



## ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ

© 2012 г. Ц. А. Егоров\*\*, Т. И. Одинцова\*\*

\*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10

\*\*Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Поступила в редакцию 26.06.2011 г. Принята к печати 24.08.2011 г.

Антимикробные пептиды — это природные антибиотики, которые синтезируются в клетках всех живых организмов для борьбы с патогенами и являются важнейшими эффекторными молекулами иммунной системы животных и растений. Антимикробные пептиды разнообразны по структуре и механизмам действия. На основе гомологии аминокислотных последовательностей и пространственной структуры их подразделяют на несколько семейств: дефензины, тионины, липидпереносящие белки, гевино- и ноттиноподобные пептиды, а также циклотиды. Обладая широким спектром антимикробной активности, антимикробные пептиды представляют несомненный интерес для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений методами генетической инженерии, а также для разработки лекарственных препаратов нового поколения. В настоящем обзоре кратко изложены свойства основных исследованных авторами семейств антимикробных пептидов растений — дефензинов и гевиноподобных пептидов, а также нового семейства 4-Сус-пептидов.

*Ключевые слова:* растения, защитные пептиды, антимикробные пептиды, иммунитет растений, фитопатогены.

## ВВЕДЕНИЕ

Растения являются богатым источником разнообразных биологически активных веществ, в том числе пептидов [1]. Среди них фитогормоны — регуляторы клеточного деления, роста и развития растений, а также индукторы (элиситоры) защитных реакций. Многие пептиды растений выполняют непосредственно защитные функции, обеспечивая устойчивость растений к биотическому и абиотическому стрессу [2]. Таковыми являются антимикробные и инсектицидные пептиды, подавляющие рост и развитие патогенных грибов и бактерий, а также насекомых-вредителей. Наряду с сигнальными пептидами, участвующими в активации защитных реакций, их объединяют в группу защитных пептидов растений. Защитным пептидам принадлежит ключевая роль в многоуровневой иммунной системе растений, направленной на ограничение распространения и уничтожение патогена. Из неоднородной по структуре и функциям группы защитных пептидов растений в настоящей работе рассматриваются только три семейства антимикробных пептидов, исследованием которых занимались авторы.

По современным представлениям, в основе функционирования иммунной системы растений лежит узнавание рецепторами растительной

клетки сигнальных молекул (элиситоров) патогена (pathogen- или microbe-associated molecular patterns, PAMPs или MAMPs) [3] или молекул, образующихся из поврежденных клеток самого растения (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Узнавание патогена служит пусковым механизмом для индукции защитных реакций и активации экспрессии защитных генов. В ответ на атаку патогена или конститутивно растения в определенных органах или тканях синтезируют целый ряд антимикробных соединений, которые ингибируют рост и развитие микробов. По химической природе они подразделяются на вторичные метаболиты — фитоалексины и фитоантисипины, и антимикробные полипептиды. Антимикробные полипептиды, в свою очередь, подразделяются на две основные группы: **полипептиды** с молекулярной массой выше 10 кДа, и **пептиды** с молекулярной массой менее 10 кДа.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

Антимикробные пептиды (АМП) эта группа защитных соединений растений, которые интенсивно исследуются в последние годы [2, 4–6]. Созданы специальные базы данных, в которых собраны имеющиеся сведения об АМП растений. АМП обеспечивают древний механизм врожденной устойчивости, который заключается в быстром формировании “первой линии обороны”

Сокращения: АМП — антимикробный пептид.

# Автор для связи (тел.: +7(495) 335-40-22; факс: +7(495) 330-73-01; эл. почта: ego@ibch.ru).

## Основные семейства антимикробных пептидов растений

Семейство	Число аминокислотных остатков	Дисульфидные связи	Активны против
ЛПБ	90–95 (класс 1) 70 (класс 2)	4	Бактерии и грибы
Дефензины	45–54	4, 5	То же
Тионины	45–47	3, 4	То же
Геveiноподобные пептиды	30–44	3, 4, 5	Грам+ бактерии и грибы
Ноттиноподобные пептиды	36–37	3	То же
Макроциклические пептиды	29–31	3	Грам+ бактерии
4-Cys-пептиды	25–50	2	Грибы

против патогенов. В пользу защитной роли АМП свидетельствуют три группы данных: антимикробная активность *in vitro*, повышение устойчивости к патогенам трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих гены антимикробных пептидов, а также усиление экспрессии генов АМП в ответ на биотический и абиотический стресс.

Десятки АМП выделены из растений, прежде всего из семян. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что набор АМП, образующихся в растениях в ответ на инфекцию, с одной стороны, видоспецифичен, с другой, зависит от типа патогена. АМП обладают рядом общих физико-химических свойств: небольшим размером молекул (30–90 а.о.), положительным зарядом и амфифильностью структуры. Все эти свойства позволяют АМП непосредственно или с участием рецепторов взаимодействовать с мембранами микроорганизмов, нарушая ее проницаемость. Большинство выделенных из растений АМП относятся к цистеин-богатым пептидам, в молекулах которых четное число остатков цистеина (2, 4, 6, 8 и 10), образует дисульфидные связи, что придает молекулам высокую структурную стабильность. По гомологии аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива и пространственной структуры различают несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липидпереносящие белки, геveiно- и ноттиноподобные пептиды, а также макроциклические пептиды (циклотиды) (см. таблицу и рисунок) [2]. Недавно было охарактеризовано новое семейство пептидов растений, содержащих 4 остатка Cys, так называемых 4-Cys-пептидов (наши неопубликованные данные).

