

ПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТочНАЯ СМЕРТЬ У РАСТЕНИЙ

©2012 г. А. С. ФОМИЧЕВА¹, А. И. ТУЖИКОВ²,
Р. Е. БЕЛОШИСТОВ¹, С. В. ТРУСОВА²,
Р. А. ГАЛИУЛЛИНА², Л. В. МОЧАЛОВА²,
Н. В. ЧИЧКОВА², А. Б. ВАРТАПЕТЯН^{2*}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики и

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского,
Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Каспазы – апоптотические протеазы животных.
III. Программированная клеточная смерть растений. IV. Заклю-
чение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Существование многоклеточных организмов требует удаления избыточных и поврежденных клеток, которые образуются как в ходе нормального развития, так и в процессе взаимодействия организма с внешней средой: при стрессовых воздействиях, вызывающих необратимые повреждения клеток, и при инфекции патогенами. Клеточный процесс, направленный на последовательное уничтожение (самоубийство) нежелательных клеток, известен как программированная клеточная смерть (ПКС). Наиболее изученной (хотя и не единственной) формой ПКС у животных является апоптоз, характеризующийся определенным набором морфологических и биохимических признаков [1]. Ключевую роль в программированном

Принятые сокращения: ВТМ – вирус табачной мозаики; ГО – гиперчувствительный ответ; ПКС – программированная клеточная смерть; АФС – 7-амино-4-трифторметил-кумарин; АМС – 7-амино-4-метилкумарин; АtМС – метакаспаза арабидопсиса; СНО – альдегидная группа; СМК – хлорметилкетон; FMK – фторметилкетон; VPE – вакуолярный процессирующий фермент.

*Адрес для корреспонденции: varta@genebee.msu.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (11-04-01120, 11-04-00984) и контрактами Министерства образования и науки РФ (П334, 14.740.11.0168).

самоубийстве клеток животных играют каспазы – семейство высокоспецифичных цистеиновых протеаз, активирующихся при апоптозе и вносящих единичные разрывы в молекулы ограниченного набора клеточных белков [2]. Каспазы обладают исключительной специфичностью гидролиза, внося разрыв после остатка аспарагиновой кислоты (D), находящегося в определенном аминокислотном контексте. Направленная фрагментация белков-мишеней каспазами приводит в конечном счете к упорядоченной гибели клетки. И напротив, ингибирование каспаз препятствует осуществлению апоптоза.

В полном соответствии с названием «апоптоз» (от греч. «опадание листьев»), ПКС функционирует и в организмах растений и используется для тех же целей, что и у животных. Растения используют ПКС как в процессе развития организма (например, при образовании ксилемы, прорастании семян, предотвращении самоопыления, старении), так и в ответ на стрессовые воздействия (солевой, температурный, окислительный стрессы) и при защите от патогенов. Как и в случае животных, ПКС может иметь разные формы [3, 4], но в целом можно проследить наличие ряда общих черт при ПКС в обоих царствах. К таким проявлениям ПКС относятся фрагментация ДНК, выход цитохрома с из митохондрий, сжатие клетки, генерация активных форм кислорода, экспонирование фосфатидилсерина и т.д. [5].

Следует отметить, что молекулярные механизмы ПКС растений изучены существенно хуже, чем в случае апоптоза животных клеток. Однако наличие ряда сходных морфологических черт в ПКС животных и растений позволяет предполагать, что при осуществлении ПКС организмы двух царств используют сходные принципы. В этой связи существенно и удивительно, что у растений, судя по результатам секвенирования растительных геномов, отсутствуют каспазы – основные исполнители ПКС животных. В то же время, имеются многочисленные данные о том, что ингибиторы каспаз животных способны подавлять развитие ПКС растений. В соответствии с этим, при ПКС растений часто наблюдается активация неидентифицированных «каспазо-подобных» протеаз, способных гидролизовать разнообразие пептидных субстратов каспаз [6]. Эти результаты позволяли думать, что в осуществлении ПКС у растений задействованы протеазы, являющиеся функциональными аналогами каспаз животных, но структурно сильно отличающиеся от каспаз.

В настоящем обзоре будут рассмотрены сходства и различия в проявлениях ПКС у животных и растений и приведены современные представления о протеазах растений, которые могли бы выполнять роль каспаз при ПКС в растительных организмах.

II. КАСПАЗЫ – АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОТЕАЗЫ ЖИВОТНЫХ

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КАСПАЗ

Ряд особенностей отличает каспазы животных от других протеаз. Как следует из названия, это цистеин-зависимые аспаратат-специфичные протеазы (caspases, cysteine-dependent aspartate-specific proteases). У млекопитающих идентифицировано примерно 10 каспаз, обладающих строгой аспарататной специфичностью гидролиза и различающихся предпочитаемым мотивом сайта узнавания [7]. Для того, чтобы избежать преждевременного срабатывания механизма клеточной гибели, каспазы синтезируются и хранятся в цитоплазме клетки в виде неактивных предшественников – прокаспаз. Активация прокаспаз заключается в их процессинге, при этом удаляется продомен, а основная часть белка расщепляется на две субъединицы – p20 и p10. Активный фермент представляет собой гомодимер, где каждый мономер состоит из одной цепи p20 и одной – p10. Комплекс формирует два симметричных активных центра [8]. Каталитическая диада представлена аминокислотными остатками цепи p20 и состоит из остатка цистеина активного центра, который является частью консервативной последовательности QACXG, и остатка гистидина.

Абсолютная специфичность каспаз животных к гидролизу пептидной связи после остатка D стала уже притчей во языцех. Каспазы очень избирательны и обычно производят один, редко два разрыва на белок, т.е. являются не деградирующими, а процессирующими протеазами. Это связано с тем, что в субстрате каспазы обычно узнают тетрапептидную последовательность, содержащую на С-конце остаток аспарагиновой кислоты, после которой и происходит гидролиз пептидной связи (позиция P1 субстрата). Предпочтительные последовательности гидролиза для разных каспаз определяются аминокислотным мотивом сайта узнавания [9, 10].

К настоящему времени описано примерно 400 субстратов, расщепляемых каспазами (эти белки-мишени представлены в базе данных 'CASBAH', <http://www.casbah.ie>). Среди них структурные белки, белки-регуляторы транскрипции и трансляции, киназы, компоненты сигнальных путей, белки патогенов и др. Цель ограниченного протеолиза клеточных белков каспазами заключается в последовательном переключении клеточных путей от жизни к упорядоченной смерти. Представление о том, что фрагментация белков-мишеней каспазами приводит к инактивации жизненно важных для клетки белков и поэтому приводит к смерти – верно лишь отчасти.

Другая задача каспазного гидролиза – активация про-апоптотических механизмов в умирающей клетке. Так, фрагментация белка Bid, принадлежащего к семейству Bcl-2, сообщает образующемуся фрагменту Bid (называемому tBid, truncated Bid) способность направляться в митохондрии и промотировать выход цитохрома с из митохондрий, что приводит к резкому усилению каспазной активности в клетке (см. ниже) [11, 12].

Другой канонический пример активации путем каспазного гидролиза – это нуклеаза CAD. В здоровых клетках активность этой нуклеазы подавлена за счет ее взаимодействия с белком-ингибитором, называемым ICAD. Активирующаяся при индукции апоптоза каспаза-3 вносит два разрыва в молекулу ICAD, что приводит к снятию ингибирования, активации нуклеазы путем ее димеризации и, в конечном счете, к межнуклеосомной фрагментации клеточной ДНК с образованием столь характерного для апоптотических клеток ДНК-«леддера» [13–15].

Следует заметить, однако, что общее число белков-мишеней каспаз относительно невелико – примерно 2% от всех белков клеток млекопитающих. Гидролиз всех ли мишеней каспазами необходим для осуществления апоптоза, или некоторые из белков просто попадают под горячую руку [16] – вопрос в большинстве случаев открытый и требующий дальнейшего изучения.

По своим функциям в апоптотическом каскаде каспазы делятся на 2 группы. Инициаторные каспазы (каспазы-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) активируются в ответ на про-апоптотические или другие стимулы и участвуют в процессинге (т.е. в активации) белков-предшественников других каспаз, образуя, таким образом, каскад протеолитических ферментов. Эффекторные, или исполнительные, каспазы (-3, -6, -7) активируются вышестоящими в каскаде инициаторными каспазами и гидролизуют разнообразные клеточные белки (о которых шла речь выше), вызывая гибель клеток [17, 18]. В соответствии с этим делением различаются и структуры этих ферментов. Инициаторные каспазы обладают протяженным продоменом, в котором локализованы один или два мотива, ответственных за взаимодействие с адапторными молекулами. Это так называемые DED (death effector domain) и CARD (caspase recruitment domain). Эффекторные каспазы обладают более коротким продоменом.

