

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ РАСТЕНИЙ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПРОЦЕССЫ РЕГУЛИРУЕМОЙ СМЕРТИ КЛЕТОК

©2015 г.

А. А. ЗАМЯТНИН (мл.)

*НИИ молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Цистеиновые протеиназы III. Сериновые протеиназы. IV Аспаргатные протеиназы. V. Треониновые протеиназы. VI. Металлопротеиназы. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Воздействие внешних факторов как механических, так и физико-химических часто приводит к неконтролируемой гибели живых клеток. Такой тип клеточной гибели часто называют случайной клеточной смертью (accidental cell death). Однако во многих случаях клеточная смерть инициируется генетической программой, исполнение которой порой можно отменить с помощью специальных генетических или фармакологических факторов. Такая регулируемая клеточная смерть (PKC; regulated cell death) является частью физиологической программы онтогенеза и может быть активирована на уровне организма как внутриклеточными изменениями, так и рядом внеклеточных факторов. Активация программы регулируемой клеточной смерти также возможно в виде ответа организма на внешние воздействия. Клеточную смерть, которая является лишь результатом развития внутренних физиологических программ организма, т.е. частного случая PKC, в соответствии с последними рекомендациями комитета по

---

*Принятые сокращения:* АГ – аппарат Гольджи, PKC – запрограммированная клеточная смерть; РКС – регулируемая клеточная смерть; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) – комитет по номенклатуре клеточной смерти; PS-SCL (positional scanning substrate combinatorial library) – позиционная сканирующая субстратная комбинаторная библиотека; VPE (Vacuolar Processing Enzyme) – вакуолярный процессирующий фермент.

*Адрес для корреспонденции:* zamyat@belozersky.msu.ru

номенклатуре клеточной смерти (NCCD) следует называть запрограммированной клеточной смертью (ПКС; programmed cell death) [1].

Активные исследования феномена ПКС в течение последних 50 лет (термин 'programmed cell death' был предложен Ричардом Локшином в середине 60-х годов [2]) привели к открытию разнообразных типов клеточной смерти, а также механизмов, задействованных в процессах регулируемой гибели клеток. Такое разнообразие потребовало упорядочивания с помощью создания специальной классификации типов клеточной смерти. Десять лет назад была предложена классификация, в основу которой были положены морфологические признаки, выделяющие основные типы клеточной смерти [3]. Однако скоро стало понятно, что для создания полноценной классификации различных типов клеточной смерти учитывать лишь морфологические признаки явно недостаточно. Поэтому было предложено дополнить морфологические признаки уникальными молекулярными и биохимическими признаками, присущими определенным типам ПКС [4]. Одними из наиболее характерных молекулярных маркеров клеточной смерти служат активности протеолитических ферментов, регулирующих инициацию и обеспечивающих дальнейшие процессы развития ПКС [4, 5].

Исследования феномена ПКС у растений развивалось не так интенсивно, как аналогичные исследования у животных и человека. Из-за недостатка информации о молекулярных механизмах развития ПКС у растений к настоящему времени удалось составить классификацию различных типов ПКС растений только на основе морфологических признаков [6]. Тем не менее, исследования механизмов развития ПКС у растений указывают на то, что наряду со сходствами развития процессов ПКС у растений и у животных, обнаруживаются также и различия [6]. Одним из принципиальных отличий является отсутствие у растений каспаз – ферментов, которые являются ключевыми факторами при инициации и обеспечении развития апоптоза у животных [5]. Тем не менее, у растений обнаружено немалое количество других протеолитических ферментов, вовлеченных в различные этапы развития ПКС, в том числе, ферментов, обладающих каспаза-подобными активностями и каспаза-подобными функциями.

У растений, как и у животных, индукторами ПКС могут являться биотические и абиотические факторы. Патогены различной природы (вирусы, бактерии и грибы) способны индуцировать развитие ПКС, в том числе, в форме гиперчувствительного ответа, который является защитной реакцией растения. В этом случае, индукторами клеточной смерти могут быть как специфические для патогена соединения –

элиситоры, распознающиеся иммунной системой растения, так и патоген-специфичные белковые продукты, экспрессия которых в растительной клетке вызывает стресс ЭПР, приводящий к развитию РКС [7–10]. Абиотическими факторами, инициирующими развитие РКС у растений, могут выступать ионы металлов, окислительный стресс, солевой стресс, УФ-излучение, тепловой шок и другие [11–15]. Кроме того, для обеспечения нормального развития растения часть его клеток погибает путём РКС. Наиболее наглядным примером такой клеточной смерти у растений можно считать процессы, связанные с образованием ксилемы [16, 17].

В настоящем обзоре обобщаются результаты исследований протеолитических ферментов, участвующих в регуляции и обеспечении процессов развития РКС у растений, вызванных биотическими и абиотическими факторами, а также необходимых для нормального развития (таблица). В меньшей степени уделяется внимание протеолитическим ферментам, участвующим в развитии специального типа РКС при старении органов растений.

## II. ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

### ВАКУОЛЯРНЫЕ ПРОЦЕССИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ (VPE)

Публикация данных о том, что при развитии гиперчувствительного ответа табака на вирусную инфекцию, индуцируемую вирусом табачной мозаики, в погибающих клетках выявлялась каспаза-1-подобная протеолитическая активность [18], стимулировала активные поиски фермента растений, который обладал бы такой активностью. Тем временем, у растений продолжали выявлять каспаза-подобные активности при изучении разнообразных типов РКС [19]. Однако расшифровка полноразмерных геномов резушки (*Arabidopsis thaliana* L.) и риса (*Oryza sativa* L.) [20, 21] позволила заключить окончательно, что у растений нет генов каспаз, которые можно было бы идентифицировать с помощью простых инструментов поиска гомологичных генов. Поэтому некоторые группы исследователей сфокусировали своё внимание на поисках протеолитических ферментов растений, которые обладают каспаза-подобными активностями, не являясь ортологами каспаз.

Первой идентифицированной протеиназой, участвующей в развитии РКС и обладающей каспаза-1-подобной активностью оказался вакуолярный процессирующий фермент (VPE) [22, 23]. VPE – это легумаин-подобная цистеиновая протеиназа, которая согласно классификации протеолитических ферментов, представленной в базе дан-

Таблица. Участие протеолитических ферментов растений в развитии регулируемой клеточной смерти у растений

Тип протеиназ	Семейство	Локализация	Индуктор РКС	Активирует (↑) или супрессирует (↓) РКС	Ссылка
1	2	3	4	5	6
<i>Цистеиновые протеиназы</i>					
<i>VPE</i>	C13	Вакуоль	Биотические факторы	↑	[22, 23, 30–33]
			Абиотические факторы	↑	[13–15, 34–38]
			Онтогенез	↑	[39–43]
<i>Метакаспазы, тип I</i>	C14	Цитоплазма, ядро	Биотические факторы	↑, ↓	[59, 60]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↓	[60]
<i>Метакаспазы, тип II</i>	C14	Цитоплазма, ядро, апопласт, протопласты погибших клеток	Биотические факторы	↑	[61–64]
			Абиотические факторы	↑	[64, 65]
			Онтогенез	↑	[47, 57, 66, 67]
<i>CEP1-подобные протеиназы</i>	C1	ЭПР, ризиносомы, апопласт (?)	Биотические факторы	↑	[99]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[79, 81, 101–106]
<i>RD21A- и XBCP3-подобные протеиназы</i>	C1	Производные ЭПР, вакуоль, цитоплазма	Биотические факторы	↑	[110]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[111]
<i>XCP2-подобные протеиназы</i>	C1	Вакуоль, протопласты погибших клеток	Биотические факторы	–	–
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[17]
<i>CTB3(CathB)-подобные протеиназы</i>	C1	Вакуоль, апопласт	Биотические факторы	↑	[116, 117]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[116]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание табл.

1	2	3	4	5	6
<i>RD19A</i> -подобные протеиназы	C1	Вакуоль, ядро	Биотические факторы	↑	[118]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[119]
<i>SAG12</i> -подобные протеиназы	C1	Периферические вакуоли	Биотические факторы	↓	[122]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑, ↓	[120, 122]
Аутофагины ( <i>ATG4</i> )	C54	Цитоплазма	Биотические факторы	↑(?)	–
			Абиотические факторы	↑(?)	–
			Онтогенез	↑(?)	–
<b>Сериновые протеиназы</b>					
Субтилизин-подобные протеиназы	S8	Цитоплазма, апопласт	Биотические факторы	↑	[129, 143]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[142]
<b>Аспартатные протеиназы</b>					
Атипичные протеиназы	A1	ЭПР	Биотические факторы	–	–
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑, ↓	[148–151]
<b>Треониновые протеиназы</b>					
Компоненты протеасом	T1	Цитоплазма, ядро	Биотические факторы	↑	[155]
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[154]
<b>Металлопротеиназы</b>					
Матриксные металлопротеиназы	M10	Плазматическая мембрана (?), апопласт (?), ЭПР (?)	Биотические факторы	–	–
			Абиотические факторы	–	–
			Онтогенез	↑	[159]

ных пептидаз MEROPS, принадлежит к семейству С13, входящему в клан CD [24]. Как и многие протеиназы, VPE транслируется в форме неактивного зимогена, содержащего N- и C-концевые пропептиды, которые автокаталитически отщепляются в процессе активации фермента. В самом начале N-концевого участка белка имеется сигнальный пептид, направляющий VPE в вакуоль, в которой и осуществляется автокаталитический процессинг [25, 26]. Гомологи VPE широко распространены у представителей царства растений и обнаруживаются как у мхов и папоротников, так и у высших растений. У животных также обнаружен гомолог VPE, известный как аспарагиновая эндопептидаза АЕР [27, 28]. В геноме *A. thaliana* содержится гены четырех VPE:  $\alpha$ VPE,  $\beta$ VPE,  $\gamma$ VPE и  $\sigma$ VPE. При этом экспрессия  $\alpha$ VPE и  $\gamma$ VPE детектируется в вегетативных органах растений, в то время как  $\beta$ VPE экспрессируется в эмбрионах, а  $\sigma$ VPE при образовании семенной кожуры [27, 28].

