

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии и биохимии Института молекулярной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования, Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель**

– *Андрей Александрович Замятнин, доктор биологических наук*

**Официальные оппоненты**

– *Алексей Анатольевич Аграновский, доктор биологических наук, профессор, заведующий сектором молекулярной биологии вирусов кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова*

*Яков Ефимович Дунаевский, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Отдела белков растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова*

*Татьяна Васильевна Ротанова, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук*

Защита диссертации состоится 14 ноября 2019 года в часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/235637375/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

## **Общая характеристика работы**

### **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) (Coll, Erppl, and Dangl 2011), в регуляцию которой вовлечены протеолитические ферменты (протеиназы) (Zamyatnin Jr. 2015). В рамках данной диссертации, совокупность всех протеиназ растения здесь и далее будет называться деградомом, как было предложено ранее (Quesada et al. 2009). 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 (Grayman et al. 2015). 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 (Crawford and Wells 2011). 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) (Chichkova et al. 2004; Trusova et al. 2019), протеасомным субъединицам (T1) (Hatsugai et al. 2009), вакуолярным процессирующим протеиназам (VPE, C13) (Zhang, Zheng, and Zhang 2010) и папаин-подобным цистеиновым протеиназам (C1A) (Misas-Villamil, van der Hoorn, and Doehlemann 2016).

Другой основной характеристикой ЗКС у растений является метакаспазная активность (Tsiatsiani et al. 2011). Метакаспазы гидролизуют пептидную связь после Arg и Lys, и было показано, что они участвуют в различных процессах, связанных с гибелью клеток (Sundstrom et al. 2009; Bozhkov et al. 2005; Coll et al. 2010; Bollhoner et al. 2018). 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 деградом на уровне сортов, исследовать факторы активации протеолитических ферментов пшеницы в норме и при биотическом стрессе; исследовать активацию *in vivo* на примере папаин-подобной цистеиновой протеиназы – тритикаина- $\alpha$ .

#### **Задачи работы**

1. Провести биоинформатический анализ деградом пшеницы, идентифицировать все закодированные в геноме *T. aestivum* протеиназы, провести их классификацию и выделить уникальные для вида особенности;
2. Исследовать вариативность деградом пшеницы внутри вида путем сравнения протеиназ двух сортов при помощи жидкостной хроматографии и tandemной 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- $\alpha$ .

## 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 пшеницы – тритикаина- $\alpha$ .

## Научная и практическая значимость

Результаты диссертационной работы имеют 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 метакаспазо-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 (Finn et al. 2016). Выращивание растений, их заражение *S. nodorum* и *P. recondita*, транзистная 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- $\alpha$  и характера его процессинга в клетках пшеницы, было проведено фракционирование органелл клеток пшеницы при помощи дифференциального центрифугирования (LampI et al. 2013). Для оценки активности тритикаина- $\alpha$  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) (Hoogen 2004). 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 из концов 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 (Levitsky et al. 2018).

### **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 с 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- $\alpha$  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.

## Результаты работы

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

В первую очередь были идентифицированы протеиназы, кодируемые в геноме пшеницы. Пшеница является гексаплоидным организмом, а ее геном представлен тремя геномами близкородственных злаков (AABBDD) (Zimin et al. 2017). Протеом *T. aestivum* (релиз 39) был получен из базы данных геномов Ensembl (<ftp://ftp.ensemblgenomes.org/>). С использованием пакета HMMER 3.1b2 всего было обнаружено 1544 протеиназы, относящихся к различным семействам (Табл.1).

**Таблица 1.** Представленность различных семейств в геноме пшеницы.

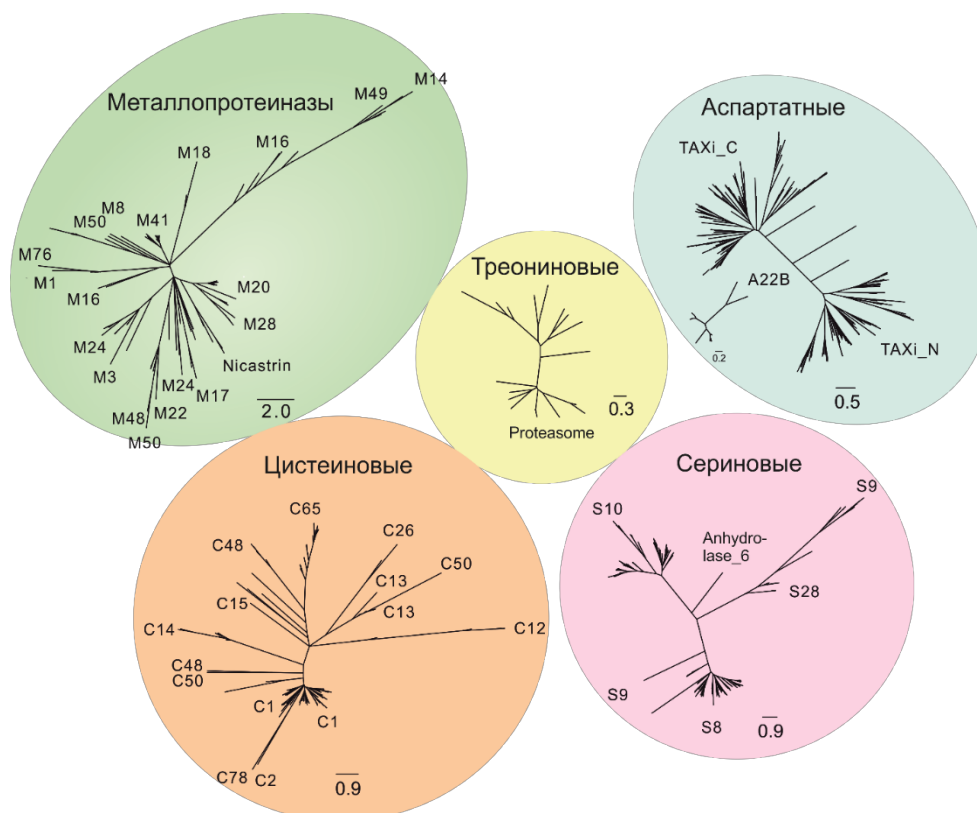
Каталитический тип протеиназ	Семейства и подсемейства (согласно номенклатуре базы данных Pfam)	Число протеиназ
Цистеиновые	C1, C2, C12, C13, C14, C15, C26, C48, C50, C54, C65, C78	459
Сериновые	S8, S9, S10, S15, S28	446
Аспартатные	A1, A22B	336
Металлопротеиназы	M1, M3, M8, M10, M14, M16_M, M16_C, M17, M18, M20, M22, M24, M28, M41, M48, M49, M50B, M50	275
Треониновые	T1	28
Всего		1544