Каспазы можно подразделить также на про-апоптотические и про-воспалительные. Про-апоптотические каспазы (-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) в основном вовлечены в осуществление процесса ПКС. Про-воспалительные каспазы (-1, -4, -5, -11, -12) принимают учас-

тие в процессинге цитокинов при воспалении. Однако поскольку активация про-воспалительных каспаз может провоцировать апоптоз, это подразделение каспаз на группы удобно, но условно. Вместе с тем, накапливается все больше данных о том, что каспазы могут участвовать в различных клеточных процессах, не связанных с апоптозом или воспалением. Показано, что каспаза-8 принимает участие в пролиферации иммунных клеток [19–22] и в клеточной дифференцировке [23]. Каспаза-3 участвует в дифференцировке долгоживущих клеток скелетных мышц, остеобластов и нейронов [24, 25]. Показательный пример – это участие про-воспалительной каспазы-1 в процессинге предшественников интерлейкинов IL-1 β и IL-18 [26, 27]. Также, каспаза-3 способна процессировать белок-предшественник IL-16 [28].

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КАСПАЗ

Активация каспаз происходит при получении клеткой определенных про-апоптотических сигналов [29]. Различают два пути активации каспаз при индукции ПКС. Один из них связан с группой трансмембранных белков – «рецепторов смерти», которые играют роль поверхностных сенсоров, улавливающих внешние лиганды, сигнализирующие о необходимости апоптоза. Наиболее известные из «рецепторов смерти» – это рецептор фактора некроза опухоли (TNFR1), а также Fas, DR3, TRAILR1 (TNF related apoptosis-inducing ligand receptor 1), TRAILR2 и другие [30]. Под действием соответствующих лигандов рецепторы смерти мультимеризуются, образуя DISC-комплексы (death-inducing signaling complexes). Со стороны цитоплазмы в комплекс DISC вовлекаются адапторные белки. Например, для рецепторов Fas или TRAIL это белок FADD (Fas-associated DD protein), который включается в комплекс своим C-концевым DD-доменом, а N-концевым DED (death effector domain) доменом взаимодействует с таким же доменом каспазы-8. Считается, что олигомеризация молекул каспазы-8 в DISC-комплексе приводит к автокаталитической активации каспазы и, тем самым, к инициации процесса программированной клеточной смерти [17, 31]. В зависимости от типа клеток каспаза-8 может активировать, отщепляя продомен, исполнительные каспазы -3 и -7, и это оказывается достаточным для осуществления апоптотической гибели клетки. В других случаях сигнал, полученный каспазой-8, может амплифицироваться через митохондриальный путь апоптоза [12].

Митохондриальный («внутренний») путь – это другой путь, приводящий к гибели клетки. Он включается при внутренних неполадках

клетки (нарушение целостности ДНК, различного рода стрессы, цитотоксические препараты). Регуляция этого пути происходит при участии большой группы белков, относящихся к семейству Bcl-2. В нем присутствуют как про-, так и анти-апоптотические белки [32–39]. При поступлении апоптотического сигнала активируются про-апоптотические белки этого семейства, которые образуют олигомерный комплекс Bак–Вах во внешней мембране митохондрий. В результате формируются каналы, по которым цитохром с выходит из митохондрий [40]. Цитохром с, в свою очередь, стимулирует сборку комплекса, который получил название «апоптосома» [41], и запускает цепь событий, ведущих к активации прокаспазы-9. Апоптосома представляет собой мультибелковый комплекс, в состав которого входят белки Аraf-1, цитохром с и в качестве кофактора dATP/ATP [42–44]. Она служит «платформой» для связывания и димеризации прокаспазы-9, что, в свою очередь, ведет к автокаталитическому процессингу прокаспазы. В результате образуются две субъединицы каспазы-9, p35 и p12, объединенные в активные димеры [45]. После активации в апоптосоме каспаза-9 запускает процессинг каспаз-2, -3, -6, -7, -8, а также, возможно, каспазы-1 [18, 46].

Два пути активации апоптотических событий не являются независимыми. Про-апоптотический белок Bid непосредственно расщепляется каспазой-8, и образующийся С-концевой фрагмент этого белка стимулирует выход цитохрома с из митохондрий [12], усиливая таким образом апоптотический эффект от сигнала, поступившего через внешние рецепторы.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ

Учитывая, что решение «жить или умереть» весьма важно для клетки и для организма в целом, было бы странно, если бы активность каспаз не контролировалась разнообразными способами. Известно, что существует многоступенчатая система контроля активности каспаз [47]. Так, при индукции апоптоза происходит резкое усиление экспрессии генов каспаз [48–50]. Активность самих каспаз, а, следовательно, и развитие апоптотических событий также регулируется с помощью разнообразных киназных сигнальных путей. Показано, например, что фосфорилирование каспазы-9 ведет к ингибированию её активности [51, 52] и сдерживанию апоптоза. Помимо этого, в клетках животных содержатся эндогенные белки-ингибиторы, способные регулировать активность зрелых каспаз *in vivo*. Наиболее значимыми из них являются белки семейства IAP (inhibitor of apoptosis) [53, 54]. Они способны связываться с каспазами и

не только нейтрализуют низкий уровень каспазной активности, но и создают барьер, при превышении которого начинается резкая активация каспазного каскада [55]. Существуют также белки, дерепрессирующие связанные с IAP каспазы. При индукции ПКС эти белки (Smac, HtrA2 и некоторые другие) выходят из межмембранного пространства митохондрий под действием про-апоптотических белков семейства Bcl-2. Smac способен вытеснять IAP из его комплекса с каспазой, таким образом активируя апоптотическую протеазу [56]. По-видимому, аналогичным образом действует и HtrA2. Но, поскольку HtrA2 сам является протеазой, то у него есть и еще один способ снятия ингибирования каспазы, на этот раз необратимо. HtrA2 способен расщеплять большинство известных IAP, активируя таким образом каспазы [57, 58]. Помимо этого, некоторые вирусные белки (белок р35 бакуловирусов, серпин СгтА вируса коровьей оспы) обладают способностью ингибировать каспазы в клетках организма хозяина [59–61], что не очень удивительно, поскольку во многих случаях быстрая смерть клетки помешает репликации вируса.

III. ПРОГРАММИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ РАСТЕНИЙ

ФОРМЫ И ПРОЯВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ

Как отмечено выше, апоптоз у животных и ПКС у растений имеет ряд сходных морфологических черт [3–5]. Однако в проявлениях ПКС у растений есть и своя специфика. Так, фрагментация ДНК в клетках растений происходит в некоторых моделях ПКС с образованием протяженных фрагментов ДНК, а не межнуклеосомного «леддера». На финальной стадии развития ПКС между животными и растениями также наблюдается существенная разница. У животных умирающая клетка образует апоптотические тельца, которые мгновенно фагоцитируются, что позволяет избежать лизиса умирающих клеток и воспалительного ответа организма. У растений фагоцитоза умирающих клеток не происходит не только из-за отсутствия профессиональных фагоцитирующих клеток, но и из-за наличия жесткой целлюлозной стенки, разделяющей клетки. Образования апоптотических телец также не было отмечено у растений. Поэтому апоптотическая растительная клетка в конце концов должна лизировать, и ее содержимое утилизируется.

Степень деградации клеточной стенки может варьировать в зависимости от типа формируемой ткани. Глубокая деградация наблю-

дается при формировании аэренхимы, при образовании перфораций в листьях и при отмирании лепестков [62–64]. В результате на месте бывшей клетки остается пустое пространство. Но нет худа без добра. Включение механизма ПКС, ведущее к образованию аэренхимы – каналов, по которым кислород может доставляться к корням из надземных частей растения, – позволяет некоторым растениям (в частности, рису) выживать на затопленных почвах. В иных случаях клеточная стенка остается интактной, как, например, в случаях образования ксилемы, перестройки организации тканей листа или при формировании плодовых тел [65, 66].

Недавно была предпринята попытка классифицировать клеточную смерть у растений на основании набора характерных морфологических признаков. Согласно этой классификации, были выделены два основных типа клеточной смерти: вакуолярная клеточная смерть и некротическая клеточная смерть [67]. Вакуолярная клеточная смерть рассматривается как комбинация автофагии, осуществляемой вакуолями и сопровождающаяся увеличением их размеров, и последующего высвобождения гидролаз из литических вакуолей в результате разрыва мембраны вакуолей (тонопласта). При этом морфология клеточных органелл и целостность плазматической мембраны клетки сохраняется до момента разрыва тонопласта. Такой тип клеточной смерти занимает дни и характерен для ПКС, происходящей в процессе развития организма.

