

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Ляпина Ирина Сергеевна

Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений

1.5.3. - Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Фесенко Игорь Александрович

Москва – 2023

Содержание

<i>ВВЕДЕНИЕ</i>	5
<i>СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ</i>	10
<i>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</i>	11
1.1 Иммуниет растений	11
1.1.1 Компоненты иммунной системы растений	11
1.1.1.1 Мембранные рецепторы и ко-рецепторы, участвующие в иммунном сигналинге	11
1.1.1.2 Цитоплазматические участники иммунного сигналинга	13
1.1.1.3 Внутриклеточные рецепторы, связанные с иммунитетом	14
1.1.1.4 Лиганды клеточных рецепторов, участвующие в иммунном сигналинге	15
1.1.2 Различные модели иммунитета растений	18
1.1.3 Эволюция иммунитета растений	20
1.2 Биоактивные пептиды растений	23
1.2.1 Регуляторы роста	25
1.2.2 Фитоцитокины	26
1.2.3 Антимикробные пептиды	27
1.3 Методы анализа биологически активных пептидов растений	28
1.3.1 Методы поиска и идентификации пептидов	28
1.3.1.1 Методы масс-спектрометрии в пептидомном анализе	29
1.3.1.2 Новейшие технологии пептидомики	36
1.3.1.3 Количественная пептидомика	37
1.3.1.4 Биоинформатические инструменты анализа	38
1.3.2 Проблемы предсказания и аннотации пептидов в геномах	39
<i>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</i>	42
2.1 Растительный материал и обработки	42

2.2	Получение нокаутных линий	43
2.3	Выделение ДНК и РНК и синтез кДНК	43
2.4	Анализ количественной ПЦР с реакцией обратной транскрипции	44
2.5	Условия выращивания патогенов и заражение растений мха	44
2.6	РНК-секвенирование	45
2.7	Детекция и измерение уровня накопления молекул АФК	46
2.8	Экстракция пептидов	47
2.9	LC-MS/MS анализ и идентификация пептидов	48
2.10	Биоинформатический анализ белковых последовательностей	49
2.11	НММ поиск	50
2.12	Предсказание КСП	50
2.13	Поиск и предсказание биоактивных пептидов в стресс-индуцированном транскриптоме	52
2.14	Синтез пептидов	53
2.15	Проверка антимикробной активности пептидов	53
2.16	Статистический анализ	53
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	54
3.1	Идентификация пептидных регуляторов иммунного ответа у бриофитов	54
3.1.1	Поиск генов-предшественников коротких секретлируемых пептидов (КСП) в геномах бриофитов	55
3.1.1.1	Группа “регуляторные” пептиды и фитоцитокнины	59
3.1.1.2	Группа “антимикробные” пептиды	64
3.1.1.3	Группа пептидов “неизвестного” действия	65
3.1.2	Анализ транскриптома <i>P. patens</i> при заражении фитопатогенами	67

3.1.3 Анализ пептидомов <i>P. patens</i> после обработки элиситорами стрессового ответа	69
3.1.3.1 Стрессовые гормоны индуцируют гидролиз маленьких белков	70
3.1.3.2 Анализ пост-трансляционных модификаций (ПТМ) внеклеточных пептидов	74
3.1.3.3 Обработка хитозаном стимулирует образование пептидов	76
3.2 Анализ биологической активности эндогенных пептидов	81
3.2.1 Изучение роли коротких секретлируемых пептидов RALF в иммунном ответе у <i>P. patens</i>	81
3.2.1.1 Анализ аминокислотного состава RALF пептидов <i>P. patens</i>	82
3.2.1.2 Нокауты генов <i>PpRALF2</i> и <i>PpRALF3</i> повышают устойчивость растений к заражению патогенами	84
3.2.1.3 Транскриптомный ответ на заражение <i>F. solani</i> в нокауте <i>PpRALF3</i>	88
3.2.2 Биологическая активность пептидов EAA и INI	95
3.3 Сравнительный анализ функций короткого секретлируемого пептида PEPR у сосудистых и несосудистых растений	100
3.3.1 Предсказание гомологов рецептора PEPR в геноме <i>P. patens</i>	100
3.3.2 Анализ активности синтетических пептидов PEPR при обработке <i>P.</i> <i>patens</i>	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В процессе роста и развития растения взаимодействуют с огромным количеством патогенных и непатогенных организмов. Взаимодействие характерных для патогенных микроорганизмов молекулярных структур со специфичными мембранными рецептор-подобными киназами растений приводит к запуску иммунного ответа, обеспечивая защиту от фитопатогенов. Кроме того, растения способны регулировать интенсивность иммунного ответа посредством эндогенных пептидов, называемых фитоцитокинами. В последние годы открыты более десятка фитоцитокинов, способных взаимодействовать со специализированными рецепторами. Такое разнообразие репертуара рецепторов, узнающих соответствующие патогенные элиситоры и регуляторные иммунные пептиды является одним из определяющих факторов устойчивости растений к фитопатогенам. Кроме того, пептиды участвующие в регуляции процессов роста и развития, также участвуют в стрессовых ответах, например, во время заражения фитопатогенами. Пептиды могут выполнять и роль защитных агентов, атакуя клетки патогенных организмов, как это делают антимикробные пептиды.

Семейства биологически активных пептидов, способных секретироваться во внеклеточное пространство и, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, регулировать специфические процессы, объединены под общим названием “короткие секретлируемые пептиды” (КСП). Короткие секретлируемые пептиды были найдены практически у всех покрытосеменных, однако их поиск прежде не проводили в других отделах царства растений. Механизм действия многих биологически активных пептидов еще не до конца понятен, а их функциональный анализ часто затруднен в связи с большим количеством представителей определенных семейств. В этом случае использование растений, семейства пептидов у которых состоят всего из нескольких генов, упрощает функциональный анализ. Примером может служить семейство пептидов RALF (Rapid Alkalinization

Factors), состоящее из нескольких десятков представителей у покрытосеменных и всего из трех у мха *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*.

Таким образом, поиск и идентификация биологически активных пептидов является сложной, но актуальной задачей современной биологии. Такие проблемы, как роль пептидного сигналинга в процессе освоения растениями суши и во взаимодействии с другими организмами, находятся в фокусе внимания современных исследователей. Эволюция пептидных сигналов и рецепторов, консервативность компонентов сигнальных каскадов, возможности переноса компонентов иммунной системы между разными группами растений на сегодняшний день изучены мало. Достижения современной науки могут предоставить возможность поиска и идентификации новых пептидных лигандов для рецептор-подобных киназ растений, а также других участников иммунной системы растений, однако существующие инструменты для этого все еще недостаточно развиты, поэтому важным является улучшение методик и разработка новых подходов.

Целью данного исследования является поиск и изучение эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа растений, на примере модельного растения *Physcomitrium patens*.

Для достижения поставленной цели мы сформулировали следующие **задачи**:

1. Аннотация белков-предшественников коротких секретлируемых пептидов (КСП) в геномах бриофитов;
2. Идентификация дифференциально экспрессирующихся КСП в транскриптом *P. patens* при заражении патогенами;
3. Функциональный анализ роли цистеин-богатого семейства пептидов RALF (Rapid Alkalinization Factors) в иммунном ответе *P. patens*;
4. Анализ внеклеточных пептидных пулов модельного растения *Physcomitrium patens* при индукции иммунного ответа;
5. Функциональный анализ роли новых эндогенных пептидов, образование которых индуцировано стрессом;

6. Изучение эволюционной консервативности пептидного иммунного сигналинга у сосудистых и несосудистых растений.

Научная новизна и практическая значимость исследования.

Биологически активные пептиды растений выполняют множество различных функций, однако их поиск, идентификация и функциональный анализ все еще являются сложной задачей. Мы разработали схему поиска не идентифицированных ранее семейств биоактивных пептидов, объединяющую несколько известных подходов: геномный, транскриптомный и пептидомный анализы. В ходе выполнения данной работы мы впервые провели биоинформатический поиск гомологов коротких секретлируемых пептидов покрытосеменных растений у пяти видов бриофитов. Было показано, что распределение количеств коротких секретлируемых пептидов разных групп у бриофитов отличается от такового у покрытосеменных. Количество найденных гомологов пептидов было меньше у бриофитов, чем у покрытосеменных. Это может как отражать разные стратегии регуляции иммунного ответа, используемые семенными и споровыми растениями, так и указывать на то, что существующие методы анализа нуждаются в доработке. Нами также было показано, что биотический стресс, такой как заражение патогенами, может индуцировать экспрессию генов предшественников коротких секретлируемых пептидов модельного растения - *P. patens*. Среди транскриптов, экспрессия которых повышается при заражении, многие были аннотированы как длинные некодирующие РНК, что показывает, что современный способ аннотации неточен и пропускает много потенциальных функциональных белков.

В ходе данного исследования мы впервые провели функциональный анализ одного из представителей известного семейства коротких секретлируемых пептидов, RALF, аннотированного в геноме модельного растения *P. patens*. Впервые была показана роль представителей данного семейства в ответе на биотический стресс у несосудистых растений.

Пептидомный анализ является одним из наиболее прямых методов идентификации эндогенных нативных пептидов, однако он недостаточно хорошо

развит для растений. Мы разработали методику пептидомного анализа для поиска кандидатов биоактивных пептидов в модельном растении *P. patens*, которая также может быть использована для других растений. Наш подход позволил нам выявить пептиды, обладающие возможным биоактивным потенциалом, выщепление которых из белков-прекурсоров было индуцировано стрессовыми факторами.

В ходе этой работы мы также синтезировали и провели функциональный анализ кандидатов биоактивных пептидов, идентифицированных в индуцированных стрессом пептидомах мха *P. patens*, и показали их возможную роль в иммунном ответе мха.

Помимо этого, в ходе нашего исследования мы впервые обнаружили гомологи рецепторов известного пептида PER - PEPR, найденного у многих видов покрытосеменных, в геноме мха *P. patens*. Мы также показали, что синтетические пептиды PER из *Arabidopsis thaliana* вызывали в клетках *P. patens* стрессовый ответ, схожий с тем, что наблюдается у покрытосеменных. Кроме того, было показано, что найденные гомологи рецептора PEPR мха могут участвовать в сигналинге этого пептида, хотя гомологов пептидов PER в геноме мха обнаружено не было. Полученные в ходе данного исследования результаты могут указывать на консервативность системы пептидного сигналинга растений и возможную роль этой системы в освоении растениями суши.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов с применением методов пептидомики, транскриптомики, геной инженерии и молекулярной биологии, а также в обработке и анализе полученных данных. Автор принимал участие в подготовке и написании публикаций и представлении результатов исследования на российских и международных конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Растения имеют консервативную систему пептидного сигналинга, компоненты которой обнаружены у споровых растений;
2. Стрессовые условия меняют внеклеточные пептидомы растений, стимулируя образование пептидов, обладающих биологической активностью;

3. Показана роль цистеин-богатого семейства пептидов RALF (Rapid Alkalinization Factors) в регуляции иммунного ответа растений, на примере мха *Physcomitrium patens*;
4. Найденные в геноме мха *P. patens* гомологи известного рецептора PEPR могут выполнять функции, схожие с рецепторами PEPR из покрытосеменных.

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены в стендовых и устных докладах на российских и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 134 страницах и содержит 16 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 229 источников.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

Статьи (знаком "" отмечены авторы, внесшие равный вклад):*

1. Mamaeva* A., **Lyapina* I.**, Knyazev A., Golub N., Mollaev T., Chudinova E., Elansky S., Babenko V., Veselovsky V., Klimina K., Gribova T., Kharlampieva D., Lazarev V., Fesenko I. RALF peptides modulate immune response in the moss *Physcomitrium patens*. *Front. Plant Sci.* 2023, 14:1077301.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1077301>
2. **Lyapina I.**, Ivanov V. and Fesenko I. Peptidome: Chaos or Inevitability. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222313128>
3. **Lyapina I.**, Filippova A., Kovalchuk S., Ziganshin R., Mamaeva A., Lazarev V., Latsis I., Mikhalchik E., Panasenko O., Ivanov O., Ivanov V., Fesenko I. Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. *Plant Mol Biol.* 2021 Mar 13. <https://doi:10.1007/s11103-021-01133-z>
4. **Lyapina I.**, Filippova A. and Fesenko I. The Role of Peptide Signals Hidden in the Structure of Functional Proteins in Plant Immune Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4343. <https://doi:10.3390/ijms20184343>
5. Fesenko, I., Azarkina, R., Kirov, I., Kniazev, A., Filippova, A., Grafaskaia, E., Lazarev, V., Zgoda, V., Butenko, I., Bukato, O., **Lyapina I.**, Nazarenko D., Elansky S., Mamaeva A., Ivanov V. and Govorun V. Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with antimicrobial activity in the Moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* 2019, 19, 9.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1611-z>
6. Filippova* A, **Lyapina* I.**, Kirov I, Zgoda V, Belogurov A., Kudriaeva A., Ivanov V., Fesenko I. Salicylic acid influences the protease activity and posttranslation modifications of the secreted peptides in the moss *Physcomitrella patens*. *J Pep Sci.* 2019;25:e3138. <https://doi.org/10.1002/psc.3138>

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Иммуниетет растений

1.1.1 Компоненты иммунной системы растений

Основой иммунитета растений служат патоген-распознающие рецепторы (или образ-распознающие рецепторы; ПРР), способные узнавать различные молекулярные структуры как патогенных организмов, так и сигналы, образующиеся при повреждении собственных клеток (рис. 1). Эта система имеет схожие черты с системой врожденного иммунитета посредством толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors (TLRs)) у животных [1, 2]. Среди лигандов, узнаваемых ПРР растений, выделяют полисахариды, пептидогликаны, липиды, пептиды, части клеточной стенки грибов, такие как хитин и олигогалактурониды, и некоторые другие. Такие молекулы называются патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (или структуры) (ПАМП) или микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (структуры) (МАМП).

1.1.1.1 Мембранные рецепторы и ко-рецепторы, участвующие в иммунном сигналинге

Семейство ПРР включает в себя рецептор-подобные киназы (РПК) и рецептор-подобные белки (РПБ), состоящие из внеклеточного, трансмембранного домена, а также внутриклеточного киназного домена, отсутствующего у рецептор-подобных белков. Структурно растительные рецептор-подобные киназы схожи с животными рецепторными тирозинкиназами [3]. На сегодняшний день описаны различные варианты внеклеточных доменов, участвующих в узнавании и связывании лигандов: лейцин-богатые повторы (Leucine rich repeats (LRR)), лизиновые мотивы (LysM), лектин и лектин-подобные мотивы, а также эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor (EGF))-подобные домены [4, 5]. Растительные рецептор-подобные киназы относятся к тому же классу киназ, что и белки из семейства Pelle у животных, к которым относятся в том числе INTERLEUKIN RECEPTOR-ASSOCIATED KINASEs [6]. Рецептор-подобные

киназы и белки с лейцин-богатыми повторами (LRR-РПК/РПБ) являются наиболее представленным семейством рецептор-подобных киназ. В геноме *Arabidopsis thaliana* было обнаружено более двух сотен генов LRR-РПК и LRR-РПБ, участвующих в различных процессах роста и развития, а также защиты от патогенов [7]. Подобная же картина наблюдается и в других покрытосеменных [8, 9]. На основе особенностей киназных доменов рецептор-подобные киназы принято разделять на 44 подсемейства [10]. Подсемейство LRR-РПК делится еще на 20 подгрупп, из которых группу IX составляет большая часть рецепторов, узнающих собственные растительные лиганды, а в группе XII состоят гены рецепторов патогенных элиситоров, такие как FLAGELLIN SENSITIVE2 (FLS2) и EF-Tu RECEPTOR (EFR) [8].

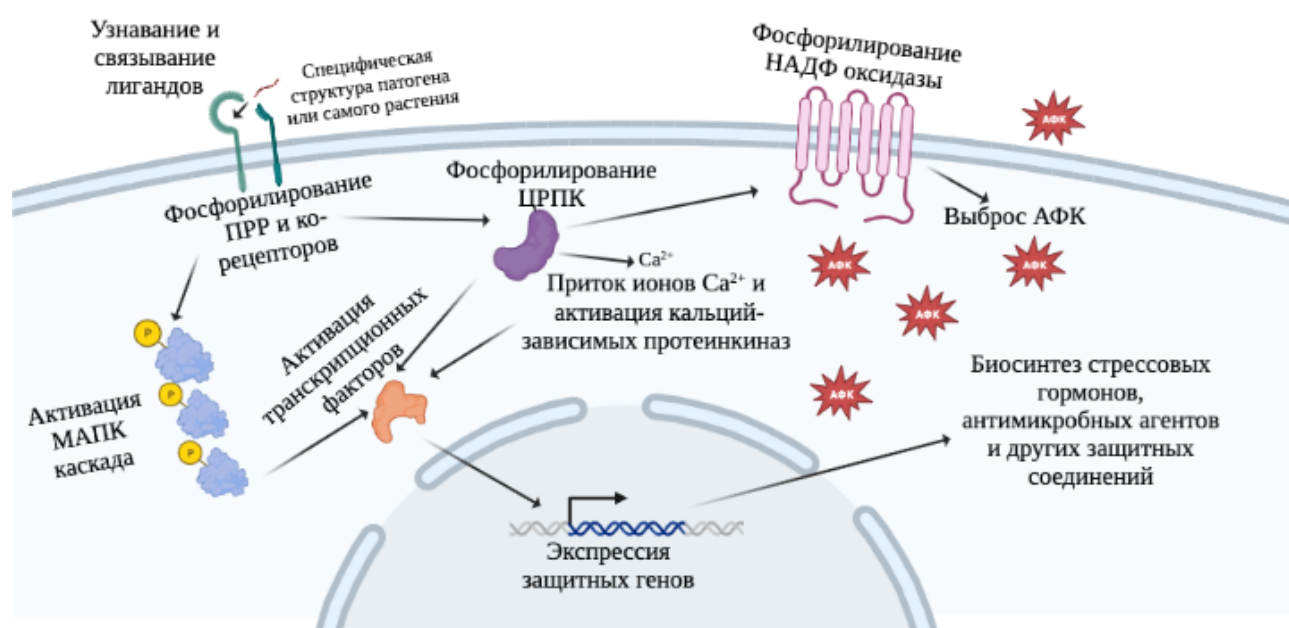


Рис. 1. Каскад реакций, происходящий в клетках растений в ответ на узнавание патогена или собственных молекул растения, вырабатывающихся в условиях стресса (иллюстрация создана с помощью BioRender.com).

Известно, что некоторые ПРР не вовлечены напрямую в узнавание лигандов, а действуют как ко-рецепторы, а иногда и негативные регуляторы иммунного сигналинга. К примеру, связывание пептида RAPID ALKALINIZATION FACTOR 23 (RALF23) с комплексом рецептор-подобных киназ CrRLK1L FERONIA (FER) и LORELEI-LIKE-GPI ANCHORED PROTEIN 1 (LLG1), приводит к препятствию

образования комплекса FLS2 и ко-рецептора BAK1 и узнаванию бактериального флагеллина [11, 12]. Самыми известными из изученных ко-рецепторов являются brassinosteroid-associated kinase (BAK)1/ SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)s, Suppressor Of BIR1-1 (SOBIR1), а также Chitin Elicitor Receptor Kinase (CERK)1 [13–15]. Эти ко-рецепторы очень консервативны практически у всех наземных растений.

1.1.1.2 Цитоплазматические участники иммунного сигналинга

Большая группа рецептор-подобных киназ растений лишена внеклеточного домена. Эти рецептор-подобные киназы называются цитоплазматическими рецептор-подобными киназами (ЦРПК), которые также делятся на подгруппы. Всего таких подгрупп у арабидопсиса было выявлено 17, и их принято обозначать римскими цифрами (от ЦРПК-II и ЦРПК-IV до ЦРПК-XIX) [6]. Хотя большинство ЦРПК состоят только из цитоплазматического киназного домена, есть и такие, которые также включают трансмембранные или внутриклеточные домены, схожие с паттерн-распознающими доменами рецептор-подобных киназ, такие как LRR, лектин, WD40 (повтор бета-трансдукция) и EGF домены [16]. Было показано, что за специфичность активируемого лигандом сигнального пути отвечают киназные домены рецептор-подобных киназ. Так при замене киназного домена рецептора brassinosterоидов Brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) на киназный домен иммунного рецептора XA21 при обработке brassinosterоидом в клетках риса химерные рецепторы инициировали именно иммунный ответ [17]. Однако дальнейшие участники сигналинга до недавнего времени оставались неизвестными. Исследования последних лет позволяют предположить, что одну из ключевых ролей в дальнейшей передаче сигнала от мембранных ПРР играют именно ЦРПК [16]. Взаимодействуя с рецептор-подобными киназами и белками напрямую или посредством какого-либо дополнительного механизма, ЦРПК регулируют практически все клеточные процессы, с помощью фосфорилирования митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК), а также независимым от МАПК путем активируя транскрипционные факторы для регуляции экспрессии нужных

генов или запуская другие физиологические ответы [16]. Члены подгруппы VII ЦРПК являются участниками защитного ответа, активируемого в ответ на узнавание ПРР патогенных или своих иммунных лигандов. Одними из распространенных примеров ЦРПК из этой подгруппы считаются киназы BOTRYTIS INDUCED KINASE1 (BIK1) и ее ближайший гомолог PBS1-LIKE1 (PBL1), участвующие в сигнальных путях таких рецептор-подобных киназ, как FLS2, LYSINE MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5), EFR, а также PEP RECEPTORS 1 и 2 (PEPR1/2) [18–20]. Кроме того, был проведен фенотипический анализ мутантов по некоторым генам семейства VII киназ ЦРПК у арабидопсиса, показавший как общую, так и строго определенную роль каждой рецептор-подобной киназы в активации различных иммунных ответов [21].

Одним из показанных субстратов для ЦРПК VII подгруппы является НАДФ оксидаза RESPIRATORY BURST ORTHOLOG D (RBOHD), что связывает узнавание рецептор-подобной киназой лиганда и последующий выброс активных форм кислорода (АФК), который является одним из индикаторов активации иммунного ответа у растений [22]. Также увеличение концентрации ионов кальция Ca^{2+} в цитоплазме связано с иммунным сигналингом и, как было показано, регулируется ЦРПК [23]. Кроме того, изменения концентраций других ионов при детекции патогенных элиситоров, регулируемые ЦРПК, приводят к деполяризации плазматической мембраны, закрытию устьиц и другим защитным реакциям [24, 25].

1.1.1.3 Внутриклеточные рецепторы, связанные с иммунитетом

Еще одними участниками системы иммунитета растений являются так называемые гены резистентности (R), кодирующие семейство внутриклеточных рецепторов с нуклеотид-связывающим и LRR доменами - Нод-подобные рецепторы (НПР). Патогены, атакующие растения, научились обходить или подавлять защитный сигналинг, запускаемый после активации ПРР. Для этого они секретируют молекулы эффекторов в клетки растений, целью которых являются компоненты защитных сигнальных каскадов ПРР. Эти эффекторы и узнаются

белками НПР, которые в свою очередь запускают каскады своих защитных реакций, включающих активацию защитных генов, выброс молекул АФК, а также запрограммированную клеточную смерть [26]. НПР могут не взаимодействовать с эффекторами патогенов напрямую, вместо этого они «охраняют» ключевых участников сигнальных путей ПРР, таких как, например, ЦРПК, или связаны с молекулами-приманками, имитирующими их. Таким образом, при изменении в белках, находящихся под их охраной, НПР активируются и запускают свои защитные каскады [27].

1.1.1.4 Лиганды клеточных рецепторов, участвующие в иммунном сигналинге

До недавнего времени эндогенные пептиды, синтезирующиеся в клетках растений, не включали в общую схему иммунной системы. Однако последние данные показывают, что такие пептиды, которые также называют фитоцитокнины по аналогии с цитокинами животных, играют важную роль в иммунном ответе растений [28].

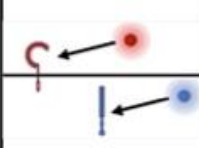
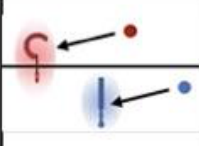
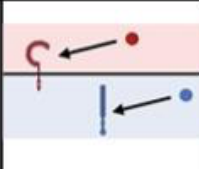
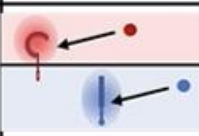
Пептидные эндогенные лиганды, узнаваемые рецептор-подобными киназами и белками, находятся в фокусе внимания исследователей в последние годы. Такие сигнальные пептиды, как у животных, так и у растений, активируют каскады биохимических реакций в клетках и индуцируют экспрессию соответствующих генов, могут участвовать в различных процессах от роста и развития до формирования ответа на стрессовые воздействия [29, 30]. Эти пептиды были найдены у многих видов растений, они входят в группу коротких секретлируемых пептидов (КСП) [31]. Было показано, что их белки-прекурсоры чаще всего имеют длину до 250 аминокислот, а также консервативные участки последовательностей, предсказанные на основании анализа многих геномов [32–35]. Одной из хорошо изученных систем пептидного сигналинга в иммунитете растений является растительный элиситорный пептид (PEP) и его рецептор PEPR, обнаруженные у многих покрытосеменных [36–38]. Хотя последовательности пептидов этой группы значительно различаются у разных семейств растений, в которых они были

найденны, было показано, что дальнейший сигналинг достаточно консервативен даже у тех видов, в которых не было обнаружено пептидов PEP и их рецепторов [38]. Было показано, что в осуществлении сигнального каскада PEP у Арабидопсиса участвуют кроме того ко-рецепторы ВАК1, ЦРПК ВК1, а также МАП-киназы, в частности МРК3, 6, 4/11 [13, 39]. Гомологи рецептор-подобных киназ разных типов, а также ключевых МАП-киназ, участвующих в иммунном сигналинге данного типа, были найдены в том числе и в геномах бриофитов, указывая на потенциальную консервативность такого типа сигнального пути [40].

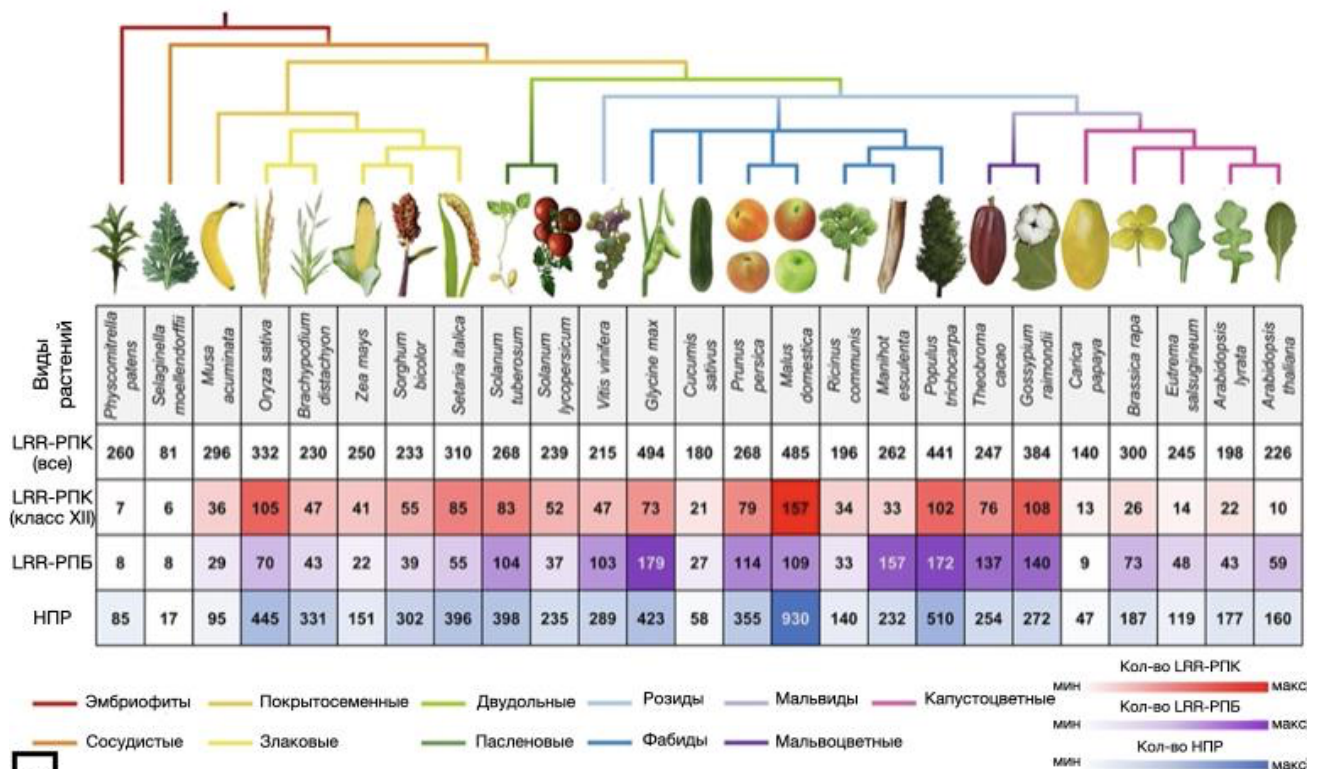
Другим известным примером растительных пептидов, вовлеченных в иммунный сигналинг, является группа пептидов САРЕ, выщепляющихся из функционально активных предшественников - С-концевого участка белков, связанных с патогенезом (PR-1b), впервые найденная у томатов [41, 42]. Пептиды этой группы имеют узнаваемый консервативный мотив R*GN*****PY, который так же был обнаружен у пептидов этой группы из других видов [43].

Кроме того, эндогенные растительные пептиды могут участвовать также в негативной регуляции иммунного ответа, как, к примеру, пептид из семейства RALF - RALF23 [11, 12].

Перекрывающиеся и взаимосвязанные пути и участники иммунной системы растений, а также постоянная коэволюция защитных и атакующих компонентов растений и патогенов привели к появлению множества моделей, описывающих растительный иммунитет (рис. 2 А).

Модели иммунитета	Определение		Преимущества	Недостатки
ПАМП-активируемый иммунитет (ПАИ)/ Эфektor-активируемый иммунитет (ЭАИ)	Определяется типом молекул, запускающих иммунный ответ		Разделяет элиситоры и разграничивает аутоиммунитет и иммунитет, индуцированный патогенами	Не может объяснить ответ на элиситоры, классифицирующиеся и как ПАМП, и как эфektorы
PRR-опосредованный иммунитет/ NLR-опосредованный иммунитет	Определяется типом рецепторов, проводящих иммунный ответ		Разделяет рецепторы и разграничивает элиситоры, классифицирующиеся и как ПАМП, и как эфektorы (1)	Не разделяет аутоиммунитет и иммунитет, индуцированный патогенами
Внеклеточный иммунитет/ Внутриклеточный иммунитет	Определяется локацией, в которой активируется иммунный ответ		Может применяться для иммунных ответов, которые не были активированы PRR или NLR (например, микроРНК) (2)	Не разделяет рецепторы и не разграничивает аутоиммунитет и иммунитет, индуцированный патогенами
Иммунитет, опосредованный поверхностными рецепторами/ Иммунитет, опосредованный внутриклеточными рецепторами	Определяется местоположением иммунных рецепторов, проводящих ответ		(1) и (2)	Не разделяет аутоиммунитет и иммунитет, индуцированный патогенами

A



B

Рис. 2. А – Различные модели иммунитета, определения, преимущества и недостатки, представленные в виде таблицы; В – Эволюция компонентов иммунной системы растений. Показаны количества LRR-PPK, LRR-PPB и NLR у разных видов растений (адаптировано из статьи Ngou et al. [44]).

1.1.2 Различные модели иммунитета растений

Одной из первых предложенных моделей иммунитета растений была модель «ген-на-ген», предполагающая, что для определения результата взаимодействия патогена и растения важны лишь одиночные гены с каждой стороны: определенный ген устойчивости к патогену у растения и соответствующий ему ген вирулентности у патогена [45]. Эта модель дала толчок и направила последующие исследования иммунитета, которые открыли более сложную картину взаимоотношений патогенов и растений. Благодаря последним достижениям молекулярной биологии были открыты многочисленные компоненты иммунной системы растений, было показано, что иммунитет растений представляет собой сложную многоуровневую систему.

Растения на протяжении жизни сталкиваются с множеством патогенов, но для того, чтобы заболевание успешно развилось, патогену необходимо избежать узнавания рецепторами растений или подавить иммунную реакцию. В эволюционной биологии такой тип взаимодействий называется принципом Красной Королевы – жертва эволюционирует, чтобы избежать смерти, хищник эволюционирует, чтобы атаковать жертву [46]. В иммунитете растений данная модель коэволюции патогенов и растений носит название «Зиг-заг» модели [47].

Иммунные реакции, активируемые при узнавании лигандов патогенов мембранными рецепторами ПРР, объединены под названием иммунитет, активируемый ПАМП, или ПАИ (ПАМП-активируемый иммунитет) [48, 49]. ПАИ можно назвать первичным барьером на пути патогена, в результате его активирования происходят сложные физиологические изменения, позволяющие растению противостоять патогену, такие как приток ионов Ca^{2+} , выброс АФК, активация экспрессии защитных генов и синтеза сигнальных и антимикробных молекул, а также изменения в клеточной стенке и плазматической мембране [50]. Реакции, активируемые узнаванием патогенных эффекторов или изменениями в молекулах-мишенях, атакуемых этими эффекторами, называются иммунитетом, активируемым эффекторами, или ЭАИ (эффектор-активируемый иммунитет), и чаще всего ЭАИ контролируется внутриклеточными рецепторами НРР [47].

Рецепторы НПР “охраняют” ключевых участников иммунного сигналинга внутри клетки или молекулы-приманки, имитирующие их [27]. Активация ЭАИ также ведет к активации защитных генов и синтезу защитных молекул, а также увеличению концентрации АФК и Ca^{2+} , однако отличительной чертой является запуск реакции сверхчувствительности и разрушение инфицированных клеток [51]. Эти термины используются в теме растительного иммунитета по сей день (рис. 2 А).

Исследования последних лет показали, что модели иммунной системы, описанной в рамках ПАИ и ЭАИ, может быть недостаточно для охвата всех реакций, происходящих в клетках растений при атаке патогенов (рис. 2 А). Так, к примеру, выяснилось, что структуры, узнаваемые рецепторами ПРР, могут иметь различное происхождение, не только микробное, но и от растительноядных насекомых или даже паразитических растений, а также лиганды могут синтезироваться в самом растении-хозяине [52]. Так изначальная расшифровка ПАИ изменилась на иммунитет, активируемый “паттернами” – молекулярными структурами различного происхождения. Кроме того, оказалось, что эффекторы патогенов способны путешествовать по апопласту и быть узнаваемыми некоторыми рецептор-подобными белками [53]. Таким образом, появилась необходимость в новых моделях иммунитета растений. Была предложена модель, основанная на типе рецепторов, узнающих патогенные молекулы – ПРР-опосредованный иммунитет и НПР-опосредованный иммунитет (рис. 2 А) [54]. Также были предложены модели, основанные на локализации иммунной реакции или узнающего рецептора, а именно внеклеточный и внутриклеточный иммунитет (рис. 2 А) [55] и иммунитет, опосредованный поверхностными рецепторами или внутриклеточными рецепторами (рис. 2 А) [56]. Минусами новых моделей является их неспособность разграничить реакции, вызванные патогенными молекулами и собственными растительными факторами (рис. 2 А) [9].