Идентифицированные протеиназы были классифицированы (Рис.1). Семейство цистеиновых протеиназ C1 состояло из 181 белка, относящегося к подсемейству C1A папаин-подобных цистеиновых протеаз (ППЦП), согласно номенклатуре MEROPS (Rawlings, Barrett, and Finn 2016).

Сериновые протеиназы насчитывали 82 фермента и образовали отдельные группы, содержащие близкие гомологи, тогда как другие группы были удалены друг от друга (Рис.1, «Сериновые»). Металлопротеиназы были представлены множеством семейств и оказались смешанными на филогенетическом дереве (Рис.1, «Металлопротеиназы»).



Аспарататные протеиназы из разных семейств (семейство A1 и подсемейство A22B) не являлись гомологами и возникли эволюционно независимо в группе аспарататных протеиназ (Рис.1, «Аспарататные»). Протеиназы из семейства A1 являются уникальными для *T. aestivum* и состоят из N- и C-концевых доменов ингибитора ксиланазы TAXi\_N и TAXi\_C, которые являются отдаленными, но гомологичными доменами.

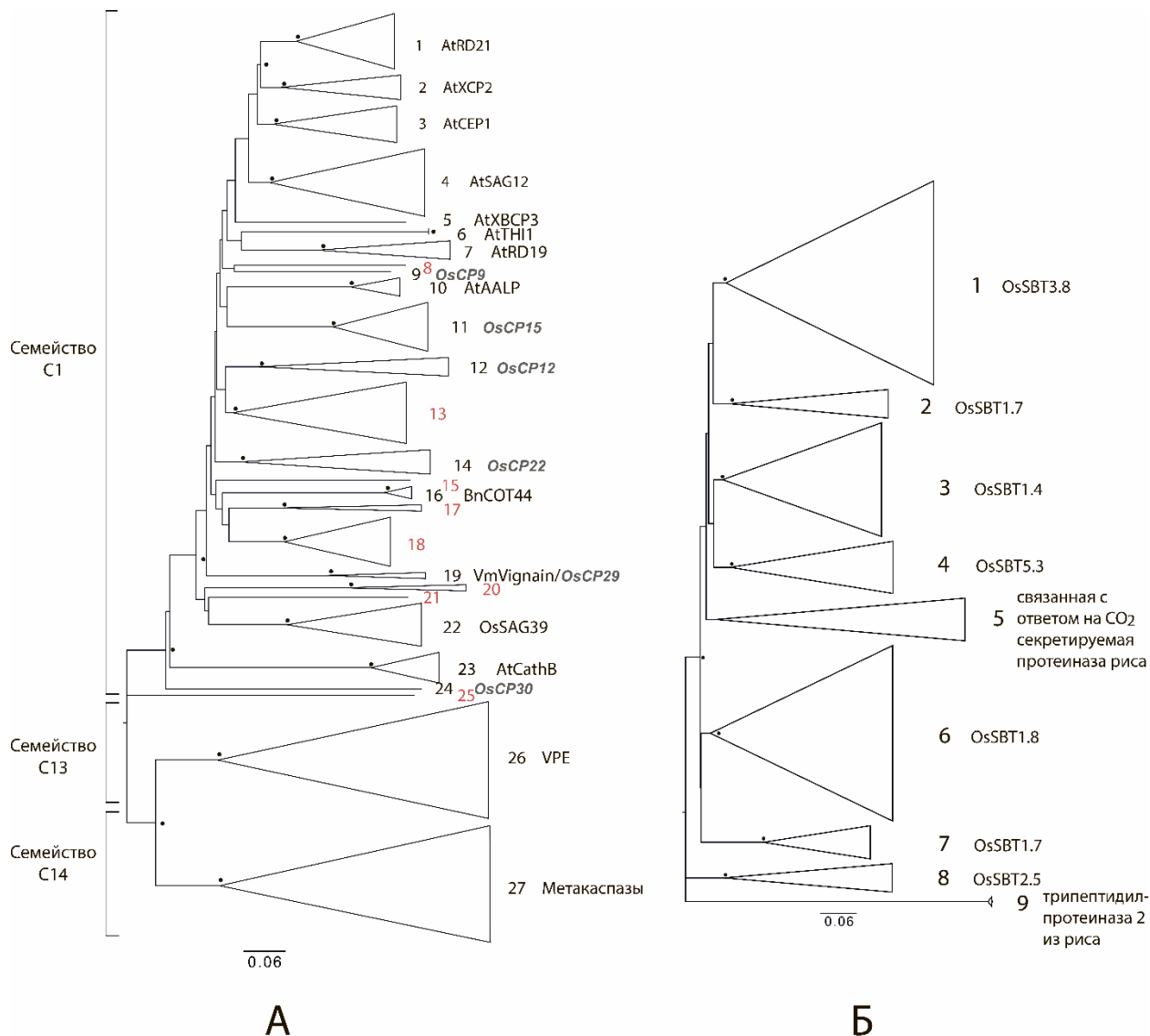


**Рисунок 1.** Деградом *T. aestivum*. Неукорененные филогенетические деревья демонстрируют разнообразие семейств протеиназ. Длины ветвей деревьев соответствуют единицам, используемым для определения эволюционных расстояний между белками. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода р-расстояния (Kumar, Stecher, and Tamura 2017), и их единицы соответствуют количеству различий на сайт.