В противовес этому, некротическая смерть сопровождается быстрым разрывом плазматической мембраны, сжатием протопласта, нарушением функционирования митохондрий, накоплением активных форм кислорода и отсутствием характерных черт вакуолярной смерти. Некротическая смерть происходит, как считается, в условиях абиотических стрессов.

Однако существует целый ряд примеров ПКС у растений, которые не попадают ни в одну из описанных категорий. Так, например, гиперчувствительный ответ (ГО) клеток растения на заражение патогенами (см. ниже) является хорошо описанной формой ПКС, но при этом сочетает в себе признаки как вакуолярной, так и некротической смерти. Также, сжатие протопласта может означать, что произошел разрыв плазматической мембраны клетки. Например, описан такой вариант ГО, при котором плазматическая мембрана клетки сохраняет свою интактность, несмотря на сжатие протопласта [68], что указывает на отсутствие прямой связи между этими явлениями.

Понятно, что предложенная классификация, основанная лишь на морфологических признаках и допускающая значительное количество неклассифицируемых исключений, является предварительной. Поэтому было бы желательно иметь представление о молекулярных механизмах и основных компонентах аппарата ПКС у растений для ее совершенствования.

Некоторые сведения такого рода получены при изучении гиперчувствительного ответа растений. ГО как форма ПКС обусловлен тем, что растения, в отличие от животных, не имеют иммунной системы, которая могла бы обезвреживать патогены и инфицированные клетки. Поэтому растения используют другую стратегию – индукцию самоубийства зараженных и окружающих их клеток. Это, с одной стороны, препятствует размножению патогена, а с другой – создает барьер из мертвых клеток, отделяющий патоген от здоровой ткани [69, 70]. Морфологические признаки клеточной смерти при ГО во многом совпадают с перечисленными выше, наблюдаемыми при ПКС, индуцированной другими стимулами. Для индукции ГО требуется распознавание специальным белком растения (продуктом R (resistance)-гена) соответствующего белка патогена (продукта так называемого гена авирулентности Avr) [71, 72]. Пары генов R и Avr могут кодировать разнообразные белки, или же эти гены могут отсутствовать. Так, в случае растений табака, заражаемых вирусом табачной мозаики (ВТМ), геном устойчивости является так называемый N ген, который имеется не у всех сортов табака. Продукт этого гена распознает вирусный белок репликазу (который в данном случае и является продуктом гена авирулентности) и включает ГО. В результате, ценой гибели ограниченного числа клеток растение предотвращает развитие вирусного заражения. Растения, не имеющие гена устойчивости, не отвечают индуцированной клеточной смертью (ГО) на заражение, в результате чего патоген распространяется по всему растению.

Вакуоли играют существенную роль в ПКС, происходящей не только в процессе развития растительных организмов, но и при ГО, вызванном заражением растений вирусными, бактериальными или другими патогенами. Описаны два сценария развития событий. При вирусной инфекции происходит лизис тонопласта с высвобождением литических ферментов вакуолей в цитозоль [73, 74]. Это имеет биологический смысл, так как подавляющее большинство вирусов растений размножается именно в цитозоле.

При бактериальном или грибном заражении патоген находится вне клетки растения – в межклеточной жидкости, называемой апопла-

стом. Такие патогены осуществляют воздействие на клетки растений посредством так называемых «эффektorных» белков, секретируемых патогенами в растительные клетки. Для борьбы с некоторыми внеклеточными патогенами вакуолярная мембрана способна сливаться с плазматической мембраной, позволяя гидролитическим ферментам вакуоли выходить во внеклеточное пространство [75]. Слияние мембран индуцируется взаимодействием продукта R-гена растения и фактора авирулентности патогена и заканчивается не только нейтрализацией патогена, но и индукцией ПКС в заражаемых клетках растений. Процесс слияния вакуолярной мембраны с плазматической, происходящий при ПКС, вызванной определенными штаммами патогенов, как оказалось, требует функционирования протеасом растительной клетки. Подавление активности протеасомы с помощью пептидных ингибиторов подавляет слияние мембран и выброс вакуолярных белков в межклеточное пространство [75]. Сайленсинг любого из генов, кодирующих субъединицы протеасомы *Arabidopsis thaliana*, также подавляет слияние мембран.

Активность протеасомы важна не только для слияния мембран, но и для развития ГО при бактериальной инфекции. Так, измеряя процент мертвых клеток (по их способности окрашиваться трипановым синим и по электропроводности тканей, возрастающей при гибели клеток), авторы [75] показали, что подавление активности любой из субъединиц протеасом препятствует развитию ГО.

Интересно, что пептидный ингибитор каспазы-3 человека Ac-DEVD-FMK (более подробно о структуре пептидных ингибиторов каспаз см. в следующем разделе) предотвращал развитие ГО в случае бактериальной инфекции, что дало авторам [75] основание думать, что для слияния мембран нужна активность, подобная активности каспазы-3, и что эта каспазо-подобная активность может принадлежать растительной протеасоме.

Следует заметить, что тот факт, что протеасомы животных и дрожжей обладают каспазо-подобной активностью, известен уже давно [76]. Более того, ингибитор протеасомы животных Ac-APnLD-CHO (nL = норлейцин) оказался также ингибитором субъединицы PBA1 растительной протеасомы, что указывало на возможное наличие у этой субъединицы каспазо-подобной активности. Сайленсинг гена PBA1 арабидопсиса снижало DEVDазную активность, обнаруживаемую в экстрактах, что не противоречило высказанному предположению, но, однако, и не являлось его строгим доказательством. При этом наблюдалось ингибирование и других субъединиц протеасомы, обладающих

трипсин- и химотрипсин-подобными активностями. Помимо этого, общий ингибитор протеасомы класто-лактистин β -лактон, а также сайленсирование генов других субъединиц протеасомы также подавляло клеточную смерть. Складывается впечатление, что определяющим фактором в осуществлении данного типа ПКС является активность протеасомы в целом, а не предполагаемая каспазо-подобная активность субъединицы РВА1. В соответствии с этим, использование биотинилированного ингибитора DEVD-FMK привело к подавлению активности не только РВА1, но, как ни странно, и других субъединиц протеасомы. Тем не менее, субъединица РВА1 связывала ингибитор DEVD-FMK. Впрочем, традиционный ингибитор протеасомы MG132 (LLL-CHO), не содержащий остатка D, также был способен модифицировать РВА1 [77]. По-видимому, вопрос о том, проявляет ли какая-либо из субъединиц растительной протеасомы специфичную каспазо-подобную активность и нужна ли эта активность для осуществления ПКС у растений, требует дальнейшего уточнения.

ПОДХОДЫ К ОБНАРУЖЕНИЮ КАСПАЗО-ПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ РАСТЕНИЙ

Несмотря на наличие ряда сходных черт в проявлении ПКС у животных и растений, остается открытым вопрос, насколько сходны молекулярные механизмы ПКС в двух царствах. Например, отсутствие у растений каспаз – ключевых апоптотических ферментов животных – является удивительным примером различия (по крайней мере, формального) между ПКС животных и растений. Поэтому поиск ответа на вопрос, выполняют ли какие-нибудь протеазы растений функции каспаз при ПКС, и если да, то что это за протеазы, – весьма актуален.

Аргументом в пользу того, что протеазы растений со специфичностью каспаз могут существовать и быть задействованы в осуществлении ПКС, послужило то обстоятельство, что белковые ингибиторы каспаз животных (бакуловирусные белки р35 и Ор-IAP), продуцируемые в растениях, в ряде случаев препятствуют развитию апоптоза. Трансгенные растения томатов, содержащие ген р35, оказались более устойчивыми к токсин-индуцируемой ПКС и поражению различными патогенными грибами [78], а развитие ГО в листьях трансгенного (по гену р35) табака, вызванное заражением бактерией *Pseudomonas syringae*, оказалось частично подавленным [79]. В обоих случаях такие же трансгенные растения, но содержащие ген мутантного белка р35, не являющегося ингибитором каспаз

животных, не обладали анти-апоптотическими свойствами. В эмбриональном каллусе кукурузы экспрессия гена p35 также вызывала подавление апоптоза [80]. Транзистная экспрессия гена p35 в протопластах *A. thaliana* предотвращала фрагментацию ДНК и гибель клеток при УФ-облучении [81]. Трансгенные растения табака, содержащие ген белка Op-IAP, ингибитора каспаз, демонстрировали повышенную устойчивость к ПКС, проявляющуюся в подавлении образования областей мертвых клеток при инфекции вирусным или бактериальным патогеном [82]. Эти результаты подразумевали, что в клетках растений могут существовать протеазы со специфичностью каспаз, и что эти ферменты могут быть вовлечены в процесс ПКС и в защитные реакции растений.

