

# РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

© 2002 г. Т. А. ВАЛУЕВА, В. В. МОСОЛОВ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Насекомые и другие вредители. III. Патогенные микроорганизмы. IV. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, которые позволяют им успешно противостоять различного рода неблагоприятным воздействиям, в том числе, вредителям и фитопатогенным микроорганизмам [77, 100, 148]. Важнейшими составляющими всех действующих механизмов защиты являются вещества белковой природы. В их число входят ферменты, такие как  $\beta$ -1,3-глюканазы, хитиназы, ингибиторы протеаз и  $\alpha$ -амилаз, лектины, а также другие белки и пептиды, обладающие антимикробной активностью [48, 49, 130, 138]. Достаточно сказать, что повреждение листьев томатов (*Lycopersicon esculentum* [Mill.]) насекомыми или микроорганизмами индуцировало синтез более двадцати различных белков, включая ингибиторы сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ, а также металлсодержащей карбоксипептидазы [140].

Вопрос об участии ингибиторов протеиназ в защитных реакциях растений был затронут в ряде обзоров [3, 50, 96, 133, 138]. Однако постоянно появляются новые экспериментальные данные, которые не только расширяют существующие представления в этой области,

---

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за финансовую поддержку (грант 01–04–48072).

*Принятые сокращения:* СС-I — ингибитор цистеиновых протеиназ из кукурузы; СрТI — ингибитор трипсина из вигны; ОС-I и ОС-II — ингибиторы цистеиновых протеиназ из риса; РI-II — ингибитор сериновых протеиназ II из картофеля; СВТI — ингибитор трипсина Кунитца из сои.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: valueva@inbi.ras.ru

но и дают возможность по-новому оценить проблему в целом. Рассмотренные в представленном обзоре вопросы представляют не только теоретический интерес, но и приобретают в последние годы важное практическое значение, особенно, в свете достижений биотехнологии по созданию трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к различного рода вредителям и патогенным микроорганизмам [106, 138, 144].

## II. НАСЕКОМЫЕ И ДРУГИЕ ВРЕДИТЕЛИ

В пищеварительном тракте насекомых содержатся протеолитические ферменты, принадлежащие ко всем четырем механистическим (классифицированным по механизму действия) классам протеаз. Однако у представителей различных систематических групп имеются свои характерные особенности. Так, у насекомых, принадлежащих к отряду чешуекрылых (*Lepidoptera*), к которому относятся многие наиболее важные вредители сельского хозяйства, первоначальное расщепление белков в пищеварительном тракте осуществляется преимущественно протеиназами серинового типа [138, 166]. С помощью специфических субстратов и химических ингибиторов было установлено, что сериновые протеиназы в кишечнике различных *Lepidoptera* представлены трипсино-, химоотрипсино- и эластазоподобными ферментами [53]. Так, в экстрактах из кишечника табачной совки (*Heliothis virescens*) более 90% общей протеолитической активности приходится на долю трипсина и химоотрипсина [53]. У другого насекомого (*Lecanobia oleracea*) протеолитическая активность распределяется приблизительно поровну между трипсино-, химоотрипсино- и эластазоподобными протеиназами [54]. В отличие от представителей отряда *Lepidoptera* у насекомых, относящихся к отряду жесткокрылых (*Coleoptera*), первоначальное расщепление белков в кишечнике осуществляется преимущественно цистеиновыми протеиназами [8, 95, 116, 151, 165]. У колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) основные пищеварительные ферменты представлены протеиназами, близкими по свойствам катепсинам Н, L и В млекопитающих [109, 151]. Однако протеолитическая система колорадского жука является достаточно сложной и включает, кроме цистеиновых протеиназ, аспартильную протеиназу, напоминающую катепсин D [27, 151], сериновую протеиназу типа химоотрипсина, а также лейцинаминопептидазу и карбоксипептидазу А [120]. В кишечнике другого представителя *Coleoptera*, долгоносика (*Hypera postica*), наряду с цистеиновыми протеиназами, катепсинами L и B, также обнаружена аспартильная протеиназа типа катепсина D [163].

Следует отметить, что состав протеолитических ферментов в пищеварительном тракте некоторых насекомых может претерпевать определенные изменения в зависимости от стадии развития. Такое явление наблюдалось у хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*). У личинок насекомого на пятой стадии развития более 90% ферментов пищеварительного тракта представлено сериновыми протеиназами, тогда как на второй стадии развития обнаруживались ферменты других типов – аспартильные и металлсодержащие протеазы [126]. Определенные изменения в качественном и количественном составе протеолитических ферментов наблюдали у насекомых и при смене растения–хозяина [126].

Как показали многочисленные исследования, ингибиторы протеиназ из растений, первоначально описанные как ингибиторы трипсина и химотрипсина животных, способны эффективно подавлять активность сериновых протеиназ, содержащихся в пищеварительном тракте насекомых [53, 138]. Было установлено также, что содержание насекомых на искусственной диете с добавкой ингибиторов трипсина и химотрипсина снижает их выживаемость, приводит к уменьшению биомассы по сравнению с контролем, замедляет развитие (увеличивается время перехода из одной стадии жизненного цикла в другую) [17, 24, 51]. Аналогичное влияние оказывали и ингибиторы цистеиновых протеиназ растительного происхождения [88, 122]. Неблагоприятное воздействие ингибиторов протеиназ на насекомых, по-видимому, определяется, в первую очередь, тем, что, подавляя активность ферментов пищеварительного тракта, они препятствуют эффективному использованию белков пищи, т.е. действуют как типичные антиметаболиты [53, 138]. В то же время нельзя исключить и другие пути влияния ингибиторов протеиназ на организм насекомых, особенно, учитывая полифункциональный характер многих из этих белков [10].

Важным подтверждением активной роли ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений от насекомых послужили работы, в которых наблюдалась индукция синтеза этих белков в ответ на нарушение целостности растительной ткани. В 1972 году было показано, что повреждение листьев томатов и картофеля колорадским жуком или его личинками вызывает быстрое увеличение содержания в растении ингибиторов трипсина и химотрипсина. Это увеличение не ограничивалось поврежденными листьями и распространялось на все надземные части растений, т.е. ответ носит системный характер [64]. Сходный эффект вызывало и простое механическое повреждение листовой ткани [64]. Дальнейшие исследования показали, что в результате механического повреждения в растении может происходить

накопление ингибиторов цистеиновых и аспартильных протеиназ, а также ингибитора металлсодержащей карбоксипептидазы [20, 63, 72]. Системный ответ на механическое повреждение растительной ткани и его механизм, включая систему передачи сигнала, был детально изучен у растений, принадлежащих к семейству пасленовых (*Solanaceae*) [64, 113, 138-140, 142, 143]. Аналогичный системный ответ на повреждение растительной ткани, судя по имеющимся данным, имеет место и у растений, принадлежащих другим семействам [22, 25, 26, 45]. При этом индукция синтеза ингибиторов может носить избирательный характер. Из трех форм цистатина сои (*Glycine max* L.) только одна (L1) являлась конститутивной, тогда как две другие (N2 и R1) отсутствовали в неповрежденном растении и экспрессировались в ответ на поранение или при обработке метилжасмонатом [171]. Следует при этом особенно отметить, что индуцируемые формы цистатинов сои обладали значительно более высокой ингибиторной активностью по отношению к протеиназам, присутствующим в кишечнике колорадского жука и личинок насекомого *Diabrotica virgifera* (Le Carte), являющегося одним из основных вредителей кукурузы в США [171]. Последующие исследования позволили установить, что мишенью для действия ингибиторов у *D. virgifera* служит основная пищеварительная протеиназа кишечника насекомого, аналогичная катепсину L [85].

Существенная роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений от насекомых и других вредителей послужила стимулом для создания трансгенных растений, содержащих гены ингибиторов протеиназ. Первый опыт по переносу гена ингибитора протеиназ из растения одного вида в растение другого вида был осуществлен в 1987 году [73]. Ген ингибитора трипсина (CpTI) из вигны (*Vigna unguiculata* [L.] Walp), который принадлежит к структурному семейству ингибиторов Баумана-Бирк и содержит два центра связывания трипсина, был перенесен в растение табака (*Nicotiana tabacum* L.). У полученных трансгенных растений содержание CpTI в листьях достигало 1% от общего количества растворимых белков. Поражение таких растений личинками табачной совки уменьшалось на 50% по сравнению с контролем [73]. Антиметаболическое действие CpTI, экспрессированного в табаке, проявлялось также по отношению к таким представителям Lepidoptera, как *Spodoptera littoralis* и *Manduca sexta* [53]. Впоследствии гены CpTI и нескольких других ингибиторов сериновых протеиназ были экспрессированы в ряде растений различных семейств. В большинстве случаев наблюдалось повышение устойчивости трансгенных растений к насекомым (таблица).