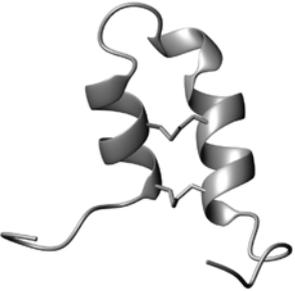
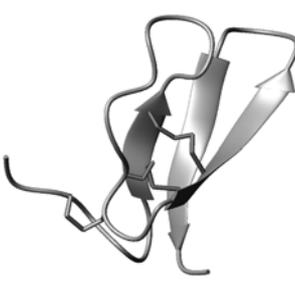
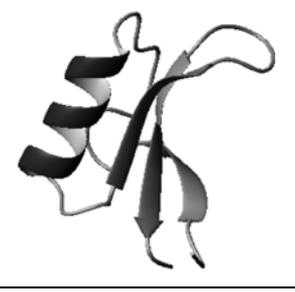
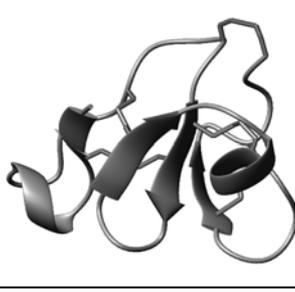
Хотя основные семейства АМП были описаны у растений более 20 лет назад, поиск новых биологически активных молекул продолжается. В этом плане особый интерес представляют дикорастущие виды, обладающие повышенной устойчивостью к патогенам. Оказалось, что некоторые АМП, которые были первоначально обнаружены

лишь у определенного вида растений, имеют значительно более широкое распространение, чем предполагалось ранее. Расширяется и спектр структурных типов АМП, обнаруженных у растений. Несмотря на кажущееся разнообразие структур пептидов, выделенных из различных источников, все исследованные АМП содержат общий, так называемый  $\gamma$ -коровый ( $\gamma$ -core) мотив, который, по всей вероятности, представляет собой древний тип АМП, к которому в ходе эволюции присоединялись различные структурные элементы ( $\alpha$ -спирали или/и  $\beta$ -тяжи) [7]. Дефензины являются древнейшим семейством АМП, поскольку были обнаружены у всех живых существ. Некоторые семейства (тионины, липидпереносящие белки) встречаются только у растений. АМП растений синтезируются в виде предшественников, которые кодируют либо одну молекулу АМП, либо несколько гомологичных пептидов.

АМП обладают широким спектром антимикробного действия, ингибируя рост фитопатогенов в микромолярных концентрациях. Механизм действия АМП растений мало изучен. Считается, что первичной мишенью их действия, как и в случае АМП животных, является мембрана патогенов. Предложено несколько моделей взаимодействия АМП с плазматическими мембранами микроорганизмов. Ингибирующий эффект связывают с нарушением целостности мембран, образованием пор, нарушением барьерной функции или/и действием на внутриклеточные мишени.

Анализ полностью секвенированных геномов растений свидетельствует о том, что в растениях сотни АМП-подобных последовательностей, которые составляют 2–3% от общего числа генов у модельных растений – арабидопсиса и риса. Показано, что 59% из них экспрессируются, однако особенности экспрессии большинства из этих генов практически не изучены [8].

Свойства основных семейств АМП будут рассмотрены ниже.

		
Ec-AMP1 2 S–S-связи 4-Cys-пептиды	Ac-AMP2 3 S–S-связи Гебеиноподобный	PAFP-S 3 S–S-связи Ноттиноподобный
		
Rs-AFP1 4 S–S-связи Дефеинзин	LTP1 4 S–S-связи Липидпереносающий белок	WAMP-1a 5 S–S-связи Гебеиноподобный

Трехмерные структуры некоторых АМП растений: Ec-AMP1 семян *Echinochloa crusgalli* (2L2R), Ac-AMP2 семян *Amaranthus audatus* (1MMC); PAFP-S семян *Phytolacca americana* (1DKC); Rs-AFP1 семян *Raphanus sativus* (1AYJ); LTP1 семян *Triticum aestivum* (1LPT); WAMP-1a семян *Triticum kiharae* (2LB7). В скобках приведены номера структур по базе данных Protein Data Bank.

## ДЕФЕНЗИНЫ

Это единственное семейство антимикробных пептидов, которое обнаружено у всех живых существ – от млекопитающих до миксобактерий. Дефензины являются наиболее изученным семейством АМП растений [9–12]. Они обнаружены у растений всех исследованных семейств в семенах, листьях, цветках, клубнях и плодах. Методами биоинформатики в геноме арабидопсиса выявлено более 300 дефензиноподобных последовательностей [13]. Растительные дефензины – короткие, положительно заряженные полипептиды, содержащие 8 остатков цистеина (10 в дефензинах цветков растений семейства Solanaceae) [12]. Гомология аминокислотных последовательностей между дефензинами различных видов растений довольно низкая, за исключением консервативно расположенных остатков цистеина. В то же время, сходство первичной структуры в пределах семейств, как правило, значительно выше, чем между дефензинами растений, относящихся к разным семействам [14]. Хотя из этого общего правила есть и исключения. Так, нами была выявлена существенная гомология аминокислотных

последовательностей (73%) между дефензинами *Nigella sativa* и *Raphanus sativus* [15], относящихся к семействам Ranunculaceae и Brassicaceae, соответственно. Этот факт свидетельствует об общности происхождения всех растительных дефензинов. Несмотря на различия в аминокислотной последовательности, пространственная структура дефензинов растений сходна и представлена одной  $\alpha$ -спиралью и тремя тяжами  $\beta$ -структуры. Основным структурным элементом в молекулах дефензинов – это цистеинстабилизированный альфа-бета-мотив ( $CS\alpha\beta$ ), в котором единственная  $\alpha$ -спираль соединена двумя дисульфидными связями со вторым (содержащим последовательность СХС) из трех  $\beta$ -тяжей, а остаток цистеина первого из трех  $\beta$ -тяжей в составе субмотива СХС образует дисульфидную связь с остатком цистеина *N*-концевой петли молекулы.

У дефензинов выявлен целый спектр биологических активностей. Так показано, что дефензины ячменя и других злаков ингибируют трансляцию в бесклеточной системе [16]. Некоторые дефензины обладают свойствами ингибиторов ферментов –  $\alpha$ -амилаз и протеиназ [17, 18]. Считается, что такие дефензины участвуют в защите

от насекомых-вредителей. Показано, что длина петли между  $\beta 2$  и  $\beta 3$  влияет на способность ингибировать  $\alpha$ -амилазы насекомых: дефензины с короткой петлей не способны взаимодействовать с активным центром фермента. Исследование дефензинов, обладающих способностью ингибировать протеиназы (трипсин), позволило идентифицировать остатки основных аминокислот, ответственных за ингибирование [18].