Были сконструированы филогенетические деревья на основе выравниваний соответствующих доменов для семейств, члены которых связаны с иммунитетом растений, таких как C1, C13, C14 (Рис.2, А) и S8 (Рис.2, Б). Доменные структуры были идентифицированы для всех протеиназ из этих семейств (Рис.3 и 4).

Поскольку протеиназы из семейств C1A, C13 и C14 очень схожи, для этих семейств было построено единое филогенетическое дерево (Рис.2, А). Всего было идентифицировано 25 кластеров C1A протеиназ. Девять кластеров соответствовали девяти

группам, обнаруженным ранее Richau et al. (Richau et al. 2012) для подсемейств ППЦП из *A. thaliana*. Кроме того, были идентифицированы протеиназные группы, гомологичные таковым из риса (*Oryza sativa*) (обозначены как Os на Рис.2). Интересно то, что протеиназы из других групп не имели ранее описанных гомологов (окрашены красным на Рис.2, А). Также были определены несколько гомологичных наиболее близких протеиназ из других организмов.

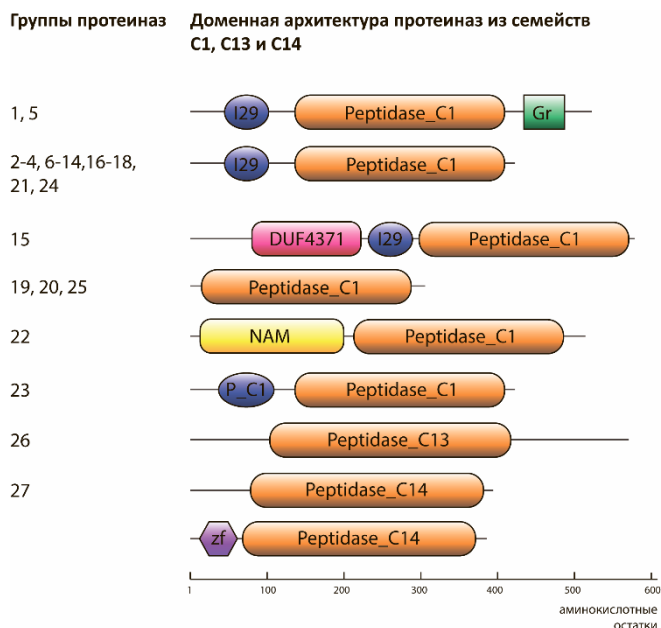


**Рисунок 2.** Филогенетические деревья (А) семейств C1, C13 и C14 цистеиновых протеиназ, (Б) S8 сериновых протеиназ. Треугольники обозначают сокращенные клады и размер каждой группы протеиназ. Бутстрэп значения выше 70% показаны с черными точками в соответствующих узлах. Ближайшие гомологи групп протеиназ 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.

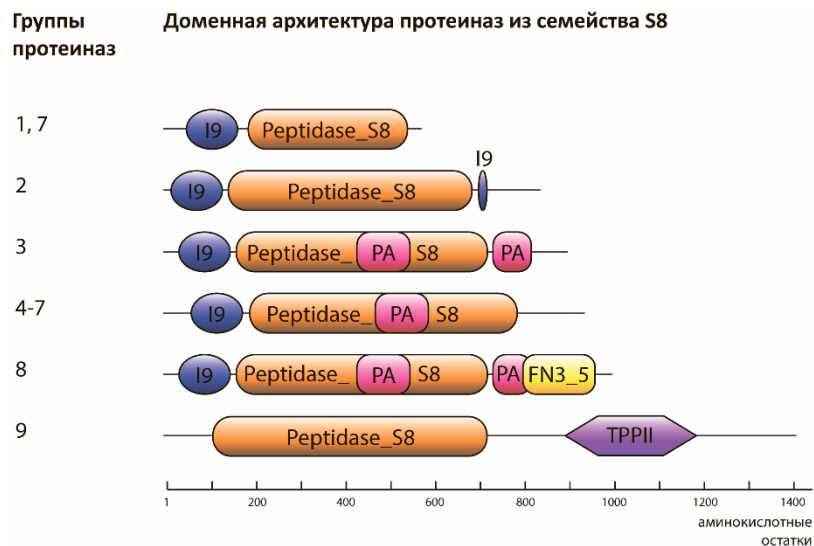
Как правило, C1A протеиназы пшеницы содержали продомен и каталитический домен, а в случае ХВСПЗ-подобных и RD21-подобных протеиназ – гранулиновый домен (Рис.3). Другие группы протеиназ обладали отличительными особенностями, например, группа 15 содержала белки с доменом неизвестной функции 4371 (DUF4371); а группа 22 – NAM домен.

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.2, Б). Протеиназы почти из всех групп несли не только каталитический домен (Peptidase\_S8), но также консервативный продомен (Inhibitor\_I9, Рис.4). Группы 3-6 и 8 содержали протеиназы с РА (protease-associated) доменом. Субтилазы из 8 и 9 групп содержали домен, подобный фибронектину III типа (fn3\_5).