Таблица  
Трансгенные растения с повышенной устойчивостью к  
насекомым, содержащие гены ингибиторов протеиназ

Растение	Инги- битор*	Насекомое	Источ- ник
Табак ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	СрТИ	<i>Heliothis virescens</i>	[73]
	PI-II	<i>Manduca sexta</i>	[78]
		<i>Chrisodeixis eriosoma</i>	[104]
	SpТИ	<i>Spodoptera litura</i>	[168]
	MTI-2	<i>Spodoptera littoralis</i>	[36]
<i>Mamestra brassicae</i>		[37]	
Табак крылатый ( <i>Nicotiana glauca</i> L.)	NaPI	<i>Helicoverpa punctigera</i>	[68]
		<i>Helicoverpa armigera</i>	[29]
Картофель ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	СрТИ	<i>Lecanobia oleracea</i>	[52]
	OC-I	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	[15, 91]
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	MTI-2	<i>Spodoptera littoralis</i>	[36]
		<i>Plutella xylostella</i>	[37]
		<i>Mamestra brassicae</i>	[37]
Рис ( <i>Oryza sativa</i> L.)	СрТИ	<i>Chilo suppressalis</i>	[167]
		<i>Sesamia inferens</i>	[167]
	PI-II	<i>Chilo suppressalis</i>	[44]
		<i>Sesamia inferens</i>	[44]
	SBТИ	<i>Nilaparvata lugens</i>	[92]
CC-I	<i>Sitophilus zeamais</i>	[76]	
Клубника ( <i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	СрТИ	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	[61]
Горох ( <i>Pisum sativum</i> L.)	NaPI	<i>Helicoverpa armigera</i>	[29]
Рапс ( <i>Brassica napus</i> L.)	MTI-2	<i>Spodoptera littoralis</i>	[37]
Тополь ( <i>Populus tremula</i> L.)	OC-I	<i>Chrysomela tremulae</i>	[94]
Тополь серебристый ( <i>Populus alba</i> L.)	Atcys	<i>Chrysomela populi</i>	[38]

\* Atcys – цистатин из *Arabidopsis thaliana*; MTI-2 – ингибитор трипсина из горчицы (*Sinapis alba* L.); NaPI – ингибитор сериновых протеиназ из крылатого табака (*Nicotiana glauca* L.); SpТИ – ингибитор трипсина из батата (*Ipomoea batatas* [Lam.]). Остальные сокращения – см. стр. 193.

Практически все насекомые, по отношению к которым была повышена устойчивость растений, экспрессирующих гены ингибиторов сериновых протеиназ, принадлежат к отряду Lepidoptera, у которых, как уже отмечалось выше, сериновые протеиназы играют определяющую роль в расщеплении белков в кишечнике [138, 166]. Единственное исключение составляет резистентность растений

клубники (*Fragaria ananassa* Duch.), экспрессирующих ген СpTI, к долгоносику (*Otiorhynchus sulcatus*), принадлежащему к отряду Coleoptera [61]. Причина этого явления до сих пор остается не выясненной [53].

Наряду с трансгенными растениями, содержащими гены ингибиторов сериновых протеиназ, были получены растения, экспрессирующие гены ингибиторов цистеиновых протеиназ (см табл.). Первым таким растением был табак, содержащий ген ингибитора цистеиновых протеиназ из риса, оризацистатина I (ОС-I) [101]. В дальнейшем были получены другие трансгенные растения, экспрессирующие гены ингибиторов цистеиновых протеиназ. Экстракты из листьев картофеля, содержащего ген ОС-I, эффективно подавляли активность протеиназ из пищеварительного тракта колорадского жука [15, 91]. Получены растения риса (*Oryza sativa* L.), содержащие ген цистатина I из кукурузы (СC-I) (*Zea mays* L.) [76]. Известно, что последний обладает более широким спектром действия на протеиназы по сравнению с собственным цистатином риса, ОС-I [12]. Полученный трансгенный рис отличался особенно высоким содержанием ингибитора (до 2% от общего количества термостабильных растворимых белков), что намного превышает содержание оризацистатинов в обычном рисе (0,001—0,002%). Выделенный из трансгенных растений цистатин действовал как эффективный ингибитор папаина, катепсина Н и протеиназы долгоносика (*Sitophilus zeamays*), насекомого, поражающего семена риса [76].

Следует отметить, что не все трансгенные растения, содержащие гены ингибиторов протеиназ, проявляли повышенную устойчивость к насекомым. Так, экспрессированный в картофеле соевый ингибитор трипсина (ингибитор Кунитца, SBTI), *in vitro* эффективно подавляющий активность протеиназ насекомого *Lecanobia oleracea*, практически не оказывал защитного действия [54]. Аналогичная картина наблюдалась у рапса (*Brassica napus* L.), в котором был экспрессирован ген ОС-I [58]. Низкая эффективность некоторых трансгенных растений может быть следствием легкой приспособляемости протеолитической системы насекомых к экзогенным ингибиторам протеиназ. Действительно, в процессе совместной эволюции с растениями насекомые-фитофаги выработали различные механизмы, позволяющие нейтрализовать или, по крайней мере, ослаблять неблагоприятное воздействие ингибиторов протеолитических ферментов, содержащихся в растениях. Простейший вариант состоит в протеолитическом расщеплении ингибиторов в кишечнике насекомого теми протеиназами, на которые они не действуют как ингибиторы. Учитывая, что в кишечнике многих насекомых содержится набор протеаз, часто

относящихся к различным механистическим классам, подобный механизм получил достаточно широкое распространение [57, 59, 105]. Например, ОС-I и ингибитор Баумана-Бирк *in vitro* подавляют активность цистеиновых и сериновых протеиназ из кишечника личинок жука *Phaedon cochleariae*, поражающего растения семейства крестоцветных (Cruciferae). Однако при включении в искусственную диету оба ингибитора подвергались быстрой протеолитической деградации и не оказывали отрицательного влияния на питание и рост насекомых [57].

Другой способ нейтрализации неблагоприятного воздействия ингибиторов связан со способностью насекомых «включать» синтез новых протеолитических ферментов, замещающих протеиназы, чувствительные к действию ингибиторов. Впервые подобное наблюдалось у гусениц *Spodoptera exigua*, питавшихся листьями трансгенного табака, содержащими ген ингибитора сериновых протеиназ II из клубней картофеля [79]. Если в контрольных опытах протеолитическая активность насекомых подавлялась ингибитором II приблизительно на 80%, то у насекомых, употребляющих в пищу листья трансгенных растений, содержание ферментов, чувствительных к ингибитору не достигало и 20% [79]. Сходный результат был получен при включении другого ингибитора сериновых протеиназ, SBTI, в искусственную диету хлопковой совки [21]. По имеющимся данным в геноме этого насекомого содержится, по крайней мере, 28 генов различных сериновых протеиназ. Сравнение устойчивых и чувствительных к действию ингибитора форм трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ показало, что наибольшие различия между ними наблюдаются в тех частях молекул, которые вступают в непосредственный контакт с ингибитором [21].

В двух описанных выше случаях происходила замена чувствительных к действию ингибиторов ферментов на устойчивые в пределах одного и того же класса сериновых протеиназ. Отличная ситуация наблюдалась у личинок жука *Baris coerulescens* Scop., в кишечнике которых преобладающая протеолитическая активность принадлежит цистеиновым протеиназам при минимальной активности сериновых протеиназ. Питание листьями трансгенного рапса, содержащего ген ОС-I, приводило к резкому снижению активности цистеиновых протеиназ в кишечнике насекомого при одновременном сильном увеличении активности сериновых протеиназ [19].