Коллапс вакуоли, инициируемый VPE, выступает в качестве одного из ключевых факторов при развитии процессов РКС у растений. К настоящему времени получены данные о том, что VPE у растений принимает участие в развитии самых разнообразных типов РКС, в том числе, вызванных биотическими и абиотическими факторами. Кроме того, было показано, что VPE вовлечен в процессы РКС, обеспечивающие нормальное развитие растения [28]. VPE принимает участие в процессе развития гиперчувствительного ответа, индуцированного вирусом табачной мозаики в растениях табака, несущих ген устойчивости *N*, стимулируя распад вакуоли, фрагментацию ДНК и формирование некротической реакции [22, 29]. VPE также, вовлечен в морфологически сходные процессы развития РКС, индуцированной другими вирусами, грибами, бактериями и их токсинами [23, 28, 30–32]. Отдельно следует отметить, что VPE также принимает участие в развитии особенного типа РКС, индуктором возникновения которой является стресс ЭПР, развивающийся в результате взаимодействий клеток *A. thaliana* с грибом *Piriformospora indica* [33]. Кроме того, VPE участвует в развитии РКС, индуцированной рядом абиотических факторов, таких как тепловой шок [15], солевой стресс [14, 34], окислительный стресс [34, 35], УФ-облучение [13] и воздействие металлов [36–38], а также РКС, развивающейся в процессах онтогенеза и старения, таких как формирование семенной кожуры [39], гибель клеток околоплодника и нуцеллуса в семязачатке [40, 41], при старении листьев [42] и лепестков [43].

Несмотря на то, что VPE выступает в качестве важного участника процессов развития некоторых типов клеточной смерти у растений, субстраты этого фермента, расщепляемые им в ходе развития РКС так и остаются фактически неизвестными. Поэтому делать заключение о том, что функции VPE у растений и функции каспаз животных сходны, несколько преждевременно.

#### МЕТАКАСПАЗЫ

Только использование специальных методов биоинформатики позволило обнаружить в геномах растений гены очень отдаленных родственников каспаз – метакаспазы [44]. Сразу после публикации результатов этого поиска несколько исследовательских групп одновременно стали активно изучать метакаспазы растений с целью показать их функциональные сходства с каспазами. Однако вскоре выяснилось, что субстратная специфичность метакаспаз принципиально отличается от таковой у каспаз: метакаспазы оказались аргинил/лизил-специфичными эндопептидазами, в то время как каспазы – это аспартат-специфичные протеолитические ферменты [45–47].

Метакаспазы являются цистеиновыми протеиназами и, согласно классификации протеолитических ферментов, представленной в базе данных пептидаз MEROPS, принадлежат к семейству C14, входящему в клан CD [24]. Как и каспазы, метакаспазы состоят из большой (p20) и малой (p10) субъединиц. Также как и у каспаз, каталитические His и Cys метакаспаз расположены в большой p20 субъединице, в то время как малая субъединица p10 принимает участие в образовании субстрат-связывающего кармана [48, 49]. Метакаспазы растений подразделяют на два основных типа. Метакаспазы типа I часто содержат дополнительный N-терминальный пролин-богатый продомен, в котором также имеется мотив цинкового пальца. В свою очередь, у представителей II типа метакаспаз N-концевой продомен всегда отсутствует, но, в отличие от метакаспаз I типа, p20 и p10 субъединицы разделены линкерной последовательностью [48, 50]. У представителей фитопланктона были описаны метакаспазы, объединенные в тип III. Характерной особенностью таких метакаспаз служит тот факт, что, в отличие от метакаспаз типов I и II, у них p10 домен расположен ближе к N-терминальной части белка, в то время как p20 – к C-терминальной [51].

Геномы растений содержат, как правило, около десяти генов, кодирующих метакаспазы, хотя у некоторых видов это количество может достигать двадцати [50]. В геноме у *A. thaliana* таких генов девять: три гена для метакаспаз I типа (AtMC1-AtMC3) и шесть генов

для метакаспаз II типа (AtMC4-AtMC9), и все девять генов экспрессируются в различных тканях растения [44, 48].

Созревание метакаспаз, как и многих других цистеиновых эндопептидаз, происходит в процессе автокаталитического расщепления зимогена. Однако автопротеолитический гидролиз метакаспаз, за редким исключением, оказывается  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым процессом [45, 47, 52]. Более того, как было показано для метакаспазы AtMC4, сайты расщепления при  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированном автокаталитическом протеолизе могут несколько варьировать в зависимости от условий проведения реакции. Предполагается, что это отражает наличие специального механизма, который на стадии активации протеиназы способен усиливать или ослаблять активность образуемого фермента [53, 54]. Еще одним регулятором активации метакаспаз может служить оксид азота (NO). Для метакаспазы AtMC9 была показана возможность S-нитрозилирования каталитического Cys, которое может быть результатом избытка NO, что приводит к ингибированию автокаталитической активации фермента [55].

Внутриклеточная локализация метакаспаз может несколько варьировать в зависимости от конкретного фермента, но, как правило, эти протеиназы можно обнаружить в цитоплазме и/или ядре клеток [56]. Кроме того, как было показано для метакаспазы ели mCP-Ra, в процессе развития РКС внутриклеточная локализация фермента может изменяться: на начальных стадиях РКС фермент обнаруживается в цитоплазме, а на более поздних – в ядре [47]. Метакаспаза *A. thaliana* AtMC9 кроме ядра и цитоплазмы клеток также обнаруживается в апопласте [57, 58].

Исследования метакаспаз растений показали, что эти ферменты являются ключевыми регуляторами и участниками развития процессов РКС, индуцированной самыми разнообразными стимулами, такими как воздействие биотических и абиотических факторов, а также при РКС, необходимой для обеспечения нормального развития. Было показано, что метакаспаза типа I AtMC1 участвует у *A. thaliana* в активации гиперчувствительного ответа на инфекцию, вызванную оомицетом *Hyaloperonospora arabidopsidis* или бактерией *Pseudomonas syringae*, в то время как другая метакаспаза типа I AtMC2 в этом процессе проявляет свойства антагониста AtMC1 [59]. Учитывая, что AtMC2 служит регулятором, блокирующим развитие РКС, следует особенно подчеркнуть, что, в данном случае, такая функция фермента оказалась не связанной с проявлением им протеолитической активности [59, 60]. Позже выяснилось, что и AtMC1 может также препятствовать развитию процессов РКС, т.к.



было показано, что метакаспаза AtMC1 является фактором выживаемости клеток при развитии процессов старения [60]. В ответ на инфекцию, вызываемую *Xanthomonas campestris* у *Capsicum annuum* L., усиливается экспрессия гена метакаспазы-9 (CaMC9). Сайленсинг гена CaMC9 приводит к супрессии развития патоген-индуцированной РКС, в то время как оверэкспрессия гена CaMC9, наоборот, повышает вероятность развития интенсивных проявлений клеточной смерти [61]. Метакаспазы пшеницы TaMC4 и *Nicotiana benthamiana* L. NbMCA1 также участвует в процессах РКС при развитии защитных реакций растения в ответ на инфекцию пшеницы, вызванную грибом *Puccinia striiformis*, или в ответ на инфекцию табака, вызванную грибом *Colletotrichum destructivum* или бактерией *P. syringae* [62, 63]. Нокаут метакаспазы II типа AtMC4 приводит к понижению чувствительности мутанта к индукции РКС, вызванной микотоксином фумонизином B1, а также индукторами окислительного стресса, в то время как оверэкспрессия гена фермента, наоборот, повышает чувствительность растения к этим индукторам развития РКС [64]. Оверэкспрессия гена метакаспазы AtMC8 стимулировала, а сайленсинг гена AtMC8 супрессировал развитие РКС, индуцированную УФ-излучением или перекисью водорода в протопластах [65]. Метакаспаза ели mCII-Pa, с одной стороны, активирует процессы аутофагии, которые необходимы для запуска процессов РКС в ходе терминальной дифференцировки клеток суспензора эмбриона, а, с другой стороны, принимает участие в дальнейшем развитии РКС [47, 66]. Локализуясь во внеклеточном пространстве, метакаспаза AtMC9 может являться эффектором развития РКС, т.к. способна выщеплять из белка GRI 11-звенный пептид, который, связываясь с мембранным рецептором PRK5, инициирует развитие РКС [67]. Кроме того, одной из функций секретлируемой метакаспазы AtMC9 оказалась деградация содержимого клеток ксилемы после разрыва в них центральной вакуоли. Таким образом, можно утверждать, что в этом случае функциональная роль фермента проявляется уже после факта клеточной смерти [57]. Примечателен также тот факт, что у *A. thaliana* может экспрессироваться ген белкового ингибитора метакаспазы AtMC9 – AtSerp1, белковый продукт которого одновременно служит и субстратом AtMC9, т.к. прежде, чем образовать ковалентную связь с ферментом, необратимый ингибитор из семейства серпинов должен быть расщеплен протеиназой [68]. Однако физиологическая роль такого ингибирования AtMC9, в частности, в РКС пока не исследована.

Кроме AtSerp1 к настоящему времени идентифицировано несколько десятков субстратов метаксазы AtMC9 растений [58]. Однако функциональная роль протеолитического расщепления, катализируемого AtMC9 *in vivo*, была показано только для одного – для фосфоенолпируват-карбоксикиназы 1 (PEPCK1), которая представляет собой один из ключевых ферментов, обеспечивающих глюконогенез у растений. Выяснилось, что процессинг PEPCK1, катализируемый AtMC9, приводит к усилению активности этого фермента [58]. К сожалению, анализ идентифицированных субстратов метаксазы AtMC9 пока не позволяет сделать какие-либо заключения о механизмах развития РКС, в которых принимает участие AtMC9.