Большинство исследованных дефензинов обладают антимикробной активностью – антифунгальной и бактерицидной. Первыми дефензинами, для которых была показана антифунгальная активность, были пептиды семян редьки Rs-AFP1 и Rs-AFP2. При прорастании семян эти пептиды выделяются в окружающую среду, защищая проросток от заражения грибами [19]. В дальнейшем, дефензины, которые обладают антимикробной активностью, были выделены из большого числа растений [10, 12]. По действию на грибы дефензины подразделяют на две группы. Так называемые морфогенетические растительные дефензины ингибируют удлинение гиф и увеличивают их ветвление, в то время как неморфогенетические только ингибируют рост гиф, но не вызывают существенных морфологических нарушений [20, 21]. Активность дефензинов зависит как от вида гриба, так и от вида дефензина. Существенный интерес представляют исследования, направленные на идентификацию участков полипептидной цепи и аминокислотных остатков, ответственных за антифунгальную функцию [22, 23] с использованием сайт-специфического мутагенеза и сравнительного анализа близкородственных полипептидов, различающихся по биологической активности.

Дефензины культурных злаков не обладают выраженной антифунгальной активностью [14, 23]. Так, дефензины пшеницы *Triticum kiharae* Tk-AMP-D1 и Tk-AMP-D6 не активны в отношении целого ряда фитопатогенных грибов (*Alternaria consortiale*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium culmorum*, *Colletotrichum graminicola* и *Diplodia maydis*) при концентрации <100 мкг/мл. Пептид Tk-AMP-D1 обладал слабой антифунгальной активностью по отношению к грибам *F. graminearum* и *F. verticillioides* при концентрации <30 мкг/мл. Пептид Tk-AMP-D6 из указанных выше грибов лишь слабо ингибировал *F. verticillioides*. В то же время дефензины дикорастущего злака – ежовника обыкновенного *Echinochloa crusgalli* – обладали высокой антифунгальной активностью. У дефензина Ec-AMP-D1 величина  $IC_{50}$  для ингибирования прорастания спор *F. graminearum* составила 15 мкг/мл, для *F. verticillioides* – 8.5 мкг/мл, для *D. maydis* – 12.5 мкг/мл.

Интересно отметить, что, несмотря на существенные различия в антифунгальной активно-

сти, дефензины пшеницы и ежовника обладают высокой гомологией аминокислотных последовательностей. Процент идентичных остатков у дефензина пшеницы Tk-AMP-D1 и дефензина ежовника составляет 65%, причем в *N*-концевой области молекул (остатки 1–27) гомология выше, чем для молекул в целом, достигая 74% (85% с учетом консервативных замен). Таким образом, можно предположить, что различия в антифунгальной активности между дефензинами Tk-AMP-D1 *T. kiharae* и Ec-AMP-D1 *E. crusgalli* связаны с различиями в аминокислотной последовательности *S*-концевой области молекул. Сравнительный анализ дефензинов *T. kiharae* и *E. crusgalli* представляет интерес и с точки зрения эволюции семейства Poaceae. Высокая гомология дефензинов в *N*-концевой области молекул свидетельствует о значительном консерватизме этого участка молекул в эволюции, который сохранился почти неизменным после дивергенции триб Paniceae (*E. crusgalli*) и Triticeae (*T. kiharae*).

Данные о высокой антифунгальной активности дефензинов ежовника подтверждают представление о том, что дикорастущие виды более устойчивы к патогенам, чем культурные. В пользу этого говорит и изучение дефензинов другого дикорастущего вида – чернушки посевной *Nigella sativa*, относящейся к семейству Ranunculaceae [15]. Выделенные из семян этого вида дефензины Ns-D1 и Ns-D2 обладали высокой ингибирующей активностью в отношении роста гиф грибов ( $IC_{50}$  менее 10 мкг/мл). Высокая антифунгальная активность дефензинов дикорастущих видов растений делает их гены чрезвычайно перспективными для создания устойчивых к патогенам сортов растений.

Механизм действия антифунгальных дефензинов изучен мало, имеющиеся данные касаются лишь нескольких представителей семейства. Лучше всего изучены в этом плане дефензины редьки RsAFP и георгина DmAMP1, для которых идентифицированы специфические центры связывания на плазматической мембране грибов – сложные сфинголипиды (кислые маннозилдиинозитолфосфорилцерамиды для DmAMP1 и нейтральные глюкозилцерамиды для RsAFP2) [24]. Получены данные о том, что RsAFP2 индуцирует образование активных форм кислорода и вызывает апоптоз клеток дрожжей *Candida albicans* [25]. Исследования механизма действия дефензина гороха Psd1 показали, что он взаимодействует с циклином F, участвующим в регуляции клеточного цикла у *Neurospora crassa* [26]. Изучение взаимодействия растительного дефензина NaD1 цветков *Nicotiana glauca* с грибом *Fusarium oxysporum* с использованием флуоресцентных методов показало, что дефензин проникает в гифы гриба, вызывая образование гранул в цитоплазме и гибель клеток. Таким образом, он действует не только на

мембранные структуры гиф гриба, но и на внутриклеточные мишени [27]. Для дефензина люцерны MsDEF1 показано, что он блокирует  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы клеток млекопитающих, и, возможно, аналогичным образом действует на грибы [28]. Способность ингибировать  $\text{Na}^{+}$ -каналы выявлена у дефензина кукурузы [29].

Некоторые растительные дефензины обладают бактерицидной активностью. Например, дефензин *Clitoria ternatea* (Ct-AMP1) активен против *Bacillus subtilis* [21] растительные дефензины клубней картофеля и листьев шпината ингибируют *Pseudomonas solanacearum* и *Clavibacter michiganense*, а дефензин пшеницы TAD1 действует на *Ps. cichorii* [30]. Дефензин пшеницы Кихара Тк-AMP-D1 подавляет рост бактерии *Ps. syringae* (наши неопубликованные данные). Механизм действия растительных дефензинов на бактерии не изучен.

