

# Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии

Т.И. Одинцова , М.П. Слезина, Е.А. Истомина

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие компоненты защитной системы растений и животных, они представляют собой древний механизм врожденной устойчивости, обеспечивающий «первую линию обороны» против патогенов. Выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки (ЛПБ), геверины- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды). Обзор посвящен характеристике семейства тионинов. Тионины – характерное только для растений семейство АМП, состоящее из коротких (~5 кДа) цистеин-богатых пептидов (с 6 или 8 остатками цистеина в молекуле), которые обладают антимикробными и токсическими свойствами. На основании сходства аминокислотных последовательностей и расположения дисульфидных связей выделяют пять структурных классов тионинов. Установлена пространственная структура ряда тионинов. Показано, что амфипатическая молекула тионина имеет форму греческой буквы Г, у которой длинное плечо образовано двумя антипараллельными α-спиралями, а короткое – двумя параллельными β-тяжами. Выявлены аминокислотные остатки, ответственные за антимикробную активность тионинов. Тионины синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Тионины являются защитными пептидами растений против патогенных бактерий и грибов, которые действуют в микромолярных концентрациях непосредственно на мембраны микроорганизмов, хотя детальный механизм действия этих АМП до конца не выяснен. Помимо патогенов растений, тионины подавляют рост ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов человека, таких как *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Тионины токсичны для различного типа клеток, включая линии раковых клеток млекопитающих. Трансгенные растения, в которых экспрессируются гены тионинов, обладают повышенной устойчивостью к патогенам. Широкий спектр антимикробной и токсической активности тионинов открывает возможности их практического использования в сельском хозяйстве и медицине.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; тионины; иммунитет растений.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Одинцова Т.И., Слезина М.П., Истомина Е.А. Тионины растений: строение, биологические функции и перспективы использования в биотехнологии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):667-675. DOI 10.18699/VJ18.409

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):667-675. DOI 10.18699/VJ18.409

УДК 615.331:632.9

Поступила в редакцию 21.03.2018

Принята к публикации 18.06.2018

© АВТОРЫ, 2018

 e-mail: odintsova2005@rambler.ru

## Plant thionins: structure, biological functions and potential use in biotechnology

T.I. Odintsova , M.P. Slezina, E.A. Istomina

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of defense system in both plants and animals. They represent an ancient mechanism of innate immunity providing rapid first line of defense against pathogens. Plant AMPs are classified into several families: thionins, defensins, non-specific lipid-transfer proteins, hevein- and knottin-type peptides, hairpinins and macrocyclic peptides (cyclotides). The review focuses on the thionin family. Thionins comprise a plant-specific AMP family that consists of short (~5 kDa) cysteine-rich peptides containing 6 or 8 cysteine residues with antimicrobial and toxic properties. Based on similarity in amino acid sequences and the arrangement of disulfide bonds, five structural classes of thionins are discriminated. The three-dimensional structures of a number of thionins have been determined. The amphipathic thionin molecule resembles the Greek letter Г, in which the long arm is formed by two anti-parallel α-helices, and the short one – by two parallel β-strands. The residues responsible for the antimicrobial activity of thionins have been identified. Thionins are synthesized as precursor proteins consisting of a signal peptide, the mature peptide region and the C-terminal prodomain. Thionins protect plants from pathogenic bacteria and fungi acting directly on the membranes of microorganisms at micromolar concentrations, although their precise mode of action remains unclear. In addition to plant pathogens, thionins inhibit growth of a number of human pathogens and opportunistic microorganisms, such as *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Thionins are toxic to different types of cells including mammalian cancer cell lines. Transgenic plants expressing thionin genes display enhanced resistance to pathogens. A wide range of biological activities makes thionins promising candidates for practical application in agriculture and medicine.

Key words: antimicrobial peptides; thionins; plant immunity.

В течение жизни растения постоянно сталкиваются с патогенами, для борьбы с которыми они используют различные защитные механизмы. Среди них – синтез антимикробных соединений белковой и небелковой природы. Важнейшими белковыми компонентами защитной системы растений являются антимикробные пептиды (АМП), которые представляют собой древний механизм врожденной устойчивости, обеспечивающий не требующую больших затрат энергии «первую линию обороны» против патогенов. Антимикробные пептиды растений обладают рядом общих свойств: небольшой размер молекул (молекулярная масса менее 10 кДа), положительный заряд и амфифильность структуры (Egorov, Odintsova, 2012; Tam et al., 2015; Sarethy, 2017). Эти структурные особенности позволяют АМП непосредственно или с участием рецепторов взаимодействовать с мембранами микроорганизмов, нарушая их проницаемость, и таким образом ингибировать рост и развитие патогенов. Подавляющее большинство АМП растений относится к цистеин-богатым пептидам, в молекулах которых четное число остатков цистеина (2, 4, 6, 8 и 10), образующих дисульфидные связи, что придает молекулам АМП высокую структурную стабильность. По гомологии аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива и пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липид-переносящие белки, гевеино- и ноттиноподобные пептиды, гарпинины, а также макроциклические пептиды (циклотиды).