1.1.3 Эволюция иммунитета растений

На данный момент в геномах покрытосеменных растений идентифицировано множество генов, кодирующих рецептор-подобные киназы, однако функции большинства из них все еще до конца не изучены (рис. 2 В) [57]. Также гены LRR-РПК были обнаружены в геномах бриофитов, хотя и в меньшем количестве (рис. 2 В) [8]. На сегодняшний день мало данных об эволюции рецепторного репертуара и регуляторных иммунных пептидов у наземных растений. В связи с этим все большее внимание уделяется модельным организмам с более простой организацией генома для исследования функций отдельных компонентов иммунного ответа, обладающих высокой консервативностью среди растений [58].

На сегодняшний день данных о механизмах и компонентах сигнальных путей у рано дивергировавших в процессе эволюции представителей высших растений, таких как мох *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*, очень мало. К примеру, у *P. patens* был обнаружен функциональный гомолог LysM-РПК CERK1, узнающий молекулы хитина грибов [40, 59]. Однако генов распространенных у покрытосеменных рецепторов бактериальных лигандов, таких как узнающий флагеллин FLS или узнающий фактор элонгации Tu EFR, у мха *P. patens* найдено не было [40]. Вероятно, рецепторы CERK были вовлечены в узнавание микроорганизмов у последнего общего предка всех растений [60]. Было показано, что каноничная структура рецепторов рецептор-подобных киназ впервые сформировалась после появления наземных растений, при этом в водорослях существуют только зачатки подобной сигнальной системы [61]. В то же время у модельного объекта *Arabidopsis thaliana* известно более 225 LRR-РПК, участвующих в различных процессах от роста и развития до формирования иммунного ответа (рис. 2 В) [7]. С чем связано значительное расширение рецепторного репертуара у покрытосеменных растений, механизмы возникновения пар лиганд-рецептор, а также происхождение лигандов из группы фитоцитокинов практически неизвестно. Учитывая, что секретом растений содержит большое количество пептидов, а представленность некоторых из них регулируется стрессовыми гормонами [62–64], можно предположить, что часть этих пептидов

может выступать в качестве лигандов для LRR-РПК, участвуя в иммунном сигналинге.

Лигандами для рецептор-подобных киназ часто выступают пептиды. Различные группы коротких секретлируемых пептидов (КСП), хоть и отличаются высоким разнообразием, имеют сходные паттерны в своих последовательностях, а также сходный механизм дальнейшего пути сигналинга. Это сделало поиск и предсказание функциональных кандидатов таких пептидов в геномах растений широко распространенной задачей [31–35]. Известно, что у водорослей не было обнаружено системы пептидного сигналинга, что позволяет сделать предположение о наличии связи между процессом выхода растений на сушу и зарождением пептидного сигналинга [61]. Как конкретно происходит данный сигналинг, как эволюционируют его компоненты, насколько они консервативны – все эти вопросы активно изучаются в настоящее время. На сегодняшний день известны несколько пептидов, которые участвуют в стрессовом сигналинге, так называемые фитоцитокнины. Они входят в группу коротких секретлируемых пептидов (КСП), обнаруженных у большинства покрытосеменных [31]. Например, растительные пептидные элиситоры PEP принадлежат семейству КСП и выщепляются из 92-аминокислотных белковых предшественников. Впервые выделенный из *Arabidopsis thaliana* AtPep1, состоящий из 23 аминокислот, распознается рецепторами PEPR1 и PEPR2 [36, 37]. Этот пептид индуцирует сигнальный каскад, включающий генерацию апопластных АФК, подщелачивание апопласта, активацию каскада MAP-киназ, повышение уровня цитозольного Ca^{2+} и экспрессии защитных генов. Узнавание PEP рецептором, как и индуцированный молекулярными структурами, связанными с патогеном, – ПАМП – синтез защитных фитогормонов амплифицируют распространение и передачу сигнала [65]. Возможные гомологи известных КСП были предсказаны в геномах бриофитов, однако, гомологов PEP на сегодняшний день обнаружено не было [64]. Данных об эволюции пептидных сигналов и соответствующих рецепторов все еще очень мало, а предсказание новых кандидатов КСП и их поиск в пептидомах растений может представлять практический интерес.

Исследования компонентов иммунного ответа позволяют предполагать консервативность данной системы среди растений. Например, растения томата и табака, экспрессирующие чужеродный ген рецептора EFR из *Arabidopsis thaliana*, демонстрировали узнавание бактериальных лигандов elf18, отсутствующее в диком типе. При этом не наблюдалось угнетения роста или конкуренции за связываемость с рецепторами других ПАМП [66]. Трансформация риса и пшеницы геном данного рецептора под контролем конститутивного промотора также показала успешный перенос устойчивости к соответствующей группе патогенов, от двудольных к однодольным [67, 68]. Помимо этого, ген рецептор-подобной киназы FLS2 из *Nicotiana benthamiana* (NbFLS2) был экспрессирован в сладком апельсине Hamlin и цитранже Carrizo [69]. Трансгенные линии, сверхэкспрессирующие NbFLS2, получали устойчивость к *Xanthomonas citri*. Также были проведены другие исследования по переносу рецептор-подобных киназ и белков из растений-доноров в реципиенты, в которых эти рецептор-подобные киназы/белки отсутствуют, с последующим приобретением этими растениями устойчивости к соответствующему патогену [70–72]. Эти исследования показывают общность принципов иммунного ответа среди различных групп растений, филогенетически отстоящих друг от друга. Также исследования показывают, что постепенное усложнение сигнальных путей и добавление специфических компонентов иммунного сигналинга в процессе эволюции, вероятно, привело к различиям в стратегиях защиты от патогенов у различных растений [73]. Из всего вышесказанного следует, что в области изучения консервативности и эволюции компонентов иммунного сигналинга, таких как рецептор-подобные киназы и их лиганды, в частности, пептиды, все еще много белых пятен и эта проблема является актуальной для современной биологии.

Связывание регуляторных пептидов рецепторами на поверхности клеточных мембран ведет к активации ко-рецепторов, MAPK-каскадов, а также к индукции транскрипции защитных генов. Схожесть паттернов ключевых компонентов иммунной системы у различных филогенетических таксонов позволяет использовать для изучения более простые и удобные модели, такие как мох

Physcomitrium patens, и применять полученные знания на более продвинутых сельскохозяйственно значимых объектах. В частности было показано, что защитные молекулы, такие как белок, связанный с патогенезом, PR-10, из мха *Physcomitrium patens* могут повышать устойчивость к патогенам в покрытосеменных [74].

1.2 Биоактивные пептиды растений

Со времени открытия способа синтеза и выделения пептидов в лабораторных условиях множество пептидов млекопитающих и бактерий уже были показаны в качестве сигнальных соединений, однако первый сигнальный пептид растений, системин, был открыт только в 1991 году [75]. За последние годы были открыты еще несколько биоактивных пептидов растений, и предполагается, что их число продолжит расти. Было показано, что пептиды в растениях выполняют множество функций от регулирования роста и развития наравне с известными гормонами непептидной природы до участия в формировании ответа на действие стрессовых факторов окружающей среды.

В результате продолжительных исследований многих групп ученых по всему миру было установлено, что в растительных клетках пептиды, обладающие биологической активностью, могут образовываться несколькими путями: из нефункциональных белковых прекурсоров, из функциональных белков и в результате непосредственного синтеза на рибосомах. В своем обзоре 2015 года Тавормина отмечает, что большинство известных сигнальных пептидов растений генерируются в результате направленного протеолиза неактивных белков-прекурсоров с последующими пост-трансляционными модификациями. Белки-прекурсоры, имеющие в своем составе сигнал экспорта на N-конце, проходят через эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и на своем пути - или уже в аппарате Гольджи - подвергаются процессингу, с добавлением всех необходимых зрелому пептиду пост-трансляционных модификаций [76]. Несколькими исследователями было выдвинуто предположение, что секретируемые пептиды могут перемещаться во внеклеточное пространство с помощью пассивной диффузии [77, 78]. Кроме

того, было показано, что в результате работы протеолитической машины растительных клеток в них накапливаются фрагменты функциональных белков собственных клеток растений, а иногда и клеток патогенных организмов. Совокупность этих пептидных «осколков» в своей работе 2008 года Фаррохки называет протеолитическим деградомом [79]. Дальнейшие эксперименты позволили выяснить, что этот деградом также может быть источником биологически активных пептидов, таких как, например, инсептин, являющийся фрагментом хлоропластной АТФ-синтазы китайской вигны (*Vigna unguiculata*) и выщепляющийся с помощью протеолитических ферментов травоядной личинки кукурузной листовой совки, как показано в исследовании Шмельца с коллегами в 2006 году [80], или пептиды GmSubPep и GmPep914, выщепляющиеся у сои (*Glycine max*) из субтилизин-подобных протеаз, которые описываются в работах Пирса и Ямагучи с коллегами от 2010 и 2011 годов [65, 81]. Хотя наши знания о механизмах формирования внутриклеточных и внеклеточных пептидных пулов на настоящий момент все еще остаются весьма ограниченными, последние данные указывают на то, что протеолитическая машина клетки, а также внеклеточные протеазы реагируют на стрессовые условия путем повышенной деградации белков. Было установлено, что характер и количество протеолитических событий находятся в непосредственной зависимости от условий, в которых находится растительный организм [82–84].

Также в работе Ханады 2013 года, а также других исследователей было показано, как с помощью современных подходов идентификации пептидов с помощью масс-спектрометрии и биоинформатического анализа были обнаружены биоактивные пептиды, которые транслируются напрямую с коротких открытых рамок считывания (менее 100 кодонов) [85]. Хотя точный механизм индукции генерации таких пептидов еще не изучен до конца, было достоверно показано, что белки-прекурсоры не принимают в этом процессе участия.

По своему действию пептиды, участвующие в иммунном сигналинге растений, могут делиться на четыре группы: пептиды от патогенных организмов, запускающие иммунные сигнальные каскады у растений (такие как фрагменты

флагеллина (flg22) и термонестабильного фактора элонгации (elf18)); пептиды-регуляторы роста, образующиеся в самом растении и отвечающие за регулирование физиологических процессов, происходящих в клетках как во время стресса, так и в нормальных условиях; фитоцитокнины, выщепляющиеся в стрессовых условиях и помогающие амплифицировать и распространить сигнал об опасности среди неповрежденных клеток растения; а также антимикробные пептиды, напрямую воздействующие на патогенные организмы при инвазии (рис. 3).

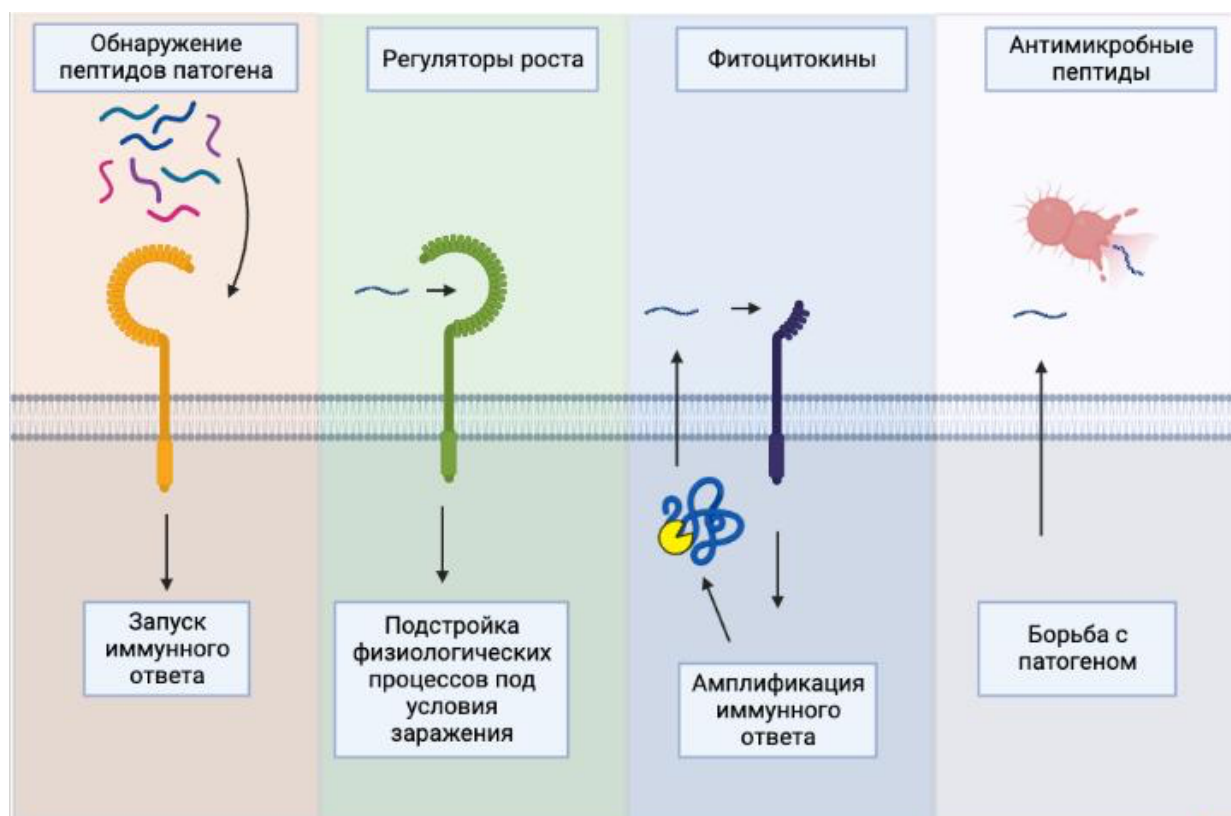


Рис. 3. Функциональные группы биоактивных пептидов (иллюстрация создана с помощью BioRender.com).

1.2.1 Регуляторы роста

Примерами пептидов-регуляторов роста могут служить фитосульфакин (PSK), который индуцирует дедифференциацию и пролиферацию клеток и кроме того обладающий антипатогенной активностью, SCR/SP11 (S-locus cysteine rich protein/ S-locus protein 11), регулирующий самонесовместимость пыльцы, Clavata (CLV), участвующий в регуляции роста апикальных меристем стебля, а также CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-RELATED (CLE),

стимулирующий закрытие устьиц в условиях засухи, и другие [79, 86]. Некоторые из открытых пептидных сигналов являются консервативными для множества различных видов растений, другие же оказались видоспецифичны, что отличает их от классических гормонов растений. В связи с этим было решено, что сигнальные пептиды не корректно относить к обычным фитогормонам, однако термин «пептидный гормон» или «гормон пептидной природы» является довольно распространенным среди исследователей.

Так же как у животных, большинство сигнальных пептидов растений являются лигандами рецептор-подобных киназ. Исследователями было показано, что, будучи признанными рецепторами, сигнальные пептиды активируют каскады биохимических реакций в клетках растений, включая фосфорилирование белков, и индуцируют экспрессию соответствующих определенному сигнальному пути генов [29, 30]. В своих работах Краузе с коллегами, а также Де Конинк с коллегами, как и многие другие исследователи указывают, что многие пептиды имеют в своем составе сигнальную последовательность, так как для выполнения своих функций им необходимо секретироваться во внеклеточное пространство [77, 87]. Примерами таких пептидов, секретлируемых клеткой во внеклеточное пространство, могут служить CLAVATA 3 (CLV3)/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE) и C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP), а также цистеин-богатые пептиды, такие как RAPID ALKALINIZATION FACTOR (RALF), контролирующие процессы роста и развития, деления и дифференциации клеток [76, 77].

1.2.2 Фитоцитокины

Пептиды, относящиеся к фитоцитокинам, также чаще всего секретированы во внеклеточное пространство и связываются определенным рецептором, чтобы запустить соответствующий иммунный сигнальный каскад [28]. Уровень экспрессии генов прекурсоров этих пептидов часто повышается в ответ на узнавание патогенов рецепторами растений, что приводит к усилению иммунного ответа. Примером могут служить ПАМП-индуцируемые секретлируемые пептиды

PIP. Уровень экспрессии генов их прекурсоров заметно повышался при обработке растений арабидопсиса пептидами патогена *elf18* и *flg22* [88]. Похожим образом ведут себя гены прекурсоров богатых серином эндогенных пептидов SCOOP в условиях биотического и абиотического стресса у арабидопсиса [89]. Другим примером являются элиситорные пептиды растений PER, только в этом случае при изменении концентрации ионов Ca^{2+} в ответ на инвазию патогена или поранение белок-прекурсор пептида PER, находящийся в вакуоли, гидролизуется метакаспазой и созревший пептид секретируется во внеклеточное пространство [90, 91]. Обработка синтезированными пептидами PIP, SCOOP и PER растений показала, что они активируют схожие сигнальные каскады, что и пептиды патогенов [88, 92, 93].

Пептидные семейства, чьи представители относятся к группе фитоцитокинов, часто бывают довольно многочисленны, а сами пептиды из одного семейства могут выполнять очень отличающиеся или даже противоположные функции в растениях. Примером тому могут служить пептиды семейства RALF, о которых говорилось выше. Помимо участия в ростовых процессах некоторые пептиды RALF регулируют процессы, связанные с иммунитетом [94]. На арабидопсисе было показано, что пептид *AtRALF17* повышает накопление молекул АФК, индуцированное патогеном, а также устойчивость к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, а *AtRALF23* имеет противоположный эффект, выражающийся в ингибировании накопления молекул АФК [11].

1.2.3 Антимикробные пептиды

Одной из наиболее широко известных групп пептидов являются антимикробные пептиды. Эти пептиды были найдены практически во всех живых организмах, однако у растений они эволюционировали немного другим путем [95]. Антимикробные пептиды растений чаще всего представляют собой небольшие цистеин-богатые белки, выщепляющиеся из прекурсоров [96]. К ним относят тионины, дефензины, гевеин-подобные пептиды, кноттины, а также белки переноса липидов и некоторые другие [95]. Многие из антимикробных пептидов растений

имеют общие черты с антимикробными пептидами других организмов, например, животных [95].

Антимикробные пептиды представляют собой важный иммунный барьер, способный бороться с атакующими патогенами. Многие из антимикробных пептидов проявляют активность против нескольких видов микроорганизмов, не только фитопатогенных, однако формально среди представителей этой группы выделяют антибактериальные, противогрибные и пептиды, активные против паразитов человека, против насекомых и так далее [97, 98]. В основе действия антибактериальных и противогрибных пептидов лежат особенности их структуры и аминокислотного состава, позволяющие им взаимодействовать с клеточной мембраной патогена, образуя в ней поры и увеличивая проницаемость [97]. Было показано, что амфифильность и наличие мотивов с положительно заряженными аминокислотами являются необходимыми чертами для проявления антибактериальной активности пептидных последовательностей [97]. Для противогрибных пептидов отличительной чертой является особое расположение полярных и нейтральных аминокислот [97]. Однако ни для одной из этих групп не были обнаружены более четкие и консервативные мотивы, как у многих фитоцитокинов [76, 97, 98].

1.3 Методы анализа биологически активных пептидов растений

1.3.1 Методы поиска и идентификации пептидов

Учитывая низкую концентрацию пептидов в клетках, а тем более во внеклеточном пространстве, а также сложность их экстракции для растений, особенно по сравнению с другими организмами, пептиды по-прежнему остаются малоизученными компонентами протеома растительной клетки, и методы и стратегии их изучения являются актуальной темой для исследователей в этой области, начиная с первого упоминания пептидов.

Поиском, анализом и идентификацией пептидов занимается сравнительно новая дисциплина - пептидомика. Это направление является довольно молодым, и, в отличие от давно проверенной протеомики, методы анализа пептидов на сегодняшний день все еще недостаточно развиты. В последние годы для этих целей используется технология LC-MS/MS позволяющая с высокой точностью детектировать последовательности эндогенных пептидов. С помощью современных биоинформатических подходов возможно предсказать потенциал биологической активности идентифицированных последовательностей, а также оценить количественные и качественные характеристики эндогенных пептидных пулов организмов.

1.3.1.1 Методы масс-спектрометрии в пептидомном анализе

Пептидомика — это научно-практическая дисциплина, включающая методы изучения пептидома, - что, в свою очередь, означает совокупность естественно образующихся пептидов в клетках или внеклеточном пространстве живых организмов, - а также теоретическое обоснование применяемых методик и биологическое приложение получаемых результатов. В исследованиях в рамках современной пептидомики используются такие технологии, как высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) как инструмент разделения и масс-спектрометрия (MS), или в последнее время чаще тандемная масс-спектрометрия (MS/MS), как инструмент идентификации молекул образцов. Благодаря особенностям самой технологии обнаружения молекул в масс-спектрометрическом анализаторе стало возможным отказаться от предыдущей стратегии идентификации пептидов по их биологической функции. Кроме того, не имея почти никакой начальной биологической информации об образце, с помощью масс-спектрометрического анализа возможно идентифицировать каждый отдельный пептид в любой смеси и узнать его структуру.

Впервые высокоэффективную жидкостную хроматографию с последующим масс-спектрометрическим анализом в качестве подхода для обнаружения биологически активных пептидов в организмах предложил использовать Дезидерио с коллегами в 1981 году [99]. Они показали возможность новой

методики обнаруживать и количественно оценивать вещество, находящееся в чрезвычайно низких концентрациях в биологических образцах, в частности, исследователи нашли пикомоли эндогенных коротких пептидов, образующихся естественным путем в тканях организма. Несмотря на очевидное преимущество новой технологии и важность получаемых результатов, прошло не меньше двадцати лет, прежде чем ее выделили в отдельную дисциплину под названием «пептидомика». Сам этот термин представляет собой сокращенную форму выражения «пептидная протеомика», поскольку эти области тесно переплетены, однако между ними существуют значительные различия, которые выражаются не только в функциональных и физико-химических различиях изучаемых молекул, но и в отличиях между способами их идентификации в рамках одного и того же применяемого метода - масс-спектрометрического анализа. Именно стремительный расцвет этой основной технологии, в отличие от не менее важных, но медленнее развивающихся методов, как хроматография или электрофорез, и позволило выделить пептидомику в отдельную дисциплину, базирующуюся на стратегии «сначала пептид - затем функция», а не наоборот, как было прежде. Дальнейшее развитие масс-спектрометрии получила после изобретения электроспрея и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) в качестве методов анализа ионов в конце 1980-х годов [100, 101]. С помощью этих анализаторов удалось отойти от привычной для протеомики стратегии идентификации олигопептидов «снизу-вверх» и осуществить пептидомный анализ «сверху-вниз», добавив также тандемную масс-спектрометрию (MS/MS), как в протеомных исследованиях, и практически полностью заменив им принятый прежде метод определения последовательности по Эдману [102–104].

Главным отличием обоих этих подходов в свою очередь является натуральное состояние молекул в пептидомных исследованиях, которые ставят перед собой цель выделить и детектировать именно эндогенные пулы пептидов - то есть именно в том виде, в котором они существуют в биологических образцах, из которых выделены, - тогда как протеомика использует искусственное

расщепление нативных белков протеазами с известными сайтами разрезания, такими как трипсин, и последующей автоматической сборкой этих фрагментов. Преимущество изучения нативных молекул заключается в том, что это позволяет проанализировать все пост-трансляционные модификации, такие как определенные сайты разрезания протеазами, модификации отдельных аминокислот, иногда существование третичной структуры (дисульфидные мостики), что, как было сказано прежде, является одной из характерных особенностей гормонов пептидной природы, а также позволяет установить вероятность существования различных форм пептидов от одного и того же белкового прекурсора. Хотя все эти возможности делают пептидомные исследования, основанные на масс-спектрометрическом анализе, значительно сложнее, по сравнению с протеомикой. Не говоря о выделении и подготовке образцов, детекция и последующее сопоставление с базой белковых прекурсоров для идентификации представляют из себя сложную задачу для эндогенных пептидов, из-за широты варьирования их физико-химических свойств и неоднозначных результатов противопоставления белкам-предшественникам ввиду отсутствия хорошо узнаваемых «концов», образующихся при вырезании известной протеазой, как в случае с протеомными исследованиями. Эти сложности привели к необходимости «ручного» анализа полученных данных в пептидомных исследованиях, а в следствие к развитию инструментов для автоматизации данного процесса, таких как биоинформатика.

Как уже говорилось, пептидомика вышла на передний план благодаря изобретению таких методов анализа нативных пептидов, как MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) или ESI (ионизация распылением в электрическом поле) масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Они прочно вытеснили используемый ранее методы получения ионов путем бомбардировки быстрыми атомами (FAB), а также ионной эмиссии из плазмы и в электрическом поле [105–107]. Особенностью всех этих методов является то, что они требуют наномолярных количеств анализируемых веществ и сравнительно долгое время измерения масс/зарядов, ведь, чем больше

изучаемая молекула, тем сложнее ее ионизировать и испарить для дальнейшего прохождения через анализатор масс-спектрометра и при этом не нарушить ее естественного состояния [108, 109]. Как уже отмечалось выше несмотря на то, что пептидомика и протеомика тесно связаны друг с другом, существуют принципиальные различия между аналитическими методами идентификации белков и пептидов. Методы анализа протеома основаны на намеренном расщеплении белков с помощью специфических ферментов, что позволяет получить известные “концы” пептидов, и это как раз напрямую связано с озвученными ограничениями ионизаторов масс-спектрометров. Для анализа нативного пептидома, однако, подобные меры не требуются, и после выделения образцы непосредственно можно идентифицировать с помощью масс-спектрометрии. В клетках и внеклеточном пространстве пептиды уже содержатся в наномолярных концентрациях, к тому же они процессируются из больших белковых прекурсоров. Учитывая то, что ранние масс-спектрометрические анализаторы имели достаточно низкое разрешение по сравнению с современными аналогами, только низкомолекулярные пептиды идентифицировались с высокой точностью масс. Все эти особенности сделали масс-спектрометрический анализ центральной технологией областей исследований в пептидомике.

Одной из важных движущих сил в развитии пептидомных технологий стало развитие методов аналитической химии. Как уже отмечалось, пептиды в биологических образцах находятся в очень низких концентрациях и сами они представляют собой небольшие молекулы, так что технологии для их детекции и идентификации должны обладать достаточно высокой чувствительностью. Кроме того, важнейшими стадиями пептидомных исследований, от правильности и успешности проведения которых во многом зависит успех всего анализа, являются выделение и подготовка образца перед масс-спектрометрическим анализом. Для выделения низкомолекулярных соединений из сложных смесей обрели популярность благодаря своему удобству такие технологии разделения и очистки, как высокоэффективная жидкостная хроматография в различных средах, например, обращенно-фазовая или ионообменная хроматография [110, 111]. Позднее оба

метода стали использовать в комплексе при создании масс-спектрометрического оборудования [112–114]. Таким образом, общепринятый метод очистки белков в протеомике, использующий разделение молекул в полиакриламидном геле под действием электрического поля по массе, называемый электрофорез, оказался совершенно не применим к пептидомным исследованиям, так как молекулярная масса пептидов слишком низкая для определения с высокой точностью таким методом. И, хотя протеомные и пептидомные технологии достаточно близки по своей сути, все же прямое приложение уже существующих и быстро развивающихся методик изучения протеомов было нецелесообразным и методики нуждались в предварительном корректировании, прежде чем их можно было использовать для новых пептидомных исследований.

После первых публикаций о двух основных методах ионизации, используемых в современных масс-спектрометрах, в конце 1980-х годов масс-спектрометрические инструменты быстро заняли лидирующие позиции в пептидомике. Масс-спектрометрические и тандемно масс-спектрометрические (MS/MS) технологии являются на сегодняшний момент главными инструментами, используемыми для идентификации белков и, в особенности, пептидов [115]. Масс-спектрометрия — это чувствительная и мощная технология, при которой ионизированные молекулы образцов разделяются соответственно их соотношениям массы/заряда (m/z) с помощью электрического и/или магнитного поля. При выделении большого количества избыточной энергии при некоторых режимах ионизации часть молекул образца начинает диссоциировать с образованием заряженных фрагментов. В масс-спектрометрических анализаторах характер образовавшихся ионов зависит от естественной структуры изучаемого соединения. Таким образом, исследователь получает на выходе уникальный паттерн, или масс-спектр, который представляет собой массы (а точнее, величину отношения массы к заряду, или m/z) получаемых ионов, отнесенные на графике к значению интенсивности их обнаружения. Интерпретация получаемого спектра, таким образом, дает информацию как о молекулярной массе, так и о структуре

образца, последовательности аминокислот и наличие или отсутствие известных пост-трансляционных модификаций.

Для пептидомных исследований других методов идентификации, сравнимых по точности с масс-спектрометрией, найдено так и не было. Все новейшие улучшения технологии немедленно применялись в исследованиях пептидомов. Так масс-спектрометры, использующие метод ионизации электроспреем, значительно повысили свои разрешающие способности с изобретением наноэлектроспрея, который позволял получать более высокозаряженные ионы, кроме того, увеличилось время цикла, что впоследствии дало более полную картину фрагментированных масс для анализа [116].

В ранних пептидомных исследованиях за получением «сырых» данных идентификации следовал анализ «вручную», заключающийся в подборе предполагаемых кандидатов белковых прекурсоров и измерение примерного количества идентифицированных молекул. С течением времени этот трудоемкий процесс начал автоматизироваться с применением последних достижений компьютерных технологий, а также новых биологических данных. Так сейчас применение масс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии как в протеомике, так и в пептидомике, опирается на огромный и постоянно растущий массив геномных и протеомных данных, хранящийся в постоянно пополняемых базах данных. С информацией, полученной от масс-спектрометра, списками интенсивностей пиков, их площадей, а также значениями масс/зарядов (m/z), можно работать в том же «сыром» виде, а также сравнивать со списками, сгенерированными на основе «теоретического» расщепления белков или «теоретической» фрагментации пептидов для получения статистической оценки достоверности получаемых данных [115].

Также значительное влияние на пептидомные исследования оказало изобретение методики тандемной масс-спектрометрии (MS/MS), которая позволяет выбирать определенные ионы, индуцировать их фрагментацию и измерять масс-заряд этих фрагментов ионов. При проведении анализа в две стадии уровень энергии молекул в образующемся вакууме сделал возможной фрагментацию в

газовой фазе. При этом на первом этапе ионы пептидов, которые отбираются по отношению масс к зарядам, образуют фрагменты, а на втором эти фрагменты попадают в анализатор и генерируют свои спектры, которые впоследствии автоматически соотносятся с предполагаемой последовательностью пептида. Кроме того, в прежних масс-спектрометрических анализах присутствовала неприятная особенность, а именно: необходимость дериватизации пептидов для анализа. Изобретение нового метода масс-спектрометрии с использованием диссоциации, вызванной столкновением, индуцирующей фрагментацию выбранных ионов в газовой фазе, удалось преодолеть эту проблему [117]. Также комбинирование этого метода с тандемной масс-спектрометрией с использованием ионизации в электрическом поле позволило получить более точные результаты идентификации пептидов, при этом значительно упростился процесс подготовки образцов перед масс-спектрометрическим анализом, как и качество всего анализа в целом [118]. Как было показано, предварительное разделение с помощью жидкостной хроматографии компонентов смеси, проходящей масс-спектрометрический анализ, значительно повышало эффективность анализа [119]. Многие исследователи использовали именно такую комбинацию в своих работах по идентификации пептидов [120, 121]. Вскоре объединение этих методов стало автоматизированным [122].

Другим не менее важным методом идентификации пептидов с помощью масс-спектрометрии стал метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI). Высокая чувствительность этого метода сделало его очень полезным для профилирования сложных смесей, состоящих из большого количества различных пептидов, когда необходимо знать представленность вещества и его распределение. Бесспорным преимуществом этого метода является упрощение очистки образца, так как различные контаминанты, сопровождающие пептиды в биологических образцах, не оказывают большого влияния на анализ. Кроме того, скорость такого анализа возрастает в разы, учитывая, что за раз можно просканировать сразу множество пептидов на спектре, в отличие от других методов [123].

С развитием исследований генома базы данных генов и кодируемых ими белков различных организмов все больше пополнялись, что позволило в итоге создать автоматизированные алгоритмы идентификации пептидов [124, 125].

1.3.1.2 Новейшие технологии пептидомики

С увеличением количества пептидомных исследований стало очевидно, что различия между триптическими (полученными с помощью искусственного ферментативного расщепления) пептидами протеомных исследований и эндогенными пептидами, являющимися объектом пептидомики, достаточно значительны, что методы пептидомики, в частности масс-спектрометрического анализа нативных пептидов, нуждаются в специфических улучшениях по сравнению с протеомными, чтобы соответствовать этим особенностям и повысить эффективность исследований. Высокая гетерогенность образцов, содержащих эндогенные пептиды, в основном существует благодаря отличию происхождения этих пептидов от полученных с помощью расщепления известными протеазами. К примеру, «концы» эндогенных пептидов могут начинаться с абсолютно произвольной аминокислоты, так как они выщепляются различными неуставленными протеазами, также длина этих пептидов может варьировать в широких пределах по тем же самым причинам, а в их последовательности могут содержаться аминокислоты с различными физико-химическими свойствами [126]. Все эти особенности оказывают заметное влияние на фрагментацию и идентификацию пептидов в распространённых методах масс-спектрометрического анализа [127]. Для преодоления этой проблемы начали заменять повсеместно используемый метод получения фрагментированных ионов диссоциацией, вызванной столкновением, на диссоциацию с переносом электрона или столкновительную диссоциацию с более высокой энергией. Большим прорывом также стало изобретение масс-анализатора типа Орбитрэп, чье высокое разрешение и скорость анализа позволили осуществлять точную идентификацию огромного количества пептидов, а также продвинуло методы секвенирования пептидов *de novo* [128].

Помимо физического улучшения метода, также оказалось, что пептидомные исследования требуют особых параметров масс-спектрометрического анализа, отличающихся от протеомных. Хотя адекватные данные можно было получить и на установках по умолчанию для триптических пептидов, все же для лучших результатов исследователи были вынуждены подбирать специфические условия.