При развитии РКС при терминальной дифференцировке клеток суспензора эмбриона ели был охарактеризован физиологический субстрат метаксазы mcII-Ра. Им оказался эволюционно-консервативный многофункциональный белок Tudor-SN [69]. Гены белка Tudor-SN закодированы не только в геномах растений, но также в геномах человека и животных, а белковый продукт, являясь компонентом многих рибонуклеопротеидных комплексов, вовлечен в целый ряд функциональных процессов, связанных с транскрипцией, сплайсингом, РНК-интерференцией, редактированием РНК, а также процессами деградации РНК [70–74]. Тем интереснее оказалось то, что в клетках человека Tudor-SN при развитии апоптоза является субстратом каспазы-3 [69]. При этом как в случае растений, так и в случае животных протеолитическое расщепление белка Tudor-SN приводит к его инактивации [69]. Недавно выяснилось, что общими субстратами с каспазами животных обладают не только метаксазы растений, но также и метаксазы грибов. Так, метаксаза гриба *Podospora anserina* PaMCA1 способна расщеплять *in vivo* такой классический субстрат каспаз, как PARP [75]. Публикация этих данных возобновила дискуссию о том, являются ли метаксазы каспазами. Ряд исследователей сходится на том, что метаксазы можно считать функциональными аналогами каспаз, а пути развития РКС настолько консервативны, что общие черты развития РКС можно проследить даже у представителей различных царств живых организмов.

#### ПАПАИН-ПОДОБНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

По механизму катализа папаин-подобные эндопептидазы относят к цистеиновым протеиназам. В соответствии с филогенетическими особенностями папаин-подобные С1А протеиназы (семейство С1, клан СА) относят к ферментам, подобным L-, В-, Н- и F-катепсинам, имеющимся у животных [24, 76].

Папаин-подобные протеиназы – относительно стабильные белки. Они часто обнаруживаются в достаточно агрессивных средах, таких как содержимое апопласта, вакуолей и лизосом [77]. Эти протеиназы представляют собой глобулярные белки, состоящие из двух доменов, взаимодействия которых приводят к образованию кармана. Этот карман способен связывать субстраты ферментов, и именно в него транслоцированы радикалы каталитической триады аминокислотных остатков: Cys, His и Asn [78].

Активность и специфичность С1А пептидаз растений *in vitro* достаточно подробно исследовалась с помощью различных тестов с использованием белков, флуорогенных синтетических пептидных субстратов, а также пептидных ингибиторов. Кроме того, активно развиваются биоинформатические методы, позволяющие проводить моделирование молекулярных взаимодействий эндопептидаз с их субстратами. Из имеющейся на данный момент информации следует, что папаин-подобные протеиназы растений обладают относительно низкой специфичностью. Тем не менее, на основании различных работ, посвященных исследованиям субстратной специфичности этих пептидаз, авторы приходят к выводу о том, что субстрат предпочтительно должен иметь в позиции Р2 неполярный, включая Pro, или ароматический аминокислотный остаток, а, в некоторых случаях, аминокислотный остаток Arg [79–83].

Для попадания в определенные внутриклеточные сайты локализации препроферменты протеиназ содержат сигнальные пептиды, в то время как наличие аутоингибирующего продомена препятствует преждевременной активации фермента [80, 84]. В ходе трансляции полипептидная цепь неактивного профермента попадает в люмен ЭПР, после чего большая часть С1А протеиназ через транс-Гольджи попадает в вакуоль, лизосомы, или секретируется в апопласт [76]. В то же время С1А протеиназы, содержащие С-концевой сигнал возврата в ЭПР К/HDEL, могут быть направлены в другие компартменты, например, в такие специализированные компартменты, как риносомы, которые являются производными ЭПР [79, 85, 86]. В дальнейшем отщепление продомена может происходить, как *in cis* за счет внутримолекулярных взаимодействий, так и *in trans* за счет межмолекулярных взаимодействий. Кроме того, имеются данные о том, что продомен может отщепляться другими протеиназами, что позволяет предполагать, что папаин-подобные протеолитические ферменты могут выступать в качестве участников протеолитических каскадов [80, 87].

Отличительной особенностью папаин-подобных протеиназ растений от многих других протеолитических ферментов, принимающих участие в процессах развития РКС, является то, что для некоторых из этих ферментов известны природные обратимые ингибиторы пептидной природы, в частности, цистатины растений. Эти белки способны взаимодействовать, в первую очередь, с представителями семейства папаин-подобных С1А цистеиновых протеиназ, а сами фитоцистатины выделяют в отдельное подсемейство внутри семейства цистатинов [24, 76]. Как правило, цистатины растений представляют собой относительно небольшие белки с молекулярной массой 12–16 кДа. Известны также и высокомолекулярные фитоцистатины с молекулярной массой 85–87 кДа, содержащие сразу несколько цистатиновых доменов [88–91]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что для ингибирования легумаин-подобных С13 пептидаз у фитоцистатинов может присутствовать дополнительный С-концевой участок, в результате чего молекулярная масса такого белка может достигать 23 кДа [92, 93]. Как указывалось выше, VPE относится к семейству цистеиновых С13 пептидаз, но пока нет данных о возможности регуляции активности VPE с помощью белковых протеиназных ингибиторов. Еще одним пептидным ингибитором папаин-подобных С1А цистеиновых протеиназ служит представитель семейства серпинов – AtSerp1, способный ингибировать протеиназу RD21A [94, 95].

Препроферменты папаин-подобных протеиназ растений всегда состоят из N-концевого сигнального пептида, продомена и протеолитического домена, содержащего каталитическую триаду, состоящую из Cys, His и Asp. Специально для растений предложена дополнительная классификация папаин-подобных протеиназ [80], учитывающая особенности структур протеолитических ферментов растений, таких как, например, наличие дополнительного С-концевого гранулинового домена, пролин-богатого домена, С-концевого сигнала возврата в ЭПР (K/HDEL), сигнала локализации в вакуоли NPIR в начале продомена и некоторых других [79, 80, 96]. Такая классификация выделяет у растений девять подсемейств папаин-подобных протеиназ [80]. К настоящему времени накопились данные, подтверждающие участие в развитии различных типов РКС представителей, как минимум, семи подсемейств (SER1-, RD19A-, RD21A-, XCP2-, XBSP3-, SAG12- и СТВ3-подобных протеиназ). В то же время пока не сообщалось о какой-либо специальной роли в развитии РКС папаин-подобных протеиназ, относящихся к подсемействам AALP- и TH1-подобных ферментов.

*СЕР1-подобные протеиназы*

Отличительная особенность представителей подсемейства СЕР1-подобных протеиназ – наличие С-концевого сигнала возврата в ЭПР KDEL. Интересно, что гены, гомологичные KDEL-содержащим протеиназам растений, отсутствуют в геномах дрожжей и животных [80, 97]. Имеющийся у протеиназ сигнал возврата в ЭПР во многих случаях служит причиной того, что ферменты попадают в специальные структуры – рибинсомы, которые являются производными ЭПР, но отделены от него. Рибинсомы не сливаются с центральной вакуолью, но при развитии процессов РКС разрушаются, высвобождая находящиеся в них протеиназы и гидролазы [81, 85, 98]. При биотическом стрессе протеиназа СЕР1 у *A. thaliana* накапливается в ЭПР и, более того, предполагается возможность ее дальнейшего высвобождения в апопласт [99].

Для многих представителей подсемейства СЕР1-подобных протеиназ было показано, что они участвуют в развитии РКС у различных растений [100, 101]. Наиболее изучены представители этого подсемейства – протеиназы *A. thaliana* СЕР1, СЕР2 и СЕР3, которые экспрессируются в корнях, стеблях, цветках и зеленых стручках растения [97]. В ответ на биотический стресс экспрессию СЕР1 также можно наблюдать и в листьях [99]. К настоящему времени подробно охарактеризовано участие этой протеиназы в развитии регулируемой смерти эпидермальных клеток, вызванной инфекцией аскомицета *Erysiphe cruciferarum* [99], а также участие протеиназы СЕР1 при развитии РКС в ходе созревания пыльцы в клетках тапетума – специального слоя, выстилающего спорангии и пыльники [101]. Было выявлено участие протеиназы СЕР2 в развитии РКС при формировании корневого чехлика [81]. Кроме того, у других видов растений KDEL-содержащие протеиназы участвуют в развитии РКС при старении лепестков лилейника (*Heimerocallis* sp.) [102], при образовании кожуры семян орхидей (*Phalaenopsis* sp.) [103] и *Jatropha curcas* L. [104], при развитии РКС в эндосперме *Ricinus communis* L. [79], томатов [105] и *J. curcas* [104], а также в пыльнике томатов [106]. Следует подчеркнуть, что некоторые KDEL-содержащие эндопептидазы оказались способными расщеплять богатый оксипролином гликопротеид экстензин, являющийся компонентом клеточной стенки растений [97].

Таким образом, к настоящему времени накопился большой экспериментальный материал, свидетельствующий об участии протеолитических СЕР1-подобных ферментов в развитие разных типов РКС,

в том числе, РКС, обеспечивающей нормальное развитие растения, а также защиту от патогенов.

#### *RD21A- и XBSP3-подобные протеиназы*

Протеолитические ферменты, относящиеся к подсемействам RD21A- и XBSP3-подобных протеиназ (различия между представителями этих двух подсемейств определяются, в первую очередь, отличиями в первичных структурах пропротеиназного домена), характерны возможным наличием дополнительного С-концевого участка, состоящего из пролин-богатого домена, который продолжается гранулин-подобным доменом [80, 107]. У животных гранулины служат внеклеточными факторами роста. Они экспрессируются в виде програнулина, в состав которого входит несколько копий цистеин-богатых модулей гранулина [108]. У растений гранулины обнаруживаются только в составе проферментов некоторых папаин-подобных протеиназ, а функция гранулинов растений до настоящего времени остается неизвестной [80].

У *A. thaliana* сортинг протеиназы RD21 осуществляется через АГ, в котором белок фукозилируется, после чего фермент накапливается в компартментах, являющихся производными ЭПР, а после их слияния с вакуолью – в вакуоле [87, 107, 109, 110]. Считается, что отщепление продомена RD21 *in vivo* может осуществляться за счет активности(ей) другой или других протеиназ, что предполагает участие RD21 в возможных протеолитических каскадах. Однако отщепление гранулин-подобного домена осуществляется автокаталитически [87]. Интересно, что выделенная из растений протеиназа RD21 может быть активирована с помощью SDS. Отсюда можно сделать вывод о том, что протеиназа RD21 накапливается *in vivo* в комплексе с обратимым эндогенным ингибитором [87]. Кроме того, было показано, что активность RD21 может ингибироваться необратимым эндогенным ингибитором AtSerp1, который относится к семейству пептидных ингибиторов протеиназ – серпинов [94]. При этом местом внутриклеточной локализацией AtSerp1 служит цитоплазма, и считается, что ингибирование RD21 при помощи AtSerp1 может осуществляться при транслокации фермента в цитоплазму [110]. Элиситоры РКС у растений, такие как бензотиадиазол (агонист салициловой кислоты) или оксалоовая кислота (токсин патогенных грибов, таких как *Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum*), влияют на проницаемость мембран вакуоли, что может приводить к транслокации RD21 в цитоплазму, где образуются неактивные комплексы RD21-AtSerp1 [110]. При сниженной экспрессии RD21 или повы-



шенной экспрессии AtSerp1 развитие РКС, вызванной элиситорами, существенно тормозиться, из чего был сделан вывод о том, что RD21 является стимулятором развития РКС, в то время как AtSerp1 снижает активность этого эффектора [110].

