEHДазная и VDVAДазная	[122]

Было показано, что растительные протеиназы участвуют в Avr/Cf-индуцированном ГО (Табл.1). NbPip1 из *N. benthamiana* связана с Avr4/Cf-4–индуцированным ГО; при внесении мутаций в NbPip1, ГО задерживался на один-два дня [123], тогда как Rcr3 из томата действует как корцептор для Cf-2 при распознавании эффектора Avr2 [116]. Кодированные Cf генами R-белки представляют собой NB-LRR (содержащие nucleotide-binding domain (NB) LRR белки), которые в основном действуют в ядре для прямой и быстрой регуляции экспрессии генов посредством активации иммунных ответов [124]. Белок RIN4 регулирует косвенное распознавание эффекторов, поэтому он является мишенью для многих из них (AvrRpt2, AvrRpm1, AvrB и HopF2) [125].

Ответ ETI впоследствии активирует MAPK каскад, который индуцирует транскрипцию с PR генов. Это вызывает биосинтез СК, ЖК, этилена и антимикробных ферментов, как было описано выше. Деградация NPR1 является молекулярным переключателем, зависимым от его паралога NPR3 и NPR4 – рецепторов СК, которые связывают ее с различным средством и регулируют деградацию NPR1 зависимым от СК способом [126]. NPR3 и NPR4 являются адаптерами Cullin 3-убиквитин-Е-лигазы, а *npr3-npr4*-двойные мутантные растения накапливают большое количество белка NPR1 и не способны запускать ETI, ЗКС или устанавливать SAR. Растительная ЗКС характеризуется конденсацией хроматина, сокращением цитоплазмы, набуханием митохондрий, вакуолизацией и разрушением хлоропластов [127]. Хлоропласты играют центральную роль в защитных реакциях и клеточной гибели клеток растений. Он является источником защитных сигнальных молекул, таких как АФК, АФА, СК и ЖК [1]. Кроме того, было показано, что эффекторы патогенов, обладающие сигналами локализации хлоропластов, подавляют иммунитет [128].

3.1. Метакаспазы

При заражении некротрофным патогеном инфекция приводит к некрозу клетки, тогда как при заражении биотрофным патогеном растительный организм запускает ЗКС для уничтожения инфицированных клеток. Однако, в то же время такие патогены подавляют ЗКС, чтобы питаться живыми клетками [129]. Основными исполнителями ЗКС у животных являются каспазы – цистеиновые аспарат-специфичные протеиназы, близкие гомологи которых отсутствуют в растениях. При этом стоит отметить, что ЗКС у растений связана с каспазо-подобной активностью, но не с самими каспазами (Табл.1). Метакаспазы являются очень отдаленными гомологами каспаз, и их биохимические свойства также отличаются: метакаспазы способны расщеплять субстраты после остатков аргинина и лизина, тогда как каспазы – после аспартата. Метакаспазы делятся на типы I (AtMC1-AtMC3) и II (AtMC4-

AtMC9), характерные для бактерий, растений и водорослей, и III, характерные для некоторых видов водорослей [130]. Метакаспазы I типа содержат дополнительный N-концевой пролин-богатый продомен с мотивом цинкового пальца [2]. Было показано, что метакаспазы *A. thaliana* типа I, AtMC1 и AtMC2, регулируют аутолитическую ЗКС (включая быструю элиминацию цитоплазмы): они подавляют реакцию ГО клеток при заражении авирулентным патогеном, *PstDC3000*. AtMC1 и AtMC2 антагонистически контролируют LSD1-ассоциированную гибель клеток [14]. Метакаспаза II типа AtMC9 функционирует вне клетки во время аутолиза элементов ксилемы после их гибели: она обеспечивает посмертную элиминацию содержимого клеток после разрыва мембраны вакуоли [102]. Во внеклеточном пространстве AtSerp1 необратимо ингибирует AtMC9 [131]. Было показано, что AtMC9 отщепляет 11 аминокислот от белка GRI, участвующего в инициации ЗКС [104]. Другим субстратом AtMC9 является фосфоенолпируваткарбоксикиназа 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, ПЕРСК1) – один из компонентов глюконеогенеза у растений. Расщепление ПЕРСК1 AtMC9 приводит к усилению активности фермента, что свидетельствует о роли AtMC9 в ограниченном протеолизе и его эффекторных свойствах [103]. Было показано, что гомологи AtMC9 из гибридной осины (*P. tremula x tremuloides*), PttMC13 и PttMC14 участвуют в разнообразных процессах ксилемы: в пути метакаспаза-TSN; в регуляторном протеолизе RD21 во время созревания ксилемы и гибели клеток ксилемных элементов (расщепление аспаргатной протеиназы PASPA3) [15]. Они также экспрессируются при неаутолитическом типе клеточной смерти – при вакуолярном коллапсе [15].

Стоит отметить, что хотя каспазы и метакаспазы обладают различными субстратными специфичностями и биохимическими свойствами, они функционально схожи. Обе группы протеиназ способны гидролизовать одни и те же консервативные субстраты, важные для жизнедеятельности разных видов. Было показано, что белок TSN, который обнаружен в растениях и животных (включая человека) и необходим для транскрипции, сплайсинга РНК, редактирования РНК и т.д., является субстратом как для каспазы-3 человека, так и для метакаспазы II типа ели обыкновенной (mcII-Pa) [12,13]. TSN входит состав комплекса RISC, который управляет активацией транскрипции, сплайсинга мРНК, регуляцией сайленсинга РНК [12]. Было показано, что TSN является анти-апоптотическим агентом: мутантный, нерасщепляемый TSN стимулирует пролиферацию клеток и защищает клетки от гибели. Деградация TSN под действием mcII-Pa приводит к ухудшению его способности активировать сплайсинг мРНК, ингибированию его рибонуклеазной активности и, в конечном итоге, к гибели клетки. Было показано, что mcII-Pa выполняет ЗКС эмбриональных клеток суспензора

во время эмбриогенеза растений [13]. Эти данные позволяют предположить, что расщепление TSN с помощью mсII-Ра представляет собой регуляторный механизм, который подавляет РНК сайленсинг и способствует ЗКС клеток, вызванной вирусом (Рис.3).

3.2. VPE и PBA1

Вакуолярный коллапс представляет собой тип ЗКС, который характеризуется отсутствием быстрой зачистки цитоплазмы и осуществляется цистеиновыми протеиназами – ферментами VPE [34]. VPE обладают каспаза-1-подобной активностью и аспартатной специфичностью; они локализуются в вакуоли и опосредуют вызванную вирусом гибель клеток, регулируя разрушение вакуолярной мембраны и высвобождение гидролитических ферментов для атаки вируса в ответ на инфекцию. VPE ответственны за YVADазную активность во время индуцированной TMV ЗКС [9]. Другая протеиназа – треонин-зависимая β-субъединица протеасомы (PBA1) – вовлечена в еще один связанный с вакуолями защитный механизм. PBA1 регулирует слияние вакуолярной и плазматической мембран с последующими высвобождением гидролитических ферментов в межклеточное пространство и атакой патогена антибактериальной жидкостью. Эта жидкость содержит PBA1, которая характеризуется каспаза-3-подобной (DEVDAзной) активностью, регулирующей последующую ЗКС [8].

3.3. Субтилазы

Субтилазы (сериновые протеиназы, семейство S8) также проявляют каспазо-подобную активность и способствуют развитию ЗКС. Субтилазы томатов P69В и P69С были первыми выявленными растительными апопластными протеиназами. Эти субтилазы являются PR-белками, которые обеспечивают базальные уровни защиты. Их промоторы индуцируются СК, и они синтезируются в виде препроферментов, как локально (в зараженном сайте), так и системно (в дистальных, неинфицированных сайтах), в ответ на *P. infestans* и *P. syringae* [132]. Протеаза P69В является мишенью и ингибируется Казал-подобными ингибиторами EPI1 и EPI10 из *P. infestans* [113]. Недавно было показано, что P69В *in vitro* является субстратом матричных металлопротеиназ S12- и S13-ММР томата. Сверхэкспрессия P69В приводит к ЗКС клеток эпидермиса гипокотилей томатов, что позволяет предположить, что P69В является положительным регулятором, а S12- и S13-ММР – отрицательными регуляторами ЗКС клеток эпидермиса [114]. S12- и S13-ММР также секретируются в апопласт, они принадлежат к семейству металлопротеиназ M10А и синтезируются в форме препроферментов (Рис.2).

Другие субтилазы – фитаспазы – проявляют VEIDазную, IETDазную, LEHDазную и VDVAДазную активности и активируются во время TMV-индуцированной ЗКС [122]. Фитаспазы способны отщеплять сигнал ядерной локализации (NLS) от NLS-содержащего белка *A. tumefaciens*, эндонуклеазы Т-ДНК VirD2, которая необходима для поглощения чужеродной ДНК в растительной клетке при бактериальной инфекции и трансформации растений [133]. Фитаспазы конститутивно синтезируются и локализуются в активной форме в апопласте в нормальных условиях, в то время как после индукции клеточной смерти релокализируются назад в цитоплазму [7,122,133].

Саспазы из овса обладают IETDазной и LEHDазной активностями и расщепляют молекулы РуБисКО во время разрушения хлоропластов во время викторин-индуцированной ЗКС (токсин из *C. victoriae*) [121]. Саспазы конститутивно синтезируются в неактивной форме; процессируются и перемещаются в апопласт после индукции ЗКС.

Было показано, что другая субтилаза из *S. tuberosum*, StSBТс-3, обладает каспаза-3-подобной DEVDазной активностью. Она локализуется в апопласте и накапливается в отдельных листьях после заражения *P. infestans*. Эта протеиназа экспрессируется конститутивно и может вызывать ЗКС и сжатие цитоплазмы *in vitro* [134].

Было показано, что другая субтилаза – AtSBТ5.2 (a) из *A. thaliana* – является негативным регулятором активности MYB30 – транскрипционного фактора, который способствует развитию ответа, связанного со смертью клеток, путем индукции генов биосинтеза липидов [111]. Вариантный белок AtSBТ5.2 (b) сохраняет MYB30 в везикулах, которые не могут проникать в ядро во время инфекции.

3.4. Папаин-подобные цистеиновые протеиназы

Было показано, что ППЦП регулируют ЗКС растений. Подавляющее большинство изученных апопластных протеиназ представлено ППЦП, которые относятся к С1А подсемейству цистеиновых протеиназ. ППЦП являются ключевыми фигурами в регуляции различных процессов растений, включая рост, развитие, реакцию на стрессы и защиту. ППЦП активируются у растений *A. thaliana*, мутантных по генам аутофагии *atg*, что указывает либо на их резервную роль в рециркуляции питательных веществ и ремобилизации, либо на их роль в содействии гибели клеток [135].

3.4.1. Апопластные ППЦП

Чаще всего апопластные ППЦП, которые тесно связаны с ответом ETI, являются мишенями эффекторов патогенов. Например, протеиназы С14 томатов и картофеля

ингибируются цистатин-подобными эффекторами EpiC [136] и эффектором AVRblb2 из *P. infestans* [119]. C14 синтезируется как препрофермент и содержит уникальный гранулиновый домен с неизвестной функцией (Рис.2, C1A). Сайленсинг C14 приводит к тому, что растения *N. benthamiana* становятся восприимчивыми к инфекции *P. infestans*. C14 – очень консервативная протеиназа, и ее гомологи имеются у различных представителей царства растений. Например, CYP1 томата – ортолог C14, который не содержит гранулинового домена и является мишенью белка V2 вируса желтой курчавости листьев томата [118]. Цистеиновые протеазы CP1A, CP1B, CP2 и XCP2 из кукурузы также являются ортологами C14, они не содержат гранулиновый домен и являются мишенями для эффектора *Ustilago maydis* Pit2 [137]. Отсутствие этих ферментов приводит к повышенной восприимчивости растений к патогенам.

Интересными примерами коэволюции эффекторов патогенов и защиты растений являются паралогичные апопластные SAG12-подобные ППЦП RCR3 и PIP1. Тот факт, что эти протеиназы являются мишенями многих эффекторов, свидетельствует о важности этих ферментов для защиты растений [115]. Обе протеиназы экспрессируются конститутивно в листьях, но их экспрессия усиливается после инокуляции *S. fulvum* (как вирулентными, так и авирулентными штаммами), *P. infestans* и *P. syringae*. Обе протеиназы могут быть ингибированы эффекторами Avr2 и цистатин-подобными ингибиторами EpiC [117]. RCR3 также является мишенью для эффектора нематод Gr-VAP1 [116]. Экспрессия PIP1 примерно в 10 раз выше, чем RCR3, и это основная «иммунная» протеиназа, вовлеченная в обеспечение иммунного ответа против целого ряда различных апопластных патогенов. Отсутствие PIP1 приводит к повышенной чувствительности к бактериальным и оомицетным патогенам, тогда как RCR3 действует как ко-рецептор к иммунному рецептору Cf-2 для распознавания Avr2. Отсутствие RCR3 вызывает повышенную восприимчивость только к *P. infestans*.

Функциональная дивергенция паралогичных генов обеспечивает более эффективную защиту от различных патогенов. Кроме того, гомолог томата PIP1, NbPip1 из *N. benthamiana*, вносит вклад в индуцированный Avr4/Cf-4 ГО [123].

Таблица 2. Протеиназы, участвующие в нисходящих сигнальных путях MTI/ETI, SAR и ISR.

Растение	Протеиназа	Семейство	Локализация	Патоген	Функция/фенотип	Ссылка
<i>S. lycopersicum</i>	SI3-MMP	Metallo, M10A	Плазматическая мембрана	<i>PstDC3000, B. cinerea</i>	Повышенная устойчивость к <i>B. cinerea</i> и повышенная экспрессия генов, связанных с защитой	[138]
	SBT3-S1	Ser, S8	Сосудистая система	Личинки <i>Manduca sexta</i>	Защита от травоядных животных, участвующих в процессинге системина и ЖК-опосредованной устойчивости	[139]
<i>Gossypium babardense</i> L.	GbSBT1	Ser, S8	Плазматическая мембрана, цитоплазма	<i>Verticillium dahliae</i>	Связана с передачей сигналов ЖК	[140]
<i>V. quinqueangularis</i>	AP13	Asp, A1	-	<i>PstDC3000, мучнистая роса, B. cinerea</i>	Передача сигнала СК-зависимого пути, но подавление передачи сигнала пути ЖК, усиленное отложение каллозы	[96]
<i>A. thaliana</i>	SBT3.3	Ser, S8	Апопласт	<i>PstDC3000</i>	H ₂ O ₂ -индуцируемый позитивный регулятор врожденного иммунитета, действующий вверх по пути СК, активация MAPK каскада, ремоделирование хроматина СК-ассоциированных генов	[61]
	OTS1, OTS2	Cys, C48	Ядро	<i>P. syringae</i>	OTS1 и OTS2 негативно регулируют биосинтез СК, снижая экспрессию гена ICS1, предположительно, в зависимости от уровня угрозы патогена	[141]
	CDR1	Asp, A1	ЭПР и апопласт	<i>P. syringae</i>	Индукция СК-зависимого ответа; может высвобождать эндогенные внеклеточные пептиды, которые действуют как мобильные сигналы для установления SAR	[89]
	AED1	Asp, A1	Апопласт	<i>P. syringae</i>	Индукцируется локально (EDS1-независимый) и системно (EDS1-зависимый) во время передачи сигналов при SAR; гомеостатический механизм для ограничения SAR, компромисс между защитой и ростом растений	[142]
	TOP1, TOP2	Metallo, M3	TOP1 – хлоропласты, TOP2 – цитозоль	-	Неконкурентное связывание СК, опосредует СК-зависимую передачу сигналов и необходима для иммунного ответа на авирулентные патогены	[143]
Кукуруза черная мексиканская сахарная (BMS-33)	MIR1	Cys, C1A	Муговка кукурузы	Гусеницы <i>Heliothis virescens</i> , тля	Протеолиз перитрофического матрикса гусениц, этилен-зависимая передача сигнала в дистальные отделы растения	[144]

3.4.2. Внутриклеточные ППЦП

Активность не апопластных, внутриклеточных ППЦП растений также связана с иммунным ответом и ЗКС. Катепсины – папаин-подобные цистеиновые протеиназы животных – представляют собой лизосомальные ферменты, которые связаны как со смертью, так и с выживанием клеток [145–149]. У *A. thaliana* AtCathB, вероятно, является позитивным регулятором гибели клеток и базальной резистентности, опосредованной через взаимодействия с LSD1. Ключевой маркерный ген старения, SAG12, подавляется у тройных мутантов *atcathb*. Таким образом, катепсин В необходим для ГО и устойчивости к бактериальным патогенам [59].

Известно, что RD21 из *A. thaliana* является гомологом C14, который накапливается в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) в неактивной форме, содержащей сигнальный пептид, продомен и гранулиновый домен (Рис.2, C1A), которые расщепляются во время процессинга. RD21 физически и обратимо подавляется ингибитором типа Куниц AtWSCP из *A. thaliana*, который регулирует ЗКС во время развития цветков [107]. В отделенных листьях RD21 также является мишенью для ингибитора AtSerp1. AtSerp1 локализуется в цитоплазме, тогда как RD21 локализуется в ЭПР и вакуоли. Факторы клеточной смерти увеличивают проницаемость мембран, что приводит к ко-локализации RD21 и AtSerp1 в цитоплазме и необратимому ингибированию протеиназы [17,150]. Кроме того, как уже упоминалось, RD21 также расщепляется метакаспазами II типа, PttMC13 и PttMC14 [15]. Мутанты RD21 не подвержены инфекции *P. syringae*, но более восприимчивы к некротрофу *B. cinerea*. Эти данные демонстрируют тот факт, что RD21 определяет иммунный ответ на некротрофные инфекции.

Ортолог RD21, RD19, также участвует в защите растений: он ингибируется эффектором *R. solanacearum* PopP2, который взаимодействует с RRS1-R из *A. thaliana* [108]. RD19 индуцируется во время инфекции *R. solanacearum* и обычно локализуется в мобильных компартментах ЭПР, и при взаимодействии с эффектором PopP2 он перемещается в ядро клеток растения. Ядерный комплекс RD19-PopP2 распознается RRS1-R и необходим для осуществления ответа ETI.

KDEL-содержащая цистеиновая эндопептидаза 1 из *A. thaliana* (AtCEP1) также локализуется в ЭПР и функционирует во время гибели клеток при развитии и ремоделировании ткани. Было показано, что эта протеиназа связана с поздними защитными реакциями: она ограничивает рост биотрофного гриба *E. cruciferarum* и участвует в поздней гибели эпидермальных клеток [110]. Активность AtCEP1 регулируется молекулами гормонов,

а не МАРК, и накапливается в гаусториях, вызывая ЗКС. AtSER1, вероятно, транспортируется из ЭПР в вакуоль через поздние эндосомы с последующим слиянием с вакуолью, что приведет к перемещению AtSER1 в апопласт или внегаусториальное пространство [8]. KDEL-содержащие ППЦП, такие как AtSER1, считаются протеиназами позднего действия, которые переваривают белки клеточной стенки на конечных стадиях ЗКС и ремоделирования тканей после клеточного распада [151].

4. Протеиназы, участвующие в нисходящих сигнальных путях МТИ/ЕТИ, SAR и ISR

Нисходящие события МТИ и ЕТИ частично перекрываются и включают активацию МАРК каскада и факторов транскрипции WRKY, содержащие консервативную аминокислотную последовательность WRKYGQK на его N-конце [152]. Транскрипционные факторы WRKY осуществляют быструю активацию PR генов, связанных с биосинтезом сигнальных молекул СК, ЖК и этилена, а также с лигнификацией, продукцией антимикробных агентов и т.д. [153,154] Субтилаза SBT3.3 из *A. thaliana* активирует МАРК и OXI1 киназы после атаки патогена (Табл.2). В нокаутных по гену *sbt3.3* растениях происходит ингибирование МАРК каскада и ремоделирования хроматина, что свидетельствует об его участии в регуляции киназ и эпигенетической регуляции [61].

4.1. Зависимые от СК сигнальные пути

Растения продуцируют СК из хоризмовой кислоты по двум биосинтетическим путям, один из которых катализируется фенилаланинлиазами 1-4 (AtPAL1–4), а другой – изохорисматсинтазой 1 и 2 (AtICS1 и 2) в хлоропластах [155]. Накопление СК приводит к созданию SAR – длительной устойчивости к широкому спектру заболеваний, которая подразумевает активацию защитных механизмов в инфицированных местах и нацелена на защиту дистальных здоровых тканей [156]. SAR приводит к полному перепрограммированию PR-генов и клеточному праймированию. Это достигается за счет продукции мобильной сигнальной молекулы MeСК в инфицированном месте и ее транспорта через плазмодесмы и флоэму в дистальные части растения [156]. Доставленный в здоровые клетки, MeСК превращается в СК и связывается с ее рецепторами NPR3 и NPR4, что приводит к деградации NPR1 и индукции генов, связанных с SAR [126]. SAR-ассоциированные протеиназы приведены в Таблице 2.

Активируемые СК нижестоящие гены делятся на непосредственно ранние и поздние гены, которые включают ген *pr1* [157]. Пептидазы TOP1 и 2 представляют собой металлопротеиназы из *A. thaliana*, которые взаимодействуют с СК, что приводит к потере их

протеолитической активности как *in vitro*, так и в растительных экстрактах [144]. Отсутствие TOP металлопротеиназ приводит к повышенной восприимчивости к *P. syringae* [144]. Было высказано предположение, что TOP участвуют в СК-зависимых сигнальных путях и действуют как модуляторы процессов клеточной смерти, происходящих в хлоропластах и цитозоли, которые могут не активироваться исключительно патогенной инфекцией напрямую.

OTS1 и 2 – это цистеиновые протеиназы из *A. thaliana*, которые отщепляют малый связанный с убиквитином модификатор 1 и 2 (SUMO1 и 2) и управляют SUMO1/2-опосредованной регуляцией передачи сигналов СК [141]. Двойной мутант *ots1/2* продемонстрировал повышенную устойчивость к вирулентному штамму *P. syringae*, возросший уровень СК и экспрессию гена *ics1* по сравнению с растениями дикого типа. СК стимулировала деградацию OTS1/2 и способствовала накоплению конъюгатов SUMO1/2. Накопление таких конъюгатов совпадало со стимулируемой СК деградацией OTS1 и 2, и может играть положительную роль в СК-опосредованной передаче сигналов.

Было показано, что апопластная аспартатная протеиназа AED1 из *A. thaliana* индуцируется локально и системно при помощи СК и ее аналогом, бензотиадиазолом [142]. Белок EDS1 важен как для генерации сигнала SAR в инфицированном участке, так и для его восприятия в системных тканях. В мутантных по *eds1* растениях избыточная аккумуляция комплекса AED1 и гемагглютинина ингибировала индуцированную СК резистентность и SAR (EDS1-зависимую), но не локальную резистентность (EDS1-независимую). Данные предполагают, что AED1 является частью механизма гомеостатической обратной связи, который регулирует системный иммунитет. Другой аспартатной апопластной протеазой является CDR1 из *A. thaliana*, гиперактивация которой вызывает СК-зависимую реакцию устойчивости к инфекциям [89]. Это активирует SAR и индуцирует накопление СК и транскриптов генов *pr1* и *pr2*, которые являются маркерами SAR. Белок CDR1 накапливается в апопласте в ответ на инокуляцию авирулентными бактериальными патогенами. CDR1 может генерировать внеклеточные пептиды, которые активируют ответ базальной защиты.

4.2. Зависимые от ЖК и этилена сигнальные пути

ЖК является основной сигнальной молекулой индуцированной системной устойчивости ISR и продуцируется путем индукции октадеканоеидного пути. ЖК является плейотропным гормоном, а ЖК-зависимые гены кодируют арсенал белков защиты растений, участвующих в устойчивости к насекомым и некротрофным патогенам [158]. ЖК- и этилен-ассоциированные сигнальные пути осуществляются и интегрируются суперсемейством

этилен-чувствительных транскрипционных факторов, которые связываются с GCC-боксом PR-белков [159]. ЖК-индуцированные (ISR) и СК-индуцированные (SAR) сигнальные пути негативно регулируют друг друга: сигнальный путь СК участвует в устойчивости к биотрофным патогенам, в то время как сигнальные пути ЖК и этилена в основном опосредуют устойчивость к некротрофным патогенам [160]. Однако было идентифицировано только несколько генов, которые регулируют взаимодействие между сигнальными путями ЖК и СК (Табл.2). Сверхэкспрессия аспартатной протеиназы 13, AP13 из *V. quinquangularis*, описанная выше, не только повышает устойчивость к мучнистой росе, но также способствует регуляции СК, ЖК и этиленом. Ее уровни транскрипции снизились после заражения *B. cinerea* (некротрофным патогеном) и обработкой метил-ЖК, но увеличилось после обработки этиленом и СК. Это говорит о том, что действие VqAP13 способствует СК-зависимой передаче сигнала, но подавляет путь передачи сигнала ЖК. Сверхэкспрессия VqAP13 подавляет биосинтез ЖК, а также экспрессию нижестоящих генов, например, липоксигеназы 3, растительного дефензина 1.2, и усиление экспрессии генов *ics1* и *pr1*, которые являются компонентами пути биосинтеза СК и сигнальных путей СК, соответственно [96].

Экспрессия металлопротеиназы матрикса томата, S13-MMP, индуцируется инфекцией *B. cinerea*, *PstDC3000*, а также обработкой СК, ЖК и этиленом [138]. S12- и S13-MMP предпочитают гидрофобные аминокислотные остатки в положении P₁ и пролиновый остаток в положении P₃ субстрата [114]. Отсутствие S13-MMP приводит к повышенной восприимчивости к *B. cinerea* и *PstDC3000*. Кроме того, обработка СК, метил-ЖК и предшественником этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты – показала увеличение в три-четыре раза по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации гена S13-MMP в поздние ответы ETI.

Субтилаза из *G. barbadense*, GbSBT1, гомологична AtSBT5.2, описанной выше, и связана с защитным ответом на инфекцию *V. dahliae* [140]. Изохорисматаза, VdISC1, секретируется *V. dahliae* для подавления СК-опосредованного врожденного иммунитета клеток-хозяев. Устойчивость к этой инфекции, таким образом, связана с сигнальным путем ЖК. GbSBT1 обычно локализуется в плазматической мембране, тогда как после обработки ЖК и этиленом она перемещается в цитоплазму, что указывает на то, что протеиназа является датчиком комбинированных сигналов обработки этиленом и ЖК. Кроме того, сверхэкспрессия GbSBT1 в *A. thaliana* приводит к активации сигнального MAPK каскада и ЖК-чувствительных генов [161].

Протеиназы, которые способствуют ISR и участвуют в защите от насекомых, также были идентифицированы (Табл.2). Интересным примером растительной протеиназы, которая участвует в защите от нападения травоядных насекомых, является цистеиновая протеаза MIR1 из кукурузы, которая активируется в ответ на кормление гусеницами [144]. Активность фермента зависит от этилена и накапливается в мутовке кукурузы, что приводит к снижению роста гусеницы и деградации ее перитрофической матрицы. Другим примером является субтилаза SBT3-S1 из томата, которая индуцируется после ранения и нападения насекомых [139]. Сайленсинг SBT3-S1 приводит к снижению устойчивости к личинкам травоядного животного, *M. sexta*, и ослабляет индукцию системных генов защиты в ране. Было обнаружено, что SBT3-S1 остается стабильным и активным в пищеварительной системе насекомого, откуда он может воздействовать на белки насекомого или растительного происхождения. Кроме того, SBT3 участвует в регуляции пектинметилэстераз.

IV. Папаин-подобные цистеиновые протеиназы: структура, специфичность, свойства

1. Понятие папаин-подобных цистеиновых протеиназ и их классификация

Далее рассмотрим более детально столь важные для иммунитета растений ферменты – папаин-подобные цистеиновые протеиназы. Впервые цистеиновая протеиназа – папаин – была выделена и охарактеризована в 1937 году из папайи *C. papaya* [162]. Группа ППЦП относится к С1А подсемейству цистеиновых протеиназ согласно MEROPS [163]. Это самая многочисленная группа тиоловых протеиназ, которая содержит в том числе катепсины человека. Катепсины, названные от греческого «katharsein» – «переваривать», представлены в основном лизосомальными ферментами, причем не только из группы цистеиновых, но и аспартатных и сериновых протеиназ. В растениях, из 11 цистеиновых катепсинов человека В,С,Е, Н,К, L, О, S, V, X и W, были обнаружены только гомологи катепсинов L, F, Н, и В [164,165]. Катепсин L- и В-подобные растительные протеиназы формируют две отдельные группы и различаются по структурам продомена и зрелого фермента [148]. Катепсин L-подобные протеиназы (включая катепсин Н) имеют продомен содержит ~100 аминокислотных остатков и, в том числе, высоко консервативные последовательности ERFNIN и GNFD [162], в то время как катепсин В-подобные мотив ERFNIN не содержат [166]. Катепсин В также обладает характерной особенностью – окклюзионной петлей, опосредующей карбоксипептидазную активность [166]. Катепсин F-подобные протеиназы растений содержат специфическую последовательность ERFNAQ в продоме [167]. При этом стоит отметить, что классификация ППЦП была осуществлена только для нескольких видов растений (таких

как *Arabidopsis*, *Hevea brasiliensis*, и др.), и, учитывая важность ППЦП для иммунитета многих растений, их обнаружение и классификация в других растительных организмах необходима.