Получены данные о том, что некоторые дефензины связаны с устойчивостью к абиотическому стрессу – низким температурам [30] и повышенным концентрациям цинка [31]. Недавно показана токсичность некоторых дефензинов для клеток растений и животных, а также их ингибирующее действие на раковые клетки человека [6, 32, 33]. Появились данные о том, что дефензины играют важную роль не только в защите растений, но и в их развитии [11]. Так, показано, что продукты дефензиноподобных генов участвуют в передаче сигналов между мужским и женским гаметофитом [34]. Разнообразные биологические активности, обнаруженные у дефензинов, их способность ингибировать патогены человека и подавлять пролиферацию раковых клеток делают их привлекательными для разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Дефензины синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида и зрелой части. Предшественники дефензинов цветков сем. Solanaceae имеют также C-концевой продомен. Для генов дефензинов характерна органоспецифичность экспрессии: в каждом органе растения экспрессируется, по крайней мере, один дефензин [11].

По числу экспрессирующихся генов виды растений значительно различаются. Так, в семенах исследованных нами видов дикорастущих растений мокрицы *Stellaria media*, ежовника *Echinochloa crusgalli* и чернушки *Nigella sativa* было обнаружено по 2 дефензина, в то время как у полиплоидных видов пшеницы *Triticum kiharae* и *T. aestivum* – 13 дефензинов [35]. Обращает на себя внимание чрезвычайно высокая гомология аминокислотных последовательностей исследованных пар дефензинов *S. media*, *E. crusgalli* и *N. sativa*, которые различаются между собой лишь по одному аминокислотному остатку в C-конце-

вой области молекулы. У дефензинов чернушки это остаток в положении 39 полипептидной цепи (пролин/лейцин) [15], у дефензинов мокрицы вариabельным является положение 49 (глутаминовая кислота/аспарагин) [36], у дефензинов ежовника – положение 45 (гистидин/аланин) [23].

Несмотря на такие минимальные различия в структуре, дефензины различаются по антимикробной активности. Так, дефензин чернушки Ec-AMP-D1 с более высокой эффективностью ингибировал рост гифов грибов *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* и оомицета *Phytophthora infestans*, чем Ec-AMP-D2. Более того, в отличие от Ec-AMP-D1, Ec-AMP-D2 не вызывал морфологических изменений оомицета. Сходные наблюдения касаются и дефензинов чернушки. Моделирование пространственной структуры этих дефензинов позволило локализовать единственную замену (пролин/лейцин) в петле, соединяющей  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , которая, как показали данные по сайт-специфическому мутагенезу, играет важную роль в антифунгальной активности дефензинов [22], что, по всей видимости, и объясняет разную антифунгальную активность дефензинов чернушки. Замена в положении 45 у дефензинов ежовника расположена в другом сайте, ответственном за антифунгальную активность ( $\beta 3$ ).

В семенах полиплоидного (гексаплоидного) вида пшеницы *T. kiharae* нами были охарактеризованы 13 дефензинов, которые по гомологии последовательностей были подразделены на 3 структурные группы: Тк-AMP-D (группа I), Тк-AMP- $\gamma 1$ , Тк-AMP- $\gamma 2$ , Тк-AMP- $\gamma 3$  (группа II), Тк-AMP- $\omega 2$  и  $\omega 3$  (группа III), имеющие, по всей видимости, различное эволюционное происхождение [35]. В пределах подгрупп гомология аминокислотных последовательностей высокая, то есть каждая подгруппа представляет собой семейство близкородственных пептидов, возникших, вероятно, в результате дубликации одного предкового гена. Наиболее вариabельным является C-концевой участок молекулы, который различается у разных форм по длине. Интересно отметить, что дефензины диплоидных видов родов *Triticum* и *Aegilops*, которые, как считается, явились донорами геномов полиплоидных пшениц (гекса- и тетраплоидных видов пшеницы), практически не отличаются по аминокислотным последовательностям от дефензинов пшеницы Кихара, что свидетельствует о том, что структура дефензинов высоко консервативна в эволюции семейства Poaceae.

## ГЕВЕИНОПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Гевеиноподобные АМП объединены в одно семейство благодаря структурной гомологии с гевеином, 43-членным хитинсвязывающим пептидом, который был выделен из гевеи *Hevea brasiliensis* [37]. Они относятся к группе белков,

способных связывать хитин (полимер *N*-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и родственные соединения, содержащие GlcNAc или *N*-ацетилнейраминную кислоту (NeuNAc) [38, 39]. Поскольку хитин не обнаружен в клетках растений, но широко распространен у грибов, насекомых и нематод, было выдвинуто предположение о том, что хитинсвязывающие белки участвуют в защите растений от патогенов. Все хитинсвязывающие белки содержат, по крайней мере, один хитинсвязывающий (геveiновый) домен, который состоит из 30–43 а.о. и содержит несколько консервативных аминокислот (несколько остатков цистеина, глицина и ароматических аминокислот), образующих хитинсвязывающий сайт. Этот участок обеспечивает связывание хитина. Помимо геveiна к хитинсвязывающим белкам относятся лектины, некоторые хитиназы (классов I и IV семейства PR-3, а также класса I семейства PR-4), несколько белков, индуцируемых поранением, и ряд геveiноподобных АМП [38, 39].

Геveiноподобные АМП образуют отдельное семейство однодоменных хитинсвязывающих белков, представители которого различаются по числу остатков цистеина, образующих внутримолекулярные дисульфидные связи. Большинство из них содержит 4 дисульфидные связи и в этом плане сходны с хитинсвязывающими доменами хитиназ классов I и IV.

Представителями 8-Cys-геveiноподобных пептидов являются пептиды Pn-AMP1 и Pn-AMP2, выделенные из семян ипомеи *Pharbitis nil* [40], и авезин овса [41]. В этом семействе есть и укороченные формы, содержащие лишь 6 остатков цистеина в молекуле, образующих 3 дисульфидные связи. К ним относятся геveiноподобные пептиды амаранта: Ac-AMP1 и Ac-AMP2 из семян *Amaranthus caudatus* [42], Au-AMP *A. hypochondriacus* [43] и Ar-AMP *A. retroflexus* [44], а также пептид IWF4, выделенный из межклеточной жидкости листьев сахарной свеклы [45]. У этих пептидов отсутствует C-концевая область канонического геveiноподобного домена. Описано также 4 геveiноподобных пептида, содержащих 10 остатков цистеина, образующих 5 дисульфидных связей и различающихся по цистеиновому мотиву. Два из них выделены из коры деревьев *Eucommia ulmoides* и *Euonymus europaeus* [46, 47], а два других – из семян злаковых – пшеницы *Triticum kiharae* [48] и колосняка *Leymus arenarius* [49]. У пептидов – Ee-SBP и WAMP-1a – цистеиновый мотив такой же, как у соответствующих хитиназ: из *Euonymus europaeus* и *Oryza sativa* [48, 50].