Протеиназа табака NtCP14 филогенетически ближе к протеиназе ХВСП3, чем к RD21А. Несмотря на это, было показано, что протеиназа NtCP14 совместно с ее ингибитором цистатином NtCYS способны выполнять функцию, сходную с функцией, выполняемой протеиназой RD21 и ингибитором протеиназ AtSerp1 [110, 111]. Было показано, что в большинстве клеток эмбрионов табака протеиназа NtCP14 не активна, т.к. находится в комплексе с NtCYS, в то время как в клетках суспензора эмбриона табака, в которых начинаются процессы развития РКС, уровень NtCYS снижается, что, в свою очередь, приводит к появлению не связанной с NtCYS и поэтому активной протеиназы NtCP14. Наличие активной протеиназы NtCP14, в том числе, обеспечивает дальнейшее развитие процессов регулируемой смерти клеток суспензора [111].

Таким образом, можно заключить, что протеолитические ферменты растений, содержащие в первичной структуре профермента последовательность гранулина, совместно с их ингибиторами являются регуляторами и участниками развития различных типов РКС, индукция процессов которых может обуславливаться как необходимостью обеспечения процессов онтогенеза, так и активацией защитных механизмов. Также не исключено возможное участие подобных ферментов в протеолитических каскадах, сопровождающих развитие РКС.

#### *ХСП2-подобные протеиназы*

Характерной особенностью С1А протеиназ растений, относящихся к подсемейству ХСП2-подобных протеиназ, служит наличие в протеиназном домене предполагаемого сайта гликозилирования консервативного для данного подсемейства [80]. Папаин, пространственная структура которого уже относительно давно определена [112], также относится к подсемейству ХСП2-подобных протеиназ, что дает дополнительные возможности судить об особенностях пространственных структур этих протеолитических ферментов. Геном *A. thaliana* содержит гены двух представителей подсемейства: ХСП1 и ХСП2. Гены этих двух протеиназ совместно с геном субтилизин-подобной сериновой протеиназой ХСП1 были впервые идентифицированы в кДНК библиотеке, полученной из ткани ксилемы [113]. Позже было показано, что при ксилогенезе ХСП1 и ХСП2

транспортируются в центральную вакуоль клеток, где принимают участие в процессах микро-автолиза, предшествующих мега-автолизу, индуцируемому разрывом тонопласта [17, 114]. Считается, что после разрыва тонопласта при формировании трахеальных элементов ксилемы оба фермента продолжают быть вовлеченными в дальнейшую деградацию клеточного содержимого [17]. Обсуждается также возможность участия ферментов ХСР1 и ХСР2 в обеспечении защиты растения от патогенов, которые живут и размножаются в ксилеме растений [115].

#### *СТВ3(CathB)-подобные протеиназы*

Первичная структура СТВ3-подобных протеиназ наиболее близка к катепсину В человека. Кроме того, их отличительной особенностью является наличие четырех дополнительных дисульфидных связей, а также консервативного для данного подсемейства предполагаемого сайта гликозилирования [80]. В геноме у *A. thaliana* закодированы гены трех представителей этого подсемейства: СТВ1 (AtCathB1), СТВ2 (AtCathB2) и СТВ3 (AtCathB3) [80, 116]. Экспрессия этих генов повышается при старении, а также при взаимодействии с патогенами. Более того, у тройного мутанта *A. thaliana* по всем генам СТВ3-подобных протеиназ наблюдается существенная задержка в развитии процессов старения, а также снижение развития гиперчувствительного ответа, индуцируемого *P. syringae* [116]. В растениях *N. benthamiana* сайленсинг СТВ3-подобной протеиназы (NbCathB) также приводит к ослаблению гиперчувствительного ответа на бактериальные инфекции, вызываемые *Erwinia amylovora* и *P. syringae* [117]. При этом NbCathB обнаруживался в апопласте, куда он секретруется и где активируется даже в отсутствие воздействия патогена [117]. Таким образом, можно заключить, что катепсин В-подобные протеолитические ферменты растений участвуют как в процессах, связанных с развитием РКС, необходимой для онтогенеза, так и при развитии РКС, обеспечивающей устойчивость к патогенам.

#### *RD19A-подобные протеиназы*

Отличительная особенность представителей RD19A-подобных протеиназ является наличие в продоме мотиве ERFNAQ и четырех дополнительных цистеинов, которые, как предполагается, образуют дисульфидные мостики, дополнительно стабилизирующие структуру ферментов, а также присутствие консервативного для данного подсемейства предполагаемого сайта гликозилирования [80]. Как показано для *A. thaliana*, RD19 принимает участие в молекулярных каскадах



биохимических реакций, которые обеспечивают устойчивость растения к бактериальной инфекции, вызываемой *Ralstonia solanacearum*. При этом происходит транслокация протеиназы RD19 из подвижных структур, ассоциированных с вакуолью, в ядро клетки [118]. Однако о прямом участии RD19 у *A. thaliana* в процессах РКС до сих пор не сообщалось. С другой стороны, опубликованы данные о вовлеченности в процессы РКС близкого гомолога RD19 – протеиназы SmCP у баклажана (*Solanum melongena* L.). Предполагают также, что SmCP может быть участником процессов РКС, необходимой в онтогенезе, в первую очередь, при образовании трахеальных элементов ксилемы [119].

#### *SAG12-подобные протеиназы*

Большинство SAG12-подобных протеиназ содержат дополнительный Cys перед каталитическим Cys (мотив CGCCWAFS) [80]. У *A. thaliana* протеиназа AtSAG12 (от senescence-associated genes) сразу была идентифицирована, как один из продуктов генов, ассоциированных со старением [120]. Было показано, что этот протеолитический фермент локализуется в специальных вакуолях, которые обнаруживаются в периферической цитоплазме отдельно от центральной вакуоли у стареющих клеток мезофилла. Однако фенотип мутанта *A. thaliana* по гену AtSAG12 не отличался от дикого типа [121]. В то же время, индукция экспрессии гена гомолога этой протеиназы из риса (OsSAG12-1) происходит не только при развитии процессов старения, но также и при РКС в ходе развития ответа на биотический стресс [122]. Сайленсинг гена OsSAG12-1 у растений риса приводил к ускоренному старению, а инфекция бактериального патогена *Xanthomonas oryzae* к усилению развития РКС по сравнению с диким типом, из чего следует, что OsSAG12-1 является супрессором развития РКС [122].

#### АУТОФАГИНЫ (ATG4)

Описывая ключевую роль цистеиновых протеиназ при развитии процессов РКС у растений, нельзя обойти стороной цистеиновые протеиназы аутофагины или Atg4, которые являются одним из ключевых факторов инициации образования аутофагосом [123, 124]. Следует подчеркнуть, что аутофагию у растений можно наблюдать при развитии самых разнообразных типов РКС как до прохождения точки невозврата, так и после [125, 126]. Таким образом, ключевые факторы аутофагии, в том числе, Atg4 можно считать полноправными участниками и, более того, регуляторами процессов развития РКС у растений.

Протеиназы Atg4 относят к семейству цистеиновых протеиназ С54, принадлежащего к клану СА [24, 123]. В своей структуре представители семейства этих ферментов не содержат сигнального пептида, что определяет их цитоплазматическую локализацию. Основная функция этих ферментов – процессинг белка Atg8, который после такой посттрансляционной модификации становится способным связывать фосфотидилэтаноламин и, таким образом, инициировать образование аутофагосомы [124]. В отличие от дрожжей, у которых по одной копии генов Atg4 и Atg8, у млекопитающих и у растений по несколько гомологичных генов Atg4 и Atg8 [127, 128]. В геноме *A. thaliana* закодировано два гена Atg4 (AtAtg4a и AtAtg4b) и девять генов Atg8 (AtAtg8a–AtAtg8i) [128]. Нельзя исключать, что наличие у *A. thaliana* двух генов для протеиназ Atg4, может приводить к образованию двух белковых продуктов с различными функциями. И действительно в экспериментах *in vitro* было показано, что, несмотря на относительную идентичность по субстратной специфичности, AtAtg4a обладал более высокой протеолитической активностью, чем AtAtg4b [128]. Можно предположить, что такие различия могут иметь функциональное значение, в том числе, при регуляции процессов инициации и осуществления РКС.

### III. СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

Попытки выявить источники каспаза-подобной активности в клетках растений при развитии РКС привели к обнаружению еще одного протеолитического фермента, вовлеченного в процессы развития РКС у растений. Им оказался представитель субтилизин-подобного семейства протеиназ, названный в соответствии с источником и проявляемой активностью фитаспазой (от *fitó* – растение по-гречески и *aspartate specific protease*) [129]. Было показано, что фитаспаза участвует в процессе развития гиперчувствительного ответа у *N. tabacum*, содержащих ген устойчивости *N*, в ответ на инфекцию, вызванную вирусом табачной мозаики [129]. Кроме того, активность этого фермента выявляется при развитии реакции в ответ на механические повреждения у двудольных и однодольных растений [130].