Можно заключить, что в геноме пшеницы было идентифицировано 1544 протеиназы, относящихся 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 3.** Типичная доменная организация протеиназ из семейств C1, C13 и C14. Номера групп соответствуют тем, которые указаны на Рис.2, А. 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.

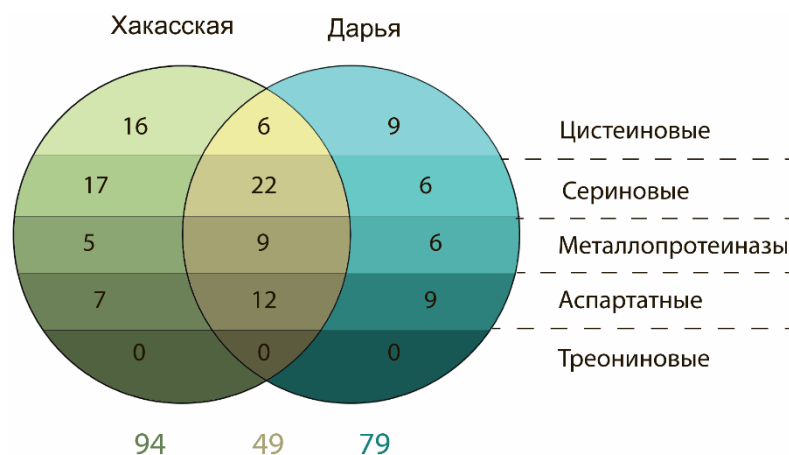


**Рисунок 4.** Типичная доменная организация субтилаз из пшеницы. Номера групп соответствуют номерам, указанным на Рис.2, Б. Длины всех структур указаны в масштабе, соответствующем шкале снизу. Идентификаторы Pfam: Peptidase\_S8 – протеолитический домен; I9 – Inhibitor\_I9 – продомен; PA – PA домен; FN3\_5 – fn3\_5; TPPII – домен трипептидилпептидазы-2.

## 2. Деградом пшеницы варьируется на уровне сортов

На следующем этапе работы были идентифицированы протеиназы, присутствующие *in vivo* в здоровых растениях сортов Хакасская и Дарья. Растения сорта Хакасская являются более чувствительными к атакам патогенов, в то время как растения Дарьи – более устойчивыми. Детектирование протеиназ было произведено при помощи метода жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Полученные данные указывали на то, что деградом пшеницы варьируется внутри вида (Рис.5). Сравнительный анализ показал, что растения сортов Хакасская и Дарья содержали разное количество протеиназ (94 и 79 протеиназ, соответственно), причем 49 протеиназ были детектированы в обоих сортах, что составляло 52,1% и 62% от общего количества протеиназ для Хакасской и Дарьи, соответственно. Наиболее представленными семействами протеиназ у обоих сортов являлись 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 совпадение на 79,3% между полными протеомами сортов пшеницы (Faghani et al. 2015).



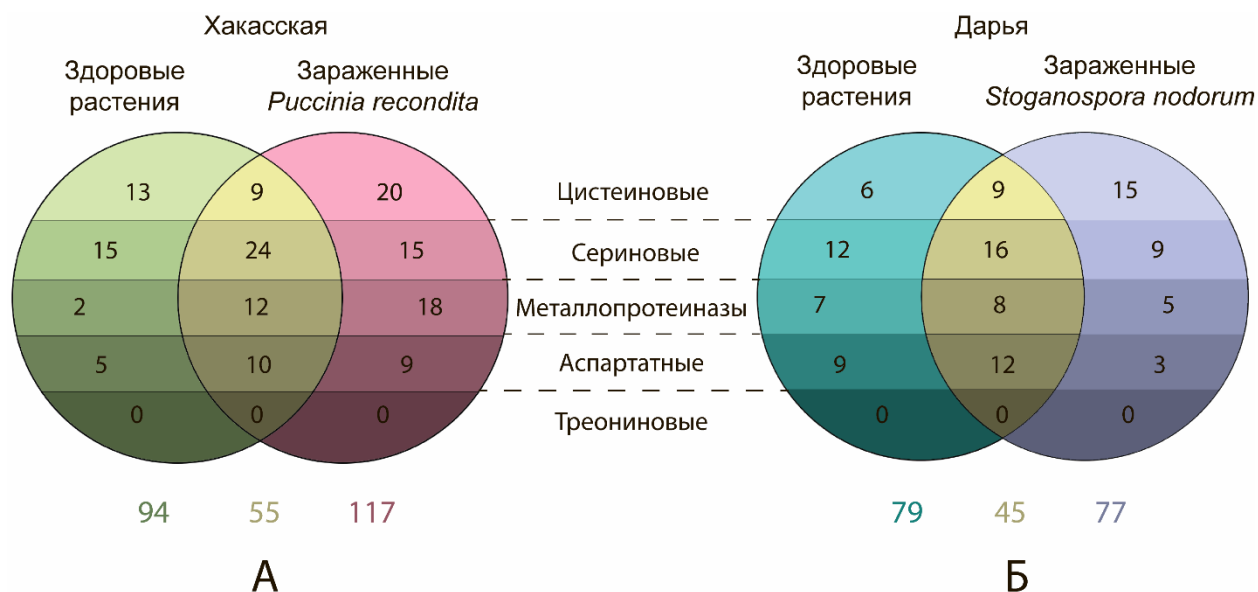
**Рисунок 5.** Диаграмма Венна, представляющая число воспроизводимо детектируемых протеиназ для сортов пшеницы Хакасская (обозначены зеленым) и Дарья (обозначены голубым). Протеиназы, обнаруженные в обоих сортах, обозначены желтым цветом, общее число протеиназ – соответствующим цветом внизу диаграммы. Пунктирные линии делят протеиназы разных каталитических типов.