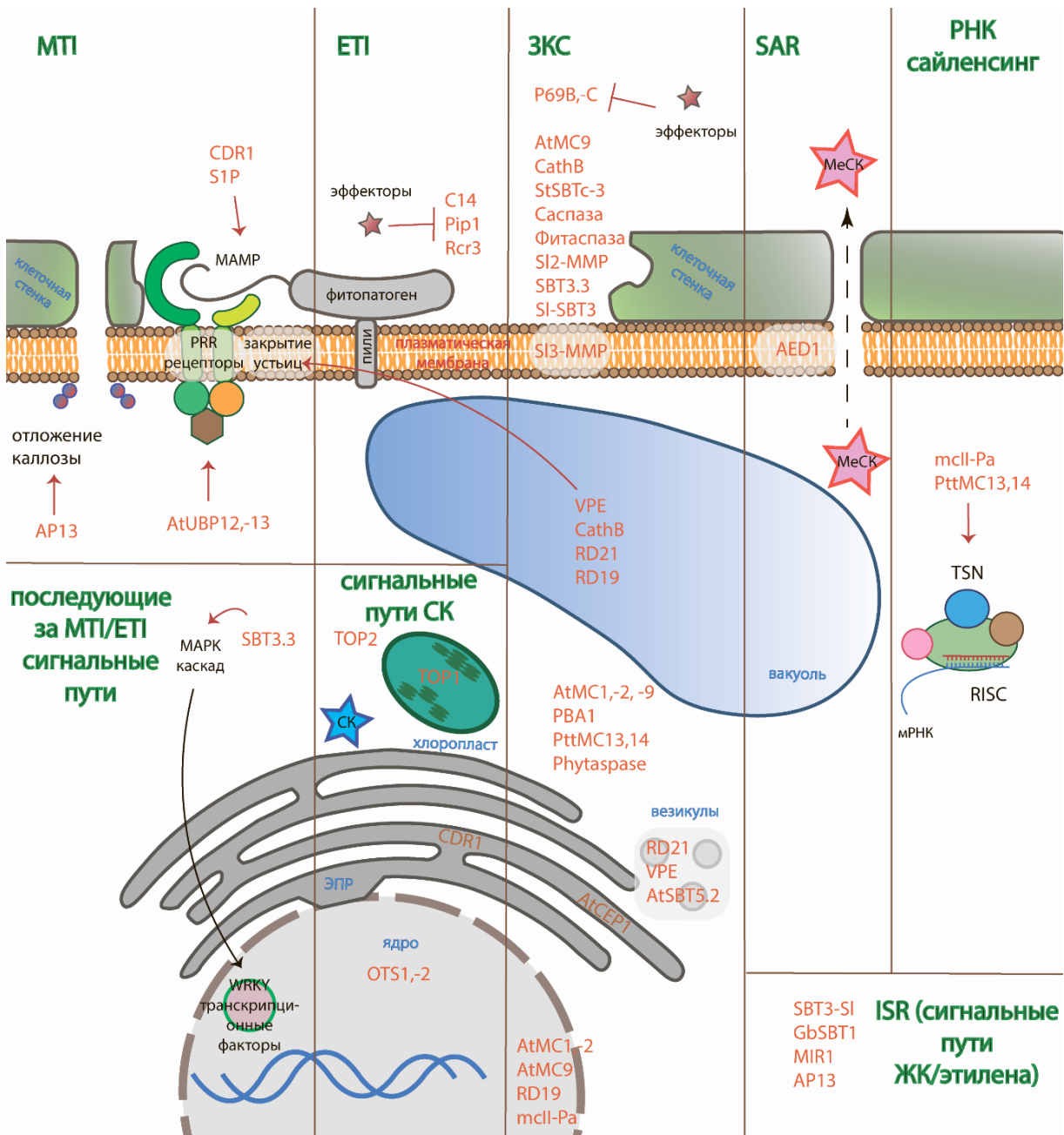


Рисунок 3. Участие растительных протеиназ в различных путях иммунитета и их внутриклеточная локализация. Протеиназы, рассмотренные в обзоре, окрашены в оранжевый цвет. Иммунные процессы окрашены в зеленый цвет. Названия компартментов окрашены в синий цвет. Стрелки указывают на объект действия протеазы (гидролиз субстрата или влияние на процесс). Т-подобные стрелки подразумевают ингибирование протеиназ эффекторами.

2. Механизм катализа папаин-подобными цистеиновыми протеиназами

Папаин-подобные протеиназы содержат два домена, образующие вместе V-образную щель, в которой располагается активный центр протеиназ. Активный центр содержит каталитическую триаду, состоящую чаще всего из остатков цистеина, гистидина и аспарагина

[168]. На первом шаге механизма реакции катализа расщепления пептидной связи субстрата происходит депротонирование каталитического остатка цистеина фермента прилегающим остатком из каталитической триады с основной группой (обычно гистидином) (Рис.4). Далее происходит нуклеофильная атака депротонированной S^- группой карбонильного атома углерода субстрата. На этом шагу высвобождается N-концевая часть разорванной пептидной связи субстрата, в то время как остаток гистидина протеиназы возвращается в депротонированную форму. Происходит образование тиоэфирного интермедиата, получившегося в результате связи между новообразованным карбоксильным концом субстрата и каталитическим цистеином протеиназы. Тиоэфирная связь в последствии гидролизуется с высвобождением карбоксильной группы субстрата с одновременной регенерацией протеиназы.

Стоит отметить, что цистеин имеет низкую pK_a , и потому важность аспарагина в триаде сильно варьируется. В некоторых протеиназах (например, протеиназа вируса гепатита А) эффективно действует диада цистеин-гистидин, в то время как для ПППЦП аспарагин важен для осуществления катализа [169].

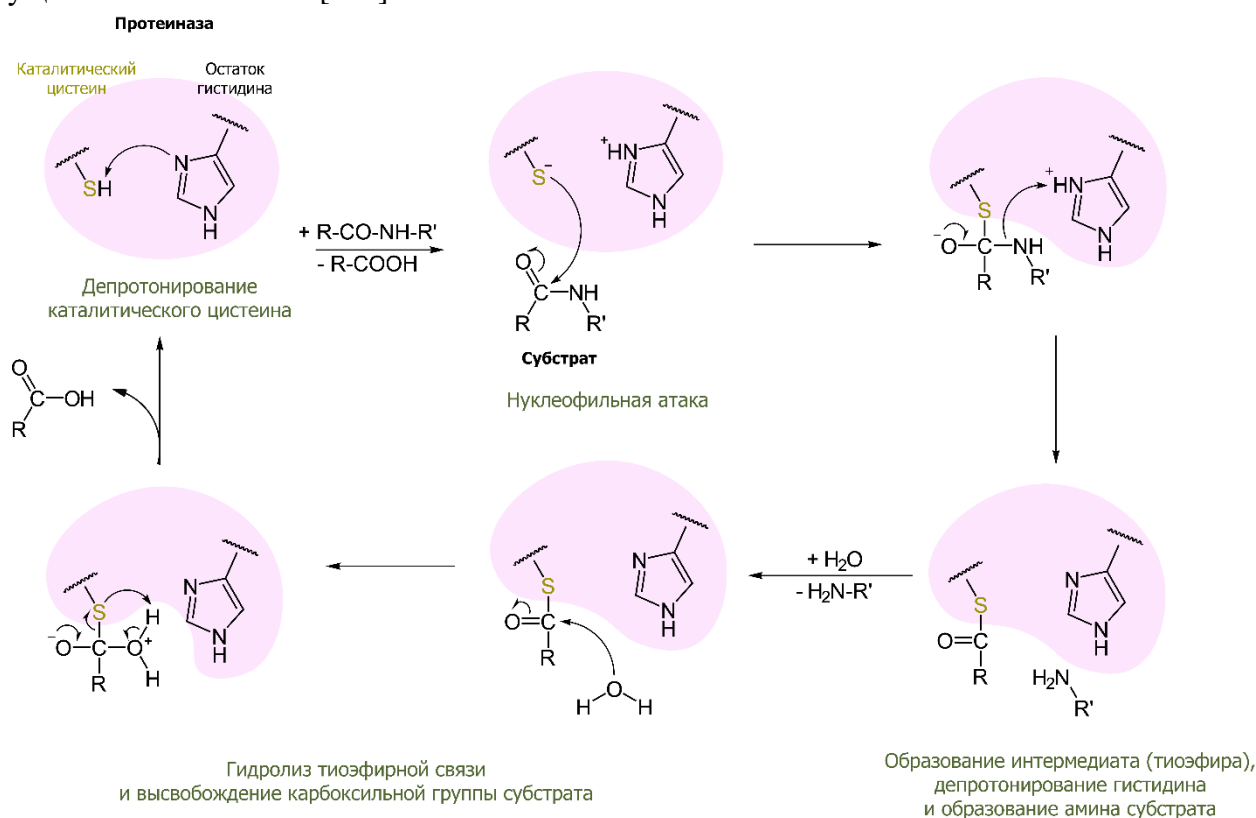


Рисунок 4. Механизм катализа расщепления пептидной связи субстрата цистеиновыми протеиназами. Каталитический остаток цистеина обозначен желтым. Протеиназа обозначена розовым овалом.

3. Специфичность ППЦП

Активность и специфичность С1А пептидаз растений *in vitro* достаточно подробно исследовались с помощью различных тестов с использованием белков, флуорогенных синтетических пептидных субстратов, а также пептидных ингибиторов. Кроме того, активно развиваются биоинформатические методы, позволяющие проводить моделирование молекулярных взаимодействий эндопептидаз с их субстратами. Из имеющейся на данный момент информации следует, что ППЦП растений обладают относительно низкой специфичностью. Тем не менее, на основании различных работ, посвященных исследованиям субстратной специфичности этих пептидаз, авторы приходят к выводу о том, что субстрат предпочтительно должен иметь в позиции P₂ гидрофобный, включая пролин, или ароматический аминокислотный остаток, а, в некоторых случаях, аминокислотный остаток аргинина [164,170–172]. Авторы ряда работ, посвященных определению пространственных структур ППЦП растений, также обращают внимание на определяющую роль лишь S₂ кармана в субстратной специфичности ферментов [173–175].

4. Синтез и активация протеиназ растений

Первым этапом участия протеиназ растений ЗКС является их активация, поскольку все известные связанные с ЗКС протеиназы как у животных, так и у растений синтезируются в виде неактивных зимогенов – препроферментов – и требуют отщепления ингибирующих доменов, которое называется процессинг. В результате процессинга протеиназа становится каталитически активной (в случаях, когда не связана с ингибитором). Большинство секретируемых зимогенов имеют сходные доменные структуры и содержат сигнальный пептид, N-концевые и/или С-концевые автоингибирующие продомены и каталитический домен (Рис.2). Гидролиз автоингибирующих доменов может происходить автокаталитически (самой протеиназой) или другими протеиназами в результате межмолекулярных взаимодействий, вызывающих конформационные изменения, которые необходимы для активности протеиназы.

4.1. Известные пути активации протеиназ растений

Широко известно, что ингибиторы необходимы для регуляции активности протеиназ у животных [176]. Это также справедливо и для растений. Например, во время эмбрионального развития *N. tabacum* механизм, запускающий ЗКС структуры, участвующей исключительно в позиционировании самого эмбриона внутри семени – суспензора, основан на антагонистическом действии двух белков, ингибитора протеиназы (цистатина NtCYS), и его

мишени (катепсин Н-подобной протеиназы NtCP14) [81]. Другим примером является протеиназа RD21, активность которой регулируется посредством необратимого ингибирования ингибитора AtSerp1 во время ЗКС [17]. Более того, недавно было показано, что существует перекрестная связь между путями необратимого ингибирования RD21 (посредством AtSerp1) и обратимого ингибирования, опосредованного WSCP, который в целом способствует регуляторной роли RD21 при врожденном иммунитете и развитии растений [150].

Ингибиторы и активаторы определенных протеиназ обычно располагаются в одних и тех же внутриклеточных компартментах [18], которые могут различаться по значениям pH среды. Это может существенно повлиять на статус активации протеиназы. Одним хорошим примером, иллюстрирующим этот пункт, являются катепсины человека, которые активируются в кислых средах с низким pH, в лизосоме. Интересно, что это подтверждается и растительными вакуолярными протеиназами, такими как протеиназа арабидопсиса RD21 [149] или ее гомолог из пшеницы – тритикаин- α [170]. С13 протеиназа легумаин, который демонстрирует pH-зависимую димеризацию и активацию, также является хорошим примером [177].

И наоборот, активность некоторых протеиназ с нейтральным pH оптимумом в значительной степени зависит от их кальций-связывающей способности. Например, как в случае мембрана-связанных протеиназ млекопитающих [178]. Это справедливо и для растительных протеиназ. Так, фитокалпаин DEK1 представляет собой кальций-зависимую мембрана-связанную протеиназу, активность которой значительно усиливается после связывания с кальцием [75], так же как и метакаспазы II типа [13], включая MCA2 из *A. thaliana* [105].

Помимо этого, активаторами каспазы-3 у животных являются АФК [179]. Аналогично, АФК способны активировать протеиназы и в растениях. Например, каспазо-подобные протеиназы (С1LP и С3LP) обладали повышенной активностью, обусловленной активными карбонильными соединениями, которые являются продуктами пути АФК и потому запускали ЗКС в *N. tabacum* [180]. Гибель клеток вакуоли также может регулироваться с помощью АФК, поскольку радикал кислорода непосредственно вызывает проницаемость мембраны вакуоли, высвобождение RD21 и его последующее связывание с AtSerp1 в клетках *A. thaliana*, приводящее к ЗКС [181].

Факторы, влияющие на активацию протеиназ растений и их сравнение с животными, суммированы на Рис.5, А.

5. Протеолитические каскады во время ЗКС

Как только протеиназа становится активной, она может изменять конформацию и взаимодействовать с другими протеиназами (Рис.5, Б). Как уже упоминалось ранее, основными исполнителями апоптоза у животных являются каспазы, которые действуют через протеолитические каскады. Каспазы могут управлять двухэтапной активацией ЗКС посредством набора инициаторных (каспазы-2, -8, -9, -10) и эффекторных (каспазы-3, -6, -7) каспаз [5]. Инициаторные каспазы вызывают активацию эффекторных каспаз, которые, в свою очередь, вносят разрывы в ряд других протеиназ или проапоптотических субстратов, приводящее к гибели клетки [20]. Апоптоз характеризуется YVADазной, DEVDазной, VEIDазной и другими активностями [182], которые соответствуют активностям каспаз-1, -3 и -6, соответственно.

Несмотря на то, что в растениях отсутствуют близкие гомологи каспаз, протеиназы, принадлежащие к тому же семейству цистеиновых пептидаз С14, в растениях присутствуют и называются метакаспазами. В то время как метакаспазы I типа (AtMC1, AtMC2) тесно связаны с аутолитическим типом ЗКС и иммунитетом растений [14], метакаспазы типа II из *Populus tremula x tremuloides* PttMC13 и PttMC14 способны расщеплять папаин-подобную цистеиновую протеиназу RD21 во время рЗКС ксилемных элементов [15].

Существует также много исследований, подтверждающих участие протеиназ, отличных от метакаспаз, в ЗКС растений, которые мы рассмотрели ранее в обзоре. Аналогично модели апоптоза животных была предложена модель инициатор-эффектор для метакаспаз [183]. Метакаспазы I типа подвергаются автокаталитической процессингу и могут активировать метакаспазы II типа. Из-за недостаточного количества данных все еще трудно приписать роль инициатора или эффектора для «не-метакаспазных» протеиназ, которые участвуют в ЗКС растений. Более того, существует мнение о том, что цистеиновые протеиназы могут не быть универсальными регуляторами ЗКС у растений, как у животных, и могут быть необязательными для ЗКС растений в принципе [184].

Недавно был рассмотрен вопрос о том, существуют ли протеолитические каскады в растениях, и было предложено конкретное требование для двух протеиназ для образования связи между ними, протеиназа-эффектор – протеиназа-субстрат [185]. Несмотря на то, что каспазы в растениях отсутствуют и каспазо-подобная не является единственной активностью,

характеризующей ЗКС растений, несомненно то, что она приводит к сходным апоптозу признакам, таким как сжатие цитоплазмы, конденсация хроматина и фрагментация ядра [33]. Основываясь на этих данных, вероятно, что вовлеченные в ЗКС растений протеолитические каскады существуют, несмотря на то, что их участники различаются по происхождению, но сходны по функциям.

6. *Исполнение сигнала, передаваемого протеиназами и приводящего к гибели клетки*

Растения и животные различаются по ряду причин, во-первых, из-за фотоавтотрофного типа роста растений, отсутствия подвижности и наличия полужесткой клеточной стенки. Независимая эволюция животных и растений привела к развитию аналогичных, но неконсервативных структур белков и сигнальных путей. Одним ярким примером являются Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) животных. В растениях эквивалентом TLR являются RLK [186]. Оба типа белков имеют С-концевой домен, состоящий из LRR повторов, а цитоплазматические домены, хоть и не являясь консервативными, способны выполнять аналогичные функции. Тем не менее, нижестоящие сигнальные пути очень консервативны среди эукариотических организмов, например, активация MAPK каскадов [187,188].

Апоптоз сам по себе очень консервативен у животных и грибов [5]. Расщепление субстрата протеиназами в определенном сайте может привести к двум последствиям: потере или появлению/смене функции этого белка-субстрата (Рис.5, В). Были проанализированы эффекты расщепления большого количества субстратов каспазами [189]. Было обнаружено, что большинство субстратов теряют свою функцию после расщепления, что приводит к остановке почти всех путей, необходимых для жизнедеятельности. Однако некоторые из субстратов становятся активными после гидролиза, такие как цитокины, протеинкиназы и регуляторные белки, необходимые для передачи клеточных сигналов.

Очень важно отметить, что анализ сайтов каспаз, их субстратов и соответствующих путей у мышей, *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*, которые разделены 600 миллионами лет эволюции, показал, что такие сайты сохраняются в течение относительно короткого эволюционного периода времени по сравнению с более консервативным уровнем сигнальных путей, которые сохраняются на более длительных временных промежутках [190]. Например, белок TSN, рассмотренный ранее, необходим для консервативных среди эукариот путей активации транскрипции, сплайсинга мРНК и сайленсинга РНК [186]. В ходе этих путей, TSN может расщепляться как каспазой-3 человека, так и метакаспазой mсII-Ра из ели обыкновенной [12]. Аналогично, поли (ADP-рибоза)полимераза (poly(ADP-ribose) polymerase,

PARP), которая участвует в другом консервативном пути – репарации ДНК – является субстратом каспаз человека и двух метакаспаз (MCA1 и MCA2) из гриба *Podospora anserine* [191]. В совокупности эти результаты в действительности подтверждают идею о том, что эукариоты имеют общие консервативные сигнальные пути, которые могут являться мишенями для протеиназ во время исполнения ЗКС, которые функционально сходны, но структурно уникальны (например, каспаза-3 и метакаспаза mсII-Ра, и др.).

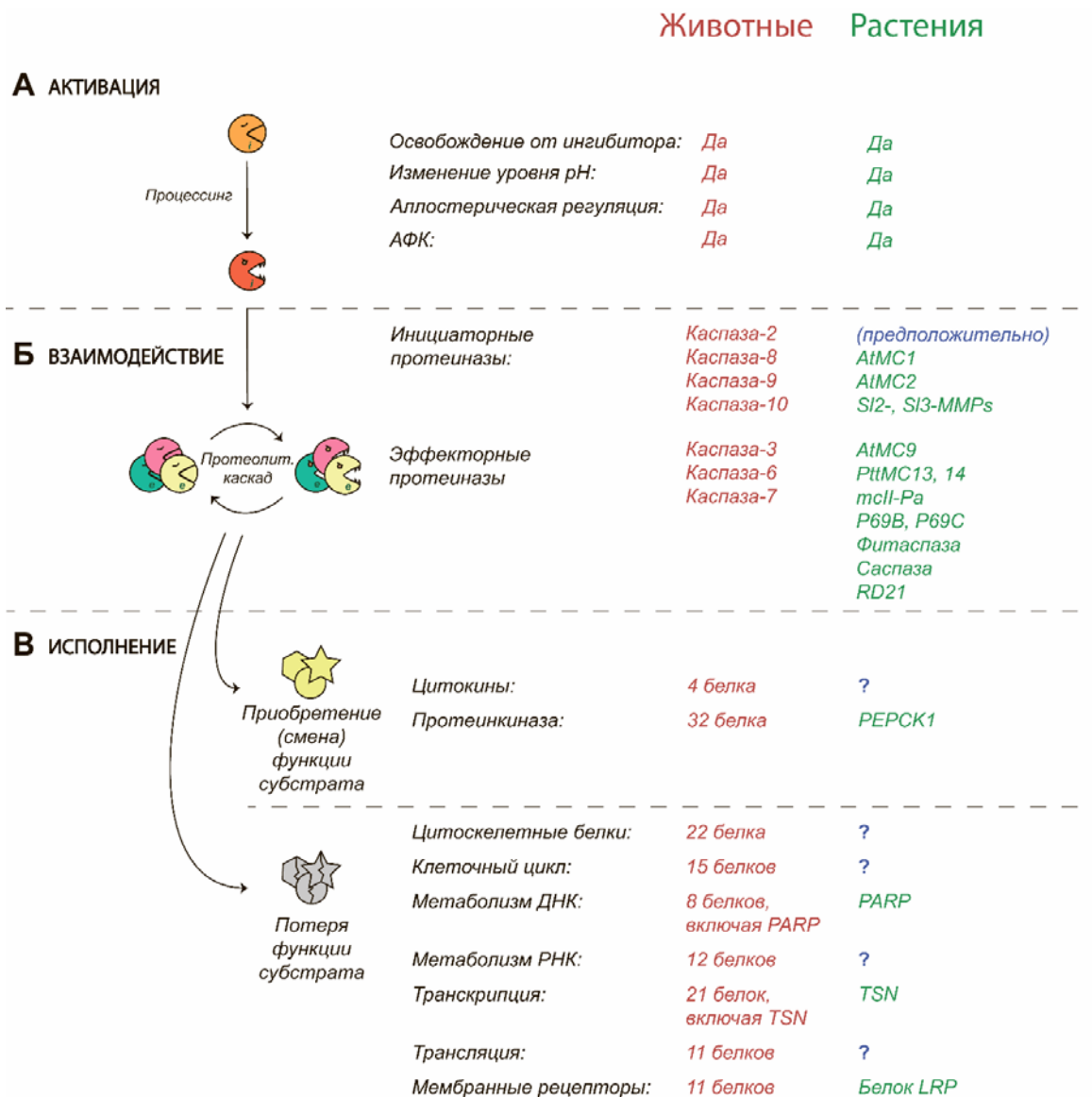


Рисунок 5. Схема участия протеиназ растений и животных в ЗКС и их сравнение. (А) Факторы, которые влияют на активацию протеиназ (инициация); (Б) взаимодействие протеиназ между собой после инициации (протеолитический каскад); (В) и влияние на передачу сигнала активированными протеиназами (исполнение). Группы каспазных субстратов были адаптированы из [189]. Названия протеиназ, пути, которые соответствуют животным, указаны красным, а растениям – зеленым.

Кроме того, еще одним отличным примером является мембранный белок-рецептор, который содержит лейцин-богатые повторы и может расщепляться протеиназой томата P69C [93]. Этот белок также можно внести в группу мембранных рецепторов, которые содержат

субстраты каспаз (Рис.5, В). Наконец, РЕРСК1 может быть расщеплена и активирована AtМС9 [103]. Другие примеры известных субстратов растительных протеиназ суммированы в [192].

7. Папаин-подобная цистеиновая протеиназа пшеницы – тритикаин-α

Тритикаин-α – это папаин-подобная цистеиновая протеиназа, которая впервые была обнаружена в прорастающих семенах пшеницы [193]. Ближайший гомолог тритикаина-α в *Arabidopsis* – RD21, который вместе со всеми его гомологами был выделен в одну из 9 подгрупп ППЦП в *A. thaliana* [164]. RD21 в свою очередь является близким гомологом катепсина L человека. Тритикаин-α имеет типичную для этой группы ППЦП структуру (Рис.6). Он содержит сигнальный пептид (предположительно направляющий протеиназу в вакуоль), N-концевой продомен, каталитический домен, и С-концевой гранулиновый домен. Гранулиновый домен является отличительной особенностью RD21- и ХВСП3-подобных протеиназ. Этот домен гомологичен гранулинам человека [194]. Однако роль гранулиновых доменов в составе протеиназ растений до сих пор не известна.

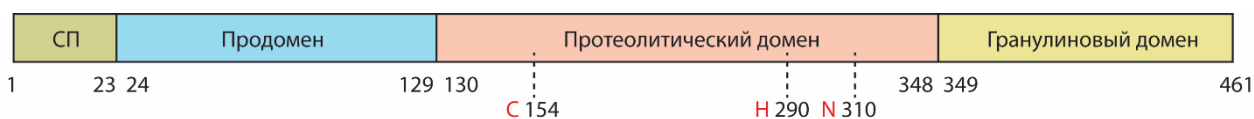


Рисунок 6. Схема структуры тритикаина-α. СП – сигнальный пептид; каталитические остатки обозначены красным.

Было показано, что максимальная экспрессия тритикаина-α наблюдалась на ранней стадии прорастания семени и спустя два дня после его набухания [193]. Экспрессия тритикаина-α подавлялась ингибитором синтеза гиббереллина – униконазолом. Тритикаин-α детектировали как в самом эмбрионе, так и в алеуроновом слое. Была предложена роль тритикаина-α и его гомологов в расщеплении запасных белков семени (глутена) во время прорастания.

В нашей лаборатории было показано, что тритикаин-α действительно способен расщеплять глютен [195]. Целиакия – это аутоиммунное заболевание, встречающееся у 1% популяции людей по всему миру и вызываемое недостаточным расщеплением глутена – совокупности запасных белков семени пшеницы, представленную глиадинами и глютеинами, – у генетически предрасположенных людей. Не полностью расщепленные пептиды богаты остатками глутамина, которые деамидируются до глутаминовой кислоты тканевой трансглутаминазой (tTG) или образуют кросс-сшивки с остатками лизина самой tTG. Деамидированные пептиды узнаются рецепторами на поверхности Т-клеток, причем у людей,

страдающих целиакией, эти рецепторы состоят преимущественно из субъединиц, кодируемых HLA-DQ2/8 аллелями [195]. Комплексы токсичных пептидов и tTG также активируют Т-клетки. Активированные Т-клетки и вызывают аутоиммунный ответ, воспаление и в конечном итоге приводят к хронической диарее, истощению, анемии, отставанию в развитии у детей, и т.д. Единственный эффективный способ лечения целиакии на данный момент – это пожизненное соблюдение безглютеновой диеты (БГД). Тритикаин- α эффективно расщепляет глютеносодержащие белки при физиологических условиях, рН 3.0-6.5 и температуре 37°C. К тому же, тритикаин- α способен гидролизовать токсические для людей, страдающих целиакией, глютеносодержащие пептиды. Это делает его потенциальным агентом энзиматической терапии целиакии. На данный момент, препарат, созданный на основе тритикаина- α , проходит клинические испытания.

Помимо этого, тритикаин- α обладает коллагеназной активностью: фермент расщепляет коллаген кожи быка при физиологических условиях, рН 3.6-4.6, 6.0-6.5 и температуре 37°C [170]. Это свойство делает тритикаин- α потенциальным агентом для лечения ран, обработки ожогов, шрамов и других коллаген-ассоциированных заболеваний.

Более того, в нашей лаборатории был разработан эффективный способ продукции рекомбинантного тритикаина- α в растворимой фракции в клетках *E.coli* [196]. Рекомбинантная версия содержит продомен, протеолитический домен и каталитически активна.

V. Применение протеиназ растений в биомедицине

Как было сказано выше, протеиназы выполняют множество физиологических функций и являются ключевыми фигурами практически во всех важных для жизнедеятельности организма растения процессах. И стоит отметить, что протеиназы растений, как и сами растения, обладают уникальными свойствами, не встречающихся у протеиназ других живых организмов. Интерес к растительным протеиназам основан на их широком диапазоне рабочих температур и уровней рН [197]. Растения могут быть источниками разнообразных протеиназ, обладающих различными активностями и пригодных для широкого использования в биотехнологии и биомедицине. В данной главе мы рассмотрим текущие достижения в области использования растительных протеиназ в биомедицине, суммированных на Рис.7.

1. Противоопухолевая активность растительных протеиназ

Растения являются естественным источником многих противоопухолевых агентов. В настоящее время 60% противоопухолевых препаратов получают из природных источников [198]. Экстракты разных растений часто проявляют противоопухолевую активность и широко

используются на практике в этномедицине. Однако знания конкретных компонентов для многих из них, а также о механизмах их действия, до сих пор отсутствуют. В некоторых случаях протеиназы, представленные в экстрактах растительных клеток, считаются основными компонентами, ответственными за противоопухолевую активность. Такая активность была показана для водного экстракта *C. papaya*, культивируемого в тропических зонах земного шара. Экстракты *C. papaya* значительно ингибируют рост линий опухолевых клеток, опосредуя Th1-зависимый иммунный ответ [199]. Экстракты также часто активируют иммуномодулирующие гены [199]. Показано, что гидрофильный экстракт, полученный из балтийских бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, содержит фармакологически активные вещества, эффективные против рака поджелудочной железы, который известен как агрессивный тип рака с низкой 5-летней выживаемостью [200]. Экстракты *F. vesiculosus* ингибируют клеточный цикл пролиферирующих клеточных линий поджелудочной железы, но не доброкачественных покоящихся Т-клеток и терминально дифференцированных клеток поджелудочной железы. Эффект усиливался в сочетании с ингибиторами аутофагии [200].

Выделенные белковые фракции разных растений используются даже чаще, чем сами экстракты. Например, смесь папаин-подобных цистеиновых протеиназ, известная как бромелаин, который получают из отходов ананаса *Ananas comosus*. Бромелаин представлен группой протеолитических ферментов, экспрессирующихся в разных частях ананаса: ананаин, комосаин – стеблевые протеиназы (ЕС 3.4.22.32), а бромелаин как таковой получают, в основном, из фруктового сока (ЕС 3.4.22.33). Другие компоненты бромелаина присутствуют в кожуре, ядре, кроне и листьях.