Субтилизин-подобные протеиназы, которые иногда называют субтилазами, являются сериновыми протеиназами. Эти ферменты характерны наличием каталитической триады аминокислотных остатков: Asp, His и Ser [131]. Согласно классификации протеолитических ферментов, представленной в базе данных пептидаз MEROPS, субтилитзин-подобные ферменты относят к семейству S8,

входящему в клан SB [80]. В геномах растений присутствует большое количество генов различных субтилаз. Например, в геноме *A. thaliana* аннотировано 56 генов этих ферментов [132, 133]. Субтилазы, как и многие другие протеиназы, обычно транслируются в виде неактивного зимогена, который представляет собой полипептид, содержащий сигнальный пептид, продомен и домен пептидазы, внутри которого располагается протеиназа-ассоциированный домен [133–135]. О пространственной организации субтилаз можно судить по субтилазе томатов SISBT3, для которой определена ее пространственная структура [136]. В растениях субтилазы выполняют самые разнообразные функции, часть из которых связана с ответом на инфекцию, вызываемую патогенами [135]. Субстратная специфичность для многих из них не очень высока [132, 133].

В отличие от некоторых охарактеризованных субтилаз фитаспазы риса и *A. thaliana* оказались достаточно специфичными ферментами, распознающими, например, такой классический сайт расщепления каспазы-6, как VEID. Выяснилось, что фитаспаза также способна расщеплять целый ряд флуорогенных пептидных субстратов, расщепляемых каспазами, таких как YVAD, VAD, IETD, LEND и некоторые другие. В то же время следует отметить, что фитаспаза оказалась не способной расщеплять такой классический субстрат каспазы-3, как DEVD [129, 137], а наиболее эффективно расщепляла субстрат IWLQ, который значительно отличается от обычных субстратов каспаз [138]. Применение метода с использованием позиционной сканирующей субстратной комбинаторной библиотеки (positional scanning substrate combinatorial library; PS-SCL) [139] при исследовании фитаспазы риса позволило выявить, что в отличие от каспаз этот фермент предпочитает субстраты с превалированием гидрофобных аминокислотных остатков в позициях P4-P2 [138]. Кроме того, выяснилось, что с наибольшей эффективностью фитаспаза расщепляет полноразмерные белки, что позволяет сделать вывод о том, что взаимодействия субстрат-фитаспаза, скорее всего, не ограничиваются лишь взаимодействиями фермента с аминокислотными остатками в позициях P4-P1 субстрата [138].

Оверэкспрессия или сайленсинг гена фитаспазы в растениях приводили к повышению чувствительности к индукторам РКС или к супрессии развития РКС, соответственно, из чего можно сделать вывод о том, что фитаспаза является активным участником процессов развития клеточной смерти [129]. Однако наиболее примечательной особенностью фитаспаз оказалась их локализация. Выяснилось, что конститутивно-экспрессирующийся зимоген фита-

спазы процессируется и, в итоге, зрелый фермент секретируется из клетки в апопласт. При индукции РКС биотическими или абиотическими факторами активная фитаспаза транслоцируется обратно в цитоплазму клетки, в которой, как считается, начинает гидролизовать белки [129, 140]. К сожалению, пока охарактеризован лишь единственный природный субстрат фитаспазы – белок VirD2 у патогенной бактерии растений *Agrobacterium tumefaciens*. VirD2 отвечает за доставку фрагмента бактериальной ДНК в ядро зараженной клетки. В результате процессинга, осуществляемого фитаспазой, VirD2 лишается С-концевого сигнального фрагмента, ответственного за локализацию в ядре клетки, что может быть проявлением функционирования системы активной защиты клетки растений от нежелательной трансформации [141]. Однако этот процесс не связан непосредственно с развитием РКС. Таким образом, вопрос о том, какие природные субстраты фитаспаз процессируются во время развития РКС и каковы функциональные последствия такого гидролиза, пока остается открытым.

Было показано, что субтилизин-подобная протеиназа AtSBT1.1 у *A. thaliana* способна расщеплять препропептид фитосульфокина AtPSK4 [142]. Результатом такого протеолитического расщепления является активный гормон, способный стимулировать дифференцировку трахеальных элементов ксилемы [115]. В кДНК библиотеке, полученной из ткани ксилемы у *A. thaliana*, можно обнаружить ген еще одной субтилизин-подобной протеиназы – XSP1 [113]. Однако функции протеолитического фермента XSP1 пока не исследованы.

Еще, как минимум, два возможных субтилизин-подобных функциональных аналога животных каспаз выявлены в растениях овса. Оба эти фермента, названные саспазами (SAS-1 и SAS-2), обладают высокой субстратной специфичностью, сходной с каспазами [135, 143]. Было показано, что эти протеиназы в процессе развития РКС у овса, индуцированной токсином гриба *Cochliobolus victoriae* викторином и сопровождающейся такими характерными признаками, как фрагментация ДНК и дисфункция митохондрий, секретируются в межклеточное пространство [143]. Однако их функциональная роль в развитии РКС охарактеризована не была. Неизвестными также остаются и их природные субстраты.

#### IV. АСПАРТАТНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

В геноме *A. thaliana* обнаружено более пятидесяти генов, кодирующих аспартатные протеиназы [144]. Несмотря на такое большое количество генов (геном человека содержит гены только восьми аспартатных протеиназ [145], а в геноме *Caenorhabditis elegans* – их лишь двенадцать [146]), функции белковых продуктов этих генов так и остаются, в основном, неизученными. Согласно классификации протеолитических ферментов, представленной в базе данных пептидаз MEROPS, у растений встречаются представители семейств A1, A3, A11 и A12, принадлежащие к клану AA, а также представители семейства A22, принадлежащего к клану AD [80]. Обычно среди аспартатных протеиназ растений выделяют три группы: типичные (группа A), нуцеллин-подобные (группа B), а также атипичные (группа C) [144, 147]. Типичные аспартатные протеиназы растений обычно содержат дополнительный С-концевой домен, который отщепляется в процессе созревания фермента. Нуцеллин-подобные аспартатные протеиназы являются гомологами нуцеллина – протеиназы, обнаруженной в клетках нуцеллуса семязачатка ячменя, в то время как атипичные аспартатные протеиназы растений обладают различными промежуточными характеристиками, свойственными типичным и нуцеллин-подобным протеолитическим ферментам [144, 147].

Несмотря на ограниченное количество информации об участии аспартатных протеиназ в развитии РКС в клетках растений, к настоящему времени показано, что экспрессия генов двух атипичных протеиназ риса (*OsAP25* и *OsAP37*) в клетках тапетума регулируется транскрипционным фактором *EAT1*. В свою очередь, протеолитические ферменты *OsAP25* и *OsAP37* принимают участие в развитии процессов регулируемой смерти этих клеток [148]. С учетом того, что экспрессия нуцеллина у ячменя ограничена клетками нуцеллуса семязачатка, в которых происходит развитие РКС, можно предполагать участие и этого представителя аспартатных протеиназ в обеспечении процессов гибели клеток [149].

Также следует отметить, что среди аспартатных протеиназ, как и среди папаин-подобных протеиназ, были обнаружены протеолитические ферменты, способные ингибировать развитие РКС. Например, у *A. thaliana* атипичная аспартатная протеиназа *PCS1* содержит в своей первичной структуре N-концевой серин-богатый участок и локализуется в ЭПР. Этот фермент способен ингибировать развитие РКС в некоторых типах клеток, которые в норме гибнут. Более того, отсутствие экспрессии активной *PCS1* приводит к массо-

вому развитию РКС в гаметофитах обоих типов, а также при развитии эмбрионов [150]. Еще одним примером у *A. thaliana* является атипичная протеиназа UNDEAD, способная ингибировать развитие РКС клеток тапетума [151].

Таким образом, к настоящему времени показано, что представители аспартатных протеолитических ферментов участвуют в регуляции развития, как минимум, некоторых типов РКС, необходимых для нормального онтогенеза. При этом эти ферменты могут быть как положительными, так и негативными факторами развития РКС.

## V. ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ

У эукариот 26S протеасома является основным протеолитическим компонентом убиквитин-зависимой системы деградации белков. 26S протеасома, в том числе, и у растений состоит из двух компонентов: 20S протеасомы и двух 19S регуляторных частиц (RPs), которые, взаимодействуя с убиквитинилированными белками, придают 26S-комплексу субстратную специфичность. У *A. thaliana* три  $\beta$ -субъединицы из семи, входящих в состав 20S протеасом (РВА, РВВ и РВЕ), являясь представителями треониновых пептидаз (семейство T1, клан PB), обладают протеолитической активностью [152]. Клетки растений, как правило, содержат как 26S, так и свободные 20S протеасомы, способные, соответственно, расщеплять белки убиквитин-зависимо или убиквитин-независимо [152, 153].

Недавно было показано, что 20S протеасомы ответственны за каспаза-3-подобную активность, детектируемую при развитии РКС в ходе ксилогенеза у *A. thaliana* и у тополя [154]. А в работе Hatsugai и соавторов установлено, что именно протеолитически-активная  $\beta$ -субъединица 20S протеасомы РВА1 частично определяет каспаза-3-подобную активность, которую можно детектировать при развитии гиперчувствительного ответа у *A. thaliana* на бактериальную инфекцию, вызываемую *P. syringae* [155]. Итак, можно заключить, что в процессах РКС у растений могут быть задействованы протеасомы и/или их компоненты.

## VI. МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

В геномах растений также обнаруживаются гены матричных металлопротеиназ. Например, в геноме *A. thaliana* их пять [156, 157]. Согласно классификации протеолитических ферментов, представленной в базе данных пептидаз MEROPS, эти протеиназы являются представителями семейства M10 и принадлежат к клану MA [80]. Как и у других организмов, у растений матричные металлопротеиназы структурно состоят из сигнального пептида, продомена и каталитического домена, в котором выявляется цинк-связывающий мотив. Для активации фермента необходимо физически отделить продомен от каталитического сайта, что может достигаться, в том числе, с помощью протеолитического отщепления продомена [158]. Предполагают, что матричные металлопротеиназы растений локализируются либо в плазматической мембране, либо в межклеточном пространстве [156, 157]. Кроме того, у металлопротеиназы At4-MMP у *A. thaliana* был обнаружен неотщепляемый N-концевой сигнальный пептид, наличие которого может направлять этот фермент в ЭПР [156]. В литературе отсутствуют данные об участии матричных металлопротеиназ растений в процессах РКС у растений за исключением того, что ген матричной металлопротеиназы огурца Cs1-MMP экспрессируется *de novo* в завершающей стадии процессов старения семядоли перед самым началом развития процессов РКС [159]. Этот факт позволяет предполагать, что матричные металлопротеиназы растений могут быть вовлечены в процессы развития РКС у растений, а изучение их функций в этих процессах еще ждет своих исследователей.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномы растений кодируют гены сотен протеиназ. У *A. thaliana* их число приближается к 800 [24]. Среди белковых продуктов генов протеиназ растений обнаруживаются представители всех пяти основных классов протеолитических ферментов: цистеиновые, сериновые, аспартатные, треониновые и металлопротеиназы. В настоящее время стало понятно, что представители всех этих классов протеолитических ферментов могут быть вовлечены в процессы развития различных типов регулируемой клеточной смерти (РКС) (таблица).

