

## Изучение специфичности ретроградного транспорта фитаспаз в клетки растений

Научный руководитель – Вартапетян Андрей Борисович

*Теплова Анастасия Дмитриевна*

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: anastasia\_teplova@mail.ru*

Фитаспазы — это субтилизин-подобные протеазы растений, участвующие в осуществлении стресс-индуцированной гибели клеток. Удивительным свойством фитаспаз является их динамичная локализация. В здоровых клетках растений N-концевой сигнальный пептид опосредует секрецию фитаспазы из клетки и накопление ее в межклеточной жидкости (апопласте). Однако при индукции программированной клеточной смерти фермент возвращается внутрь растительной клетки [1].

Недавно было показано, что ретроградный транспорт фитаспазы в растительную клетку осуществляется путем клатрин-зависимого эндоцитоза [2]. Чтобы понять, является ретроградный транспорт фитаспазы специфичным, или любой белок будет перемещаться из апопласта внутрь погибающей растительной клетки, мы сконструировали секретлируемый флуоресцентный белок и сравнили его поведение с динамичной локализацией фитаспазы.

Для этого мы получили плазмидную конструкцию, кодирующую N-концевой сигнальный пептид фитаспазы табака (SP), соединенный с флуоресцентным белком mRFP. Рекомбинантный белок SP-mRFP был продуцирован в листьях *Nicotiana benthamiana* с помощью агроинфильтрации. Локализацию полученного белка определяли с помощью флуоресцентной микроскопии и путем фракционирования белков клетки на апопластные и внутриклеточные с последующей детекцией белков методом иммуноблоттинга.

Как и ожидалось, синтезированный белок SP-mRFP полностью процессировался в клетках растений, и флуоресцентный белок mRFP обнаруживался исключительно в апопласте. Поэтому впоследствии белок SP-mRFP использовался в качестве маркера апопласта для изучения специфичности ретроградного транспорта фитаспазы. Мы осуществляли совместную продукцию фитаспазы табака, содержащей EGFP-тэг, (Nt-Phyt-EGFP) и SP-mRFP в листьях *N. benthamiana* и вызывали окислительный стресс с помощью обработки антимицином А. При отсутствии стресса Nt-Phyt-EGFP и секретированный mRFP локализовались в апопласте. При индукции окислительного стресса мы наблюдали ожидаемое возвращение фитаспазы внутрь клетки, в то время как секретированный белок mRFP сохранял апопластную локализацию.

Полученный результат указывает на то, что ретроградный транспорт фитаспазы специфичен и, вероятно, происходит при участии рецептора.

### Источники и литература

- 1) Chichkova, et. al. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. EMBO Journal, 29(6):1149–1161, 2010.
- 2) Trusova, et. al. Sometimes they come back: endocytosis provides localization dynamics of a subtilase in cells committed to cell death. Journal of Experimental Botany, 2019. doi:10.1093/jxb/erz014