1.3.1.3 Количественная пептидомика

Следом за изучением целых пептидомов различных организмов исследователи пришли к выводу о необходимости количественной их оценки при сравнении различных пептидомных образцов. Методики количественного анализа изначально появились в протеомных исследованиях, а затем некоторые были адаптированы для пептидомики. Например, распространенная в протеомных исследованиях методика, включающая реакцию с тиольной группой цистеина, оказалась применимой для многих пептидных гормонов, так как одной из их отличительных черт является третичная структура, обусловленная дисульфидными мостиками, формируемыми между цистеинами, входящими в их состав. Однако, большинство эндогенных пептидов, не являющихся пептидными гормонами, содержат слишком мало или вовсе не содержат цистеинов, чтобы этот метод квантификации стал широко использоваться для пептидомных исследований. Вместо него так называемый «безметочный» метод оказался наиболее подходящим для количественного анализа эндогенных пептидов, поскольку он основывается на взаимодействии с аминной группой, которая характерна для N-конца нативных пептидов, а также входит в состав распространенной аминокислоты лизина. Исследователи опробовали различные реагенты для этого метода [129], однако у него также обнаружились проблемы, заключавшиеся в том, что свободная аминогруппа, являющаяся целью этого метода, в естественных условиях чаще всего нейтрализуется или заряжается отрицательно, так что, при условии, что пептид не содержит дополнительных положительно заряженных аминокислот, вся последовательность будет заряжена отрицательно, что не позволит масс-спектрометру детектировать ее. Также проблемой оказалось то, что при

использовании некоторых меток пептид может изменять свои свойства и сходить с хроматографической колонки немного раньше, чем остальные, что будет затруднять квантификацию. К тому же из-за химических особенностей сами метки такой способ квантификации позволяет только парное сравнение образцов. Тем не менее, некоторые метки, изначально разработанные для протеомных исследований, оказались все же применимы для количественной пептидомики. Так, например, метки, используемые в методе под названием iTRAQ (изобарные тэги для относительной и абсолютной квантификации) или в методе TMT (тэги тандемных масс) [130]. Последним достижением стали метки TMAV (триметиламинобутирил), адаптированные из меток для протеомных исследований, решившие все озвученные выше проблемы и позволившие пептидомике открыть новую нишу в исследованиях [129, 131].

1.3.1.4 Биоинформатические инструменты анализа

Как было показано в ходе пептидомных исследований, функция биоактивного пептида и белкового прекурсора, из которого он выщепился, может значительно различаться. Однако для пептидомного анализа остается важным установить функциональную принадлежность белка-предшественника. Сделать это стало возможным с созданием базы Генной Онтологии, содержащей информацию о практически всех известных белках, объединенных в группы по биологической активности, молекулярной функции и клеточному компартменту, к которому относится белок. С помощью идентификационных номеров стало возможным сделать анализ обогащения функций белка, процессов, в которых он принимает участие, для более полного понимания возможных событий, предшествовавших его расщеплению. Такой анализ стал достаточно распространенным в пептидомных исследованиях последних лет, появились онлайн инструменты, автоматизировавшие аналитический процесс, например, сервис DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) для функционального анализа больших объемов данных или онлайн сервис, разработанный для растительной пептидомики Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) [132]. Также в круг интересов пептидомных исследований последних лет также вошел поиск пептидов

с определенными активностями, например, антимикробных. Предсказание активности стало возможным благодаря изучению физико-химических свойств достаточного количества подтвержденных биоактивных пептидов и составление онлайн баз данных. Так, для предсказания антимикробной активности широко распространен сервис CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) [133].

Для предсказания активности эндогенных пептидов в последние годы все чаще используются последние достижения биоинформатики. Так, одним из наиболее интересных методов является машинное обучение, позволяющее «обучить» алгоритм искать похожие паттерны в новых массивах данных, натренировав его на подтвержденной выборке. Также методы программирования в последнее время используются для упрощения статистических анализов и автоматизированной визуализации данных.

Как уже говорилось, пептидомика позволила определить, что не все пептиды происходят от белковых прекурсоров. В исследованиях последних лет было показано существование коротких открытых рамок считывания (sORF), кодирующих короткие пептиды, в геномах как млекопитающих, так и растений [85, 134].

Кроме того, новой стратегией пептидомных исследований стала платформа для анализа генома на базе масс-спектрометрического анализа. Этот подход позволяет определить новые рибосомные и нерибосомные пептиды, основываясь на их физико-химических свойствах. В основе этого метода лежит идентификация *de novo* пептидов из различных организмов с помощью тандемной масс-спектрометрии [135].

1.3.2 Проблемы предсказания и аннотации пептидов в геномах

Стратегии предсказания и идентификации КСП также изучаются многими исследователями в последние годы. Основной подход поиска функциональных гомологов белковых молекул, заключающийся в анализе схожести последовательностей и филогенетической близости, недостаточен ввиду того, что большинство биологически активных пептидов представляют собой достаточно

короткие молекулы, которые часто выщепляются из белковых прекурсоров, чья полная последовательность не обладает такой высокой степенью консервативности, как последовательность скрытых в них пептидов. Кроме того, было показано, что некоторые группы КСП могут быть специфическими только для одного семейства или даже рода, однако функциональные аналоги могут присутствовать и в других растениях [38].

Поскольку было установлено, что структура и некоторые мотивы функциональных пептидов схожи между собой, подход, основанный на применении скрытых Марковских моделей (НММ) известных семейств пептидов, часто используется в работах, нацеленных на поиск новых генов КСП в геномах растений [31, 35, 136, 137]. Согласно последним данным, программа SPADA показала себя очень эффективной для предсказания возможных КСП, совмещая в себе различные подходы для идентификации новых коротких пептидов в геномах и транскриптомах растений [35, 137, 138]. Были созданы базы данных известных КСП для различных растений, такие как MtSSPdb (<https://mtsspdb.noble.org/>) [31, 35]. Более ранняя база данных, PlantSSP, содержит более 39 тысяч коротких белков, найденных в 32 двух видах растений [139]. Другим подходом для предсказания новых генов КСП является машинное обучение. В недавнем исследовании было показано его применение для поиска сигнальных пептидов Clavata/Embryo Surrounding Region (CLE), имеющих консервативный домен [140]. Также было показано, что комплексный подход к поиску и идентификации новых КСП является наиболее предпочтительным, учитывая такие особенности биологически активных пептидов, как выщепление из функциональных и нефункциональных прекурсоров, низкая концентрация в клетках и посттрансляционные модификации. В работах последних лет был проведен биоинформатический скрининг биоактивных пептидов на основе транскриптомных и протеомных данных [141], также был проведен прямой пептидомный анализ [142] и, кроме того, с помощью ДНК-микрочипа предсказаны новые КСП, участвующие в защитном ответе [138]. Попытки идентификации конкретных эндогенных пептидов, участвующих в ответе

на поражение патогенов также активно предпринимаются в последнее время [138, 143, 144].

При поиске новых кандидатов КСП также встаёт проблема аннотации геномов растений. Короткие рамки, кодирующие потенциальные функциональные последовательности, могут пропускаться в существующих аннотациях, исходя из существующих принципов идентификации кодирующих нуклеотидных последовательностей, устанавливающих ограничения на высокий порог длины потенциальной рамки, присутствия или отсутствия определенных мотивов, а также специфичности стартового кодона [145].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Растительный материал и обработки

Протонема мха *P. patens* subsp. *patens* Gransden 2004 дикого типа и мутантных линий выращивалась в 200 мл жидкой среды Кнопа, содержащей 500 мг/л аммония тартрата (Helicon, Москва, Российская Федерация) при освещении белым светом от люминесцентных ламп Sanyo Plant Growth Incubator MLR-352H (Panasonic, Осака, Япония) с фотонным потоком 61 мкмоль/м² в условиях 16-часового фотопериода при 24°C и относительной влажности 50%. Гаметофоры выращивались на среде с добавлением 1,5% агара (Helicon, Москва, Российская Федерация) без аммония тартрата в тех же условиях, для анализа использовались гаметофоры 8-недельного возраста. Для масс-спектрометрического анализа пятидневная ткань протонемы обрабатывалась 400 мкМ салициловой кислоты/метилжасмоната и инкубировалась в течение часа или ткань протонемы дикого типа и мутантные линии обрабатывались 0,1 мг/мл хитозана (M = 50–190 кДа, деацетилирован 75-85%; Sigma-Aldrich, США) и инкубировались в течении 3 часов. Хитозан растворяли в воде с 0,001 % ледяной уксусной кислотой и пре-фильтровали через мембранный фильтр 0,50 мкм (Millipore). По меньшей мере три биологических повтора было использовано для каждого типа анализа. Для анализа аккумуляции молекул АФК пятидневная протонема обрабатывалась 1 мг/мл хитозана в течение минуты или 5 мкМ синтетических пептидов в течение 15 минут. Для анализа количественной ПЦР с реакцией обратной транскрипции (qOT-ПЦР) протонема мха обрабатывалась 1 мкМ синтетического пептида INI и 400 мкМ метилжасмоната в течение 2, 4 и 8 часов или 5 мкМ синтетического пептида ЕАА и 0,1 мг/мл хитозана в течение 2 и 4 часов, а также 5 мкМ синтетического пептида AtPER1 в течение 2 (и 4) часов.

Все эксперименты проводились как минимум в трех биологических повторах.

2.2 Получение нокаутных линий

Нокаутные линии *PpRALF1* (Pp3c3_15280V3), *PpRALF2* (Pp3c6_7200V3), *PpRALF3* (Pp3c25_4180V3), *PEPR-like1* (Pp3c3_12560V3) и *PEPR-like2* (Pp3c2_18570V3) были созданы с использованием системы CRISPR/Cas9 [146]. Поиск гидовых последовательностей (sgRNA), которым предшествует PAM мотив *Streptococcus pyogenes* Cas9 (NGG), проводился с использованием кодирующих последовательностей при помощи Интернет-ресурса CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). Для клонирования была выбрана направляющая последовательность, ближайшая к сайту начала трансляции (ATG). Эти последовательности были клонированы в плазмиду pBB [147], что дало конечную полную кассету экспрессии sgRNA. Протопласты получали из пятидневной протонемы. Протонему собирали с поверхности агара с помощью шпателя, отжимали и помещали в 0,5% раствор драйзелазы (Sigma-Aldrich, США) в 0,48 М маннитолу на 45 минут при непрерывном покачивании в темноте. Затем суспензия фильтровалась через металлическое ситечко 100 мкм. Затем протопласты осаждались в 50 мл пластиковых пробирках центрифугированием при $150 \times g$ в течение 5 минут. Далее протопласты дважды отмывали 0,48 М маннитолом с последующим центрифугированием в тех же условиях. Затем супернатант сливали, а полученные протопласты трансформировали согласно протоколу PEG трансформации [148] с использованием трех плазмид: 1) одна из плазмид pBB, несущая экспрессионную кассету sgRNA; 2) pACT-CAS9, несущая ген CAS9; 3) плазида pBNRF, несущая ген устойчивости к антибиотику G418. Плазмиды pACT-CAS9 и pBNRF были любезно предоставлены доктором Fabien Nogué.

Мутантные линии $\Delta cerk$ были предоставлены доктором Bressendorff [40].

2.3 Выделение ДНК и РНК и синтез кДНК

Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора Биолабмикс (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Суммарную РНК из гаметофор и протонемы выделяли с помощью реагента TRIzol™ в соответствии с

рекомендациями производителя. Качество и количество РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле с использованием красителя SYBR Green (Биолабмикс, Россия). Концентрацию всей РНК в образцах измеряли с помощью Nanodrop™One (Thermo Fisher Scientific, США).

Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Праймеры OligodT использовались для получения кДНК из 3 мкг тотальной РНК после обработки ДНКазой.

2.4 Анализ количественной ПЦР с реакцией обратной транскрипции

ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с использованием буфера HS-qPCR SYBR Blue (2x) (Биолабмикс, Россия) на амплификаторе LightCycler®96 (Roche, Германия). Реакцию количественной ПЦР проводили как минимум в трех биологических и трех технических повторах.

Для количественного ПЦР-анализа степени распространения инфекции праймеры были подобраны для *Fusarium solani* или выбраны на основании предыдущих исследований [149] для *Pectobacterium carotovorum* для специфической амплификации патогенной ДНК из зараженных растений мха.

2.5 Условия выращивания патогенов и заражение растений мха

Для заражения растений мха использовались фитопатогены *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (штамм ЕСРА16 NCBI № OL677456) и *Fusarium solani* (20 МККК1 NCBI № OQ073458). Бактериальная культура *P. carotovorum* наращивалась в течение 18 часов, после чего на спектрофотометре при 600 нм была измерена оптическая плотность бактериальной суспензии. По результатам предварительных опытов для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация ~10⁷ КОЕ/мл. Для получения этой концентрации исходную

суспензию бактерий разбавили стерильной водой в 1000 раз. Поэтому в качестве контроля использовались растения, обработанные стерильной водой. Для заражения растений использовали 15 мкл приготовленной ночной культуры с конечной концентрацией $9,5 \times 10^6$ КОЕ/мл. После каждого эксперимента разбавленную суспензию бактерий выращивали на среде для последующего подсчета КОЕ. Споры *F. solani* получили из культуры, выращенной на твердой среде, для заражения использовали суспензию с конечной концентрацией $8,3 \times 10^5$ спор/мл. Конидии *Fusarium solani* также разбавлялись стерильной водой, концентрация конидий подсчитывалась под микроскопом. Чашки Петри с зараженными растениями выращивали при комнатной температуре в стандартных условиях (16 часов день/8 часов ночь). Зараженные растения собирали через 7 дней и замораживали в жидком азоте.

2.6 РНК-секвенирование

Обработку ДНКазой проводили с помощью набора TURBO DNA-free (Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 50 мкл. Очистку РНК проводили с помощью набора Agencourt RNA Clean XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию и качество тотальной РНК проверяли с помощью набора для анализа РНК Quant-it RiboGreen (Thermo Fisher Scientific) и чипа RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, США) соответственно. Библиотеки РНК готовили с использованием модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly(A) и набора для подготовки парных библиотек РНК NEBNext Ultra (NEB) в соответствии с протоколом производителя. Библиотека прошла окончательную очистку с использованием системы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), после чего распределение размеров и качество библиотек оценивали с помощью высокочувствительного ДНК-чипа (Agilent Technologies). Затем библиотеки квантифицировали с помощью набора для анализа ДНК Quant-iT High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific). Наконец, эквимоллярные количества всех библиотек (10 пМ) были секвенированы с помощью высокопроизводительного запуска на

Illumina HiSeq 2500 с использованием прочтений парных концов 2×100 п.н. и 1% контроля всплеска Phix.

Адаптеры и низкокачественные последовательности были удалены из сырых ридов с помощью Trimmomatic v0.39 [150]. Отфильтрованные риды были выровнены на референсный геном *P. patens* v3.3 (скачан с веб-сайта: <https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) с использованием HISAT2 v2.1.0 [151] и выравнивания были отсортированы с помощью Samtools [152]. Уровень экспрессии картированных ридов подсчитывали с помощью инструмента FeatureCounts [153]. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета EdgeR [154]. Гены были определены как дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) при скорректированном значении $p \leq 0,05$ и с логарифмированным соотношением эксперимент/контроль $\geq 1,0$.

2.7 Детекция и измерение уровня накопления молекул АФК

Для выявления внутриклеточных молекул АФК использовали флуоресцентный краситель 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетат (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, США). Протонему, выращенную в жидкой культуре, обрабатывали синтетическими пептидами в концентрации 5 мкМ и инкубировали с 10 мкМ DCFH-DA в течение 15 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 6 пмоль смеси пептидов с известным временем удержания (RT) (Biognosys, Швейцария). Хитозан в концентрации 1 мг/мл добавляли до 1 мл общего объема непосредственно перед подготовкой препарата. Для анализа накопления молекул АФК в протонеме, выращенной на твердой среде, семидневные нити протонемы с помощью шпателя снимали с поверхности агара и переносили в mQ. Затем протонема обрабатывалась 0,0025% драйзелазы (разбавленной в mQ) в течение 1 минуты и инкубировали с 10 мкМ DCFH-DA в течение 15 минут. В качестве контроля использовали стерильную воду. Измерение флуоресценции проводили на флуоресцентном микроскопе Axio Imager M2 (Zeiss) с цифровой камерой AxioCam 506 и блоками фильтров. Для детекции флуоресценции DCFH-DA использовали

фильтр № 44 (λ_{ex} BP 475 нм/40 нм; λ_{em} BP 530 нм/50 нм). Экспозиция была установлена на 300 мс, использовались каналы FITC и Brightlight. Данные об интенсивности флуоресценции были получены из соответствующего программного обеспечения Zeiss Zen.

Для обнаружения накопления внеклеточных АФК деэтерифицированный DCFH был получен из DCFH-DA путем гидролиза в NaOH (10 мМ), как описано в работе Смирновой и др. [155]. 1 мл жидкой среды, содержащей нити протонемы, 10 мкМ красителя и элиситоры, центрифугировали при $15000 \times g$ в течение 1 мин, затем осадок отбрасывали. Уровень внеклеточных АФК определяли в супернатанте с помощью многофункционального ридера Varioskan Flash (Thermo Scientific, США). Интенсивность флуоресценции измеряли при λ 485 нм/535 нм (длина волны возбуждения/испускания) при 25°C. Интенсивность накопления АФК была выражена в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ).

2.8 Экстракция пептидов

Секретируемые пептиды экстрагировали из 400 мл культуральной жидкости, в которой выращивали протонему (среда Кнопа с добавлением 500 мг/л аммония тартрата). Культуральную среду пропускали через 0,22 мкм мембранный фильтр (Millipore), лиофилизировали и ресуспензировали в 700 мкл 5% водного раствора ацетонитрила (AcN), содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA). Следом суспензию центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 10 минут, а полученный супернатант переносили в чистые пробирки и центрифугировали при $5000 \times g$ в течение 5 минут, осадок отбрасывали. При выделении пептидов из протонемы, обработанной хитозаном, супернатант центрифугировали при $15000 \times g$ в течение 30 минут, чтобы избавиться от остатков хитозана. Пептиды выделяли из культуральной среды путем твердофазной экстракции на обращено-фазовых картриджах DSC-18 (Discovery DSC-18, Supelco, USA) с использованием 50% раствора AcN в качестве элюирующего. Элюированные пептиды концентрировали в SpeedVac и ресуспендировали в 5% растворе AcN, содержащем 0,1% TFA. Выпаренный осадок растворяли в водном растворе, содержащем 0,02 М

хлорацетамид (САА), 0,025 М трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР) и 0,1 М трис-НСl с рН 8,5, нагревали до 90°C в течение 10 мин и затем охлаждали для восстановления дисульфидов в аминокислотах. Пул пептидов выделяли с помощью твердофазной экстракции на наконечниках ZipTip (Millipore) с использованием 50% раствора АсN в качестве элюирующего. Элюированные пептиды концентрировали в SpeedVac и ресуспензировали в 5% растворе АсN, содержащем 0,1% TFA, с последующим масс-спектрометрическим анализом всех приготовленных образцов.

2.9 LC-MS/MS анализ и идентификация пептидов

Масс-спектрометрический анализ эндогенных пептидов был проведен в трех независимых биологических и трех технических повторах. Пептиды разделялись при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC, Ultimate 3000 Nano LC System, Thermo Scientific, USA), используя 15 см колонки C18 диаметром 75 мкм (Acclaim® PepMap™ RSLC, Thermo Fisher Scientific, USA). Элюция пептидов проводилась в 5–35% градиенте буфера (80% ацетонитрила/0,1% муравьиной кислоты) в течение 45 минут при скорости потока 0,3 мкл/мин. Дальнейший анализ проводили с использованием Q Exactive HF масс-спектрометра (Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific, USA). Масс-спектры были получены при разрешении 60,000 (MS) и 15,000 (MS/MS) в диапазоне 400–1,500 m/z (MS) и 200–2,000 m/z (MS/MS). Отбор прекурсоров осуществлялся при пороге 67000. До 10 прекурсоров подвергались фрагментации методом высокоэнергетической диссоциации в ловушке (HCD) при энергии столкновения 25 эВ и времени активации 100 мс. Прекурсоры с состоянием заряда +1 отбрасывались, и все измеренные прекурсоры были исключены из измерения в течение 20 с.

Поиск масс-спектрометрических данных проводился с помощью программного пакета PEAKS Studio (версия 8.0, Bioinform Inc., Калифорния, США) в базе данных Phytozome v12.0, содержащей белковые последовательности *P. patens*, объединенные с хлоропластными и митохондриальными белками (33 053

записи), и последовательности, предсказанные алгоритмом SPADA. Поиск проводился со следующими параметрами: допуск по массе прекурсора 10 ppm и допуск по массе фрагмента 0,05 Да; «режим фрагментации» был установлен на «неспецифический»; фиксированные модификации - Карбамидометилирование (+ 57,02); переменные модификации - Окисление (M) - +15,99 и Ацетилирование (N-термин) - +42,01. Настройки прибора были установлены на «орби-орби» (орбитальная ловушка использовалась для определения m/z как предшественника, так и фрагментных ионов). Спектры отсекались при величине FDR < 1%.

2.10 Биоинформатический анализ белковых последовательностей

Всего для анализа разнообразия КСП было отобрано 43 вида покрытосеменных, 1 вид голосеменных и 1 вид плауновидных. Белковые последовательности семейств КСП CAPE, TAX, тионина и гевеина были загружены из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), а последовательности пептидов PpRALF были получены из базы данных Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) в формате FASTA. Список пептидов AtRALF был получен из статьи Abarca et al. [156]. Список известных рецепторов PEPR у покрытосеменных был получен из статьи Lori et al. [38]. Пакет ClustalW применялся для создания множественных выравниваний КСП и PEPR с параметрами по умолчанию [157]. После каждого выравнивания КСП репрезентативные последовательности отбирали вручную. Визуализация множественных выравниваний выполнялась с использованием программного пакета Jalview2 [158].

Множественные выравнивания пептидов RALF *P. patens* и *Arabidopsis thaliana* были созданы с использованием алгоритма MAFFT [159] и визуализированы с помощью программного обеспечения Jalview [158]. Многоядерная версия IQ-TREE 2.2.0 [160] использовалась для проведения анализа максимального правдоподобия (ML) с 1000 повторений сверхбыстрой начальной

загрузки [161]. Модель FLU+F+G4 была выбрана встроенной программой ModelFinder [162] как наиболее подходящая модель в соответствии с Байесовским информационным критерием (BIC). Метод главных компонент (PCA) был выполнен с использованием инструмента iFeature [163].

Сети белок-белкового взаимодействия были созданы с использованием базы данных STRING v.10 (www.string-db.org), параметры были выставлены по умолчанию [164]. Визуализацию взаимодействия белков проводили с помощью программного обеспечения Cytoscape [165]. Анализ обогащения GO был проведен с помощью g:Profiler [166].

2.11 НММ поиск

Для поиска гомологов PROPEP в геноме *P. patens* был применен пакет HMMERv3.3 (<http://hmmerr.org>). Профили НММ всех известных PROPEP у покрытосеменных были созданы с использованием алгоритма hmmbuild. Для запуска консольного алгоритма jackhmmmer было установлено пороговое значение E-value < 0,001 как для последовательности, так и для каждого домена. Консольный инструмент программы HMMER, jackhmmmer, искал PROPEP в геноме *P. patens*, транслированном в 6 направлениях, используя ранее сгенерированные профили НММ 75 известных аминокислотных последовательностей PROPEP, идентифицированных как у однодольных, так и у двудольных растений.

2.12 Предсказание КСП

Биоинформатический подход SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application) был применен для поиска пептидных сигналов в геномах *P. patens* [167], *Sphagnum fallax* [168], *Marchantia polymorpha* [169], *Anthoceros agrestis* (боннский и оксфордский штаммы) и *A. punctatus* [170] [31, 137]. Пайплайн биоинформатического алгоритма доступен по адресу <https://github.com/ZhaoBioinformaticsLab/PlantSSPProtocols>. Геномы *P. patens*, *S. fallax* и *M. polymorpha* в формате FASTA скачаны с Phytozome v12.1

(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), геномы представителей *Anthoceros* были загружены из базы данных <https://www.hornworts.uzh.ch/en.html>. Алгоритм SPADA запускали с помощью командной строки Linux. Пакет Augustus в пайплайне SPADA был запущен с использованием *Arabidopsis thaliana* в качестве референсного генома. Докер контейнер (CRP_PlantSSPv1_Noble в общедоступном пайплайне), содержащий последовательности всех известных в настоящее время КСП, использовался для поиска НММ в пайплайне SPADA. Для предсказания генной модели использовалось пороговое значение E-value < 0,001, чтобы исключить ложноположительные результаты. В результате были получены новые аннотации предсказания генной модели в формате GFF3. Для дальнейшей функциональной аннотации и классификации предсказанных генов, потенциально кодирующих КСП, были сгенерированы последовательности белков (< 250 а.о.). Затем потенциальные предшественники КСП были классифицированы как “известные КСП”, “вероятно известные КСП”, “предполагаемые КСП” и “не относящиеся к КСП” (Boschiero et al. 2020). “Известные КСП” (кодирующие известные КСП) соответствуют следующим критериям: D-критерий SignalP > 0,45; значение E-value НММ гомологии < 0,01; значение E-value гомологии Смита-Уотермана < 0,01 и длина белка-предшественника < 200 аминокислотных остатков. Гены “вероятно известных КСП” имеют значение E-value НММ гомологии < 0,01 и значение E-value гомологии Смита-Уотермана < 0,01; длина белка-предшественника < 250. Гены “предполагаемых КСП” не имеют или имеют небольшое сходство последовательностей с другими известными КСП, размер предшественника < 230 аминокислотных остатков; D-критерий SignalP > 0,25 и отсутствие трансмембранных доменов. Гены, “не относящиеся к КСП”, не соответствовали вышеуказанным категориям. Предсказанные КСП были сопоставлены с помощью BLAST с соответствующими базами данных белков для получения ID белка.

2.13 Поиск и предсказание биоактивных пептидов в стресс-индуцированном транскриптоме

Сырые транскриптомные данные были получены из статьи Reboledo et al. [171]. Качество прочтений было оценено с помощью программы FastQC, прочтения необходимого качества были отфильтрованы с помощью программы Trimmomatic. Риды были выровнены на референсный геном *P. patens*, а также на базу длинных некодирующих РНК (длнкРНК) *P. patens*, с помощью программы hisat2. Затем с использованием полученных выравниваний и программы Stringtie2 были собраны транскриптомы. Дифференциальная экспрессия для определения транскриптов, представленность которых увеличивается при заражении, была посчитана с помощью пакета DESeq2. Стресс-индуцированные транскрипты, которые были классифицированы как мРНК и длнкРНК, были использованы для предсказания всех открытых рамок считывания длиной более 30 аминокислот с помощью пакета orfipy. В качестве стартового кодона были использованы как стандартный триплет AUG, так и альтернативные CUG и UUG. Предсказанные короткие рамки считывания были кластеризованы с использованием пакета cd-hit. Поскольку возможными прекурсорами КСП могут быть белки длиной 100–200 аминокислот без предсказанных функциональных доменов и с сигналом экспорта, мы далее предсказали функциональные домены на всех рамках считывания используя пакет InterProScan. Кроме того, используя пакеты TMHMM 2.0 и SignalP 5.0, были предсказаны трансмембранные домены и сигналы экспорта потенциальных прекурсоров. Рамки считывания, содержащие предсказанные сигналы экспорта и не содержащие известные домены, были отнесены к потенциальным прекурсорам новых секретлируемых биоактивных или сигнальных пептидов. Пептиды без сигналов экспорта, транскрипты которых сильно индуцировались при биотическом стрессе ($F\text{Clog}_2 > 4$, $P < 0.05$), были отобраны для дальнейшего анализа. С помощью программы CD-HIT [172] были кластеризованы гомологи дифференциально экспрессирующихся транскриптов в геноме *P. patens*. В дополнение, для предсказания кандидатов генов известных КСП также был использован

биоинформатический алгоритм SPADA. Для предсказанных дифференциально экспрессирующихся транскриптов был проведен анализ консервативности с использованием алгоритма tBLASTn в базе тысячи транскриптомов растений среди представителей семейства Бриофитов (<https://db.cngb.org/onekp/>).

2.14 Синтез пептидов

Найденные кандидаты биологически активных пептидов и известные фитоцитокнины были химически синтезированы в Shanghai Ruifu Chemical Co., Ltd. (Шанхай, Китай) или в лаборатории генетической инженерии ФНКЦ ФХМ (Москва, Россия). Чистота пептидов в лиофилизированной форме была > 95%, их молекулярная масса была подтверждена масс-спектрометрическим анализом. Синтезированные пептиды были растворены в стерильной воде до концентрации 2560 мкг/мл и хранились при -80° С.

2.15 Проверка антимикробной активности пептидов

Минимальную ингибирующую концентрацию пептидов определяли методом двукратных разведений в стерильных 96 луночных планшетах (Corning 3870) в жидкой питательной среде Mueller-Hinton broth (МНВ, Becton Dickinson), по отношению к *E. coli* K-12 MG 1655 и *B. subtilis* 168 НТ как описано в статье Wiegand et al. [173].

2.16 Статистический анализ

Статистический анализ и визуализация были выполнены в Python v. 3.7.5 [174] с использованием модулей scipy 1.5.2 [175], seaborn 0.11.1 [176], numpy 1.20.1., pandas 1.2.3 [177]. Для двух- или более -факторного дисперсионного анализа (ANOVA) применялись тесты Тьюки на достоверно значимые различия (HSD), основанные на множественных сравнениях средних, а также U-критерий Манна-Уитни, чтобы определить, какие парные сравнения были статистически значимыми. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Идентификация пептидных регуляторов иммунного ответа у бриофитов

Пептиды играют ключевую роль в регуляции множества биологических процессов, в том числе, модулируют иммунный ответ растений. За последние 30 лет обнаружен целый ряд новых семейств биоактивных пептидов, регуляторов разнообразных процессов, в том числе позитивных и негативных регуляторов иммунитета [11, 36, 75, 88, 89, 178–181]. Более того, было показано повышение устойчивости к фитопатогенам у растений, обработанных синтетическими фитоцитокинами. Однако работа по выявлению функциональных пептидных семейств в геномах растений далека от завершения. Более того, открытие нового класса малых регуляторов – микробелков, кодируемых короткими открытыми рамками считывания (кОРС), делает исследования по поиску и функциональному анализу пептидных регуляторов стрессового ответа еще более актуальными [85].

Современные подходы поиска и изучения биоактивных пептидов имеют ряд недостатков. Так, например, геномы многих организмов на сегодняшний день недостаточно хорошо аннотированы, что также затрудняет предсказание новых семейств пептидов. Кроме того, концентрация биоактивных пептидов в клетках живых организмов часто слишком низкая для их непосредственной детекции. Также многие семейства пептидов состоят из достаточно большого количество представителей, что усложняет их функциональный анализ. В целом, существующие на данный момент инструменты поиска и идентификации биоактивных пептидов в растениях недостаточно развиты и не могут в полной мере охватить все их разнообразие.

В связи с этим на первом этапе нашего исследования мы разработали схему идентификации новых, ранее не охарактеризованных семейств биологически активных пептидов, которая объединила методы анализа геномов, транскриптомов

и пептидомов. В качестве модельного растения был использован мох *Physcomitrium patens* (рис. 4 А).

3.1.1 Поиск генов-предшественников коротких секретлируемых пептидов (КСП) в геномах бриофитов

Семейства коротких сигнальных пептидов (КСП) были идентифицированы у различных видов покрытосеменных растений, в которых они являются медиаторами многих важнейших процессов, в том числе иммунного ответа [31]. Однако эволюция КСП у наземных растений изучена слабо. Предполагается, что экспансия определенных семейств пептидов связана с дупликацией растительных геномов [182].

Для поиска закономерностей эволюции пептидных семейств растений, на первом этапе нашего исследования мы провели биоинформатический поиск генов белков-предшественников коротких сигнальных пептидов в геномах бриофитов (рис. 4 В). Для этого был использован разработанный ранее командой Zhou и других [137] алгоритм SPADA, позволяющий предсказать гены, кодирующие КСП, в геномах растений (рис. 4 С). Были отобраны пять видов представителей бриофитов, два модельных вида – мох *Physcomitrium patens* и печеночник *Marchantia polymorpha*, чьи геномы хорошо аннотированы [167, 169], мох *Sphagnum fallax* [168], а также три вида антоцеротовых мхов: *Anthoceros agrestis* (линии Bonn и Oxford) и *A. punctatus*, геномы которых недавно также были проанализированы [170]. Общий процесс предсказания коротких секретлируемых пептидов показан на рисунке рис. 4 В. SPADA использует уже готовые профили семейств коротких секретлируемых пептидов, построенные на скрытых марковских моделях (Hidden Markov Models, HMM), собранных в базе данных PlantSSP (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/PlantSSP/>), и сканирует любой предоставленный геном на их наличие. Следует отметить, что предсказание потенциальных коротких секретлируемых пептидов ограничено только уже известными моделями семейств, обнаруженных у покрытосеменных. Поэтому

ограничением такого подхода является невозможность идентифицировать специфичные для бриофитов короткие секретлируемые пептиды.

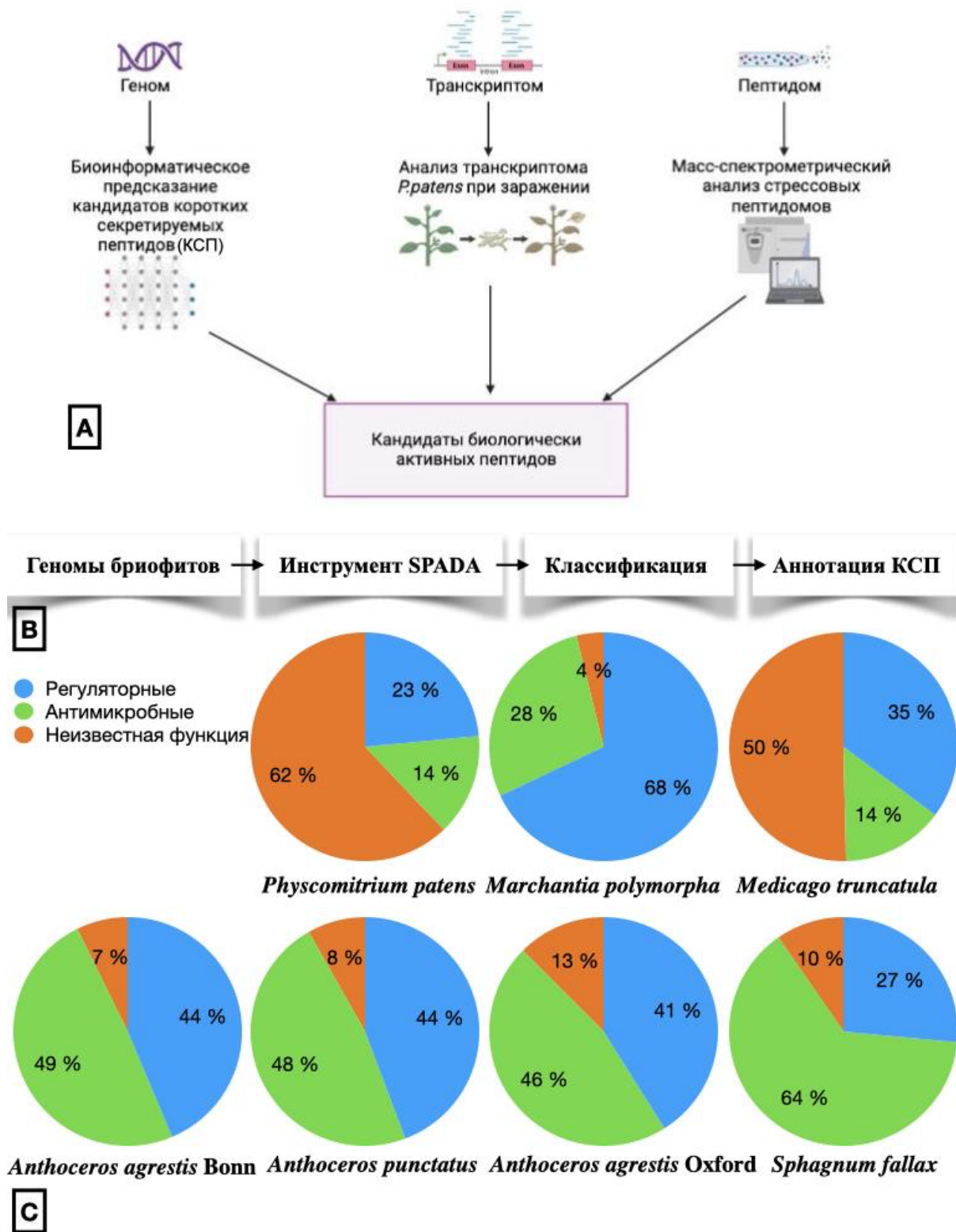


Рис. 4. А - Общая схема идентификации новых биологически активных пептидов; В - общая схема анализа геномов с помощью инструмента SPADA; С - диаграммы,

показывающие распределение групп генов предшественников КСП в разных таксонах растений в соответствии с *in silico* предсказанием с помощью инструмента SPADA.