Поскольку природный белковый субстрат гипотетических каспаз растений не был известен, то наиболее прямой путь обнаружения каспазо-подобной активности в растениях заключался в использовании пептидных флуорогенных субстратов, а также пептидных ингибиторов каспаз животных. Стандартными пептидными субстратами каспаз служат тетрапептиды с последовательностью XXXD-AFC (AFC – 7-амино-4-трифторметил-кумарин), где мотив, предшествующий аминокислотному остатку D, после которого происходит гидролиз связи ферментом, характерен для каждой (или нескольких) каспазы животных. В результате гидролиза ферментом от C-концевого аспартата отщепляется AFC, который начинает флуоресцировать (длина волны 505 нм), что и позволяет детектировать расщепление субстрата флуориметрически. Специфические пептидные ингибиторы каспаз животных имеют те же аминокислотные последовательности XXXD, но остаток аспартата в них модифицирован альдегидной (СНО), фторметилкетонной (FMK) или хлорметилкетонной (СМК) группой, которая при связывании субстрата с ферментом модифицирует аминокислотный остаток активного центра (цистеин в случае каспаз) [83].

Использование пептидных субстратов каспаз для выявления активности апоптотических протеаз растений началось в 1998 г. со ставшей классической публикацией del Pozo & Lam [84]. Эти авторы использовали экстракты из листьев табака NN-генотипа, зараженных вирусом табачной мозаики (ВТМ), в которых развивался ГО, или же экстракты незараженных растений. Оказалось, что в экстрактах апоптотических листьев детектируется протеолитическая активность, гидролизующая специфический субстрат каспазы-1 Ac-YVAD-AFC, в то время как в экстрактах здоровых листьев такая активность не наблюдается. Более того, специфические ингибиторы каспаз

Ac-YVAD-СМК и Ac-DEVD-СМК были способны подавлять как эту YVADазную активность, так и препятствовать развитию ПКС в растениях табака, вызванному бактериальной инфекцией *P. syringae*. Последнее обстоятельство особенно существенно, так как оно позволяет думать, что обнаруженная YVADазная активность может иметь отношение к исполнению программы клеточной смерти.

С тех пор опубликованы десятки работ, в которых испытывали те или иные пептидные субстраты и ингибиторы каспаз животных для выявления каспазо-подобных активностей у растений. В зависимости от того, какой именно пептид оказывался у авторов под рукой, обнаруженные активности называли DEVDазой, VEIDазой, YVADазой и т.д. (см. обзор Vonpeau и соавт. [6]). Интересно, что спектр детектируемых каспазо-подобных активностей, обнаруживаемых при ПКС растений, вызванной различными биотическими и абиотическими стимулами, может существенно различаться. Так, довольно часто регистрируется DEVDазная активность, однако в ряде случаев такая активность отсутствует и наблюдается другая – например, YVADазная.

Подводя итог результатам, полученным с использованием описанного подхода – применения пептидных субстратов и ингибиторов каспаз животных – следует отметить, что они дали веские основания считать, что в различных модельных системах ПКС у растений активируются протеазы со специфичностью каспаз, и что активность этих протеаз может быть важна для осуществления ПКС.

МЕТАКАСПАЗЫ

Вскоре после расшифровки геномов арабидопсиса и риса стало очевидно, что растения (по крайней мере, те, чьи геномы секвенированы) не содержат генов каспаз, которые можно было бы обнаружить путем простого поиска по гомологии. Поэтому описанные выше каспазо-подобные активности, наблюдающиеся при ПКС растений и участвующие в осуществлении ПКС, по-видимому, принадлежат протеазам, структурно отличающимся от каспаз. С этим заключением было трудно смириться, поэтому всеобщее воодушевление вызвало обнаружение, с помощью изоширенного биоинформатического анализа, двух семейств протеаз, отдаленно напоминающих каспазы [85]. Одно из этих семейств, встречающееся у животных и миксомицетов (и поэтому не представляющее для нас сейчас непосредственного интереса), было названо паракаспазами, а другое, встречающееся у растений, грибов и простейших, – метакаспазами.

Структурно метакаспазы относятся к клану CD цистеин-зависимых протеиназ, в который также входят каспазы (гидролизующие

после аминокислотного остатка D), легумаины (гидролизующие после остатка N и, реже, N и D), сепаразы (гидролизующие после остатка R) и бактериальные протеазы клострипаины и гингипаины (гидролизующие после R и K). Эти протеолитические ферменты объединяют в один клан, поскольку они имеют общий тип пространственной структуры, называемый «caspase/hemoglobinase fold» [86], и содержат характерную диаду каталитических остатков Cys и His. Геномы растений содержат примерно 10 генов метакаспаз. Метакаспазы синтезируются в виде белков-предшественников и подразделяются на два типа [87]. Метакаспазы растений типа I (они преобладают у ряда растительных организмов) имеют N-концевой продомен, а метакаспазы типа II его не имеют. В структуре метакаспаз выделяют, по аналогии с каспазами, большую (20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы. В случае белка-предшественника метакаспаз типа II малая субъединица отделена от большой довольно протяженным линкерным участком. В состав большой субъединицы метакаспаз входит, как и в случае каспаз, каталитическая диада His и Cys. Образование зрелой метакаспазы происходит путем автокаталитического процессинга зимогена [88, 89]. Метакаспазы локализованы в цитозоле клетки растения (рис.).

Открытие метакаспаз у растений дало основание ожидать, что метакаспазы и являются искомыми аналогами каспаз у растений, обладающими специфичностью и функциями каспаз. Поначалу казалось, что метакаспазы растений действительно обладают специфичностью гидролиза каспаз животных. При суперэкспрессии генов метакаспаз в растениях отмечалась повышенная каспазная активность, а при РНК-интерференции метакаспаз – подавление каспазной активности, что выявляли с помощью флуорогенных пептидных субстратов каспаз животных [90, 91]. Однако все встало на свои места, когда метакаспазы растений были выделены в чистом виде и получены рекомбинантные ферменты, и когда был изучен автокаталитический процессинг белков-предшественников метакаспаз. Оказалось, что метакаспазы не гидролизуют пептидные субстраты каспаз, а обладают строгой Arg- и Lys-специфичностью [88, 92–94]. Развернувшаяся затем в литературе бурная многолетняя дискуссия, можно ли считать метакаспазы каспазами [95–97], завершилась недавно заключением, что метакаспазы каспазами не являются уже потому, что не имеют аспаргатовой субстратной специфичности.

И все же, пусть метакаспазы и не оказались теми аспаргат-специфичными апоптотическими протеазами растений, за которыми шла

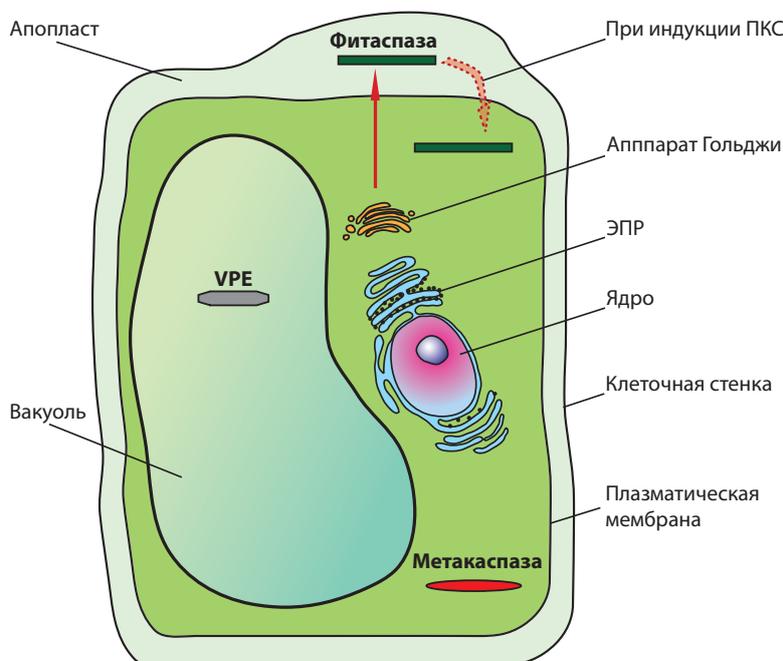


Рис. Разнообразие локализации протеаз, участвующих в осуществлении программированной клеточной смерти растений.