Способность синтезировать протеазы, не чувствительные к действию ингибиторов, очевидно, возникла у насекомых-фитофагов в процессе естественного отбора как следствие постоянного контакта с растениями-хозяевами, характеризующимися высоким содержанием

ингибиторов протеолитических ферментов [80]. В связи с этим поиск наиболее эффективных ингибиторов для борьбы с конкретными насекомыми целесообразно вести среди растений, не являющихся их естественными хозяевами. При этом существенно, чтобы действующие ингибиторы принадлежали к другому структурному семейству белков, нежели ингибиторы растения-хозяина [23]. Весьма наглядные данные, подтверждающие справедливость подобного заключения, были получены в опытах с личинками хлопковой совки. Было установлено, что ингибиторы протеиназ из таких растений, как арахис (*Arachis hypogaea* L.), крылатые бобы (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) и картофель (*Solanum tuberosum* L.) подавляют активность пищеварительных протеиназ и тормозят рост этих насекомых. В то же время ингибиторы, выделенные из хлопка (*Gossypium arboreum* L.) и некоторых других растений, являющихся естественными хозяевами для хлопковой совки, не оказывали подобного действия [67].

Поиски эффективных ингибиторов протеиназ насекомых ведутся в настоящее время в различных направлениях. Известно, что многие пропептиды, освобождающиеся при активации зимогенов протеаз, могут действовать как высокоэффективные ингибиторы зрелых форм ферментов [9]. Недавно было показано, что пропептид глицилэндопептидазы (КФ 3.4.22.25), фермента из млечного сока плодов дынного дерева (*Carica papaya* L.), способен действовать как ингибитор цистеиновых протеиназ из кишечника колорадского жука [160]. При этом пропептид подавлял активность тех же протеиназ, что и ОС-I. Однако серьезным недостатком, ограничивающим его действие, являлось быстрое расщепление пропептида другими протеиназами из кишечника насекомого (предположительно, катепсином D) [160]. Был также осуществлен химический синтез двух семичленных пептидов, соответствующих по строению пропептидам двух трипсиноподобных протеиназ, содержащихся в кишечнике табачного бражника (*Manduca sexta*). Оба пептида, имеющие строение Val-Pro-Ala-Тур-Pro-Gln-Arg (I) и Val-Pro-Ala-Asn-Pro-Gln-Arg (II), действовали как достаточно эффективные ингибиторы пищеварительных протеиназ табачного бражника ( $K_i = 6,1$  мкМ для пептида I и  $K_i = 8,5$  мкМ для пептида II при pH 7,0), но не оказывали ингибирующего действия на трипсин свиньи [150].

Предпринимались также попытки использовать для подавления активности протеиназ насекомых ингибиторы животного происхождения. Было показано, что ингибитор цистеиновых протеиназ, стефин А человека, действует на протеиназы колорадского жука с большей эффективностью, чем ОС-I. Однако основной недостаток стефина А заключался в его быстром расщеплении в кишечнике насекомого, в



то время как ОС-I оставался устойчивым в аналогичных условиях [108]. Для подавления активности тех цистеиновых протеиназ из кишечника колорадского жука, которые устойчивы к действию ОС-I, успешно использовали другой ингибитор животного происхождения, эквистатин из актинии (*Actinia equina*) [65]. Можно предположить, что высокая эффективность эквистатина связана в определенной степени и с тем, что он способен подавлять активность не только цистеиновых протеиназ, но и катепсина D [93].

Еще один оригинальный подход основан на использовании генов, кодирующих ингибиторы сериновых протеиназ, содержащихся в гемолимфе насекомых. Гены, кодирующие серпины табачного бражника, были экрессированы в люцерне (*Medicago sativa* L.) и табаке [152, 153]. Включение листьев трансгенных растений в искусственную диету насекомых приводило к снижению скорости их роста и увеличению смертности [152, 153].

При рассмотрении вопроса о практическом применении трансгенных растений, содержащих гены ингибиторов протеиназ, необходимо учитывать возможность неблагоприятных побочных эффектов. В частности, может быть нарушено биологическое равновесие между насекомыми-фитофагами и другими насекомыми, которые являются их естественными врагами. Недавно было показано, что рекомбинантные цистатины из риса, ОС-I и ОС-II, ингибируют активность пищеварительных протеиназ хищного насекомого, щитника (*Perillus bioculatus*), одного из наиболее существенных естественных врагов колорадского жука [123]. Цистатины из растений подавляли активность протеиназ из пищеварительного тракта двуточечной божьей коровки (*Adalia bipunctata* L.), насекомого, которое широко используется как средство биологической защиты в сельском и лесном хозяйстве [161]. Ингибиторы сериновых протеиназ способны также подавлять активность пищеварительных ферментов некоторых полезных насекомых [43].

Ингибиторы протеолитических ферментов могут играть важную роль в защите растений не только от насекомых, но и от других вредителей. К числу таких вредителей относятся круглые черви, нематоды. Многие нематоды паразитируют на растениях и наносят значительный ущерб сельскохозяйственному производству [83]. В кишечнике нематод содержатся активные протеолитические ферменты, представленные цистеиновыми и сериновыми протеиназами. Цистеиновые протеиназы, напоминающие катепсины L и S, обнаружены в кишечнике соевой нематоды (*Heterodera glycines*), а протеиназа, близкая по свойствам к катепсину В, содержится у нематоды *Globodera pallida* [98, 155]. Активность цистеиновой протеиназы соевой нематоды,

родственной катепсину L, ингибировалась модифицированной формой ОС-I [98, 155]. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле было показано образование прочных комплексов между протеиназами трех паразитических нематод, относящихся к роду *Meloidogyne*, и цистатинами ОС-I и ОС-II [107]. В кишечнике соевой нематоды, наряду с уже упомянутыми цистеиновыми протеиназами, присутствуют также сериновые протеиназы, близкие по свойствам к химотрипсину и калликреину млекопитающих [97]. Интересно, что среди генов, транскрипты которых накапливаются в растениях томатов, инфицированных нематодой *Meloidogyne javanica*, был идентифицирован ген, кодирующий белок, относящийся к структурному суперсемейству ингибитора Кунитца (SBTI) [90].

Так же, как и в случае с насекомыми, предпринимались попытки получения трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к нематодам и содержащих гены ингибиторов протеиназ. Экспрессия в корнях томатов гена ОС-I приводила к торможению роста и развития нематоды *G. pallida*. Особенно эффективно действовала модифицированная форма ОС-I, у которой отсутствовал остаток Asp в положении 86 [154]. Точно также экспрессия ОС-I у *Arabidopsis thaliana* вызывала подавление роста и способности к размножению нематод *Heterodera schachtii* и *Meloidogyne incognita* [156]. Однако наибольший защитный эффект наблюдался у трансгенных растений, содержащих одновременно ген ингибитора цистеиновых протеиназ (ОС-I) и ген ингибитора сериновых протеиназ (СрТИ) [157]. Недавно было показано, что трансгенный картофель, содержащий ген ингибитора цистеиновых протеиназ, характеризуется повышенной устойчивостью к нематодам в полевых условиях [158]. При этом существенно отметить, что конститутивная экспрессия цистатина у картофеля, сама по себе, не оказывала отрицательного воздействия на растение. Последнее обстоятельство имеет принципиальное значение, поскольку картофель содержит активные цистеиновые протеиназы [84].

Защитное действие ингибиторов у растений может распространяться и на других вредителей. Так, недавно было установлено, что питание листьями трансгенного растения *Arabidopsis thaliana*, содержащего ген ОС-I, приводит к подавлению роста и развития сетчатого слизня (*Deroceras reticulatum* Muller), что является следствием подавления активности основной пищеварительной протеиназы цистеинового типа [162].