Как и дефензины, все геveiноподобные АМП синтезируются в виде предшественников. Однако в отличие от дефензинов, структуры предшественников геveiноподобных АМП различаются. Большинство из них являются однодоменными,

то есть кодируют один зрелый геveiноподобный пептид, однако встречаются и двухдоменные предшественники. Пептиды Ac-AMP1 и IWF4, содержащие 6 остатков цистеина, а также восьмицистеиновый Pn-AMP синтезируются в виде пре-пробелков, состоящих из *N*-концевого сигнального пептида, зрелого пептида и C-концевого пропептида длиной около 30 а.о.

Пептид *Euonymus europaeus* Ee-SBP синтезируется в виде более длинного предшественника: вместо короткого C-концевого продомена он содержит протяженный хитиновый домен, который соединяется с геveiновым доменом шарнирным участком и отщепляется при пост-трансляционном процессинге [50]. Предшественник пептида WAMP-1a также сходен с хитиназами: об этом говорит обнаруженное нами сходство последовательности зрелого пептида с геveiноподобным доменом хитиназ, а также гомология пропоследовательности предшественника с C-концевой областью каталитического домена хитиназ.

Полученные методом спектроскопии ЯМР данные о пространственной структуре пептида WAMP-1a также подтверждают сходство пептида с геveiноподобным доменом хитиназ класса I [51]. В целом, все это указывает на то, что ген пептида WAMP-1a возник в ходе эволюции из гена древней хитиназы в результате делеции значительной части каталитического домена. Как показали наши исследования, в отличие от вышеупомянутых однодоменных предшественников, предшественники геveiноподобных АМП звездчатки средней (*Stellaria media* L.) имеют двухдоменную структуру: они кодируют сразу два зрелых антимикробных пептида, которые различаются по биологической активности (GenBank: CBJ21248.1; CBJ21249.1).

Была установлена трехмерная структура ряда геveiноподобных АМП: геveiна (8 Cys) (2LDB), пептида AcAMP2 амаранта (6 Cys) (1MMC), 10-Cys-пептида коры дерева *Eucommia ulmoides*, определенная методами ЯМР (1P9Z) [52] и рентгеноструктурного анализа (1P9G) [53], а также 10-Cys-пептида *T. kiharae* WAMP-1a [51]. Обнаружено сходство трехмерной структуры хитинсвязывающего домена у всех исследованных хитинсвязывающих белков. Исследование пространственной структуры геveiна позволило идентифицировать аминокислотные остатки хитинсвязывающего сайта, которые специфически взаимодействуют с олигосахаридами (Trp-21, Trp-23 и Tyr-30) за счет гидрофобных взаимодействий. Это взаимодействие стабилизируется водородной связью с остатком Ser-19. Гомологичные консервативные остатки есть и в других хитинсвязывающих белках, в частности, у Ac-AMP2. По сравнению с другими изученными хитинсвязывающими белками пептид WAMP-1a занимает особое место: в

этом пептиде консервативный остаток серина хитин-связывающего сайта замещен на глицин, при этом способность связывать полимерный хитин не утрачивается [48], однако теряется способность связывать пента-*N*-ацетилхитопентозы (А.В. Митькевич, ИМБ имени В.А. Энгельгардта РАН, личное сообщение). Детальное исследование структуры пептида коры дерева *Eucommia ulmoides* выявило амфифильность молекулы – наличие двух кластеров: с одной стороны, кластера положительно заряженных аминокислот, а с другой, гидрофобного кластера, содержащего хитинсвязывающий сайт [52, 53]. Амфифильность структуры была показана и для пептида WAMP-1a [51]. Наличие у пептида как антифунгальной, так и антибактериальной активности, по всей видимости, связано с амфифильностью молекулы и наличием кластера положительно заряженных аминокислот, а также гидрофобного кластера, содержащего хитинсвязывающий сайт.

Спектр антимикробной активности гевеиноподобных пептидов достаточно широк и включает как нитчатые, так и дрожжеподобные грибы. В ряде случаев показано ингибирование роста бактерий. Так, пептиды амаранта Ас-AMP1 и Ас-AMP2 ингибируют рост грамположительных бактерий, хотя неактивны в отношении тестированных грамотрицательных бактерий [42]. Пептид WAMP-1a действует как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии [48]. Для пептида Ее-СВР показано, что его антифунгальная активность возрастает в присутствии эндогенной хитиназы [50].

Механизм действия гевеиноподобных АМП мало изучен. Для одного представителя – Pn-AMP1 – показано, что в клетках дрожжей он вызывает деполяризацию актина [54]. Большинство из вышеупомянутых пептидов связываются с хитином [38, 42, 44, 47]. Однако неизвестно, насколько их антифунгальная активность связана с действием на метаболизм хитина у грибов. Зависимость их активности от наличия в среде катионов, скорее, предполагает, что они действуют на плазматическую мембрану, поскольку наблюдаемый антагонизм часто проявляют пептиды, действующие на мембраны. Растения табака и томата, экспрессирующие гевеиноподобные пептиды Pn-AMP, обладают повышенной устойчивостью к патогенам, содержащим и не содержащим хитин [55].