Поскольку полученные нами в процессе предсказания гены-предшественники коротких секретрируемых пептидов уже могли быть аннотированы у изучаемых видов, мы дополнительно сравнили транслированные последовательности генов, кодирующих предсказанные предшественники КСП, с аннотированными протеомами этих видов (отсечка e-value 0,00001 и не менее 70% покрытия для BLASTp-анализа).

Предсказанные с помощью алгоритма SPADA гены, предположительно кодирующие предшественники КСП, были поделены на четыре группы, на основании наличия или отсутствия сигнальной последовательности на N-конце и трансмембранного домена, длины прекурсора, а также степени схожести последовательностей с известными короткими сигнальными пептидами. Для группы “известные короткие секретрируемые пептиды” длина предсказанного прекурсора составляет не более 200 а.о., имеется высокая степень гомологии с известными короткими секретрируемыми пептидами других растений и сигнальная последовательность на N-конце; для группы “вероятно известные короткие секретрируемые пептиды” длиной прекурсора не превышает 250 а.о., высокая степень гомологии с короткими секретрируемыми пептидами других растений; в группе “предположительные короткие секретрируемые пептиды” предсказанные прекурсоры не имеют высокой степени гомологии с известными короткими секретрируемыми пептидами и их длина составляет не более 230 а.о., в их прекурсорах также могут быть предсказаны N-концевые сигнальные последовательности и они не должны иметь трансмембранного домена; а также группа “не относящиеся к коротким секретрируемым пептидам”, прекурсоры из которой не отвечают ни одному из перечисленных выше критериев [31].

Нами были предсказаны 132 гена “известных коротких секретрируемых пептидов”, 5 “вероятно известных коротких секретрируемых пептидов”, 404 “предположительных коротких секретрируемых пептида” и 375 “не относящиеся к

коротким секретируемым пептидам” у *P. patens*. Примерно по 80 генов были предсказаны как “известные короткие секретируемые пептиды” у *M. polymorpha* и *S. fallax* и около 55–60 генов – у 3 представителей Антоцеротовых мхов. По 3-4 гена, предсказанных как “вероятно известные короткие секретируемые пептиды”, было обнаружено у *M. polymorpha* и двух линий *A. agrestis*, 6 генов – у *A. punctatus* и больше всего, 9 генов “вероятно известных коротких секретируемых пептидов” было обнаружено у *S. fallax*. От 400 до 440 генов оказались предсказаны как “предположительные короткие секретируемые пептиды” у *M. polymorpha* и 3 представителей Антоцеротовых, как и у *P. patens*, больше всего таких генов было предсказано у *S. fallax* – 695 генов. Около 270 генов соответствовали группе “не относящихся к коротким секретируемым пептидам” у *M. polymorpha* и *S. fallax*, от 110 до 120 были предсказаны у 3 представителей Антоцеротовых (Таблица 1).

Таблица 1 – Количество предсказанных прекурсоров КСП

	<i>P. patens</i>	<i>M. polymorpha</i>	<i>A. agrestis</i> В	<i>A. agrestis</i> О	<i>A. punctatus</i>	<i>S. fallax</i>
Известные КСП	132	78	55	56	61	83
Вероятно известные КСП	5	4	4	3	6	9
Предположительные КСП	404	442	421	401	405	695
Не относящиеся к КСП	375	278	120	110	112	265
Всего	916	802	600	570	584	1052

Здесь мы сосредоточились на подробной характеристике генов, которые были предсказаны как “известные короткие секретируемые пептиды” и в некоторых случаях как “вероятно известные короткие секретируемые пептиды”, в каждом виде бриофитов.

3.1.1.1 Группа “регуляторные” пептиды и фитоцитокнины

Пайплайн SPADA позволил нам предсказать несколько белков-предшественников известных пептидных семейств, вовлеченных в регуляцию процессов развития растений, а также иммунных реакций, в геномах бриофитов. Это может указывать на важность пептидной регуляции в адаптации растений к наземным условиям [183]. Наш анализ выявил несколько коротких секретлируемых пептидов (RALF, EPFL, CLE), уже идентифицированных ранее у *P. patens*, а также несколько коротких секретлируемых пептидов (RALF), аннотированных у *M. polymorpha*. Мы посчитали этот результат положительным контролем применения инструмента предсказания SPADA.

Семейство CAPE (CAP-производный пептид)

Пептиды семейства CAPE образуются из С-концевого участка белка-предшественника PR1b (белок, связанный с патогенезом 1) у томата [41]. Среди потенциальных коротких секретлируемых пептидов, предсказанных SPADA у *P. patens*, мы обнаружили четыре белка, которые являются потенциальными предшественниками пептидов CAPE: Pp3c18_21170V3.1.p (CYSTEINE-RICH SECRETORY PROTEIN-RELATED); Pp3c18_21090V3.1.p (Defense-related protein containing SCP domain); Pp3c25_120V3.1.p (ALLERGEN V5/TPX-1-RELATED FAMILY PROTEIN-RELATED); Pp3c25_500V3.1.p (PR-1). Кроме того, мы обнаружили возможные прекурсоры CAPE пептидов в других видах бриофитов, использованных в исследовании: девять генов было найдено у *M. polymorpha*; два и один ген были найдены у линий *A. agrestis* Bonn и Oxford, соответственно; один ген был предсказан в *S. fallax*. В *A. punctatus* генов, предсказанных как потенциальные прекурсоры пептидов CAPE, обнаружено не было.

Мы выбрали представителей семейства CAPE пептидов из других видов растений, таких как *Solanum lycopersicum*, *Medicago truncatula* и другие, и провели множественное выравнивание с предсказанными нами прекурсорами. Этот анализ подтвердил, что консервативный мотив CAPE пептидов (P*GN*****PY) присутствует практически во всех потенциальных прекурсорах (рис. 5 А). Более того, мы проанализировали общедоступные данные экспрессии генов *P. patens*

(<https://peatmoss.online.uni-marburg.de/>) и показали, что экспрессия четырех генов, предсказанных как прекурсоры CAPE пептидов, повышалась при обработке OPDA (предшественник жасмоновой кислоты).

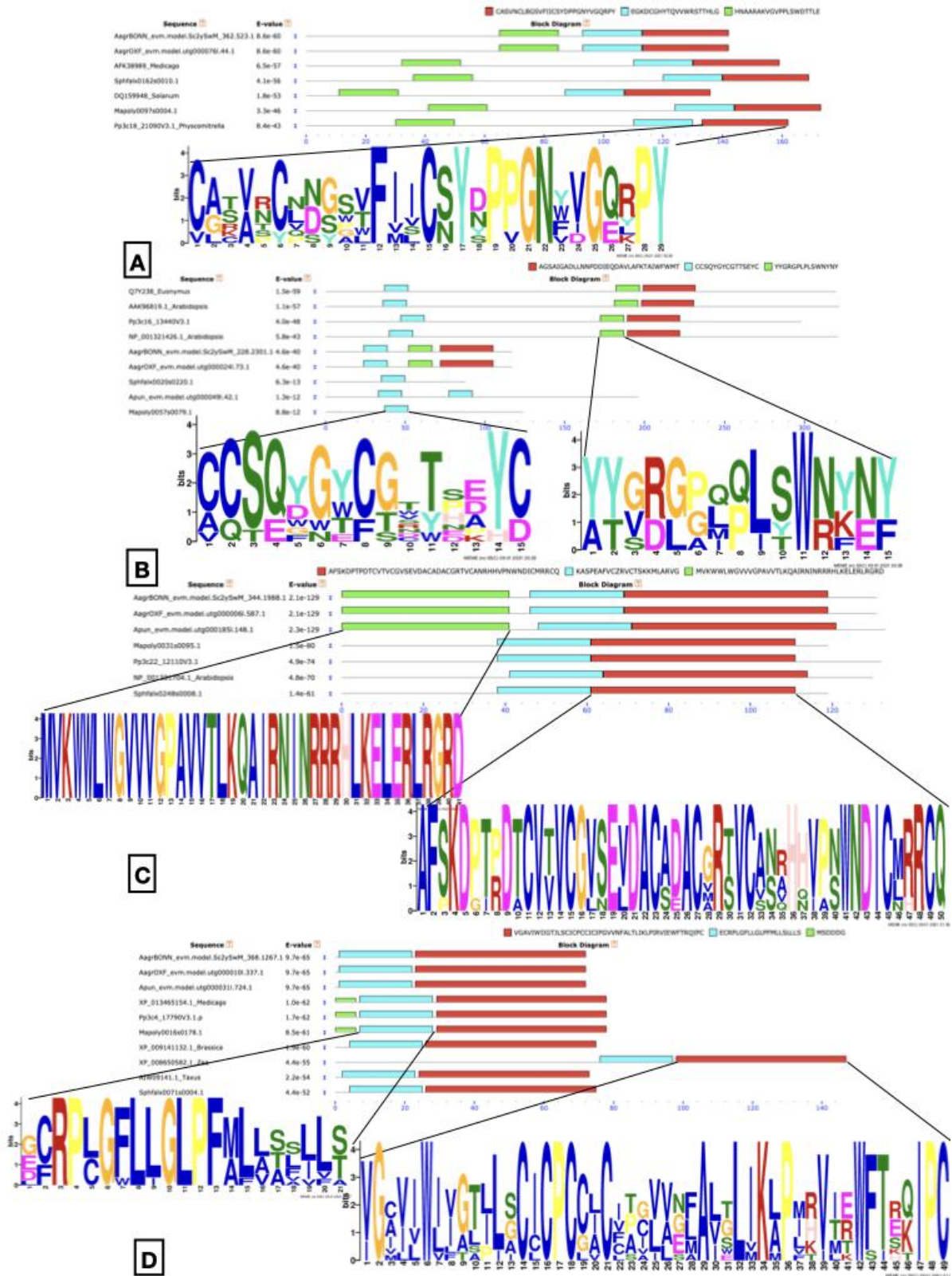


Рис. 5. Лого **A** - известного мотива пептидов CAPE; **B** - известного мотива гевеинов; **C** - общие мотивы тиониноподобных пептидов; **D** - общие мотивы

пептидов TAX из некоторых сосудистых растений и кандидатов из бриофитов, созданные с помощью онлайн-инструмента MEME (<http://memesuite.org/tools/meme>).

RALF пептиды

RALF пептиды относятся к группе цистеин-богатых пептидов и идентифицированы у всех покрытосеменных растений [184]. Одна из их основных функций связана с регулированием корневой архитектуры; однако они также были обнаружены у *P. patens*, *M. polymorpha* и *S. fallax*, у которых отсутствует корневая система [169, 184]. Разнообразие рецепторов и ко-рецепторов, способных связывать RALF пептиды, привело к большому разнообразию функций, показанных для этого семейства [156]. Так было показано, что RALF пептиды, помимо регуляции роста корней, также вовлечены в процессы удлинения пыльцевой трубки, образования азотфиксирующих клубеньков, накопления инулина и регуляции ответа на биотический и абиотический стресс [94, 185–187]. Наш анализ выявил два гена “известных коротких секретлируемых пептидов”, определенных как RALF-подобные, у *P. patens*, один из которых уже был аннотирован (Pr3c6_7200V3.1.p). Еще два уже аннотированных гена RALF-подобных пептидов были предсказаны как “предположительные короткие секретлируемые пептиды”. Также два гена были предсказаны у *M. polymorpha* как RALF-подобные, и оба уже оказались аннотированы (Mapoly0076s0067.1, Mapoly0040s0047.1). Один ген был предсказан как RALF-подобный у *S. fallax* и один ген – у *A. punctatus*, однако в обеих линиях *A. agrestis* ни один RALF-подобный ген обнаружен не был. С помощью множественного выравнивания также были показаны характерные консервативные мотивы в предсказанных прекурсорах бриофитов.

Подобные эпидермальному паттерн-фактору (EPFL)

Пептиды, относящиеся к семейству EPFL, являются цистеин-богатыми, они были обнаружены как у покрытосеменных, так и у мхов [76]. У покрытосеменных представители этого семейства пептидов регулируют как подавление, так и

стимуляцию развития и плотность расположения устьиц [76, 188]. Также было показано, что у пшеницы пептиды ТаEPFL1 регулируют развитие тычинок [189]. Кроме того, в недавних исследованиях было показано, что экспрессия генов, кодирующих пептиды семейства EPFL, изменялась в ответ на заражение *Fusarium oxysporum* в томате, что может говорить о возможной роли, которую эти пептиды играют в иммунном ответе растений [190]. В нашем анализе SPADA предсказала несколько уже аннотированных прекурсоров пептидов EPFL у *P. patens* (Pp3c5_11260V3.1.p, Pp3c2_13490V3.1.p и др.), а также потенциальные прекурсоры пептидов EPFL в трех геномах *Anthoceros* – по 5 генов в геномах *A. agrestis* обеих линий и 6 генов в геноме *A. punctatus*.

Фитоцианин/Гемоцианин (PCY)

Пептиды PCY принадлежат к группе цистеин-богатых пептидов и участвуют в регуляции роста пыльцевых трубок у сосудистых растений [191]. Мы идентифицировали 9 генов, классифицированных как “известные короткие секретлируемые пептиды” или “вероятно известные короткие секретлируемые пептиды”, которые потенциально кодируют белки-прекурсоры фитоцианинов у *P. patens* (Pp3c3_25110V3.1.p, Pp3c5_5180V3.1.p, Pp3c5_23940V3.1.p, Pp3c16_22330V3.1.p, Pp3c8_8380V3.1.p, Pp3c20_17730V3.1.p, Pp3c23_9820V3.1.p, pcy_Chr04_13M_1, Pp3c7_7010V3.1.p). Пептиды PCY также были предсказаны у всех остальных исследованных видов. Наибольшее количество прекурсоров было идентифицировано у *M. polymorpha*. Однако функции этого семейства секретлируемых пептидов у бриофитов требуют дальнейшего выяснения.

TAX пептиды

Пептиды TAX относятся к группе цистеин-богатых пептидов и участвуют в процессах биосинтеза таксанов и синтеза никотиновых алкалоидов [192]. Было предсказано три гена (Pp3c5_22950V3.1.p, Pp3c3_16420V3.1.p, Pp3c4_17790V3.1.p), кодирующих вероятные прекурсоры пептидов TAX у *P. patens*. У всех этих белков-прекурсоров отсутствует какая-либо аннотация домена

в текущей версии v3.3 генома *P. patens*, также не было никаких свидетельств присутствия пептидов ТАХ у бриофитов. По два гена, предположительно кодирующих пептиды ТАХ, было предсказано в *M. polymorpha*, *A. punctatus* и в обеих линиях *A. agrestis*. Четыре гена были предсказаны как ТАХ у *S. fallax*.

Множественное выравнивание потенциальных прекурсоров из бриофитов с белками-прекурсорами ТАХ из других видов растений выявило высокое сходство последовательностей (рис. 5 D).

Неспецифичные белки переноса липидов (nsLTP)

Маленькие белки, содержащие не-специфический липид-переносящий домен (Non-specific Lipid Transfer Proteins (nsLTPs)), представляют собой большую группу цистеин-богатых пептидов, которые участвуют в переносе липидов, защитных реакциях и развитии растений у большинства сосудистых растений [193]. Используемый нами алгоритм предсказал одиннадцать генов, кодирующих прекурсоры белков переноса липидов у *P. patens*. Девять из этих белков-прекурсоров уже были аннотированы как возможные белки переноса липидов (LTP_2), а два были аннотированы нами в нашем исследовании. В обеих линиях *A. agrestis* было идентифицировано по пять генов белков переноса липидов. Четыре гена были предсказаны как белки переноса липидов у *A. punctatus* и *M. polymorpha*. Два из предсказанных белков переноса липидов уже были аннотированы у *M. polymorpha* (Mapoly0120s0024.1.p; Mapoly0955s0001.1.p). Два белка были предсказаны как предшественники пептидов от белков переноса липидов в *S. fallax*, и они также уже были аннотированы (Sphfalx0002s0328.1.p; Sphfalx0005s0219.1.p).

SPADA также предсказала уже аннотированные пептиды из группы «регуляторных», такие как предшественники пептидов Clavata/Embryo Surrounding Region (CLE) у *P. patens*. Мы также смогли обнаружить белки-прекурсоры пептидов Root_Cap/Late_Embryogenesis, принадлежащих к группе «регуляторных» в *P. patens* и в обеих линиях *A. agrestis*. Прекурсоры растительных натрийуретических пептидов (PNP) были предсказаны у *M. polymorpha* и обеих

линий *A. agrestis*, но не были идентифицированы у *P. patens*, *S. fallax* или *A. punctatus*.

3.1.1.2 Группа “антимикробные” пептиды

Антимикробные пептиды обеспечивают первую линию защиты от атак патогенов, они были обнаружены у всех видов растений [29, 30].

Гевеиноподобные пептиды

Гевеиноподобные пептиды относятся к группе антимикробных пептидов и идентифицированы у различных однодольных и двудольных растений [194]. В наших данных мы предсказали четыре гена, кодирующих возможные предшественники гевеиноподобных пептидов у *P. patens*. Все эти белки-предшественники участвуют в защитных реакциях растений; согласно описанию генов в общедоступных аннотациях, они связывают и разрушают хитин клеточных стенок грибов. Однако некоторые из них также включают последовательность гевеиноподобных пептидов, которые соответствуют формуле известных гевеинов ($C_1X_4-5C_2X_4C_3C_4X_5C_5X_6C_6$, где C обозначает цистеин, а X обозначает любую аминокислоту в промежутке). Потенциальные прекурсоры этих пептидов также были обнаружены у всех исследованных видов бриофитов. Наше множественное выравнивание последовательностей также выявило общие мотивы между прекурсорами из бриофитов и известными гевеинами других растений (рис. 5 В).

Тиониноподобные пептиды

Тиониноподобные пептиды — это цистеин-богатые пептиды, которые обладают как токсическим, так и антимикробным действием, разрушая мембрану патогенов [195]. Эти пептиды были идентифицированы как у однодольных, так и у двудольных. На сегодняшний день гены, кодирующие тиониноподобные пептиды, не были аннотированы у *P. patens* или других бриофитов. Однако мы предсказали два гена как возможные тиониноподобные пептиды (Pr3c22_12110V3.1, Pr3c19_18370V3.1) у *P. patens*. Эти гены не аннотированы в Phytozome v12. По одному гену было предсказано в качестве возможных тиониноподобных пептидов у *M. polymorpha* и в трех геномах *Anthoceros*. Два белка-прекурсора были

предсказаны как тиониноподобные пептиды в *S. fallax*. Мы также провели множественное выравнивание этих белков-прекурсоров с известными прекурсорами тиониноподобных пептидов из других растений (рис. 5 С).

3.1.1.3 Группа пептидов “неизвестного” действия

К этой группе мы отнесли предсказанные предшественники пептидов, имеющих известные домены, позволяющие отнести их к известному семейству, однако действие которых в бриофитах не до конца понятно.

В этой группе оказались пептиды от таких известных семейств, как ингибиторы субтилизина, фитоцистатины, ингибитор протеиназ II типа картофеля, а также ингибиторы тринспина Кунитца, семейство ингибиторов Казала и цитотоксический Т-лимфоцит антиген-2 альфа (CTLA). Нам удалось идентифицировать по 1–2 гена предположительно фитоцистатина у всех изучаемых видов, кроме *M. polymorpha*, а также по 1 потенциальному гену ингибиторов субтилизина у Антоцеротовых и 2 гена у *S. fallax*, и 1 ген, предсказанный как ингибитор Казала, у *S. fallax*. Самое большое количество генов среди всех потенциальных коротких секретлируемых пептидов, предсказанных для всех исследуемых видов, оказалось для цитотоксического Т-лимфоцит антигена-2 альфа.

Цитотоксический Т-лимфоцит антиген-2 альфа (CTLA)

Пептиды CTLA участвуют в регуляции активности цистеиновых протеаз и могут ингибировать их активность [196]. Наш анализ выявил 13 генов, кодирующих потенциальные пептиды CTLA у *P. patens* (Pr3c2_30400V3.1.p и еще несколько). Анализ обогащения терминов генной онтологии показал, что эти белки-прекурсоры участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Прекурсоры пептидов CTLA также были предсказаны у всех других исследованных видов. Наибольшее количество белков-прекурсоров было идентифицировано у *S. fallax*.

Кроме того, мы идентифицировали прекурсоры специфического для клубеньков белка, богатого глицином (NodGRP), у всех исследованных видов бриофитов. Функции этой группы коротких секретлируемых пептидов у бриофитов требуют дальнейшего изучения. Также с помощью SPADA мы предсказали несколько низкомолекулярных цистеин-богатых пептидов (LCR) в *P. patens*, большинство из которых были аннотированы SPADA *de novo*. Прекурсоры LCR также были предсказаны в *S. fallax*, *A. punctatus* и *A. agrestis* линии Oxford, но не в *M. polymorpha* и *A. agrestis* линии Bonn. Также с помощью SPADA мы предсказали наличие прекурсоров группы специфичных для клубеньков богатых цистеином пептидов (NCR) у *M. polymorpha*, у обеих линий *A. agrestis* и у *A. punctatus*, но они не были идентифицированы у *P. patens* и *S. fallax*.

Также мы нашли прекурсоры, предсказанные как “известные короткие секретлируемые пептиды” из разных групп, которые встречались исключительно у нескольких видов: прекурсоры пептидов LEED.PEED (LP) в *A. agrestis* линии Oxford и *A. punctatus*; прекурсоры ингибитора субтилизина (SubIN) в трех геномах *Anthoceros* и в *S. fallax*; прекурсор Tapetum Determinant 1 (TPD) у *A. punctatus*; и некоторые другие.

Мы обнаружили, что паттерны распределения коротких секретлируемых пептидов, идентифицированных у *S. fallax*, отличаются от *P. patens* и *M. polymorpha*, скорее напоминая таковые у Антоцеротовых. В геноме *S. fallax* было идентифицировано несколько уникальных прекурсоров коротких секретлируемых пептидов, таких как MtSUBPEP, ProSCOOP, семейство ингибиторов Казала и растительные дефензин-подобные пептиды (PDL).

В заключение можно сказать, что количество предсказанных генов, кодирующих короткие секретлируемые пептиды, выше у мхов, чем у Антоцеротовых и печеночников, но все же ниже, чем у покрытосеменных растений, таких как *Medicago truncatula* (рис. 4 С).

3.1.2 Анализ транскриптома *P. patens* при заражении фитопатогенами

Для поиска кандидатов новых видоспецифичных семейств иммунных пептидов, а также для подтверждения роли найденных в геноме гомологов известных генов коротких секретлируемых пептидов как регуляторов иммунного ответа мы проанализировали транскриптом, полученный после заражения мха *P. patens* патогенным грибом *Botrytis cinerea* [171]. В последнее время было показано, что существующие способы аннотации геномов и транскриптомов пропускают много потенциально функциональных рамок считывания. Поэтому мы заново предсказали открытые рамки считывания в транскриптоме с новыми параметрами, отфильтровали их по длине, наличию сигнальной последовательности и по изменению уровня транскрипции при заражении (\log_2 fold change > 1; $P < 0,05$).

Нами были предсказаны 1749 потенциальных белков-предшественников (длина < 200 а.о.), гены которых дифференциально экспрессировались при заражении. После сравнения с нашими результатами предсказания коротких секретлируемых пептидов в геноме мха мы идентифицировали кандидаты из 7 семейств “известных коротких секретлируемых пептидов”: EPFL, MEG, nsLTP, CAPE, STIG-GRI, фитоцианины, а также семейство, обозначенное как c121 (неизвестная функция).

Представители семейства пептидов EPFL отвечают в числе прочего за развитие клеток устьиц. Нами были идентифицированы несколько транскриптов генов, кодирующих ортологи EPFL, имеющие соответствующую аннотацию в геноме мха [188]. Помимо дифференциально-экспрессирующихся аннотированных генов EPFL (Pr3c6_12270; Pr3c1_26030; Pr3c23_5720; Pr3c23_11350; Pr3c24_9860; Pr3c16_1430), мы также предсказали несколько схожих транскриптов, вероятно, образующих семейство, имеющее структуру, подобную известным представителям EPFL пептидов из других растений (рис. 6 А и В). Согласно данным транскриптомного анализа экспрессия генов данного семейства, особенно Pr3c6_12270, значительно повышалась после заражения. Также мы

обнаружили ещё один цистеин-богатый пептид, не аннотированный прежде у *P. patens*, но отнесенный в нашем предсказании к группе Maternally Expressed Genes (MEG). MEG пептиды были обнаружены у кукурузы, а впоследствии и у других покрытосеменных [197]. Соответствующие гены специфически экспрессируются в транспортных клетках эндосперма кукурузы, однако роль этого пептида не до конца понятна. Существует предположение, что MEG пептиды могут выполнять структурную или защитную роль [190]. Еще одним семейством цистеин-богатых пептидов, экспрессия генов которого значительно повышалась при заражении, оказался предсказанный белок переноса липидов (Pr3c10_4720; Pr3c14_3810; Pr3c11_7470; Pr3c11_7530; Pr3c11_12520; Pr3c11_3860). Белки переноса липидов обнаружены у многих растений и выполняют широкий спектр функций, в том числе защитных. Однако об их действии у бриофитов известно немного. Недавнее исследование показывает, что вышеупомянутые цистеин-богатые пептиды действительно участвуют в регуляции иммунного ответа у покрытосеменных, в частности, у томата, однако их роль в иммунитете бриофитов ещё предстоит изучить [190].

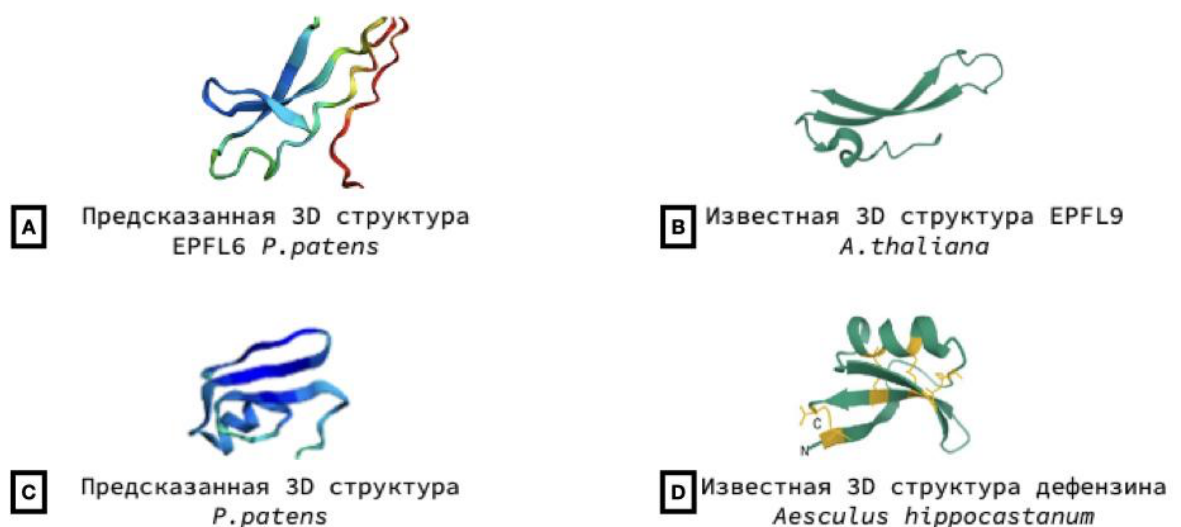


Рис. 6. 3D структура пептидов **A** - EPFL6 мха *P. patens*, **B** - EPFL9 арабидопсиса [197], **C** - предположительного гомолога дефензина мха *P. patens*, **D** - дефензина *Aesculus hippocastanum* [98], предсказанная с помощью инструмента AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) для гомологов из *P. patens*.

Известным защитным пептидом, транскрипты генов вероятных гомологов которого мы обнаружили в транскриптоме после заражения, оказался CAPЕ, выщепляющийся из функционального белка PR1. Последовательность этого пептида у мха содержит консервативный мотив на С-конце, соответствующий известным функциональным CAPЕ пептидам у покрытосеменных.

Кроме того, среди дифференциально повышающихся при заражении транскриптов мы нашли транскрипты генов, предсказанных нами как фитоцианины, а также STIG-GRI. Их роль в иммунном ответе на данный момент недостаточно изучена.

Кроме вероятных гомологов известных коротких секретлируемых пептидов нами были обнаружены 49 открытых рамок считывания, кодирующих потенциальные кандидаты новых биологически активных пептидов, уровень транскрипции которых повышается в ответ на заражение. 27 из этих транскриптов также ранее были аннотированы как длинные некодирующие РНК. Последовательности некоторых из этих пептидов при анализе tBLASTn в базе данных 1К Транскриптомов (<https://db.cngb.org/onekp/>) показали гомологию с другими видами бриофитов, однако функциональной аннотации для них показано не было. Мы провели анализ их структуры и показали, что некоторые из них могут относиться к известным группам антимикробных пептидов и белков, таких как дефензины (рис. 6 С и D).

3.1.3 Анализ пептидомов *P. patens* после обработки элиситорами стрессового ответа

Как правило, в отличие от других регуляторных пептидов, те из них, которые участвуют в иммунном сигналинге растений, сложнее обнаружить при аннотации геномов, используя инструменты, основанные на выявлении сходства последовательностей. Показано, что многие известные иммунные пептиды являются видо- или родоспецифичными, например, пептиды PEP1, найденные у Крестоцветных, и их возможный функциональный аналог системин, обнаруженный у Пасленовых [38, 199]. Кроме того, защитные пептиды способны

выщепляться из функциональных белков-прекурсоров под действием определенных стрессовых факторов [41, 80, 81]. Также в ответ на стрессовый стимул гены прекурсоров биоактивных пептидов не всегда повышают свою транскрипцию, вместо этого стрессовые факторы активируют гидролиз соответствующих белков-прекурсоров, как, например, это было показано для белка PROPEP1, связанного с вакуолями, из которого протеазы из семейства метакаспаз выщепляют пептиды PEP1 в условиях изменения концентрации Ca^{2+} [91]. Такие изменения в паттерне расщепления белков могут быть детектированы с помощью методов пептидомики. При этом, преимуществом пептидомики является идентификация нативных пептидомов, образующихся в клетках естественным образом, а не триптических пептидов как при стандартном протеомном анализе. В связи с этим мы решили выполнить поиск предполагаемых кандидатов в биоактивные пептиды, в эндогенных пептидных пулах модельного объекта мха *Physcomitrium patens*. Для индукции выщепления таких пептидов, мы использовали обработку стрессовыми гормонами с последующей оценкой изменений образующихся пулов пептидов, выщепляющихся из маленьких белков (< 200 а.о.), и их пост-трансляционных модификаций. Кроме того, мы также использовали обработку известным элиситором, хитозаном, растений мха дикого типа, а также мутантных по гену одного из его рецепторов.

3.1.3.1 Стрессовые гормоны индуцируют гидролиз маленьких белков

Известно, что прекурсоры многих коротких секретлируемых пептидов растений это маленькие (< 200 а.о.) белки без установленных функций [200]. Мы использовали масс-спектрометрический анализ, для того чтобы идентифицировать потенциально биоактивные секретлируемые пептиды в пептидомах растений *P. patens*, обработанных стрессовыми фитогормонами. На первом этапе мы выделили и проанализировали эндогенные пептиды из культуральной жидкости *P. patens*. Используя масс-спектрометрический анализ, мы обнаружили примерно 2500 эндогенных пептидов, выщепляющихся из 270 белков-прекурсоров, длиной менее 200 а.о., что составляет около 7% от всего пептидома (рис. 7 А, В). Среди этих

белков 8% не имеют предсказанной функции и, таким образом, могут быть потенциальными прекурсорами пептидных гормонов. Кроме того, мы идентифицировали масс-спектры таких “известных коротких секретлируемых пептидов”, предсказанных нами ранее в геноме мха, как белки переноса липидов и фитоцианины, а также “вероятно известных” и “предполагаемых коротких секретлируемых пептидов” с “неизвестным” способом действия, как NodGRP, NCR, LCR, фитоцистатин, и “регуляторных” пептидов, таких как Leginsulin, EPFL и Rotundifolia/Devil.