Было показано, что бромелаин обладает антиметастатическими свойствами и способен расщеплять рецепторы – поверхностные белки интегрин $\alpha3\beta1$ и рецептор гиалуроновой кислоты CD44, участвующие в инвазии клеток глиомы [201]. Противоопухолевый эффект наблюдался при холангиокарциноме: бромелаин ингибировал передачу сигналов NF κ B/АМРК, что приводило к уменьшению пролиферации, инвазии и миграции клеток карциномы [202]. Бромелаин также оказывает антипролиферативное и проапоптотическое действие на клетки колоректальной карциномы и химиопрофилактическое действие при канцерогенезе толстой кишки [203]. Однако точные механизмы действия бромелаина еще не до конца изучены.

C. papaya является источником латекса. Он содержит 15% сухого вещества, которое состоит в основном из цистеиновых протеиназ, таких как папаин, химопапаин, карикаин и глицил-эндопептидаза [204]. Протеиназа папаин среди других ферментов, таких как

коллагеназа, ДНКаза, гиалуронидаза, диспаза, используется для мягкой ферментативной диссоциации опухолей головного мозга человека [205]. Было показано, что папаин оказывает противоопухолевое действие, снижая скорость роста, метастазирование и инвазивность клеток легочной карциномы Льюиса и клеток меланомы В16 [206]. Было показано, что уменьшение роста и метастазирования клеток меланомы В16 коррелирует с уменьшением количества молекул CD44 и CD54 [207]. Наряду с ДНКазой I, направленной на разрушение циркулирующей бесклеточной ДНК, в качестве противоопухолевой композиции была предложена смесь протеиназ, включающая папаин, химотрипсин и трипсин [208].

Было показано, что фармацевтические препараты на основе смесей папаина и бромелаина эффективны против злокачественных форм опухолей [209]. Было выдвинуто предположение, что папаин и бромелаин действуют аналогичным образом. Опухолевая среда характеризуется «кислым» внеклеточным рН 6,5-6,9. Известно, что помимо расщепления поверхностных белков и молекул адгезии, эти протеолитические ферменты необратимо связываются с антипротеиназами, такими как α 2-макроглобулин или α 1-антитрипсин [210]. Снижение свободных антипротеиназ приводит к синтезу новых антипротеиназ макрофагами, которые инактивируют протеиназы, необходимые для развития опухолей и метастазирования, такие как катепсины [211]. TNF- β способствует иммуносупрессии хозяина и способствует гибели опухолевых клеток. Комплексы протеиназ-антипротеиназ связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-6, IFN- γ и TNF- β , и выводят их из опухоли, обеспечивая противоопухолевый эффект (Рис.7). Кроме того, опухоли блокируют факторы иммунной системы, которые позволяют опухолевым клеткам защищать себя от распознавания антителами и иммунными клетками. Блокирующие факторы представляют собой растворимые поверхностные антигены, связанные с антителами, ингибирующими макрофагов, моноцитов и естественных киллеров (НК-клеток). Экзогенные протеолитические ферменты, такие как папаин и бромелаин, уменьшают количество таких блокирующих факторов [43].

В настоящее время очевидно, что методы противоопухолевой энзиматической терапии, основанные на действии протеиназ растений, не могут заменить традиционные стратегии лечения рака, такие как хирургия, лучевая терапия, химиотерапия и гормональная терапия, даже несмотря на то, что традиционные стратегии имеют серьезные недостатки и побочные эффекты [210]. Тем не менее, это перспективная альтернатива, которую можно использовать вместе с традиционными методами лечения злокачественных опухолей, и которая имеет большой потенциал для дальнейшего улучшения.



Рисунок 7. Схематическое изображение противоопухолевого действия папаина и бромелаина. Ферменты действуют в трех направлениях: 1 – папаин и бромелаин расщепляют CD молекулы на поверхности клеток и блокирующие факторы, выделяемые опухолью, и освобождают моноциты, макрофаги и естественных киллеров (NK-клетки) от действия этих блокирующих факторов; 2 – экзогенные протеолитические ферменты связываются с антипротеиназами, усиливая их экспрессию в макрофагах и, таким образом, снижая необходимое для развития опухоли и метастазирования количество протеиназ (катепсинов); 3 – растительные протеиназы уменьшают количество провоспалительных цитокинов. Знак ножниц указывает на возможное участие протеолитической активности экзогенных пептидаз.

2. Свертывание крови

Коагуляция (или свертывание) крови – это процесс образования сгустка крови с помощью ряда ферментативных реакций, защищающих от неостанавливаемого кровотечения [212]. Фибринолиз – это процесс разложения фибрина на растворимые фрагменты, осуществляемого каскадом ферментативных реакций, приводящих к растворению сгустка или тромба – процесса, называемого тромболизисом [213]. В нормальных условиях коагуляция и фибринолиз сбалансированы, но при наличии патологической аномалии соотношение коагуляции и фибринолиза не сбалансировано, что приводит к неукротимому кровотечению или тромбоэмболическим нарушениям. Таким образом, фибрин является незаменимым белком обеих систем и присутствует в кровотоке в виде предшественника – фибриногена, необходимого для гемостаза, заживления ран, воспаления, ангиогенеза и других биологических функций [214]. Это растворимый белок, но его превращение в мономерный фибрин приводит к образованию нерастворимого фибринового сгустка. Расщепление

фибриногена может быть индуцировано плазмином или тромбином, циркулирующими в крови, что приводит к деградации фибриногена или к образованию фибринового сгустка, соответственно. Фибриновый сгусток, в свою очередь, может разлагаться плазмином.

2.1. Прокоагулянтные свойства

Хотя прокоагулянтные препараты на основе чистых растительных протеиназ еще не разработаны, многие растительные экстракты, содержащие протеиназы, широко используются в народной медицине для остановки кровотечений и заживления ран. Таким образом, в настоящее время прокоагулянтные свойства протеиназ являются предметом интереса. Существует несколько растительных протеиназ и белковых фракций, выделяемых из латекса, с прокоагулянтными свойствами, которые сокращают время свертывания крови [86]. В клинической практике наиболее частое использование активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени (ТВ) и протромбинового времени (ПТВ) для оценки свертывания крови. АЧТВ измеряет активность внутренней системы и общий путь коагуляционной системы, в то время как ПТВ оценивает функцию внешней системы и общий путь.

Pergularain e I из *Pergularia extensa* является единственной протеиназой с доказанным расщеплением похожих на фибринопептиды А и В фрагментов, которые обычно продуцируются в результате расщепления тромбина в плазме, что приводит к образованию сгустка в присутствии Ca^{2+} и трансклутаминазы (фактор XIII) [215,216]. Большинство растительных протеиназ также выявили фибринолитические свойства. Обнаружено, что пептидазы семейства *Asclepiadaceae* обладают как плазминовой, так и тромбино-подобной активностью [217,218]. Некоторые протеиназы (из *Calotropis procera*, *Cnidocolus urens*, *S. grantii*) демонстрировали снижение АЧТВ и неизменный ПТВ, что свидетельствует о возможной преимущественной активации факторов коагуляции внутреннего пути [218–220]. Кроме того, было обнаружено, что некоторые протеиназы участвуют не только в фибрино(гено)лизисе, но также в активации ферментов с предыдущих этапов каскада коагуляции. Фицин снижает как АЧТВ, так и ПТВ в нормальной плазме человека и плазме с дефицитом факторов коагуляции, но практически не снижает АЧТВ в плазме с дефицитом FX (фактора X) и ПТВ в плазме с дефицитом FX и FV (факторов X и V). В плазме с дефицитом протромбина, фицин не был вовлечен в снижение ПТВ, что предполагает исключение прямого расщепления фибриногена фицином. Фициновые протеиназы (23,2 кДа и 23,5 кДа) влияют на свертывание крови путем активации FX с идентичными схемами расщепления, в зависимости от присутствия Ca^{2+} и Mn^{2+} [221]. Папаин проявляет трансклутаминазо-подобную активность,

вызывая кросс-сшивки в очищенном препарате фибриногена. Папаин не способен процессировать протромбин в тромбин, поэтому он расщепляет фибриноген непосредственно тромбино-подобным образом, образуя мягкие сгустки [222].

2.2. Антикоагулянтные свойства

Экстракты и протеолитические фракции некоторых растений проявляют не только про-, но и антикоагулянтные свойства. Они способны расщеплять фибриноген с различной структурой и эффективностью: некоторые протеиназы были способны осуществлять полный гидролиз, а другие – только частичный гидролиз фибриногена. Большинство протеиназ обладают прямой фибринолитической активностью и способностью лизировать сгустки крови [86]. Несколько растительных протеиназ проявляют анти-агрегатную активность. Для некоторых протеиназ вызываемые ими пролонгированный АЧТВ и незначительно измененный ПТВ (например, протеиназы из *Costaria costata*, из экстракта семян *Artocarpus heterophyllus*) могут быть связаны с ингибированием внутреннего и/или общего пути коагуляции. Это говорит о том, что внешний путь не может быть полностью ими ингибирован.

Некоторые растительные протеиназы предотвращают или уменьшают АЧТВ на мышинной модели. Члены семейства *Asteraceae* показали фибринолитическую активность, сравнимую с активатором плазмينا урокиназного типа (u-Ра) [223,224]. Характер расщепления фибрина, сходный с u-Ра (как прямой, так и непрямой гидролиз – путем расщепления плазминогена в плазмин), приписывается бромелаину из *A. comosus* [225], кодиазе из *Codium fragile* [226], протеиназам CLP из *Codium latum* [227] и *C. costata* [228]. Эти особенности делают эти протеиназы потенциальными агентами для использования в качестве тромболитиков. Протеиназы из *Petasites japonicus* и кодиаза из *C. fragile*, которые защищают мышей с индуцированным каррагинаном тромбозом с большей эффективностью, чем u-РА, и не проявляют геморрагической активности, представляются особенно многообещающими. Также показано, что кодиаза проявляет антитромбоцитарную активность [226]. Бромелаин известен своей способностью активировать фактор XII и прекалликреин, а также гидролизовать холестерин [229].

Двойная (про- и антикоагулянтная) активность показана для богатых белком экстрактов из видов *Bromeliaceae*: *Pseudananas macrodentes* (Pm), *Bromelia balansae* (Bb) и *Bromelia hieronymi* (Bh), по сравнению с коммерческим стеблевым бромелаином. Все экстракты показывают одинаковую способность гидролизовать все субъединицы фибриногена. Прокоагулянтные свойства выявляются при низких концентрациях Pm, Bh и бромелаина при

помощи АЧТВ, а при снижении ПТВ при высоких концентрациях все экстракты протеиназ демонстрируют пролонгированные ПТВ и АЧТВ (антикоагулянтные свойства). Фибринолитическая активность Pm, Vb и Vh ниже, чем активность бромелаина в исследуемых концентрациях [230].

Интересно, что эти протеиназы из водорослей *Codium divaricatum* содержат как фибрино(гено)литический фермент (CDP или FII), так и фермент свертывания фибриногена (FI) [231]. Интересно отметить, что на каскад коагуляции может влиять не только протеолитическое действие растительных белков. Несмотря на то, что он не обладает протеолитической активностью, гетеромультимерный гликопротеин HSGPL1 из *A. heterophyllus* воздействует на внутренний путь коагуляции в качестве ингибитора сериновых протеиназ и, как было показано, снижает активность факторов свертывания крови XIa и α -XIIa человека [232].

3. Заживление ран

Рана – это травма, при которой произошло нарушение целостности эпителия. В классической модели заживления ран имеется четыре последовательных, но перекрывающихся этапа: гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование. Эти фазы включают в себя образование фибринового сгустка, установление иммунного барьера, растворение фибринового сгустка, удаление мертвых тканей, ангиогенез, синтез внеклеточного матрикса и развитие нового эпителия [233]. Использование латекса для заживления ран было популярно с древних времен. Эффективность использования латекса связана с большим количеством протеиназ со специфической активностью, учитывая, что значения рН в области ран варьируются от 5 и ниже (поверхностные) до 8,0 (глубокие). Гемостатический эффект протеиназ основан на активации зимогена FX посредством протеолиза, который приводит к его активированной форме FXa (сериновая протеиназа), которая, в свою очередь, обеспечивает превращение протромбина в тромбин. Было показано, что способность расщеплять FX характерна для папаина и фицина [212], однако Ca^{2+} и Mn^{2+} необходимы для стабилизации FXa: их отсутствие приводит к дальнейшему расщеплению FXa фицином.

Протеиназы из латекса *C. gigantea* способны расщеплять фибриноген с образованием волокон фибрина, которые являются основой сгустков крови. Тем не менее, он вызывает кровотечение в высоких концентрациях, так как он также обладает фибринолитической активностью [234]. Такая тромбино-подобная активность характерна и для латексных

протеиназ из *S. grantii* и *W. tinctoria*, которые были выделены и охарактеризованы как сериновые, и цистеиновой протеазы *pergularain* e I из латекса *P. extensa* [235,236]. Более того, исследования *in vitro* на модифицированной смешанной культуре лимфоцитов показали, что бромелаин и папаин способствуют увеличению продукции IL-6, который является важным участником иммунного ответа на повреждение [237]. Однако эти результаты не согласуются с исследованиями активности бромелаина после перорального приема [238].

4. Обработка ожогов

Присутствие мертвой ткани является одним из наиболее важных факторов инфекции при ожогах, и особенно при ожогах третьей степени, поскольку является источником интоксикации, создавая благоприятные условия для роста многих патогенных бактерий. Поэтому важной задачей является раннее удаление мертвых тканей без ущерба для здоровой кожи. В настоящее время ожоги обычно лечат комбинацией хирургического и химического лечения. Обработка раны лекарственными веществами, которая позволяет избежать хирургических недостатков (таких как боль и потеря крови), требует больше времени и повторных воздействий для удаления некротической ткани. С середины прошлого века ученые изучали ферменты из разных источников, которые могли бы применяться для ферментативного лечения ожогов [239]. В частности, было проведено много исследований, объясняющих использование протеиназ бактериального происхождения, в основном из *Clostridium histolyticum* и *Bacillus subtilis* [240] и растительных протеиназ; в основном это папаин и бромелаин.

Растительные протеиназы, используемые для лечения ожогов, гидролизуют белки кожи, такие как коллаген I типа (цепь A для папаина), а также омертвевшие и некротические ткани. pH области ожога варьируется от 7,9 до 8,5 [241]. Смесь ферментов папаина активна в широком диапазоне pH от 3,0 до 12,0 и проявляет максимальную активность при pH 4,0-7,0 и температуре 37 °C, тогда как смесь бромелаинов расщепляет субстраты в диапазоне pH от 5,5 до 8,5 [242]. Папаин стал одним из первых ферментов, которые были исследованы на предмет использования при лечении ожогов. Смесь папаина, мочевины и хлорофиллина продают как препарат Panafil, который уже поступил в продажу [243]. Однако использование альтернативного лекарственного средства на основе мочевины и папаина под названием Debridase может привести к таким неблагоприятным эффектам, как высокая температура и боль [244]. Debricin на основе фицина эффективно разрушает мертвые ткани ожоговых зон [245].

Смесь бромелаинов является одним из наиболее эффективных энзиматических средств лечения ожогов. Клейн изучал применение бромелаина в лечении ожогов, начатом в 1960 г. Согласно его исследованиям *in vitro*, бромелаин был наиболее эффективным из изученных в то время ферментов [246]. Бромелаин быстро и эффективно разлагал ожоговые фрагменты третьей степени при температуре от 37 до 38 °С. Дальнейшие исследования привели к разработке метода выделения бромелаина, который впоследствии стал использоваться в эффективной смеси, запатентованной под названием Debridase [247]. Эффективное удаление некротической ткани в течение 4 часов с помощью Debridase также способствовало более быстрой реэпителизации поврежденной кожи и уменьшению площади раны, требующей трансплантации [248]. Кроме того, было показано, что была повышена эффективность очистки от струпа с комбинацией Debridase с ультразвуком [249]. Недавно был разработан новый препарат для лечения ожогов на основе бромелаина под названием NexoBrid, который также обладает высокой эффективностью в удалении ожогового струпа [250]. Исследования, сравнивающие эффективность и безопасность Debridase и NexoBrid, еще не проводились.

Было показано, что две другие цистеиновые протеиназы, ананаин и комозаин, также присутствующие в соке стеблей ананаса, но в небольших количествах, успешно разлагают некротическую ткань [251]. Однако, вероятно, из-за низкого выхода фермента при очистке, было гораздо меньше испытаний на применение этих ферментов, чем Debridase.

Недавно, актинидин, протеиназа из плодов киви, который ранее использовался в качестве размягчителя мяса, был впервые исследован в отношении лечения ожогов. Было выявлено, что актинидин проявляет бактерицидные свойства и уменьшает раны после санации при лечении ожогов [252].

Как было сказано ранее, цистеиновая протеиназа из пшеницы *T. aestivum*, тритикаин- α , также обладает коллагенолитической активностью, эффективно гидролизует бычий коллаген кожи при 37 °С и диапазоне pH 3,5-6,5 [170].

5. Уход за ротовой полостью

Кариес является одним из наиболее распространенных заболеваний полости рта и характеризуется pH, меньшим или равным 5,5. Химико-механическое удаление кариеса основано на предварительном размягчении пораженного дентина с последующим выскабливанием. Соскоб не только удаляет верхний слой, но и деминерализует верхние несколько микрометров, обнажая волокна коллагена, под которыми находится дентин. Существует три типа коллагеновых волокон: коллагеновые типы I, III и V. Коллагеновые

белки образуют сети, которые необходимо гидролизовать при удалении кариеса [253]. Первые препараты для хемомеханического удаления кариеса зубов были основаны на гипохлорите натрия (NaOCl), гидроксиде натрия (NaOH) и хлориде натрия (NaCl) [254]. Позднее в Бразилии был разработан препарат под названием Paracarie, в основе которого лежали папаин, хлорамин и толуидиновый синий [255]. Папаин гидролизует частично разрушенные молекулы коллагена в поврежденной ткани, так как не обладает антипротеиназной активностью и, таким образом, сохраняет деминерализованный дентин. Кроме того, папаин сокращает время восстановления тканей. Paracarie характеризуется антибиотической активностью, в основном в отношении *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus*, а также противовоспалительными свойствами. Гель Paracarie – это менее инвазивный метод лечения кариеса, и, поскольку он уменьшает потребность в анестезии, используется для детей. В 2013 году индийские ученые предложили новый, более дешевый препарат для хемомеханического удаления кариеса, названный Carie Care. Carie Care похожа на композицию Paracarie, но отличается благодаря добавлению эфирных масел из растений [256]. При сравнении этих продуктов было показано, что Paracarie быстрее удаляет кариес и обладает более сильным антибактериальным действием. Точно так же бромелаин широко используется в стоматологии из-за его коллагенолитической активности. Он был исследован на депротеинизирующее дентин свойства и привел к удалению коллагеновой сети [253].

Отбеливание зубов является еще одним применением растительных протеиназ. Было показано, что папаин и бромелаин обладают отбеливающими свойствами, так как удаляют белковые части зубного налета [257]. Однако, поскольку папаин и бромелаин являются ферментами, срок годности пасты ограничен.

6. Антимикробные свойства

6.1. Антибактериальные свойства

Некоторые растительные протеиназы обладают антибактериальной активностью. Папаин и бромелаин показали бактерицидную активность в отношении грамположительных бактерий *Alicyclobacillus sp.* Папаин также известен своей антибактериальной активностью в отношении нескольких штаммов *B. subtilis*, энтеропатогенов *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumonia* [258].

Вероятно, что ингибирующая активность папаина и бромелаина в отношении бактерий связана с их трехмерной структурой и амидазной и эстеразной, но не протеолитической

активностью [259]. Связанные с леупептином, эти протеиназы демонстрировали одинаковый уровень антибактериальной активности, что подразумевает то, что отсутствие протеолитической активности не влияет на антибактериальные свойства ферментов. Было показано, что папаин и бромелаин синергически взаимодействуют друг с другом и с низином – полициклическим антибактериальным пептидом. Однако точный механизм антибактериального действия папаина и бромелаина до сих пор неясен. Кроме того, было продемонстрировано, что папаин поглощает 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилгидроксильные и супероксидные радикалы и снижает вызванный H_2O_2 окислительный стресс у штаммов *E. coli* [260]. Антимикробная активность против *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 была продемонстрирована для AMP48 из латекса *A. heterophyllus*, но точный механизм еще не исследован.

6.2. Противогрибковые свойства

Сообщается о противогрибковых свойствах двух аспарагиновых протеаз *S. tuberosum* (StAP1 и StAP3) против спор *Fusarium solani* и кист *P. infestans* [261]. В соответствии с этими проблемами StAP1 снижал жизнеспособность спор *F. solani* дозо-зависимым образом и был примерно в два раза более эффективным, чем StAP3. Кроме того, для ингибирования прорастания *P. infestans* на 50% требуется приблизительно в 70 раз меньшая концентрация StAP1, чем StAP3.

Описаны антипролиферативные свойства зингипаина, цистеиновой протеиназы из корневищ *Zingiber officinale*, против грибковых, бактериальных и злокачественных клеточных линий человека [262]. AMP48 также продемонстрировала сильную противогрибковую активность в отношении *Candida albicans*, который является одним из наиболее распространенных патогенов человека, и никакой активности в отношении менее патогенного *Candida tropicalis* [263].

7. *Расстройства пищеварения*

7.1. Желудочно-кишечные инфекции и язвы

Растительные протеиназы используются при лечении желудочно-кишечных инфекций, вызванных нематодами. Как животные, так и люди, имеющие отношение к сельскому хозяйству, страдают от таких инфекций во всем мире. Некоторые цистеиновые протеиназы из растений обладают антигельминтной активностью [264]: они способны разлагать кутикулу нематод при pH 7,4. Было показано, что очищенный фицин, папаин, химопапаин, экстракты египетского латекса молочая и экстракты, содержащие бромелаин, эффективны против

нематод *Heligmosomoides polygyrus* по сравнению с контрольным пирантел тартратом с доказанной антигельминтной активностью [265]. Натуральные антигельминтные препараты являются хорошей альтернативой синтетическим лекарствам, к которым нематоды уже приобрели устойчивость.

Папаин и цистеиновые протеиназы из *Carica candamarcensis* оказывают защитное действие на модели язвенной болезни желудка крысы: он восстанавливает равновесие таких соединений, как HCl, этанол, пепсиноген и защитных агентов, таких как бикарбонат, простагландины и т.д. [266] Бромелаин также показал быстрое улучшение симптомов при лечении язвенного колита [267].

7.2. Целиакия

Потенциальное энзиматическое лечение целиакии включает использование цистеиновой протеиназы тритикаина- α из *T. aestivum* [170]. Целиакия представляет собой аутоиммунное заболевание, встречающееся у генетически предрасположенных людей, имеющих HLA-DQ2/DQ8 аллели, и связанное с неполной экзогенной деградацией глютена – совокупности запасных белков зерновых растений, таких как пшеница, ячмень, рожь и овес [268].

Гистопатологические симптомы целиакии включают нарушение всасывания питательных веществ в тонком кишечнике, атрофию ворсинок, гиперплазию крипты, усиление инфильтрации интраэпителиальными лимфоцитами. В настоящее время только один подход к лечению целиакии доказал свою эффективность – БГД, подразумевающая исключение из питания глютен-содержащей пищи. Однако, несмотря на свою эффективность, БГД имеет свои недостатки [269]. В связи с этим, многообещающим подходом к лечению целиакии является энзиматическая терапия, направленная на восполнение недостаточной протеолитической активности или замену дефектного фермента [270]. Было показано, что тритикаин- α эффективно расщепляет основные токсичные пептиды, полученные из глютена. Этот фермент активен в диапазоне pH от 3,4 до 6,5 и устойчив к протеолизу, осуществляемому пепсином, что делает возможным пероральное введение этого фермента в ходе лечения целиакии.

Другой протеиназной композицией, используемой в лечении целиакии, является ALV003 на основе смеси глютеназы EP-B2, полученной из ячменя, и пролилэндопептидазы из *Sphingomonas capsulata* [271]. Было показано, что эта глютенная смесь успешно ослабляет вызванное глютеном повреждение слизистой оболочки у пациентов с целиакией. В настоящее время ALV003 проходит клинические испытания.

7.3. Другие желудочно-кишечные заболевания

Растительные экстракты часто используются для лечения желудочно-кишечных заболеваний. Например, солон (экстракт *Sophoradin*), экстракт семян амаранта, экстракт семян грейпфрута и капсаицин (экстракт перца чили) были исследованы на гастропротекторное воздействие на острые поражения желудка, вызванные агрессивной концентрацией этанола [272]. Бромелаин благодаря широкому диапазону оптимальных значений pH может использоваться как в желудке, так и в тонком кишечнике. Бромелаин использовался в качестве пищеварительного препарата в случаях экзокринной недостаточности поджелудочной железы [273] и мог заменить пепсин и трипсин. Бромелаин в сочетании с желчью вола и панкреатином очень эффективен для снижения экскреции жирового стула у пациентов со стеатореей поджелудочной железы. Он также увеличивает поглощение радиоактивной серы на 50% и глюкозамина на 30-90%, улучшая заживление слизистой желудка [274]. Бромелаин ингибирует прикрепление энтеротоксина к толстому кишечнику, тем самым предотвращая вызванную энтеротоксином диарею [275]. Он также проявляет противовоспалительные свойства при воспалительных заболеваниях кишечника, снижая клиническую и гистологическую тяжесть заболевания у мышей [276].

Кроме того, цистеиновые протеиназы и целлюлазы используются для лечения фибробезоаров, возникающих в системе пищеварения сельскохозяйственных животных [277].

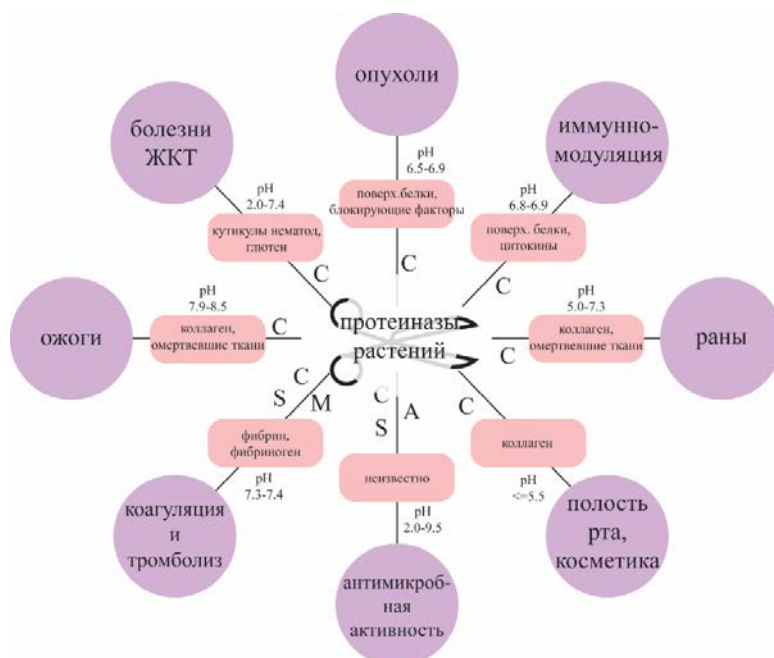


Рисунок 8. Различные применения растительных протеиназ в биомедицине. Прямоугольники содержат субстраты, расщепляемые растительными протеиназами для каждого биомедицинского применения и значения pH на пораженном участке. С – цистеиновые протеиназы; S – сериновые протеиназы, А – аспаратные протеиназы, М – металлопротеиназы.

Материалы и методы

1. Филогенетический анализ семейств протеиназ пшеницы

Полный набор белковых последовательностей для *T. aestivum* (n = 154 140) был получен из базы данных генома Ensembl (<ftp://ftp.ensemblgenomes.org/>) [278]. Для работы использовали самый свежий релиз генома пшеницы (релиз 39). Белковые последовательности, короче 200 аминокислотных остатков, были опущены. Были исключены белки, которые содержали более четырех неопределенных аминокислотных остатков (то есть XXXX, где X – неопределенный аминокислотный остаток). Также были опущены любые последовательности в наборе данных, отличающиеся менее чем на 5% нуклеотидной последовательности. Набор отобранных последовательностей (n = 66615) был проанализирован с использованием пакета HMMER 3.1b2 (<http://eddylab.org/software/hmmer/hmmer-3.1b2.tar.gz>) [279] для того, чтобы определить домены из базы данных Pfam в белках протеома пшеницы.

Последовательности белков были разделены на семейства протеиназ в соответствии с их аннотациями к доменам базы данных Pfam: идентификатор «Peptidase_C» определял белок как цистеиновую протеиназу; «Peptidase_M» – как металлопротеиназу; «Peptidase_S» – как сериновую пептидазу; «Peptidase_A» и «TAXi_» – как аспартатные пептидазы; и «Proteasome» – как треониновую пептидазу. Последовательности, содержащие эти домены, анализировали с помощью пакета HMMER 3.1b2 с использованием порогового значения E-value, равного 10^{-4} . Соответствующие домены являлись фрагментами полных белковых последовательностей. Были применены различные пороговые длины для разных семейств протеиназ: 200 аминокислотных остатков для семейств цистеиновых и сериновых протеиназ; 150 аминокислотных остатков для семейств металлопротеиназ и аспартатных протеиназ; и 100 аминокислотных остатков для семейств треониновых протеиназ. Использовали сервер MAFFT для выравнивания соответствующих доменных последовательностей (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) [280]. Эволюционные расстояния были посчитаны с использованием метода Neighbor-Joining, реализованного в MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) [281]. Достоверность деревьев оценивалось по 100 повторностям бутстрэпа. Были использованы бутстрэп значения, превышающие 70. Филогенетические деревья были визуализированы с помощью FigTree (v. 1.4.2) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2. Используемые в работе материалы

2.1. Соли и реактивы

Трис, глицин, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (ДСН), бромфеноловый синий, глицерин, акриламид, персульфат натрия, ТЕМЕД, борная кислота, дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), MES, MgCl₂, PIPES, HEPES, KOH, CaCl₂, KCl, MnCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, диметилсульфоксид (ДМСО), KMnO₄, Tween-40, Tween-20, Silwet-77, рифампицин, стрептомицин, спектиномицин, ацетисирингон, ацетат натрия, дитиотриэтол (ДТТ), этидий бромид, обезвоженное молоко, таблетки фосфатного буфера (PBS), метанол, хлороформ, мочеви́на, уксусная кислота, муравьиная кислота, салициловая кислота, ацетонитрил, агар, агароза, дрожжевой экстракт, триптон были куплены у производителей Sigma Aldrich, Thermo Scientific, Merck, Difco, Helicon, ДиаМ, Amresco, GE Healthcare, Fluka, Qiagen, МР.