### III. ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Многие фитопатогенные микроорганизмы, наряду с другими ферментами, играющими важную роль в патогенезе, такими как полигалактуроназы, пектатлиазы, ксиланазы, продуцируют активные экстрацеллюлярные протеазы. В 1973 году было показано, что фитопатогенный гриб *Colletotrichum lindemuthianum* при выращивании на стенках растительных клеток или на искусственной питательной среде секретирует активную протеазу с молекулярной массой 25000 Да и оптимумом действия при pH 8,6 [135]. Это была первая экстрацеллюлярная протеаза растительного патогена, полученная в чистом виде. В последние годы многие экстрацеллюлярные протеазы, продуцируемые фитопатогенными микроорганизмами, были выделены и в большей или меньшей степени охарактеризованы. Среди них преобладают сериновые протеиназы, хотя встречаются ферменты, относящиеся к другим механистическим классам. Все известные сериновые протеиназы фитопатогенов могут быть условно разделены на трипсиноподобные и субтилизиноподобные ферменты. К первой группе относятся протеиназы, продуцируемые микроорганизмами *Cochliobolus carbonum* [117], *Verticillium dahliae* [16, 41] и *Stagonospora (Septoria) nodorum* [28]. Субтилизиноподобные ферменты представлены протеиназами *Acremonium typhium* [131], *Cochliobolus carbonum* [117], *Magnaporthe poae* [147], *Trichoderma harzianum* [4] и *Fusarium oxysporum* [40]. Среди экстрацеллюлярных протеиназ фитопатогенов достаточно широко распространены аспартильные протеиназы. К их числу относятся ферменты, продуцируемые *Botrytis cinerea* [115], *Cryphonectria parasitica* (эндотиапепсин) [32] и *Glomerella cingulata* [34]. Цистеиновая протеиназа секретирувалась грибом *Pyrenopeziza brassicae* [14]. К металлопротеиназам относится семейство Zn-зависимых ферментов бактерий, принадлежащих к роду *Erwinia* [56, 69, 169]. Одна из этих протеиназ, выделенная из *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, близка по свойствам к термолизину из *Bacillus thermoproteolyticus* [89].

На основании имеющихся в настоящее время данных можно сделать заключение, что экстрацеллюлярные протеиназы, по-видимому, играют активную роль в процессах патогенеза [14, 115, 124]. Так, было показано, что у гриба *Pyrenopeziza brassicae*, листового патогена, поражающего растения семейства крестоцветных, не патогенные мутанты лишены способности продуцировать экстрацеллюлярную цистеиновую протеиназу. Восстановление патогенности у таких мутантов сопровождалось восстановлением их способности к образованию протеиназы [14]. Важная роль в развитии заболевания принадлежит, по-видимому, и аспартильной протеиназе гриба *Botrytis cinerea*, являющегося патогеном широкого профиля. Секретция протеиназы

этим микроорганизмом наблюдалась уже на ранних стадиях развития инфекции (до того, как начиналось образование пектолитических ферментов) и сопровождалась гибелью растительных клеток [115]. Предварительная обработка спор *B. cinerea* ингибитором аспартильных протеиназ, пепстатином, сильно снижала уровень развития инфекции, хотя и не оказывала влияния на прорастание спор [115]. Недавно было показано, что бесклеточный препарат, полученный из суспензии спор и прорастающих цист возбудителя фитофтороза, оомицета *Phytophthora infestans*, при инъекции в листья картофеля вызывает некроз растительной ткани. При этом наблюдалась корреляция между уровнем протеолитической активности препарата и его некротическим действием [124].

В отличие от приведенных выше примеров в ряде случаев не была обнаружена зависимость между активностью экстрацеллюлярных протеиназ и патогенностью микроорганизма. Так, не наблюдалось снижения патогенности у трипсин-дефицитных мутантов патогена злаков *Cochliobolus carbonum* [117]. Направленная инактивация субтилизиноподобной экстрацеллюлярной протеазы Prt1 гриба *F. oxysporum* также не оказывала влияния на его патогенность по отношению к томатам [40]. Эти и аналогичные им данные [34, 103] позволяют предположить, что в некоторых случаях роль экстрацеллюлярных протеиназ может ограничиваться обеспечением фитопатогенных микроорганизмов аминокислотами, необходимыми для их роста и развития [53].

В тех случаях, когда экстрацеллюлярные протеиназы принимают активное участие в патогенезе, их функции могут быть достаточно разнообразными, от участия в проникновении микроорганизма в растение и необратимой инактивации защитных белков до участия в превращениях собственных белков патогена. Несмотря на то, что стенки растительных клеток построены главным образом из полисахаридов, в них присутствуют белки и даже некоторые ферменты [146]. Недавно было показано, что металлопротеиназа бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, возбудителя черной гнили у крестоцветных, способна расщеплять гликопротеины экстрацеллюлярного матрикса в лепестках турнепса (*Brassica campestris* L.) [42]. Известно, что такого рода белки, характеризующиеся высоким содержанием пролина и оксипролина, играют важную роль в защите растений от патогенных микроорганизмов [132]. Трипсиноподобная сериновая протеиназа SNP1 другого микроорганизма *Stagonospora nodorum*, освобождала оксипролин при действии на клеточные стенки пшеницы. Подобная активность в сочетании с ранней экспрессией в процессе патогенеза

позволяет предположить, что протеиназа SNP1 играет активную роль в разрушении клеточных стенок растения [28].

Протеиназы патогенов могут играть активную роль и в деградации других белков, принимающих участие в защите растений, например, таких ферментов, как хитиназы и  $\beta$ -1,3-глюканазы [13]. Очищенная экстрацеллюлярная металлопротеиназа бактерии *E. carotovora* subsp. *carotovora* расщепляла лектин картофеля [69], а также действовала на экстензин, белок экстрацеллюлярного матрикса с высоким содержанием оксипролина [39]. Протеиназы фитопатогенных микроорганизмов, по-видимому, могут выполнять и другие более специфические функции. Например, у бактерии *Erwinia chrysanthemi* экстрацеллюлярная металлопротеиназа катализировала превращение в зрелую форму фермента, пекатлиазы, играющего важную роль в мацерации растительной ткани [145]. Недавно было высказано предположение, что некоторые пептиды, освобождающиеся под действием экстрацеллюлярных протеаз фитопатогенных микроорганизмов, могут действовать как элиситоры, активирующие защитные реакции у растений [141].

Как и в случае с насекомыми и другими вредителями, ингибиторы протеиназ из растений способны подавлять активность ферментов фитопатогенных микроорганизмов. В 1976 году было показано, что ингибиторы трипсина и химотрипсина из таких растений, как соя, фасоль и картофель, способны подавлять активность протеиназ, секретируемых фитопатогенным грибом *Fusarium solani* [111]. Более того, ингибиторы из фасоли, принадлежащие к структурному семейству ингибиторов Баумана-Бирк, тормозили рост гиф и прорастание конидий грибов *F. solani*, *Fusarium culmorum* и *Botrytis cinerea* [1]. Аналогичные результаты были получены позднее при изучении влияния других ингибиторов протеиназ из растений на активность ферментов, рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов. Так, ингибитор трипсина из кукурузы тормозил прорастание конидий и рост гиф ряда фитопатогенных грибов, включая такие виды, как *Aspergillus flavus*, *Asp. parasiticus* и *Fusarium moniliforme* [31]. Ингибитор трипсина из гречихи (*Fagopyrum esculentum* [L.] Moench) подавлял активность протеиназ гриба *Alternaria alternata*, поражающего различные культурные и дикорастущие растения [6]. Ингибитор из гречихи также тормозил прорастание спор и рост мицелия фитопатогенных грибов *A. alternata* и *F. oxysporum* [5]. Было показано, что ингибиторы химотрипсина из клубней картофеля подавляют рост и развитие оомицета *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза [2, 7].

Наряду с ингибиторами трипсина и химотрипсина у многих растений обнаружены белки, действующие преимущественно как ингибиторы протеиназ микроорганизмов [30, 71]. Некоторые из этих

белков, кроме действия на ферменты микроорганизмов, способны ингибировать также химотрипсин, другие же были вообще не активны по отношению к протеиназам животного происхождения. Первый специфический ингибитор микробных протеиназ был выделен из семян ячменя (*Hordeum vulgare* L.) [110]. Ингибитор представлен несколькими множественными формами и подавлял активность протеиназ микроорганизмов *Asp. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus* и *Alternaria tenuissima* [110]. Близкий по свойствам белок был позднее выделен из семян кукурузы [11]. Оба белка из ячменя и кукурузы полностью лишены ингибиторной активности по отношению к трипсину, но действовали как относительно слабые, нестехиометрические ингибиторы химотрипсина [11, 110]. Впоследствии была установлена принадлежность ингибиторов из ячменя к семейству картофельного ингибитора I [18]. Сам ингибитор I из картофеля отличается от двух упомянутых выше белков тем, что является высоко эффективным ингибитором химотрипсина, хотя действует также на субтилизин и некоторые другие протеолитические ферменты микроорганизмов [137]. Как уже отмечалось, некоторые ингибиторы микробных протеиназ вообще лишены активности по отношению к протеиназам животного происхождения [149]. Один из наиболее специфичных ингибиторов протеиназ фитопатогенных микроорганизмов был выделен из семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.). Ингибитор подавлял активность сериновой протеиназы гриба *Colletotrichum lindemuthianum*, возбудителя антракноза, но не действовал ни на трипсин, ни на химотрипсин [112]. В свою очередь, ингибиторы трипсина и химотрипсина из фасоли были не активны по отношению к протеиназе *C. lindemuthianum* [112].