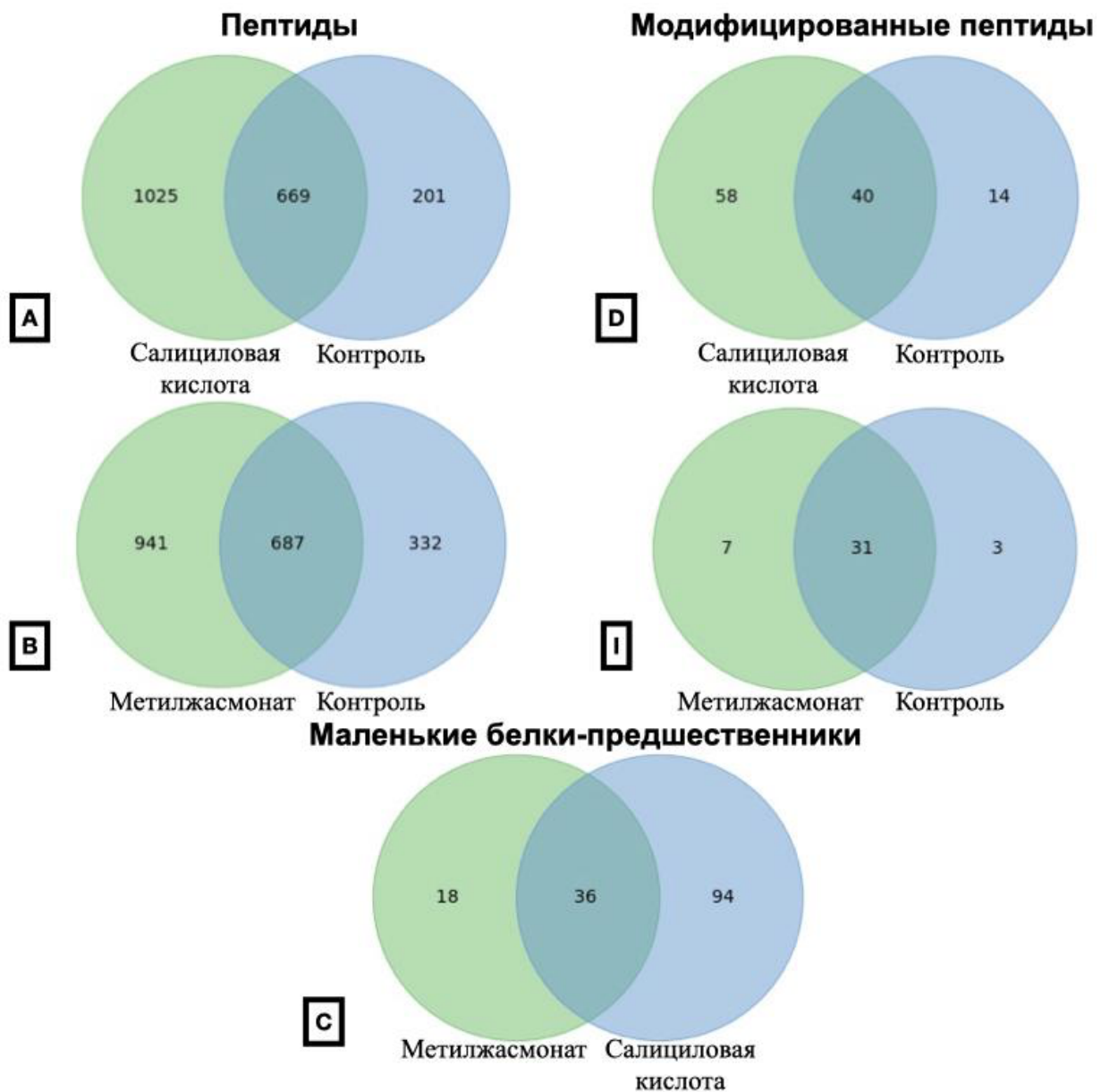


Рис. 7. Диаграммы Венна, демонстрирующие сравнение **A** - секретлируемых пептидов после обработки салициловой кислотой и в контрольных образцах; **B** -

секретируемых пептидов после обработки метилжасмонатом и в контрольных образцах; **С** - маленьких белков-предшественников (< 200 а.о.) секретируемых пептидов, индуцированных обработкой салициловой кислотой и метилжасмонатом; **Д** - пептидов с посттрансляционными модификациями в секретоме после обработки салициловой кислотой и в контрольных образцах; **Г** - пептидов с посттрансляционными модификациями в секретоме после обработки метилжасмонатом и в контрольных образцах.

Далее мы оценили, как влияет индукция стрессового ответа на внеклеточный пептидом нашей модели - *P. patens*. Для этого мы обработали жидкую культуру мха хорошо известными стрессовыми гормонами: салициловой кислотой и метилжасмонатом, и проанализировали секретируемые пептидные пулы.

Используя масс-спектрометрический анализ, мы идентифицировали около 1900 внеклеточных пептидов в контрольных и обработанных 400 мкМ салициловой кислотой образцах (рис. 7 А). Сравнительный анализ этих пептидомов показал, что салициловая кислота индуцирует протеолиз небольших белков, включая белки с неизвестной функцией. Так, мы идентифицировали эндогенные пептиды от 130 коротких прекурсоров в секретоме, обработанном салициловой кислотой (рис. 7 С). Среди них были связанные со стрессом белки, такие как реморин, маленький белок теплового шока HSP20 и другие. Маленькие белки-прекурсоры составляли примерно 30% от всех прекурсоров, уникальных для обработанных салициловой кислотой образцов. Из них 15% белков не имели аннотации, что позволило предположить, что некоторые из них можно отнести к вероятным прекурсорам биоактивных пептидов. Кроме того, с помощью алгоритма BLASTp мы провели поиск гомологичных белков в базе NCBI среди других растений и показали, что несколько таких коротких нефункциональных белков, чей протеолиз индуцируется только при стрессе, обнаруживались только у бриофитов или даже эксклюзивно у *P. patens*, что может указывать на новые специфичные семейства сигнальных пептидов, свойственные только несосудистым растениям. Мы также наблюдали увеличение количества пептидов С-концевых последовательностей маленьких

прекурсоров при обработке салициловой кислотой по сравнению с контролем (29,6% в контроле vs 40,2% таких пептидов в обработке).

Далее мы провели масс-спектрометрический анализ пептидов из культуральной жидкости *P. patens*, обработанной 400 мкМ метилжасмоната, и идентифицировали около 2000 пептидов в контрольных и обработанных образцах (рис. 7 В). Обработка метилжасмонатом привела к расщеплению 54 маленьких прекурсоров в культуральной жидкости мха *P. patens* (рис. 7 С). При этом 20,4% из них относились к белкам с неизвестной функцией, большая же часть относилась к хлоропластным и гистонным белкам. Поиск с помощью BLASTp гомологов из других растений в базе NCBI показал, что небольшая часть этих нефункциональных белков (7,4%), так же, как и в случае с индукцией салициловой кислотой, обнаруживалась только у *P. patens* или у других бриофитов, но не у сосудистых растений.

Из предсказанных нами прекурсоров “известных” и “вероятно известных коротких секретлируемых пептидов” в индуцированных стрессовыми гормонами пептидомах мы обнаружили пептиды от фитоцианинов, прекурсора RALF пептидов (который также был уже аннотирован; Pr3c6_7200), а также от фитоцистатина и цистеин-богатого белка корневого чехлика (Root Cap). Среди белков-прекурсоров с неизвестной функцией нами были выделены несколько кандидатов, в том числе Pr3c21_4350 и Pr3c14_22870, меняющие свой профиль расщепления под действием стрессовых факторов. Последовательности пептидов от этих белков, идентифицированные в индуцированных гормонами пептидомах (INIINAPLQGFKIA; EAAPAPVAEVEAPKAEE), встречаются несколько раз внутри последовательностей соответствующих белков, что напоминает известный иммунный пептид (HypSys), гомологи которого в различных видах растений семейства Пасленовые имеют по несколько копий внутри своего белка-прекурсора [201].

3.1.3.2 Анализ пост-трансляционных модификаций (ПТМ) внеклеточных пептидов

Многие пептидные гормоны растений подвергаются пост-трансляционные модификациям, таким как гидроксирование пролина, сульфирование тирозина и гликозилирование гидроксипролина [200]. Например, такие модификации были найдены у CLE, CEP и RALF пептидов, секретируемых корнями сосудистых растений [202]. Для поиска в пуле внеклеточных пептидов известных и новых пептидных гормонов мы проанализировали данные масс-спектрометрического анализа со следующими модификациями: гидроксирование пролина, сульфирование тирозина и N-концевое ацетилирование. Наш анализ показал, что приблизительно 17% эндогенных пептидов в контроле содержали гидроксированный пролин. Обработка салициловой кислотой привела к значительному снижению количества гидроксированных пептидов (до 8%; тест Фишера $p\text{-value } 7,29 \times 10^{-8}$). При этом всего было идентифицировано 58 уникальных пост-трансляционно модифицированных эндогенных пептидов, индуцированных обработкой салициловой кислотой (рис. 7 D). Пропорции пептидов, ацетилированных с N-конца, остались прежними – 7,6% и 7,9% внеклеточных пептидов в контроле и обработанных салициловой кислотой, соответственно. Четыре пептида в контрольных образцах оказались сульфированными, тогда как после обработки салициловой кислотой мы не нашли подобных пептидов.

Анализ терминов геномной онтологии (GO terms) прекурсоров модифицированных пептидов показал, что наиболее значимыми биологическими процессами были ионный мембранный транспорт, регуляция транскрипции и трансляции, окислительно-восстановительные процессы, метаболизм углеводов и протеолиз. Возможно, что внутриклеточные и мембранные белки производят пептиды, которые, в случае стрессовых условий, проходят специфическую пост-трансляционную модификацию.

Затем мы оценили количество модифицированных пептидов, образующихся от маленьких прекурсоров. В контроле были идентифицированы четыре пептида происходящих от маленьких белков-прекурсоров с гидроксированием пролина:

FLLNELALP(hy)AG, HSSDP(hy)NFP(hy)FSIK, QP(hy)GSSACVTP(hy)LP(hy)QLS и VTENLEVMP(hy)STTIR. Размер этих пептидов и количество модификаций похожи на известные пептидные гормоны, такие как CEP и CLE. Три из соответствующих прекурсоров являются белками с неизвестной функцией, в то время как четвертый – белком HIKESHI (посредник ядерного импорта белка теплового шока). Среди модифицированных пептидов, образующихся при обработке салициловой кислотой, мы нашли два пептида с гидроксильным пролином – GP(hy)SLIFP(hy)ARSPV и VAVKYYSDDW(hy), – один из них от нефункционального белка, а другой от белка ZETA-COAT (связанный с везикулами).

Затем мы проанализировали эндогенные внеклеточные пептиды *P. patens* на наличие гидроксильных и гликозилированных остатков пролина и сульфированных остатков тирозина до и после обработки метилжасмонатом (рис. 7 I). В результате анализа было обнаружено, что, как в контроле, так и при обработке, для примерно 10% эндогенных пептидов характерно наличие пост-трансляционных модификаций, причем более 90% из них были гидроксильными по остаткам пролина, как и в случае обработки салициловой кислотой. При этом, как в случае с салициловой кислотой, обработка метилжасмонатом приводила к увеличению общего числа модифицированных пептидов и появлению 7 уникальных.

Наши результаты доказывают, что обработка стрессовыми фитогормонами меняет секретируемый пептидом и приводят к выщеплению уникальных модифицированных пептидов и появлению пептидов от новых белков-прекурсоров по сравнению с контрольными образцами. Таким образом, процесс гидролиза белков в растениях носит не полностью случайный характер, находясь под влиянием различных факторов. Увеличение количества выщепляемых пептидов или появление новых в индуцированных пептидомах может указывать на их потенциальную биологическую активность, создавая базу для поиска новых регуляторов различных процессов.

3.1.3.3 Обработка хитозаном стимулирует образование пептидов

Элиситорами иммунного ответа, помимо стрессовых гормонов, могут служить и другие соединения, например фрагменты клеточной стенки фитопатогенов, узнаваемые рецептор-подобными киназами [48]. Мы предположили, что активация иммунного ответа также может оказывать влияние на формирование пулов потенциальных биологически активных пептидов, как и гормоны, меняя паттерны гидролиза белков и индуцируя образование новых пептидов. Для проверки этой гипотезы на нашем модельном объекте *P. patens* мы выбрали хитин, одним из рецепторов которого является рецептор-подобная киназа CERK1.

Показано, что у мха хитин, а также его производное хитозан, будучи признанными комплексом паттерн-распознающих рецепторов CERK1 и LYK5, запускают иммунный сигнальный каскад, как у сосудистых растений [14]. Геном *P. patens* содержит четыре гомолога хитинового рецептора арабидопсиса AtCERK1, но только одна нокаутная линия (*Δcerk1*) показала нечувствительность к хитину [40]. Мы использовали масс-спектрометрический анализ для изучения пулов эндогенных секретируемых пептидов, индуцированных обработкой хитозаном. Чтобы определить пептиды, специфически индуцированные хитозаном, мы также провели масс-спектрометрический анализ пептидома из культуральной жидкости мутанта *Δcerk1*. Следует отметить, что мы не можем исключить возможность того, что эта мутантная линия в той или иной степени способна узнавать хитин, за счет частичного связывания со вторым рецептором - LYK5, чьи гомологи также были найдены в геноме мха [14].

Учитывая естественную гетерогенность нативных пептидных пулов, для дальнейшего анализа мы брали пептиды, идентифицированные по меньшей мере в двух биологических повторах. Сначала мы оценили, как обработка хитозаном влияет на образование эндогенных пептидов у мха дикого типа. В культуральной жидкости дикого типа мха, обработанном хитозаном, было идентифицировано 1187 уникальных пептидов из 297 прекурсоров. Большая часть прекурсоров в образцах, обработанных хитозаном, принадлежит хлоропластным, транспортным и

протеолитическим белкам, в том числе белкам, участвующим в трансмембранном транспорте аминокислот, и несколько меньшая часть приходится на факторы трансляции, субъединицы рибосом и шапероны. Мы обнаружили, что для 6% этих прекурсоров функция неизвестна, причем половина из них имели длину около 200 а.о. Учитывая высокую изменчивость нативных пептидомов мы отбросили пептиды, полученные из прекурсоров, идентифицированных также в контрольных образцах. В результате фильтрации был получен список из 52 пептидов из 38 прекурсоров, появляющихся только в пептидоме культуральной жидкости, обработанной хитозаном. Эти прекурсоры включали белки, связанные со стрессом, такие как Pr3c2_12150 (молекулярный шаперон DnaK), Pr3c20_21140 (белок, связывающий кальций); белки клеточной стенки, такие как Pr3c14_18450 (EXPANSIN-A5), Pr3c24_15950 (белок семейства рецептор-подобных протеинкиназ с лейцин-богатыми повторами), Pr3c5_23400 (пектинэстераза). Также анализ белков-прекурсоров показал, что 30% из них были меньше 250 а.о., включая Pr3c1_19210V3 (белок неизвестной функции (DUF1118)), рибосомальные белки L28e и S19e и Pr3c26_5890V3 (пероксидаза).

Анализ терминов геномной онтологии показал, что эти прекурсоры участвуют в таких биологических процессах как фотосинтез и стабилизация фотосистем, проведение сигнала, белковая пептидил-пролил изомеризация, сворачивание белка, трансляция, элонгация и терминами трансляции и их регуляция, убиквитин-зависимый процесс катаболизма белков, декарбоксилирование глицина, транспорт белка, в том числе внутриклеточный, транспорт в нуклеоцитоплазме.

Далее мы исключили из полученного при обработке хитозаном дикого типа списка пептидов те, которые были идентифицированы также в мутантах *Δcerk1*, чтобы проверить, какие пептиды реагируют именно на элиситор. Мы идентифицировали 14 пептидов, специфически появляющихся только как минимум в двух повторах обработанных хитозаном секретлируемых пептидомов дикого типа. Два пептида из этого списка выщеплялись из С-конца пероксидазы длиной 165 аминокислот (Pr3c26_5890). Пероксидазы участвуют во многих клеточных процессах, таких как развитие и реакция на стресс.

Обнаружение биоактивных пептидов с помощью масс-спектрометрии может быть затруднено из-за их низкой концентрации и быстрой деградации в клетках. Поэтому мы также рассмотрели пептиды и прекурсоры, идентифицированные только в одном повторе секретлируемых пептидомов, обработанных хитозаном. Сначала мы отфильтровали пептиды, обнаруженные в контрольных образцах. Среди предшественников 5320 пептидов из образцов, обработанных хитозаном, мы идентифицировали кальмодулин (Pr3c10_21490), белок, связанный с хитиназой (Pr3c1_30410), вероятный белок переноса липидов (LTP_2) (Pr3c19_2080), лактопероксидаза (Pr3c26_5890), цистатин-С (Pr3c9_24090) - ингибитор цистеиновой протеиназы, несколько актиновых белков (Pr3c3_33410) и кукумизинов (Pr3c22_10010). Затем мы отобрали 430 маленьких (до 250 а.о.) прекурсоров, появляющихся в образцах, обработанных хитозаном.

После исключения пептидов, которые также появлялись у мутантов *Δcerk* при обработке хитозаном, мы идентифицировали 9 пептидов из небольших прекурсоров с неизвестной функцией, специфически индуцируемых хитозаном. Эти пептиды могут обладать потенциальной биологической активностью и участвовать в защитных реакциях у растений.

Далее, мы сравнили полученные данные с результатами обработки мутантов элиситором, чтобы проверить, как изменился паттерн гидролиза белков при нарушенной системе сигналинга. Мы показали, что в этом случае обработка привела к расщеплению белков-прекурсоров тех же групп, что и в диком типе. Дополнительно мы идентифицировали пептиды от митохондриальных белков. Анализ терминов геной онтологии этих прекурсоров также показал, что они принимают участие в схожих биологических процессах, что и прекурсоры дикого типа, и, кроме того, в процессах различного метаболизма, синтеза клеточной стенки и ответа на стрессы.

Таким образом, обработка хитозаном приводит к выщеплению новых уникальных пептидов как у дикого типа, так и у мутантов. Однако достоверной разницы между количеством стабильно выщепляющихся пептидов дикого типа и мутантов, как и между их интенсивностями, найдено не было (рис. 8 А, В). Это

может указывать на то, что при ответе на специфический стресс ключевую роль играют конкретные последовательности, а не их количество.

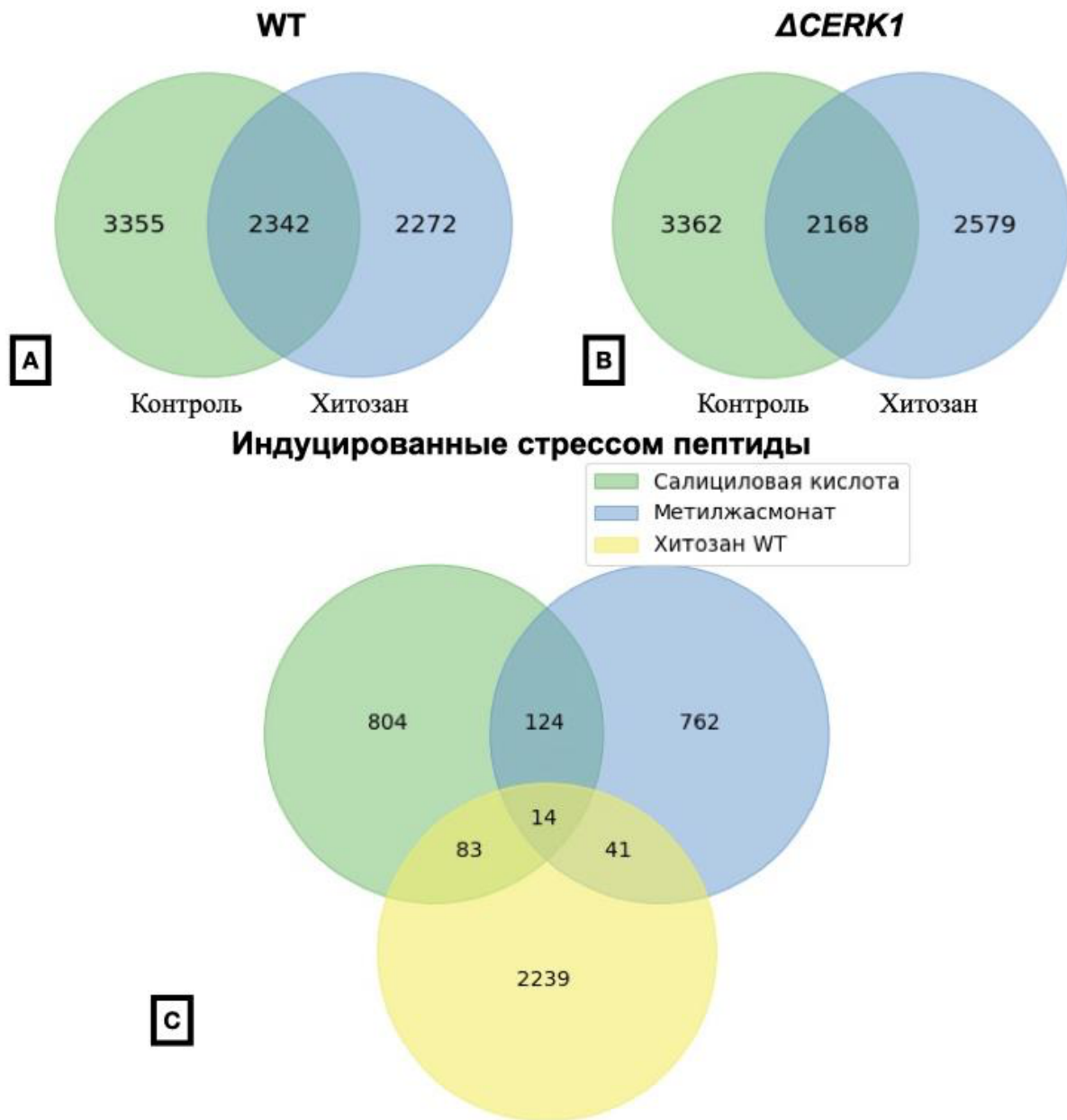


Рис. 8. Диаграммы Венна, демонстрирующие сравнение секретируемых пептидов, индуцированных обработкой 0,1 мг/мл хитозана, и в контрольных образцах в растениях **A** - дикого типа и **B** - нокаутированных по гену рецептора CERK1; а также **C** - сравнение секретируемых пептидов, индуцированных тремя стрессовыми факторами: 400 мкМ салициловой кислоты, 400 мкМ метилжасмоната и 1 мг/мл хитозана.

Так, к примеру, среди новых пептидов, появляющихся только при обработке, мы нашли кандидаты биоактивных пептидов, выбранных нами в предыдущих

главах при обработке стрессовыми гормонами (INIINAPLQGFKIA; EAAPARVAEVEAPKAEЕ) (рис. 8 С). Интересно отметить, что эти кандидаты не обнаружались среди пептидов, выщепляющихся после обработки в мутантах, что может указывать на их роль в регулировании защитного ответа, индуцированного сигналингом различных стрессовых факторов.

Далее, мы решили найти эндогенные пептиды от белков-прекурсоров, которые были предсказаны как “известные” или “вероятно известные короткие секретлируемые пептиды”, во внеклеточных пептидомах. Нами обнаружены гевеиноподобные пептиды в *cerk*-мутантных линиях при обработке хитозаном (Pr3c1_30410V3.1.p). Три уникальных пептида содержали мотив цистеин-богатых пептидов, образующих дисульфидные мостики между следующими цистеиновыми остатками: C1–C4, C2–C5 и C3–C6. Таким образом, эти пептиды, скорее всего, являются гевеинами. Однако нам не удалось обнаружить такие пептиды в образцах дикого типа, обработанных хитозаном. Низкая концентрация и быстрая деградация эндогенных пептидов в клетках и внеклеточном пространстве могут сильно затруднить выделение и идентификацию некоторых пептидов. Таким образом, мы не можем утверждать, что определенные пептиды не вырабатываются в растениях, используя только масс-спектрометрический анализ.

И в стресс-индуцированных, и в контрольных образцах мы идентифицировали потенциальные пептиды PCY, выщепляющиеся из Pr3c5_23940V3.1.p, Pr3c16_22330V3.1.p, pcy_Chr04_13M_1 (ген, предсказанный SPADA *de novo*). При этом представленность потенциальных цистеин-богатых пептидов PCY во внеклеточных пептидомах повысилась в результате обработки хитозаном, что также может указывать на их вовлеченность в защитный ответ.

Согласно нашим данным, различные стрессы могут приводить к расщеплению одинаковых прекурсоров и генерации тех же сигнальных пептидов. Чтобы проверить это мы сравнили полученные данные после обработки растений дикого типа хитозаном с данными после обработки стрессовыми гормонами (салициловой кислоты и метилжасмоната). Мы обнаружили, что между обработками метилжасмонатом и салициловой кислотой идентифицировалось

большее количество одинаковых пептидов по сравнению с другими вариантами (рис. 8 С). Общие для всех трех элиситоров пептиды выщеплялись из прекурсоров, большинство которых принимает участие в фотосинтезе. Кроме этого, общие пептиды выщеплялись из кукумзина (Pr3c2_4520) - белка, принимающего участие в стрессовом ответе, а также из нефункциональных белков. Среди общих пептидов, индуцируемых обработками всеми тремя элиситорами, мы отобрали ряд новых многообещающих кандидатов сигнальных пептидов для дальнейшего синтеза и функционального анализа. Среди них были пептиды, от белков-прекурсоров Pr3c14_22870V3.1.p, Pr3c21_4350V3.1.p, а также из Pr3c13_3880V3.1.p и Pr3c17_15750V3.1.p.

3.2 Анализ биологической активности эндогенных пептидов

3.2.1 Изучение роли коротких секретлируемых пептидов RALF в иммунном ответе у *P. patens*

В результате проведенного нами биоинформатического анализа было показано, что в геноме *P. patens* присутствуют как минимум три гена прекурсоров цистеин-богатых пептидов RALF, которые были обозначены как: Pr3c3_15280 – *PpRALF1*; Pr3c6_7200 – *PpRALF2*; Pr3c25_4180 – *PpRALF3*. Известно, что у покрытосеменных данное семейство пептидов, кроме участия в регуляции апикального роста, формирования азотфиксирующих клубеньков и накопления инулина, также участвует в регуляции иммунного ответа [11, 156, 185–187, 203]. Например, при индукции иммунного ответа с помощью патогенных пептидов elf18 последующая обработка некоторыми пептидами AtRALF влияет на генерацию АФК у арабидопсиса [156]. Хотя возможная роль обнаруженных представителей этого пептидного семейства у бриофитов все еще изучается, недавно для двух из трех аннотированных у *P. patens* RALF пептидов – *PpRALF1* и *PpRALF2* – была показана роль в индукции апикального роста и растяжения клеток протонемы [204].

Что касается третьего представителя пептидного семейства RALF у мха *P. patens*, его функция на сегодняшний день еще не была установлена.

Кроме того, на примере пептидного семейства RALF становится очевидным преимущество использования таких простых генетических систем, как мох *P. patens*, для изучения функций представителей таких мультигенных семейств. В геноме арабидопсиса содержится более 30 генов, предсказанных как предшественники RALF пептидов, что существенно затрудняет функциональных анализ каждого из них [156]. У бриофитов, в частности у *P. patens*, как уже упоминалось, в геноме хоть и присутствуют представители из тех же семейств, что и у покрытосеменных, но их репертуар значительно меньше, что позволяет получать мутантные линии по генам каждого из членов этих семейств. Помимо этого, большую часть жизненного цикла такие растения, как мох *P. patens*, проводят в форме гаплоидного гаметофита, что также облегчает анализ изменений, вызванных нокаутом выбранного гена. Учитывая, что покрытосеменные и бриофиты имеют общие консервативные пути передачи сигнала, использование бриофитов в качестве моделей является оправданным.

3.2.1.1 Анализ аминокислотного состава RALF пептидов *P. patens*

Как уже говорилось, члены семейства пептидов RALF отличаются функциональной гетерогенностью в сосудистых растениях, в том числе они играют роль в модуляции иммунного ответа [94]. Показано, что у арабидопсиса экзогенная обработка синтетическими пептидами AtRALF23, AtRALF33, AtRALF34 ингибирует производство активных форм кислорода (АФК), индуцированное обработкой иммунными элиситорами (такими как пептид из патогена elf18), и подавляет рост проростков и корней, тогда как AtRALF17, AtRALF24, AtRALF32 и некоторые другие, напротив, способны индуцировать генерацию АФК [156]. Филогенетический анализ различных семейств наземных растений, проведенный ранее, разделил пептиды RALF на четыре клады. При этом консервативные мотивы RALF пептидов из разных клад различаются между собой, а также есть различия в предсказанных физико-химических свойствах [184]. Мы сгруппировали PpRALF и

AtRALF пептиды, используя метод главных компонент (PCA), отобразив в 2D пространстве процентное содержание аминокислот в каждом из пептидов. Этот анализ выявил четкое разделение, по которому пептиды AtRALF, ингибирующие индуцированную патогенами генерацию АФК, явно кластеризовались вместе (рис. 9 А). PpRALF пептиды группировались вместе с AtRALF пептидами, которые ингибируют индуцированную стрессовыми элиситорами генерацию АФК [156]. Эти результаты согласуются с данными предыдущего филогенетического анализа, где пептиды PpRALF группировались вместе с AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33, AtRALF34 [204]. Эти данные свидетельствуют о том, что общий аминокислотный состав пептидов RALF в некоторой степени отражает их функциональную направленность, при этом пептиды PpRALF могут иметь функции, сходные с пептидами AtRALF, которые участвуют в негативной регуляции иммунного ответа.

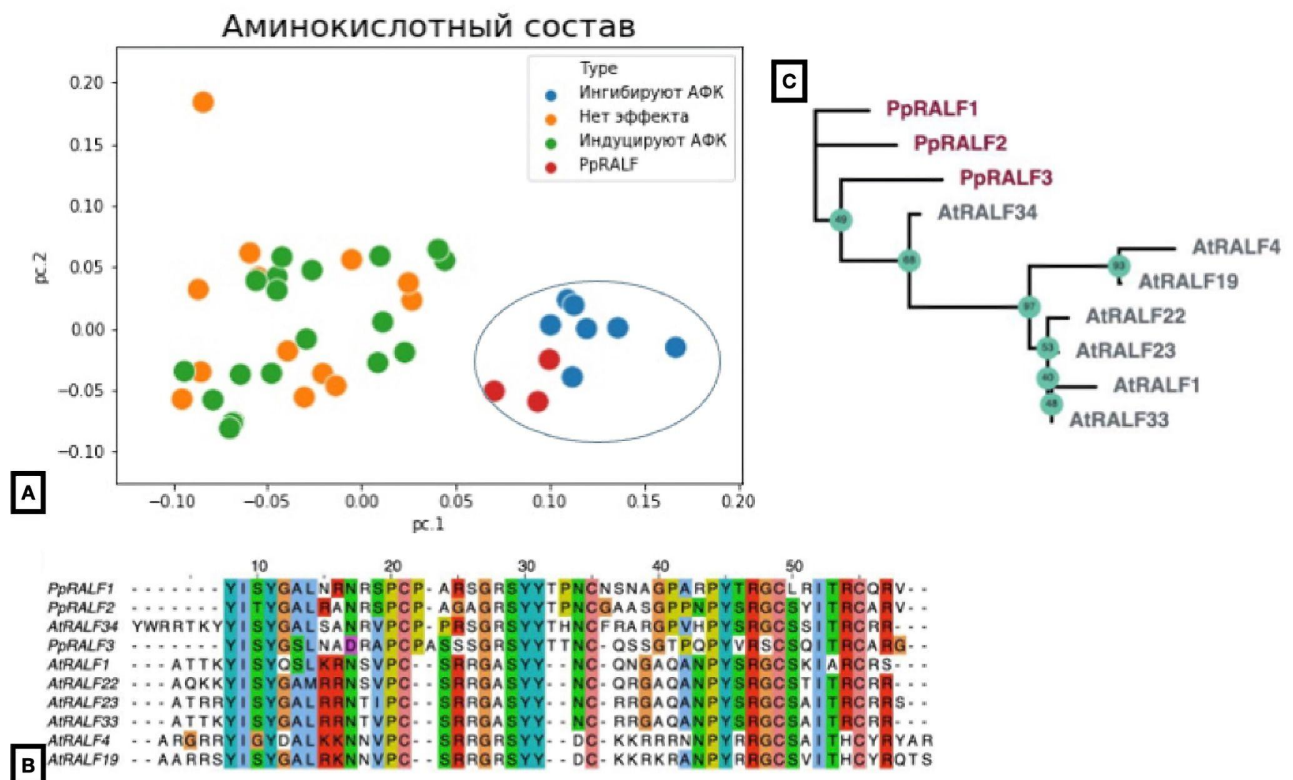


Рис. 9. А - Анализ главных компонент (PCA) аминокислотного состава, рассчитанный с помощью инструмента iFeature [163] для пептидов AtRALF и PpRALF. Пептиды PpRALF мха кластеризуются с известными иммунными пептидами RALF из арабидопсиса, такими как AtRALF1, AtRALF4, AtRALF19,

AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33 и AtRALF34. **В** - Множественное парное выравнивание пептидов PpRALF и пептидов AtRALF, связанных с иммунитетом (AtRALF1, AtRALF4, AtRALF19, AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33, AtRALF34). **С** - Неукорененное филогенетическое дерево с аминокислотными последовательностями RALF из *Physcomitrium patens* (PpRALF1, PpRALF2, PpRALF3) и связанных с иммунитетом AtRALF (AtRALF1, AtRALF4, AtRALF19, AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33, AtRALF34); значения бутстреп (1000 повторов).

Недавно было показано, что PpRALF1 и PpRALF2 в *P. patens*, принадлежащие к Кладе III [184], способствуют апикальному росту и элонгации протонемы [204]. Однако третий член семейства пептидов RALF мха *P. patens* – PpRALF3 – не вошел в анализ Campbell и Turner (2017); он также имеет замену в консервативном мотиве «RGC» (рис. 9 В). Наш филогенетический анализ показал, что пептид PpRALF3 отделился от PpRALF1 и PpRALF2 и образует группу с пептидами AtRALF (рис. 9 С). Пептиды AtRALF, кластеризующиеся вместе с пептидами PpRALF (рис. 9 А), принадлежат к Кладам 1, 2 и 3 [184], что указывает в этом случае на отсутствие корреляции между функциями RALF в иммунном ответе и разделением на клады. Однако роль пептидов PpRALF в ответ на стрессовые условия еще неизвестна.

3.2.1.2 Нокауты генов *PpRALF2* и *PpRALF3* повышают устойчивость растений к заражению патогенами

Химический синтез пептидов, так же, как и получение рекомбинантных белков, связаны с определенными трудностями. Создание соответствующих связей и правильное сворачивание пептидов требует особых условий, в противном случае пептиды могут не сработать надлежащим образом или может потребоваться более высокая концентрация [156]. Поскольку это может не отражать фактический эффект пептидов, для изучения роли RALF пептидов из *P. patens* в иммунном ответе мы решили использовать нокаутные линии. В нашей лаборатории с помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы нокаутные линии по

соответствующим генам прекурсоров пептидов RALF (*PpRALF1*, *PpRALF2*, *PpRALF3*).

Индукция генерации и накопления молекул АФК в клетках и внеклеточном пространстве растений является одной из первых и быстрых реакций иммунной системы на инвазию патогена [205]. Чтобы определить, влияет ли нокаут генов *PpRALF* на иммунный ответ у бриофитов, мы с помощью флуоресцентного красителя DCFH-DA (2,7-дихлорфлуоресцин диацетат) проанализировали генерацию всех внутриклеточных АФК у мха *P. patens* дикого типа и нокаутных линий при обработке индуктором иммунного ответа – драйзелазой. Драйзелаза представляет собой смесь ферментов, разрушающих клеточную стенку, из *Basidiomycetes* sp., которая сопоставима с коктейлем ферментов, выделяемых грибными патогенами во время инфекции [206].

Мы обнаружили, что уровень накопления молекул АФК был значительно снижен в линиях, нокаутированных по генам *PpRALF1* и *PpRALF2*, по сравнению с растениями дикого типа и нокаутной линией гена *PpRALF3* после обработки драйзелазой (рис. 10 А; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки $P < 0,001$). Более того, фоновый уровень молекул АФК в линиях с нокаутом гена *PpRALF3* без обработки был значительно выше, чем у других генотипов (рис. 10 А; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки $P < 0,001$). Можно предположить, что это может быть связано с вероятной ролью *PpRALF3* пептида в модуляции иммунного ответа, как это было показано, например, для пептидов *AtRALF23* и *AtRALF33*, негативно регулирующих иммунный ответ и ингибирующих патоген-индуцированную генерацию АФК у арабидопсиса.