### 3. Заражение патогенами приводит к изменению составов протеиназ

Далее было проведено сравнение протеиназ, детектируемых в здоровых растениях и растениях, собранных 24 часа спустя после заражения биотрофным патогеном – грибом *P. recondita* и некротрофным патогеном – грибом *S. nodorum*. Идентификация протеиназ была проведена с использованием ЖХ-МС/МС.

Было обнаружено 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.6).

Следует отметить, что в случае биотрофной инфекции были индуцированы протеиназы из семейств M17 и M20, в то время как в случае некротрофной – из C14 и C26. При этом обе инфекции вызывали увеличение количества 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.

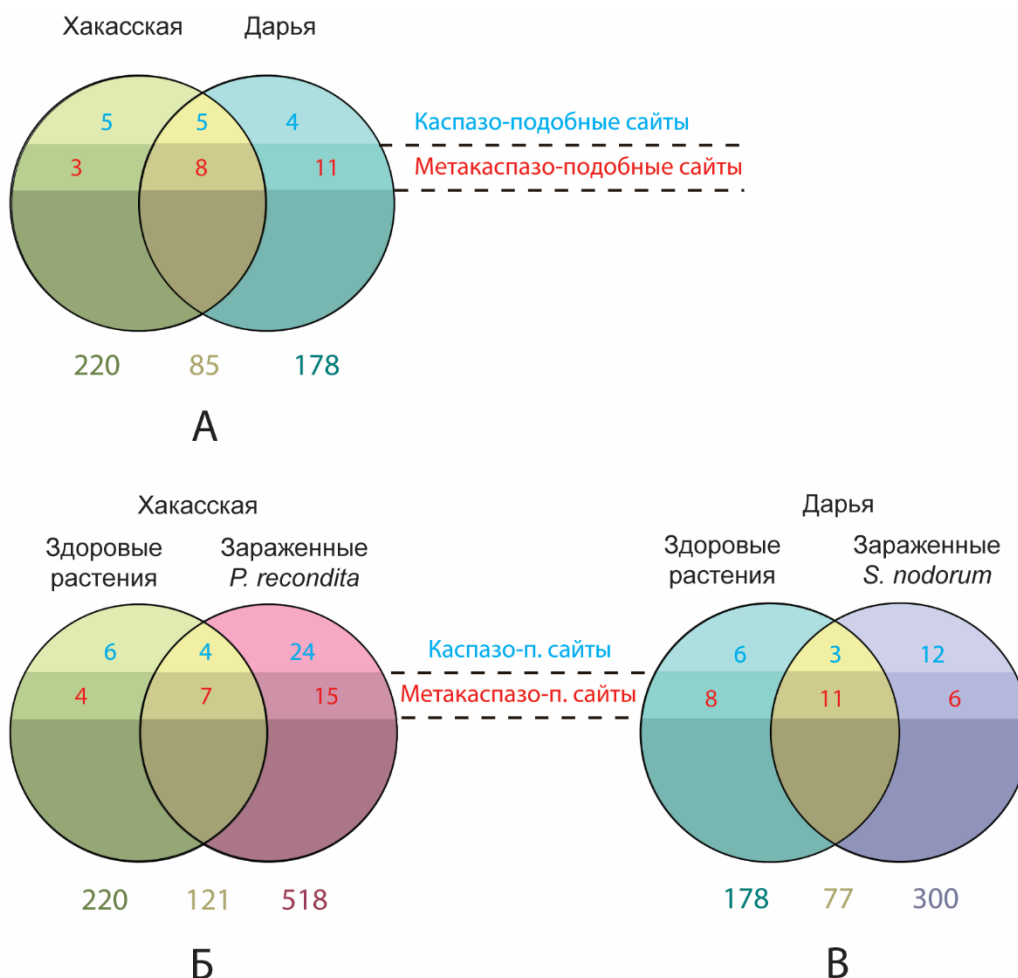


**Рисунок 6.** Диаграммы Венна, представляющие число воспроизводимо детектируемых протеиназ в протеомах (А) здоровых (обозначены зеленым) и зараженных *P. recondita* (обозначены розовым) растений сорта Хакасская; (Б) здоровых (обозначены голубым) и зараженных *S. nodorum* (обозначены фиолетовым) растений сорта Дарья. Число протеиназ, одновременно обнаруженных в опытных и контрольных пробах, обозначены на пересечении желтым, общее число протеиназ – соответствующим цветом внизу диаграмм.

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

Далее был проверено, увеличивается ли общая протеолитическая активность на фоне увеличения числа экспрессируемых протеиназ. Был проведен поиск потенциальных субстратов, расщепляемых протеиназами в здоровых растениях обоих сортов. Анализ выявил разные множества предположительно гидролизированных субстратов, совпадающее на ~40%, в здоровых растениях Хакасской и Дарьи (Рис.7, А).

Как указывалось ранее, иммунные ответы растений и ЗКС связаны с каспазо-подобной и метакаспазной активностями, которые подразумевают гидролиз субстратов в специфических сайтах, таких как VEID, DEVD, YVAD, и др. Поэтому присутствие субстратов, предположительно расщепляемых каспазо- 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, тогда как число субстратов метакаспазо-подобных протеиназ было в 1,5 раза больше в растениях Дарьи (Рис.7, А, синим и красным).



**Рисунок 7.** Диаграммы Венна, представляющие число 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 растениях Дарьи (обозначены голубым); (Б) здоровых (обозначены зеленым) и зараженных *P. recondita* (обозначены розовым) растений 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.