2.2. Линии растений

Сорта Хакасская и Дарья пшеницы *T. aestivum*, любезно предоставленные В.Г. Джавахией.

N. benthamiana L, любезно предоставленные А.Г. Соловьевым.

2.3. Штаммы прокариот и патогенов пшеницы

Штамм *E. coli* XL1-Blue, Invitrogen

Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 и GV3101, любезно предоставленные А.Г. Соловьевым.

S. nodorum (Verk) (штамм В-24/МС2 из Государственной Коллекции Фитопатогенных Микроорганизмов ВНИИФ).

P. recondita Rob. ex Desm f. sp. *tritici* (Нижневолжская популяция 757 из ГКФМ ВНИИФ).

2.4. Векторы и плазмиды

1. pLH7000delta(+), Invitrogen
2. pLH7000delta(+)-p19
3. pLH7000delta(+)-Triticain(wt)
4. pLH7000delta(+)-Triticain(C154A)
5. pLH7000delta(+)-SiCys8, любезно предоставленная Dr. Philippe Varennes-Jutras.

Синтез олигонуклеотидов и секвенирование осуществляли в компании Евроген.

2.5. Антитела

1. Поликлональные антитела к тритикаину- α из кролика, любезно предоставленные Н.К. Тихомировой;
2. Поликлональные антитела из козы к кроличьим белкам, конъюгированные с пероксидазой хрена, ab6721, Abscam, USA.

3. Составы буферов и сред

3.1. Буферы, необходимые для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

1. Трис-глициновый буфер: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 50 мМ глицин;
2. 2xSB: 62 мМ Трис-НСl, рН 6.8; 5% β -меркаптоэтанол; 2% ДСН; 0.01% бромфеноловый синий; 20% глицерин.
3. Разделяющий гель: 0,375 М Трис-НСl рН8.8, 12% акриламид, 0,1% ДСН, 0,06% персульфат натрия, ТЕМЕД 1 мкл/мл;
4. Концентрирующий гель: 0,125 М Трис-НСl рН 6.8, 4,5% акриламид, 0.1% ДСН, 0.06% персульфат натрия, ТЕМЕД 1 мкл/мл;

3.2. Буферы, необходимые для электрофореза в агарозном геле

5. Трис-боратный буфер (1xTBE): 0.05 М Трис-борат, рН 8.3; 1 мМ ЭДТА, 0.5 мг/мл этидий бромид.

3.3. Среды

6. LB: пептон 10 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; NaCl 10 г/л, доведение рН до 7.5 10 мМ NaCl;
7. YEB: пептон 5 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; сахароза 5 г/л;
8. SOB: пептон 20 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, доведение рН до 6.8-7.0 10 мМ NaCl; после автоклавирования добавляли до 10 мМ MgCl₂;

3.4. Буфер для агроинfiltrации

9. MMA: 10 мМ MES рН 5.5; 10 мМ MgCl₂; 150 мкМ ацетосирингон

3.5. Другие буферы, использованные в работе

10. TB: 10 мМ PIPES, рН 6.7 (KOH); 15 мМ CaCl₂; 250 мМ KCl; 55 мМ MnCl₂;
11. PBS: 10 мМ Na₂HPO₄; 1.8 мМ KH₂PO₄, рН 7.3; 0.14 М NaCl; 2.7 мМ KCl;

4. Работа с клетками *E. coli*

4.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Клетки штамма XL1-Blue с чашки (2% агара, LB) засевали 250 мл среды SOB, растили до A₆₀₀=0.6. Далее инкубировали 10 минут на льду, центрифугировали в течение 10 минут при 4°C 2500 rpm и ресуспендировали в 80 мл холодного буфера TB. Центрифугировали еще раз с последующим ресуспендированием в 20 мл TB. После этого добавляли ДМСО до 7% и

инкубировали при 0°C 10 минут. Аликвотировали полученные суспензии (100 и 200 мкл). Замораживали в жидком азоте и хранили при -80.

4.2. Трансформация клеток E.coli

К 100 мкл компетентных клеток XL1-Blue добавляли лигазную смесь (~100 нг) или плазмиду (~10 нг). Инкубировали при 0°C 25-30 минут. Затем проводили тепловой шок путем нагревания в течение 30 сек при 42°C. После этого переносили в лёд на 2 мин и добавляли 0.4 мл среды LB. Далее проводили фенотипическую экспрессию путем инкубации в течение 1 часа при 37°C на орбитальном шейкере при 250 rpm. Селекцию трансформантов проводили на чашках Петри (2% агара, LB), содержащих соответствующий антибиотик (стрептомицин, спектиномицин).

5. Работа с нуклеиновыми кислотами

5.1. Выделение суммарной РНК из листьев пшеницы

Выделение суммарной РНК для последующего синтеза кДНК из 1 г листьев 7-дневных ростков пшеницы проводили при помощи реагента ExtractRNA от Евроген (BC032) согласно инструкциям производителя.

5.2. Синтез кДНК и амплификация гена интереса

Синтез первичной цепи кДНК проводили при помощи набора реагентов MMLV RT от Евроген (SK022S) согласно рекомендациям производителя, с использованием праймера Oligo(dT) или специфического обратного праймера. Амплификацию интересующего гена проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров и Phusion ДНК полимеразы (F530S, ThermoFisher Scientific). Протокол для амплификации и состав реакции соответствовали рекомендациям к Phusion ДНК полимеразе.

5.3. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмид осуществляли при помощи наборов реагентов Евроген Plasmid Miniprep и QIAGEN Plasmid Mini Kit согласно рекомендациям производителя.

5.4. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции. Лигирование.

Рестрикцию фрагментов ДНК и необходимых плазмид проводили при помощи эндонуклеаз рестрикции от Fermentas (ThermoFisher Scientific), согласно инструкции производителя. Лигирование проводили в смеси, содержащей линейризованную плазмиду (50-

100 нг) и встраиваемый фрагмент(ы) ДНК (100 нг), добавляли 10-кратный лигазный буфер и 1 мкл 5U/мкл Т4 ДНК-лигазы (ThermoFisher Scientific, EL0011). Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

5.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Анализ фрагментов ДНК проводили в агарозном геле. Гели и электродный буфер (1×TBE) содержали 1 мкг/мл бромистого этидия. Образцы наносили на гель в растворе, содержащем 0,001% бромфенолового синего и 5% глицерина.

5.6. Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля

Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля проводили при помощи QIAquick Gel Extraction Kit (28704, QIAGEN), согласно инструкции производителя.

5.7. Используемые в работе олигонуклеотиды

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды (Табл.3).

Таблица 3. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

pLH-Left-60	5'-TCATTTTCATTTGGAGAGGAC
pLH-Right-60	5'-CCTTATCTGGGAACACTCACACATT
Tritα-P	5'- ATCTCGAGATGAGGAGCTCCATGGCCC
Alpha-M	5'-GGGGGATCCTTACGCGCTACTTTTCTTGCC
Trit-C154A-dir	5'-GCGGGAGCTGCTGGGCTTTCTCAGC
Trit-C1545A-rev	5'-GCTGAGAAAGCCCAGCAGCTCCCGC

5.8. Клонирование полноразмерного гена тритикаина-α в pLH7000delta(+)

Ген тритикаина-α был получен при помощи ПЦР, для которой использовалась в качестве матрицы кДНК, синтезированная с суммарной РНК, выделенной из листьев пшеницы *T. aestivum*. Для амплификации гена были использованы праймеры Tritα-P и Alpha-M (Табл.3). Ген был клонирован в бинарный вектор pH7000delta(+) по сайтам рестриктаз BspHI – BamHI. Клетки штамма XL1-Blue были трансформированы полученной лигазной смесью. Селекцию клонов проводили по устойчивости клонов к смеси стрептомицина (20 мг/мл) и спектиномицина (50 мг/мл) и при помощи ПЦР с праймерами на вставку и вектор (pLH-Left-60

и pLH-Right-60, Табл.3). Отсутствие мутаций в гене тритикаина- α было подтверждено секвенированием.

Для получения мутанта по каталитическому цистеину C154, была внесена мутация путем замены Cys154 на Ala путем сайт-направленного мутагенеза при помощи ПЦР и праймеров Trit-C154A-dir и Trit-C1545A-rev (Табл.3). Наличие мутации было подтверждено секвенированием.

5.9. pLH7000delta(+)-SlCys8

Конструкция pLH7000delta(+)-SlCys8, содержащая ген цистатина Cys8 из томата, была любезно предоставлена Philippe Varennes-Jutras из лаборатории Кеметики Растений, Оксфордский Университет, Оксфорд, Великобритания.

6. Рост растений и заражение патогенами

Семена пшеницы универсально восприимчивой линии Дарья промывали водой и выдерживали 15 мин в 5%-ном растворе KMnO_4 , после чего помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри и инкубировали 2 суток в термостате при температуре 22°C. Проросшие семена высаживали в вегетационные сосуды с землёй. Растения выращивали в климатической камере в течение 8-10 суток при 16-часовой длине светового дня и температуре 20-22°C. Для экспериментов использовали растения с полностью развернувшимся первым настоящим листом.

Культуру гриба *S. nodorum* (Verk) (штамм В-24/МС2 из Государственной Коллекции Фитопатогенных Микроорганизмов ВНИИФ) выращивали на стерильном пшеничном зерне. Качалочную колбу засыпали до двух третей объема зерном и добавляли воду до половины веса зерна. Колбу автоклавировали в течение 1 часа (0.5 атм, 114°C). Полученную массу зерна охлаждали и заражали кусочками мицелия, собранного с поверхности, покрытой мицелием гриба агаризованной среды в чашках Петри. Колбы с зерном инкубировали в термостате при 26°C в течение 7 суток. Споры смывали с поверхности зерна дистиллированной водой. В экспериментах использовали споровую суспензию в концентрации 1×10^6 спор/мл.

Для заражения растений пшеницы (сорт Дарья) использовали споровую суспензию гриба *S. nodorum*. Суспензию наносили с помощью пульверизатора; расход – 10 мл на 10 растений. В суспензию добавляли Tween-40 по капле на 100 мл суспензии. Инокулированные растения на 2 суток помещали во влажную камеру при температуре 20-22°C, а затем возвращали в климатическую камеру с первоначальным режимом [282].

Споры бурой ржавчины *P. recondita* Rob. ex Desm f. sp. tritici (Нижеволжская популяция 757 из ГКФМ ВНИИФ) суспендировали в воде до концентрации 1×10^6 спор/мл, добавляли Tween-40 (1 каплю на 100 мл). Растения пшеницы (сорт Хакасская) на стадии первого развернувшегося настоящего листа инокулировали путем натирания суспензией спор листьев до полного увлажнения инокулируемой поверхности. Далее растения переносились во влажную камеру при температуре 20-22°C. Через 2 суток растения возвращались в климатическую камеру с первоначальным режимом [283].

7. Продукция рекомбинантных белков в растениях *N. benthamiana*

7.1. Трансформация агробактерий плазмидными конструкциями

Ночную культуру агробактерий *A. tumefaciens* штамма C58C1 (или GV3101), устойчивых к рифампицину, трансформировали соответствующими плазмидами с добавлением рифампицина (100 мг/мл) и 1 мкг плазмиды. Смесь 5 минут держали во льду, 5 минут – в жидком азоте, 15 минут – проводили тепловой шок в водяном термостате при 37 °C. Далее добавляли 1 мл LB и ставили на качалку 2-5 часов при 28 °C. Затем клетки высевали на чашки, содержащие твердую питательную среду с рифампицином (100 мг/мл), стрептомицином (20 мг/мл) и спектиномицином (50 мг/мл) в случае плазмид pLN7000delta(+). Растили клетки в течение 3-4 дней, проверяли присутствие плазмид при помощи праймеров на плазмиду pLN7000delta(+) (Табл.3).

7.2. Агроинфльтрация растений *N. benthamiana*

Перед инфильтрацией растений *N. benthamiana* подготавливали агробактерии: выращенными на чашках колониями заседали ночную культуру в 5 мл LB с добавлением нужных антибиотиков и ацетисирингона до концентрации 20 мкМ (см. Предыдущий раздел).

Параллельно с агробактериями, трансформированными плазмидами, содержащими гены тритикаина, подготавливали агробактерии, трансформированные плазмидой, содержащей ген белка p19 вируса кудрявости помидоров [284]. p19 препятствует РНК-интерференции в растительных клетках, которая подавляет продукцию рекомбинантных белков.

Ночные культуры центрифугировали 10 минут при 22°C и 6000 rpm на центрифуге 5804R (Eppendorf). Суспендировали в ММА (см. Составы буферов и сред) в объеме 5 мл. Измеряли оптическое поглощение при $\lambda=600$ нм, доводили до OD=1, смешивали суспензии агробактерий, несущих гены интереса, и агробактерий, содержащих p19-кодирующую

плазмиду, в объемах 3:1. Затем инфильтрировали листья растений *N. benthamiana* суспензией клеток с помощью шприца посредством прямого введения суспензии агробактерий в апопласт.

В случае коэкспрессии тритикаина- α и SlCys8, агробактерии несущие эти гены и ген p19, смешивались в соотношении 3:3:1, соответственно.

Сбор листьев производили спустя 3-5 дней после агроинфильтрации.

7.3. Экстракция листьев

Листья растирали в ступке в жидком азоте, добавляли буфер 20 мМ Трис pH 7.5 (для электрофореза в ПААГ или иммуноблоттинга) или 50 мМ ацетата натрия, 5 мМ ДТТ, для АВРР (см. Основанный на активности профайлинг белков). Инкубировали 20 минут при 0 °С, после чего центрифугировали на настольной центрифуге при 4°С 10 минут, отбирали супернатант и замораживали или анализировали далее.

7.4. Выделение апопластной жидкости

Листья растений *N. benthamiana* срезали ножницами, разрезали на небольшие кусочки, удаляли крупные жилки. Промывали дважды в дистиллированной воде, подсушивали на фильтровальной бумаге. Проводили вакуумную инфильтрацию в шприце буфером на дистиллированной воде, содержащем 0.01% Silwet-77, 0.5М NaCl, 1М Трис pH 8.0. Затем кусочки листьев подсушивали на фильтровальной бумаге и центрифугировали 30 минут при 2000 rpm. Из осажденных листьев делали экстракты (см. Экстракция листьев), отобранный супернатант (апопластная жидкость) анализировали при помощи электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга.

8. Анализ экспрессии рекомбинантных белков в *N. benthamiana*

8.1. Электрофорез белков в ПААГ

Разделение белков проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли [285]. Использовали ПААГ с концентрацией акриламида 12%. В пробы добавляли двукратный буфер для образцов (см. Составы буферов и сред) и до нанесения на гель инкубировали при 95°С в течение 5 минут.

8.2. Вестерн блоттинг

Для проведения вестерн блоттинга (иммуноблоттинга) сначала разделяли белки в ПААГ по методу Лэммли (см. Предыдущий раздел). Далее осуществляли перенос белков на мембраны PVDF (входящие в состав набора для переноса Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini

PVDF Transfer Kit, Bio-Rad) при помощи полусухого способа переноса (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) с использованием стандартной программы Mixed MW.

После переноса мембраны инкубировали в 5% молоке (AppliChem A0830,0500), растворенном в PBS, в течение часа. После этого проводили инкубацию с первичными антителами, растворенными в соответствующих концентрациях в 5%-ом молоке (см. Составы буферов и сред), от 1,5 часов при комнатной температуре до ночи при 4°C. После этого мембраны отмывали буфером PBS с добавлением 0,1% Tween-20 три раза по 10 минут на настольном шейкере. Далее инкубировали мембраны со вторичными антителами к мышинным антителам (см. раздел *Использованные в работе материалы*), разведенными в соотношении 1:5000 в 5%-ом молоке, в течение 1-1,5 часов. После этого мембраны отмывали буфером PBS с добавлением 0,1% Tween-20 три раза по 10 минут на настольном шейкере.

После этого проводили хемилюминесцентную детекцию с помощью набора Clarity™ Western ECL, Bio-Rad, согласно рекомендациям производителя.

8.3. Основанный на активности профайлинг белков (ABPP)

Основанный на активности профайлинг белков был произведен в лаборатории Кеметики растений Отдела наук о растениях Оксфордского Университета, Оксфорд, Великобритания, под руководством Dr. Philippe Varennes-Jutras и Prof. Renier A.L. van der Hoorn [57]. Спустя 3-5 суток после инфильтрации листьев *N. benthamiana* агробактериями, несущими соответствующие конструкции, собирали несколько аликвот листьев по 3 диска диаметром 1 см, гомогенизировали в жидком азоте, после чего добавляли 150 мкл 50 мМ ацетата натрия, 5 мМ ДТТ. Центрифугировали образцы 10 минут при 13000 rpm при 4°C. Отбирали 48 мкл супернатанта в новую пробирку, добавляли 1 мкл ДМСО, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Контрольные образцы содержали 0,2 мМ E-64. После чего добавляли 0,5 мкл 0,1 М MV202 (ковалентно связывающаяся флуоресцентная проба, специфичная к папаин-подобным цистеиновым протеиназам) и инкубировали 4 часа при комнатной температуре в темноте. После этого проводили электрофорез в ПААГ и сканировали гель при помощи сканера Amersham Typhoon Biomolecular Imager в канале Cy3.

9. Фракционирование органелл клеток листьев *T. aestivum* путем дифференциального центрифугирования

Разделение органелл клеток листьев 7-дневных проростков сорта пшеницы Дарья проводили путем дифференциального центрифугирования согласно ранее описанной методике [17]. Листья были собраны и измельчены при помощи пестика и ступки в жидком азоте, после

чего получали экстракт в 10 мМ HEPES-КОН pH 7.5, 10% сахарозы. Экстракт был отфильтрован при помощи марли. Далее фильтрат был фракционирован при помощи дифференциального центрифугирования. Осадок P1, полученный центрифугированием при 1000g, содержал ядра, хлоропласты и ЭПР, осадок P8 (8000g) – тельца ЭПР и митохондрии, осадок P100 (100000g) – микросомы, и супернатант S100 (100000g) – цитозоль и растворимые вакуолярные белки. Полученные фракции были анализированы путем измерения нитратов.

10. Измерение нитратов во фракциях клеток листьев пшеницы

Нитраты – известный маркер вакуоли растительных клеток. Измерение проводили колориметрически путем измерения поглощения проб при $\lambda=410$ нм согласно протоколу, описанному ранее и основанному на нитровании салициловой кислоты [286].

11. Подготовка образцов для масс-спектрометрии

Для выделения суммарного белка из тканей растений был использован метод хлороформ/метанольного переосаждения. К 200 мкл экстракта добавляли 600 мкл метанола, 150 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе, добавляли 450 мкл MilliQ, снова перемешивали на вортексе и центрифугировали 1 минуту при комнатной температуре при 13000g. Удаляли верхнюю водную фазу, добавляли к оставшейся жидкости 450 мкл метанола, перемешивали на вортексе и центрифугировали 2 минуты при комнатной температуре при 13000g. Удаляли супернатант. Осадок белков растворяли в 6М мочеvine, 100 мМ Трис-НСl, pH 7.5. Ферментативное расщепление суммарного белка трипсином (Promega, V5111) и AspN (Promega, VA1160) проводили согласно рекомендациям производителя ферментов. После окончания гидролиза, реакцию останавливали добавлением до 1% уксусной кислоты (в случае трипсина) или прогреванием 10 минут при 70°C (в случае AspN). Перед масс-спектрометрическим анализом пробы обессоливали при помощи Thermo Scientific Pierce C18 колонок. Каждый эксперимент проводился по 3 биологические повторности.

12. Метод жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС)

1 микрограмм пептидов в объеме 1–4 мкл был загружен в предварительную колонку Acclaim (размер частиц 0,5 мм × 3 мм, Thermo Scientific, Rockwell, IL, USA) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме подвижной фазы С (2% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты). Затем пептиды разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate 3000 Nano LC System, Thermo Scientific, Rockwell, IL, USA) в колонке C18 длиной 15 см (Acclaim® PepMap™ RSLC,

внутренний диаметр 75 мкм, Thermo. Fisher Scientific, Rockwell, IL, USA). Пептиды элюировали градиентом буфера В (80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Общее время пробега, включая начальные 4 минуты уравнивания колонки с буфером А (0,1% муравьиная кислота), затем градиент от 5–35% буфера В в течение 65 минут, 6 минут до достижения 99% буфера В, промывка 10 минут 99% буфером В и 5 мин повторного уравнивания в буфере А составили 90 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили, по меньшей мере, в трех технических повторностях с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF (масс-спектрометр Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, Thermo Fisher Scientific, Rockwell, IL, USA). Температура капилляра составляла 240°C, а напряжение на эмиттере 2,1 кВ. Масс-спектры получали с разрешением 120000 (МС) в диапазоне 300-1500 m/z . Tandemное сканирование фрагментных ионов было проведено при разрешении 15000 (МС/МС) в диапазоне от 100 m/z до значения m/z , определяемого состоянием заряда предшественника, но не более 2000 m/z . Максимальное время интеграции для прекурсорных ионов составило не более 50 мс, для фрагментных ионов не более 110 мс. Значение автоматического управления усилением для ионов-предшественников и фрагментов было установлено равной 1×10^6 и 2×10^5 , соответственно. Для отбора прекурсоров был определен порог интенсивности в 50000, и максимальное число разрешённых для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 было установлено, как не более 20. Прекурсоры с заряженным состоянием +1 и более +5 были отклонены, и все измеренные прекурсоры были динамически исключены из запуска последующей MS/MS в течение 20 с.

13. Идентификация белков и определение сайтов, гидролизованных in vivo эндогенными протеиназами

Для анализа данных масс-спектрометрии была создана база данных с использованием протеома *T. aestivum* (релиз 39, база данных генома Ensembl (<ftp://ftp.ensemblgenomes.org/>) [278]), объединенного с протеомами патогенов. В случае инфекции *P. recondita* использовалась сборка *Puccinia triticina* 1-1 BBBD Race 1 (NCBI ID 1628) [287], тогда как в случае инфекции *S. nodorum* использовалась *Parastagonospora nodorum* SN15 (сборка ASM14691v2) [288]. В нашем исследовании мы выполнили 3 биологических и 3 технических повторения для каждого эксперимента.

Полученные данные обсчитывались с использованием алгоритма поиска IdentiPy [19]. Отбор пептидов была основан на Hyperscore алгоритма X! Tandem (таблицы S1 – S12) [289]. Алгоритм IdentiPy предлагает функцию автонастройки, которая позволяет повторно

обрабатывать спектры и оптимизировать исходные параметры поиска. Начальные значения для параметров были установлены по умолчанию как 100 ppm для ошибки массы предшественника, 500 ppm для ошибки массы фрагмента и 5 для допустимых отклонений. Результаты предварительного поиска были отфильтрованы по значению 1% FDR с использованием target-decoy подхода и статистически проанализированы для получения оптимальных параметров, которые были скорректированы алгоритмом для всех поисков, выполненных в этом исследовании: 20 ppm для погрешности массы предшественника, 10–11 ppm для погрешности массы фрагмента и 2 для допустимых расщеплений.

IdentifyPy также был использован для идентификации белков. Анализ после поиска и фильтрация FDR основывались на многопараметрическом алгоритме оценки [290]. Сопоставление PSM, пептидов и белков было сделано при 1,0% FDR, оцененном с использованием распределения decoy последовательностей. Белки, имеющие по крайней мере два уникальных пептида, считались положительно идентифицированными.

Для выявления различий в количестве протеиназ в разных сортах и между здоровыми и инфицированными растениями в последовательностях из базы данных, содержащей все 1544 протеазы пшеницы, были определены специфические (полные триптические и полные AspN) пептиды. Только протеиназы, для которых были найдены 2 и более уникальных пептида во всех биологических и технических повторностях, считались идентифицированными.

Чтобы идентифицировать сайты гидролиза *in vivo* во всех белках из образцов, был проведен поиск полуспецифических (полутриптических и полу-AspN) пептидов в последовательностях из базы данных, содержащей протеом пшеницы. Полуспецифические пептиды, присутствующие во всех биологических и всех технических повторностях для каждого типа проб, были взяты для дальнейшего анализа.

Чтобы идентифицировать сайты процессинга протеиназ *in vivo*, был проведен поиск полуспецифических пептидов в областях, находящихся +/- 40 аминокислотных остатков до и после первого аминокислотного сайта пептидазного домена. Для этого поиска использовалась база данных, содержащая протеиназы пшеницы, которые были идентифицированы с использованием полно-специфических пептидов. В случае метакаспаз для поиска использовались известные сайты процессинга [291]. Пептидазы, содержащие полуспецифичные пептиды (идентичные на 100%, покрытые на 100%), высвобождаемые после расщепления AspN или трипсином и определенные IdentifyPy, были приписаны протеиназам с использованием алгоритма BlastP [292].

Результаты работы

1. Деградом *Triticum aestivum* L. представлен различными семействами протеиназ

В первую очередь были идентифицированы протеиназы, кодируемые в геноме пшеницы. Протеом *T. aestivum* (релиз 39) был получен из базы данных геномов Ensembl (<ftp://ftp.ensemblgenomes.org/>) и использован для идентификации множества протеиназ пшеницы (деградом). Были определены семейства протеиназ различных каталитических типов: цистеиновые, сериновые, аспартатные, треониновые и металлопротеиназы.

Всего нами было обнаружено 1544 протеиназы (Табл.4): 459 цистеиновых протеиназ из 12 семейств, 275 металлопротеиназ из 17 семейств, 336 аспартатных протеиназ из двух семейств, 446 сериновых протеиназ из пяти семейств и 28 треониновых протеиназ.

Таблица 4. Представленность различных семейств в геноме пшеницы.

Каталитический тип протеиназ	Семейства и подсемейства (согласно номенклатуре базы данных Pfam)
Цистеиновые	C1, C2, C12, C13, C14, C15, C26, C48, C50, C54, C65, C78
Сериновые	S8, S9, S10, S15, S28
Аспартатные	A1, A22B
Металлопротеиназы	M1, M3, M8, M10, M14, M16_M, M16_C, M17, M18, M20, M22, M24, M28, M41, M48, M49, M50B, M50
Треониновые	T1

Семейство C1 состояло из 181 белка, относящегося к подсемейству C1A ППЦП согласно номенклатуре MEROPS [163]. Следует отметить, что некоторые протеиназы были одновременно аннотированы двумя разными идентификаторами Pfam: Peptidase_C1 и Peptidase_C1_2 со значением E-value порядка e^{-100} и e^{-10} , соответственно. Эти пептидазы образуют независимую группу и не имеют описанных гомологов из *A. thaliana*. Peptidase_C1_2 соответствует подсемейству C1B (согласно номенклатуре MEROPS). Был сделан вывод о том, что геном *T. aestivum* не содержит пептидазы подсемейства C1B. Тем не менее, C1 пептидазы образовали две отдельные ветви на филогенетическом дереве, разделенные несколькими протеиназами из семейств C2 и C78, что указывает на возможные дивергентные процессы в подсемействе C1A цистеиновых протеаз (Рис.9, «Цистеиновые»). У этого большого дерева отдаленно связанных цистеиновых протеиназ были обнаружены некоторые особенности.

Например, последовательности, аннотированные к семейству C48 в соответствии с его доменом Pfam, были рассеяны по всему дереву, в то время как другие C48 протеиназы были ближе к другим семействам, чем друг к другу (Рис.9, «Цистеиновые»).

Сериновые протеиназы образовали отдельные группы, содержащие близкие гомологи, тогда как другие группы были удалены друг от друга (Рис.9, «Сериновые»). Металлопротеиназы были представлены множеством семейств (Табл.4), и оказались смешанными на филогенетическом дереве (Рис.9, «Металлопротеиназы»). Аспаргатные протеиназы из разных семейств (семейство A1 и подсемейство A22B) не являются гомологами и возникли эволюционно независимо в группе аспаргатных протеиназ (Рис.9, «Аспаргатные»). Протеиназы из семейства A1 являются уникальными для *T. aestivum* и состоят из N- и C-концевых доменов ингибитора ксиланазы TAXi_N и TAXi_C *T. aestivum*, которые являются отдаленными, но гомологичными доменами. Следует отметить, что домены TAXi_N из разных протеиназ ближе друг к другу, чем домены TAXi_N и TAXi_C в пределах одной пептидазы. Был сделан вывод о том, что филогенетическое дерево (Рис.9, «Аспаргатные») указывает на дивергентные процессы между доменами TAXi.

Филогенетические деревья, основанные на выравнивании соответствующих доменов, были сконструированы для семейств, о которых в настоящее время известно, что они связаны с иммунитетом растений. Деревья, соответствующие пептидазам семейств C1, C13, C14 отображено на Рисунке 10, семейству S8 – на Рисунке 11 [293]. Доменные структуры были идентифицированы для всех протеиназ и суммированы на Рисунках 12 и 13. Некоторые критерии были введены для разграничения дискретных подгрупп протеиназ. Использовались следующие критерии на основе принципа «от листьев к корням»:

1. Проверяли общий узел на два листа. Если бутстрэп значение для этого узла было больше 70, объединяли эти листья в одну подгруппу. Если меньше 70, то листья рассматривали как отдельные, независимые группы. Повторяли этот шаг столько раз, сколько необходимо;
2. Проверяли общий узел для узлов с низким значением бутстрэпа. Если это значение для общего узла превышает 70, то подгруппы следует рассматривать как члены более крупной группы;
3. Если известно, что протеиназы образуют группу с уникальными особенностями, то их следует рассматривать как независимые.