Метакаспазы находятся в цитозоле, VPE – в вакуолях. Фитаспазы секретируются из растительной клетки (с помощью канонического пути, включающего эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и аппарат Гольджи) в межклеточную жидкость (апопласт) здоровых растений. При индукции клеточной смерти фитаспазы быстро перемещаются из апопласта в цитозоль.

охота, что удалось узнать нового в отношении ПКС растений при изучении метакаспаз? Современная точка зрения на метакаспазы растений состоит в том, что метакаспазы вовлечены во многие процессы в растительной клетке, включая ПКС. Сайленсинг гена одной из метакаспаз приводил к нарушению терминальной дифференцировки клеток и развития зародыша ели [91]. Нокауты по генам некоторых метакаспаз арабидопсиса не имели выраженных нарушений в осуществлении ПКС, что, возможно, связано с избыточностью (перекрыванием функций) метакаспаз. В то же время, суперпродукция метакаспазы-8 (AtMC8) усиливала, а РНК-интерференция – подавляла ПКС в протопластах, вызванную УФ-облучением и перекисью водорода [98]. Семена и побеги нокаутированных по AtMC8 растений

арабидопсиса проявляли повышенную устойчивость к обработке гербицидом метилвиологеном. Описано участие метакаспазы арабидопсиса AtMC4 в осуществлении клеточной смерти, вызванной окислительным стрессом и токсином фумонизином В-1 [99]. Недавно показано, что метакаспаза AtMC1 типа I арабидопсиса является позитивным регулятором ГО, а другая метакаспаза (AtMC2) подавляет про-апоптотическое действие первой [100]. Интересно, что для этого подавления не требовалось наличия протеолитической активности у AtMC2, поскольку мутант по остатку Cys активного центра сохранял анти-апоптотические свойства. Таким образом, метакаспазы, по-видимому, являются мультифункциональными клеточными ферментами.

Единственным известным белковым субстратом метакаспаз растений является эволюционно консервативный белок TSN (Tudor staphylococcal nuclease), функция которого у растений не установлена [101]. Рекомбинантный белок TSN гидролизуется метакаспазой mCP-Ра ели в четырех местах в соответствии со специфичностью метакаспаз (после остатков R и K). Аналогичная фрагментация этого белка наблюдается при ПКС, вызванной окислительным стрессом или происходящей в процессе развития зародыша. Интересно отметить, что белок TSN человека является мишенью каспазы-3, однако в этом случае в молекулу TSN вносится всего один разрыв, имеющий регуляторное значение, который не совпадает с местами гидролиза метакаспазой.

ВАКУОЛЯРНАЯ ПРОТЕАЗА VPE

Вакуолярная протеаза растений VPE (vacuolar processing enzyme) является цистеин-зависимой протеазой, локализующейся в вакуолях растительной клетки (рис.), где она участвует в процессинге вакуолярных белков. VPE относится к легумаинам, которые, в свою очередь, входят в состав клана протеаз CD, к которому принадлежат каспазы, метакаспазы и ряд других протеаз (см. выше). Принадлежность VPE к клану CD проявляется в пространственной укладке протеолитического домена и наличии каталитических остатков His и Cys в характерных позициях. Однако сходство аминокислотной последовательности VPE и других представителей клана очень невелико. Так же, как и большинство протеаз, VPE арабидопсиса синтезируется в виде неактивного предшественника, причем отщепляемые продомены находятся как с N-, так и с C-конца протеазного домена. Процессинг белка-предшественника может осуществляться автокаталитически [102, 103]. На самом N-конце белка-предшественника расположен

сигнальный пептид, направляющий синтезируемый белок в вакуоль.

VPE обладает характерной для легуминов субстратной специфичностью, гидролизуя пептидную цепь после остатка аспарагина (N), и каноническим ингибитором этой протеазы является Ac-ESEN-CHO. Использование ряда синтетических пептидов, соответствующих некоторым белкам растений, показало, что VPE может гидролизовать пептидные связи и после некоторых остатков D, хотя эффективность такого расщепления ниже, чем после остатка N [102]. Более того, один из каспазных ингибиторов, биотинилированный VAD-FMK, введенный в листья, ковалентно связывался с VPE [104]. Интересно, что Ac-YVAD-CHO мог выступать в качестве конкурента VAD-FMK, а Ac-DEVD-CHO такой способностью не обладал. Связывание VPE арабидопсиса с VAD-FMK и YVAD-CMK было подтверждено и другой группой исследователей [105]. На этом основании авторы пришли к заключению, что VPE растений обладает активностью каспазы-1. Продуцированная в клетках насекомых и «частично очищенная» рекомбинантная γ -VPE (одна из четырех форм VPE, существующих у растений) [106] обладала способностью гидролизовать флуорогенный субстрат VPE Ac-ESEN-AMC (AMC, 7-амино-4-метилкумарин) и каспазы-1 Ac-YVAD-AMC, но не гидролизовала Ac-DEVD-AMC (субстрат каспазы-3).

Еще один пример связан с VPE мака. Рекомбинантный фермент продуцировали в клетках *E. coli* и очищали с помощью аффинной хроматографии. Фермент был способен присоединять биотинилированный DEVD-CHO, но не YVAD-CHO. Что удивительно, такой активностью обладал белок-предшественник и фермент, сохранивший N-концевой продомен, а зрелая форма VPE не обладала [107]. Тем не менее, гидролитическая активность VPE мака проявлялась в отношении не только субстрата Ac-DEVD-AMC, но и YVAD-производного, а также производного IETD и, в меньшей степени, LEVD и VEID. И в этих случаях протеолитической активностью обладали лишь предшественники VPE, а не зрелая форма фермента. Другой неожиданный результат заключался в том, что обладающая активностью проVPE не подвергалась автокаталитическому процессингу.

Таким образом, в настоящее время не очень понятно, какой каспазо-подобной активностью обладает VPE, нужен ли процессинг белка-предшественника для активации фермента и как он происходит. Возможно, имеющиеся расхождения связаны с видовыми различиями или со способами получения фермента для анализа его активности. Как бы то ни было, имеет ли VPE отношение к ПКС растений? Существующие данные указывают на то, что VPE может быть

вовлечена в осуществление ПКС, и это, не в последнюю очередь, связано с локализацией этого фермента в вакуолях (рис.). Показано, что VPE принимает участие в ПКС, происходящей в листьях табака при вирусном (ВТМ) заражении и включающей разрыв тонопласта, фрагментацию ДНК и образование областей мертвых клеток. Сайленсинг четырех генов VPE подавляет коллапс вакуоли, фрагментацию ДНК и образование некрозов [74, 104, 108]. Каким именно образом VPE вовлечена в описанные процессы – неизвестно. Интересно, что экспрессия генов VPE возрастает в начале ГО и затем быстро падает. Возможно, это указывает на роль VPE на ранних этапах клеточной смерти. VPE вовлечена также в развитие ПКС, индуцируемое некоторыми токсинами грибов. Морфологически эта гибель клеток похожа на ВТМ-индуцируемый ГО [106]. И в этом случае инактивация всех четырех генов VPE подавляет осуществление ПКС.

Следует отметить, что ингибирование VPE (добавлением Ac-YVAD-FMK, в частности) не влияло на развитие ПКС в ответ на бактериальное заражение, в отличие от ПКС, вызываемой вирусной инфекцией [75]. При этом интересно отметить, что процесс слияния вакуолярной мембраны с плазматической, происходящий при ПКС, вызванной определенными штаммами патогенов, также не зависит от VPE.

Таким образом, существует связь между активностью VPE и некоторыми формами ПКС растений. В какой степени это участие VPE в клеточной гибели связано с вероятной каспазо-подобной активностью фермента и какие белки являются апоптотическими мишенями VPE – предстоит выяснить.

СУБТИЛИЗИН-ПОДОБНЫЕ ПРОТЕАЗЫ РАСТЕНИЙ С АСПАРТАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Продуктивным оказался альтернативный подход к поиску апоптотических протеаз растений, основанный на идентификации растительной протеазы, гидролизующей природный белок-мишень по тому же сайту, что и каспаза животных. В качестве белка-мишени был использован белок VirD2 агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* – патогена растений, который, как оказалось, может специфично фрагментироваться каспазой-3 человека. Было выяснено, что при индукции ГО в растениях табака *Nicotiana tabacum* генотипа NN, вызванного инфекцией ВТМ, происходит активация растительной протеазы, обладающей сходной специфичностью гидролиза белка VirD2 (расщепление белка после остатка D в мотиве TATD) [109]. Обнаруженная протеаза была названа фитаспазой (от «растительная

аспартат-специфичная протеаза») [110]. Активность фитаспазы регистрируется также при механическом разрушении растительной ткани, что позволило обнаружить активность фитаспазы у самых разных растений [111], включая двудольных и однодольных.