#### СЕМЕЙСТВО 4-ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ 4 ОСТАТКА ЦИСТЕИНА (4-Cys-ПЕПТИДЫ)

Исследование АМП различных видов растений позволило обнаружить новое семейство пептидов, содержащих 4 остатка цистеина, для которых характерен следующая цистеиновый мотив: C<sup>1</sup>XXXX<sup>2</sup>X<sub>n</sub>C<sup>3</sup>XXXX<sup>4</sup>, где X – любая аминокисло-

та, *n* – число аминокислотных остатков от 10 до 15. Это семейство было названо “4-Cys-пептиды”. Ранее был известен лишь один пептид кукурузы MBP-1 с таким мотивом [56]. Оказалось, что 4-Cys-пептиды широко распространены у растений. Так, они были обнаружены у пшеницы [35], ежевника и звездчатки (наши неопубликованные данные).

Определение пространственной структуры пептида ежевника методом спектроскопии ЯМР показало, что в растворе этот пептид представляет собой α-спиральную шпильку, “скрепленную” двумя дисульфидными связями, с достаточно лабильными *N*- и *C*-концами [62] (опубликовано после набора данной статьи). Такой же структурой обладает и ингибитор трипсина, выделенный из гречихи и *Veronica hederifolia* [57, 58]. Пептиды, названные MiAMP2 (a, b, c и d), с таким же 4-Cys-мотивом были обнаружены в орехах такого экзотического растения, как макадамия *Macadamia integrifolia* [59]. Было показано, что эти антимикробные пептиды образуются в результате процессинга запасного 7S глобулина – вицилина.

Принципиально иное строение у предшественников 4-Cys-пептидов пшеницы. Установлено, что они имеют модульное строение и кодируют 5 или 7 гомологичных пептидов, которые, вероятно, различаются по биологической активности. Исследование гена 4-Cys-пептида мокрицы показало, что этот пептид образуется из вицилиноподобного модульного предшественника, кодирующего 12 гомологичных 4-Cys-пептидов (неопубликованные данные).

#### ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМП В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Потери урожая сельскохозяйственных культур, связанные с патогенами (грибами, бактериями, вирусами и вироидами), насекомыми-вредителями и нематодами, достигают 45% [60, 61]. Помимо снижения уровня производства сельскохозяйственной продукции, патогены ухудшают ее качество. Так, микотоксины *Fusarium* sp., поражающие зерно, токсичны для человека и животных. Ежегодно ущерб, наносимый патогенами и вредителями, достигает триллиона рублей. На фоне стремительно возрастающего населения Земного шара увеличивается потребность в пищевом белке, которая в настоящее время составляют 230 млн. тонн в год, что делает проблему повышения урожайности сельскохозяйственных культур чрезвычайно актуальной. Традиционные методы селекции не всегда эффективны из-за отсутствия соответствующих генов устойчивости, кроме того, они трудоемки и длительны. Использование химических средств защиты растений наносит существенный ущерб экологии и позволяет снизить потери урожая лишь на 7%.

Альтернативной стратегией повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к патогенам и насекомым-вредителям, а также к другим стрессовым факторам окружающей среды абиотической природы (засухе, засоленности почвы и пр.) служит генетическая инженерия, которая позволяет встраивать чужеродные гены, обуславливающие устойчивость, в геномы культурных растений. Путем генетической трансформации уже получены сельскохозяйственные культуры, устойчивые к гербицидам, насекомым-вредителям, а также абиотическому стрессу. АМП обладают широким спектром антимикробного действия, поэтому их гены являются перспективными для трансформации растений и получения устойчивых к патогенам форм сельскохозяйственных растений. В виде одиночных генов или в комбинации с другими генами они могут быть непосредственно встроены в геномы чувствительных растений для увеличения их устойчивости.

В лабораторных условиях уже удалось достичь повышения устойчивости к патогенам у трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих гены ряда АМП растений [12]. В качестве трансгенов преимущественно использовали гены дефензинов. Другим подходом к усилению устойчивости растений к патогенам может быть изменение экспрессии защитных генов. Однако для его реализации необходимо более глубокое понимание сигнальных путей, участвующих в активации экспрессии генов АМП.

Другим аспектом практического применения АМП является их использование в качестве моделей для разработки лекарственных препаратов нового поколения. Стремительный рост числа новых антибиотиков, введенных в клиническую практику в середине 20 века, привел к появлению устойчивых форм патогенных микроорганизмов. Известны случаи устойчивости целого ряда бактериальных патогенов человека (*Enterrococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae* и др.) практически к любому используемому антибиотику.

Не менее серьезную проблему представляют и грибковые болезни человека — микозы. За последние 20 лет существенно возросла частота системных грибковых инфекций, особенно среди ВИЧ-инфицированных, онкологических больных, а также пациентов, подвергшихся трансплантации органов. Основными патогенными для человека видами грибов являются *Candida albicans* (а также *C. glabrata*, *C. tropicalis* и *C. krusei*), виды рода *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*), *Histoplasma capsulatum* и *Cryptococcus neoformans*. Серьезная угроза здоровью людей, которую представляют собой грибковые инфекции, обусловила широкое

применение антимикотиков в клинической практике, кроме того, стимулировало поиск новых фунгицидных препаратов широкого спектра действия. Традиционно используемые антифунгальные препараты — азола и полиены — не удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к антимикотикам для лечения заболеваний, вызванных грибами: азола обладают лишь фунгистатическим действием, в то время как полиены токсичны для клеток человека.

АМП обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционно используемыми антибиотиками: они способны быстро убивать клетки-мишени, обладают широким спектром действия, активны в отношении штаммов, резистентных к другим антибиотикам, не токсичны для клеток млекопитающих, а также не вызывают образование устойчивых форм патогенов. Все это свидетельствует о значительном потенциале АМП для лечения и профилактики инфекций и позволяет рассматривать их в качестве основы для разработки лекарственных препаратов нового поколения. Поиск новых АМП природного происхождения и изучение механизма их действия позволит создать пептидные антибиотики и антимикотики нового поколения для медицинских целей.