Поскольку число детектируемых протеиназ увеличивалось на фоне обеих инфекций (см. предыдущий раздел), было проверено, увеличивается ли число субстратов, расщепленных эндогенными протеиназами. В случае инфекции *P. recondita* (Рис.7, Б), это число увеличилось в ~2,5 раз, в то время как в случае инфекции *S. nodorum* (Рис.7, В) – в ~1,6 раз. Субстраты каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ также были обнаружены. Произошло увеличение числа сайтов обоих типов в 2-3 раза в случае инфекции *P. recondita*, и в 1,5 раза только каспазо-подобных сайтов в случае *S. nodorum*.

Можно заключить, что спустя 24 часа после заражения обоими патогенами произошло увеличение не только числа протеиназ, но и общей протеолитической активности в клетках растений. Стоит отметить, что каспазо-подобная активность возросла в обоих случаях, в то время как метакаспазная – только в случае биотрофной инфекции.

Также, были исследованы потенциальные субстраты каспазо- и метакаспазо-подобных протеиназ, гидролизованных одновременно 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.2. Расщепление рецептор-подобных протеинкиназ протеиназами может являться непосредственным звеном в установлении базального иммунитета или иммунитета, вызванного эффекторами (Watanabe and Lam 2011).

**Таблица 2.** 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><b>Возможные субстраты каспазо-подобных протеиназ</b></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><b>Возможные субстраты метакаспазо-подобных протеиназ</b></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*. Следующим шагом стало изучить, влияют ли эти активности на протеолитическую активацию протеиназ как в здоровых, так и в зараженных растениях. Для этого был реализован подход, основанный на идентификации полу-специфических пептидов после расщепления трипсином или AspN при подготовке проб к ЖХ-МС/МС. Был проведен поиск пептидов, приходящихся на область границы продомена и протеолитического домена ( $\pm 40$  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 (Tsiatsiani et al. 2011). Таким образом был определен статус процессинга протеиназ в здоровых и зараженных *P. recondita* и *S. nodorum* растений спустя 24 часа после заражения (Табл.3).

**Таблица 3.** 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
<b>Всего</b>		<b>7</b>	<b>16 (3)</b>	<b>7 (1)</b>	<b>9 (1)</b>

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

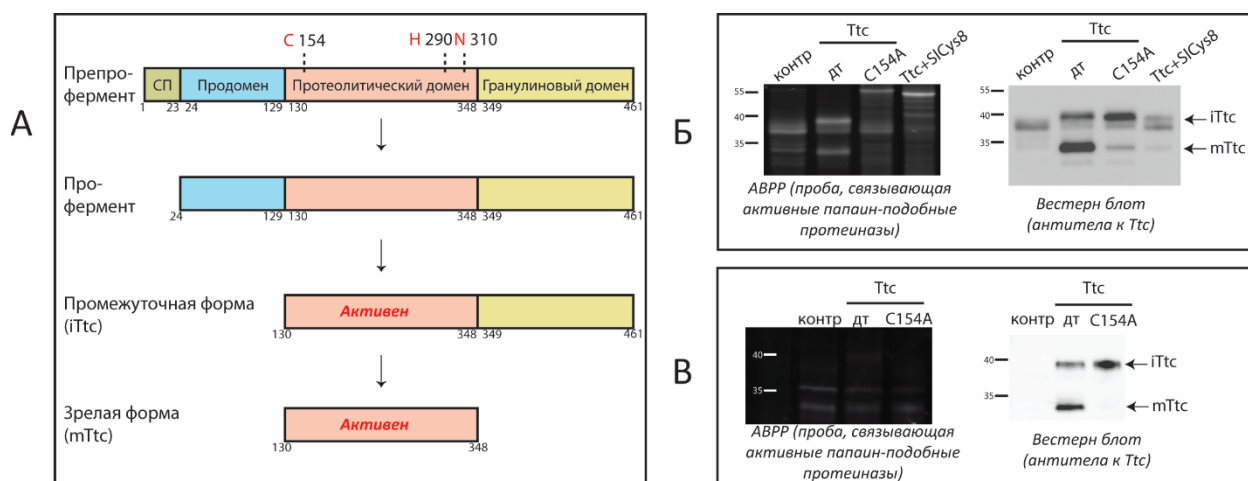
Результат, суммированный в Табл.3, показывает, что в зараженной пшенице сайты активации протеиназ отличаются от известных сайтов узнавания каспаз и метакаспаз. Только три из 16 и один из девяти сайтов относились к каспазо-подобным ферментам для зараженных *P. recondita* и *S. nodorum* растениям, соответственно. Ни одного сайта активации не было обнаружено для метакаспазо-подобных ферментов. Можно заключить, что активация протеиназ при раннем ответе пшеницы на биотический стресс осуществляется протеиназами, отличными от каспаз и метакаспаз и обладающими до сих пор неохарактеризованными активностями.

#### **6. Активация тритикаина- $\alpha$ – многоступенчатый автокаталитический процесс, который, предположительно, регулируется цистатином**

Для того, чтобы более детально изучить механизмы процессинга протеиназ пшеницы *in vivo*, было принято решение исследовать особенности активации протеиназы тритикаина- $\alpha$ , которая как структурно, так и по типу активности не относится к каспазо- и метакаспазо-подобным ферментам. Тритикаин- $\alpha$  представляет из себя папаин-подобную цистеиновую протеиназу, которая была обнаружена в прорастающих семенах пшеницы (Kiyosaki et al. 2009). Ранее нами было показано, что тритикаин- $\alpha$  обладает глютеиназной и коллагеназной активностями (Savvateeva et al. 2015), однако его физиологические свойства и способ активации оставались не известными.