Следуя указанным выше критериям, были сконструированы филогенетические деревья на основе выравниваний соответствующих доменов для семейств, члены которых ранее были связаны с иммунитетом растений, таких как C1, C13, C14 (Рис.10) и S8 (Рис.11). Доменные структуры были идентифицированы для всех протеиназ из этих семейств (Рис.12 и 13).

Поскольку протеиназы из семейств C1A, C13 и C14 относительно схожи, для этих семейств было построено единое филогенетическое дерево (Рис.10). Всего было идентифицировано 25 кластеров C1A протеиназ. Девять кластеров соответствовали девяти группам, идентифицированным ранее Richau et al. [164] для подсемейств ППЦП *A. thaliana* (Рис.2): RD21, XCP2, CEP1, SAG12, XBCP3; RD19, AALP, TH1. Кроме того, были также идентифицированы протеиназные группы, гомологичные таковым из риса (*Oryza sativa*) (обозначены как OsCP на Рис.10). Кроме того, протеиназы из других групп имели ранее

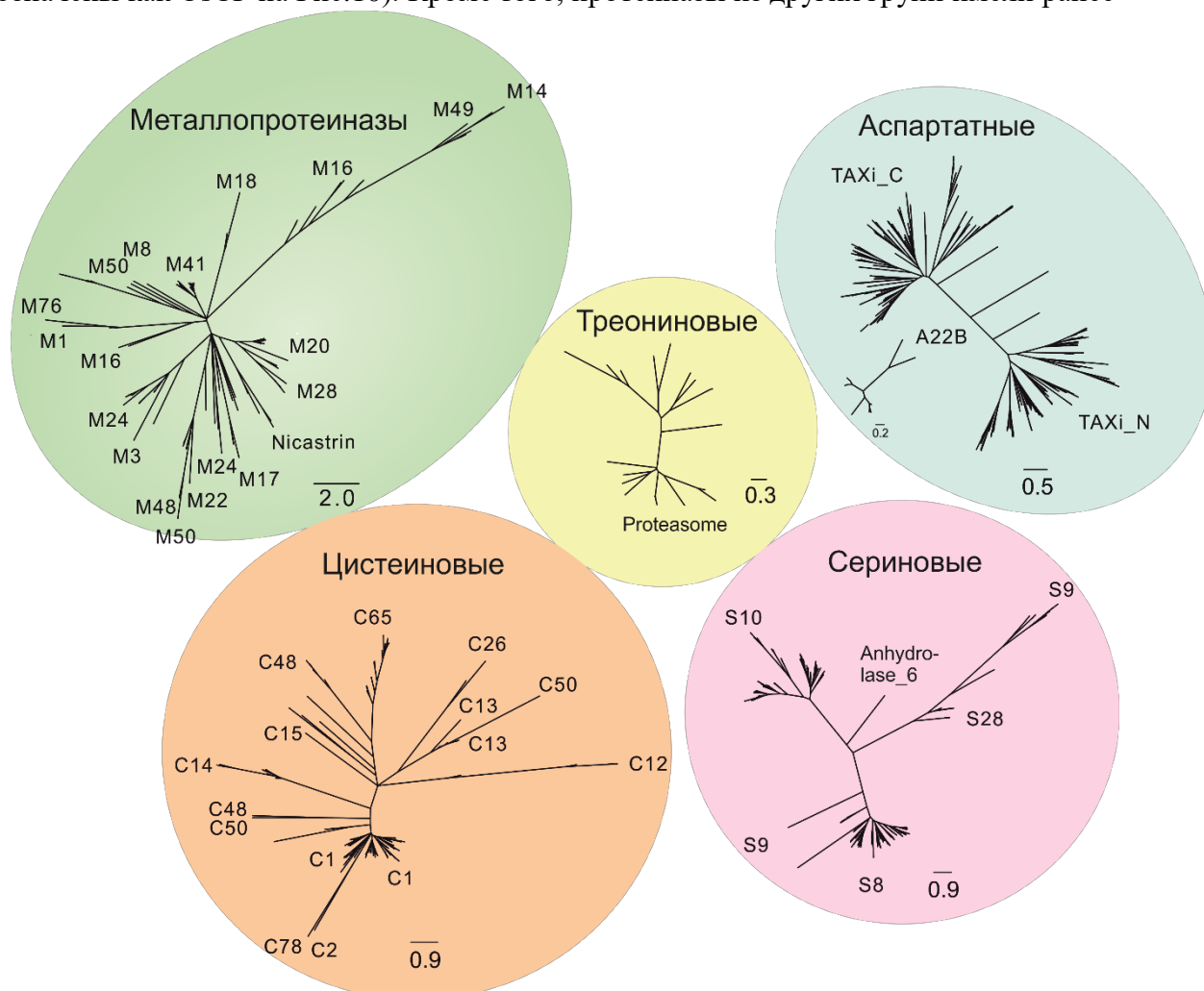


Рисунок 9. Деградом *T. aestivum*. Металлопротеиназы обозначены зеленым, треолиновые – желтым, аспаратные – синим, цистеиновые – оранжевым, сериновые – розовым. Неукорененные филогенетические деревья демонстрируют разнообразие семейств протеиназ. Длины ветвей деревьев соответствуют единицам, используемым для определения эволюционных расстояний между белками. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода р-расстояния [281], и их единицы соответствуют количеству различий на сайт.

неописанные гомологи (отмечены красным на Рис.10). Также были определены несколько гомологичных наиболее близких протеиназ из других организмов (Рис.10): наиболее близкая протеиназа для группы 16 стала COT44 из *Brassica napus*, 19 – vignain из *Vigna mungo* и 22 – SAG39 из *O. sativa*.

Как правило, C1A протеиназы пшеницы содержали продомен и каталитический домен, а в случае XBCP3-подобных и RD21-подобных протеиназ – гранулиновый домен (Рис.12). Другие группы протеиназ обладали отличительными особенностями: группа 15 содержали белки с доменом неизвестной функции 4371 (DUF4371); а группа 22 – NAM (no apical meristem) домен.

Пептидазы C13, отображенные на филогенетическом дереве (группа 26, Рис.10), были классифицированы на пять тесно связанных групп, включающих гомологи α , β , γ и δ вакуолярных пептидаз VPE. Метакаспазы из семейства C14 образовали три клады, которые включали метакаспазы I и II типа. Метакаспазы I типа имели N-концевой домен типа цинкового пальца (zf-LSD1), что совпадает с уже описанными особенностями метакаспаз I типа [11].

82 сериновые протеиназы из семейства S8, также известные как субтилазы, были классифицированы на девять групп, для которых были определены ближайшие гомологи из *A. thaliana* (Рис.11). Протеиназы почти из всех групп несут не только каталитический домен (Peptidase_S8), но также консервативный продомен (Inhibitor_I9, Рис.13). Группы 3-6 и 8 содержали протеиназы с PA (protease-associated) доменом. Субтилазы из 8 и 9 групп содержали домен, подобный фибронектину III типа (fn3_5).

Можно заключить, что в геноме пшеницы было обнаружено 1544 протеиназы, относящиеся к относительно большому количеству семейств. Наиболее ярким примером является подсемейство C1A папаин-подобных цистеиновых протеиназ, насчитывающее 181 фермент и включающее 8 уникальных для пшеницы групп (Рис.2, А, красным).

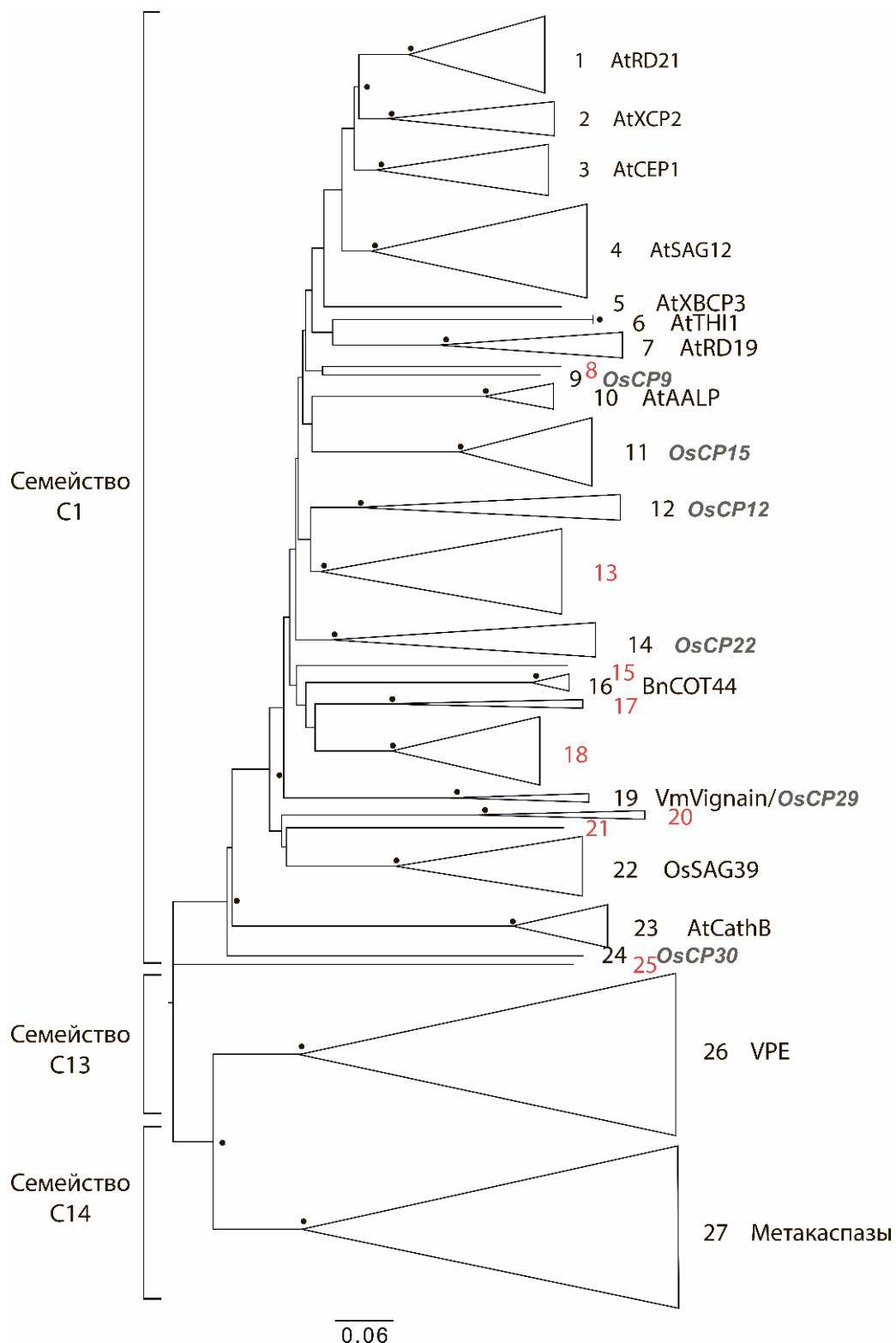


Рисунок 10. Филогенетическое дерево семейств C1, C13 и C14 цистеиновых протеиназ. Треугольники обозначают сокращенные клады и размер каждой группы протеиназ. Бутстрэп значения выше 70% показаны с черными точками в соответствующих узлах. Ближайшие гомологи групп протеиназ указаны справа от филогенетического дерева: At – *A. thaliana*, Os – *O. sativa*, Bn – *B. napus* и Vm – *V. mungo*. Номера уникальных для *T. aestivum* групп окрашены красным цветом.

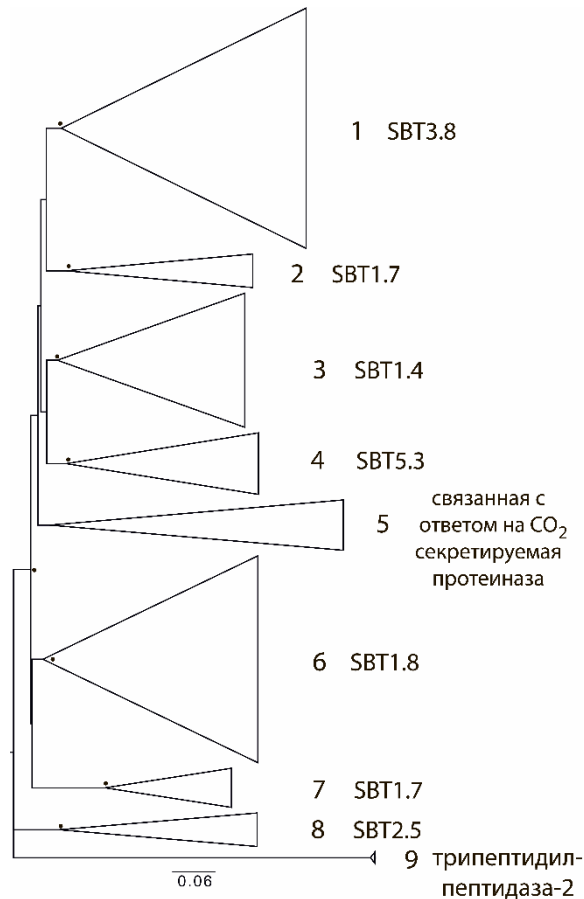


Рисунок 11. Филогенетическое дерево протеиназ семейства S8 пшеницы. Треугольники представляют сокращенные клады и соответствуют размеру каждой группы протеиназ. Бутстрэп значения выше 70% показаны черными точками в соответствующих узлах. Ближайшие гомологи групп протеиназ из *O. sativa* указаны справа.

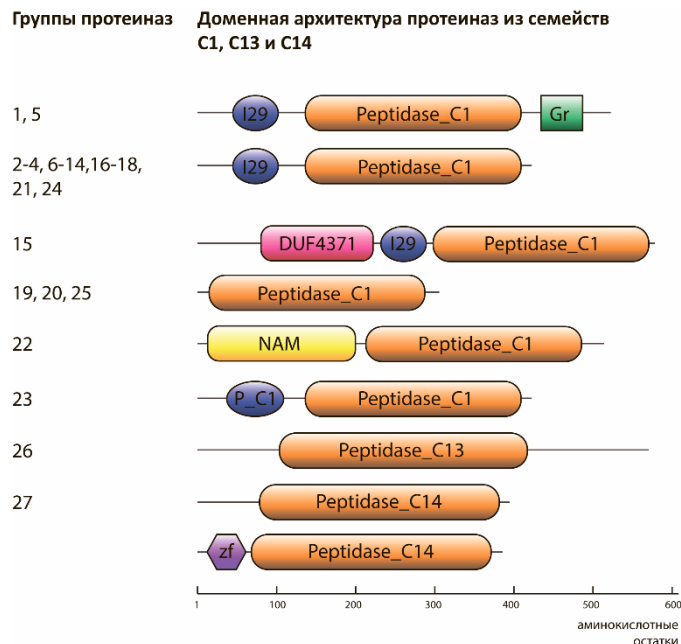


Рисунок 12. Типичная доменная организация протеиназ из семейств C1, C13 и C14. Номера групп соответствуют тем, которые указаны на Рис.10. Длины всех структур указаны в масштабе, соответствующем шкале снизу. Идентификаторы Pfam: Peptidase_C протеолитический домен протеиназ семейств C1, C13 и C14; I29 – Inhibitor_I29 – продомен; NAM – No Apical Meristem домен; P_C1 – Propeptide_C1 - продомен; zf – домен zf-LSD1.

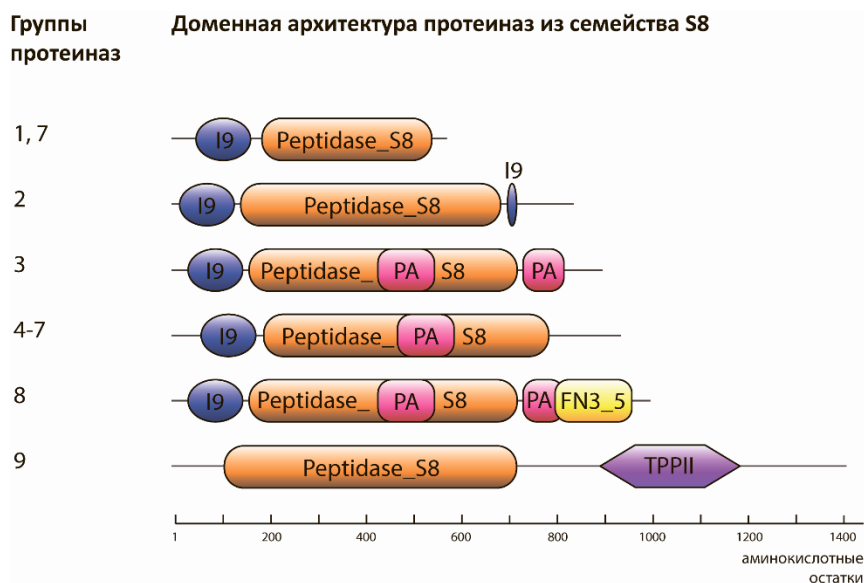


Рисунок 13. Доменная архитектура субтилиз из пшеницы. Номера групп соответствуют номерам, указанным на Рис.11. Длины всех структур указаны в масштабе, соответствующем шкале снизу. Идентификаторы Pfam: Peptidase_S8 – протеолитический домен; I9 – Inhibitor_I9 – продомен; PA – PA домен; FN3_5 – fn3_5; TPPII – домен трипептидилпептидазы-2.

2. Деградом пшеницы варьируется на уровне сортов

На основе данных, полученных при помощи ЖХ-МС/МС, были идентифицированы протеиназы, присутствующие в здоровых растениях сортов Хакасская и Дарья. Растения сорта Хакасская является более чувствительными к атакам патогенов, в то время как растения Дарья – более устойчивыми. Идентификация протеиназ была основана на количественном определении полно-специфических триптических и полно-специфических пептидов AspN. С базами обнаруженных пептидов можно ознакомиться в приложении (Табл. S1-S2) к статье [294] по ссылке <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3991>. Полученные данные указывали на то, что деградом пшеницы варьируется внутри вида (Рис.14). Сравнительный анализ показал, что растения сортов Хакасская и Дарья экспрессируют разное количество протеиназ (94 и 79 протеиназ, соответственно), причем 49 протеиназ были детектированы в обоих сортах, что составляет 52,1% и 62% от общего количества протеиназ для Хакасской и Дарьи, соответственно. Наиболее представленными семействами протеиназ у обоих сортов являются C1, S8, S9, S10, M20, M24 и A1.

Можно заключить, что в разных сортах пшеницы могут быть обнаружены разные наборы протеиназ. Деградомы Хакасской и Дарьи совпадают на 52,1% и 62% от всех протеиназ, соответственно, что несколько меньше, чем уже известное ранее различие в 79,3% между протеомами сортов пшеницы [295].

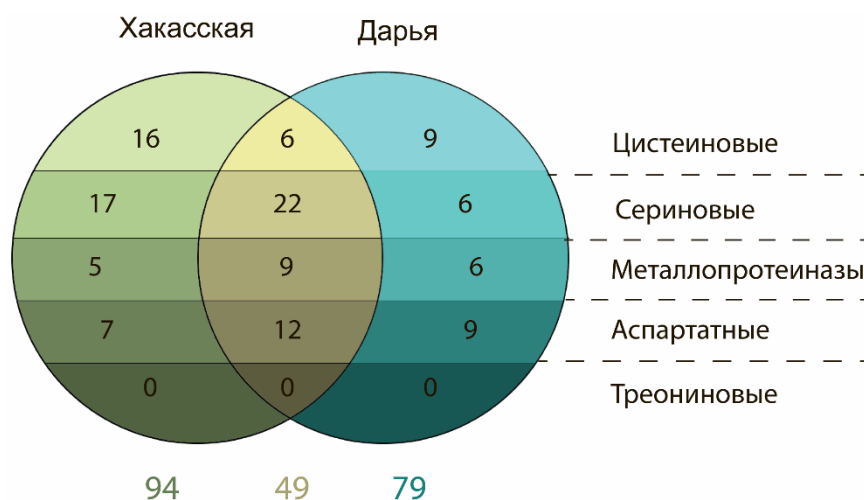


Рисунок 14. Диаграмма Венна, представляющая число воспроизводимо детектируемых протеиназ для сортов пшеницы Хакасская (обозначены зеленым) и Дарья (обозначены голубым). Протеиназы, обнаруженные в обоих сортах, обозначены желтым цветом. Пунктирные линии делят протеиназы разных каталитических типов.

3. Заражение патогенами приводит к изменению составов протеиназ

Далее было проведено сравнение протеиназ, экспрессируемых в здоровых растениях и растениях, собранных спустя 24 часа после заражения биотрофным патогеном – грибом *P. recondita* и некротрофным патогеном – грибом *S. nodorum*. Идентификация протеиназ была основана на количественном определении полно-специфических триптических и полно-специфических пептидов AspN, использованных для приготовления проб для ЖХ-МС/МС. С базами обнаруженных пептидов можно ознакомиться в приложении (Таблицы S3-S4) к статье [294] по ссылке <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3991>. Были обнаружены 117 и 77 протеиназ у растений, зараженных *P. recondita* и *S. nodorum*, соответственно, 55 (58, 5%) и 45 (60%) протеиназ из которых совпадают с соответствующими контролями (Рис.15).

Можно заключить, что в случае биотрофной инфекции были индуцированы протеиназы из семейств M17 и M20, в то время как в случае некротрофной – из C14 и C26. Следует отметить, что обе инфекции вызывали индукцию протеиназ из большого числа одних и тех же семейств (C1, C13, C48, C65, M24, M41, S10, S9, S8 и A1). Протеиназы из C13 и C14 семейств ранее были ассоциированы с ответами на патогены. Однако оставшиеся семейства требуют дальнейшего изучения.

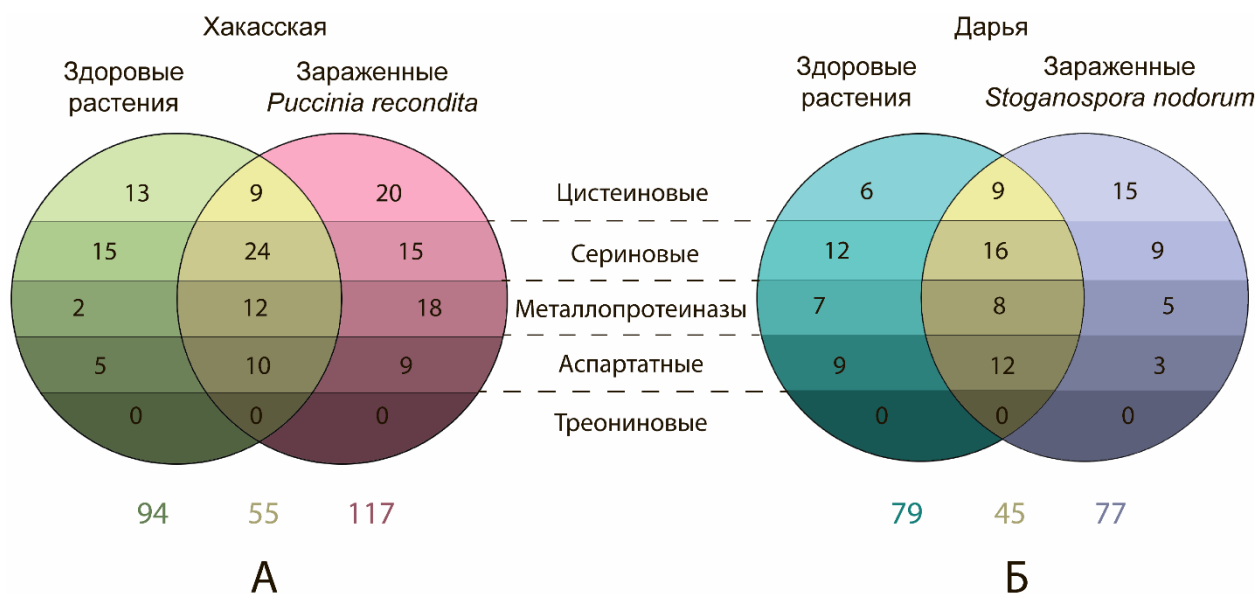


Рисунок 15. Диаграммы Венна, представляющие число воспроизводимо детектируемых протеиназ в протеомах (А) здоровых (обозначены зеленым) и зараженных *P. recondita* (обозначены розовым) растений сорта Хакасская; (Б) здоровых (обозначены голубым) и зараженных *S. nodorum* (обозначены фиолетовым) растений сорта Дарья. Число протеиназ, одновременно обнаруженных в опытных и контрольных пробах, обозначены на пересечении желтым.

4. Множество субстратов, расщепляемых протеиназами *in vivo*, увеличивается на фоне обоих типов заражения

Далее был проведен поиск потенциальных субстратов, расщепляемых протеиназами в здоровых растениях обоих сортов. С базами обнаруженных пептидов можно ознакомиться в приложении (Таблицы S5-S8) к статье [294] по ссылке <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3991>. Анализ выявил практически разное количество гидролизованных субстратов: 220 и 178 белков были идентифицированы (85 общих) в здоровых растениях Хакасской и Дарьи (Рис.16, А). Как указывалось ранее, иммунные ответы растений и ЗКС связаны с каспазо-подобной и метакаспазой активностями, которые включают гидролиз субстратов в специфических сайтах, таких как VEID, DEVD, YVAD, и др. Поэтому присутствие субстратов, предположительно расщепляемых каспазо-подобными и метакаспазо-подобными протеиназами, также было исследовано. Было применено обобщенное правило для идентификации субстратов: XXXD для каспазо-подобных и XXXR, XXXK для метакаспазо-подобных пептидаз, где X – любая аминокислота. Было обнаружено почти одинаковое число вероятных субстратов каспазо-подобных протеиназ в здоровых растениях Хакасской и Дарьи (10 и девять соответственно, с пятью общими), тогда как число субстратов метакаспазо-подобных протеиназ составили 11 и 19, с восемью общими, соответственно (Рис.16, А).

Поскольку число экспрессированных протеиназ увеличивалось на фоне обеих инфекций (см. предыдущий раздел), было проверено, увеличивается ли число субстратов, расщепленных эндогенными протеиназами. В случае инфекции *P. recondita* (Рис.16, Б), это число увеличилось с 220 до 518 (121 общих с контролем белков), в то время как в случае инфекции *S. nodorum* (Рис.16, В) – с 178 до 300 (77 общих с контролем белков). Также были обнаружены субстраты каспаза- и метакаспаза-подобных протеиназ. Как в здоровых, так и в зараженных растениях, наблюдалось повышенное количество белков, расщепленных по сайтам XXXD. 10 и 28 (четыре общих) сайта были идентифицированы в случае *P. recondita* (Рис.16, Б); девять и 15 (три общих) – в случае инфекции *S. nodorum* (Рис.16, В). Кроме того, только при биотрофной инфекции произошло повышение метакаспазо-подобной активности: 11 и 22 (семь общих) сайтов (Рис.16, Б), в то время как в случае инфекции *S. nodorum* это число почти не изменилось – 19 и 17 (11 общих) сайтов (Рис.16, В).

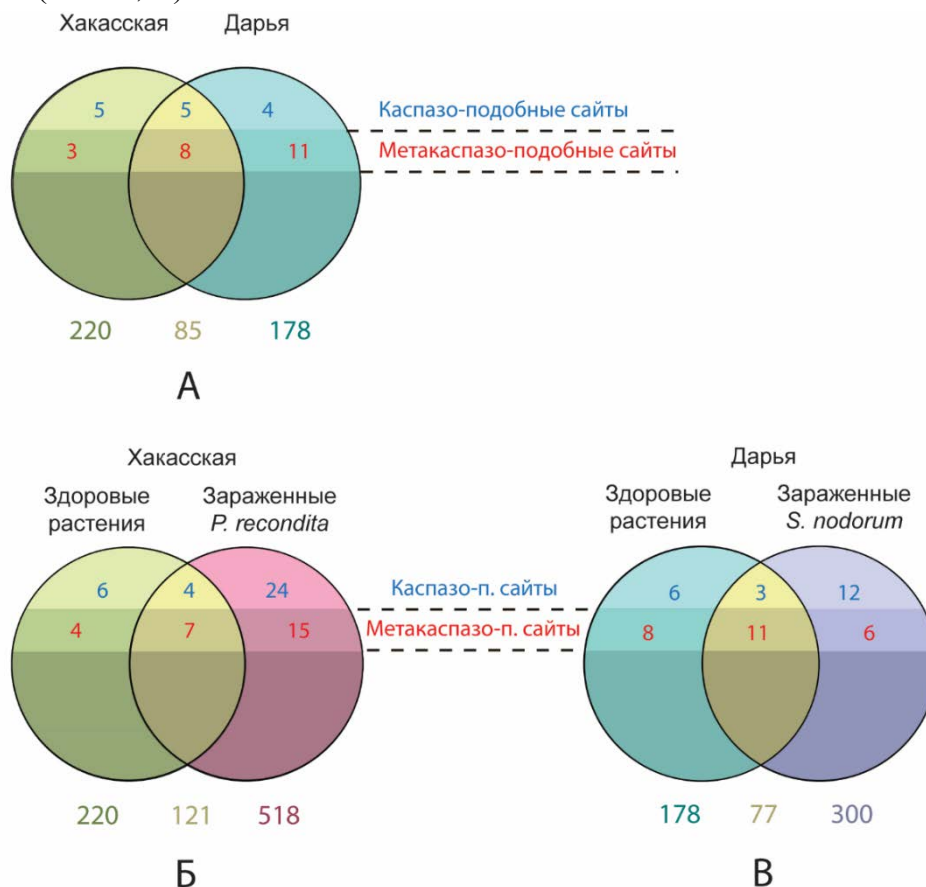


Рисунок 16. Диаграммы Венна, представляющие количество воспроизводимо детектируемых сайтов расщепления *in vivo* (обнаруженных с помощью ЖХ-МС/МС) во всех белках в протеомах (А) здоровых растений Хакасской (обозначены зеленым) и здоровых растений Дарьи (обозначены голубым); (Б) здоровых (обозначены зеленым) и зараженных *P. recondita* (обозначены розовым) растениях Хакасской; и (В) здоровых (обозначены голубым) и зараженных *S. nodorum* (обозначены фиолетовым) растениях Дарьи. Протеиназы, одновременно обнаруженные в разных образцах, обозначены желтым цветом. XXXD – каспазо-подобный сайт; XXXR, XXXK – метакаспазо-подобные сайты; X – любая аминокислота; цифры внизу диаграмм – общее число сайтов расщепления по протеомам; число каспазо-подобных сайтов обозначено синим, число метакаспазо-подобных сайтов – красным.