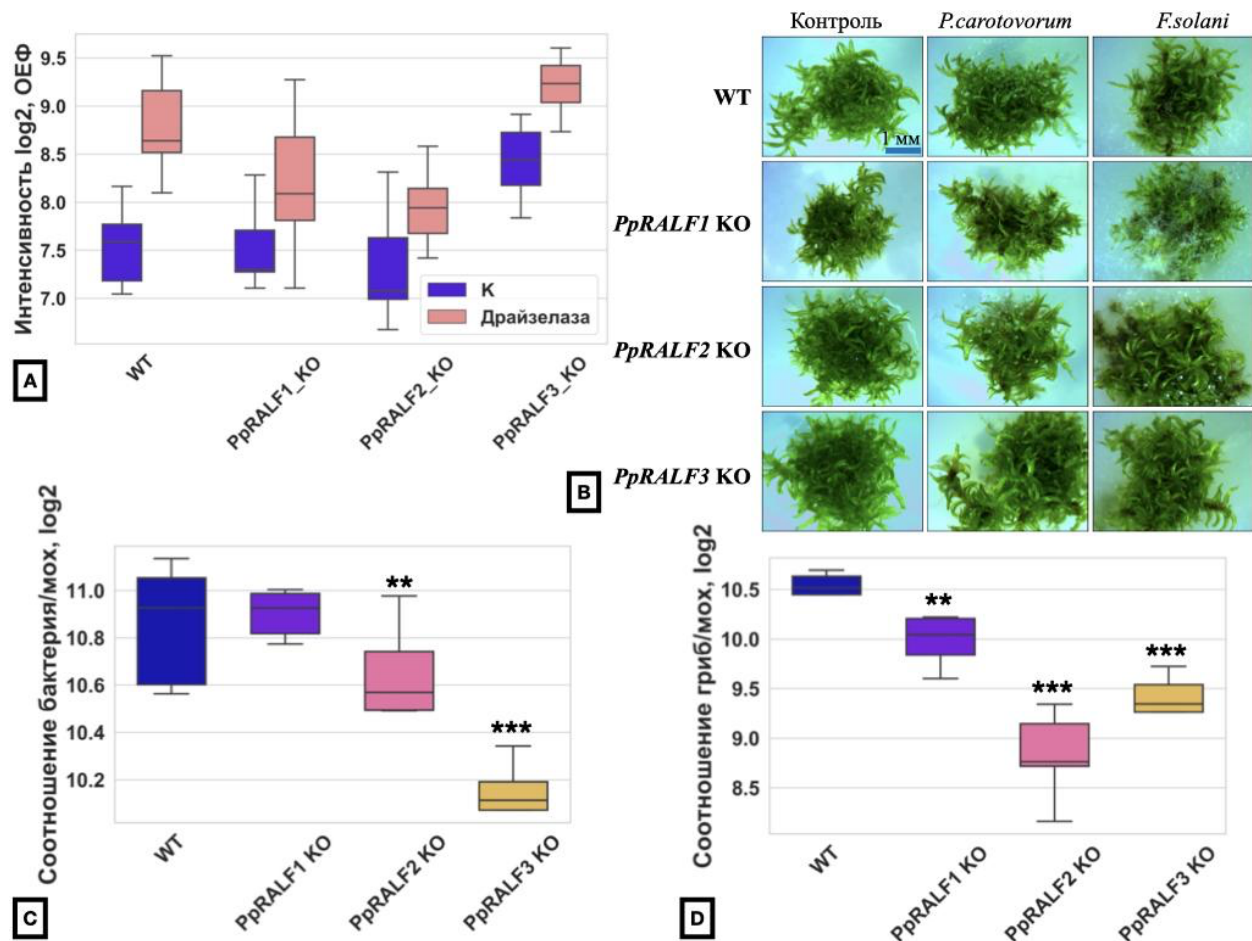


Рис. 10. **А** - Влияние нокаутов генов *PpRALF* на генерацию АФК в растениях дикого типа и нокаутных линиях, обработанных 0,0025% драйзелазы (ОЕФ - относительные единицы флуоресценции); **В** - Развитие симптомов после заражения бактерией *P. carotovorum* и грибом *F. solani* на 7 dpi у растений мха дикого типа и нокаутных линий по генам *PpRALF1*, *PpRALF2* и *PpRALF3*. Масштабная линейка: 1 мм; **С** - Отношения концентраций ДНК *P. carotovorum* к геномной ДНК *P. patens*, которые были оценены с помощью количественного анализа ПЦР. **Д** - Отношения концентраций ДНК *F. solani* к геномной ДНК *P. patens*, которые были оценены с помощью количественного анализа ПЦР. Показаны результаты шести независимых экспериментов. Для результатов количественной ПЦР был проведен анализ дисперсии и апостериорный тест Тьюки (**P < 0,01; ***P < 0,001).

Далее мы изучили возможные функции пептидов PpRALF в защитном ответе растений *P. patens* при заражении фитопатогенами. Для этого мы заразили растения мха двумя известными фитопатогенами - *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* и *Fusarium solani* (рис. 10 В). Ранее была показана способность *P.*

carotovorum инфицировать *P. patens* [207, 208]. Такой фитопатогенный грибок с широким кругом хозяев, как *Botrytis cinerea*, обычно используется для изучения иммунного ответа у бриофитов [171, 209]. Однако *B. cinerea* агрессивен, и после инокуляции растения мха быстро погибают [171, 209]. В связи с этим для сравнения иммунного ответа разных генотипов мы выбрали *Fusarium solani*, который вызывал только легкие симптомы (рис. 10 В). Эти патогены также демонстрируют отчетливые симптомы инфекции, такие как побурение, вызванное некрозом тканей [210, 211]. Чтобы проверить, отличается ли скорость колонизации *P. carotovorum* и *F. solani* на диком типе и нокаутных линиях, растения мха собирали через 7 дней после инокуляции (dpi) и измеряли соотношение концентраций ДНК патогена к ДНК растения с помощью количественной ПЦР, как было описано в работе Castro et al. [74].

Согласно нашим данным, скорость колонизации *P. carotovorum* была значительно выше на растениях дикого типа по сравнению с нокаутными линиями по генам *PpRALF2* и *PpRALF3* (рис. 10 С; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки $P < 0,001$). Однако разница между скоростью роста *P. carotovorum* на растениях дикого типа и на линии, нокаутированной по гену *PpRALF1*, была незначительной (рис. 10 С). Рост *F. solani* был значительно снижен во всех нокаутах генов *PpRALF* по сравнению с растениями дикого типа (рис. 10 D; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки $P < 0,001$). При этом нокаутные линии по генам *PpRALF2* и *PpRALF3* оказались наиболее устойчивыми к заражению *F. solani*. Эти результаты показывают, что нокаут генов *PpRALF* повышает устойчивость *P. patens* к атаке фитопатогенов. По-видимому, пептиды *PpRALF2* и *PpRALF3* играют ключевую роль в негативной регуляции иммунного ответа у *P. patens*, как это было показано для некоторых членов семейства RALF у арабидопсиса.

Для пептидов *AtRALF23* и *AtRALF33* роль в негативной регуляции иммунного ответа выражается в связывании рецепторного комплекса FER-LLG1, подавляя формирование комплексов ключевых участников иммунного пептидного сигналинга [28, 212]. Сверхэкспрессия пептидов *AtRALF23* способствовала повышению чувствительности к *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 и грибу

Plectosphaerella cucumerina в растениях арабидопсиса [11]. Отличительной чертой пептидов AtRALF, участвующих в негативной регуляции иммунного ответа, является наличие двухосновного сайта “RR” для субтилазы S1P [11, 156, 180]. Среди пептидов PpRALF мха только белок-прекурсор RALF1 содержит соответствующий мотив “RRL” [204], хотя, согласно нашим данным, он не играет роли в регуляции стрессового ответа. В то же время наш филогенетический анализ показал, что пептид PpRALF3 явно отличается от двух остальных (рис. 9 С). Таким образом, все еще неясно, каким критериям должны отвечать RALF пептиды, чтобы принимать участие в регуляции иммунного ответа, и могли ли предковые формы RALF пептидов быть многофункциональными, а потому не отличаться разнообразием последовательностей.

3.2.1.3 Транскриптомный ответ на заражение *F. solani* в нокауте *PpRALF3*

У наземных растений иммунный ответ приводит к обширному перепрограммированию транскриптома [171, 213, 214]. У модельного растения арабидопсиса ранние изменения транскриптома включают повышенную экспрессию генов, участвующих в реакции на связывание хитина и повреждение, а также генов, участвующих в ответе на перекись водорода и в модификации клеточной стенки, через 5 минут и через 180 минут после обработки известными элиситорами, соответственно [213]. Ответная реакция мха *P. patens* и маршанции на инфекцию грибного патогена *B. cinerea* и оомицетов включает укрепление клеточной стенки, индукцию экспрессии генов, участвующих в защитных реакциях, а также индукцию шикиматных и фенилпропаноидных путей [74, 171, 209, 215]. Это позволяет предположить, что этот механизм защитного ответа является отличительной чертой предковой стратегии борьбы с патогенами.

В ходе нашего анализа мы обнаружили, что как бактерии *P. carotovorum*, так и гриб *F. solani* размножались гораздо медленнее на линиях, нокаутных по генам *PpRALF2* и *3*, чем на растениях дикого типа и нокаутной линии по гену *PpRALF1*. Это говорит о том, что эти нокаутные генотипы вероятно более устойчивы к фитопатогенам. Чтобы расширить наше понимание роли пептидов PpRALF в

иммунном ответе, мы использовали метод РНК-секвенирования (RNA-seq) для того, чтобы сравнить изменения в транскриптомах растений нокаутной линии по гену *PpRALF3* и дикого типа после заражения *F. solani*. Двенадцать библиотек парных прочтений были сгенерированы из трех биологических повторов контрольных и зараженных грибом *F. solani* растений дикого типа и нокаутной линии *PpRALF3* КО. Всего мы детектировали более 1700 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ; $-1 \leq \log_2 \text{fold change} \leq 1$; $P_{\text{corr}} < 0,05$) в обоих генотипах, при этом 474 ДЭГ были общими для растений дикого типа и нокаутных (рис. 11 А). Сначала мы проанализировали эти 474 общих дифференциально экспрессирующихся генов и обнаружили, что их экспрессия изменялась сходным образом у обоих генотипов (рис. 11 В). Среди них мы обнаружили известные гены, связанные с патогенезом, такие как Pp3c11_1420 (предшественник противогрибного пептида гевеина), Pp3c7_19850, Pp3c17_5160 (белки, связанные с патогенезом) и Pp3c6_6560 (DIRIGENT PROTEIN). Экспрессия этих ДЭГ значимо повышалась в растениях дикого типа и нокаутных по гену *PpRALF3* после заражения. Кроме того, наиболее распространенные ДЭГ в зараженных растениях включали Pp3c3_14700 (субъединица MLRQ комплекса НАДН-убихинон-редуктазы), Pp3c7_12870 (связанный с экспансином-5) и Pp3c6_14470 (связанный с транскрипционным фактором WRKY 38). Показано, что эти гены связаны с иммунным ответом у растений [216, 217]. Большинство общих ДЭГ, экспрессия которых была ингибирована в инфицированных растениях, были Pp3c14_15640 (относящийся к анионному каналу S-типа SLAH2), Pp3c20_17620 (аспарагинсинтетаза), Pp3c3_35020 (относящийся к семейству белков ССТ мотива) и гены с неизвестными функциями.

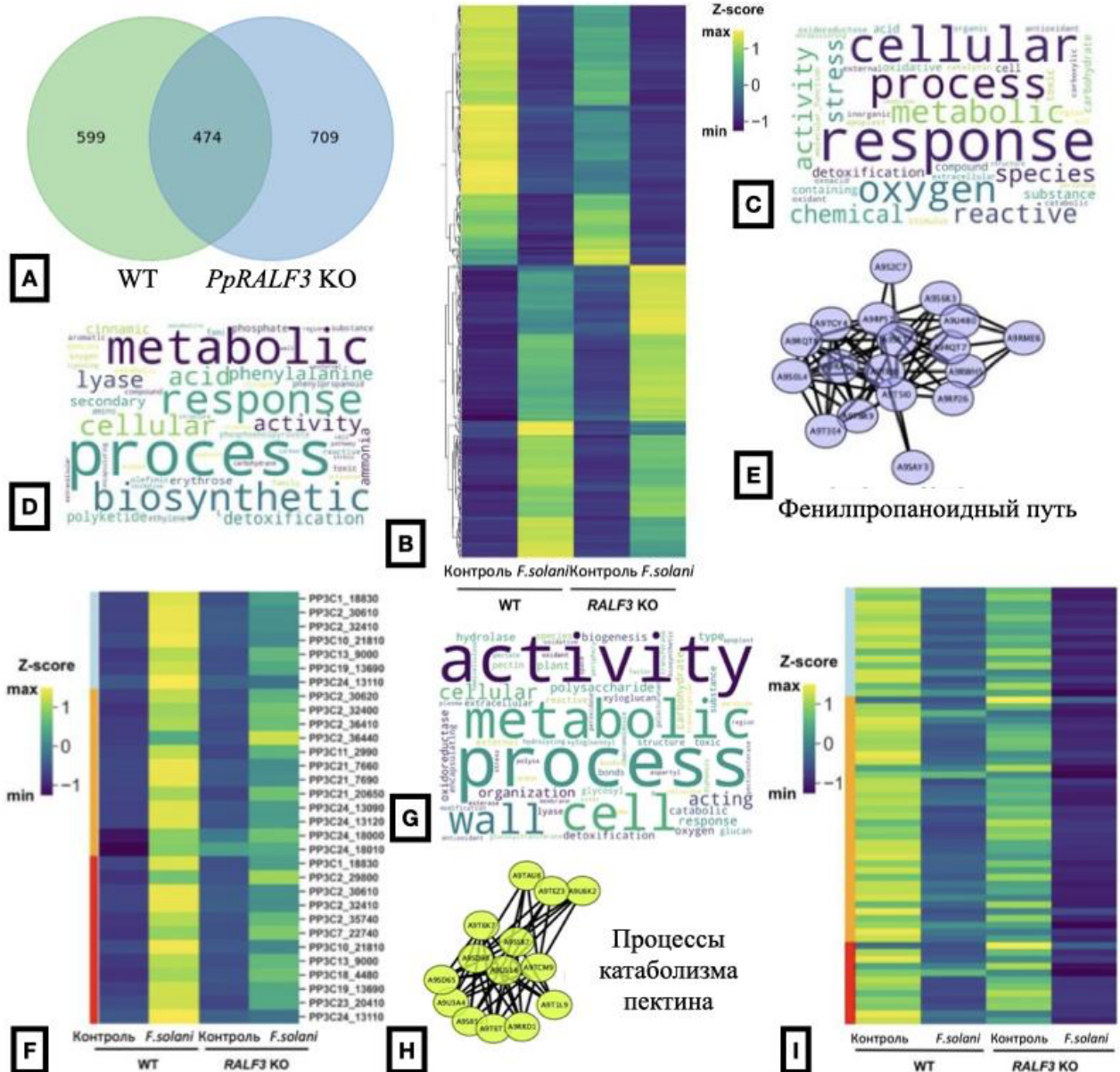


Рис. 11. А - Диаграмма Венна, показывающая перекрывающиеся дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) между растениями дикого типа и нокаутной линией по гену *PpRALF3*; **В** - Хитмэп, демонстрирующий уровни транскрипции между перекрывающимися дифференциально экспрессируемыми генами дикого типа и нокаута *PpRALF3*. Показаны нормализованные значения количества транскриптов на миллион (TPM); **С** - Облако слов смещения терминов генной онтология (GO). Показано облако слов обогащенных терминов GO для ДЭГ, общих между линиями дикого типа и *PpRALF3* KO (P-value с поправкой на частоту ложных открытий (FDR) $\leq 0,05$); **Д** - Облако слов смещения терминов GO. Показано облако слов обогащенных терминов GO для растений дикого типа (P-value с

поправкой на частоту ложных открытий ($FDR \leq 0,05$); **E** - Сети белок-белковых взаимодействий группы дифференциально экспрессируемых генов с повышенной экспрессией в растениях дикого типа, которые относятся к процессу метаболизма фенилпропаноидов. Гены представлены на узлах схемы, а взаимодействия между белками представлены линиями; **F** - Хитмэп, демонстрирующий уровни транскрипции ДЭГ, которые относятся к «процессу биосинтеза фенилпропаноидов» (голубой), «процессу метаболизма поликетидов» (оранжевый), «процессу метаболизма семейства ароматических аминокислот» (красный). Показаны нормализованные значения количества транскриптов на миллион (TPM); **G** - Облако слов смещения терминов GO. Показано облако слов обогащенных терминов GO в растениях, нокаутных по гену *PpRALF3* (P-value с поправкой на частоту ложных открытий ($FDR \leq 0,05$)); **H** - Сети белок-белковых взаимодействий группы дифференциально экспрессируемых генов с пониженной экспрессией, которые относятся к процессу катаболизма пектина, в растениях, нокаутных по гену *PpRALF3*. Гены представлены на узлах схемы, а взаимодействия между белками представлены линиями; **I** - Хитмэп, демонстрирующий уровни транскрипции ДЭГ, которые относятся к «процессу метаболизма пектина» (голубой), «организации или биогенезу клеточной стенки» (оранжевый), «ксилоглюкан: активность ксилоглюкозилтрансферазы» (красный). Показаны нормализованные значения количества транскриптов на миллион (TPM).

Далее мы использовали веб-сервис g:Profiler [166, 218] для того, чтобы найти обогащенные термины генной онтологии в списке общих дифференциально экспрессирующихся генов (рис. 11 С). Эти гены в основном были обогащены терминами генной онтологии, связанными с оксидоредуктазной активностью (GO:0016491), ответом на активные формы кислорода (GO:0000302), антиоксидантной активностью (GO:0016209). Среди этих генов мы обнаружили супероксиддисмутазу (*Pp3c17_14510*), которая нейтрализует АФК; ее экспрессия была значимо индуцирована как в зараженных растениях дикого типа, так и в нокаутных растениях.

Эти результаты перекликаются с ранее полученными транскриптомными данными при заражении *P. patens* грибом *Botrytis cinerea* [171]. Несмотря на различия между патогенами – некротрофный (*B. cinerea*) и факультативный (*F. solani*) паразит, – а также разное время после инокуляции, через которое образцы были собраны, – 24 часа и 7 дней, – количество совпавших ДЭГ в растениях дикого типа составило примерно 40% [171]. При этом совпадение между ДЭГ из растений, нокаутированных по гену *PpRALF3*, и вышеупомянутым набором данных составило всего 27%, что свидетельствует о специфических иммунных реакциях в нокаутной линии.

Мы также обнаружили некоторых представителей семейства белков экспансинов, таких как Pp3c11_12000 (expansin 5-related) и Pp3c7_12870 (expansin 5-related), которые повышались в зараженных растениях.

Далее мы проанализировали различия в транскриптомных ответах на заражение между изучаемыми генотипами. В растениях дикого типа десять наиболее значимо обогащенных терминов генной онтологии относились к процессам биосинтеза вторичных метаболитов, включая процессы метаболизма поликетидов (GO:0030638), процессы метаболизма фенилпропаноидов (GO:0009698), процессы метаболизма коричной кислоты (GO:0009803; рис. 11 D). Повышающиеся дифференциально экспрессирующиеся гены, относящиеся к этим терминам генной онтологии, включали гистидин и фенилаланин аммиак-лиазы (например, Pp3c13_9000), а также халконсинтазы (например, Pp3c11_9040). Затем мы использовали базу данных STRING для создания ассоциативных сетей ДЭГ из растений дикого типа. На основе этого анализа был идентифицирован явно выделяющийся кластер генов, участвующих в фенилпропаноидном пути (рис. 11 E). Уровень транскрипции генов, участвующих в «процессе биосинтеза фенилпропаноидов», «процессе метаболизма поликетидов» и «процессе метаболизма ароматических аминокислот», был значительно повышен у растений дикого типа по сравнению с нокаутной линией (рис. 11 F). Среди них группа гистидин аммиак-лиаз (например, Pp3c2_30610). Это соответствует ранее проведенному исследованию взаимодействия *P. patens* и *B. cinerea* [171]. С

помощью qOT-ПЦР мы дополнительно проанализировали транскрипцию таких защитных генов, как фенилаланин аммиак-лиаза (Pp3c13_9000, PAL1), белок 10, связанный с патогенезом (Pp3c2_27350, PR10), и диригентный белкой (Pp3c6_6545, DIR) в зараженных линиях, нокаутированных по генами *PpRALF1* и *PpRALF2*. Индукция транскрипции гена PAL1 в нокаутных генотипах была значительно ниже по сравнению с растениями дикого типа (рис. 12). Это согласуется с результатами анализа RNA-seq для генотипа, нокаутного по гену *PpRALF3*, и подразумевает, что фенилпропаноидный путь ингибирован в нокаутах генов *PpRALF*. Индукция транскрипции гена PR10 значительно понижалась только в линии, нокаутированной по гену *PpRALF2* (рис. 12). Следует отметить, что, несмотря на сходный паттерн транскрипции защитных генов, на разных нокаутных генотипах была показана разная скорость и обширность размножения *F. solani* (рис. 10 D).

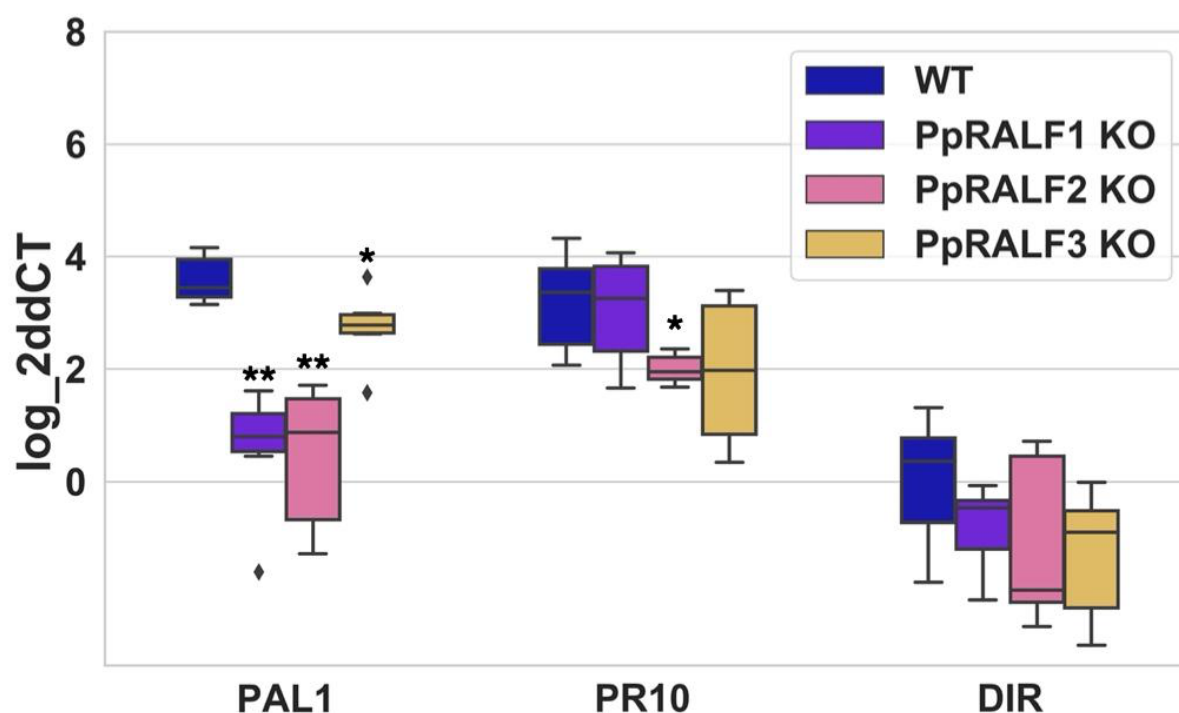


Рис. 12. qOT-ПЦР анализ экспрессии генов PAL1, PR10 и DIR в гаметафорах мха *P. patens* дикого типа, а также нокаутированных по генам *PpRALF1*, *PpRALF2* и *PpRALF3*, заражённых *F. solani*. Был проведен анализ с применением U-критерия Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05.

Напротив, термины генной онтологии ДЭГ, чья экспрессия понижалась в нокаутированных по гену *PpRALF3* растениях после заражения, в основном были

обогащены процессами, относящимися к организации и биосинтезу клеточной стенки, такими как процесс катаболизма пектина (GO:0045490), процесс метаболизма ксилоглюкана (GO:0010411), процесс метаболизма полисахаридов (GO:0005976; рис. 11 G). На основании анализа белок-белковых взаимодействий с помощью базы STRING в этом наборе ДЭГ были идентифицированы ясно выделяющиеся группы пектатлиаз (например, Pp3c21_16990) и пектинэстераз (рис. 11 H). Уровень транскрипции ДЭГ, относящихся к «процессам метаболизма пектина», «организации или биосинтезу клеточной стенки», «активности ксилоглюкан: ксилоглюкозилтрансферазы», был снижен более выражено, чем у растений дикого типа (рис. 11 I). Это может указывать на связь между ролью пептидов RALF в регуляции клеточной стенки и в реакции на стресс. Гены, экспрессия которых повышалась при инфекции, были обогащены такими терминами генной онтологии, как оксидоредуктазная активность (GO:0016491) и организация или биосинтез клеточной стенки (GO:0071554).

Пектины представляют собой структурные гетерополисахариды, являющиеся основными компонентами первичной клеточной стенки растений, участвующие в поддержании роста и развития растений, морфогенеза, защитных реакций и т. д. [219, 220]. Ферменты, расщепляющие пектин, вызывают мацерацию растительной ткани, лизис клеток и модификацию структуры клеточной стенки [221]. Стрессовые условия, например, солевой стресс приводят к ингибированию генов, участвующих в процессах организации и модификации клеточной стенки, таких как суперсемейство пектинлиазоподобных белков, экспансины, ксилоглюкангидролазы в растениях арабидопсиса, мутантных по трем генам *lrx3*, *4*, *5* [222]. Белки семейства LRX взаимодействуют с некоторыми AtRALF пептидами, участвуя в регуляции полярного роста в арабидопсисе [223]. Ингибирование транскрипции аналогичных генов, связанных с клеточной стенкой, в нашей нокаутной линии по гену *PpRALF3* в условиях стресса предполагает роль пептидов RALF и родственных рецепторов, таких как FERONIA или LRX, в качестве модулей, которые связывают между собой рост растений и регуляцию устойчивости к стрессу у наземных растений. Кроме того, было показано, что такие

модификации пектина, как метилэтерификация, регулируются при ответе на атаку фитопатогенов, а высокий уровень метилэтерификации пектина коррелирует с повышенной устойчивостью к патогенам [224, 225]. Это может свидетельствовать об изменении состава клеточной стенки как важном факторе повышенной устойчивости к фитопатогенам у соответствующих нокаутных линий. Нет прямых свидетельств того, как разные пептиды RALF влияют на состав клеточной стенки растений, но нокаут некоторых генов *LRX* у арабидопсиса приводил к увеличению количества маннозы и лигнина по сравнению с растениями дикого типа [226].

В заключение стоит еще раз упомянуть, что транскриптомные изменения в растениях дикого типа согласуются с ранее полученными данными по ответу *P. patens* на заражение патогенами [171] и свидетельствуют об изменениях в таких процессах, как генерация и детоксикация АФК, биосинтез вторичных метаболитов, играющих различную роль в защите, и некоторых других. Заметное различие между линией, нокаутированной по гену *PpRALF3*, и растениями дикого типа заключалось в транскриптомных изменениях в генах, связанных с процессами биогенеза и модификации клеточной стенки. Учитывая известную роль пептидов семейства RALF в ремоделировании клеточной стенки, можно предположить, что эти изменения при заражении действительно являются результатом нокаута гена *PpRALF3*.

Точные механизмы, с помощью которых пептиды RALF и соответствующие им рецепторы координировали рост растений, целостность клеточных стенок и реакцию на определенные изменения окружающей среды (например, инвазию патогенов) у предков современных наземных растений, все еще неизвестны. Тем не менее, будущее исследование генетически более простых растений, таких как *P. patens*, может помочь выяснить эволюцию и точные механизмы передачи сигналов пептидами RALF.

3.2.2 Биологическая активность пептидов EAA и INI

Поиск, основанный только на анализе сходства последовательностей, часто не позволяет идентифицировать новые видоспецифичные семейства биоактивных

пептидов. В связи с этим, пептидомный анализ представляет особый интерес для выявления новых регуляторных пептидов, позволяя изучать эндогенные пептидные пулы в тканях и секрете растений в разных условиях.

Как уже говорилось в пункте 3.1.3 “Анализ пептидомов *P. patens* после обработки элиситорами стрессового ответа”, нами был проведен поиск биоактивных пептидов в индуцированных различными стрессами пептидомах. Среди общих пептидов, выщепление которых было индуцировано всеми тремя стрессовыми факторами (метилжасмонат, салициловая кислота и хитозан), для дальнейшего анализа были отобраны два пептида от нефункциональных предшественников – INI (INIINAPLQGFKIA) и EAA (EAAPAPVAEVEAPKAEЕ). Поскольку было показано, что экзогенная обработка эндогенными пептидами растений, продуцирующимися в ответ на действие стрессового фактора, может регулировать иммунный ответ, таким образом предупреждая атаку патогенов и повышая устойчивость растений к ним [227], мы синтезировали пептиды INI и EAA и проанализировали их действие.

Мы показали, что пептид, названный нами INI, обладает высокой антимикробной активностью против таких бактерий, как *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (МИК = 16 мкг/мл). Для анализа влияния пептида INI на транскрипцию защитных генов с помощью qOT-ПЦР были выбраны известные защитные гены алленоксидсинтаза (AOS) и редуктаза оксофитодиеновой кислоты (OPR). При экзогенной обработке в концентрации 1 мкМ секретируемый пептид INI индуцировал экспрессию гена OPR и ингибировал экспрессию AOS (рис. 13 А). Предыдущие исследования активности биоактивных пептидов из функциональных белков показали, что степень индукции экспрессии защитных генов зависит от времени обработки синтетическим пептидом и может меняться нелинейно [41, 81, 228]. Полученные результаты обработки пептидом INI клеток протонемы выявили, что наиболее сильная индукция экспрессии OPR проявляется в результате 8-часовой инкубации. При этом наиболее сильное подавление экспрессии AOS наблюдается после 4-часовой инкубации (рис. 13 А).

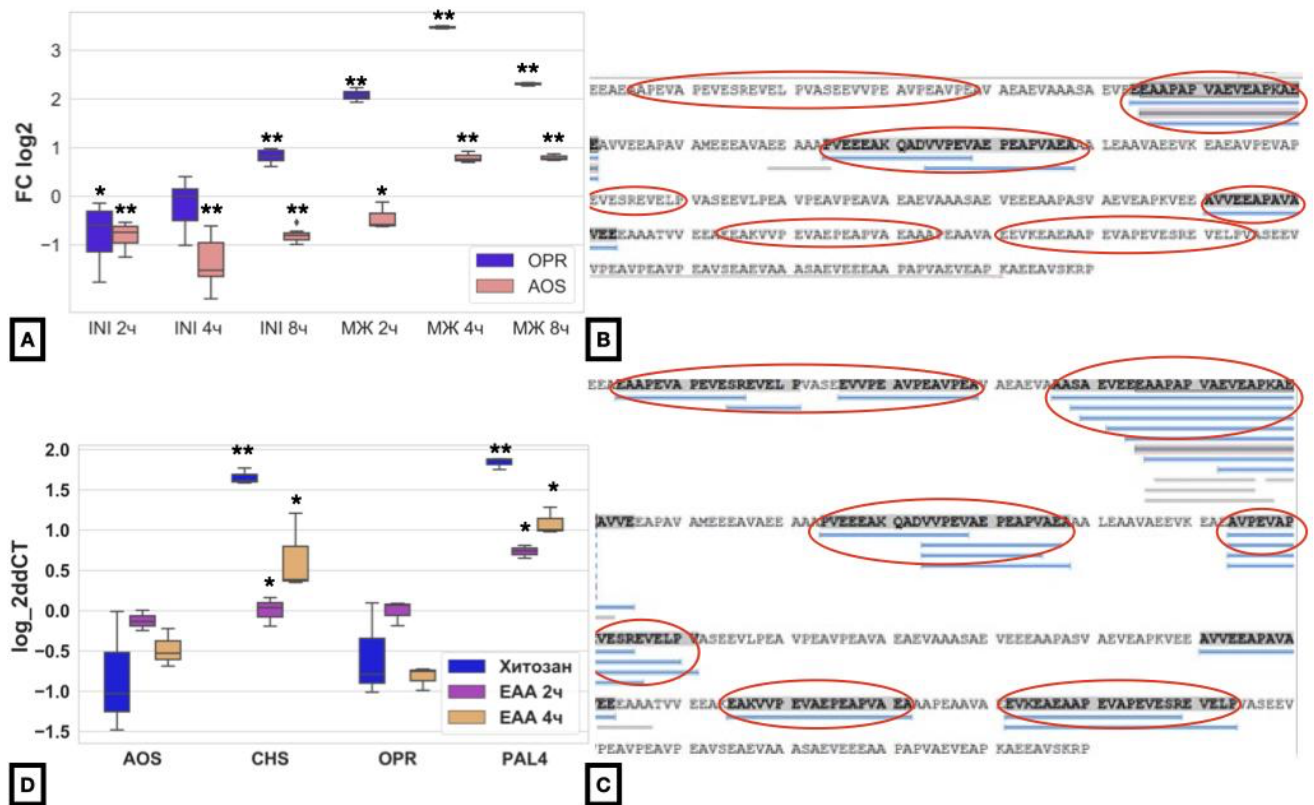


Рис. 13. А - qOT-ПЦР анализ экспрессии генов AOS и OPR в протонеме *P. patens* после обработки 400 мкМ метилжасмоната и 1 мкМ INI в течение 2, 4 и 8 часов (непарный t-тест: *P < 0,05; **P < 0,01); В - Расположение детектированных масс-спектров внутри последовательности белка-прекурсора пептида EAA - Pr3c21_4350V3.1.p в секретируемой жидкости мха *P. patens* в контроле и С - при обработке 400 мкМ салициловой кислоты; D - qOT-ПЦР анализ экспрессии генов AOS, CHS, OPR и PAL4 в протонеме *P. patens* после обработки 0,01 мг/мл хитозана и 5 мкМ EAA в течение 2 и 4 часов (U-критерий Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05).

Анализ экспрессий данных генов после обработки протонемы *P. patens* известным стрессовым гормоном метилжасмонатом выявил, что метилжасмонат и INI имеют однонаправленное действие на экспрессию OPR, и противоположное по отношению к экспрессии AOS в определенных временных точках (рис. 13 А). Вероятно, пептид INI действует подобно известным пептидам-элиситорам патогенов, несмотря на то что изменения в экспрессии защитных генов наблюдались только после обработки в относительно высокой концентрации - 1 мкМ. Однако, учитывая, что с помощью химического синтеза не всегда можно

получить нативный пептид, включая все пост-трансляционные модификации, и экзогенная обработка может не полностью отражать условия его действия, применение синтетического пептида в концентрации большей, чем в естественных условиях, видится оправданным. Можно предположить, что, регулируя уровень экспрессии AOS и OPR, пептид INI может участвовать в сигналинге метилжасмоната и регулировать количество OPDA в условиях стресса. Дальнейшие исследования необходимы для понимания роли пептида INI в регуляции ответа на биотический стресс.