Не только ингибиторы сериновых протеиназ из растений способны подавлять активность ферментов фитопатогенных микроорганизмов. Из экссудата флоемы плодов тыквы (*Cucurbita maxima* L.) недавно был выделен белок с молекулярной массой 10000 Да, который действовал как ингибитор аспартильных протеиназ. Кроме пепсина, он подавлял активность экстрацеллюлярной аспартильной протеиназы гриба *Glomerella cingulata*, возбудителя антракноза [33]. Цистатин, выделенный из плодов каштана (*Castanea sativa* L.), обладал высокой антигрибковой активностью и подавлял рост некоторых патогенов, таких как *Botrytis cinerea* [128]. К сожалению, данные о его способности действовать на протеиназы микроорганизмов в настоящее время отсутствуют. Другой ингибитор цистеиновых протеиназ из проса (*Pennisetum glaucum* L.), отличающийся по свойствам от обычных цистатинов, также проявлял высокую противогрибковую активность [82]. Однако позднее были высказаны сомнения в том, что антигриб-

ковая активность белка из проса связана с его способностью подавлять активность протеолитических ферментов грибов [81].

Важную роль ингибиторы цистеиновых протеиназ, по-видимому, могут играть во взаимоотношениях растений и вирусов. Это связано с тем, что цистеиновые протеиназы играют активную роль в процессинге белков у многих вирусов. В связи с этим цистеиновые протеиназы становятся привлекательной мишенью при разработке эффективных способов борьбы с вирусными заболеваниями как у растений, так и у животных [60]. Предварительные опыты показали, что ингибиторы из растений, оризацистатины (ОС-I и ОС-II), способны подавлять репликацию вирусов животных, принадлежащих к семейству пикорнавирусов [86]. Впоследствии были получены трансгенные растения табака, содержащие ген ОС-I. Они обладали повышенной устойчивостью к вирусу гравировки табака и вирусу Y картофеля [66]. Оба этих вируса относятся к потивирусам, использующим для процессинга белков цистеиновые протеиназы.

Так же, как в случае с другими PR(pathogenesis related)-белками растений [159], синтез ингибиторов протеиназ индуцируется в ответ на заражение фитопатогенными микроорганизмами. Впервые подобное явление наблюдалось у томатов, инфицированных оомицетом *Phytophthora infestans*. При этом имела место корреляция между увеличением содержания ингибиторов трипсина и химотрипсина и устойчивостью растения к патогену [127]. Возрастание активности ингибиторов сериновых протеиназ отмечалось также в клубнях картофеля, зараженных *P. infestans* [7]. Аналогичное явление имело место не только у пасленовых, но и у растений других семейств. Было показано, что инфицирование дыни грибом *Colletotrichum lagenarium* вызывает увеличение активности ингибитора, действующего на протеиназу патогена [136]. Сходная картина отмечена и у представителей однодольных. Поражение проростков кукурузы грибом *Fusarium moniliforme* приводило как к локальной, так и к системной индукции ингибитора сериновых протеиназ, который относится к структурному семейству картофельного ингибитора I [35]. Индукция в ответ на инфицирование патогенными микроорганизмами не ограничивается ингибиторами сериновых протеиназ. Так, в листьях каштана в ответ на заражение грибом *Botrytis cinerea* происходило образование цистатина [129].

Заслуживает внимания то, что ингибиторы протеиназ, которые индуцируются в ответ на инфицирование, могут существенно отличаться от аналогичных ингибиторов, присутствующих в здоровом растении. В листьях табака (*Nicotiana tabacum* L.) в ответ на заражение ВТМ образовывался белок, который по своим свойствам относился к структурному семейству картофельного ингибитора I, но отличался

от других ингибиторов этого семейства характером действия на ферменты. Так, индуцируемый ингибитор обладал высокой активностью по отношению к протеиназам грибов и бактерий, но слабо действовал на трипсин и химотрипсин [55]. Это свойство отличало его от ингибитора I из здоровых листьев табака, который является эффективным ингибитором химотрипсина [87]. Дальнейшие исследования показали, что ингибитор из листьев табака, инфицированных ВТМ, содержал в положении P1 реактивного центра остаток Glu [70], в то время как у родственных ингибиторов, выделенных из здоровых растений картофеля и томатов, в этом положении располагаются остатки Leu или Met [62, 134]. Индукция белка с необычными свойствами наблюдалась также в инфицированных ВТМ листьях другой разновидности табака (*Nicotiana glutinosa* L.). По структурным особенностям белок был отнесен к структурному семейству ингибиторов сериновых протеиназ типа Кунитца (SBTI), но имел также некоторые черты, общие с ингибиторами цистеиновых протеиназ семейства цистатинов. Действие этого белка на ферменты в настоящее время не изучено [125].

Общей и характерной для PR-белков чертой является их локализация в межклеточном пространстве [159]. Уже в ранних гистохимических исследованиях было установлено, что значительная часть ингибиторов протеиназ в семенах сои сосредоточена в области клеточной стенки [74]. При набухании семян сои и других представителей семейства бобовых (Leguminosae) ингибиторы трипсина и химотрипсина (как типа Баумана-Бирк, так и типа Кунитца), наряду с лектинами, быстро диффундируют в окружающий раствор [75, 164], что, по-видимому, свидетельствует об их способности легко выделяться в межклеточное пространство. Способность к секреции не ограничивалась ингибиторами сериновых протеиназ. Недавно было показано, что ингибитор цистеиновых протеиназ, содержащийся в клетках моркови (*Daucus carota* L.), также легко выделялся в окружающую среду [121]. У томатов ингибиторы сериновых протеиназ I и II откладывались в стенках клеток эндосперма и секреторных клетках корневого чехлика и секретировались в окружающую среду. В связи с этим было высказано предположение, что ингибиторы протеиназ могут защищать растущую меристему корней от действия патогенных микроорганизмов и других вредителей [118]. С подобным представлением согласуются данные о том, что некоторые почвенные микроорганизмы, в том числе, и не патогенные для растений, такие как *Pseudomonas putida*, способны индуцировать синтез ингибиторов протеиназ в корнях растений [102].



#### IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выше рассмотрены имеющиеся в настоящее время данные, касающиеся участия ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений от вредителей и болезней. Затронутые вопросы, помимо чисто теоретического интереса, приобрели в последние годы важное практическое значение. Это связано, в первую очередь, с последними достижениями биотехнологии по созданию трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к различного рода неблагоприятным воздействиям. Подобный подход позволяет не только повысить урожайность многих культурных растений, но и способствует улучшению экологической обстановки за счет снижения использования высокотоксичных химических средств защиты растений [46, 114]. В настоящее время достаточно широкое распространение получили трансгенные растения, содержащие гены δ-эндотоксинов бактерии *Bacillus thuringiensis* и обладающие повышенной устойчивостью к вредным насекомым [99]. В ближайшие годы следует ожидать внедрения в практику сельскохозяйственного производства растений, содержащих гены других белков, повышающих их устойчивость к вредителям и болезням. Среди таких белков важное место занимают ингибиторы протеолитических ферментов [106]. В настоящее время гены свыше 14 белков-ингибиторов протеиназ уже экспрессированы в различных культурных растениях [144]. В подавляющем большинстве трансгенные растения, содержащие гены ингибиторов протеиназ характеризовались повышенной устойчивостью к насекомым и некоторым другим вредителям. В то же время по своей устойчивости трансгенные растения, содержащие гены ингибиторов протеиназ, пока уступают растениям, содержащим гены токсинов *B. thuringiensis* [53]. По-видимому, наиболее перспективными могут стать растения, содержащие гены ингибиторов протеиназ в сочетании с генами других белков. В качестве примера можно привести растения батата (*Ipomoea batatas* [Lam.]), содержащие одновременно гены трех белков, β-глюкоронидазы, ингибитора протеиназ (CpTI) и лектина подснежника (*Galanthus nivalis* L.) [119]. Были получены также растения табака, содержащие гены токсина *B. thuringiensis* и CpTI. Такие растения обладали более высокой инсектицидной активностью по сравнению с растениями, содержащими только гены токсина *B. thuringiensis* [47, 170]. Можно предположить, что в подобных случаях ингибиторы протеиназ действуют не только сами, но и защищают другие рекомбинантные белки от разрушающего действия протеиназ растений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бенкен И.И., Мосолов В.В., Федуркина Н.В. // Микология и фитопатология. 1976. Т. 10. № 3. С. 198–201.
2. Валуева Т.А., Кладницкая Г.В., Ильинская Л.И., Герасимова Н.Г., Озерцовская О.Л., Мосолов В.В. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. № 5. С. 346–349.
3. Валуева Т.А., Мосолов В.В. // Прикл. биохим. микробиол. 1995. Т. 31. № 6. С. 579–589.
4. Дунаевский Я.Е., Грубань Т.Н., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 6. С. 848–853.
5. Дунаевский Я.Е., Павлюкова Е.Б., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 8. С. 990–996.
6. Дунаевский Я.Е., Павлюкова Е.Б., Белякова Г.А., Грубань Т.Н., Белозерский М.А. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 12. С. 1904–1910.
7. Кладницкая Г.В., Валуева Т.А., Ермолова Н.В., Ильинская Л.И., Герасимова Н.Г., Мосолов В.В. // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 5. С. 701–706.
8. Конарев Ал.В. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 2. С. 195–201.
9. Мосолов В.В. // Биоорган. химия. 1998. Т.24. № 5. С. 332–340.
10. Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. № 6. С. 643–650.
11. Мосолов В.В., Соколова Е.В., Ливенская О.А. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 8. С. 1334–1342.
12. Abe M., Abe K., Kuroda M., Arai S. // J. Biochem. 1994. V. 116. № 3. P. 488–492.
13. Alexander D., Lawton K., Uknes S., Ward E., Ryals J. // in: Genetic Engineering. J.K. Setlow, ed. Plenum Press. New York. 1994. P. 195–212.
14. Ball A.M., Ashby A.M., Daniels M.J., Ingram D.S., Johnstone K. // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1991. V. 38. № 2. P. 147–161.
15. Benchekroun A., Michaud D., Nguyen-Quoc B., Overney S., Desjardins Y., Yelle S. // Plant Cell Rep. 1995. V. 14. № 9. P. 585–588.
16. Bidochka M.J., St Leder R.J., Stuart A., Gowanlock K. // Microbiology. 1999. V. 145. № 4. P. 955–963.
17. Birk Y., Applebaum S.W. // Enzymologia. 1960. V. 22. № 3. P. 318–326.
18. Boisen S., Andersen C.Y., Hejgaard J. // Physiol. Plant. 1981. V. 52. № 2. P. 167–176.
19. Bonade-Bottino M., Lerin J., Zaccomer B., Jouanin L. // Insect Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 29. № 2. P. 131–138.
20. Boulter C.J. // Plant Physiol. 1993. V. 103. № 4. P. 1347–1353.
21. Bown D.P., Wilkinson H.S., Gatehouse J.A. // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27 № 7. P. 625–638.
22. Bradshaw H.D.F., Hollick J.B., Parsons T.J., Clarke H.R.G., Gordon M.P. // Plant Mol. Biol. 1989. V. 14. № 1. P. 51–59.
23. Broadway R.M. // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1996. V. 32. № 1. P. 39–53.
24. Broadway R.M., Duffey S.S. // J. Insect Physiol. 1986. V. 32. № 10. P. 827–833.
25. Brown W.E., Ryan C.A. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 15. P. 3418–3422.
26. Brown W.E., Takio K., Titani K., Ryan C.A. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 9. P. 2105–2108.
27. Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Cloutier C., Michaud D. // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1999. V. 42. № 1. P. 88–98.

28. *Carlile A.J., Bindschedler L.V., Bailey A.M., Bowyer P., Clarkson J.M., Cooper R.M.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. № 5. P. 538–550.
29. *Charity J.A., Anderson M.A., Bittisnich D.J., Whitecross M., Higgins T.J.V.* // *Mol. Breeding.* 1999. V.5. № 4. P. 357–365.
30. *Chavan J.K., Hejgaard J.* // *J. Sci. Food Agric.* 1981. V. 32. № 6. P. 857–862.
31. *Chen Z.-Y., Brown R.L., Lax A.R., Cleveland T.E., Russin J.S.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 3. P. 1320–1324.
32. *Choi G.H., Pawlyk D.M., Rae B., Shapira R., Nuss D.L.* // *Gene.* 1993. V. 125. № 2. P. 135–141.
33. *Christeller J.T., Farley P.C., Ramsay R.J., Sullivan P.A., Laing W.A.* // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 254. № 1. P. 160–167.
34. *Clark S.J., Templeton M.D., Sullivan P.A.* // *Microbiology.* 1997. V. 143. № 4. P. 1395–1403.
35. *Cordero M.J., Raventos D., San-Segundo B.* // *Plant J.* 1994. V. 6. № 2. P. 141–150.
36. *DeLeo F., Bonade-Bottino M.A., Ceci L.R., Gallerani R., Jouanin L.* // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. № 3. P. 997–1004.
37. *DeLeo F., Bonade-Bottino M.A., Ceci L.R., Gallerani R., Jouanin L.* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001. V. 31. № 6–7. P. 593–602.
38. *Delledonne M., Allegro G., Belenghi B., Balestrazzi A., Picco F., Levine A., Zelasco S., Calligari P., Confalonieri M.* // *Mol. Breeding.* 2001. V. 7. № 1. P. 35–42.
39. *Dey P.M., Brownleader M.D., Pantelides A.T., Trevan M., Smith J.J., Sadtler G.* // *Planta.* 1997. V. 202. № 2. P. 179–187.
40. *Di Pietro A., Huertas-Gonzalez M.D., Gutierrez-Corana J.F., Martinez-Cadena G., Meglec E., Roncero M.I.G.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2001. V. 14. № 5. P. 653–662.
41. *Dobinson K.F., Lecomte N., Lazarovits G.* // *Can. J. Microbiol.* 1997. V. 43. № 3. P. 227–233.
42. *Dow J.M., Davies H.A., Daniels M.J.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1998. V. 11. № 11. P. 1085–1093.
43. *Down R.E., Ford L., Mosson H.J., Fitches E., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.* // *Parasitology.* 1999. V. 119. № 2. P. 157–166.
44. *Duan X., Li X., Hue Q.* // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14. № 4. P. 494–498.
45. *Eckelkamp C., Ehmann B., Schopfer P.* // *FEBS Lett.* 1993. V. 323. № 1, 2. P. 73–76.
46. *Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N., Duck N.B., Warren G.W., Koziel M.G.* // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 2. P. 137–141.
47. *Fan X., Shi X., Zhao J., Zhao R., Fan Y.* // *Chin. J. Biotechnol.* 1999. V. 15. № 1. P. 1–5.
48. *Fritig B., Heitz T., Legrand M.* // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. V. 10. № 1. P. 16–22.
49. *Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., Rodriguez-Palenzuela P.* // *Biopolymers.* 1998. V. 47. № 6. P. 479–491.
50. *Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge R., Gomez L., Royo J., Carbonero P.* // *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 1987. V. 4. P. 275–334.
51. *Gatehouse A.M.R., Boulter D.* // *J. Sci. Food Agric.* 1983. V. 34. № 2. P. 345–350.
52. *Gatehouse A.M.R., Davison G.M., Newell C.A., Merryweather A., Hamilton W.D.O., Burgess E.P.J., Gilbert R.J.C., Gatehouse J.A.* // *Mol. Breeding.* 1997. V. 3. № 1. P. 49–63.
53. *Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R., Bown D.P.* // in: *Recombinant Protease Inhibitors in Plants.* D. Michaud, ed. Georgetown. Landes Bioscience. 1999. P. 9–26.