Можно заключить, что спустя 24 часа после заражения обоими патогенами произошло увеличение не только числа экспрессируемых протеиназ, но общей протеолитической активности в клетках растений. Стоит отметить, что и каспазо-подобная активность возросла после обоих типов заражения, в то время как метакаспазная – только в случае биотрофной инфекции. Это совпадает с ранее опубликованными данными [13]. Это означает, что в раннем ответе пшеницы на биотический стресс расщепление субстратов в клетке происходит в том числе и каспазо- и метакаспазо-подобными ферментами.

Также, были исследованы потенциальные субстраты каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ, гидролизованных в ответе растений на оба типа инфекции. Было обнаружено, что семь белков были гидролизованы каспазо-подобными протеиназами, а три – метакаспазо-подобными. Субстраты приведены в Табл.5. Расщепление рецептор-подобных протеинкиназ протеиназами может являться непосредственным звеном в установлении базального иммунитета, вызванного МАР патогенов, или иммунитета, вызванного эффекторами (ETI) [105].

Таблица 5. Возможные субстраты каспазо-подобных и метакаспазо-подобных протеиназ, гидролизованные на фоне обоих типов инфекций. Аннотация белков была сделана при помощи Blast: приведены лучшие находки с E-value $<1 \cdot 10^{-50}$. Сайты гидролиза указаны стрелками.

Белок	Сайт гидролиза
<i>Возможные субстраты каспазо-подобных протеиназ</i>	
Uncharacterized protein	VPTD↓AQLE
Protein Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 22 (TIC 22), chloroplastic-like	ITLD↓QVYM
Disease resistance protein Rho-type GTPase-activating protein 2-like (RGA2)	VSAD↓GVTR
5'-3' exoribonuclease 2-like	ILRD↓MVPL
Homeobox-DDT (DNA-binding homeobox-containing proteins and the different transcription and chromatin remodeling factors) domain protein Ringlet 3-like (RLT3)	KPED↓LTEY
Protein Fatty Acyl-CoA Reductase 1 (FAR1)-Related Sequence 5-like	LAAD↓HPRR
Constitutive Photomorphogenic1 (COP1)-interacting protein 7	IDID↓AELG
<i>Возможные субстраты метакаспазо-подобных протеиназ</i>	
Adenine/guanine permease Azaguanine Resistant 2 (AZG2)	CLAR↓TKSD
Wall-associated receptor kinase 5-like	LSTR↓NELI
Protein FAR1-Related Sequence 5-like	LFKK↓GVGA

5. Биотический стресс вызывает синтез и/или протеолитическую активацию протеиназ путем действия отличных от каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ

Было показано, что каспазо- и метакаспазо-подобная активности присутствуют в клетках пшеницы после заражения *P. recondita* и *S. nodorum*. На следующем этапе было проведено исследование влияния таких активностей на протеолитическую активацию протеиназ как в здоровых, так и в зараженных растениях. Для этого был реализован тот же подход, основанный на идентификации полу-специфических пептидов после расщепления трипсином или AspN при подготовке проб к ЖХ-МС/МС. С базами обнаруженных пептидов можно ознакомиться в приложении (Таблицы S8-S12) к статье [294] по ссылке <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3991>. Был проведен поиск пептидов, приходящихся на область границы продомена и протеолитического домена (± 40 аминокислотных остатков от границы), т.к. большое количество протеиназ содержат автоингибирующие продомены, которые необходимо гидролизовать для получения активной протеиназы. В случае метакаспаз были выбраны полу-специфичные пептиды в известных местах процессинга гомологичных ферментов [11]. Таким образом был определен статус процессинга протеиназ в здоровых и зараженных *P. recondita* и *S. nodorum* растений спустя 24 часа после заражения (Табл.6).

При биотрофной инфекции было обнаружено увеличение в два раза количества процессированных протеиназ по сравнению с контролем (Табл.6). Здоровые и зараженные растения имеют шесть общих процессированных протеиназ; при этом было обнаружено 10 протеиназ из семейств M17, M20, M24, M41, S8, S10, A1, предположительно активированных при заражении. Здоровые растения характеризуются только 1 уникальной протеиназой.

При некротрофной инфекции три общих процессированных протеиназы были обнаружены как в здоровых, так и в зараженных растениях. При этом заражение вызвало активацию протеиназ из семейств C1, C13, S8, S49, M24, A1 (шесть) по сравнению с контролем (четыре).

Данный результат показывает, что в зараженной пшенице сайты активации протеиназ отличаются от известных сайтов узнавания каспаз и метакаспаз. Только три из 16 и один из девяти сайтов относились к каспазо-подобным ферментам для зараженных *P. recondita* и *S. nodorum* растениям, соответственно. Ни одного сайта активации не было обнаружено для метакаспазо-подобных ферментов.

Таблица 6. Полученные на основании данных ЖХ-МС/МС предполагаемые сайты активации протеиназ из разных семейств в здоровых и зараженных растениях обоих сортов.

Каталитический тип	Семейство	Число детектированных сайтов* (число сайтов вида XXXD, если были обнаружены), [число сайтов вида XXXR или XXXK, если были обнаружены]			
		Здоровые растения Хакасской	Зараженные <i>P. recondita</i> растения Хакасской	Здоровые растения Дарьи	Зараженные <i>S. nodorum</i> растения Дарьи
Цистеиновые	Peptidase_C1	2	1	1	2
	Peptidase_C13		1 (1)		1 (1)
Сериновые	Peptidase_S8		2	1	1
	Peptidase_S10		1		
	Peptidase_S49				1
Металло-	Peptidase_M17		1		
	Peptidase_M20		1	1	
	Peptidase_M24		1		1
	Peptidase_M41	1	2	2	2
Аспартатные	A1 (TAXi_C)	4	6 (2)	2 (1)	1
Всего		7	16 (3)	7 (1)	9 (1)

*Каждый сайт расщепления был обнаружен только в одной протеиназе, т.е. число обнаруженных сайтов расщепления совпадает с числом активированных протеиназ.

6. Активация тритикаина- α – многоступенчатый автокаталитический процесс, который, предположительно, регулируется цистатином

Для того, чтобы более детально изучить механизмы процессинга протеиназ пшеницы *in vivo*, было решено изучить активацию на примере одной не каспазо- и метакаспазо-подобной протеиназы – тритикаина- α . Тритикаин- α – это папаин-подобная цистеиновая протеиназа, которая была обнаружена в прорастающих семенах пшеницы [193]. Ранее нами было показано, что тритикаин- α обладает глютеназными и коллагеназными свойствами [170], однако его физиологические свойства и способ активации оставались не известными.

Тритикаин- α имеет типичную для ПППП структуру и содержит сигнальный пептид, N-концевой продомен, протеолитический домен и C-концевой гранулиновый домен (Рис.17, А). В экспериментах по изучению активации фермента, в качестве контроля был создан и использован мутант тритикаина- α по каталитическому остатку Cys154.

С помощью проведенных экспериментов было показано, что процессинг тритикаина- α – ступенчатый процесс. При сверхэкспрессии рекомбинантного тритикаина- α в растениях *N. benthamiana*, сначала происходит отщепление N-концевого продомена как в ферменте дикого типа, так и в мутанте с образованием промежуточной формы – интермедиата (iTtc, Рис.10, Б).

Согласно результату основанного на активности профайлинга белков (АВРР), iTtc дикого типа, несмотря на частичное созревание, обладал протеолитической активностью, в то время как мутант был ее лишен (Рис.17, Б). При этом, процессинг мутантного фермента до промежуточной формы все же происходил. Это позволяет сделать вывод о том, что отщепление продомена *in vivo* приводит к активации фермента и может осуществляться не только самим тритикаином- α (автокаталитически), но и за счет межмолекулярного взаимодействия, в том числе, в ходе протеолитического каскада. Помимо этого, согласно данным, полученным при помощи масс-спектрометрии, были обнаружены два близких сайта расщепления при отщеплении продомена, что позволяет предположить, что данный процесс не является сайт-специфичным (Рис.18, В, Р8). Возможно, такая специфичность обусловлена позицией отщепления продомена относительно активного центра протеиназы.

Помимо этого, было обнаружено, что активность тритикаина- α полностью подавляется цистатином томата SlCys8 при их коэкспрессии в листьях *N. benthamiana*. АВРР показал, что тритикаин- α полностью утратил свою активность (Рис.17, Б), несмотря на то, что тритикаин- α все же присутствовал в клетке, согласно вестерн блоту (Рис.17, Б). Стоит отметить, что в присутствии SlCys8 зрелой формы тритикаина- α накапливалось значительно меньше. По-видимому, цистатин способен влиять на активацию и созревание тритикаина- α .

Также было обнаружено, что часть iTtc как дикого типа, так и мутанта, секретировается в межклеточное пространство – апопласт (Рис.17, В). Апопласт является богатой протеиназами средой. Так, было обнаружено, что в случае фермента дикого типа происходит отщепление С-концевого гранулинового домена до зрелой формы (mTtc), в то время как в случае мутанта этого не происходит (Рис.17, В). Можно заключить, что созревание фермента происходит автокаталитически, при котором необходима протеолитическая активность самого фермента. Дополнительно, этапы процессинга тритикаина- α были подтверждены ЖХ-МС/МС (Рис.18, В).

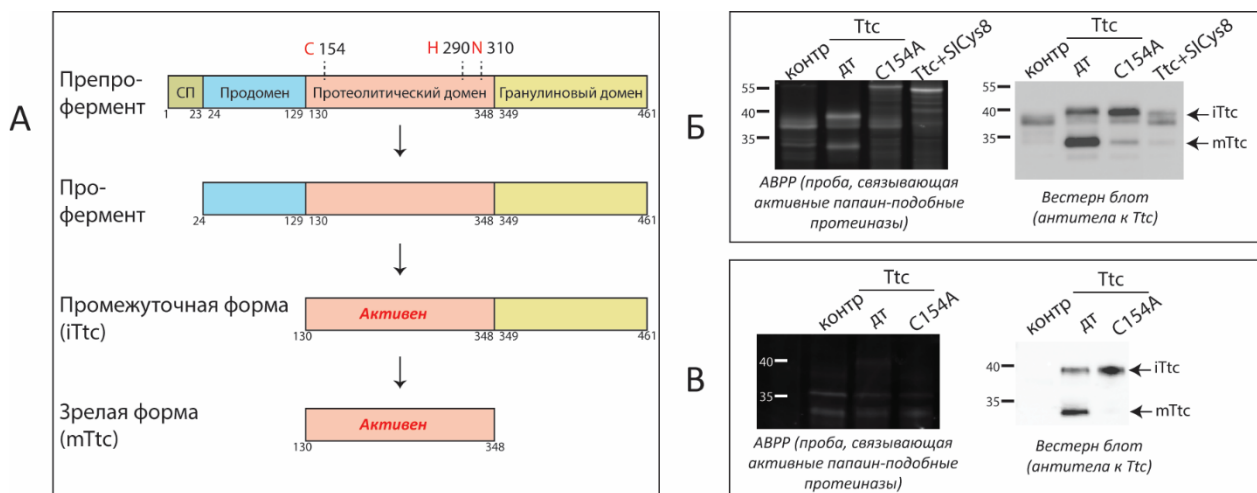


Рисунок 17. Активация тритикаина- α *in vivo* – многоступенчатый процесс. (А) Паттерн активации тритикаина- α ; СП – сигнальный пептид, каталитические остатки обозначены красным. (Б) Результат сверхэкспрессии рекомбинантных форм дикого типа (дт) и мутанта (C154A) тритикаина- α в клетках *N. benthamiana*; (В) в апопласте. Тtc – тритикаин- α , контр – контроль, дт – протеиназа дикого типа, C154A – мутант по каталитическому Cys, АВРР – основанный на активности профайлинг белков.

7. Тритикаин- α в основном накапливается в вакуоли, и его созревание происходит рН-зависимо

Для того, чтобы выяснить, как происходит активация эндогенного тритикаина- α в различных клеточных органеллах в клетках пшеницы, было проведено фракционирование экстрактов листьев 7-дневных проростков при помощи дифференциального центрифугирования. Центрифугирование при 1,000*g давало осадок P1, содержащий ядра, хлоропласты, ЭПР, при 8,000*g – осадок P8 с митохондриями и тельцами ЭПР, при 100,000*g осадок P100 с микросомальной фракцией и 100,000*g – супернатант S100, содержащий цитозоль и растворимые вакуолярные белки.

Факт успешного проведения фракционирования был подтвержден путем колориметрического измерения маркера вакуоли – нитратов (Рис.18, А). Было показано, что тритикаин- α присутствует в различных фракциях в разных формах, причем переход от препрофермента до промежуточной (iTtc) и полностью зрелой (mTtc) формы происходит постепенно (Рис.18, Б). Стоит отметить, что на Рис.18, Б пробы выровнены по концентрации тритикаина- α , а не по объему получаемых фракций. Фракции P1, P8 и P100 были сконцентрированы в 20 раз. При этом в S100 наблюдается самая низкомолекулярная форма, соответствующая зрелой форме тритикаина- α (mTtc, Рис.18, Б). Для того, чтобы это подтвердить и определить места процессинга фермента во всех фракциях, был проведен масс-спектрометрический анализ (Рис.18, В). Из полученных результатов можно заключить, что тритикаин- α в основном накапливается в вакуоли, где происходит его полное созревание. Стоит

отметить, что вакуоль характеризуется пониженным значением рН среды, из чего можно заключить, что активация и созревание тритикаина- α *in vivo* происходит рН-зависимо.

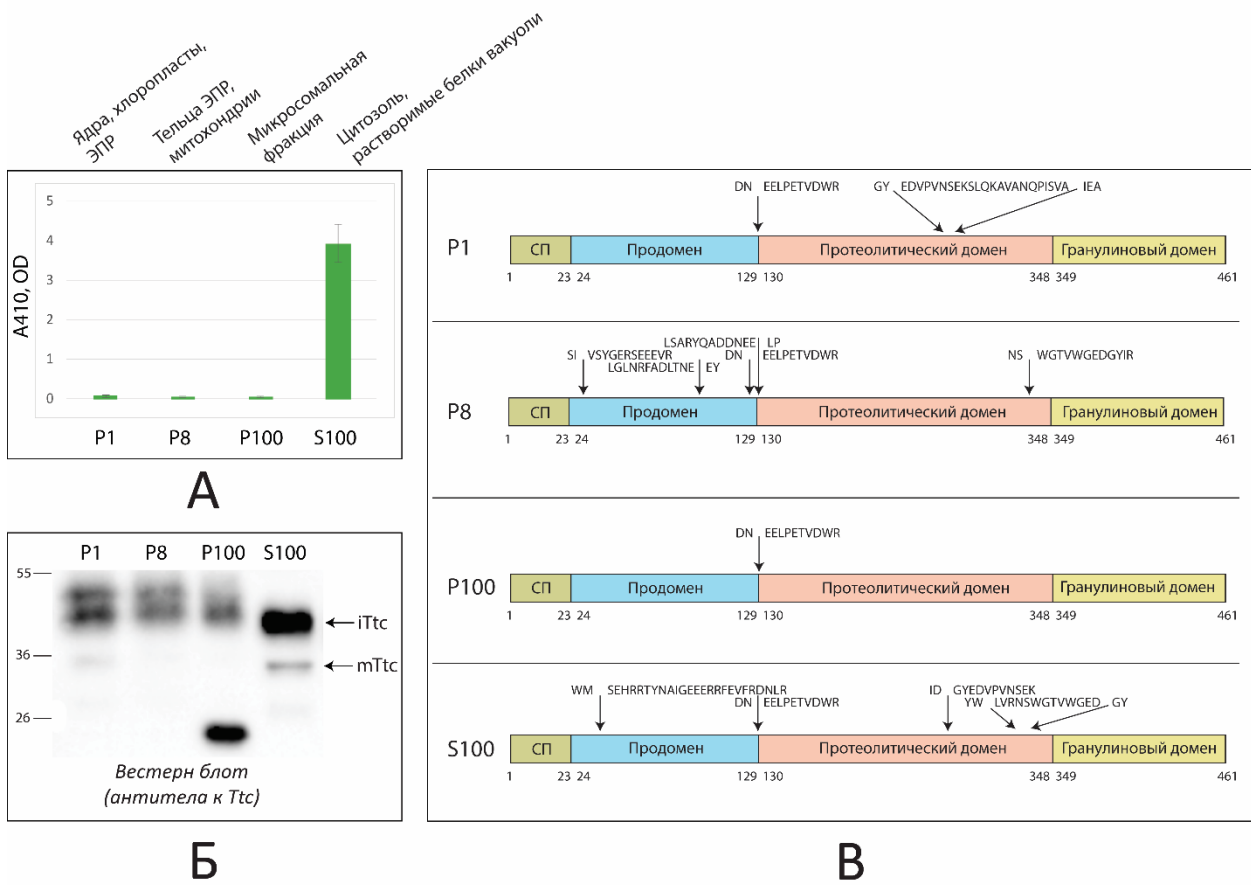


Рисунок 18. Паттерн активации эндогенного тритикаина- α *in vivo*. (А) Измерение маркера вакуоли – нитратов (3 биологические повторности), (Б) результат фракционирования листьев 7-дневных проростков пшеницы, (В) результат ЖХ-МС/МС анализа фракций. Ttc – тритикаин- α , СП – сигнальный пептид.

Обсуждение результатов

Пшеница *T. aestivum* является одной из основных зерновых культур, представляющих ценность как для промышленности, так и для биотехнологии. Одним из определяющих факторов при выращивании пшеницы является ее устойчивость к различным патогенам, которая определяется тем, что пшеница – гексаплоидный организм, чей геном составлен из трех независимых геномов (AABBDD) с общим размером более 15 Gbp. Геном А был унаследован от *Triticum urartu*, в то время как геном В – от неизвестного злака, близкого *Aegilops speltoides*, и D – от *Aegilops tauschii* [296]. Пшеница подвергается атакам различных патогенов: бактериальных (*Pseudomonas spp* [297], *Xanthomonas translucens* [298], и др.), грибковых (*Puccinia recondita*, *Fusarium spp*, *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici* [299] и др.), вирусных (barley stripe mosaic virus [300], wheat streak mosaic virus [301], yellow leaf mosaic virus [302], и т.д.); а также атакам травоядных насекомых (*Sitobion avenae* [303]) и даже нематод (*Heterodera avenae* [304]).

Широко известно, что иммунный ответ растений на заражение чаще всего сопряжен с ЗКС, которая, в свою очередь, ассоциирована с протеиназами и протеолитической активностью. Совокупность всех протеиназ организма в рамках данной работы было решено называть деградомом, в соответствии с [3]. Однако в случае пшеницы, ее деградом еще не был охарактеризован, несмотря на его важность для иммунитета и процессов, связанных с ЗКС. В данной работе впервые были идентифицированы протеиназы пшеницы *T. aestivum*. Всего было обнаружено 1544 протеиназы, закодированные во всем геноме *T. aestivum*. Это относительно большое количество кодируемых пептидаз, например, по сравнению с диплоидными двудольными растениями, такими, как табак *N. benthamiana*, содержащий предположительно 1245 протеиназы. У *A. thaliana* было обнаружено 723 протеиназы [305] и 901 фермент – у томатов [306]. У однодольного вида – риса – было определено 997 пептидаз [306]. Геном человека содержит 588, в том числе около 150 транскрипционно активных генов протеиназ в различных типах ткани [307].

Оказалось, что деградом пшеницы представлен большим количеством семейств протеиназ, которые были разделены на различные группы. Наиболее ярким примером является подсемейство С1А – семейство ППЦП. В этой группе был определен 181 фермент. В других видах растений было обнаружено меньшее число ППЦП: у *A. thaliana* – 31 протеиназа [164], 33 в рисе [308], 43 в каучуке [165] и 33 в папайе [309]. Подсемейства ППЦП, уже описанные ранее для *A. thaliana* [164] и риса [308], также были идентифицированы среди протеиназ

пшеницы. Кроме того, были обнаружены группы, для членов которых не нашлось соответствующих гомологов из других организмов. Восемь групп ППЦП были определены как уникальные для пшеницы. Классификация 82 субтилаз (семейство протеаз S8) привела к идентификации групп, гомологичных протеиназам из *A. thaliana*, и об их особенностях сообщалось ранее [310–314].

Помимо сложности генома пшеницы как такового, существуют различия между сортами внутри вида. Разница в уровнях экспрессии всех белков различных сортов была оценена ранее и составила 30% [295,315]. Именно эти отличия определяют устойчивость тех или иных сортов к патогенам и условиям роста и, следовательно, их пригодность для различных применений. Однако насколько варьируется состав экспрессируемых протеиназ внутри вида еще исследовано не было.

В настоящей работе впервые была оценена вариативность деградомы двух сортов пшеницы. Результаты анализа ЖХ-МС/МС двух сортов Хакасская и Дарья, которые отличаются в своей чувствительности к инфекциям, показал, что в разных сортах могут быть обнаружены разные наборы протеиназ. Протеомы сортов Хакасская и Дарья совпадают на 58,5% и 60% от всех протеиназ, соответственно, что существенно меньше, чем уже известная ранее оценка совпадения на 79,3% между полными протеомами сортов пшеницы [295,315].

Иммунный ответ пшеницы на различные патогены до сих пор охарактеризован относительно слабо. Стоит отметить, что патогены используют различные стратегии при заражении растительных клеток: некротрофные (*B. cinerea* [316]) патогены способствуют росту растений и приводят к некрозу инфицированной клетки, потребляя ее содержимое, в то время как биотрофные патогены (*P. syringae* [62]) питаются живыми клетками, подавляя рост растений и вызывая ЗКС инфицированных клеток. Наиболее хорошо изученная форма ЗКС – это апоптоз человека, который регулируется протеолитическими каскадами, включающими каспазы – Asp-специфичные цистеиновые протеиназы. Каспазы делятся на инициаторные (-2, -8, -9 и -10) и эффекторные (-3, -6 и -7) [2]. Каспазы синтезируются в виде неактивных препроферментов – прокаспаз. Инициаторные прокаспазы подвергаются автокаталитическому процессингу и активируют эффекторные прокаспазы путем ограниченного протеолиза. Далее эффекторные каспазы вносят разрывы в проапоптотические белки, в том числе, активируя другие протеиназы путем протеолитических каскадов, которые приводят к массовой деградации белков и гибели клеток.

Считается, что ЗКС растений, как и у животных, регулируется протеолитическими каскадами [2]. И хотя близкие гомологи каспаз в растениях отсутствуют, каспазо-подобная активность может быть обнаружена в растительных клетках после индукции ЗКС: DEVDазная [8,139], VEIDазная [122] и YVADазная [9]. Такие активности приписывают протеиназам из разных семейств, например, субтилазам (S8) [317], протеасомным субъединицам (T1) [22] и вакуолярным протеиназам (VPE, C13) [60]. Как и в случае каспаз, эти протеиназы синтезируются в виде зимогенов (препроферментов) и нуждаются в протеолитической активации. Они обычно содержат три домена: сигнальный пептид, автоингибирующий продомен и протеолитический домен. Продомен часто (автокаталитически) процессируется, что приводит к высвобождению активного, зрелого фермента.

Другой основной характеристикой ЗКС у растений является метакаспазная активность. Метакаспазы расщепляют субстраты после R и K, и было показано, что они участвуют в различных процессах, связанных с гибелью клеток [12–15,102]. То, как происходит активация и процессинг метакаспаз, было описано ранее [291]. Стоит отметить, что несмотря на то, что ряд субстратов, расщепляемых каспазо-подобными протеиназами и метакаспазами [293], известен, существует очень мало данных об их точной субстратной специфичности и участии в клеточных протеолитических каскадах.

В случае пшеницы, ее ответные реакции на патогены, например, *B. graminis* [318] или *F. graminearum* [4], а также на многочисленные абиотические стрессы [319], были охарактеризованы только в общих чертах без акцентирования внимания на протеиназах. Известно, что экспрессия гена метакаспазы 1 пшеницы (TaMCA1) увеличивается при заражении растений патогеном *Puccinia striiformis* [320]. Однако в целом до сих пор имеется очень мало данных об участии протеиназ в регуляции иммунитета пшеницы.

Поэтому следующим шагом работы стала оценка того, насколько изменился состав детектируемых протеиназ спустя 24 часа после заражения патогенами, использующими две различные стратегии заражения, биотрофную (*P. recondita*) и некротрофную (*S. nodorum*). Анализ зараженных растений методом ЖХ-МС/МС впервые показал, что оба типа инфекции индуцируют экспрессию протеиназ и что эти протеиназы различны. Ответ включал индукцию протеиназ из семейств M17 и M20 в случае биотрофной и C14, C26 – некротрофной инфекции. Следует отметить, что большинство протеиназ, индуцируемых как биотрофными, так и некротрофными патогенами, отличаются между собой, но относятся к одним и тем же семействам, таким как C1, C13, C48, C65, M24, M41, S10, S9, S8 и A1. C13 семейство включает протеиназы VPE, ассоциированные ранее с иммунным ответом на вирусы [60] и *P. syringae*

[9], которые являются биотрофными патогенами, как и *P. recondita*. С14 протеиназы включают в себя метакаспазы, которые, как уже было описано, вовлечены в иммунитет растений. Семейства M17, M20, M24, M41, C26 являются до сих пор не охарактеризованными группами протеиназ. Исходя из результатов настоящей работы, можно заключить, что члены этих семейств, вероятно, ассоциированы с иммунными ответами на различные виды биотического стресса в пшенице.

Стоит также отметить, что в настоящем исследовании был предложен новый подход для обнаружения событий протеолиза *in vivo*, который основан на поиске полу-специфических пептидов в данных ЖХ-МС/МС. ЖХ-МС/МС является мощным инструментом, который был успешно применен для изучения свойств различных сортов пшеницы [295,315], аспектов развития растений [321,322] и ответов пшеницы на биотические [4,318] и абиотические стрессы [319]. В настоящем исследовании метод ЖХ-МС/МС позволил впервые провести оценку общей протеолитической активности у здоровых и стрессированных растений. Результаты показывают, что инфекции, вызываемые патогенами *P. recondita* и *S. nodorum*, связаны с увеличением в полтора-два раза числа субстратов, потенциально расщепляемых эндогенными протеиназами в зараженных растительных клетках. Однако оценки, проведенные в этом исследовании, были качественными, а не количественными, и не отражают физического количества каждого субстрата, который был расщеплен. Тем не менее, можно сделать вывод, что количество расщепляемых белков значительно увеличилось в ответ на биотический стресс по сравнению со здоровыми растениями, что указывает на увеличение числа и/или активности протеиназ.

Идентификация субстратов для каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ показала, что, несмотря на значительное увеличение общего количества белков, расщепляемых после индукции биотического стресса, количество субстратов для каспазо-подобных протеиназ увеличилось незначительно. Количество субстратов для метакаспазо-подобных протеиназ увеличилось в полтора-два раза при инфекции *P. recondita* и не изменилось для *S. nodorum*. Этот результат подтверждает участие метакаспаз в ответе растений на патогены, описанные ранее [14,141,291], а также указывает на то, что каспазо-подобные протеиназы, возможно, не были активированы спустя 24 часа после заражения.

Интересно, что при заражении патогенами у разных сортов пшеницы были найдены одни и те же субстраты для каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ (Табл.5). Среди них были обнаружены рецептор-подобные протеинкиназы, пермеазы, белки устойчивости к болезням и др. Рецептор-подобные протеинкиназы могут быть непосредственно вовлечены в

установление типов иммунитета МТИ или ЕТИ. Связь между такой рецептор-подобной протеинкиназой и протеиназой, которая расщепляет ее, является совершенно не изученной областью исследований у растений. Один из немногих известных примеров – это расщепление эктодомена CERK1 из *A. thaliana* неизвестной протеиназой [88]. Обнаруженные субстраты могут стать потенциальными объектами для дальнейших исследований. Было обнаружено, что другой субстрат – FAR1-подобный белок – расщепляется как каспазо-подобными, так и метакаспазо-подобными протеиназами пшеницы. У *Arabidopsis* этот белок был связан с контролем света и развитием растений [323]. Однако роль этого белка в растительном иммунитете нуждается в изучении.

В настоящее время известен пул субстратов, расщепляемых AtMC9 из *A. thaliana*, [103]. Стоит отметить, что некоторые из обнаруженных в данной работе субстратов метакаспазо-подобных ферментов относятся к тем же классам, что и субстраты AtMC9, но при этом сами белки не гомологичны. Например, как в этом исследовании, так и среди субстратов AtMC9, были обнаружены хеликазы. Различия в конкретных субстратах метакаспаз *A. thaliana* и пшеницы могут быть связаны с эволюционными расстояниями между этими видами: пшеница является однодольным организмом, тогда как *A. thaliana* – двудольным. Помимо этого, в данной работе были обнаружены потенциальные субстраты, которые являются совершенно не охарактеризованными белками и нуждаются в детальном изучении.