Тритикаин- $\alpha$  имеет типичную для ППЦП структуру и содержит сигнальный пептид, N-концевой продомен, протеолитический домен и C-концевой гранулиновый домен (Рис.8, А). В экспериментах по изучению активации фермента, в качестве контроля был создан и использован мутант тритикаина- $\alpha$  по каталитическому Cys. В результате было показано, что процессинг тритикаина- $\alpha$  – ступенчатый процесс (Рис.8 и 9). При сверхэкспрессии рекомбинантного тритикаина- $\alpha$  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. 8, Б, ДТ). Согласно результату основанного на активности профайлинга белков (ABPP), iTtc дикого типа, несмотря на частичное созревание, обладал протеолитической активностью, в то время как мутант был ее лишен (Рис. 8, Б, C154А). При этом, процессинг мутантного фермента до промежуточной формы все же происходил. Это говорит о том, что отщепление продомена *in vivo* приводит к активации фермента и может осуществляться не

только самим тритикаином- $\alpha$  (автокаталитически), но и за счет межмолекулярных взаимодействий с другими ферментами в ходе протеолитических каскадов.



**Рисунок 8.** Активация тритикаина- $\alpha$  *in vivo* – многоступенчатый процесс. (А) Паттерн активации тритикаина- $\alpha$ ; СП – сигнальный пептид, каталитические остатки обозначены красным. (Б) Результат свёрхэкспрессии рекомбинантных форм дикого типа (дт) и мутанта (C154A) тритикаина- $\alpha$  в клетках *N. benthamiana*; (В) в апопласте. Ttc – тритикаин- $\alpha$ , контр – контроль, дт – протеиназа дикого типа, C154A – мутант по каталитическому Cys, АВРР – основанный на активности профайлинг белков.

Было обнаружено, что активность тритикаина- $\alpha$  полностью подавляется цистатином томата SlCys8 при их коэкспрессии в листьях *N. benthamiana*. АВРР показал, что тритикаин- $\alpha$  полностью утратил свою активность, несмотря на то, что все же присутствовал в клетке, согласно результату вестерн блоттинга (Рис.8, Б, Ttc+SlCys8). Стоит отметить, что в присутствии SlCys8 зрелой формы тритикаина- $\alpha$  накапливалось значительно меньше. По-видимому, цистатин способен влиять на активацию и созревание тритикаина- $\alpha$ .

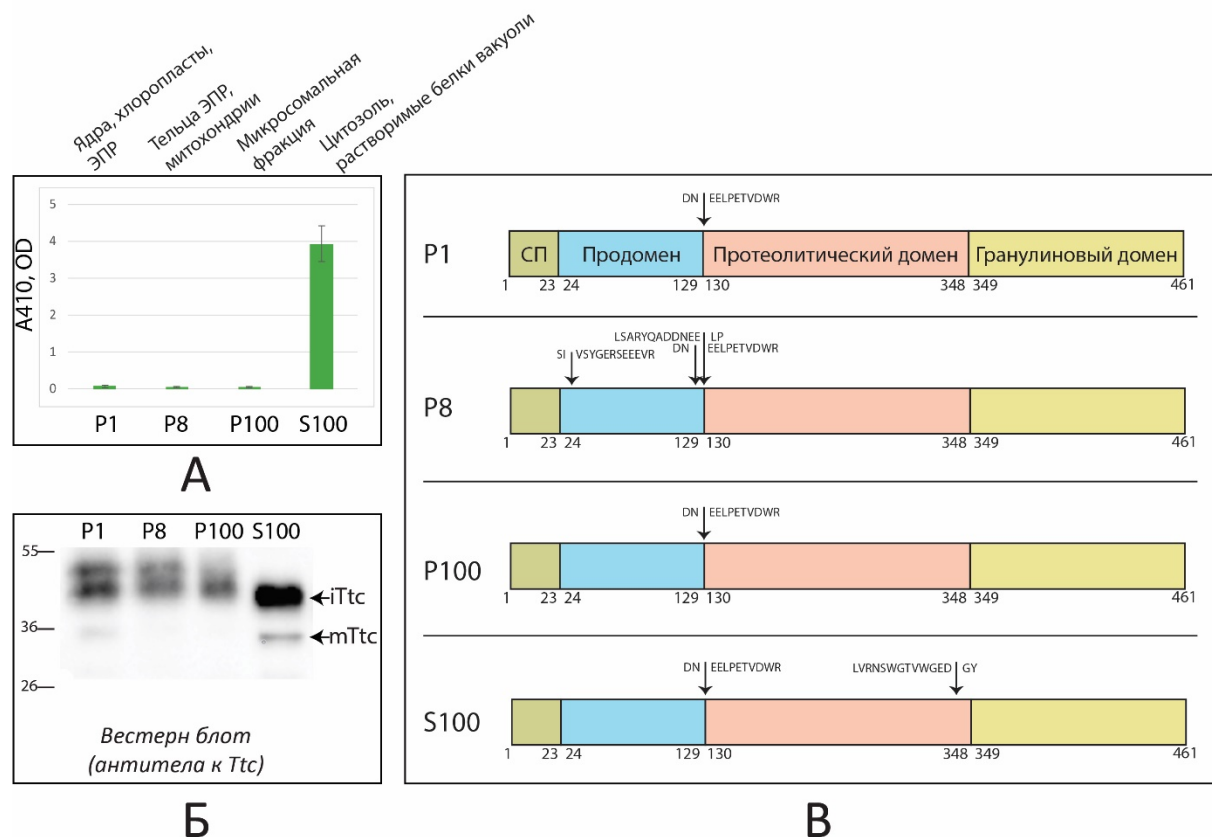
Также было обнаружено, что часть iTtc как дикого типа, так и мутанта, секретируется в межклеточное пространство – апопласт (Рис.8, В). Апопласт является богатой протеиназами средой. Так, было обнаружено, что в случае фермента дикого типа происходит отщепление С-концевого гранулинового домена до зрелой формы (Рис.8, В, дт), в то время как в случае мутанта этого не происходит (Рис.8, В, C154A). Можно заключить, что созревание фермента происходит автокаталитически, при котором необходима протеолитическая активность самого фермента. Этапы процессинга тритикаина- $\alpha$  были подтверждены ЖХ-МС/МС.