Интерес, проявляемый к АМП в последние годы, связан с возможностью использования их в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями культурных растений, а также в медицине для разработки лекарственных препаратов нового поколения (de Souza Cândido et al., 2014; Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

## Тионины

### Структурные особенности

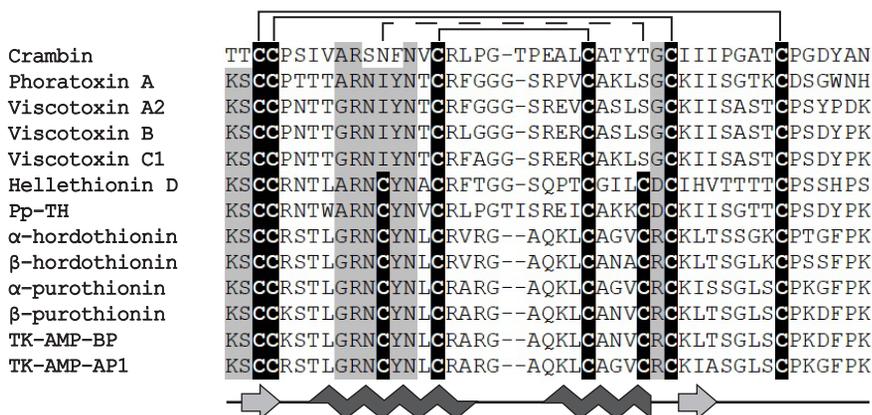
Тионины представляют собой короткие (~5 кДа) цистеин-богатые пептиды, которые были впервые обнаружены в эндосперме зерновок пшеницы (Balls et al., 1942). В дальнейшем они были найдены у многих одно- и двудольных растений. Описано около 100 последовательностей тионинов из 15 видов растений (Stec, 2006). В отличие от семейства дефензинов, представители которого обнаружены не только у растений, но и у животных, тионины встречаются только у растений. По числу остатков цистеина тионины разделяют на две основные группы: пептиды, содержащие шесть и восемь остатков цистеина соответственно. На основании сходства аминокислотных последовательностей и расположения дисульфидных связей выделяют пять структурных классов тионинов (I–V). Тионины класса I содержатся в эндосперме семян злаковых. Они состоят из 45 аминокислот, из которых 8 приходится на цистеин, и у них высокий положительный заряд молекул. Тионины класса II присутствуют в листьях и орехах паразитического растения *Pyricularia pubera*, а также в листьях ячменя *Hordeum vulgare*. Они менее основны, чем тионины класса I, и состоят из 46–47 аминокислотных остатков. У них также восемь остатков цистеина в молекуле. Тионины

класса III выделены из различных видов омелы, таких как *Viscum album*, *Phoradendron tomentosum*, *Phoradendron liga* и *Dendrophthora clavata*. Они содержат 45–46 аминокислот, имеют три дисульфидные связи и их заряд такой же, как у тионинов класса II. Тионины класса IV состоят из 46 аминокислот, имеют три дисульфидные связи и нейтральны. Они выделены из семян *Crambe abyssinica*. К тионинам класса V относится тионин пшеницы, который является укороченным вариантом тионинов класса I. Аминокислотные последовательности тионинов различных классов обладают высоким сходством. На рис. 1 представлены аминокислотные последовательности тионинов некоторых видов растений.

Все тионины синтезируются в виде препробелков с молекулярной массой ~18 кД, которые состоят из сигнального пептида, основного тионинового домена и кислого С-концевого пропептида. В пределах вида С-концевые пропептиды высоко консервативны, особенно это касается положения в полипептидной цепи шести остатков цистеина (Schradler-Fischer, Apel, 1993). Существует также гомология, хотя и менее выраженная, между кислыми пропептидами тионинов разных видов растений. Консерватизм последовательности С-концевого продомена свидетельствует о большой функциональной значимости этой области предшественника. Удаление сигнального пептида и С-концевого пропептида происходит в ходе посттрансляционного процессинга предшественника. Из листьев табака выделена вакуолярная протеиназа, которая отщепляет сигнальный пептид от предшественника, что необходимо для активации токсичных свойств тионина (Romero et al., 1997). Из этиолированных проростков ячменя получена сериновая протеиназа – субтилаза, относящаяся к семейству пирролизиннов, которая осуществляет процессинг предшественника тионина, отщепляя С-концевой продомен (Plattner et al., 2015). Роль кислого С-концевого продомена до конца не изучена. Предполагают, что он необходим для направленного транспорта зрелого тионина к месту назначения – в вакуоли, клеточные стенки или белковые тела. Кроме того, этот продомен служит для нейтрализации токсических свойств зрелого тионина до поступления в межклеточное пространство или в вакуоли, т.е. для защиты клеток растения от собственного токсина (Bohlmann, 1994). Возможно также, что он является внутримолекулярным шапероном, обеспечивающим фолдинг тионина.