Идентификация фитаспаз табака и риса продемонстрировала, что фитаспазы являются субтилизин-подобными протеазами (субтилазами) растений [110]. И хотя с самого начала предполагалось, что каспазо-подобные (в функциональном смысле) протеазы растений должны структурно отличаться от каспаз животных (в противном случае фитаспазы давно идентифицировали бы по гомологии), трудно было ожидать, что различие будет столь значительным. Действительно, субтилизин-подобные протеазы структурно очень сильно отличаются от каспаз. Субтилазы являются Ser-зависимыми протеазами, в то время как каспазы – Cys-зависимые. Активная каспаза представляет собой тетрамер, состоящий из двух больших и двух малых субъединиц, в то время как фитаспаза является мономером. Наличие потенциального сигнального пептида в белке-предшественнике фитаспаз (см. ниже) могло указывать на внеклеточную локализацию фермента, а каспазы являются внутриклеточными белками (табл.).

Тем не менее, определение субстратной специфичности фитаспаз табака и риса показало, что эти ферменты, как и каспазы, гидролизуют субстраты строго после остатка D, находящегося в определенном аминокислотном контексте [110]. Оптимальным субстратом фитаспаз оказался пептид Ac-VEID-AFC (субстрат каспазы-6), хотя сравнимая (в 2–4 раза меньшая) скорость гидролиза наблюдалась в случае производных VAD (субстрат разнообразных каспаз), YVAD (субстрат каспазы-1), VDVAD (субстрат каспазы-2), IETD (субстрат каспазы-8), LEHD (субстрат каспазы-9) (табл.). Единственным исключением оказался Ac-DEV D-AFC (субстрат каспазы-9), который не гидролизывался фитаспазами вообще.

Способность фитаспаз из разных растительных организмов гидролизовать разнообразные пептидные субстраты каспаз может создать иллюзию относительно низкой избирательности растительного фермента. Однако такое заключение, по-видимому, ошибочно, учитывая то обстоятельство, что на уровне белковых субстратов по своей избирательности фитаспазы превосходят каспазу-3 человека. Фитаспаза, несомненно, является «процессирующим», а не «переваривающим» протеолитическим ферментом. Впрочем, это утверждение относится и к каспазам животных.

Фитаспаза с ее широким спектром гидролизуемых пептидных субстратов каспаз одна способна объяснить почти все многообразие

Таблица
**Сравнение свойств аспаргат-специфичных апоптотических
 протеаз животных и растений – каспаз и фитаспаз**

Параметр	Каспазы	Фитаспазы
Тип протеазы	Cys-зависимые, клан CD	Ser-зависимые, семейство субтилаз, подсемейство S8A
Специфичность гидролиза	Строго Asp-специфичные	Строго Asp-специфичные
Предпочитаемый аминокислотный мотив сайта узнавания	DEVD (каспаза-3,7), VEID (каспаза-6), IETD (каспаза-8), LEHD (каспаза-9), VDVAD (каспаза-2)	VEID; несколько хуже YVAD, VAD, IETD, LEHD и др. Не узнается: DEVD
Белки-субстраты	Различные белки клетки и патогенов	VirD2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Синтезируется в виде	Про-фермент	Пре-про-фермент
Способ процессинга	Индуцируемый, автокаталитический или осуществляемый другой каспазой	Конститутивный, автокаталитический
Зрелый фермент	Димер гетеродимеров, субъединицы ~ 12 кДа и ~ 20 кДа	Мономер, ~ 80 кДа
Локализация	Внутриклеточная, в основном цитоплазматическая	Внеклеточная в здоровых тканях (апопласт); перемещается в цитозоль при индукции ПКС
Роль в ПКС	Инициация и осуществление ПКС	На ранних стадиях (до участия митохондрий); фрагментация чужеродных белков

каспазо-подобных активностей, обнаруживаемых при ПКС растений с использованием таких субстратов. Поэтому, вероятно, количество разнообразных каспазо-подобных ферментов у растений не так удручающе велико, как принято считать. Есть, правда, одно исключение. Фитаспаза не обладает DEVDазной активностью (табл.), которая довольно часто выявляется при ПКС у растений. Следует ожидать поэтому, что, по крайней мере, еще одна каспазо-подобная протеаза растений до сих пор не открыта.

Было также выявлено участие фитаспаз в осуществлении ПКС у растений, вызванной биотическими и абиотическими стрессами. Повышение уровня активности фитаспазы при суперпродукции фермента стимулировало протекание клеточной смерти, а снижение активности фитаспазы при помощи специфического ингибитора или путем РНК-интерференции подавляло ПКС [110].

Таким образом, фитаспазы близки к каспазам как по своей специфичности, так и по той роли, которую эти протеазы играют в осуществлении ПКС. Однако структурно фитаспазы принципиально отличаются от каспаз, и это отличие, как оказалось, имеет важные функциональные следствия. Показано, что фитаспазы синтезируются в виде неактивного белка-предшественника, содержащего N-концевой сигнальный пептид, продомен и собственно протеазный домен. N-концевой сигнальный пептид в составе профермента направляет секрецию фитаспазы из растительной клетки. Активная фитаспаза образуется путем отщепления продомена. Этот процесс происходит автокаталитически и конститутивно, т.е. даже в отсутствие ПКС. Отщепление продомена необходимо для образования протеолитически активного фермента и для его секреции.

В здоровых тканях растений фитаспаза накапливается в межклеточной жидкости (апопласте) (рис.). Таким образом достигается пространственное разобщение фермента и его внутриклеточных субстратов. Однако при индукции ПКС фитаспаза перемещается из апопласта внутрь умирающей растительной клетки и получает доступ к своим внутриклеточным белкам-мишеням [110]. Механизм этого совершенно нового явления неизвестен, но имеются основания считать, что «ретроградный» транспорт фитаспазы происходит специфично.

Локализация процессированной фитаспазы в апопласте может означать, что у фермента имеются защитные функции, связанные с протеолизом (нейтрализацией) эффекторных белков бактериальных патогенов. В настоящее время известен единственный природный

белок-мишень апоптотических субтилаз растений, и это – белок VirD2 фитопатогенной бактерии *A. tumefaciens*. В процессе заражения растений бактериальный белок VirD2 с присоединенной к нему бактериальной ДНК (Т-ДНК) попадает в цитоплазму растительной клетки, а затем импортируется в ядро. Это обеспечивает интеграцию бактериальной ДНК в геном растений и трансформацию растительной клетки [112]. Для активного транспорта в ядро белок VirD2, хотя он и является бактериальным, оснащен сигналом ядерной локализации [113]. Показано, что гидролиз фитаспазой белка VirD2 агробактерий представляет собой защитный механизм растительной клетки, ограничивающий доставку в ядро и экспрессию чужеродной (агробактериальной) ДНК [114]. Это происходит потому, что следствием расщепления фитаспазой белка VirD2 по сайту TATD400 является удаление короткого С-концевого фрагмента белка VirD2. Поскольку именно в этой области VirD2 находится сигнал его ядерной локализации, то укороченный фитаспазой белок VirD2 утрачивает способность импортироваться в ядро растительной клетки и транспортировать туда присоединенную к нему бактериальную Т-ДНК.

Субтилизин-подобные протеазы подсемейства S8A, к которому принадлежат фитаспазы и все другие растительные субтилазы, обычно не отличаются высокой специфичностью гидролиза [115, 116]. Способность же специфично гидролизовать субстраты строго после остатка D вообще является редкостью среди протеаз. В этой связи следует отметить, что у каждого вида растений имеются десятки генов субтилаз (более 50 членов семейства у *A. thaliana* и более 60 – у риса *Oryza sativa* [117, 118]). Охарактеризованы лишь единичные представители этих семейств, и ни одна из идентифицированных ранее субтилаз активностью фитаспаз не обладала. Представляет интерес вопрос: сколько членов семейства субтилаз у каждого вида растений имеет аспаргатную специфичность – один или несколько? Если несколько, то было бы интересно узнать, различаются ли эти ферменты по предпочитаемым сайтам гидролиза, локализации, экспрессии в тканях, участию в ПКС в процессе развития и в ответ на стрессы.