## **7. Тритикаин- $\alpha$ в основном накапливается в вакуоли, а его созревание происходит рН-зависимо**

Для того, чтобы выяснить, как происходит активация эндогенного тритикаина- $\alpha$  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, эндоплазматический ретикулум (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.9, А). Было показано, что тритикаин- $\alpha$  присутствует в различных фракциях в разных формах, причем переход от препрофермента до промежуточной (iTtc) и полностью зрелой (mTtc) формы происходит постепенно (Рис.9, Б). Стоит отметить, что на Рис.9, Б пробы выровнены по концентрации тритикаина- $\alpha$ , 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- $\alpha$  (Рис.9, Б, mTtc). Места процессинга фермента во всех фракциях были определены при помощи масс-спектрометрического анализа (Рис.9, В).

Из полученных результатов можно заключить, что тритикаин- $\alpha$  в основном накапливается в вакуоли, где и происходит его полное созревание. Стоит отметить, что вакуоль характеризуется пониженным значением рН среды, из чего можно заключить, что активация и созревание тритикаина- $\alpha$  *in vivo* происходит рН-зависимо.



**Рисунок 9.** В разных органеллах клеток пшеницы тритикаин-α присутствует в разных формах. (А) Измерение маркера вакуоли – нитратов (3 биологические повторности), (Б) результат фракционирования листьев 7-дневных проростков пшеницы, (В) результат ЖХ-МС/МС анализа фракций; пептиды указаны сверху схем, стрелками указано положение неспецифичного конца полупептида. Ttc – тритикаин-α; СП – сигнальный пептид; P1, P8, P100, S100 – фракции органелл клеток пшеницы.

## Заключение

Комплексный анализ генома *T. aestivum* выявил значительное количество протеиназ (всего 1544), которое, по-видимому, обусловлено гексаплоидностью организма и наличием 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* (Zimin et al. 2017). Были идентифицированы уникальные группы протеиназ из семейства С1. Анализ данных ЖХ-МС/МС выявил существенное различие ~40% между деградами различных сортов пшеницы (Хакасская и Дарья). Различия были одинаково распределены между различными каталитическими типами протеиназ, что может указывать на комплементацию разных протеиназ друг другом. Эти данные подчеркивают важность

взаимодействия между компонентами деградома любого организма и пшеницы, в частности.

Инфекция биотрофными (*P. recondita*) или некротрофными (*S. nodorum*) патогенными микроорганизмами вызывала резкие изменения в составе детектируемых при помощи ЖХ-МС/МС протеолитических ферментов. Тем не менее, иммунный ответ связан с протеиназами, относящимися к одним и тем же семействам. Они включали не только уже изученные, но и еще не охарактеризованные семейства протеиназ, которые требуют дальнейшего изучения.

Кроме того, 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. Однако этот вывод следует подтвердить также с помощью других подходов.

Активация папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина- $\alpha$  является многоступенчатым рН-зависимым процессом и, по-видимому, может осуществляться как автокаталитически, так и в результате межмолекулярного взаимодействия, возможно, в результате протеолитического каскада.

## Выводы

1. Геном *T. aestivum* содержит 1544 протеиназы, принадлежащие к пяти основным каталитическим типам. Геном пшеницы содержит уникальные группы протеиназ из семейства C1;
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 числа 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- $\alpha$  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 pH.

Соискатель имеет 3 работы по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования (WoS, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Статьи:

1. **Balakireva AV** and Zamyatnin AA Jr. Cutting out the gaps between proteases and programmed cell death. *Frontiers in plant science*, 10:704, 2019. IF = 4,298
2. **Balakireva AV**, Deviatkin AA, Zgoda VG, Kartashov MI, Zhemchuzhina NS, Dzhavakhiya VG, Golovin AV, Zamyatnin AA Jr. 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12):3991, 2018. IF = 4,183
3. **Balakireva AV** and Zamyatnin AA Jr. Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(2), 629. IF = 4,183

Материалы конференций:

1. **Balakireva AV**, Varennes-Jutras P, van der Hoorn RAL, Zamyatnin AA, Jr. “Determination of active forms of triticain- $\alpha$ , implemented in response to various types of stress in wheat”, UK – Russia Young Medics Conference, Abstract Book, 2019, pp. 19-20;
2. **Balakireva AV**, Zgoda VG, Tikhomirova NK, Savvateeva LV, Zernii EY, Zamyatnin AA Jr. Distinct patterns of activation of papain-like cysteine protease Triticain- $\alpha$  in vivo. *FEBS open bio*, 2018, 8: P.06-002-Tue;
3. Замятнин АА, **Балакирева АВ**, Гороховец НВ, Зерний ЕЮ, Кузнецова НВ, Макаров ВА, Петушкова АИ, Савватеева ЛВ. Создание энзиматического средства для эффективной детоксификации глютена. Международная научная конференция по биоорганической химии «XII Чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, спецвыпуск *Acta Naturae*, 2017, с. 155-156;
4. Zamyatnin AA Jr. **Balakireva AV**, Gorokhovets NV, Kuznetsova NV, Makarov VA, Petushkova AI, Savvateeva LV, Zernii EY. Targeting at gluten intolerance culprit: development of enzymatic tools for effective gluten detoxification. Abstract Book of International Conference “Toolkits for DNA vaccine design, an update”, 2016, p. 29.