Белок-предшественник другого пептида, обозначенного нами EAA, также не имеет известной функции, и нами было показано, что его расщепление индуцируется стрессовыми гормонами, в данном случае салициловой кислотой, с образованием новых пептидов и увеличением количества уже высвобождающихся (рис. 13 В, С). Обработка протонемы мха вторым пептидом EAA также изменяла экспрессию защитных генов схожим с известным элиситором образом (рис. 13 D). Для анализа влияния пептида EAA на транскрипцию защитных генов были выбраны AOS, OPR, халконсинтаза (CHS) и фенилаланин аммиаклиаза (PAL4). Так же, как и в ответ на обработку известным элиситором хитозаном, уровень транскрипции генов OPR и AOS снижался, а генов CHS и PAL4 повышался в клетках протонемы мха после обработки 5 мкМ пептида EAA (рис. 13 D), что указывает на активацию фенилпропаноидного пути. Мы также показали, что экспрессия выбранных генов, изменялась в зависимости от времени обработки пептида EAA (рис. 13 D). Однако, вопрос играет ли этот пептид какую-то роль в иммунном ответе все еще требует дальнейшего изучения.

Как уже говорилось, высвобождение АФК является известным индикатором стрессовых реакций растений [229]. Поэтому мы измерили накопление внутри- и внеклеточных молекул АФК в протонеме *P. patens*, обработанной пептидами INI и EAA и неактивными пептидами RT (retention time) в качестве контроля (рис. 14). Мы обнаружили значимое повышение уровня АФК при обработке выбранными пептидами, что позволяет предположить, что данные пептиды могут рассматриваться в качестве иммунных сигналов (рис. 14 А, С). Обработка

синтетическим пептидом ЕАА также привела к повышению аккумуляции внеклеточных АФК (рис. 14 С).

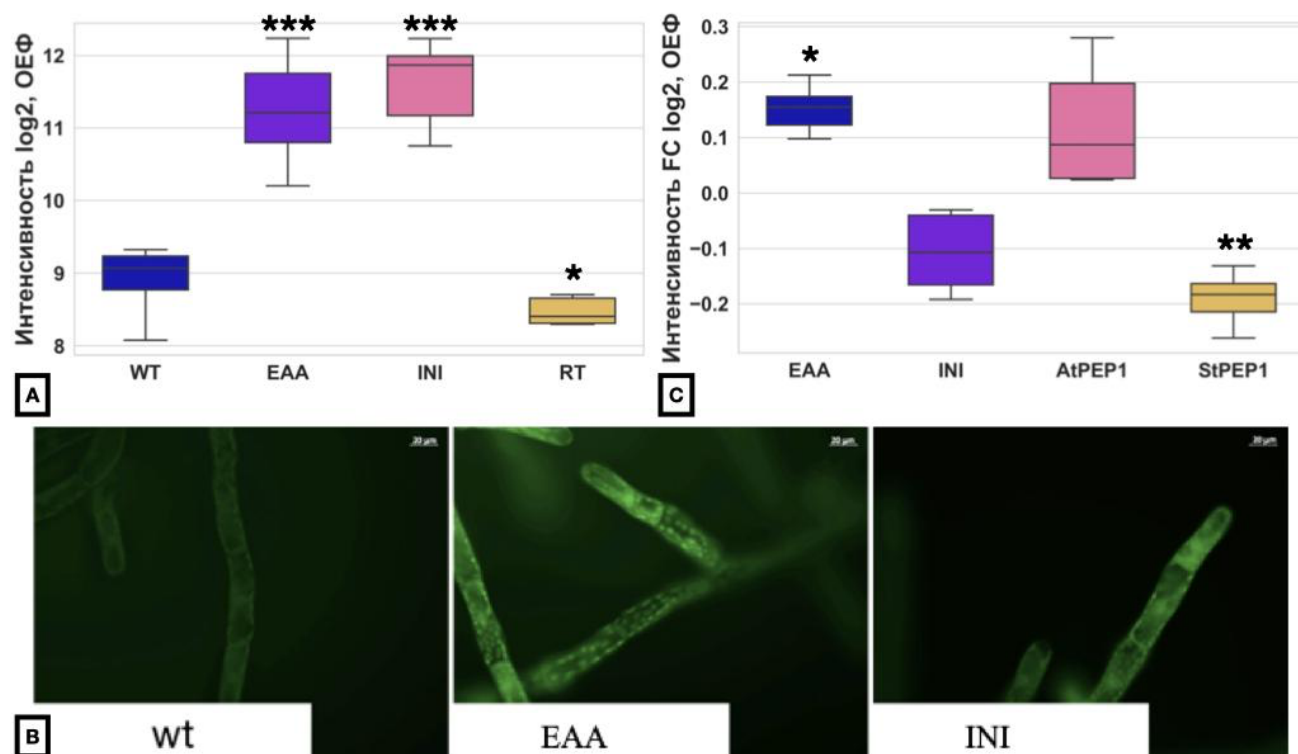


Рис. 14. Сравнение интенсивности аккумуляции молекул АФК **А**, **В** – во внутриклеточном пространстве и **С** – во внеклеточном пространстве с использованием флуоресцентного красителя после обработки 1 мг/мл хитозана, 5 мкМ синтетических пептидов ЕАА, INI, AtPEP1 и StPEP1, а также пептидами с известным временем удержания (RT) в качестве отрицательного контроля. На боксплоте **А** представлены логарифмированные значения интенсивности сигнала, на боксплоте **С** – логарифмированные значения фолдченджа интенсивностей относительно необработанного контроля. Был проведен парный t-тест; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.3 Сравнительный анализ функций короткого секретизируемого пептида PEP у сосудистых и несосудистых растений

3.3.1 Предсказание гомологов рецептора PEPR в геноме *P. patens*

Семейство пептидов PEP (plant elicitor peptides) и их рецепторы PEPR (plant elicitor peptide receptors) были найдены почти во всех покрытосеменных, но не обнаружены в геномах споровых растений [38]. Это может быть обусловлено двумя причинами: 1) последовательности белков-предшественников данного пептида слишком сильно дивергировали в процессе эволюции; 2) пептид возник у предка сосудистых растений после отделения филогенетической ветви бриофитов. На данный момент неизвестно, содержал ли последний общий предок покрытосеменных и бриофитов ген, кодирующий белок-предшественник функционального пептида PEP.

Поскольку использование стандартного поиска BLASTp не выявило последовательностей PROPEP в протеоме *P. patens*, мы далее использовали программный пакет HMMER с его встроенным инструментом поиска jackhammer. Мы идентифицировали 12 потенциальных генов белков-предшественников, которые могли бы содержать последовательности PEP. Мы сравнили последовательности PROPEP и наших потенциальных кандидатов, однако не обнаружили никаких общих мотивов. Возможно, это связано с тем, что гомологи пептидов PEP мха слишком специфичны и не похожи на другие известные PEP. Также есть вероятность, что у мха данные пептиды не появились, учитывая, что бриофиты отделились от других наземных растений раньше в процессе эволюции.

Аминокислотные последовательности рецепторов PEPR демонстрируют высокую степень вариативности между семействами, при этом чаще всего в одном виде покрытосеменных присутствует только по одному гену рецептора (за исключением арабидопсиса, у которого их два: *AtPEPR1* и *AtPEPR2*) [38]. Используя список последовательностей известных рецепторов PEPR однодольных

и двудольных растений, мы провели поиск гомологов PEPR у модельного объекта *P. patens* с помощью инструмента BLASTp. В результате мы идентифицировали 14 потенциальных PEPR-подобных гомологов и выполнили множественное выравнивание с помощью алгоритма ClustalW. Согласно анализу ключевых аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействие между лигандом и его рецептором, 7 последовательностей были исключены из дальнейшего анализа (рис. 15 А). Интересно отметить, что ключевые аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия между пептидами PEPR и рецепторами PEPR, такие как Арг 487, Асп 441, Фен 419, оказались наиболее консервативными как в покрытосеменных, так и у *P. patens*. Наиболее высокий уровень схожести с последовательностями PEPR покрытосеменных среди PEPR-подобных гомологов *P. patens* продемонстрировали гены Pr3c3_12560V3.1 и Pr3c2_18570V3.1, так как, похоже, что в этих последовательностях ключевые аминокислотные остатки находятся в позициях, обеспечивающих взаимодействие между участниками комплекса PEPR-PEPR-ВАК (рис. 15 А).

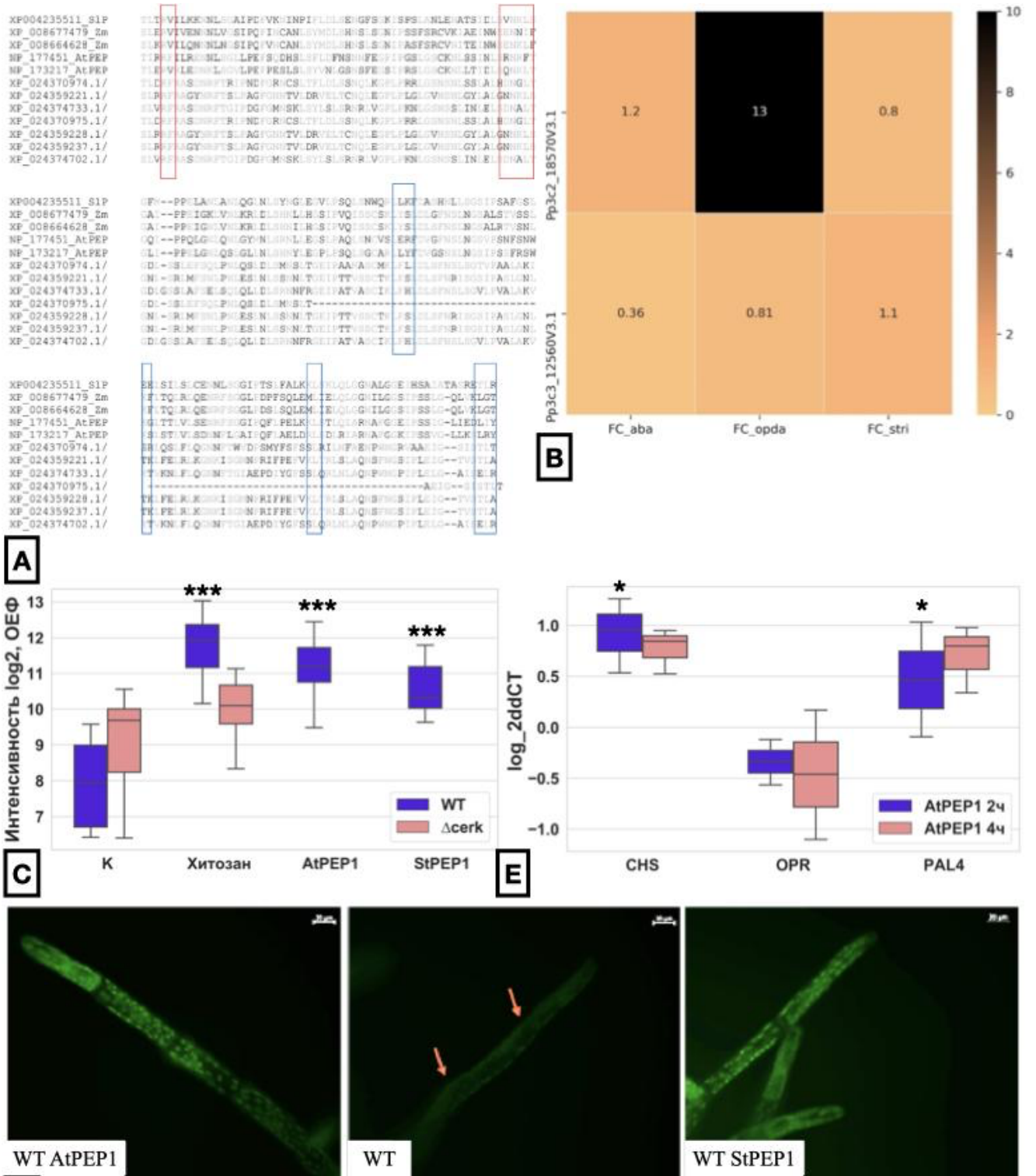


Рис. 15. А - Множественные выравнивания последовательностей рецептора PEPR и потенциальных гомологов PEPR из *P. patens* в области взаимодействия с ВАК1 системы PEPR1-AtPEP1-ВАК1. Красные рамки указывают на область взаимодействия с PEPR, синие рамки - на область взаимодействия с ВАК1. В - Хитмэп, показывающий уровни транскрипции генов гомологов рецептора PEPR *P.*

patens - PEPR-like 1 и PEPR-like 2 в транскриптомах после обработки стрессовыми гормонами АБК, OPDA и стриголактон (из базы данных транскриптомов *P. patens* PEATmoss (<https://peatmoss.online.uni-marburg.de/>)); **C** - Сравнение интенсивности аккумуляции внутриклеточных молекул АФК с использованием флуоресцентного красителя после обработки 1 мг/мл хитозана, 5 мкМ синтетических пептидов AtPEP1 и StPEP1, в протонеме растений *P. patens* дикого типа и нокаутных по гену *CERK1* (парный t-тест; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001); **D** - Сравнение интенсивности аккумуляции внутриклеточных молекул АФК с использованием флуоресцентного красителя после обработки 5 мкМ AtPEP1 и StPEP1 растений *P. patens*, показанное с помощью флуоресцентного микроскопа; **E** - qOT-ПЦР анализ экспрессии генов CHS, OPR и PAL4 в протонеме *P. patens* после обработки 5 мкМ AtPEP1 в течение 2 и 4 часов. Был проведен анализ с применением U-критерия Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05.

Таким образом, мы предположили, что благодаря схожести структуры PEPR-подобных рецептор-подобных киназ, пептидные элиситоры из покрытосеменных могут запустить каскад сигнальных реакций у *P. patens*.

3.3.2 Анализ активности синтетических пептидов PEP при обработке *P. patens*

Нами были предсказаны гомологи рецептора PEPR1 у мха *P. patens*. Кроме того, мы обнаружили, что, согласно общедоступным данным из базы PEATmoss (<https://peatmoss.online.uni-marburg.de/>), экспрессия генов этих гомологов повышается при обработке стрессовыми гормонами (рис. 15 В). Мы предположили, что эти рецепторы могут связывать неизвестные пептидные лиганды в стрессовых условиях.

Для того, чтобы проверить предположение о том, что ортологи рецепторов PEPR у *P. patens* могут взаимодействовать с пептидами PEP, мы синтезировали – AtPEP1 из *Arabidopsis thaliana* и StPEP1 из *Solanum tuberosum*. Выбор именно этих PEP обусловлен тем, что AtPEP1 часто используется в исследованиях иммунитета

растений [13, 22, 36], а StPEP1 является пептидом из сельскохозяйственно значимого растения (*Solanum tuberosum*).

Мы измерили накопление внутри- и внеклеточных молекул АФК в протонеме мха, обработанной синтетическими пептидами PEP и известным иммунным элиситором хитозаном в качестве контроля (рис. 15 С, D и рис. 14 С). Как и ожидалось, обработка хитозаном индуцировала высвобождение молекул АФК в клетках мха дикого типа, в то время как нокаутная линия по гену $\Delta cerk$ (ген рецептора хитозана, см. параграф 3.1.3) не показала значительных изменений в паттернах накопления АФК (рис. 15 С). В растениях дикого типа сигнал флуоресценции в основном детектировался в цитоплазме и ближе к клеточной стенке. Обработка синтетическими пептидами PEP так же привела к повышению уровня внутриклеточных АФК в хлоропластах и цитоплазме. Кроме того, обработки пептидом AtPEP1 и хитозаном индуцировали накопление внеклеточных АФК, в отличие от StPEP1 (рис. 14 С (данные для обработки хитозаном не показаны)).

Мы также проанализировали экспрессию некоторых защитных генов, таких как OPR, CHS и PAL4, в протонеме мха *P. patens* в ответ на обработку пептидами AtPEP1. Количественный ОТ-ПЦР анализ показал, что уровни транскрипции CHS и PAL4 повышались при обработке 5 мкМ AtPEP1, так же как мы наблюдали для остальных элиситоров, использованных в этом исследовании (рис. 15 D; рис. 13 А, D). Стоит отметить, что изменения уровня транскрипции защитных генов, вызванные обработкой различными синтетическими пептидами, оказались сопоставимы между собой, при этом изменения в ответ на обработку известными стрессовыми элиситорами, такими как метилжасмонат и хитозан, были более заметны (рис. 13 А, D). Все это может свидетельствовать о схожих защитных механизмах, активируемых связыванием исследуемых пептидов рецепторами мха, а также о схожей роли, которую они играют в иммунном ответе растений.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что рецепторы PEPR *P. patens* могут связываться с пептидами PEP и запускать иммунный сигнальный каскад. Кроме того, сами мхи могут секретировать

некоторые собственные пептидные сигналы, которые способны активировать общий стрессовый ответ, такой как накопление молекул АФК.

Для того, чтобы проверить, могут ли гомологи рецептора PEPR1 у мха участвовать в сигналинге пептидов PEP, с помощью технологии CRISPR/Cas9 мы получили нокаутные линии по генам этих гомологов, обозначенных нами как PEPR-like 1 (Pr3c3_12560V3.1) и PEPR-like 2 (Pr3c2_18570V3.1), и проанализировали такой маркер стрессового ответа, как интенсивность накопления молекул АФК (рис. 16 А). Экзогенная обработка пептидом AtPEP1 не индуцировала выброс молекул АФК у нокаутных линий, что может подтверждать участие данных гомологов рецептора PEPR в сигналинге функциональных гомологов пептида PEP у покрытосеменных. Это также указывает на то, что в проведенных нами экспериментах индукция АФК и защитных генов при обработке синтетическим AtPEP1 связана с функциями PEPR-подобных рецепторов Pr3c3_12560 и Pr3c2_18570.

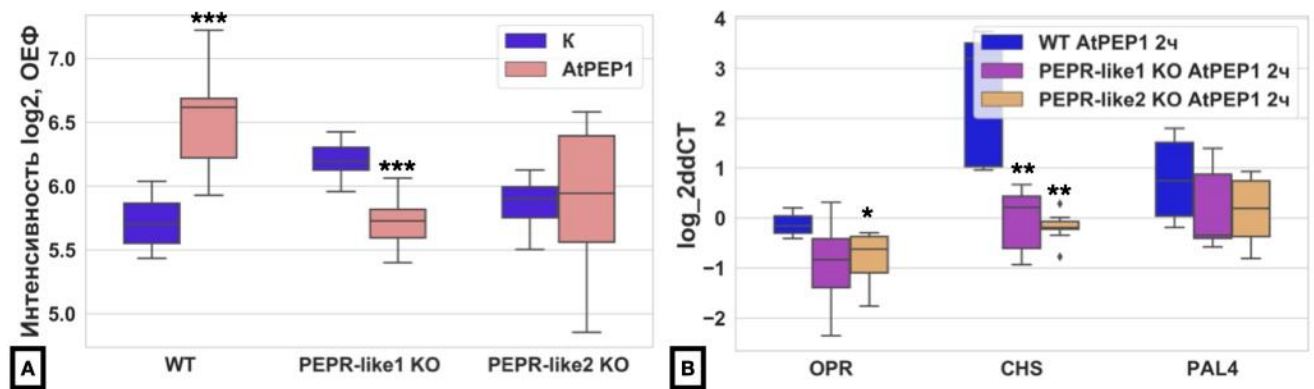


Рис. 16. А - Сравнение интенсивности аккумуляции внутриклеточных молекул АФК с использованием флуоресцентного красителя после обработки 5 мкМ AtPEP1 в протонеме растений *P. patens* дикого типа и нокаутных по генам *PEPR-like 1* и *PEPR-like 2* (парный t-тест; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001); В - qОТ-ПЦР анализ экспрессии генов OPR, CHS и PAL4 после обработки 5 мкМ AtPEP1 в течение 2 часов в протонеме *P. patens* дикого типа и нокаутных по генам *PEPR-like 1* и *PEPR-like 2*. Был проведен анализ с применением U-критерия Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05.

Мы также проанализировали экспрессию таких защитных генов, как OPR, CHS, PAL4 в клетках линий мха, нокаутированных по генам гомологов рецептора PEPR, после обработки их синтетическим пептидом AtPEP1 и обнаружили, что паттерн изменения уровня транскрипции выбранных генов действительно отличался у нокаутных линий по сравнению с диким типом, особенно для CHS, что может свидетельствовать о том, что найденные нами гомологи рецептора PEPR действительно могут в некоторой степени связывать пептид AtPEP1, указывая на консервативность путей иммунного сигналинга (рис. 16 В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первый биологически активный пептид растений был идентифицирован около 30 лет назад. С тех пор, были описаны свыше десяти функциональных семейств пептидов, что, по-видимому, составляет только небольшую часть от общего пула биоактивных пептидов растений. Связано это с тем, что аннотация и функциональный анализ пептидов до сих пор являются сложной задачей. Например, существующие способы аннотации геномов могут пропускать короткие функциональные рамки считывания, способные кодировать биологически активные пептиды.

Целью данной работы являлись разработка методов поиска и изучение эндогенных пептидов растений, участвующих в регуляции иммунного ответа. В качестве модельного объекта был использован мох *Physcomitrium patens*. На первом этапе работы мы разработали подходы для поиска гомологов известных коротких секретлируемых пептидов в геномах бриофитов, а также кандидатов новых биологически активных пептидов в транскриптом и пептидоме *Physcomitrium patens* после заражения патогеном и индукции различными стрессами. Мы обнаружили, что геномы эволюционно далеких видов растений – покрытосеменных и бриофитов содержат сходные семейства коротких секретлируемых пептидов. Согласно нашим данным, экспрессия генов белков-предшественников таких коротких секретлируемых пептидов, как EPFL, MEG, nsLTP, CAPE, STIG-GRI и фитоцианины, увеличивалась в ответ на заражение, указывая на роль этих пептидов в регуляции иммунного ответа *P. patens*. Это является свидетельством консервативности путей пептидного сигналинга в филогенетически отдаленных таксонах растений.

Одним из семейств известных коротких секретлируемых пептидов, найденных нами в геноме *P. patens*, было семейство цистеин-богатых пептидов RALF. В последние годы данное семейство пептидов привлекает особое внимание исследователей в связи с разнообразием их функций у цветковых растений. Однако роль данных пептидов у предков современных покрытосеменных, а также

эволюция их функций практически не изучены. В этой работе нами было показано, что пептиды PpRALF мха имеют сходную структуру и аминокислотный состав с пептидами AtRALF из арабидопсиса, участвующими в регуляции иммунного ответа. Заражение нокаутных по генам белков-предшественников RALF пептидов линий *P. patens* показало, что пептид PpRALF3 негативно регулирует иммунный ответ у *P. patens*. На основе полученных результатов мы делаем вывод о том, что RALF пептиды и их рецептор FERONIA играли важную роль в регуляции ответа на стрессовые воздействия у общего предка покрытосеменных и споровых растений. Кроме того, в нашей работе мы показали на практике как растения с редуцированным, по сравнению с покрытосеменными, числом генов белков-предшественников могут быть использованы для функционального анализа данного семейства пептидов.

С помощью нашего подхода мы также предсказали ряд коротких рамок считывания, – в том числе расположенных на длинных некодирующих РНК, – чьи последовательности имеют признаки, характерные для белков-предшественников известных фитоцитокинов и регуляторных пептидов, но не содержат известных функциональных доменов, дифференциально экспрессирующихся в *P. patens* после заражения патогеном. Изменение экспрессии генов, кодирующих предположительные предшественники биологически активных пептидов, в процессе иммунного ответа указывает на вероятность вовлеченности этих пептидов в регуляцию защитных реакций.

Анализ пептидных пулов растений, образующихся под действием стрессовых факторов, является одним из прямых методов поиска биологически активных пептидов. Однако, несмотря на стремительное развитие методов масс-спектрометрического анализа в последние годы, пептидомика растений остается мало изученной областью. Мы разработали методику выделения и анализа пулов эндогенных пептидов, которая также может применяться для других растений. В ходе нашей работы мы показали, что стрессовые факторы, такие как стрессовые гормоны и патогенные молекулярные структуры, могут влиять на формирование секретлируемого пептидома, индуцируя расщепление уникальных прекурсоров,

способных быть белками-предшественниками потенциальных биологически активных пептидов, а также стимулируя выщепление пептидов из новых областей уже существующих прекурсоров. Потенциальные биологически активные пептиды при этом могут содержать пост-трансляционные модификации, а также показывать антимикробную активность. В нашей работе мы обнаружили два потенциальных кандидата в новые биоактивные пептиды, чье образование было стабильно индуцировано различными стрессами. Мы показали, что экзогенная обработка синтезированными пептидами вызывала в растениях *P. patens* иммунный ответ, выражающийся в повышении уровня накопления молекул АФК, а также в изменении экспрессии защитных генов. Таким образом, обнаруженные пептиды могут представлять собой новые фитоцитокнины, специфичные для мха.

Несмотря на то, что в геноме мха присутствуют гены многих известных семейств коротких секретлируемых пептидов, представители некоторых семейств слишком специфичны или к моменту отделения ветви бриофитов в процессе эволюции растений их гены еще не появились. Одним из таких семейств оказалось семейство пептидов PEP, последовательности которых мы не смогли обнаружить в геноме мха. Однако экзогенная обработка синтетическими пептидами AtPEP1 из арабидопсиса показала, что они способны активировать защитный ответ в клетках мха, указывая на присутствие генов возможных рецепторов этих пептидов в геноме *P. patens*, а также на наличие консервативных участников пептидного сигналинга, вероятно имевшихся также у последнего общего предка наземных растений. Проведенный поиск показал присутствие в геноме мха двух наиболее вероятных гомологов рецептора PEPR, узнающего пептиды семейства PEP. С помощью нокаутных линий по соответствующим генам мы показали участие этих гомологов рецептора PEPR в регуляции таких иммунных реакций мха *P. patens*, как накопление молекул АФК и изменение экспрессии защитных генов, в ответ на обработку синтетическими пептидами AtPEP1.

Таким образом, в ходе нашего исследования мы показали, что пептиды играют важную роль в регуляции разнообразных процессов, таких как иммунные реакции. Компоненты пептидных сигнальных путей в высокой степени

консервативны среди различных таксонов растений, что позволяет проводить функциональный анализ семейств биологически активных пептидов с большим количеством представителей в таких простых генетических системах, как бриофиты.

ВЫВОДЫ

1. Геномы бриофитов содержат гены белков-предшественников известных семейств коротких секретлируемых пептидов.
2. Экспрессия генов белков предшественников коротких секретлируемых пептидов у *Physcomitrium patens* растет в ответ на заражение *Botrytis cinerea*, что указывает на их роль в защитном ответе и подтверждает консервативность иммунных путей растений разных таксономических групп.
3. Пептиды известного семейства RALF у *P. patens* имеют общие черты по структуре и аминокислотному составу с RALF пептидами арабидопсиса, регулирующими уровень АФК в клетках при биотическом стрессе.
4. Представитель семейства коротких секретлируемых пептидов PrRALF3 играет роль в негативной регуляции иммунного ответа у *P. patens*.
5. Стрессовые факторы индуцируют гидролиз белков, приводя к появлению в пептидоме *P. patens* биологически активных пептидов.
6. Обнаружены пептиды INI и EAA от нефункциональных белков предшественников, которые регулируют выброс АФК и экспрессию защитных генов у *P. patens*.
7. Показано, что при экзогенной обработке растений *P. patens* фитоцитокином арабидопсиса AtPEP1 активируется синтез АФК и экспрессия защитных генов, что указывает на наличие компонентов пептидного иммунного сигналинга у последнего общего предка покрытосеменных и споровых растений.
8. Нокаут гомологов рецептора PEPR1 (участвующего в узнавании AtPEP1 у арабидопсиса) у *P. patens* снижает выброс АФК, а также влияет на транскрипционный ответ защитных генов при обработке синтетическим пептидом AtPEP1, указывая что именно эти рецепторы связаны с распознаванием данного фитоцитокина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Goff, K.E., Ramonell, K.M., The Role and Regulation of Receptor-Like Kinases in Plant Defense. *Gene Regul Syst Bio* 2007, 1, 167–175.
2. Wu, Y., Zhou, J.-M., Receptor-Like Kinases in Plant Innate Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* 2013, 55, 1271–1286.
3. Shiu, S.-H., Bleecker, A.B., Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98, 10763–10768.
4. Couto, D., Zipfel, C., Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* 2016, 16, 537–552.
5. Boutrot, F., Zipfel, C., Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 2017, 55, 257–286.
6. Shiu, S.-H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.-H., Mayer, K.F.X., Li, W.-H., Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. *The Plant Cell* 2004, 16, 1220–1234.
7. Smakowska-Luzan, E., Mott, G.A., Parys, K., Stegmann, M., Howton, T.C., Layeghifard, M., Neuhold, J., Lehner, A., Kong, J., Grünwald, K., et al., An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature* 2018, 553, 342–346.
8. Dufayard, J.-F., Bettembourg, M., Fischer, I., Droc, G., Guiderdoni, E., Périn, C., Chantret, N., Diévert, A., New Insights on Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase Orthologous Relationships in Angiosperms. *Front. Plant Sci.* 2017, 8.
9. Ngou, B.P.M., Heal, R., Wyler, M., Schmid, M.W., Jones, J.D., Concerted expansion and contraction of immune receptor gene repertoires in plant genomes. 2022, 2022.01.01.474684.
10. Shiu, S.H., Bleecker, A.B., Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003, 132, 530–543.

11. Stegmann, M., Monaghan, J., Smakowska-Luzan, E., Rovenich, H., Lehner, A., Holton, N., Belkhadir, Y., Zipfel, C., The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* 2017, 355, 287–289.
12. Xiao, Y., Stegmann, M., Han, Z., DeFalco, T.A., Parys, K., Xu, L., Belkhadir, Y., Zipfel, C., Chai, J., Mechanisms of RALF peptide perception by a heterotypic receptor complex. *Nature* 2019, 572, 270–274.
13. Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tör, M., de Vries, S., Zipfel, C., The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens[W]. *Plant Cell* 2011, 23, 2440–2455.
14. Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., Stacey, G., The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *ELife* 2014, 3, e03766.
15. Liebrand, T.W.H., van den Berg, G.C.M., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J.H.G., America, A.H.P., America, A.H.P., Sklenar, J., Jones, A.M.E., Tameling, W.I.L., et al., Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110, 10010–10015.
16. Lin, W., Ma, X., Shan, L., He, P., Big Roles of Small Kinases: The Complex Functions of Receptor-Like Cytoplasmic Kinases in Plant Immunity and Development. *J Integr Plant Biol* 2013, 55, 1188–1197.
17. He, Z., Wang, Z.-Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J., Perception of Brassinosteroids by the Extracellular Domain of the Receptor Kinase BRI1. *Science* 2000, 288, 2360–2363.
18. Liu, Z., Wu, Y., Yang, F., Zhang, Y., Chen, S., Xie, Q., Tian, X., Zhou, J.-M., BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, 110, 6205–6210.
19. Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P., A receptor-like cytoplasmic

- kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, *107*, 496–501.
20. Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., et al., Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host & Microbe* 2010, *7*, 290–301.
21. Rao, S., Zhou, Z., Miao, P., Bi, G., Hu, M., Wu, Y., Feng, F., Zhang, X., Zhou, J.-M., Roles of Receptor-Like Cytoplasmic Kinase VII Members in Pattern-Triggered Immune Signaling¹. *Plant Physiol* 2018, *177*, 1679–1690.
22. Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., et al., Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell* 2014, *54*, 43–55.
23. Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Fröhlich, K., Westphal, L., Scheel, D., Lee, J., Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic kinases, PBL1 and BIK1. *BMC Plant Biol* 2014, *14*, 374.
24. Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D., Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, *94*, 4800–4805.
25. Liu, Y., Maierhofer, T., Rybak, K., Sklenar, J., Breakspear, A., Johnston, M.G., Fliegmann, J., Huang, S., Roelfsema, M.R.G., Felix, G., et al., Anion channel SLAH3 is a regulatory target of chitin receptor-associated kinase PBL27 in microbial stomatal closure. *ELife* 2019, *8*, e44474.
26. Wu, C.-H., Derevnina, L., Kamoun, S., Receptor networks underpin plant immunity. *Science* 2018, *360*, 1300–1301.
27. Khan, M., Subramaniam, R., Desveaux, D., Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology* 2016, *29*, 49–55.

28. Rzemieniewski, J., Stegmann, M., Regulation of pattern-triggered immunity and growth by phyto cytokines. *Current Opinion in Plant Biology* 2022, 68, 102230.
29. Czyzewicz, N., Yue, K., Beeckman, T., De Smet, I., Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development. *J. Exp. Bot.* 2013, 64, 5281–5296.
30. Oh, E., Seo, P.J., Kim, J., Signaling Peptides and Receptors Coordinating Plant Root Development. *Trends in Plant Science* 2018, 23, 337–351.
31. Boschiero, C., Dai, X., Lundquist, P.K., Roy, S., Bang, T.C. de, Zhang, S., Zhuang, Z., Torres-Jerez, I., Udvardi, M.K., Scheible, W.-R., et al., MtSSPdb: The *Medicago truncatula* Small Secreted Peptide Database. *Plant Physiology* 2020, 183, 399–413.
32. Lease, K.A., Walker, J.C., The Arabidopsis Unannotated Secreted Peptide Database, a Resource for Plant Peptidomics. *Plant Physiology* 2006, 142, 831.
33. Butenko, M.A., Vie, A.K., Brembu, T., Aalen, R.B., Bones, A.M., Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in Plant Science* 2009, 14, 255–263.
34. Breiden, M., Simon, R., Q&A: How does peptide signaling direct plant development? *BMC Biology* 2016, 14, 58.
35. Bang, T.C. de, Lundquist, P.K., Dai, X., Boschiero, C., Zhuang, Z., Pant, P., Torres-Jerez, I., Roy, S., Nogales, J., Veerappan, V., et al., Genome-Wide Identification of *Medicago* Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation. *Plant Physiology* 2017, 175, 1669–1689.
36. Huffaker, A., Pearce, G., Ryan, C.A., An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *PNAS* 2006, 103, 10098–10103.
37. Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., Ryan, C.A., PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 2010, 22, 508–522.
38. Lori, M., van Verk, M.C., Hander, T., Schatowitz, H., Klauser, D., Flury, P., Gehring, C.A., Boller, T., Bartels, S., Evolutionary divergence of the plant

- elicitor peptides (Peps) and their receptors: interfamily incompatibility of perception but compatibility of downstream signalling. *J Exp Bot* 2015, *66*, 5315–5325.
39. Bartels, S., Lori, M., Mbengue, M., van Verk, M., Klauser, D., Hander, T., Böni, R., Robatzek, S., Boller, T., The family of Peps and their precursors in *Arabidopsis*: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany* 2013, *64*, 5309–5321.
40. Bressendorff, S., Azevedo, R., Kenchappa, C.S., Ponce de León, I., Olsen, J.V., Rasmussen, M.W., Erbs, G., Newman, M.-A., Petersen, M., Mundy, J., An Innate Immunity Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 2016, *28*, 1328–1342.
41. Chen, Y.-L., Lee, C.-Y., Cheng, K.-T., Chang, W.-H., Huang, R.-N., Nam, H.G., Chen, Y.-R., Quantitative Peptidomics Study Reveals That a Wound-Induced Peptide from PR-1 Regulates Immune Signaling in Tomato. *The Plant Cell* 2014, *26*, 4135–4148.
42. Chen, Y.-L., Fan, K.-T., Hung, S.-C., Chen, Y.-R., The role of peptides cleaved from protein precursors in eliciting plant stress reactions. *New Phytologist* 2020, *225*, 2267–2282.
43. Chien, P.-S., Nam, H.G., Chen, Y.-R., A salt-regulated peptide derived from the CAP superfamily protein negatively regulates salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2015, *66*, 5301–5313.
44. Ngou, B.P.M., Ding, P., Jones, J.D.G., Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell* 2022, *34*, 1447–1478.
45. Flor, H.H., Inheritance of Reaction to Rust in Flax. 1947.
46. Brockhurst, M.A., Chapman, T., King, K.C., Mank, J.E., Paterson, S., Hurst, G.D.D., Running with the Red Queen: the role of biotic conflicts in evolution. *Proc Biol Sci* 2014, *281*, 20141382.
47. Jones, J.D.G., Dangl, J.L., The plant immune system. *Nature* 2006, *444*, 323–329.