По своей высокой избирательности гидролиза субстратов фитаспазы напоминают субтилизин-подобные протеазы животных и дрожжей, называемые пропротеин конвертазами и относящиеся к подсемейству S8B (которое у растений, по-видимому, не встречается) [119, 120]. Конвертазы участвуют в процессинге белков-предшественников, что ведет к образованию биологически активных пептидов и белков,

и можно допустить существование похожей функции у фитаспазы в свободное от ПКС время. Надо отметить, правда, что конвертазы вносят разрыв в белки-мишени после остатков основных аминокислот (K, R), а не после D.

К субтилизин-подобным протеазам растений относится, по-видимому, и саспаза овса [121]. Модель ПКС, в которой была обнаружена эта активность, представляла собой растения овса *Avena sativa*, заражаемые грибом *Cochliobolus victoria*. Этот патоген секретирует необычный токсин, называемый викторином. ПКС, вызываемая викторином, представляет собой ГО на заражение [68, 122, 123]. Из листьев овса, обработанных викторином, была выделена протеаза, названная саспазой (серин-зависимой аспаргат-специфичной протеазой). Саспаза, как и фитаспаза, способна гидролизовать многие пептидные субстраты каспаз [121, 124] и при этом не имеет DEVDазной активности. Секвенирование нескольких пептидов фермента показало, что сам белок должен принадлежать к субтилизин-подобным протеазам (субтилазам) растений. Можно думать, что саспаза – это фитаспаза овса, но между двумя ферментами есть и интересное различие. В то время как фитаспазы двух эволюционно отдаленных растений – табака и риса – предпочитают производное VEID в качестве субстрата, саспаза не гидролизует производное VEID вовсе [121]. Вопрос о причине этого отличия можно решить после идентификации саспазы.

Интересно, что при индукции ПКС викторином или тепловым шоком активность саспазы начинала детектироваться в апопласте, хотя до индукции ПКС такой активности в апопласте не наблюдалось [121]. Предполагается, что в ответ на индукцию ПКС может происходить либо быстрая секреция саспазы в апопласт, либо демаскирование уже находящейся в апопласте протеазы.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПКС у растений демонстрирует ряд общих черт с ПКС у животных, но, в то же время, имеет и ряд существенных отличий. Протеолитические ферменты, участвующие в осуществлении ПКС, локализуются в различных компартментах клеток растений: в цитоплазме (метакаспазы), в вакуолях (VPE), а также в межклеточной жидкости (фитаспазы) (рис.). Впрочем, пример фитаспазы, перемещающейся из апопласта в цитоплазму при индукции ПКС, показывает, что локализация фермента в определенном компартменте здоровых клеток (тканей) не исключает функционирования этой протеазы совсем в другом месте

умирающих клеток. Представляют существенный интерес вопросы, как распределяются функции между апоптотическими протеазами растений и способны ли они оказывать влияние на функционирование друг друга.

Из рассмотренных протеолитических ферментов растений, участвующих в осуществлении ПКС, фитаспазы наиболее близко соответствуют каспазам животных по субстратной специфичности (табл.). В то же время, структурно эти апоптотические протеазы животных и растений совершенно не похожи, и более того, фитаспазы являются Ser-зависимыми, а каспазы – Cys-зависимыми ферментами. Из сравнения свойств каспаз и фитаспаз складывается впечатление, что животные и растения руководствовались различными тактическими приемами, приведшими в итоге к сходному принципиальному решению: созданию протеаз со сходной функцией и специфичностью.

Животные и растения используют различные стратегии в отношении своих апоптотических протеаз. Как каспазы, так и фитаспазы синтезируются в виде неактивных белков-предшественников, однако дальше пути расходятся. Прокаспазы хранятся внутри клеток животных. Их активация путем процессинга и ассоциации субъединиц происходит в ответ на ПКС-индуцирующие стимулы и приводит к фрагментации внутриклеточных белков-мишеней и гибели клетки. В противоположность этому сценарию, профитаспазы процессируются конститутивно и автокаталитически с образованием активного фермента даже в отсутствие ПКС-индуцирующих воздействий. Однако зрелые фитаспазы при этом секретируются из клетки в апопласт – благодаря наличию сигнального пептида в составе белка-предшественника. Это позволяет пространственно отделить активный протеолитический фермент от внутриклеточных белков-мишеней и избежать несанкционированного протеолиза и гибели клеток. При индукции ПКС фитаспаза транспортируется из апопласта внутрь клеток, что приводит к фрагментации внутриклеточных белков.

Таким образом, контроль за внутриклеточной активностью каспаз осуществляется на уровне процессинга белков-предшественников, а фитаспаз – на уровне транспорта фермента из апопласта в цитоплазму. Можно заключить, что растения выработали свой собственный механизм контроля за апоптотическими протеазами, не встречающийся (или пока не обнаруженный) у животных [124, 125]. Таким образом, клетки животных и растений демонстрируют как общие черты, так и существенные различия в том, как они обращаются со своими апоптотическими протеазами.

Одним из основных способов выяснения механизма действия и новых функций апоптотических протеаз растений является обнаружение белков-мишеней этих ферментов. Исследование фрагментации клеточных белков должно позволить выявить важные черты в молекулярных механизмах ПКС растений, обнаружить новые сигнальные пути и осуществить более детальное сравнение аппаратов животных и растений, отвечающих за ключевые процессы в жизни и смерти клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Br. J. Cancer, **26**, 239–257.
2. Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1997) Trends Biochem. Sci., **22**, 299–306.
3. Williams, B., Dickman, M. (2008) Mol. Plant Pathol., **9**, 531–544.
4. Reape, T.J., Molony, E.M., McCabe, P.F. (2008) J. Exp. Bot., **59**, 435–444.
5. Reape, T.J., McCabe, P.F. (2010) Apoptosis, **15**, 249–256.
6. Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E., Gallois, P. (2008) J. Exp. Bot., **59**, 491–499.
7. Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003) Oncogene, **22**, 8543–8567.
8. Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Frensch, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., et al. (1994) Cell, **78**, 343–352.
9. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 17907–17911.
10. Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., Wong, W.W. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 9677–9682.
11. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Cell, **94**, 481–490.
12. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998) Cell, **94**, 491–501.
13. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) Cell, **89**, 175–184.
14. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) Nature, **391**, 43–50.
15. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998) Nature, **391**, 96–99.
16. Timmer, J.C., Salvesen, G.S. (2007) Cell Death Differ., **14**, 66–72.
17. Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., Blenis, J. (1998) Curr. Biol., **8**, 1001–1008.
18. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J. (1999) J Cell Biol., **144**, 281–292.
19. Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E., Lenardo, M.J. (2002) Nature, **419**, 395–399.
20. Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W.C.,

- McGlade, J.C., Ohashi, P.S., Hakem, R. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 883–895.
21. Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kolla, R.V., Hoffmann, A., Hedrick, S.M. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 3469–3473.
22. Su, H., Bidère, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., Lenardo, M. (2005) *Science*, **307**, 1465–1468.
23. Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E.E., Pewzner-Jung, Y., Yogeve, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T., Wallach, D. (2004) *J. Immunol.*, **173**, 2976–2984.
24. Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., Megeney, L.A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11025–11030.
25. Miura, M., Chen, X.D., Allen, M.R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B.M., Lakhani, S., Flavell, R.A., Feng, X.H., Robey, P.G., Young, M., Shi, S. (2004) *J. Clin. Invest.*, **114**, 1704–1713.
26. Howard, A.D., Kostura, M.J., Thornberry, N., Ding, G.J., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J.P., Hogquist, K.A., Chaplin, D.D., Mumford, R.A., et al. (1991) *J. Immunol.*, **147**, 2964–2969.
27. Sleath, P.R., Hendrickson, R.C., Kronheim, S.R., March, C.J., Black, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 14526–14528.
28. Zhang, Y., Center, D.M., Wu, D.M., Cruikshank, W.W., Yuan, J., Andrews, D.W., Kornfeld, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1144–1149.
29. Riedl, S.J., Shi, Y. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5**, 897–907.
30. Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 265–267.
31. Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D. (1998) *Immunity*, **9**, 267–276.
32. Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. (1990) *Nature*, **348**, 334–336.
33. Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., Thompson, C.B. (1993) *Cell*, **74**, 597–608.
34. Adams, J.M., Cory, S. (1998) *Science*, **281**, 1322–1326.
35. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993) *Cell*, **74**, 609–619.
36. Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.L., Guild, B.C. (1995) *Nature*, **374**, 733–736.
37. Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J. (1995) *Nature*, **374**, 736–739.
38. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (1995) *Cell*, **80**, 285–291.
39. Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2859–2869.
40. Chipuk, J.E., Green, D.R. (2008) *Trends Cell Biol.*, **18**, 157–164.
41. Riedl, S.J., Salvesen, G.S. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 405–413.
42. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997) *Cell*, **90**, 405–413.
43. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerman, R., Wang, X. (1996) *Cell*, **86**, 147–157.
44. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997) *Cell*, **91**, 479–489.

45. Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Ludtke, S.J., Wang, X., Akey, C.W. (2010) *Structure*, **18**, 571–583.
46. Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A. Jr, Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I., Flavell, R.A. (2006) *Science*, **311**, 847–851.
47. Shi, Y. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 459–470.
48. Wang, S., Miura, M., Jung, Y., Zhu, H., Gagliardini, V., Shi, L., Greenberg, A.H., Yuan, J. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 20580–20587.
49. Lin, X.Y., Choi, M.S., Porter, A.G. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 39920–39926.
50. Eckhart, L., Ban, J., Fischer, H., Tschachler, E. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 655–659.
51. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998) *Science*, **282**, 1318–1321.
52. Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., Clarke, P.R. (2003) *Nat. Cell. Biol.*, **5**, 647–654.
53. Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 239–252.
54. Fesik, S.W., Shi, Y. (2001) *Science*, **294**, 1477–1478.
55. Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., Shi, Y. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 519–527.
56. Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y. (2001) *Cell*, **104**, 769–780.
57. Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., Du, C. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1487–1496.
58. Srinivasula, S.M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 31469–31472.
59. Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., et al. (1995) *Science*, **269**, 1885–1888.
60. Xue, D., Horvitz, H.R. (1995) *Nature*, **377**, 248–251.
61. Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 7797–7800.
62. Drew, M.C., He, C.J., Morgan, P.W. (2000) *Trends Plant Sci.*, **5**, 123–127.
63. Gunawardena, A.H. (2008) *J. Exp. Bot.*, **59**, 445–451.
64. Rubinstein, B. (2000) *Plant Mol. Biol.*, **44**, 303–318.
65. Fukuda, H. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 299–325.
66. Greenberg, J.T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12094–12097.
67. van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A., Petersen, M., Smertenko, A., Talianky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2011) *Cell Death Differ.*, **18**, 1241–1246.
68. Curtis, M.J., Wolpert, T.J. (2004) *Plant J.*, **38**, 244–259.
69. Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001) *Nature*, **411**, 826–833.
70. Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001) *Nature*, **411**: 848–853.
71. Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 575–607.
72. Hutcheson, S.W. (1998) *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 59–90.
73. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N. (2011) *Cell Death Differ.*, **18**, 1298–1304.

74. *Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.* (2006) *Apoptosis*, **11**, 905–911.
75. *Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.* (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2496–2506.
76. *Kisselev, A.F., Garcia-Calvo, M., Overkleeft, H.S., Peterson, E., Pennington, M.W., Ploegh, H.L., Thornberry, N.A., Goldberg, A.L.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35869–35877.
77. *Gu, C., Kolodziejek, I., Misas-Villamil, J., Shindo, T., Colby, T., Verdoes, M., Richau, K.H., Schmidt, J., Overkleeft, H.S., van der Hoorn, R.A.* (2010) *Plant J.*, **62**, 160–170.
78. *Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., Gilchrist, D.G.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15217–15221.
79. *del Pozo, O., Lam, E.* (2003) *Mol. Plant Microbe Interact.*, **16**, 485–494.
80. *Hansen, G.* (2000) *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**, 649–657.
81. *Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., Gallois, P.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 779–787.
82. *Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., French, R.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6957–6962.
83. *Shaw, E.* (1990) *Advances in Enzymology*, **63**, 271–347.
84. *del Pozo, O., Lam, E.* (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 1129–1132.
85. *Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M.* (2000) *Mol. Cell*, **6**, 961–967.
86. *Aravind, L., Koonin, E.V.* (2002) *Proteins*, **46**, 355–367.
87. *Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zaviyalov, A., Lam, E., Bozhkov, P.V.* (2011) *Cell Death Differ.*, **18**, 1279–1288.
88. *Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inzé, D., Van Breusegem, F.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 45329–45336.
89. *Watanabe, N., Lam, E.* (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 10027–10040.
90. *Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F., Helmersson, A., Smertenko, A.P., Zhivotovsky, B., von Arnold, S.* (2004) *Cell Death Differ.*, **11**, 175–182.
91. *Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A., Savenkov, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V.* (2004) *Curr. Biol.*, **14**, R339–340.
92. *Bozhkov, P.V., Suarez, M.F., Filonova, L.H., Daniel, G., Zamyatnin, A.A. Jr, Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Smertenko, A.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14463–14468.
93. *Watanabe, N., Lam, E.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 14691–14699.
94. *Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.A., De Rycke, R., Brackenier, A., Inzé, D., Harris, J.L., Van Breusegem, F.* (2006) *J. Mol. Biol.*, **364**, 625–636.
95. *Vercammen, D., Declercq, W., Vandenaabeele, P., Van Breusegem, F.* (2007) *J. Cell Biol.*, **179**, 375–380.
96. *Carmona-Gutierrez, D., Fröhlich, K.U., Kroemer, G., Madeo, F.* (2010) *Cell Death Differ.*, **17**, 377–378.
97. *Enoksson, M., Salvesen, G.S.* (2010) *Cell Death Differ.*, **17**, 1221.
98. *He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J., Gallois, P.* (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 774–783.
99. *Watanabe, N., Lam, E.* (2011) *Plant J.*, **66**, 969–982.

100. Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L., Epple, P. (2010) *Science*, **330**, 1393–1397.
101. Sundström, J.F., Vaculova, A., Smerthenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatin, A.A. Jr, Välineva, T., Saarikettu, J., Frilander, M.J., Suarez, M.F., Zavialov, A., Ståhl, U., Hussey, P.J., Silvoinen, O., Sundberg, E., Zhivotovskiy, B., Bozhkov, P.V. (2009) *Nat. Cell. Biol.*, **11**, 1347–1354.
102. Hiraiwa, N., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1999) *FEBS Lett.*, **447**, 213–216.
103. Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2002) *Plant Cell Physiol.*, **43**, 143–151.
104. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004) *Science*, **305**, 855–858.
105. Rojo, E., Martín, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, M., Sánchez-Serrano, J.J., Baker, B., Ausubel, F.M., Raikhel, N.V. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1897–1906.
106. Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 32914–32920.
107. Bosch, M., Poulter, N.S., Perry, R.M., Wilkins, K.A., Franklin-Tong, V.E. (2010) *Plant Mol. Biol.*, **74**, 381–393.
108. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. (2005) *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 404–408.
109. Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliensky, M.E., Vartapetian, A.B. (2004) *Plant Cell*, **16**, 157–171.
110. Chichkova, N.V., Shaw, J., Galiullina, R.A., Drury, G.E., Tuzhikov, A.I., Kim, S.H., Kalkum, M., Hong, T.B., Gorshkova, E.N., Torrance, L., Vartapetian, A.B., Taliensky, M. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1149–1161.
111. Chichkova, N.V., Galiullina R.A., Taliensky M.E., Vartapetian A.B. (2008) *Plant Stress*, **2**, 89–95.
112. Pitzschke, A., Hirt, H. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1021–1032.
113. Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovsky, V., Zambryski, P.C. (1992) *Cell*, **68**, 109–118.
114. Reavy, B., Bagirova, S., Chichkova, N.V., Fedoseeva, S.V., Kim, S.H., Vartapetian, A.B., Taliensky, M.E. (2007) *Plant Cell Rep.*, **26**, 1215–1219.
115. Schaller, A. (2004) *Planta*, **220**, 183–197.
116. Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Schaller, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17223–17228.
117. Rautengarten, C., Steinhauser, D., Büssis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J., Altmann, T. (2005) *PLoS Comput. Biol.*, **1**, e40.
118. Tripathi, L.P., Sowdhamini, R. (2006) *BMC Genomics*, **7**, 200.
119. Steiner, D.F. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 31–39.
120. Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., Prat, A. (2008) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 1111–1125.
121. Coffeen, W.C., Wolpert, T.J. (2004) *Plant Cell*, **16**, 857–873.
122. Curtis, M.J., Wolpert, T.J. (2002) *Plant J.*, **29**, 295–312.

-
123. Navarre, D.A., Wolpert, T.J. (1999) *Plant Cell*, **11**, 237–249.
124. Vartapetian, A.B., Tuzhikov, A.I., Chichkova, N.V., Taliansky, M., Wolpert, T.J. (2011) *Cell Death Differ.*, **18**, 1289–1297.
125. Chichkova, N.V., Tuzhikov, A.I., Taliansky, M., Vartapetian, A.B. (2012) *Physiol. Plant.*, **145**, 77–84.