В данном обзоре собраны и систематизированы данные о том, какие протеолитические ферменты растений и каким образом способны регулировать инициацию и обеспечивать дальнейшие процессы развития РКС, вызванной биотическими и абиотическими



факторами, а также особенностями онтогенеза растений. Однако в данном обзоре за редким исключением не обсуждались вопросы участия протеолитических ферментов растений в процессах старения, т.к. в этом случае пока сложно отличить процессы, предшествующие РКС, и процессы непосредственного развития РКС. Кроме того, участие протеолитических ферментов в процессах старения у растений неоднократно рассматривалось ранее [160, 161].

Следует признать, что в данный момент только начинается накопление знаний о функциональной роли каждого из протеолитических ферментов, регулирующих и обеспечивающих процессы РКС у растений. В настоящее время выявлено всего лишь несколько физиологических субстратов этих ферментов, и очевидно, что большинство их субстратов в будущем еще предстоит охарактеризовать. В современной литературе имеется несколько указаний на то, что у растений, как и у животных, во время инициации и развития РКС могут функционировать протеолитические каскады. Выявление конкретных эндопептидаз, участвующих в таких каскадах, несомненно будет предметом дальнейших исследований. Кроме того, к настоящему моменту у растений известны типы РКС, для которых уже показано участие сразу нескольких протеолитических ферментов, однако вопрос о регуляции их взаимодействий остается пока без ответа.

Причиной активных исследований РКС у человека и животных, во-многом, является то, что РКС у человека напрямую связана с процессами канцерогенеза. К настоящему моменту становится очевидным, что РКС у растений имеет непосредственное отношение к процессам развития, а также к процессам обеспечения устойчивости растений к различным стрессам и патогенам. Таким образом, исследования молекулярных механизмов регуляции и развития РКС у растений приобретает не только фундаментальное, но и важное прикладное значение, т.к. позволит в перспективе создать новые способы управления защитными реакциями и процессами онтогенеза растений.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nuñez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2015) Essential *versus* accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015, *Cell Death and Differentiation*, **22**, 58–73.
2. Lockshin, R.A. (2008) Early work on apoptosis, an interview with Richard Lockshin, *Cell Death and Differentiation*, **15**, 1091–1095.
3. Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G. (2005) Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death and Differentiation*, **12**, 1463–1467.
4. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death and Differentiation*, **19**, 107–120.
5. Crawford, E.D., Wells, J.A. (2011) Caspase substrates and cellular remodeling, *Annual Review of Biochemistry*, **80**, 1055–1087.
6. 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., Smerthenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2011) Morphological classification of plant cell deaths, *Cell Death Differentiation*, **18**, 1241–1246.
7. Sánchez-Vallet, A., Mesters, J.R., Thomma, B.P. (2015) The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions, *FEMS Microbiology Reviews*, **39**, 171–183.

8. Соловьева А.Д., Фролова О.Ю., Соловьев А.Г., Морозов С.Ю., Замятнин А.А. мл. (2013) Влияние митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 на программируемую клеточную смерть, индуцированную вирусными белками в растениях табака, *Биохимия*, **78**, 1284–1292.
9. Lukhovitskaya, N.I., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A. Jr., Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Sandgren, M., Morozov, S.Y., Valkonen, J.P., Savenkov, E.I. (2005) Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of *Potato mop-top virus*, *Journal of General Virology*, **86**, 2879–2889.
10. Ye, C.M., Chen, S., Payton, M., Dickman, M.B., Verchot, J. (2013) TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death, *Molecular Plant Pathology*, **14**, 241–255.
11. Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., Gechev, T.S. (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants, *Frontiers in Plant Science*, **6**, 69.
12. Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E. (2014) Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **232**, 1–44.
13. Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N., Gallois, P. (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 779–787.
14. Kim, Y., Wang, M., Bai, Y., Zeng, Z., Guo, F., Han, N., Bian, H., Wang, J., Pan, J., Zhu, M. (2014) Bcl-2 suppresses activation of VPEs by inhibiting cytosolic Ca<sup>2+</sup> level with elevated K<sup>+</sup> efflux in NaCl-induced PCD in rice, *Plant Physiology and Biochemistry*, **80**, 168–175.
15. Li, Z., Yue, H., Xing, D. (2012) MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, **195**, 85–96.
16. Bagniewska-Zadworna A, Arasimowicz-Jelonek M, Smoliński D.J., Stelmasik A. (2015) New insights into pioneer root xylem development: evidence obtained from *Populus trichocarpa* plants grown under field conditions, *Annals of Botany*, **113**, 1235–1247.
17. Avci, U., Petzold, H.E., Ismail, I.O., Beers, E.P., Haigler, C.H. (2008) Cysteine proteases XCP1 and XCP2 aid micro-autolysis within the intact central vacuole during xylogenesis in *Arabidopsis* roots, *The Plant Journal*, **56**, 303–315.
18. del Pozo, O., Lam, E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens, *Current Biology*, **8**, 1129–1132.
19. Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E., Gallois, P. (2008) What happened to plant caspases?, *Journal of Experimental Botany*, **59**, 491–499.
20. Sasaki, T. (1998) The rice genome project in Japan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 2027–2028.
21. Dennis, C., Surrige, C. (2000) *Arabidopsis thaliana* genome. Introduction, *Nature*, **408**, 791.
22. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death, *Science*, **305**, 855–858.

23. 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) VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens, *Current Biology*, **14**, 1897–1906.
24. Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Research*, **42**, D503–D509.
25. Hiraiwa, N., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1999) Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides, *FEBS Letters*, **447**, 213–216.
26. Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide, *Plant and Cell Physiology*, **43**, 143–151.
27. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N. (2011) The role of vacuole in plant cell death, *Cell Death and Differentiation*, **18**, 1298–1304.
28. Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I. (2015) Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death, *Frontiers in Plant Science*, **6**, 234.
29. Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death, *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 404–408.
30. Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 32914–32920.
31. Gauthier, A., Lamotte, O., Reboutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., Wendehenne, D. (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death, *Plant Signaling and Behavior*, **2**, 86–95.
32. Kumar, D., Rampuria, S., Singh, N.K., Shukla, P., Kirti, P.B. (2015) Characterization of a vacuolar processing enzyme expressed in *Arachis diogeni* in resistance responses against late leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis personata*, *Plant Molecular Biology*, **88**, 177–191.
33. Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M.U., Kogel, K.H., Schäfer, P. (2012) The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death, *The Plant Cell*, **24**, 794–809.
34. Deng, M., Bian, H., Xie, Y., Kim, Y., Wang, W., Lin, E., Zeng, Z., Guo, F., Pan, J., Han, N., Wang, J., Qian, Q., Zhu, M. (2011) Bcl-2 suppresses hydrogen peroxide-induced programmed cell death via OsVPE2 and OsVPE3, but not via OsVPE1 and OsVPE4, in rice, *The FEBS Journal*, **278**, 4797–4810.
35. Kadono, T., Tran, D., Errakhi, R., Hiramatsu, T., Meimoun, P., Briand, J., Iwaya-Inoue, M., Kawano, T., Bouteau, F. (2010) Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death, *PLoS One*, **5**, e13373.
36. Yakimova, E.T., Kapchina-Toteva, V.M., Laarhoven, L.J., Harren, F.M., Woltering, E.J. (2006) Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells, *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 581–589.

37. Yakimova, E.T., Kapchina-Toteva, V.M., Woltering, E.J. (2007) Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells, *Journal of Plant Physiology*, **164**, 702–708.
38. Kariya, K., Demiral, T., Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Turkan, I., Sano, T., Hasezawa, S., Yamamoto, Y. (2013) A novel mechanism of aluminum-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **128**, 196–201.
39. Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005) A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development, *The Plant Cell*, **17**, 876–887.
40. Radchuk, V., Weier, D., Radchuk, R., Weschke, W., Weber, H. (2011) Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth, *Journal of Experimental Botany*, **62**, 1217–1227.
41. Tran, V., Weier, D., Radchuk, R., Thiel, J., Radchuk, V. (2014) Caspase-like activities accompany programmed cell death events in developing barley grains, *PLoS One*, **9**, e109426.
42. Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions, *The Plant Journal*, **19**, 43–53.
43. Müller, G.L., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Lara, M.V. (2010) Role of photosynthesis and analysis of key enzymes involved in primary metabolism throughout the lifespan of the tobacco flower, *Journal of Experimental Botany*, **61**, 3675–3688.
44. Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma, *Molecular Cell*, **6**, 961–967.
45. 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) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 45329–45336.
46. Watanabe, N., Lam, E. (2005) Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 14691–14699.
47. Bozhkov, P.V., Suarez, M.F., Filonova, L.H., Daniel, G., Zamyatnin, A.A. Jr., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Smertenko, A. (2005) Cysteine protease mCII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 14463–14468.
48. Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavalov, A., Lam, E., Bozhkov, P.V. (2011) Metacaspases, *Cell Death and Differentiation*, **18**, 1279–1288.
49. Acosta-Maspons, A., Sepúlveda-García, E., Sánchez-Baldoquín, L., Marrero-Gutiérrez, J., Pons, T., Rocha-Sosa, M., González, L. (2014) Two aspartate residues at the putative p10 subunit of a type II metacaspase from *Nicotiana tabacum* L. may