Основное препятствие на пути использования АМП в медицине заключается в высокой стоимости их производства в промышленных масштабах. В связи с этим, важное значение приобретает разработка методов гетерологической экспрессии АМП в различных системах. Обнаружение у некоторых АМП антипролиферативной активности открывает возможности также использовать их для создания антиканцерогенных препаратов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа поддержана грантами РФФИ № 11-04-00190-а, 11-04-00767-а и 09-04-00250-а, а также ГК Минобрнауки № 16.512.11.2156 и № 16.740.11.0424.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farrokhi N., Whitelegge J.P., Brusslan J.A. // Plant peptides and peptidomics. Plant. Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 105–134.
2. Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G.W., Osborn R.W. // Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant. Sci. 1997. V. 16. P. 297–323.
3. Jones J.D.G., Dangl J.L. // The plant immune system. Nature. 2006. V. 444. P. 323–329.
4. Benko-Iseppon A.M., Galdino S.L., Calsa T., Jr., Kido E.A., Tossi A., Belarmino L.C., Crovella S. // Overview on plant antimicrobial peptides. Curr. Protein Pept. Sci. 2010. V. 11. P. 181–188.

5. *Padovan L., Scocchi M., Tossi A.* // Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 210–219.
6. *da Rocha Pitta M.G., da Rocha Pitta M.G., Galdino S.L.* // Development of novel therapeutic drugs in humans from plant antimicrobial peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 236–247.
7. *Yount N.Y., Yeaman M.R.* // Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 7363–7368.
8. *Silverstein K.A., Moskal W.A., Jr, Wu H.C., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D., VandenBosch K.A.* // Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 2007. V. 51. P. 262–280.
9. *Thomma B.P., Cammue B.P., Thevissen K.* // Plant defensins. *Planta.* 2002. V. 216. P. 193–202.
10. *Carvalho A.O., Gomes V.M.* // Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.* 2009. V. 30. P. 1007–1020.
11. *Stotz H.U., Thomson J.G., Wang Y.* // Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav.* 2009. V. 4. P. 1010–1012.
12. *Lay F.T., Anderson M.A.* // Defensins—components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005. V. 6. P. 85–101.
13. *Silverstein K.A., Graham M.A., Paape T.D., VandenBosch K.A.* // Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 600–610.
14. *Odintsova T.I., Egorov T.S.A., Musolyamov A.Kh., Odintsova M.S., Pukhalsky V.A., Grishin E.V.* // Seed defensins from *T. kiharae* and related species: genome localization of defensin-encoding genes. *Biochimie.* 2007. V. 89. P. 605–612.
15. *Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I.* // Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 2011. V. 49. P. 131–137.
16. *Mendez E., Rocher A., Calero M., Girbes T., Citores L., Soriano F.* // Primary structure of omega-hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 67–73.
17. *Wijaya R., Neumann G.M., Condron R., Hughes A.B., Polya G.M.* // Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* 2000. V. 159. P. 243–255.
18. *Melo F.R., Rigden D.J., Franco O.L., Mello L.V., Ary M.B., Grossi-de-Sa M.F., Bloch C.* // Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking. *Proteins.* 2002. V. 48. P. 311–319.
19. *Terras F.R.G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R.W., Kester A., Rees S.B., Torrekens S., Van-Leuven F., Vanderleyden J., Cammue B.P.A., Broekaert W.F.* // Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 573–588.
20. *Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammue B.P.A. and Osborn R.W.* // Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 1353–1358.
21. *Osborn R.W., De Samblanx G.W., Thevissen K., Goderis I., Torrekens S., Van Leuven F.* // Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters.* 1995. V. 368 P. 257–262.
22. *De Samblanx G.W., Goderis I.J., Thevissen K., Raemaekers R., Fant F., Borremans F., Acland D.P., Osborn R.W., Patel S., Broekaert W.F.* // Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 1171–1179.
23. *Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Y., Musolyamov A.K., Yalpani N., Egorov T.A., Grishin E.V.* // Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie.* 2008. V. 90. P. 1667–1673.
24. *Thevissen K., Warnecke D.C., Francois I.E.J.A., Leipelt M., Heinz E., Ott C.* // Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 3900–3905.
25. *Aerts A.M., Francois I.E., Meert E.M.K., Li Q.T., Cammue B.P.A., Thevissen K.* // The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* 2007. V. 13. P. 243–247.
26. *Lobo D.S., Pereira I.B., Fragel-Madeira L., Medeiros L.N., Cabral L.M., Faria J., Bellio M., Campos R.C., Linden R., Kurtenbach E.* // Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 987–996.
27. *Van der Weerden N.L., Hancock R.E.W., Anderson M.A.* // Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall dependent process. *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 37513–37520.
28. *Spelbrink R.G., Dilmac N., Allen A., Smith T.J., Shah D.M., Hockerman G.H.* // Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 2055–2067.
29. *Kushmerick C., de Souza Castro M., Santos Cruz J., Bloch C., Beirao P.S.* // Functional and structural features of gamma-zeationins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett.* 1998. V. 440. P. 302–306.
30. *Koike M., Okamoto T., Tsuda S., Imai R* // A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 298. P. 46–53.
31. *Mirouze M., Sels J., Richard O., Czernic P., Loubet S., Jacquier A., Francois I.E.J.A., Cammue B.P.A., Lebrun M., Berthomieu P., Marques L.* // A putative novel role for plant defensins: a defensin from zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J.* 2006. V. 47. P. 329–342.
32. *Anaya-Lopez J.L., Lopez-Meza J.E., Baizabal-Aguirre V.M., Cano-Camacho H., Ochoa-Zarzosa A.* // Fungicidal and cytotoxic activity of *Capsicum chinense*

- defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. P. 1101–1108.
33. de Zelicourt A., Letousey P., Thoiron S., Campion C., Simoneau P., Elmorjani K., Marion D., Simier P., Delavault P. // Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta*. 2007. V. 226. P. 591–600.
  34. Okuda S., Tsutsui H., Shiina K., Sprunck S., Takeuchi H., Yui R., Kasahara R.D., Hamamura Y., Mizukami A., Susaki D., Kawano N., Sakakibara T., Namiki S., Itoh K., Otsuka K., Matsuzaki M., Nozaki H., Kuroiwa T., Nakano A., Kanaoka M.M., Dresselhaus T., Sasaki N., Higashiyama T. // Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*. 2009. V. 458. P. 357–361.
  35. Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. // Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides*. 2005. V. 26. P. 2064–2073.
  36. Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Grishin E.V., Egorov T.A. // Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. *Biochimie*. 2011. V. 93. P. 450–456.
  37. Van Parijs J., Broekaert W.F., Goldstein I.J., Peumans W.J. // Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*. 1991. V. 183. P. 258–264.
  38. Raikhel N.V., Lee H.-I. // Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1993. V. 44. P. 591–615.
  39. Beintema J.J. // Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters*. 1994. V. 350. P. 159–163.
  40. Koo J.C., Lee S.Y., Chun H.J., Cheong Y.H., Choi J.S., Kawabata S.-I., Miyagi M., Tsunasawa S., Ha K.S., Bae D.W., Han C.-D., Lee B.L., Cho M.J. // Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1382. P. 80–90.
  41. Li S.-S., Claeson P. // Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. *Phytochemistry*. 2003. V. 63. P. 249–255.
  42. Broekaert W.F., Mariën W., Terras F.R.G., De Bolle M.F.C., Proost P., Van Damme J., Dillen L., Claeys M., Rees S.B., Vanderleyden J., Cammue B.P.A. // Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine-glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 4308–4314.
  43. Rivillas-Acevedo L.A., Soriana-Garcia M. // Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 10156–10161.
  44. Lipkin A., Anisimova V., Nikonorova A., Babakov A., Krause A., Bienert M., Grishin E., Egorov T. // An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*. 2005. V. 66. P. 2426–2431.
  45. Nielsen K.K., Nielsen J.E., Madrid S.M., Mikkelsen J.D. // Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* 1997. V. 113. P. 83–91.
  46. Huang R.-H., Xiang Y., Liu X.-Z., Zhang Y., Hu Z., Wang D.-C. // Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Letters*. 2002. V. 521. P. 87–90.
  47. Van den Bergh K.P.B., Proost P., Van Damme J., Coosemans J., Van Damme E.J.M., Peumans W.J. // Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *FEBS Letters*. 2002. V. 530. P. 181–185.
  48. Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Musolyamov A.K., Finkina E.I., Khadeeva N.V., Rogozhin E.A., Korostyleva T.V., Pukhalsky V.A., Grishin E.V., Egorov T.A. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. *FEBS J.* 2009. V. 276. P. 4266–4275.
  49. Utkina L.L., Zhabon E.O., Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Shiyan A.N., Grishin E.V., Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalskii V.A. // Heterologous expression in *Escherichia coli* cells of a synthetic gene encoding a novel hevein-like peptide of *Leymus arenarius*. *Russian J. Genet.* 2010. V. 46. P. 1–7.
  50. Van den Bergh K.P., Rougé P., Proost P., Coosemans J., Krouglova T., Engelborghs Y., Peumans W.J., Van Damme E.J.M. // Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *Planta*. 2004. V. 219. P. 221–232.
  51. Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Grishin E.V., Egorov T.A., Arseniev A.S. // Solution Structure of a Defense Peptide from Wheat with a 10-Cysteine Motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011 June 14. [Epub ahead of print] PMID: 21704019.
  52. Huang R.-H., Xiang Y., Tu G.-Z., Zhang Y., Wang D.-C. // Solution structure of *Eucommia* antifungal peptide: a novel structural model distinct with a five-disulfide motif. *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 6005–6012.
  53. Xiang Y., Huang R.-H., Liu X.-Z., Zhang Y., Wang D.-C. // Crystal structure of a novel antifungal protein distinct with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Olivier at an atomic resolution. *J. Struct. Biol.* 2004. V. 148. P. 86–97.
  54. Koo J.C., Lee B., Young M.E., Koo S.C., Cooper J.A., Baek D., Lim C.O., Lee S.Y., Yun D.J., Cho M.J. // Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1669–1680.
  55. Lee O.S., Lee B., Park N., Koo J.C., Kim Y.H., Prasad D., Karigar C., Chun H.J., Jeong B.R., Kim D.H., Nam J., Yun J.-G., Kwak S.-S., Cho M.J., Yun D.-J. // Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confer disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*. 2003. V. 62. P. 1073–1079.
  56. Duvick J.P., Rood T., Rao A.G., Marshak D.R. // Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 18814–18820.
  57. Цыбина Т.А., Дунаевский Я.Е., Мусолямов А.Х., Егоров Т.А., Белозерский М.А. // Катионные ингибиторы сериновых протеиназ семян гречихи. *Биохимия*. 2001. Т. 66. С. 1157–1164.

58. *Conners R., Konarev A.V., Forsyth J., Lovegrove A., Marsh J., Joseph-Horne T., Shewry P., Brady R.L.* // An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of veronica (*Veronica hederifolia* L.). *J. Biol. Chem.* 2007. V. 38. P. 27760–27768.
59. *Marcus J.P., Green J.L., Goulter K.C., Manners J.M.* // A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J.* 1999. V. 19. P. 699–710.
60. *Oeke E.C., Dehne H.W., Schonbeck F., Weber A.* // Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. 1994. Elsevier, Amsterdam.
61. *Vasil I.K.* Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1133–1154.
62. *Nolde S.B., Vassilevski A.A., Rogozhin E.A., Barinov N.A., Balashova T.A., Samsonova O.V., Baranov V.V., Feofanov A.V., Egorov T.A., Arseniev A.S., Grishin E.V.* // Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 25145–25153.

## Defense Peptides of Plant Immune System

**Ts. A. Egorov\*\* and T. I. Odintsova\*\***

*#Phone: +7 (495) 335-40-22; fax: +7 (495) 330-73-01; e-mail: ego@ibch.ru*

*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, Russia*

*\*\*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Antimicrobial peptides (AMPs) are natural antibiotics produced by all living organisms to combat pathogens. They are important effector molecules of the immune system both in animals and plants. AMPs are diverse in structure and mode of action. Based on homology of amino acid sequences and 3D structures several AMP families have been distinguished. They are defensins, thionins, lipid transfer proteins, hevein- and knottin-like peptides, and cyclotides. AMPs display broad-spectrum antimicrobial activity and thus show promise for the development of disease-resistant crops by genetic engineering and for the production of new-generation drugs. In this paper, the properties of the main AMP families (defensins and hevein-like peptides) and of a new 4-Cys plant AMP family are reviewed.

*Keywords: plants, defense peptides, antimicrobial peptides, plant immune system, phytopathogens.*