54. Gatehouse A.M.R., Norton E., Davison G.M., Babbe S.M., Newell C.A., Gatehouse J.A. // *J. Insect Physiol.* 1999. V. 45. № 6. P. 545–558.
55. Geoffroy M., Legrand M., Fritig B. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1990. V. 3. № 5. P. 327–333.
56. Ghigo J.M., Wandersman C. // *Res. Microbiol.* 1992. V. 143. № 9. P. 857–867.
57. Girard C., Le Metayer M., Bonade-Bottino M., Pham-Delegue M.H., Jouanin L. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1998. V. 28. № 4. P. 229–237.
58. Girard C., Le Metayer M., Zaccomer B., Bartlet E., Williams I., Bonade-Bottino M., Pham-Delegue M.H., Jouanin L. // *J. Insect. Physiol.* 1998. V. 44. № 3–4. P. 263–270.
59. Giri A.P., Harsulkar A.M., Deshpande V.V., Sainani M.N., Gupta V.S., Ranjekar P.K. // *Plant Physiol.* 1998. V. 116. № 1. P. 391–401.
60. Gorbalenya A.E., Snijder E.J. // *Perspect. Drug. Discov. Design.* 1996. V. 6. P. 64–86.
61. Graham J., Gordon S.C., McNicol R.J. // *Ann. Appl. Biol.* 1997. V. 131. № 2. P. 133–139.
62. Graham J.S., Pearce G., Merryweather J., Titani K., Ericsson L., Ryan C.A. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 11. P. 6555–6560.
63. Graham J.S., Ryan C.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. V. 101. № 4. P. 1164–1170.
64. Green T.R., Ryan C.A. // *Science.* 1972. V. 175. № 4. P. 776–777.
65. Gruden K., Strukelj B., Popovic T., Lenarcic B., Bevec T., Brzin J., Kregar I., Herzog-Velikonja J., Stiekema W.J., Bosh D., Jongsma M.A. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1998. V. 28. № 8. P. 549–560.
66. Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J.A., Saucedo-Arias L.J., Gomez-Lim M.A. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 12. P. 1223–1226.
67. Harsulkar A.M., Giri A.P., Patankar A.G., Gupta V.S., Sainani M.N., Ranjekar P.K., Deshpande V.V. // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. № 2. P. 497–506.
68. Heath R.L., Mc Donald G., Christeller J.T., Lee M., Bateman K., West J., Van Heeswijck R., Anderson M.A. // *J. Insect Physiol.* 1997. V. 43. № 9. P. 833–842.
69. Heilbronn J., Johnstone D.J., Dunbar B., Lyon C.D. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1995. V. 47. № 5. P. 285–292.
70. Heitz T., Geoffroy P., Stintzi A., Fritig B., Legrand M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 23. P. 16987–16992.
71. Hejgaard J. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 116. № 2. P. 444–449.
72. Hildmann T., Ebneith M., Pena-Cortes H., Sanchez-Serrano J.J., Willmitzer L., Prat S. // *Plant Cell.* 1992. V. 4. № 9. P. 1157–1170.
73. Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.E., Barker R.F., Boulter D. // *Nature.* 1987. V. 300. P. 160–163.
74. Horisberger M., Tacchini-Vonlanten M. // *Histochemistry.* 1983. V. 77. № 1. P. 37–50.
75. Hwang D.L.R., Yang W.-K., Foard D.E. // *Plant Physiol.* 1978. V. 61. № 1. P. 30–34.
76. Irie K., Hosoyama H., Takeuchi T., Iwabuchi K., Watanabe H., Abe K., Arai S. // *Plant Mol. Biol.* 1996. V. 30. № 1. P. 149–157.
77. Jackson A.O., Taylor C.B. // *Plant Cell.* 1996. V. 8. № 10. P. 1651–1668.
78. Johnson R., Narvaez J., An G., Ryan C.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989. V. 86. № 24. P. 9871–9875.
79. Jongsma M.A., Bakker P.L., Peters J., Bosh D., Stiekema W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. V. 92. № 17. P. 8041–8045.
80. Jongsma M.A., Stiekema W.J., Bosh D. // *Trends Biotechnol.* 1996. V. 14. № 9. P. 331–333.

81. *Joshi B.N., Sainani M.N., Bastawade K.B., Dashpande V.V., Gupta V.S., Ranjekar P.K.* // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 265. № 2. P. 556–563.
82. *Joshi B.N., Sainani M.N., Bastawade K.B., Gupta V.S., Ranjekar P.K.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 246. № 2. P. 382–387.
83. *Jung C., Cai D., Kleine M.* // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. № 7. P. 266–271.
84. *Kitamura N., Maruyama Y.* // *Agric. Biol. Chem.* 1985. V. 49. № 6. P. 1591–1597.
85. *Koiwa H., Shade R.E., Zhu-Salzman K., D'Urzo M.P., Murdock L.L., Bresnan R.A., Hasegawa P.M.* // *FEBS Lett.* 2000. V. 471. № 1. P. 67–70.
86. *Kondo H., Ijiri S., Abe K., Maeda H., Arai S.* // *FEBS Lett.* 1992. V. 299. № 1. P. 48–50.
87. *Kuo T.-M., Pearce G., Ryan C.A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. V. 230. № 2. P. 504–510.
88. *Kuroda M., Ishimoto M., Suzuki K., Kondo H., Abe K., Arai S.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1996. V. 60. № 2. P. 209–212.
89. *Kyostio S.R., Cramer C.L., Lacy G.H.* // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 20. P. 6537–6546.
90. *Lambert K.N., Ferrie B.J., Nombela G., Brenner E.D., Williamson V.M.* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. V. 55. № 6. P. 341–348.
91. *Lecardonnell A., Chauvin L., Jouanin L., Beaujean A., Prevost G., Sangwan-Norreel B.* // *Plant Sci.* 1999. V. 140. № 1. P. 71–79.
92. *Lee S.I., Lee S.-H., Koo J.C., Chun H.J., Lim C.O., Mun J.H., Song Y.H., Cho M.J.* // *Mol. Breeding.* 1999. V. 5. № 1. P. 1–9.
93. *Lenarcic B., Turk V.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 2. P. 563–566.
94. *Leple J.C., Bonade-Bottino M., Augustin S., Pilate G., LeTan V.D., Delplanque A., Cornu D., Jouanin L.* // *Mol. Breeding.* 1995. V. 1. № 4. P. 319–328.
95. *Liang C., Brookhart G., Feng G.H., Reeck G.R., Kramer K.J.* // *FEBS Lett.* 1991. V. 278. № 2. P. 139–142.
96. *Liener I.E., Kakade M.L.* // in: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.* Liener I.E., ed. New York. London. Academic Press. 1980. P. 7–71.
97. *Lilley C.J., Urwin P.E., Atkinson H.J., McPherson M.J.* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997. V. 89. № 2. P. 195–207.
98. *Lilley C.J., Urwin P.E., McPherson M.J., Atkinson H.J.* // *Parasitology.* 1996. V. 113. № 4. P. 415–424.
99. *Maagd R.A., Bosh D., Stiekema W.* // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. № 1. P. 9–13.
100. *Malek K., Dietrich R.A.* // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. № 6. P. 215–219.
101. *Masoud S.A., Johnson L.B., White F.F., Reeck G.R.* // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. № 4. P. 655–663.
102. *McGurl B., Mukherjee S., Kahn M., Ryan C.A.* // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 27. № 5. P. 995–1001.
103. *McHenry J., Christeller J.T., Shade E.* // *Plant Pathol.* 1996. V. 45. № 4. P. 552–563.
104. *McManus M.T., White D.W.R., McGregor P.G.* // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. № 1. P. 50–58.
105. *Michaud D.* // *Trends Biotechnol.* 1997. V. 15. № 1. P. 4–6.
106. *Michaud D., ed.* // *Recombinant Protease Inhibitors in Plants.* Georgetown. Landes Bioscience. 1999. 241 pp.
107. *Michaud D., Cantin L., Bonade-Bottino M., Jouanin L., Vrain T.C.* // *Electrophoresis.* 1996. V. 17. № 8. P. 1373–1379.
108. *Michaud D., Nguyen-Quoc B., Vrain T.C., Fong D., Yelle S.* // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1996. V. 31. № 4. P. 451–464.