48. Boller, T., Felix, G., A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 2009, *60*, 379–406.
49. Zhang, J., Zhou, J.-M., Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant* 2010, *3*, 783–793.
50. Gómez-Gómez, L., Boller, T., FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 2000, *5*, 1003–1011.
51. Wu, C.-H., Abd-El-Haliem, A., Bozkurt, T.O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J.H., Kamoun, S., NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017, *114*, 8113–8118.
52. Zipfel, C., Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 2014, *35*, 345–351.
53. Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D., Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 1994, *266*, 789–793.
54. Lacaze, A., Joly, D.L., Structural specificity in plant-filamentous pathogen interactions. *Mol Plant Pathol* 2020, *21*, 1513–1525.
55. van der Burgh, A.M., Joosten, M.H.A.J., Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box. *Trends Plant Sci* 2019, *24*, 587–601.
56. Ding, P., Sakai, T., Krishna Shrestha, R., Manosalva Perez, N., Guo, W., Ngou, B.P.M., He, S., Liu, C., Feng, X., Zhang, R., et al., Chromatin accessibility landscapes activated by cell-surface and intracellular immune receptors. *Journal of Experimental Botany* 2021, *72*, 7927–7941.
57. Liu, P.-L., Du, L., Huang, Y., Gao, S.-M., Yu, M., Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC Evolutionary Biology* 2017, *17*, 47.
58. Bressendorff, S., Rasmussen, M.W., Petersen, M., Mundy, J., Chitin-Induced Responses in the Moss *Physcomitrella patens*, in: Shan, L., He, P. (Eds.), *Plant Pattern Recognition Receptors: Methods and Protocols*, Springer, New York, NY

- 2017, pp. 317–324.
59. Galotto, G., Abreu, I., Sherman, C., Liu, B., Gonzalez-Guerrero, M., Vidali, L., Chitin Triggers Calcium-Mediated Immune Response in the Plant Model *Physcomitrella patens*. *MPMI* 2020, 33, 911–920.
60. Fürst-Jansen, J.M.R., de Vries, S., de Vries, J., Evo-physio: on stress responses and the earliest land plants. *Journal of Experimental Botany* 2020, 71, 3254–3269.
61. Delaux, P.-M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J.D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., et al., Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *PNAS* 2015, 112, 13390–13395.
62. Filippova, A., Lyapina, I., Kirov, I., Zgoda, V., Belogurov, A., Kudriaeva, A., Ivanov, V., Fesenko, I., Salicylic acid influences the protease activity and posttranslation modifications of the secreted peptides in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Peptide Science* 2019, 25, e3138.
63. Fesenko, I., Azarkina, R., Kirov, I., Kniazev, A., Filippova, A., Grafaskaia, E., Lazarev, V., Zgoda, V., Butenko, I., Bukato, O., et al., Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with antimicrobial activity in the Moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 2019, 19, 9.
64. Lyapina, I., Filippova, A., Kovalchuk, S., Ziganshin, R., Mamaeva, A., Lazarev, V., Latsis, I., Mikhalechik, E., Panasenko, O., Ivanov, O., et al., Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. *Plant Mol Biol* 2021, 106, 123–143.
65. Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2011, 14, 351–357.
66. Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., et al., Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 365–369.
67. Schoonbeek, H., Wang, H.-H., Stefanato, F.L., Craze, M., Bowden, S.,

- Wallington, E., Zipfel, C., Ridout, C.J., Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytologist* 2015, 206, 606–613.
68. Schwessinger, B., Bahar, O., Thomas, N., Holton, N., Nekrasov, V., Ruan, D., Canlas, P.E., Daudi, A., Petzold, C.J., Singan, V.R., et al., Transgenic Expression of the Dicotyledonous Pattern Recognition Receptor EFR in Rice Leads to Ligand-Dependent Activation of Defense Responses. *PLoS Pathog* 2015, 11.
69. Hao, G., Pitino, M., Duan, Y., Stover, E., Reduced Susceptibility to *Xanthomonas citri* in Transgenic Citrus Expressing the FLS2 Receptor From *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2016, 29, 132–142.
70. Saur, I.M.L., Kadota, Y., Sklenar, J., Holton, N.J., Smakowska, E., Belkhadir, Y., Zipfel, C., Rathjen, J.P., NbCSPR underlies age-dependent immune responses to bacterial cold shock protein in *Nicotiana benthamiana*. *PNAS* 2016, 113, 3389–3394.
71. Rodriguez-Moreno, L., Song, Y., Thomma, B.P., Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops. *Curr Opin Plant Biol* 2017, 38, 42–49.
72. Pfeilmeier, S., George, J., Morel, A., Roy, S., Smoker, M., Stransfeld, L., Downie, J.A., Peeters, N., Malone, J.G., Zipfel, C., Expression of the Arabidopsis thaliana immune receptor EFR in *Medicago truncatula* reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. *Plant Biotechnol J* 2019, 17, 569–579.
73. Han, G.-Z., Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist* 2019, 222, 70–83.
74. Castro, A., Vidal, S., Ponce de León, I., Moss Pathogenesis-Related-10 Protein Enhances Resistance to *Pythium irregulare* in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 2016, 7, 580.
75. Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A., A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science* 1991, 253, 895–897.

76. Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., Cammue, B.P.A., The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *Plant Cell* 2015, 27, 2095–2118.
77. Krause, C., Richter, S., Knöll, C., Jürgens, G., Plant secretome - from cellular process to biological activity. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1834, 2429–2441.
78. Murphy, E., Smith, S., Smet, I.D., Small Signaling Peptides in Arabidopsis Development: How Cells Communicate Over a Short Distance. *The Plant Cell* 2012, 24, 3198.
79. Farrokhi, N., Whitelegge, J.P., Brusslan, J.A., Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnology Journal* 2008, 6, 105–134.
80. Schmelz, E.A., Carroll, M.J., LeClere, S., Phipps, S.M., Meredith, J., Chourey, P.S., Alborn, H.T., Teal, P.E.A., Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 8894–8899.
81. Pearce, G., Munske, G., Yamaguchi, Y., Ryan, C.A., Structure-activity studies of GmSubPep, a soybean peptide defense signal derived from an extracellular protease. *Peptides* 2010, 31, 2159–2164.
82. van der Hoorn, R.A., Jones, J.D., The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7, 400–407.
83. Adams, E.H.G., Spoel, S.H., The ubiquitin-proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity. *J Exp Bot* 2018, 69, 4529–4537.
84. Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., Smalle, J., Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal Behav* 2009, 4, 924–927.
85. Hanada, K., Higuchi-Takeuchi, M., Okamoto, M., Yoshizumi, T., Shimizu, M., Nakaminami, K., Nishi, R., Ohashi, C., Iida, K., Tanaka, M., et al., Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *PNAS* 2013, 110, 2395–2400.
86. Clark, S.E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M., CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* 1993, 119, 397–418.
87. De Coninck, B., De Smet, I., Plant peptides - taking them to the next level. *J Exp*

- Bot* 2016, 67, 4791–4795.
88. Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turrà, D., Pietro, A.D., Zhang, W., The Secreted Peptide PIP1 Amplifies Immunity through Receptor-Like Kinase 7. *PLOS Pathogens* 2014, 10, e1004331.
 89. Gully, K., Pelletier, S., Guillou, M.-C., Ferrand, M., Aligon, S., Pokotylo, I., Perrin, A., Vergne, E., Fagard, M., Ruelland, E., et al., The SCOOP12 peptide regulates defense response and root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 2019, 70, 1349–1365.
 90. Hander, T., Fernández-Fernández, Á.D., Kumpf, R.P., Willems, P., Schatowitz, H., Rombaut, D., Staes, A., Nolf, J., Pottie, R., Yao, P., et al., Damage on plants activates Ca²⁺-dependent metacaspases for release of immunomodulatory peptides. *Science* 2019, 363, eaar7486.
 91. Shen, W., Liu, J., Li, J.-F., Type-II Metacaspases Mediate the Processing of Plant Elicitor Peptides in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 2019, 12, 1524–1533.
 92. Rhodes, J., Yang, H., Moussu, S., Boutrot, F., Santiago, J., Zipfel, C., Perception of a divergent family of phytocytokines by the *Arabidopsis* receptor kinase MIK2. *Nat Commun* 2021, 12, 705.
 93. Bartels, S., Boller, T., Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany* 2015, 66, 5183–5193.
 94. Blackburn, M.R., Haruta, M., Moura, D.S., Twenty Years of Progress in Physiological and Biochemical Investigation of RALF Peptides. *Plant Physiol* 2020, 182, 1657–1666.
 95. Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W.L., Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel)* 2015, 8, 711–757.
 96. Kulaeva, O., Kliukova, M., Afonin, A., Sulima, A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Biological Communications* 2020, 65, 187–199.
 97. Salas, C.E., Badillo-Corona, J.A., Ramírez-Sotelo, G., Oliver-Salvador, C., Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *Biomed Res Int*

- 2015, 2015, 102129.
98. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., Yang, X., Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies* 2021, 62, 5.
 99. Desiderio, D.M., Yamada, S., Tanzer, F.S., Horton, J., Trimble, J., High-performance liquid chromatographic and field desorption mass spectrometric measurement of picomole amounts of endogenous neuropeptides in biologic tissue. *J Chromatogr* 1981, 217, 437–452.
 100. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246, 64–71.
 101. Karas, Michael., Hillenkamp, Franz., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299–2301.
 102. Edman, P., Chemistry of amino acids and peptides. *Annu Rev Biochem* 1959, 28, 69–96.
 103. Verhaert, P., Uttenweiler-Joseph, S., de Vries, M., Loboda, A., Ens, W., Standing, K.G., Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: an elegant tool for peptidomics. *Proteomics* 2001, 1, 118–131.
 104. Clynen, E., Baggerman, G., Veelaert, D., Cerstiaens, A., Van der Horst, D., Harthoorn, L., Derua, R., Waelkens, E., De Loof, A., Schoofs, L., Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur J Biochem* 2001, 268, 1929–1939.
 105. Williams, D.H., Bradley, C.V., Santikarn, S., Bojesen, G., Fast-atom-bombardment mass spectrometry. A new technique for the determination of molecular weights and amino acid sequences of peptides. *Biochem J* 1982, 201, 105–117.
 106. Winkler, H.U., Beckey, H.D., Field desorption mass spectrometry of peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1972, 46, 391–398.

107. Macfarlane, R.D., Torgerson, D.F., Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectroscopy. *Science* 1976, *191*, 920–925.
108. Fohlman, J., Peterson, P.A., Roepstorff, P., Höjrup, P., Kamensky, I., Säwe, G., Håkansson, P., Sundquist, B., Comparison of 252californium plasma desorption and fast atom bombardment mass spectrometry for analysis of small peptides. *Biomed Mass Spectrom* 1985, *12*, 380–387.
109. Feistner, G.J., Höjrup, P., Evans, C.J., Barofsky, D.F., Faull, K.F., Roepstorff, P., Mass spectrometric charting of bovine posterior/intermediate pituitary peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, *86*, 6013–6017.
110. Regnier, F.E., High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science* 1983, *222*, 245–252.
111. Schulz-Knappe, P., Schrader, M., Ständker, L., Richter, R., Hess, R., Jürgens, M., Forssmann, W.G., Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chromatogr A* 1997, *776*, 125–132.
112. Raida, M., Schulz-Knappe, P., Heine, G., Forssmann, W.G., Liquid chromatography and electrospray mass spectrometric mapping of peptides from human plasma filtrate. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999, *10*, 45–54.
113. Schrader, W., Klein, H.-W., Liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-FTICR MS): an early overview. *Anal Bioanal Chem* 2004, *379*, 1013–1024.
114. Issaq, H.J., Chan, K.C., Blonder, J., Ye, X., Veenstra, T.D., Separation, detection and quantitation of peptides by liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 2009, *1216*, 1825–1837.
115. Wysocki, V.H., Resing, K.A., Zhang, Q., Cheng, G., Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* 2005, *35*, 211–222.
116. Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 1996, *379*, 466–469.
117. Ovchinnikov, I.A., Kiriushkin, A.A., Vinogradova, E.I., Rozynov, B.V., Shemiakin, M.M., [Mass spectrometric determination of the amino acid sequence

- in peptides and proteins]. *Biokhimiia* 1967, 32, 427–438.
118. Fernandez-de-Cossio, J., Gonzalez, J., Betancourt, L., Besada, V., Padron, G., Shimonishi, Y., Takao, T., Automated interpretation of high-energy collision-induced dissociation spectra of singly protonated peptides by “SeqMS”, a software aid for de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998, 12, 1867–1878.
119. Dawkins, B.G., Arpino, P.J., McLafferty, F.W., Polypeptide sequencing by liquid chromatography mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1978, 5, 1–6.
120. Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., et al., Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci* 2000, 20, 639–648.
121. Che, F.-Y., Yan, L., Li, H., Mzhavia, N., Devi, L.A., Fricker, L.D., Identification of peptides from brain and pituitary of Cpefat/Cpefat mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98, 9971–9976.
122. Licklider, L.J., Thoreen, C.C., Peng, J., Gygi, S.P., Automation of nanoscale microcapillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a vented column. *Anal Chem* 2002, 74, 3076–3083.
123. Perkins, J.R., Smith, B., Gallagher, R.T., Jones, D.S., Davis, S.C., Hoffman, A.D., Tomer, K.B., Application of electrospray mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for molecular weight assignment of peptides in complex mixtures. *J Am Soc Mass Spectrom* 1993, 4, 670–684.
124. Yates, J.R., Eng, J.K., Clauser, K.R., Burlingame, A.L., Search of sequence databases with uninterpreted high-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 1996, 7, 1089–1098.
125. Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999, 20, 3551–3567.
126. Sasaki, K., Osaki, T., Minamino, N., Large-scale Identification of

- Endogenous Secretory Peptides Using Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry *. *Molecular & Cellular Proteomics* 2013, 12, 700–709.
127. Tabb, D.L., Huang, Y., Wysocki, V.H., Yates, J.R., Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* 2004, 76, 1243–1248.
128. Samgina, T.Yu., Tolpina, M.D., Trebse, P., Torkar, G., Artemenko, K.A., Bergquist, J., Lebedev, A.T., LTQ Orbitrap Velos in routine de novo sequencing of non-tryptic skin peptides from the frog *Rana latastei* with traditional and reliable manual spectra interpretation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2016, 30, 265–276.
129. Che, F.-Y., Fricker, L.D., Quantitative peptidomics of mouse pituitary: comparison of different stable isotopic tags. *J Mass Spectrom* 2005, 40, 238–249.
130. Xiang, F., Ye, H., Chen, R., Fu, Q., Li, L., N,N-Dimethyl Leucines as Novel Isobaric Tandem Mass Tags for Quantitative Proteomics and Peptidomics. *Anal. Chem.* 2010, 82, 2817–2825.
131. Morano, C., Zhang, X., Fricker, L.D., Multiple isotopic labels for quantitative mass spectrometry. *Anal Chem* 2008, 80, 9298–9309.
132. Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al., Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 2012, 40, D1178-1186.
133. Thomas, S., Karnik, S., Barai, R.S., Jayaraman, V.K., Idicula-Thomas, S., CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 2010, 38, D774-780.
134. Slavoff, S.A., Mitchell, A.J., Schwaid, A.G., Cabili, M.N., Ma, J., Levin, J.Z., Karger, A.D., Budnik, B.A., Rinn, J.L., Saghatelian, A., Peptidomic discovery of short open reading frame–encoded peptides in human cells. *Nat Chem Biol* 2013, 9, 59–64.
135. Kersten, R.D., Yang, Y.-L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S.-J., Fenical, W., Fischbach, M.A., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., A mass spectrometry–guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nat Chem Biol*

- 2011, 7, 794–802.
136. Pan, B., Sheng, J., Sun, W., Zhao, Y., Hao, P., Li, X., OrySPSSP: a comparative Platform for Small Secreted Proteins from rice and other plants. *Nucleic Acids Res* 2013, 41, D1192–D1198.
137. Zhou, P., Silverstein, K.A., Gao, L., Walton, J.D., Nallu, S., Guhlin, J., Young, N.D., Detecting small plant peptides using SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application). *BMC Bioinformatics* 2013, 14, 335.
138. Zhou, B., Benbow, H.R., Brennan, C.J., Arunachalam, C., Karki, S.J., Mullins, E., Feechan, A., Burke, J.I., Doohan, F.M., Wheat Encodes Small, Secreted Proteins That Contribute to Resistance to Septoria Tritici Blotch. *Front. Genet.* 2020, 11.
139. Ghorbani, S., Lin, Y.-C., Parizot, B., Fernandez, A., Njo, M.F., Van de Peer, Y., Beeckman, T., Hilson, P., Expanding the repertoire of secretory peptides controlling root development with comparative genome analysis and functional assays. *EXBOTJ* 2015, 66, 5257–5269.
140. Zhang, Z., Liu, L., Kucukoglu, M., Tian, D., Larkin, R.M., Shi, X., Zheng, B., Predicting and Clustering Plant CLE Genes with a New Method Developed Specifically for Short Amino Acid Sequences. *BMC Genomics* 2020.
141. Wang, P., Yao, S., Kosami, K., Guo, T., Li, J., Zhang, Y., Fukao, Y., Kaneko-Kawano, T., Zhang, H., She, Y.-M., et al., Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics- and proteomics-based screening. *Plant Biotechnology Journal* 2020, 18, 415–428.
142. Luo, W., Xiao, Y., Liang, Q., Su, Y., Xiao, L., Identification of Potential Auxin-Responsive Small Signaling Peptides through a Peptidomics Approach in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules* 2019, 24, 3146.
143. Villalobos Solis, M.I., Poudel, S., Bonnot, C., Shrestha, H.K., Hettich, R.L., Veneault-Fourrey, C., Martin, F., Abraham, P.E., A Viable New Strategy for the Discovery of Peptide Proteolytic Cleavage Products in Plant-Microbe Interactions. *MPMI* 2020, 33, 1177–1188.
144. Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., Plant–

- microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* 2020, *18*, 607–621.
145. Fesenko, I., Shabalina, S.A., Mamaeva, A., Knyazev, A., Glushkevich, A., Lyapina, I., Ziganshin, R., Kovalchuk, S., Kharlampieva, D., Lazarev, V., et al., A vast pool of lineage-specific microproteins encoded by long non-coding RNAs in plants. *Nucleic Acids Research* 2021, *49*, 10328–10346.
146. Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., White, C., Schaefer, D.G., Nogu e, F., CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol J* 2017, *15*, 122–131.
147. Fesenko, I., Kirov, I., Knyazev, A., Khazigaleeva, R., Lazarev, V., Kharlampieva, D., Grafkaia, E., Zgoda, V., Butenko, I., Arapidi, G., et al., Distinct types of short open reading frames are translated in plant cells. *Genome Res.* 2019, gr.253302.119.
148. Schaefer, D.G., Zr yd, J.P., Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 1997, *11*, 1195–1206.
149. Kabir, M.N., Taheri, A., Dumenyo, C.K., Development of PCR-Based Detection System for Soft Rot Pectobacteriaceae Pathogens Using Molecular Signatures. *Microorganisms* 2020, *8*, 358.
150. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014, *30*, 2114–2120.
151. Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 2015, *12*, 357–360.
152. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009, *25*, 2078–2079.
153. Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 2014,

- 30, 923–930.
154. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010, 26, 139–140.
 155. Smirnova, A.V., Matveyeva, N.P., Polesskaya, O.G., Yermakov, I.P., Generation of reactive oxygen species during pollen grain germination. *Russ J Dev Biol* 2009, 40, 345.
 156. Abarca, A., Franck, C.M., Zipfel, C., Family-wide evaluation of RAPID ALKALINIZATION FACTOR peptides. *Plant Physiology* 2021, 187, 996–1010.
 157. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, 23, 2947–2948.
 158. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009, 25, 1189–1191.
 159. Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* 2019, 20, 1160–1166.
 160. Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2015, 32, 268–274.
 161. Minh, B.Q., Nguyen, M.A.T., von Haeseler, A., Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* 2013, 30, 1188–1195.
 162. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermin, L.S., ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 2017, 14, 587–589.
 163. Chen, Z., Zhao, P., Li, F., Leier, A., Marquez-Lago, T.T., Wang, Y., Webb, G.I., Smith, A.I., Daly, R.J., Chou, K.-C., et al., iFeature: a Python package and web server for features extraction and selection from protein and peptide sequences. *Bioinformatics* 2018, 34, 2499–2502.

164. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., et al., STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015, *43*, D447-452.
165. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003, *13*, 2498–2504.
166. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., Vilo, J., g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 2019, *47*, W191–W198.
167. Lang, D., Ullrich, K.K., Murat, F., Fuchs, J., Jenkins, J., Haas, F.B., Piednoel, M., Gundlach, H., Bel, M.V., Meyberg, R., et al., The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *The Plant Journal* 2018, *93*, 515–533.
168. Shaw, A.J., Schmutz, J., Devos, N., Shu, S., Carrell, A.A., Weston, D.J., Chapter Five - The Sphagnum Genome Project: A New Model for Ecological and Evolutionary Genomics, in: Rensing, S.A. (Ed.), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, 2016, pp. 167–187.
169. Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., et al., Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 2017, *171*, 287-304.e15.
170. Zhang, J., Fu, X.-X., Li, R.-Q., Zhao, X., Liu, Y., Li, M.-H., Zwaenepoel, A., Ma, H., Goffinet, B., Guan, Y.-L., et al., The hornwort genome and early land plant evolution. *Nature Plants* 2020, *6*, 107–118.
171. Reboledo, G., Agorio, A.D., Vignale, L., Batista-García, R.A., Ponce De León, I., Transcriptional profiling reveals conserved and species-specific plant defense responses during the interaction of *Physcomitrium patens* with *Botrytis*

- cinerea. *Plant Mol Biol* 2021, 107, 365–385.
172. Li, W., Godzik, A., Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2006, 22, 1658–1659.
173. Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008, 3, 163–175.
174. van Rossum, G., Drake Jr, F.L., Python reference manual. *Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam* 1995.
175. Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., et al., SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods* 2020, 17, 261–272.
176. Waskom, M.L., seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software* 2021, 6, 3021.
177. McKinney, W., Python for Data Analysis: Data Wrangling with Pandas, NumPy, and IPython, 2nd edition, O'Reilly Media, Sebastopol, California 2017.
178. Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 7623–7627.
179. Fernandez, A., Hilson, P., Beeckman, T., GOLVEN peptides as important regulatory signalling molecules of plant development. *Journal of Experimental Botany* 2013, 64, 5263–5268.
180. Srivastava, R., Liu, J.-X., Guo, H., Yin, Y., Howell, S.H., Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *The Plant Journal* 2009, 59, 930–939.
181. Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., Ryan, C.A., RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98, 12843–12847.
182. Cao, J., Shi, F., Evolution of the RALF Gene Family in Plants: Gene

- Duplication and Selection Patterns. *Evol Bioinform Online* 2012, 8, EBO.S9652.
183. Whitewoods, C.D., Cammarata, J., Nemec Venza, Z., Sang, S., Crook, A.D., Aoyama, T., Wang, X.Y., Waller, M., Kamisugi, Y., Cuming, A.C., et al., CLAVATA Was a Genetic Novelty for the Morphological Innovation of 3D Growth in Land Plants. *Current Biology* 2018, 28, 2365-2376.e5.
184. Campbell, L., Turner, S.R., A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups. *Front Plant Sci* 2017, 8.
185. Murphy, E., De Smet, I., Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci* 2014, 19, 664–671.
186. Tena, G., Immunity: RALF to the rescue. *Nat Plants* 2016, 2, 16067.
187. Wiegand, A., Prüfer, D., Schulze Gronover, C., Loss of function mutation of the Rapid Alkalinization Factor (RALF1)-like peptide in the dandelion *Taraxacum koksaghyz* entails a high-biomass taproot phenotype. *PLoS One* 2019, 14, e0217454.
188. Hunt, L., Bailey, K.J., Gray, J.E., The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytol* 2010, 186, 609–614.
189. Sun, Q., Qu, J., Yu, Y., Yang, Z., Wei, S., Wu, Y., Yang, J., Peng, Z., TaEPFL1, an EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) secreted peptide gene, is required for stamen development in wheat. *Genetica* 2019, 147, 121–130.
190. Slezina, M.P., Istomina, E.A., Korostyleva, T.V., Kovtun, A.S., Kasianov, A.S., Konopkin, A.A., Shcherbakova, L.A., Odintsova, T.I., Molecular Insights into the Role of Cysteine-Rich Peptides in Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* Infection in Tomato Based on Transcriptome Profiling. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 5741.
191. Chae, K., Lord, E.M., Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. *Ann. Bot.* 2011, 108, 627–636.
192. Onrubia, M., Pollier, J., Bossche, R.V., Goethals, M., Gevaert, K., Moyano, E., Vidal-Limon, H., Cusidó, R.M., Palazón, J., Goossens, A., Taximin,

- a conserved plant-specific peptide is involved in the modulation of plant-specialized metabolism. *Plant Biotechnology Journal* 2014, 12, 971–983.
193. Liu, F., Zhang, X., Lu, C., Zeng, X., Li, Y., Fu, D., Wu, G., Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *J. Exp. Bot.* 2015, 66, 5663–5681.
194. Slavokhotova, A.A., Shelenkov, A.A., Andreev, Ya.A., Odintsova, T.I., Hevein-like antimicrobial peptides of plants. *Biochemistry Moscow* 2017, 82, 1659–1674.
195. Plattner, S., Gruber, C., Stadlmann, J., Widmann, S., Gruber, C.W., Altmann, F., Bohlmann, H., Isolation and Characterization of a Thionin Proprotein-processing Enzyme from Barley. *J Biol Chem* 2015, 290, 18056–18067.
196. Sugita, S., Yamada, Y., Horie, S., Nakamura, O., Ishidoh, K., Yamamoto, Y., Yamagami, S., Mochizuki, M., Induction of T Regulatory Cells by Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-2 α on Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, 52, 2598–2605.
197. Gutiérrez-Marcos, J.F., Costa, L.M., Biderre-Petit, C., Khbaya, B., O’Sullivan, D.M., Wormald, M., Perez, P., Dickinson, H.G., maternally expressed gene1 Is a novel maize endosperm transfer cell-specific gene with a maternal parent-of-origin pattern of expression. *Plant Cell* 2004, 16, 1288–1301.
198. Ohki, S., Takeuchi, M., Mori, M., The NMR structure of stomagen reveals the basis of stomatal density regulation by plant peptide hormones. *Nat Commun* 2011, 2, 512.
199. Ryan, C.A., Pearce, G., Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100, 14577–14580.
200. Peng, Y., van Wersch, R., Zhang, Y., Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *MPMI* 2018, 31, 403–409.
201. Chen, Y.-C., Siems, W.F., Pearce, G., Ryan, C.A., Six Peptide Wound

- Signals Derived from a Single Precursor Protein in *Ipomoea batatas* Leaves Activate the Expression of the Defense Gene *Sporamin*. *J Biol Chem* 2008, 283, 11469–11476.
202. Matsubayashi, Y., Small Post-Translationally Modified Peptide Signals in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 2011, 9, e0150.
203. Zhang, X., Yang, Z., Wu, D., Yu, F., RALF–FERONIA Signaling: Linking Plant Immune Response with Cell Growth. *Plant Commun* 2020, 1, 100084.
204. Ginanjar, E.F., Teh, O.-K., Fujita, T., Characterisation of rapid alkalinisation factors in *Physcomitrium patens* reveals functional conservation in tip growth. *New Phytol* 2022, 233, 2442–2457.
205. Venisse, J.-S., Gullner, G., Brisset, M.-N., Evidence for the Involvement of an Oxidative Stress in the Initiation of Infection of Pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 2001, 125, 2164–2172.
206. Engelsdorf, T., Gigli-Bisceglia, N., Veerabagu, M., McKenna, J.F., Vaahtera, L., Augstein, F., Van der Does, D., Zipfel, C., Hamann, T., The plant cell wall integrity maintenance and immune signaling systems cooperate to control stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal* 2018, 11, eaao3070.
207. Ponce de León, I., Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Bentancor, M., Vidal, S., *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 2007, 7, 52.
208. Andersson, R.A., Akita, M., Pirhonen, M., Gammelgård, E., Valkonen, J.P.T., Moss–*Erwinia* pathosystem reveals possible similarities in pathogenesis and pathogen defense in vascular and nonvascular plants. *J Gen Plant Pathol* 2005, 71, 23–28.
209. Ponce de León, I., Schmelz, E.A., Gaggero, C., Castro, A., Alvarez, A., Montesano, M., *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Mol Plant Pathol* 2012, 13, 960–974.
210. Akita, M., Lehtonen, M.T., Koponen, H., Marttinen, E.M., Valkonen,

- J.P.T., Infection of the Sunagoke moss panels with fungal pathogens hampers sustainable greening in urban environments. *Science of The Total Environment* 2011, 409, 3166–3173.
211. Alvarez, A., Montesano, M., Schmelz, E., Ponce de León, I., Activation of Shikimate, Phenylpropanoid, Oxylipins, and Auxin Pathways in *Pectobacterium carotovorum* Elicitors-Treated Moss. *Frontiers in Plant Science* 2016, 7.
212. Shen, Q., Bourdais, G., Pan, H., Robatzek, S., Tang, D., Arabidopsis glycosylphosphatidylinositol-anchored protein LLG1 associates with and modulates FLS2 to regulate innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114, 5749–5754.
213. Bjornson, M., Pimprikar, P., Nürnberger, T., Zipfel, C., The transcriptional landscape of *Arabidopsis thaliana* pattern-triggered immunity. *Nat Plants* 2021, 7, 579–586.
214. Campos, M.D., Félix, M. do R., Patanita, M., Materatski, P., Varanda, C., High throughput sequencing unravels tomato-pathogen interactions towards a sustainable plant breeding. *Hortic Res* 2021, 8, 171.
215. Carella, P., Gogleva, A., Hoey, D.J., Bridgen, A.J., Stolze, S.C., Nakagami, H., Schornack, S., Conserved Biochemical Defenses Underpin Host Responses to Oomycete Infection in an Early-Divergent Land Plant Lineage. *Current Biology* 2019, 29, 2282-2294.e5.
216. Phukan, U.J., Jeena, G.S., Shukla, R.K., WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Front Plant Sci* 2016, 7, 760.
217. An, L., Zhang, S., Guo, P., Song, L., Xie, C., Guo, H., Fang, R., Jia, Y., RIR1 represses plant immunity by interacting with mitochondrial complex I subunit in rice. *Mol Plant Pathol* 2022, 23, 92–103.
218. Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Vilo, J., Peterson, H., gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. *F1000Res* 2020, 9, ELIXIR-709.
219. Hongo, S., Sato, K., Yokoyama, R., Nishitani, K., Demethylesterification

- of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the Arabidopsis stem. *Plant Cell* 2012, 24, 2624–2634.
220. Leng, Y., Yang, Y., Ren, D., Huang, L., Dai, L., Wang, Y., Chen, L., Tu, Z., Gao, Y., Li, X., et al., A Rice PECTATE LYASE-LIKE Gene Is Required for Plant Growth and Leaf Senescence. *Plant Physiol* 2017, 174, 1151–1166.
221. Atanasova, L., Dubey, M., Grujić, M., Gudmundsson, M., Lorenz, C., Sandgren, M., Kubicek, C.P., Jensen, D.F., Karlsson, M., Evolution and functional characterization of pectate lyase PEL12, a member of a highly expanded *Clonostachys rosea* polysaccharide lyase 1 family. *BMC Microbiol* 2018, 18, 178.
222. Zhao, C., Jiang, W., Zayed, O., Liu, X., Tang, K., Nie, W., Li, Y., Xie, S., Li, Y., Long, T., et al., The LRXs-RALFs-FER module controls plant growth and salt stress responses by modulating multiple plant hormones. *Natl Sci Rev* 2021, 8, nwaa149.
223. Mecchia, M.A., Santos-Fernandez, G., Duss, N.N., Somoza, S.C., Boisson-Dernier, A., Gagliardini, V., Martínez-Bernardini, A., Fabrice, T.N., Ringli, C., Muschietti, J.P., et al., RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis. *Science* 2017, 358, 1600–1603.
224. Wydra, K., Beri, H., Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2006, 68, 41–50.
225. Lionetti, V., Cervone, F., Bellincampi, D., Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J Plant Physiol* 2012, 169, 1623–1630.
226. Draeger, C., Ndinyanka Fabrice, T., Gineau, E., Mouille, G., Kuhn, B.M., Moller, I., Abdou, M.-T., Frey, B., Pauly, M., Bacic, A., et al., Arabidopsis leucine-rich repeat extensin (LRX) proteins modify cell wall composition and influence plant growth. *BMC Plant Biol* 2015, 15, 155.
227. Zhang, Y.-M., Ye, D.-X., Liu, Y., Zhang, X.-Y., Zhou, Y.-L., Zhang, L.,

- Yang, X.-L., Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. *Advanced Agrochem* 2023, 2, 58–78.
228. Ziemann, S., van der Linde, K., Lahrmann, U., Acar, B., Kaschani, F., Colby, T., Kaiser, M., Ding, Y., Schmelz, E., Huffaker, A., et al., An apoplastic peptide activates salicylic acid signalling in maize. *Nature Plants* 2018, 4, 172–180.
229. Shapiguzov, A., Vainonen, J., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J., ROS-talk – how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Front. Plant Sci.* 2012, 3.