Метод ЖХ-МС/МС позволил также оценить протеолитическую активацию протеиназ *in vivo*. Было показано, что протеиназы из семейств M17, M20, M41, S10, A1, вероятно, были активированы при биотрофной инфекции, в то время как ферменты из семейства S49 – в случае некротрофной инфекции. Множество протеиназ, которые были предположительно активированы при обеих инфекциях, принадлежат к семействам C1, C13, S8, M24 и A1. Семейство C1 включает уже описанные ранее ППЦП, C13 – протеиназы VPE, S8 – субтилазы. Все эти семейства протеиназ ранее были хорошо охарактеризованы в предыдущих исследованиях и связаны с иммунитетом растений [293]. Однако активность протеиназ из семейств M24 и A1 была ассоциирована с иммунными реакциями растений в этом исследовании впервые.

Результаты работы показывают, что активация протеиназ в зараженной пшенице происходит в сайтах, которые значительно отличаются от сайтов, обычно распознаваемых каспазами или метакаспазами. Только 3/16 и 1/9 каспазо-подобных сайтов расщепления (XXXD) были обнаружены в протеиназах растений, зараженных *P. recondita* и *S. nodorum*,

соответственно. Более того, сайты активации, распознаваемые метакаспазами (XXXXR, XXXXK), не были обнаружены ни в здоровых, ни в инфицированных образцах.

Результаты настоящей работы позволяют также предположить, что биотический стресс, по-видимому, активирует протеолитические каскады и общую деградацию белков. Анализ данных ЖХ-МС/МС выявил сайты протеолиза в последовательностях протеиназ, которые, вероятно, являются мишенями для автокаталитической активации или гидролиза другими протеиназами в протеолитических каскадах. При этом, по-видимому, каспазо- и метакаспазо-подобные протеиназы не играют в данных процессах какой-либо существенной роли. Это поразительный результат, который дает представление о недостаточно исследованной области протеолитических каскадов растений и пшеницы, в частности. Однако этот вывод следует подтвердить также с помощью других подходов.

Для того, чтобы более детально изучить механизмы процессинга протеиназ пшеницы *in vivo*, было решено изучить активацию протеиназы тритикаин- α , который как структурно, так и по типу активности не относится к каспазо- и метакаспазо-подобным ферментам. Тритикаин- α представляет из себя папаин-подобную цистеиновую протеиназу, которая была обнаружена в прорастающих семенах пшеницы [193]. Нами было показано, что активация и процессинг тритикаина- α – ступенчатый процесс, при котором сначала происходит отщепление продомена с образованием промежуточной формы, после чего гидролиз гранулинового домена и конечное созревание фермента. Был сделан вывод о том, что отщепление продомена может осуществляться не только самим тритикаином- α (автокаталитически), но и за счет межмолекулярных взаимодействий с другими ферментами в ходе протеолитических каскадов. Это утверждение подтверждается известными фактами о процессинге гомологичных тритикаину- α протеиназ. Например, было показано, что сверхэкспрессированный профермент RD21 из *A. thaliana* в клетках насекомых может быть активирован только при добавлении растительного экстракта, который либо содержит факторы, необходимые для аутокаталитического процессинга продомена, либо другие протеиназы, осуществляющие активацию фермента в результате протеолитического каскада [149]. При этом, в другой работе, как и в нашем случае, мутант RD21 по каталитическому цистеину при его сверхэкспрессии в листьях *N. benthamiana* подвергался отщеплению продомена и накапливался в промежуточной форме [324]. Учитывая эти данные, был сделан вывод об осуществляемой другими протеиназами, *in-trans* активации RD21. Полученные в данной работе результаты соотносятся с имеющимися в литературе данными и подтверждают вывод о том, что отщепление продомена тритикаина- α так же происходит за счет межмолекулярных взаимодействий. Однако, гидролиз

гранулинового домена тритикаина- α происходит только автокаталитически. Это подтверждается известными данными о процессинге RD21 из *A. thaliana* [324]. Отличительной особенностью тритикаина- α является, то, что согласно масс-спектрометрическому анализу отщепление продомена происходит в нескольких близко расположенных сайтах, что может указывать на то, что отщепление N-концевого продомена опосредовано его положением относительно активного центра протеиназы, а не ее специфичностью.

Также в данной работе было показано, что активация и процессинг тритикаина- α может быть замедлен при помощи цистатина томата SlCys8. Цистатины – известные ингибиторы цистеиновых протеиназ [325]. Ранее было показано, что SlCys8 подавляет активность девяти катепсин L-/H-подобных ППЦП во время его сверхэкспрессии в *N. benthamiana* [326]. Тритикаин- α также является катепсин L-подобной протеиназой. Результаты настоящей работы указывают на то, что тритикаин- α является мишенью для цистатинов растений. Это взаимодействие может иметь физиологический смысл при развитии растений пшеницы. Так, было продемонстрировано, что во время развития эмбриона *N. tabacum* происходит клеточная смерть суспензора, которая регулируется антагонистическим взаимодействием ППЦП NtCP14 и ее ингибитора-цистатина NtCYS [172]. В случае тритикаина- α , аналогичные взаимодействия нуждаются в дальнейшем изучении.

Фракционирование органелл клеток листьев пшеницы показало, что тритикаин- α в основном локализуется в вакуоли, где и происходит его полное созревание при пониженном pH. Это соответствует данными о локализации и процессинге папаин-подобных цистеиновых протеиназ [327]. Известно, что многие ППЦП подвергаются автокаталитическому процессингу во время ацидификации окружающей среды, например, в лизосоме, литических вакуолях или апопласте. Известно также, что вакуоли растений выделяются среди других органелл пониженным pH. При этом, было показано, что RD21 из *A. thaliana* локализован в вакуоли [17]. Можно заключить, что активация и созревание тритикаина- α происходит в несколько этапов и заканчивается в вакуолях.

Выводы

1. Геном *T. aestivum* содержит 1544 протеиназы, принадлежащих к пяти основным каталитическим типам. Геном пшеницы содержит уникальные группы протеиназ из семейства С1;
2. Деградомы сортов пшеницы Хакасская и Дарья различаются на ~40% согласно ЖХ-МС/МС;
3. Инфекция биотрофным (*P. recondita*) или некротрофным (*S. nodorum*) патогенами вызывает увеличение количества как самих протеолитических ферментов, так и общей протеолитической активности. Иммунный ответ в разных сортах пшеницы связан с протеиназами, относящимися к одним и тем же семействам;
4. Сайты автокаталитической или осуществляемой другими эндогенными протеиназами активации преимущественно не являются сайтами узнавания каспазо- или метакаспазо-подобных ферментов;
5. Активация тритикаина- α включает процессинг N-концевого продомена и может происходить автокаталитически или в результате межмолекулярного взаимодействия, в то время как созревание С-концевого гранулинового домена – только автокаталитически. Окончательное созревание фермента происходит в вакуоли при пониженном рН.

Список сокращений

ABPP -	основанный на активности профайлинг белков (activity-based protein profiling)
DAMP-patterns)	паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns)
ETI -	вызываемый эффекторами иммунитет (effector-triggered immunity)
HEPES-	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-этансульфоновая кислота (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
ISR -	индуцированная системная устойчивость (induced systemic resistance)
LRR -	богатые лейцином повторы (leucine-rich repeats)
MAMP или PAMP -	паттерны, ассоциированные с микробами (патогенами) (microbe(pathogen)-associated molecular patterns)
MAPK-	митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)
MTI -	вызываемый MAMP иммунитет (MAMP-triggered immunity)
NB-LRR- белки	содержащие нуклеотид-связывающий домен (nucleotide-binding domain, NB) LRR белки
NAM -	No Apical Meristem домен
NLR -	NOD-подобный рецептор (NOD-like receptor)
NLS -	сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal)
NOD -	нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен (nucleotide-binding oligomerization domain)
PA -	протеиназа-ассоциированный домен (protease-associated)
PARP -	поли(АДФ-рибоза)-полимераза (poly(ADP-ribose) polymerase)
PBS -	фосфатный буфер (phosphate-buffered saline)
PEPCK1 -	фосфоенолпируваткарбоксикиназа 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PIPES -	1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота (1,4-piperazinediethanesulfonic acid)
PR белки -	связанные с патогенезом белки (pathogenesis-related)
PRR -	рецепторы узнавания паттернов (pattern-recognition receptors)
<i>Pst</i> DC3000 -	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC30000
PTGS -	пост-транскрипционный сайленсинг генов (post-transcriptional gene silencing)
RISC -	РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex)
RITS -	РНК-индуцированный транскрипционный комплекс (RNA-induced transcriptional silencing complex)
RLK или RLP -	рецептор-подобная киназа или белок (receptor-like kinase (protein))

SAR	-	системная приобретенная устойчивость (systemic acquired resistance)
TBE	-	трис-боратный буфер
TGS	-	транскрипционный сайленсинг генов (transcriptional gene silencing)
TLR	-	Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor)
TMV	-	вирус табачной мозаики (tobacco mosaic virus)
tTG	-	тканевая трансглутаминаза (tissue transglutaminase)
АП	-	аскорбатпероксидаза
АФА	-	активные формы азота
АФК	-	активные формы кислорода
АЧТВ	-	активированное частичное тромбопластиновое время
БГД	-	безглютеновая диета
ГО	-	гиперчувствительный ответ
ДМСО	-	диметилсульфоксид
ДСН	-	додецилсульфат натрия
ДТТ	-	дитиотриэтол
ЖК	-	жасмоновая кислота
ЖХ-МС/МС	-	жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия
ЗКС	-	запрограммированная клеточная смерть
MeСК	-	метилсалициловая кислота
oЗКС	-	ЗКС, вызванная окружающей средой
ПААГ	-	полиакриламидный гель
ППЦП	-	папаин-подобная цистеиновая протеиназа
ПТВ	-	протромбиновое время
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
pЗКС	-	ЗКС развития
СК	-	салициловая кислота
ТВ	-	тромбиновое время
ЭПР	-	эндоплазматический ретикулум
ЭДТА	-	этилендиаминтетраацетат

Список литературы

1. Coll N.S., Epple P., Dangl J.L. Programmed cell death in the plant immune system // *Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18, № 8. P. 1247–1256.
2. Zamyatnin Jr. A.A. Plant Proteases Involved in Regulated Cell Death // *Biochem.* 2015. Vol. 80, № 13. P. 1701–1715.
3. Quesada V. et al. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. P. D239–D243.
4. Erayman M. et al. Transcriptome analysis of wheat inoculated with *Fusarium graminearum* // *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 6. P. 1–17.
5. Crawford E.D., Wells J.A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80, № 1. P. 1055–1087.
6. Chichkova N. V et al. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16, № 1. P. 157–171.
7. Trusova S. V. et al. Sometimes they come back: endocytosis provides localization dynamics of a subtilase in cells committed to cell death // *J. Exp. Bot.* 2019. Vol. 70, № 7. P. 2003–2007.
8. Hatsugai N. et al. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23, № 21. P. 2496–2506.
9. Zhang H., Zheng X., Zhang Z. The role of vacuolar processing enzymes in plant immunity // *Plant Signal Behav.* 2010. Vol. 5, № 12. P. 1565–1567.
10. Misas-Villamil J.C., van der Hoorn R.A., Doehlemann G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity // *New Phytol.* 2016. Vol. 212, № 4. P. 902–907.
11. Tsiatsiani L. et al. Metacaspases // *Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18. P. 1279–1288.
12. Sundstrom J.F. et al. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome // *Nat Cell Biol.* 2009. Vol. 11, № 11. P. 1347–1354.
13. Bozhkov P. V et al. Cysteine protease mCII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. Vol. 102, № 40. P. 14463–14468.
14. Coll N.S. et al. Arabidopsis Type I Metacaspases Control Cell Death // *Science (80-.).* 2010. Vol. 330, № 6009. P. 1393–1397.
15. Bollhoner B. et al. The function of two type II metacaspases in woody tissues of *Populus* trees // *New Phytol.* 2018. Vol. 217, № 4. P. 1551–1565.
16. Finn R.D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D279–D285.
17. Lampl N. et al. Set-point control of RD21 protease activity by AtSerp1 controls cell death in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2013. Vol. 74, № 3. P. 498–510.
18. Hoorn R. Van der. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 135, № July. P. 1170–1178.
19. Levitsky L.I. et al. IdentiPy: An Extensible Search Engine for Protein Identification in Shotgun Proteomics: research-article // *J. Proteome Res. American Chemical Society,* 2018. Vol. 17. P. 2249–2255.
20. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* 2018. Vol. 25, № 3. P. 486–541.
21. Swanson R.A., Castro-Obregón S. *Plant Programmed Cell Death, Methods and Protocols* // Springer Protocols. 2018. 634–636 p.

22. Berghe T. Vanden et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 2. P. 135–147.
23. Conrad M. et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Drug Discov.* InTech, 2016. Vol. 15, № 5. P. 348–366.
24. Kaminsky V., Zhivotovsky B. Proteases in autophagy // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 1824, № 1. P. 44–50.
25. Buvat R., Robert G. Vacuole Formation in the Actively Growing Root Meristem of Barley (*Hordeum sativum*) // *Am. J. Bot.* 2014. Vol. 66, № 10. P. 1219–1237.
26. Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. Vol. 27, № 1. P. 107–132.
27. Van Doorn W.G., Papini A. Ultrastructure of autophagy in plant cells: A review // *Autophagy.* 2013. Vol. 9, № 12. P. 1922–1936.
28. Nagl W. «Plastolysomes» — Plastids Involved in the Autolysis of the Embryo-Suspensor in *Phaseolus* // *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 1977. Vol. 85, № 1. P. 45–51.
29. Huysmans M. et al. Dying two deaths — programmed cell death regulation in development and disease // *Curr. Opin. Plant Biol.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 35. P. 37–44.
30. Bosch M., Franklin-Tong V.E. Self-incompatibility in *Papaver* : signalling to trigger PCD in incompatible pollen // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59, № 3. P. 481–490.
31. Gunawardena A.H.L.A.N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants: Fig. 1. // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59, № 3. P. 445–451.
32. Gómez Ros L. V. et al. Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system // *Protoplasma.* 2006. Vol. 227, № 2–4. P. 175–183.
33. Van Doorn W.G. et al. Morphological classification of plant cell deaths // *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 18, № 8. P. 1241–1246.
34. Escamez S., Tuominen H. Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal // *J. Exp. Bot.* 2014. Vol. 65, № 5. P. 1313–1321.
35. Cubría-Radio M., Nowack M.K. Transcriptional networks orchestrating programmed cell death during plant development. 2019. P. 161–184.
36. Moeder W., Yoshioka K. Lesion mimic mutants // *Plant Signal. Behav.* 2008. Vol. 3, № 10. P. 764–767.
37. Liu Y. et al. Autophagy Regulates Programmed Cell Death during the Plant Innate Immune Response // *Cell.* 2005. Vol. 121, № 4. P. 567–577.
38. Locato V. et al. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in PCD Signaling. 2016. P. 165–192.
39. Olvera-Carrillo Y. et al. A conserved core of PCD indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants // *Plant Physiol.* 2015. P. pp.00769.2015.
40. Vacca R.A. et al. Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright-Yellow 2 cells // *FEBS Lett.* 2007. Vol. 581, № 5. P. 917–922.
41. Anderson J.P. et al. Plants versus pathogens: an evolutionary arms race // *Funct Plant Biol.* 2010. Vol. 37, № 6. P. 499–512.

42. Santori F.R. The immune system as a self-centered network of lymphocytes // *Immunol Lett.* 2015. Vol. 166, № 2. P. 109–116.
43. Farber D.L. et al. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future // *Nat Rev Immunol.* 2016. Vol. 16, № 2. P. 124–128.
44. Ronald P.C., Beutler B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures // *Science* (80-.). 2010. Vol. 330, № 6007. P. 1061–1064.
45. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // *Annu Rev Plant Biol.* 2009. Vol. 60. P. 379–406.
46. Danna C.H. et al. The Arabidopsis flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol. 108, № 22. P. 9286–9291.
47. Smith K.D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility // *Nat Immunol.* 2003. Vol. 4, № 12. P. 1247–1253.
48. Spoel S.H., Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells // *Nat Rev Immunol.* 2012. Vol. 12, № 2. P. 89–100.
49. Nedukha O.M. Callose: Localization, functions, and synthesis in plant cells // *Cytol. Genet.* 2015. Vol. 2015 v.49, № 1. P. 49–57.
50. Luna E. et al. Callose deposition: a multifaceted plant defense response // *Mol Plant Microbe Interact.* 2011. Vol. 24, № 2. P. 183–193.
51. Muthamilarasan M., Prasad M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism // *J Biosci.* 2013. Vol. 38, № 2. P. 433–449.
52. Liu J. et al. A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor // *Cell Host Microbe.* 2011. Vol. 9, № 2. P. 137–146.
53. Dangl J.L., Jones J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection // *Nature.* 2001. Vol. 411, № 6839. P. 826–833.
54. Goff S.A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) // *Science* (80-.). 2002. Vol. 296, № 5565. P. 92–100.
55. Tenthorey J.L. et al. The structural basis of flagellin detection by NAIP5: A strategy to limit pathogen immune evasion // *Science* (80-.). 2017. Vol. 358, № 6365. P. 888–893.
56. Shirasu K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors // *Annu Rev Plant Biol.* 2009. Vol. 60. P. 139–164.
57. Misas-Villamil J.C. et al. Activity profiling of vacuolar processing enzymes reveals a role for VPE during oomycete infection // *Plant J.* 2013. Vol. 73, № 4. P. 689–700.
58. Fomicheva A.S. et al. Programmed cell death in plants // *Biochem.* 2012. Vol. 77, № 13. P. 1452–1464.
59. McLellan H. et al. Functional redundancy in the Arabidopsis Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence // *New Phytol.* 2009. Vol. 183, № 2. P. 408–418.
60. Hatsugai N. et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death // *Science* (80-.). 2004. Vol. 305, № 5685. P. 855–858.

61. Ramirez V. et al. An extracellular subtilase switch for immune priming in Arabidopsis // *PLoS Pathog.* 2013. Vol. 9, № 6. P. e1003445.
62. Choudhary D.K., Prakash A., Johri B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action // *Indian J Microbiol.* 2007. Vol. 47, № 4. P. 289–297.
63. Ross A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants // *Virology.* 1961. Vol. 14. P. 340–358.
64. Chanda B. et al. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants // *Nat Genet.* 2011. Vol. 43, № 5. P. 421–427.
65. Tada Y. et al. Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins // *Science (80-)*. 2008. Vol. 321, № 5891. P. 952–956.
66. Beckers G.J. et al. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana // *Plant Cell.* 2009. Vol. 21, № 3. P. 944–953.
67. Baumgarten A. et al. Genome-level evolution of resistance genes in Arabidopsis thaliana // *Genetics.* 2003. Vol. 165, № 1. P. 309–319.
68. Heil M., Bostock R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences // *Ann Bot.* 2002. Vol. 89, № 5. P. 503–512.
69. Zhang T. et al. Host-Induced Gene Silencing of the Target Gene in Fungal Cells Confers Effective Resistance to the Cotton Wilt Disease Pathogen *Verticillium dahliae* // *Mol Plant.* 2016. Vol. 9, № 6. P. 939–942.
70. Sharma N. et al. Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs) // *Mol Biotechnol.* 2013. Vol. 55, № 1. P. 63–77.
71. Martinez de Alba A.E., Elvira-Matelot E., Vaucheret H. Gene silencing in plants: a diversity of pathways // *Biochim Biophys Acta.* 2013. Vol. 1829, № 12. P. 1300–1308.
72. Lister R. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis // *Cell.* 2008. Vol. 133, № 3. P. 523–536.
73. Yadav R.K., Chattopadhyay D. Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a geminivirus // *Mol Plant Microbe Interact.* 2011. Vol. 24, № 10. P. 1189–1197.
74. Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Kragler F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses // *Curr Opin Plant Biol.* 2004. Vol. 7, № 6. P. 641–650.
75. van der Hoorn R.A.L. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. Vol. 59, № 1. P. 191–223.
76. Minina E.A., Moschou P.N., Bozhkov P. V. Limited and digestive proteolysis: crosstalk between evolutionary conserved pathways // *New Phytol.* 2017. Vol. 215, № 3. P. 958–964.
77. Li L. et al. The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity // *Cell Host Microbe.* 2014. Vol. 15, № 3. P. 329–338.
78. Rawlings N.D. et al. MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № D1. P. D503–D509.
79. Antao C.M., Malcata F.X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features // *Plant Physiol Biochem.* 2005. Vol. 43, № 7. P. 637–650.
80. Shahri W., Tahir I. Flower senescence: some molecular aspects // *Planta.* 2014. Vol. 239, № 2. P. 277–297.

81. Zhao P. et al. A Bipartite Molecular Module Controls Cell Death Activation in the Basal Cell Lineage of Plant Embryos // *PLoS Biol.* / ed. Grossniklaus U. 2013. Vol. 11, № 9. P. e1001655.
82. Buckley J.J., Jessen J.R. Matrix metalloproteinase function in non-mammalian model organisms // *Front Biosci (Schol Ed)*. 2015. Vol. 7. P. 168–183.
83. Chen H.J. et al. Sweet potato SPAP1 is a typical aspartic protease and participates in ethephon-mediated leaf senescence // *J Plant Physiol*. 2015. Vol. 180. P. 1–17.
84. Niu N. et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice // *Nat Commun*. 2013. Vol. 4. P. 1445.
85. Guo R. et al. Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape // *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 554.
86. Balakireva A. V et al. Trends and Prospects of Plant Proteases in Therapeutics // *Curr. Med. Chem*. 2019. Vol. 26, № 3. P. 465–486.
87. Antolin-Llovera M. et al. Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions // *Annu Rev Phytopathol*. 2012. Vol. 50. P. 451–473.
88. Petutschnig E.K. et al. A novel Arabidopsis CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing // *New Phytol*. 2014. Vol. 204, № 4. P. 955–967.
89. Xia Y. et al. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling // *EMBO J*. 2004. Vol. 23, № 4. P. 980–988.
90. Santamaria M.E. et al. Inhibitory properties of cysteine protease pro-peptides from barley confer resistance to spider mite feeding // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0128323.
91. Pearce G. et al. A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, № 33. P. 14921–14925.
92. Stegmann M. et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling // *Science (80-.)*. 2017. Vol. 355, № 6322. P. 287–289.
93. Tornero P. et al. Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis // *Plant J*. 1996. Vol. 10, № 2. P. 315–330.
94. Ewan R. et al. Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity // *New Phytol*. 2011. Vol. 191, № 1. P. 92–106.
95. Zhang J. et al. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants // *Cell Host Microbe*. 2007. Vol. 1, № 3. P. 175–185.
96. Guo R. et al. Ectopic expression of a grape aspartic protease gene, AP13, in *Arabidopsis thaliana* improves resistance to powdery mildew but increases susceptibility to *Botrytis cinerea* // *Plant Sci*. 2016. Vol. 248. P. 17–27.
97. Wang W.H. et al. Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis* // *J Exp Bot*. 2012. Vol. 63, № 1. P. 177–190.
98. Zhang H. et al. The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from *Nicotiana benthamiana* in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure // *J Exp Bot*. 2010. Vol. 61, № 13. P. 3799–3812.
99. Melotto M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion // *Cell*.

2006. Vol. 126, № 5. P. 969–980.
100. Cook D.E., Mesarich C.H., Thomma B.P. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion // *Annu Rev Phytopathol.* 2015. Vol. 53. P. 541–563.
 101. Iida Y. et al. Novel Mutations Detected in Avirulence Genes Overcoming Tomato Cf Resistance Genes in Isolates of a Japanese Population of *Cladosporium fulvum* // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 4. P. e0123271.
 102. Bollhoner B. et al. Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements // *New Phytol.* 2013. Vol. 200, № 2. P. 498–510.
 103. Tsiatsiani L. et al. The Arabidopsis METACASPASE9 Degradome // *Plant Cell.* 2013. Vol. 25, № 8. P. 2831–2847.
 104. Wrzaczek M. et al. GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in Arabidopsis // *EMBO J.* 2015. Vol. 34, № 1. P. 55–66.
 105. Watanabe N., Lam E. Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses // *Plant J.* 2011. Vol. 66, № 6. P. 969–982.
 106. Shindo T. et al. A role in immunity for Arabidopsis cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14 // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 1. P. e29317.
 107. Boex-Fontvieille E. et al. A Kunitz-type protease inhibitor regulates programmed cell death during flower development in Arabidopsis thaliana // *J Exp Bot.* 2015. Vol. 66, № 20. P. 6119–6135.
 108. Bernoux M. et al. RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector // *Plant Cell.* 2008. Vol. 20, № 8. P. 2252–2264.
 109. Shimada T. et al. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in Arabidopsis thaliana // *J Biol Chem.* 2003. Vol. 278, № 34. P. 32292–32299.
 110. Howing T. et al. Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense // *Front Plant Sci.* 2014. Vol. 5. P. 58.
 111. Serrano I. et al. A non canonical subtilase attenuates the transcriptional activation of defence responses in Arabidopsis thaliana // *Elife.* 2016. Vol. 5. P. e19755.
 112. Minina E.A. et al. Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants // *J Cell Biol.* 2013. Vol. 203, № 6. P. 917–927.
 113. Tian M., Benedetti B., Kamoun S. A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 138, № 3. P. 1785–1793.
 114. Zimmermann D. et al. Cell Death Control by Matrix Metalloproteinases // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171, № 2. P. 1456–1469.
 115. Ilyas M. et al. Functional Divergence of Two Secreted Immune Proteases of Tomato // *Curr Biol.* 2015. Vol. 25, № 17. P. 2300–2306.
 116. Lozano-Torres J.L. et al. Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. Vol. 109, № 25. P. 10119–10124.
 117. Tian M. et al. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease // *Plant Physiol.* 2007. Vol. 143, № 1. P. 364–377.

118. Bar-Ziv A. et al. The Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) V2 protein inhibits enzymatic activity of the host papain-like cysteine protease CYP1 // *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. Vol. 460, № 3. P. 525–529.
119. Bozkurt T.O. et al. Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol. 108, № 51. P. 20832–20837.
120. Cedzich A. et al. The protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SlSBT3) // *J Biol Chem.* 2009. Vol. 284, № 21. P. 14068–14078.
121. Coffeen W.C., Wolpert T.J. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa* // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16, № 4. P. 857–873.
122. Chichkova N. V et al. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity // *EMBO J.* 2010. Vol. 29, № 6. P. 1149–1161.
123. Xu Q.F. et al. Identification of genes required for Cf-dependent hypersensitive cell death by combined proteomic and RNA interfering analyses // *J Exp Bot.* 2012. Vol. 63, № 7. P. 2421–2435.
124. Cheng Y.T. et al. Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2009. Vol. 21, № 8. P. 2503–2516.
125. Wilton M. et al. The type III effector HopF2Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. Vol. 107, № 5. P. 2349–2354.
126. Fu Z.Q. et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants // *Nature.* 2012. Vol. 486, № 7402. P. 228–232.
127. Hayward A.P., Tsao J., Dinesh-Kumar S.P. Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation // *Semin Cell Dev Biol.* 2009. Vol. 20, № 9. P. 1041–1047.
128. Fu Z.Q. et al. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity // *Nature.* 2007. Vol. 447, № 7142. P. 284–288.
129. Glazebrook J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43, № 1. P. 205–227.
130. Klemenčič M., Funk C. Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain // *New Phytol.* 2018. Vol. 218, № 3. P. 1179–1191.
131. Vercammen D. et al. Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9 // *J Mol Biol.* 2006. Vol. 364, № 4. P. 625–636.
132. Jorda L., Vera P. Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression // *Plant Physiol.* 2000. Vol. 124, № 3. P. 1049–1058.
133. Reavy B. et al. Caspase-resistant VirD2 protein provides enhanced gene delivery and expression in plants // *Plant Cell Rep.* 2007. Vol. 26, № 8. P. 1215–1219.
134. Fernandez M.B., Daleo G.R., Guevara M.G. DEVDase activity is induced in potato leaves during *Phytophthora infestans* infection // *Plant Physiol Biochem.* 2012. Vol. 61. P. 197–203.
135. Havé M. et al. Increases in activity of proteasome and papain-like cysteine protease in *Arabidopsis* autophagy mutants: back-up compensatory effect or cell-death promoting effect?

- // J. Exp. Bot. / ed. Bozhkov P. 2018. Vol. 69, № 6. P. 1369–1385.
136. Kaschani F. et al. An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 154, № 4. P. 1794–1804.
 137. Mueller A.N. et al. Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2 // *PLoS Pathog.* 2013. Vol. 9, № 2. P. e1003177.
 138. Li D. et al. Tomato SI3-MMP, a member of the Matrix metalloproteinase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 // *BMC Plant Biol.* 2015. Vol. 15. P. 143.
 139. Meyer M. et al. The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato // *J Exp Bot.* 2016. Vol. 67, № 14. P. 4325–4338.
 140. Duan X. et al. Characterization of a Novel Cotton Subtilase Gene GbSBT1 in Response to Extracellular Stimulations and Its Role in *Verticillium* Resistance // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 4. P. e0153988.
 141. Bailey M. et al. Stability of small ubiquitin-like modifier (SUMO) proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 modulates salicylic acid signalling and SUMO1/2 conjugation in *Arabidopsis thaliana* // *J Exp Bot.* 2016. Vol. 67, № 1. P. 353–363.
 142. Breitenbach H.H. et al. Contrasting Roles of the Apoplastic Aspartyl Protease APOPLASTIC, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1-DEPENDENT1 and LEGUME LECTIN-LIKE PROTEIN1 in *Arabidopsis* Systemic Acquired Resistance // *Plant Physiol.* 2014. Vol. 165, № 2. P. 791–809.
 143. Moreau M. et al. The *Arabidopsis* oligopeptidases TOP1 and TOP2 are salicylic acid targets that modulate SA-mediated signaling and the immune response // *Plant J.* 2013. Vol. 76, № 4. P. 603–614.
 144. Pechan T. et al. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. Vol. 99, № 20. P. 13319–13323.
 145. Repnik U., Cesen M.H., Turk B. The endolysosomal system in cell death and survival // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. Vol. 5, № 1. P. a008755.
 146. Stoka V., Turk V., Turk B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis // *Biol Chem.* 2007. Vol. 388, № 6. P. 555–560.
 147. Turk B. et al. Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases // *Biol Chem.* 2002. Vol. 383, № 7–8. P. 1035–1044.
 148. Turk V. et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers // *Biochim Biophys Acta.* 2012. Vol. 1824, № 1. P. 68–88.
 149. Yamada K. et al. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves // *Plant Physiol.* 2001. Vol. 127, № 4. P. 1626–1634.
 150. Rustgi S. et al. Serpin1 and WSCP differentially regulate the activity of the cysteine protease RD21 during plant development in *Arabidopsis thaliana* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017. Vol. 114, № 9. P. 2212–2217.
 151. Helm M. et al. KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds // *Am J Bot.* 2008. Vol. 95, № 9. P. 1049–1062.