109. *Michaud D., Nguyen-Quoc B., Yelle S.* // FEBS Lett. 1993. V. 331. № 1–2. P. 173–176.
110. *Mikola J., Suolinna E.-M.* // Arch. Biochem. Biophys. 1971. V. 144. № 2. P. 566–575.
111. *Mosolov V.V., Loginova M.D., Fedurkina N.V., Benken I.I.* // Plant Sci. Lett. 1976. V. 7. № 1. P. 77–80.
112. *Mosolov V.V., Loginova M.D., Malova E.L., Benken I.I.* // Planta. 1979. V. 144. № 2. P. 265–269.
113. *Moura D.S., Ryan C.A.* // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 1. P. 289–298.
114. *Mourgues F., Brisset M.N., Chevreau E.* // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 5. P. 203–210.
115. *Movahedy S., Heale J.* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1990. V. 36. № 6. P. 303–324.
116. *Murdock L.L., Brockhart G., Dunn P.E.* // Comp. Biochem. Physiol. 1987. V. 87B. № 5. P. 783–787.
117. *Murphy J.M., Walton J.D.* // Mol. Plant Microbe Interact. 1996. V. 9. № 4. P. 290–297.
118. *Narwaez-Vasquez J., Franceschi V.R., Ryan C.A.* // Planta. 1993. V. 189. № 2. P. 257–266.
119. *Newell C.A., Lowe J.M., Merryweather A., Rooke L.M., Hamilton W.D.O.* // Plant Sci. 1995. V. 107. № 2. P. 215–227.
120. *Novillo C., Castanera P., Ortego F.* // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1997. V. 36. № 3. P. 181–201.
121. *Ojima A., Shiota H., Higashi K., Kamada H., Shimma Y., Wada M., Satoh S.* // Plant Mol. Biol. 1997. V. 34. № 1. P. 99–109.
122. *Orr G.L., Strickland J.A., Walsh T.A.* // J. Insect Physiol. V.40. № 9. P. 893–900.
123. *Overney S., Yelle S., Cloutier C.* // Comp. Biochem. Physiol. 1998. V. 120 B. № 1. P. 191–195.
124. *Paris R., Lamattina L.* // Eur. J. Plant Pathol. 1999. V. 105. № 8. P. 753–760.
125. *Park K.-S., Cheong J.-J., Lee S.-J., Suh M.-C., Choi D.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1492. № 2–3. P. 509–512.
126. *Patankar A.G., Giri A.P., Harsulkar A.M., Sainani M.N., Deshpande V.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 31. № 4–5. P. 453–464.
127. *Peng J.H., Black L.L.* // Phytopathol. 1976. V. 66. № 5. P. 958–963.
128. *Pernas M., Lopez-Solanilla E., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Rodriguez-Palenzuela P.* // Mol. Plant Microbe Interact. 1999. V. 12. № 7. P. 624–627.
129. *Pernas M., Sanchez-Monge R., Salcedo G.* // FEBS Lett. 2000. V. 467. № 2–3. P. 206–210.
130. *Peumans W.J., Damme E.J.* // Histochem. J. 1995. V. 27. № 4. P. 253–271.
131. *Reddy P.V., Lam C.K., Belanger F.S.* // Plant. Physiol. 1996. V. 111. № 4. P. 1209–1218.
132. *Reiter W.-D.* // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. № 1. P. 27–32.
133. *Richardson M.* // Phytochemistry. 1977. V. 16. № 1. P. 159–169.
134. *Richardson M., Barner R.D.J., McMillan R.T., Cossins L.M.* // Phytochemistry. 1977. V. 16. № 7. P. 837–839.
135. *Ries S.M., Albersheim P.* // Phytopathol. 1973. V. 63. № 5. P. 625–629.
136. *Roby D., Toppin A., Esquerre-Tugay M.T.* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1987. V. 30. № 2. P. 453–460.
137. *Ryan C.A.* // Biochemistry. 1966. V. 5. № 5. P. 1592–1596.
138. *Ryan C.A.* // Annu. Rev. Phytopathol. 1990. V. 28. P. 425–449.
139. *Ryan C.A.* // Plant Mol. Biol. 1992. V. 19. № 1. P. 123–133.

140. Ryan C.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1477. № 1–2. P. 112–121.
141. Ryan C.A., Pearce G. // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. № 1. P. 65–68.
142. Sanchez-Serrano J.J., Keil M., O'Connor A., Schell J., Willmitzer L. // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 2. P. 303–306.
143. Sanchez-Serrano J.J., Schmidt R., Schell J., Willmitzer L. // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 203. № 1. P. 15–20.
144. Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R., Denholm I. // *Trends. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 4. P. 168–175.
145. Shevchik V.E., Boccarda M., Vedel R., Hugouvieux-Cotte-Pattat N. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 29. № 6. P. 1459–1469.
146. Showalter A.M. // *Plant Cell.* 1993. V. 5. № 1. P. 9–23.
147. Sreedhar L., Kobayashi D.Y., Bunting T.E., Hillman B.I., Belanger F.C. // *Gene.* 1999. V. 235. № 1–2. P. 121–129.
148. Stotz H.U., Kroymann J., Mitchell-Olds T. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. V. 2. № 4. P. 268–272.
149. Svendsen I., Hejgaard J., Chavan J.K. // *Carlsberg Res. Commun.* 1984. V. 49. № 3. P. 493–502.
150. Taylor M.A.J., Lee M.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 235. № 3. P. 606–609.
151. Thie N.M., Houseman J.G. // *Insect Biochem.* 1990. V. 20. № 3. P. 313–318.
152. Thomas J.C., Adams D.G., Keppenne V.D., Wasmann C.C., Brown J.K., Kanost M.R., Bohnert H.J. // *Plant Physiol. Biochem.* 1995. V. 33. № 5. P. 611–614.
153. Thomas J.C., Wasmann C.C., Echt C., Dunn R.L., Bohnert H.J., McCoy T.J. // *Plant Cell Rep.* 1994. V. 14. № 1. P. 31–36.
154. Urwin P.E., Atkinson H.J., Waller D.A., McPherson M.J. // *Plant J.* 1995. V. 8. № 1. P. 121–123.
155. Urwin P.E., Lilley C.J., McPherson M.J., Atkinson H.J. // *Parasitology.* 1997. V. 114. № 6. P. 605–613.
156. Urwin P.E., Lilley C.J., McPherson M.J., Atkinson H.J. // *Plant J.* 1997. V. 12. № 2. P. 455–461.
157. Urwin P.E., McPherson M.J., Atkinson H.J. // *Planta.* 1998. V. 204. № 4. P. 472–479.
158. Urwin P.E., Troth K.M., Zubko E.I., Atkinson H.J. // *Mol. Breeding.* 2001. V. 8. № 1. P. 95–101.
159. Van Loon L.C. // *Plant Mol. Biol.* 1985. V. 4. № 2. P. 111–116.
160. Visal S., Taylor M.A.J., Michaud D. // *FEBS Lett.* 1998. V. 434. № 3. P. 401–405.
161. Walker A.J., Ford L., Majerus M.E.N., Geoghegan I.E., Birch N., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1998. V. 28. № 3. P. 173–180.
162. Walker A.J., Urwin P.E., Atkinson H.J., Brain P., Glen D.M., Shewry R.R. // *Transgenic Res.* 1999. V. 8. № 2. P. 95–103.
163. Wilhite S.E., Elden T.C., Brzin J., Smigocki A.C. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2000. V. 30. № 12. P. 1181–1188.
164. Wilson K.A. // *Phytochemistry.* 1980. V. 19. № 12. P. 2517–2519.
165. Wolfson J.L., Murdock L.L. // *Entomol. Exp. Appl.* 1987. V. 44. № 2. P. 235–240.
166. Wolfson J.L., Murdock L.L. // *J. Chem. Ecol.* 1990. V. 16. № 8. P. 1089–1102.
167. Xu D., Xue Q., McElroy D., Mawal Y., Hilder V.A., Wu R. // *Mol. Breeding.* 1996. V. 2. № 2. P. 167–173.
168. Yeh K.-W., Lin M.-I., Tuan S.-J., Chen Y.-M., Lin C.-J., Kao S.-S. // *Plant Cell Rep.* 1997. V. 16. № 10. P. 696–699.
169. Zhang Y., Bak D.D., Heid H., Geider K. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 5. P. 1239–1251.

170. *Zhang J.-H., Wang C.-Z., Qin J.-D.* // *J. Invertebrate Pathol.* 2000. V. 75. № 4. P. 259–266.
171. *Zhao Y., Botella M.A., Subramanian L., Ni X., Nielsen S.S., Bressan R.A., Hasegawa P.M.* // *Plant Physiol.* 1996. V. 111. № 4. P. 1299–1306.