- contribute to the substrate-binding pocket, *Planta*, 239, 147–160.
50. Fagundes, D., Bohn, B., Cabreira, C., Leipelt, F., Dias, N., Bodanese-Zanettini, M.H., Cagliari, A. (2015) Caspases in plants: metacaspase gene family in plant stress responses, *Functional and Integrative Genomics*, in press, doi: 10.1007/s10142-015-0459-7.
51. Choi, C.J., Berges, J.A. (2013) New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases, *Cell Death and Disease*, 4, e490.
52. Wen, S., Ma, Q.M., Zhang, Y.L., Yang, J.P., Zhao, G.H., Fu, D.Q., Luo, Y.B., Qu, G.Q. (2013) Biochemical evidence of key residues for the activation and autoprocessing of tomato type II metacaspase, *FEBS Letters*, 587, 2517–2522.
53. Watanabe, N., Lam, E. (2011) Calcium-dependent activation and autolysis of *Arabidopsis* metacaspase 2d, *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 10027–10040.
54. Zhang, Y., Lam, E. (2011) Sheathing the swords of death: post-translational modulation of plant metacaspases, *Plant Signaling and Behavior*, 6, 2051–2056.
55. Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackener, A., Inzé, D., Delledonne, M., Van Breusegem, F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 1352–1358.
56. Huang, L., Zhang, H., Hong, Y., Liu, S., Li, D., Song, F. (2015) Stress-responsive expression, subcellular localization and protein-protein interactions of the rice metacaspase family, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 16216–16241.
57. Bollhöner, B., Zhang, B., Stael, S., Denancé, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F., Tuominen, H. (2013) Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements, *New Phytologist*, 200, 498–510.
58. Tsiatsiani, L., Timmerman, E., De Bock, P.J., Vercammen, D., Stael, S., van de Cotte, B., Staes, A., Goethals, M., Beunens, T., Van Damme, P., Gevaert, K., Van Breusegem, F. (2013) The *Arabidopsis* metacaspase9 degradome, *The Plant Cell*, 25, 2831–2847.
59. Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L., Epple, P. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death, *Science*, 330, 1393–1397.
60. Coll, N.S., Smidler, A., Puigvert, M., Popa, C., Valls, M., Dangl, J.L. (2014) The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy, *Cell Death and Differentiation*, 21, 1399–1408.
61. Kim, S.M., Bae, C., Oh, S.K., Choi, D. (2013) A pepper (*Capsicum annuum* L.) metacaspase 9 (Camc9) plays a role in pathogen-induced cell death in plants, *Molecular Plant Pathology*, 14, 557–566.
62. Wang, X., Wang, X., Feng, H., Tang, C., Bai, P., Wei, G., Huang, L., Kang, Z. (2012) TaMCA4, a novel wheat metacaspase gene functions in programmed cell death induced by the fungal pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 755–764.
63. Hao, L., Goodwin, P.H., Hsiang, T. (2007) Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and the effect of silencing the gene on the host response, *Plant Cell Reports*, 26, 1879–1888.
64. Watanabe, N., Lam, E. (2011) *Arabidopsis* metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during



- biotic and abiotic stresses, *The Plant Journal*, **66**, 969–982.
65. He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J., Gallois, P. (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis*, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 774–783.
  66. Minina, E.A., Filonova, L.H., Fukada, K., Savenkov, E.I., Gogvadze, V., Clapham, D., Sanchez-Vera, V., Suarez, M.F., Zhivotovsky, B., Daniel, G., Smertenko, A., Bozhkov, P.V. (2013) Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants, *The Journal of Cell Biology*, **203**, 917–927.
  67. Wrzaczek, M., Vainonen, J.P., Stael, S., Tsiatsiani, L., Help-Rinta-Rahko, H., Gauthier, A., Kaufholdt, D., Bollhöner, B., Lamminmäki, A., Staes, A., Gevaert, K., Tuominen, H., Van Breusegem, F., Helariutta, Y., Kangasjärvi, J. (2015) GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in *Arabidopsis*, *The EMBO Journal*, **34**, 55–66.
  68. Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.A., De Rycke, R., Brackener, A., Inzé, D., Harris, J.L., Van Breusegem, F. (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9, *Journal of Molecular Biology*, **364**, 625–636.
  69. Sundström, J.F., Vaculova, A., Smertenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatnin, A.A. Jr., Välineva, T., Saarikettu, J., Frilander, M.J., Suarez, M.F., Zavalov, A., Ståhl, U., Hussey, P.J., Silvennoinen, O., Sundberg, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2009) Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome, *Nature Cell Biology*, **11**, 1347–1354.
  70. Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., Plasterk, R.H. (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes, *Nature*, **425**, 411–414.
  71. Scadden AD. (2005) The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage, *Nature Structural and Molecular Biology*, **12**, 489–496.
  72. Hundley, H.A., Bass, B.L. (2010) ADAR editing in double-stranded UTRs and other noncoding RNA sequences, *Trends in Biochemical Sciences*, **35**, 377–383.
  73. Замятнин А.А. мл., Лямзаев К.Г., Зиновкин Р.А. (2010) А→I редактирование РНК: вклад в многообразии транскриптома и развитие организмов, *Биохимия*, **75**, 1489–1498.
  74. Gutierrez-Beltran, E., Moschou, P.N., Smertenko, A.P., Bozhkov, P.V. (2015) Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, **27**, 926–943.
  75. Strobel, I., Osiewacz, H.D. (2013) Poly(ADP-ribose) polymerase is a substrate recognized by two metacaspases of *Podospora anserina*, *Eukaryotic Cell*, **12**, 900–912.
  76. Martínez, M., Cambra, I., González-Melendi, P., Santamaría, M.E., Díaz, I. (2012) C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants, *Physiologia Plantarum*, **145**, 85–94.
  77. Trobacher, C.P., Senatore, A., and Greenwood, J.S. (2006). Masterminds or minions? Cysteine proteases in plant programmed cell death, *Canadian Journal of Botany*, **84**, 651–667.
  78. Turk, V., Turk, B., Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities, *The EMBO Journal*, **20**, 4629–4633.

79. Than, M.E., Helm, M., Simpson, D.J., Lottspeich, F., Huber, R., Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm, *Journal of Molecular Biology*, **336**, 1103–1116.
80. Richau, K.H., Kaschani, F., Verdoes, M., Pansuriya, T.C., Niessen, S., Stüber, K., Colby, T., Overkleeft, H.S., Bogyo, M., Van der Hoorn, R.A. (2012) Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics, *Plant Physiology*, **158**, 1583–1599.
81. Hierl, G., Höwing, T., Isono, E., Lottspeich, F., Gietl, C. (2014) *Ex vivo* processing for maturation of *Arabidopsis* KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles, *Plant Molecular Biology*, **84**, 605–620.
82. Liu, H., Chen, L., Li, Q., Zheng, M., Liu, J. (2014) Computational study on substrate specificity of a novel cysteine protease 1 precursor from *Zea mays*, *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 10459–10478.
83. Savvateeva, L.V., Gorokhovets, N.V., Makarov, V.A., Serebryakova, M.V., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Reddy, V.P., Zernii, E.Y., Zamyatnin, A.A. Jr., Aliev, G. (2015) Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain- $\alpha$ : feasibility for enzymatic therapy assays, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **62**, 115–124.
84. van der Hoorn, R.A. (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms, *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 191–223.
85. Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., Gietl, C. (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment, *Planta*, **206**, 466–475.
86. Schmid, M., Simpson, D.J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Gietl, C. (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5353–5358.
87. Gu, C., Shabab, M., Strasser, R., Wolters, P.J., Shindo, T., Niemer, M., Kaschani, F., Mach, L., van der Hoorn, R.A. (2012) Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, **7**, e32422.
88. Madureira, H.C., Da Cunha, M., Jacinto, T. (2006) Immunolocalization of a defense-related 87 kDa cystatin in leaf blade of tomato plants, *Environmental and Experimental Botany*, **55**, 201–208.
89. Martínez, M., Díaz, I. (2008) The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship, *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 198.
90. Nissen, M.S., Kumar, G.N., Youn, B., Knowles, D.B., Lam, K.S., Ballinger, W.J., Knowles, N.R., Kang, C. (2009) Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins, *The Plant Cell*, **21**, 861–875.
91. Green, A.R., Nissen, M.S., Kumar, G.N., Knowles, N.R., Kang, C. (2013) Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and the significance of core domains, *The Plant Cell*, **25**, 5043–5052.
92. Martínez, M., Díaz-Mendoza, M., Carrillo, L., Díaz, I. (2007) Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases, *FEBS Letters*, **581**, 2914–2918.

93. Margis-Pinheiro, M., Zolet, A.C., Loss, G., Pasquali, G., Margis, R. (2008) Molecular evolution and diversification of plant cysteine protease inhibitors: new insights after the poplar genome, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**, 349–355.
94. Lampl, N., Budai-Hadrian, O., Davydov, O., Joss, T.V., Harrop, S.J., Curmi, P.M., Roberts, T.H., Fluhr, R. (2010) *Arabidopsis* AtSerpin1, crystal structure and *in vivo* interaction with its target protease RESPONSIVE TO DESICCATION-21 (RD21), *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 13550–13560.
95. Fluhr, R., Lampl, N., Roberts, T.H. (2012) Serpin protease inhibitors in plant biology, *Physiologia Plantarum*, **145**, 95–102.
96. Ahmed, S.U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J.E., Matsuoka, K., Raikhel, N.V. (2000) The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH<sub>2</sub>-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*, *The Journal of Cell Biology*, **149**, 1335–1344.
97. Helm, M., Schmid, M., Hierl, G., Terneus, K., Tan, L., Lottspeich, F., Kieliszewski, M.J., Gietl, C. (2008) KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds, *American Journal of Botany*, **95**, 1049–1062.
98. Greenwood, J.S., Helm, M., Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 2238–2243.
99. Höwing, T., Huesmann, C., Hoefle, C., Nagel, M.K., Isono, E., Hückelhoven, R., Gietl, C. (2014) Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of *Arabidopsis* (AtCEP1) is involved in pathogen defense, *Frontiers in Plant Science*, **5**, 58.
100. Hierl, G., Vothknecht, U., Gietl, C. (2012) Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development, *Physiologia Plantarum*, **145**, 103–113.
101. Zhang, D., Liu, D., Lv, X., Wang, Y., Xun, Z., Liu, Z., Li, F., Lu, H. (2014) The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, **26**, 2939–2961.
102. Valpuesta, V., Lange, N.E., Guerrero, C., Reid, M.S. (1995) Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Hemerocallis*) flowers, *Plant Molecular Biology*, **28**, 575–582.
103. Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Li, J., O'Neill, S.D. (1996) Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs, *The Plant Cell*, **8**, 213–239.
104. Rocha, A.J., Soares, E.L., Costa, J.H., Costa, W.L., Soares, A.A., Nogueira, F.C., Domont, G.B., Campos, F.A. (2013) Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*), *Plant Science*, **213**, 30–37.
105. Trobacher, C.P., Senatore, A., Holley, C., Greenwood, J.S. (2013) Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid, *Planta*, **237**, 665–79.
106. Senatore, A., Trobacher, C.P., Greenwood, J.S. (2009) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato, *Plant Physiology*, **149**, 775–790.



107. Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2001) A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves, *Plant Physiology*, **127**, 1626–1634.
108. Bateman, A., Bennett, H.P. (2009) The granulin gene family: from cancer to dementia, *BioEssays*, **31**, 1245–1254.
109. Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., Raikhel, N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins, *The Plant Cell*, **16**, 3285–3303.
110. Lampl, N., Alkan, N., Davydov, O., Fluhr, R. (2013) Set-point control of RD21 protease activity by AtSerp1 controls cell death in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, **74**, 498–510.
111. Zhao, P., Zhou, X.M., Zhang, L.Y., Wang, W., Ma, L.G., Yang, L.B., Peng, X.B., Bozhkov, P.V., Sun, M.X. (2013) A bipartite molecular module controls cell death activation in the Basal cell lineage of plant embryos, *PLoS Biology*, **11**, e1001655.
112. Kim, M.J., Yamamoto, D., Matsumoto, K., Inoue, M., Ishida, T., Mizuno, H., Sumiya, S., Kitamura, K. (1992) Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites, *Biochemical Journal*, **287**, 797–803.
113. Zhao, C., Johnson, B.J., Kositsup, B., Beers, E.P. (2000) Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases, *Plant Physiology*, **123**, 1185–1196.
114. Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C., Beers, E.P. (2002) The *Arabidopsis* xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog, *Plant Physiology*, **128**, 84–94.
115. Petzold, H.E., Zhao, M., Beers, E.P. (2012) Expression and functions of proteases in vascular tissues, *Physiologia Plantarum*, **145**, 121–129.
116. McLellan, H., Gilroy, E.M., Yun, B.W., Birch, P.R., Loake, G.J. (2009) Functional redundancy in the *Arabidopsis* Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence, *New Phytologist*, **183**, 408–418.
117. Gilroy, E.M., Hein, I., van der Hoorn, R., Boevink, P.C., Venter, E., McLellan, H., Kaffarnik, F., Hrubikova, K., Shaw, J., Holeva, M., López, E.C., Borrás-Hidalgo, O., Pritchard, L., Loake, G.J., Lacomme, C., Birch, P.R. (2007) Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response, *The Plant Journal*, **52**, 1–13.
118. Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., de Wit, P.J., Marco, Y., Deslandes, L. (2008) RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector, *The Plant Cell*, **20**, 2252–2264.
119. Xu, F.X., Chye, M.L. (1999) Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal, *The Plant Journal*, **17**, 321–327.
120. Lohman, K.N., Gan, S., John, M.C. and Amasino, R.M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Physiologia Plantarum*, **92**, 322–328.
121. Otegui, M.S., Noh, Y.S., Martinez, D.E., Vila Petroff, M.G., Staehelin, L.A., Amasino, R.M., Guamet, J.J. (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic

- activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean, *The Plant Journal*, **41**, 831–844.
122. Singh, S., Giri, M.K., Singh, P.K., Siddiqui, A., Nandi, A.K. (2013) Down-regulation of OsSAG12-1 results in enhanced senescence and pathogen-induced cell death in transgenic rice plants, *Journal of Biosciences*, **38**, 583–592.
  123. Mariño, G., Uría, J.A., Puente, X.S., Quesada, V., Bordallo, J., López-Otín, C. (2003) Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 3671–3678.
  124. Kaminsky, V., Zhivotovsky, B. (2012) Proteases in autophagy, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1824**, 44–50.
  125. Escamez, S., Tuominen, H. (2014) Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal, *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1313–1321.
  126. Minina, E.A., Bozhkov, P.V., Hofius, D. (2014) Autophagy as initiator or executioner of cell death, *Trends in Plant Science*, **19**, 692–697.
  127. Li, M., Hou, Y., Wang, J., Chen, X., Shao, Z.M., Yin, X.M. (2011) Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates, *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 7327–7338.
  128. Woo, J., Park, E., Dinesh-Kumar, S.P. (2014) Differential processing of *Arabidopsis* ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 863–868.
  129. 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., Taliansky, M. (2010) Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity, *The EMBO Journal*, **29**, 1149–1161.
  130. Chichkova, N.V., Galiullina, R.A., Taliansky, M.E., Vartapetian, A.B. (2008) Tissue disruption activates a plant caspase-like protease with TATD cleavage specificity, *Plant Stress*, **2**, 89–95.
  131. Dodson, G., Wlodawer, A. (1998) Catalytic triads and their relatives, *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 347–352.
  132. Rautengarten, C., Steinhauser, D., Büssis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J., Altmann, T. (2005) Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family, *PLoS Computational Biology*, **1**, e40.
  133. Schaller, A., Stintzi, A., Graff, L. (2012) Subtilases – versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment, *Physiologia Plantarum*, **145**, 52–66.
  134. Yamagata, H., Masuzawa, T., Nagaoka, Y., Ohnishi, T., Iwasaki, T. (1994) Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor, *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 32725–32731.
  135. Vartapetian, A.B., Tuzhikov, A.I., Chichkova, N.V., Taliansky, M., Wolpert, T.J. (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases, *Cell Death and Differentiation*, **18**, 1289–1297.
  136. Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Schaller, A. (2009) Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3,

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 17223–17228.
137. Чичкова Н.В., Галиуллина Р.А., Белошистов Р.Е., Балакирева А.В., Вартапетян А.Б. (2014) Фитаспазы: аспаратспецифичные апоптотические протеазы растений, *Биоорганическая химия*, **40**, 658–664.
138. Galiullina, R.A., Kasperkiewicz, P., Chichkova, N.V., Szalek, A., Serebryakova, M.V., Poreba, M., Drag, M., Vartapetian, A.B. (2015) Substrate Specificity and Possible Heterologous Targets of Phytaspase, a Plant Cell Death Protease, *The Journal of Biological Chemistry*, in press, doi: 10.1074/jbc.M115.675819
139. Poreba, M., Szalek, A., Kasperkiewicz, P., Drag, M. (2014) Positional scanning substrate combinatorial library (PS-SCL) approach to define caspase substrate specificity, *Methods in Molecular Biology*, **1133**, 41–59.
140. Фомичева А.С., Тужиков А.И., Белошистов Р.Е., Трусова С.В., Галиуллина Р.А., Мочалова Л.В., Чичкова Н.В., Вартапетян А.Б. (2012) Программированная клеточная смерть у растений, *Успехи биологической химии*, **52**, 97–126.
141. Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E., Vartapetian, A.B. (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response, *The Plant Cell*, **16**, 157–171.
142. Srivastava, R., Liu, J.X., Howell, S.H. (2008) Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, **56**, 219–227.
143. Coffeen, W.C., Wolpert, T.J. (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*, *The Plant Cell*, **16**, 857–873.
144. Faro, C., Gal, S. (2005) Aspartic proteinase content of the *Arabidopsis* genome, *Current Protein and Peptide Science*, **6**, 493–500.
145. Dunn, B.M. (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases, *Chemical Reviews*, **102**, 4431–4458.
146. Geier, G., Banaj, H.J., Heid, H., Bini, L., Pallini, V., Zwilling, R. (1999) Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans*. Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis, *European Journal of Biochemistry*, **264**, 872–879.
147. Guo, R., Xu, X., Carole, B., Li, X., Gao, M., Zheng, Y., Wang, X. (2013) Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape, *BMC Genomics*, **14**, 554.
148. Niu, N., Liang, W., Yang, X., Jin, W., Wilson, Z.A., Hu, J., Zhang, D. (2013) EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice, *Nature Communications*, **4**, 1445.
149. Chen, F., Foolad, M.R. (1997) Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration, *Plant Molecular Biology*, **35**, 821–831.
150. Ge, X., Dietrich, C., Matsuno, M., Li, G., Berg, H., Xia, Y. (2005) An *Arabidopsis* aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis, *EMBO Reports*, **6**, 282–288.

151. Phan, H.A., Iacuone, S., Li, S.F., Parish, R.W. (2011) The MYB80 transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Cell*, **23**, 2209–2224.
152. Kurepa, J., Smalle, J.A. (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, **90**, 324–335.
153. Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Smalle, J. (2009) Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance, *Plant Signaling and Behavior*, **4**, 924–927.
154. Han, J.J., Lin, W., Oda, Y., Cui, K.M., Fukuda, H., He, X.Q. (2012) The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development, *The Plant Journal*, **72**, 129–141.
155. Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens, *Genes and Development*, **23**, 2496–2506.
156. Maidment, J.M., Moore, D., Murphy, G.P., Murphy, G., Clark, I.M. (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity, *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 34706–34710.
157. Marino, G., Huesgen, P.F., Eckhard, U., Overall, C.M., Schröder, W.P., Funk, C. (2014) Family-wide characterization of matrix metalloproteinases from *Arabidopsis thaliana* reveals their distinct proteolytic activity and cleavage site specificity, *Biochemical Journal*, **457**, 335–346.
158. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlir-Hansen, L., Winberg, J.O. (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease, *The FEBS Journal*, **278**, 28–45.
159. Delorme, V.G., McCabe, P.F., Kim, D.J., Leaver, C.J. (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber, *Plant Physiology*, **123**, 917–927.
160. Roberts, I.N., Caputo, C., Criado, M.V., Funk, C. (2012) Senescence-associated proteases in plants, *Physiologia Plantarum*, **145**, 130–139.
161. Díaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., González-Melendi, P., Martínez, M., Díaz, I. (2014) C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence, *Journal of Experimental Botany*, **65**, 3825–3833.