152. Eulgem T. et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors // *Trends Plant Sci.* 2000. Vol. 5, № 5. P. 199–206.
153. Nomura H. et al. Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis* // *Nat Commun.* 2012. Vol. 3. P. 926.
154. Eichmann R., Schafer P. The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death // *Front Plant Sci.* 2012. Vol. 3. P. 200.
155. Dempsey D.A. et al. Salicylic Acid biosynthesis and metabolism // *Arab. B.* 2011. Vol. 9. P. e0156.
156. Kiefer I.W., Slusarenko A.J. The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 132, № 2. P. 840–847.
157. Lebel E. et al. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis* // *Plant J.* 1998. Vol. 16, № 2. P. 223–233.
158. Bosch M. et al. Jasmonic acid and its precursor 12-oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato // *Plant Physiol.* 2014. Vol. 166, № 1. P. 396–410.
159. Huang P.Y., Catinot J., Zimmerli L. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity // *J Exp Bot.* 2016. Vol. 67, № 5. P. 1231–1241.
160. Hind S.R. et al. The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens // *Plant J.* 2011. Vol. 65, № 3. P. 480–491.
161. Christians M.J., Larsen P.B. Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in *Arabidopsis* seedlings // *J Exp Bot.* 2007. Vol. 58, № 8. P. 2237–2248.
162. Verma S., Dixit R., Pandey K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets // *Front. Pharmacol.* 2016. Vol. 7. P. 1–12.
163. Rawlings N.D., Barrett A.J., Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D343–50.
164. Richau K.H. et al. Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics // *Plant Physiol.* 2012. Vol. 158, № 4. P. 1583–1599.
165. Zou Z., Xie G., Yang L. Papain-like cysteine protease encoding genes in rubber (*Hevea brasiliensis*): comparative genomics, phylogenetic, and transcriptional profiling analysis // *Planta.* Springer Berlin Heidelberg, 2017. Vol. 246, № 5. P. 999–1018.
166. Turk D. et al. Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 384, № 3. P. 211–214.
167. Martinez M., Diaz I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship // *BMC Evol. Biol.* 2008. Vol. 8, № 1. P. 198.
168. Turk V. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 17. P. 4629–4633.
169. Beveridge A.J. A theoretical study of the active sites of papain and S195C rat trypsin: Implications for the low reactivity of mutant serine proteinases // *Protein Sci.* 1996. Vol. 5, №

7. P. 1355–1365.
170. Savvateeva L. V et al. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-alpha: feasibility for enzymatic therapy assays // *Int J Biochem Cell Biol.* 2015. Vol. 62. P. 115–124.
 171. Niemer M. et al. *Nicotiana benthamiana* cathepsin B displays distinct enzymatic features which differ from its human relative and aleurain-like protease // *Biochimie.* 2016. Vol. 122. P. 119–125.
 172. Paireder M. et al. The death enzyme CP14 is a unique papain-like cysteine proteinase with a pronounced S2 subsite selectivity // *Arch Biochem Biophys.* 2016. Vol. 603. P. 110–117.
 173. Than M.E. et al. The 2.0Å Crystal Structure and Substrate Specificity of the KDEL-tailed Cysteine Endopeptidase Functioning in Programmed Cell Death of *Ricinus communis* Endosperm // *J. Mol. Biol.* 2004. Vol. 336, № 5. P. 1103–1116.
 174. Bethune M.T. et al. Heterologous Expression, Purification, Refolding, and Structural-Functional Characterization of EP-B2, a Self-Activating Barley Cysteine Endoprotease // *Chem. Biol.* 2006. Vol. 13, № 6. P. 637–647.
 175. Ghosh R. et al. Structural insights into the substrate specificity and activity of ervatamins, the papain-like cysteine proteases from a tropical plant, *Ervatamia coronaria* // *FEBS J.* 2008. Vol. 275, № 3. P. 421–434.
 176. Armstrong P.B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction // *Immunobiology.* 2006. Vol. 211, № 4. P. 263–281.
 177. Zauner F.B. et al. Crystal Structure of Plant Legumain Reveals a Unique Two-Chain State with pH-Dependent Activity Regulation // *Plant Cell.* 2018. Vol. 30, № 3. P. 686–699.
 178. Mellgren R.L. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? // *FASEB J.* 1987. Vol. 1, № 2. P. 110–115.
 179. Higuchi M. et al. Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases // *Oncogene.* 1998. Vol. 17, № 21. P. 2753–2760.
 180. Biswas M.S., Mano J. Reactive carbonyl species activate caspase-3-like protease to initiate programmed cell death in plants // *Plant Cell Physiol.* 2016. Vol. 57, № 7. P. 1432–1442.
 181. Koh E. et al. Singlet Oxygen-Induced Membrane Disruption and Serpin-Protease Balance in Vacuolar-Driven Cell Death // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171, № 3. P. 1616–1625.
 182. Kidd V.J. PROTEOLYTIC ACTIVITIES THAT MEDIATE APOPTOSIS // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. Vol. 60, № 1. P. 533–573.
 183. Rocha G.L. et al. Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants // *Enzyme Inhibitors and Activators. InTech,* 2017. Vol. 12, № 1. P. 11–17.
 184. Sueldo D.J., van der Hoorn R.A.L., Hoorn R.A.L. Van Der. Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? // *FEBS J.* 2017. Vol. 284, № 10. P. 1577–1585.
 185. Paulus J.K., Van der Hoorn R.A.L. Do proteolytic cascades exist in plants? // *J. Exp. Bot.* 2019. Vol. 70, № 7. P. 1997–2002.
 186. Ausubel F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6, № 10. P. 973–979.
 187. Dong C., Davis R.J., Flavell R. a. MAP kinases in the immune response. // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20, № 1. P. 55–72.
 188. Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. MAPK cascade signalling networks in plant defence // *Curr.*

- Opin. Plant Biol. 2009. Vol. 12, № 4. P. 421–426.
189. Fischer U., Jänicke R.U., Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: A comprehensive update of caspase substrates // *Cell Death Differ.* 2003. Vol. 10, № 1. P. 76–100.
 190. Crawford E.D. et al. Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 19, № 12. P. 2040–2048.
 191. Strobel I., Osiewacz H.D. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is a Substrate Recognized by Two Metacaspases of *Podospira anserina* // *Eukaryot. Cell.* 2013. Vol. 12, № 6. P. 900–912.
 192. Balakireva A. V., Zamyatnin A.A. Cutting Out the Gaps Between Proteases and Programmed Cell Death // *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 704.
 193. Kiyosaki T. et al. Wheat cysteine proteases triticain alpha, beta and gamma exhibit mutually distinct responses to gibberellin in germinating seeds // *J Plant Physiol.* 2009. Vol. 166, № 1. P. 101–106.
 194. Bateman A., Bennett H.P.J. Granulins : the structure and function of an emerging family of growth factors. 1998. № Berks 1995. P. 145–151.
 195. Balakireva A., Zamyatnin A. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities // *Nutrients.* 2016. Vol. 8, № 10. P. 644.
 196. Gorokhovets N. V et al. Rational Design of Recombinant Papain-Like Cysteine Protease: Optimal Domain Structure and Expression Conditions for Wheat-Derived Enzyme Triticain- α // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 7. P. 1395.
 197. Feijoo-Siota L., Villa T.G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications // *Food Bioprocess Tech.* 2010. Vol. 4, № 6. P. 1066–1088.
 198. Salas C.E. et al. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity // *Phytochemistry.* 2008. Vol. 69, № 12. P. 2263–2269.
 199. Otsuki N. et al. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects // *J Ethnopharmacol.* 2010. Vol. 127, № 3. P. 760–767.
 200. Geisen U. et al. Molecular Mechanisms by Which a *Fucus vesiculosus* Extract Mediates Cell Cycle Inhibition and Cell Death in Pancreatic Cancer Cells // *Mar Drugs.* 2015. Vol. 13, № 7. P. 4470–4491.
 201. Grabowska E. et al. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells // *Int J Oncol.* 1997. Vol. 11, № 2. P. 243–248.
 202. Muller A. et al. Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines // *Int J Oncol.* 2016. Vol. 48, № 5. P. 2025–2034.
 203. Romano B. et al. The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (*Ananas comosus* L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects // *Mol Nutr Food Res.* 2014. Vol. 58, № 3. P. 457–465.
 204. Baines B.S., Brocklehurst K. A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of *Carica papaya* and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods // *Biochem J.* 1979. Vol. 177, № 2. P. 541–548.
 205. Volovitz I. et al. A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells // *BMC Neurosci.* 2016. Vol. 17, № 1. P. 30.
 206. Bellelli A. et al. Inhibition of tumor growth, invasion and metastasis in papain-immunized mice // *Invasion Metastasis.* 1990. Vol. 10, № 3. P. 142–169.

207. Wald M. et al. Polyenzyme preparation Wobe-Mugos inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice // *Life Sci.* 1998. Vol. 62, № 3. P. PL43-8.
208. Trejo-Becerril C. et al. Antitumor Effects of Systemic DNase I and Proteases in an In Vivo Model // *Integr. Cancer Ther.* 2016. Vol. 15, № 4. P. NP35–NP43.
209. Gerard G. [Anticancer treatment and bromelains] // *Agressologie.* 1972. Vol. 13, № 4. P. 261–274.
210. Beuth J. Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? // *Integr Cancer Ther.* 2008. Vol. 7, № 4. P. 311–316.
211. Lah T.T., Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis // *Biol Chem.* 1998. Vol. 379, № 2. P. 125–130.
212. Alexander B., Pechet L., Kliman A. Proteolysis, fibrinolysis, and coagulation. Significance in thrombolytic therapy // *Circulation.* 1962. Vol. 26. P. 596–611.
213. Weisel J.W., Litvinov R.I. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate // *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008. Vol. 6, № 3. P. 161–180.
214. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin // *Adv Protein Chem.* 2005. Vol. 70. P. 247–299.
215. Gorkun O. V et al. Role of the alpha C domains of fibrin in clot formation // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33, № 22. P. 6986–6997.
216. Shivaprasad H. V et al. Procoagulant properties of plant latex proteases // *Toxins and Hemostasis.* Springer, 2010. P. 591–603.
217. Shivaprasad H. V et al. Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities // *J Thromb Thrombolysis.* 2009. Vol. 28, № 3. P. 304–308.
218. Rajesh R. et al. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity // *Toxicon.* 2005. Vol. 46, № 1. P. 84–92.
219. de Menezes Y.A. et al. Protein-rich fraction of *Cnidioscolus urens* (L.) Arthur leaves: enzymatic characterization and procoagulant and fibrinogenolytic activities // *Molecules.* 2014. Vol. 19, № 3. P. 3552–3569.
220. Rajesh R. et al. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties // *Planta Med.* 2007. Vol. 73, № 10. P. 1061–1067.
221. Richter G. et al. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica* // *Br J Haematol.* 2002. Vol. 119. P. 1042–1051.
222. Eagle H., Harris T.N. Studies in Blood Coagulation : V. The Coagulation of Blood by Proteolytic Enzymes (Trypsin, Papain) // *J Gen Physiol.* 1937. Vol. 20, № 4. P. 543–560.
223. Kim D.W. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus* // *Int J Biol Macromol.* 2015. Vol. 72. P. 1159–1167.
224. Choi J.H. et al. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: purification and partial characterization // *J Biosci Bioeng.* 2014. Vol. 118, № 4. P. 372–377.
225. Maurer H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use // *Cell Mol Life Sci.* 2001. Vol. 58, № 9. P. 1234–1245.
226. Choi J.H. et al. Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-

- functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile* // *Biochimie*. 2013. Vol. 95, № 6. P. 1266–1277.
227. Matsubara K. et al. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum* // *Phytochemistry*. 1999. Vol. 52, № 6. P. 993–999.
 228. Kim D.-W. et al. Direct acting anti-thrombotic serine protease from brown seaweed *Costaria costata* // *Process Biochem*. 2013. Vol. 48, № 2. P. 340–350.
 229. Taussig S.J. The mechanism of the physiological action of bromelain // *Med Hypotheses*. 1980. Vol. 6, № 1. P. 99–104.
 230. Errasti M.E. et al. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016. Vol. 27, № 4. P. 441–449.
 231. Matsubara K. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codiumdivaricatum* // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000. Vol. 125, № 1. P. 137–143.
 232. Siritapetawee J., Thammasirirak S. Purification and characterization of a heteromultimeric glycoprotein from *Artocarpus heterophyllus* latex with an inhibitory effect on human blood coagulation // *Acta Biochim Pol*. 2011. Vol. 58, № 4. P. 521–528.
 233. Stroncek J.D., Bell N., Reichert W.M. Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures // *J Biomed Mater Res A*. 2009. Vol. 90, № 4. P. 1230–1238.
 234. Singh M.K. et al. Hemostatic potential of latex proteases from *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex. Roem. and Schult. and *Artocarpus altilis* (Parkinson ex. FA Zorn) Forsberg // *J Thromb Thrombolysis*. 2015. Vol. 39, № 1. P. 43–49.
 235. Yariswamy M. et al. Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br. (Apocyanaceae) latex augments healing of experimentally induced excision wound in mice // *J Ethnopharmacol*. Elsevier, 2013. Vol. 149, № 1. P. 377–383.
 236. Rajesh R. et al. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot // *Biochimie*. 2006. Vol. 88, № 10. P. 1313–1322.
 237. Rose B. et al. Dose-dependent induction of IL-6 by plant-derived proteases in vitro // *Clin Exp Immunol*. 2006. Vol. 143, № 1. P. 85–92.
 238. Silke Müller Manfred Schmolz, Bernd Drewelow, Klaus Eschmann and Peter Meiser R.M. Placebo-controlled Randomized Clinical Trial on the Immunomodulating Activities of Low- and High-Dose Bromelain after Oral Administration – New Evidence on the Antiinflammatory Mode of Action of Bromelain // *Phyther. Res*. 2013. Vol. 27. P. 199–204.
 239. Altemeier W.A. et al. Enzymatic debridement of burns // *Ann Surg*. 1951. Vol. 134, № 4. P. 581–583.
 240. Webster M.E. et al. Enzymatic debridement of third-degree burns on guinea pigs by *Clostridium histolyticum* proteinases // *J Bacteriol*. 1962. Vol. 83, № 3. P. 602–608.
 241. Kemble J. V. PH changes on the surface of burns // *Br J Plast Surg*. 1975. Vol. 28, № 3. P. 181–184.
 242. Klein G.K. Enzymatic Debridement of Third Degree Burns in Animals with Bromelains. A Preliminary Report // *J Maine Med Assoc*. 1964. Vol. 55. P. 169–171.
 243. Burke J.F., Golden T. A clinical evaluation of enzymatic debridement with papain-urea-

- chlorophyllin ointment // *Am J Surg*. 1958. Vol. 95, № 5. P. 828–842.
244. Langer V. et al. Enzymatic debridement of large burn wounds with papain-urea: Is it safe? // *Med J Armed Forces India*. 2013. Vol. 69, № 2. P. 144–150.
 245. Connell Jr. J.F., Del Guercio L.R., Rousselot L.M. Debricin; clinical experiences with a new proteolytic enzyme in surgical wounds // *Surg Gynecol Obs*. 1959. Vol. 108, № 1. P. 93–99.
 246. Levenson SM Gruber C, Crowley LV, Lent R, Watford A, Seifter E. K.D. Chemical debridement of burns. // *Ann Surg*. 1974. Vol. 180. P. 670–704.
 247. Houck J.C., Chang C.M., Klein G. Isolation of an effective debriding agent from the stems of pineapple plants // *Int J Tissue React*. 1983. Vol. 5, № 2. P. 125–134.
 248. Singer A.J. et al. The effects of rapid enzymatic debridement of deep partial-thickness burns with Debrase on wound reepithelialization in swine // *J Burn Care Res*. 2010. Vol. 31, № 5. P. 795–802.
 249. Gurfinkel R. et al. Combined ultrasonic and enzymatic debridement of necrotic eschars in an animal model // *J Burn Care Res*. 2009. Vol. 30, № 3. P. 505–513.
 250. Rosenberg L. et al. Minimally invasive burn care: a review of seven clinical studies of rapid and selective debridement using a bromelain-based debriding enzyme (Nexobrid®) // *Ann Burn. Fire Disasters*. 2015. Vol. 28, № 4. P. 264.
 251. Skrabut E.M. et al. Removal of necrotic tissue with an ananain-based enzyme-debriding preparation // *Wound Repair Regen*. 1996. Vol. 4, № 4. P. 433–443.
 252. Hafezi F. et al. *Actinidia deliciosa* (kiwifruit), a new drug for enzymatic debridement of acute burn wounds // *Burns*. Elsevier Ltd and International Society of Burns Injuries, 2010. Vol. 36. P. 352–355.
 253. Dayem R.N., Tameesh M.A. A new concept in hybridization: Bromelain enzyme for deproteinizing dentin before application of adhesive system // *Contemp Clin Dent*. 2013. Vol. 4, № 4. P. 421.
 254. Goldman M., Kronman J.H. A preliminary report on a chemomechanical means of removing caries // *J Am Dent Assoc*. 1976. Vol. 93, № 6. P. 1149–1153.
 255. Bussadori S.K., Castro L.C., Galvao A.C. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent // *J Clin Pediatr Dent*. 2005. Vol. 30, № 2. P. 115–119.
 256. Venkataraghavan K. et al. Chemomechanical Caries Removal: A Review & Study of an Indigenously Developed Agent (Carie Care (TM) Gel) In Children. // *J Int Oral Heal*. 2013. Vol. 5. P. 84–90.
 257. Chakravarthy P., Acharya S. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts // *J Young Pharm*. 2012. Vol. 4, № 4. P. 245–249.
 258. Osato J.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya // *Life Sci*. 1993. Vol. 53, № 17. P. 1383–1389.
 259. dos Anjos M.M. et al. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp // *Int J Food Microbiol*. 2016. Vol. 216. P. 121–126.
 260. da Silva C.R. et al. Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (*Carica papaya* L.) Using In Vitro Assays // *J Biomed Biotechnol*. 2010. Vol. 2010. P. 197898.
 261. Guevara M.G. et al. Potato aspartic proteases: Induction, antimicrobial activity and substrate specificity // *J. Plant Pathol*. 2004. Vol. 86, № 3. P. 233–238.
 262. Karnchanatat A. et al. Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber officinale* rhizomes

- with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines // *Prep Biochem Biotechnol.* 2011. Vol. 41, № 2. P. 138–153.
263. Siritapetawee J., Thammasirirak S., Samosornsuk W. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012. Vol. 16, № 1. P. 132–137.
 264. Berger J., Asenjo C.F. Anthelmintic Activity of Crystalline Papain // *Science* (80-.). 1940. Vol. 91, № 2364. P. 387–388.
 265. Stepek G. et al. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro // *Parasitology.* 2005. Vol. 130, № Pt 2. P. 203–211.
 266. Mello V.J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis* // *Phytomedicine.* 2008. Vol. 15, № 4. P. 237–244.
 267. Kane S., Goldberg M.J. Use of bromelain for mild ulcerative colitis // *Ann. Intern. Med.* 2000. Vol. 132, № 8. P. 680.
 268. Shan L. et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue // *Science* (80-.). 2002. Vol. 297, № 5590. P. 2275–2279.
 269. Vici G. et al. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review // *Clin Nutr.* 2016. Vol. 35, № 6. P. 1236–1241.
 270. Bethune M.T., Khosla C. Oral enzyme therapy for celiac sprue // *Methods Enzym.* 2012. Vol. 502. P. 241–271.
 271. Lahdeaho M.L. et al. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease // *Gastroenterology.* 2014. Vol. 146, № 7. P. 1649–1658.
 272. Zayachkivska O.S. et al. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts // *J Physiol Pharmacol.* 2005. Vol. 56 Suppl 1, № 1. P. 219–231.
 273. Knill-Jones R.P. et al. Comparative trial of Nutrizym in chronic pancreatic insufficiency // *Br Med J.* 1970. Vol. 4, № 5726. P. 21–24.
 274. Felton G.E. Does kinin released by pineapple stem bromelain stimulate production of prostaglandin E1-like compounds? // *Hawaii Med J.* 1977. Vol. 36, № 2. P. 39–47.
 275. Mynott T.L., Luke R.K., Chandler D.S. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic *Escherichia coli* receptor activity in piglet small intestine // *Gut.* 1996. Vol. 38, № 1. P. 28–32.
 276. Hale L.P. et al. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease // *Clin Immunol.* 2005. Vol. 116, № 2. P. 135–142.
 277. Walker-Renard P. Update on the medicinal management of phytobezoars // *Am J Gastroenterol.* 1993. Vol. 88, № 10. P. 1663–1666.
 278. Kersey P.J. et al. Ensembl Genomes 2016: More genomes, more complexity // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D574–D580.
 279. Wheeler T.J., Eddy S.R. Nhmmer: DNA homology search with profile HMMs // *Bioinformatics.* 2013. Vol. 29, № 19. P. 2487–2489.
 280. Kuraku S. et al. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № Web Server issue. P. 22–28.

281. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. Vol. 33, № 7. P. 1870–1874.
282. Санин А.А., Анциферова Л.В. Определение патогенных свойств изолятов *Septoria nodorum* (Berk.) и *S. tritici* Rob. et Desm. на пшенице // *Микология и фитопатология.* 1991. Vol. 25, № 2. P. 155–160.
283. BROWDER L.E. Pathogenic specialization in cereal rust fungi, especially *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*: concepts, methods of study and application // *USDA Tech. Bull.* 1432. 1971. P. 37–51.
284. Zamore P.D. Plant RNAi: How a Viral Silencing Suppressor Inactivates siRNA // *Curr. Biol.* 2004. Vol. 14, № 5. P. R198–R200.
285. LAEMMLI U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
286. Cataldo D.A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1975. Vol. 6, № 1. P. 71–80.
287. Kiran K. et al. Draft genome of the wheat rust pathogen (*Puccinia triticina*) unravels genome-wide structural variations during evolution // *Genome Biol. Evol.* 2016. Vol. 8, № 9. P. 2702–2721.
288. Syme R.A. et al. Resequencing and Comparative Genomics of *Stagonospora nodorum* : Sectional Gene Absence and Effector Discovery // *Genes|Genomes|Genetics.* 2013. Vol. 3, № 6. P. 959–969.
289. Craig R., Beavis R.C. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra // *Bioinformatics.* 2004. Vol. 20, № 9. P. 1466–1467.
290. Ivanov M. V. et al. Empirical multidimensional space for scoring peptide spectrum matches in shotgun proteomics // *J. Proteome Res.* 2014. Vol. 13, № 4. P. 1911–1920.
291. Fagundes D. et al. Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses // *Funct. Integr. Genomics.* 2015. Vol. 15, № 6. P. 639–649.
292. Camacho C. et al. BLAST+: Architecture and applications // *BMC Bioinformatics.* 2009. Vol. 10. P. 1–9.
293. Balakireva A., Zamyatnin A. Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 2. P. 629.
294. Balakireva A. et al. Proteomics Analysis Reveals That Caspase-Like and Metacaspase-Like Activities Are Dispensable for Activation of Proteases Involved in Early Response to Biotic Stress in *Triticum aestivum* L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 3991.
295. Faghani E. et al. Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance // *J. Proteomics. Elsevier B.V.,* 2015. Vol. 114. P. 1–15.
296. Zimin A. V. et al. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum* // *Gigascience.* 2017. Vol. 6, № 11. P. 1–7.
297. Mauchline T.H. et al. An analysis of *Pseudomonas* genomic diversity in take-all infected wheat fields reveals the lasting impact of wheat cultivars on the soil microbiota // *Env. Microbiol.* 2015. Vol. 17, № 11. P. 4764–4778.
298. Gardiner D.M. et al. Genomic analysis of *Xanthomonas translucens* pathogenic on wheat and barley reveals cross-kingdom gene transfer events and diverse protein delivery systems // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 1. P. e84995.
299. Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U. A Review of the Interactions between Wheat and

- Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 4. P. 1138.
300. Zhang K. et al. The Barley stripe mosaic virus gammab protein promotes chloroplast-targeted replication by enhancing unwinding of RNA duplexes // *PLoS Pathog.* 2017. Vol. 13, № 4. P. e1006319.
 301. Lee S. et al. Loop-mediated Isothermal Amplification Assay to Rapidly Detect Wheat Streak Mosaic Virus in Quarantined Plants // *Plant Pathol J.* 2015. Vol. 31, № 4. P. 438–440.
 302. Ogasawara Y. et al. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation // *J Biol Chem.* 2008. Vol. 283, № 14. P. 8885–8892.
 303. Li F. et al. Response of wheat germplasm to infestation of English grain aphid (Hemiptera: Aphididae) // *J Econ Entomol.* 2013. Vol. 106, № 3. P. 1473–1478.
 304. Kong L.A. et al. Large-scale identification of wheat genes resistant to cereal cyst nematode *Heterodera avenae* using comparative transcriptomic analysis // *BMC Genomics.* 2015. Vol. 16. P. 801.
 305. García-Lorenzo M. et al. Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis* // *BMC Plant Biol.* 2006. Vol. 6. P. 1–24.
 306. Grosse-Holz, F., Kelly, S., Blaskowski, S., Kaschani, F., Kaiser, M., van der Hoorn R.A.L. The transcriptome, extracellular proteome and active secretome of agroinfiltrated *N. benthamiana* uncover a large, diverse protease repertoire // *Plant Biotechnol J.* 2018. Vol. 16, № 5. P. 1068–1084.
 307. Kappelhoff R. et al. Overview of transcriptomic analysis of all human proteases, non-proteolytic homologs and inhibitors: Organ, tissue and ovarian cancer cell line expression profiling of the human protease degradome by the CLIP-CHIPTM DNA microarray // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 1864, № 11. 2210–2219 p.
 308. Wang W. et al. Papain-like and legumain-like proteases in rice : genome-wide identification , comprehensive gene feature characterization and expression analysis // *BMC Plant Biol. BMC Plant Biology,* 2018. Vol. 18, № 87. P. 1–16.
 309. Liu J. et al. Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: Lineage-specific gene duplication and expansion // *BMC Genomics.* BMC Genomics, 2018. Vol. 19, № 1. P. 1–12.
 310. Golldack D., Vera P., Dietz K.J. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences // *Physiol. Plant.* 2003. Vol. 118, № 1. P. 64–73.
 311. Martinez D.E. et al. SASP, a Senescence-Associated Subtilisin Protease, is involved in reproductive development and determination of silique number in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2015. Vol. 66, № 1. P. 161–174.
 312. Neuteboom L.W. et al. A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence // *DNA Res.* 1999. Vol. 6, № 1. P. 13–19.
 313. Engineer C.B. et al. Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development // *Nature.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 513, № 7517. P. 246–250.
 314. Book A.J. et al. Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 138, № 2. P. 1046–1057.
 315. Vu L.D. et al. Proteome Profiling of Wheat Shoots from Different Cultivars // *Front. Plant Sci.* 2017. Vol. 8, № March. P. 1–11.

316. Jia H. et al. Jasmonic acid involves in grape fruit ripening and resistant against *Botrytis cinerea* // *Funct Integr Genomics*. 2016. Vol. 16, № 1. P. 79–94.
317. Rose R., Schaller A., Ottmann C. Structural features of plant subtilases // *Plant Signal. Behav.* 2010. Vol. 5, № 2. P. 180–183.
318. Xin M. et al. Transcriptome Comparison of Susceptible and Resistant Wheat in Response to Powdery Mildew Infection // *Genomics, Proteomics Bioinforma.* Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, 2012. Vol. 10, № 2. P. 94–106.
319. Komatsu S., Kamal A.H.M., Hossain Z. Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5, № December. P. 1–19.
320. Hao Y. et al. TaMCA1, a regulator of cell death, is important for the interaction between wheat and *Puccinia striiformis* // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № December 2015. P. 1–11.
321. Yang Y. et al. Quantitative Proteomics Reveals the Defense Response of Wheat against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* // *Nat. Publ. Gr.* Nature Publishing Group, 2016. № November 2015. P. 1–15.
322. Wan Y. et al. Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat // *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9. P. 1–16.
323. Lin R. Arabidopsis FHY3/FAR1 Gene Family and Distinct Roles of Its Members in Light Control of Arabidopsis Development // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136, № 4. P. 4010–4022.
324. Gu C. et al. Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease rd21 of *Arabidopsis thaliana* // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 3. P. 1–11.
325. van der Linde K. et al. A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases // *Plant Cell*. 2012. Vol. 24, № 3. P. 1285–1300.
326. Jutras P. V. et al. Activity-based proteomics reveals nine target proteases for the recombinant protein-stabilizing inhibitor SI CYS 8 in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Biotechnol. J.* 2019. Vol. 17, № 8. P. 1670–1678.
327. Mach L., Mort J.S., Glossl J. Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 17. P. 13030–13035.