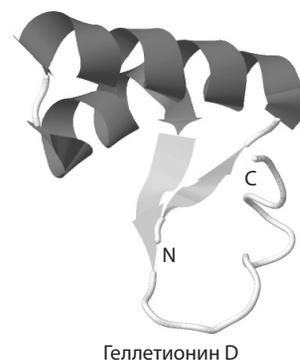
При атаке патогена экспрессия генов тионинов регулируется метилжасмонатом – растительным гормоном, который играет ключевую роль в защитных реакциях растений. Показано, что у *Arabidopsis thaliana* регуляция экспрессии генов тионинов *Thi2.1* и *Thi2.2* осуществляется по-разному. Экспрессия *Thi2.1* в цветках индуцируется заражением *Fusarium oxysporum* и регулируется метилжасмонатом, в то время как экспрессия *Thi2.2* наблюдается в проростках и не индуцируется жасмонатом (Stotz et al., 2013).

Методом рентгеноструктурного анализа определена трехмерная структура 6-Сус крамбина семян *C. abyssinica*, 8-Сус тионинов пшеницы и ячменя, а также вискотоксина АЗ листьев омелы. Структура некоторых тионинов была определена методами спектроскопии ядерного магнит-

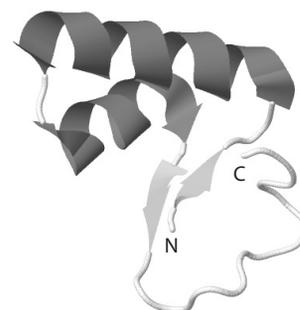


**Рис. 1.** Аминокислотные последовательности тионинов: крамбин *C. abyssinica* (GenBank P01542.2); форатоксин А *P. tomentosum* (GenBank P01539.1); вискотоксин А2 (GenBank P32880.1); вискотоксин В (GenBank P08943.2); вискотоксин С1 (GenBank P83554.1) из *V. album*; геллетионин D *Helleborus purpurascens* (GenBank P60057.1); Pp-TH *P. pubera* (GenBank P07504.1);  $\alpha$ -гордотионин (GenBank AAA32966.1) и  $\beta$ -гордотионин (GenBank 1206255A) *H. vulgare*;  $\alpha$ -пуротионин (GenBank CAA65313.1) и  $\beta$ -пуротионин (GenBank CAA65312.1) из *Triticum aestivum*; TK-AMP-BP и TK-AMP-AP1 *Triticum kiharae* (наши неопубликованные данные).

Остатки цистеина выделены белым шрифтом на черном фоне, функционально значимые аминокислотные остатки – черным шрифтом на сером фоне. Линиями сверху обозначены дисульфидные связи. Внизу представлена вторичная структура тионинов:  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структурные элементы изображены серым и светло-серым цветом соответственно.



Геллетионин D



Вискотоксин C1

ного резонанса: форатоксина А, крамбина, вискотоксина А3 и С1,  $\alpha$ -гордотионина, пуротионина и геллетионина. Во всех случаях показано, что амфипатическая молекула тионина имеет форму греческой буквы Г, у которой длинное плечо образовано двумя антипараллельными  $\alpha$ -спиралями, а короткое – двумя параллельными  $\beta$ -тяжами. С-концевой участок тионинов образует петлю (рис. 2). Показано, что желобок между двумя структурными доменами играет важную роль в функционировании тионинов (Stec et al., 2004; Oard et al., 2007).

### Пуротионины пшеницы

У гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (AABBDD) описано три тионина класса I, называемых пуротионинами. Это пуротионины  $\beta$ ,  $\alpha_B$  и  $\alpha_D$ , которые кодируются генами *pur A1*, *pur B1* и *pur D1*, расположенными на длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D соответственно (Sánchez-Monge et al., 1979). Два  $\beta$ -пуротионина описано у доноров генома А полиплоидных пшениц – *T. monococcum* и *T. urartu*. Кроме того, у гексаплоидной пшеницы есть тионины класса V, гены которых располагаются на расстоянии нескольких килобаз от генов тионинов класса I на длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D (Castagnaro et al., 1992). Нами в гексаплоидной пшенице *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., которая представляет собой синтетический аллополиплоид, полученный при скрещивании *Triticum timopheevii* с *Aegilops tauschii* и обладающий повышенной устойчивостью к патогенам, обнаружено также три тионина, два из которых – Tk-AMP-AP1 и Tk-AMP-BP – были выделены из семян и просеквенированы (наши неопубликованные данные). Структура Tk-AMP-BP оказалась идентичной  $\beta$ -пуротионину *T. aestivum*. Значительно большее разнообразие пуротионинов было выявлено при анализе транскриптомов *T. kiharae* методом высокоэффективного параллельного секвенирования (NGS) (наши неопубликованные данные). Для поиска транскриптов предшественников тионинов был использован алгоритм, основанный на консервативных цистеиновых мотивах, характерных для С-концевого продомена и зрелого пептида предшественников тионинов (Silverstein et al., 2007). В результате в транскриптомах проростков пшеницы было обнаружено 15 транскриптов, кодирующих предшественники с характерными для тионинов цистеиновыми мотивами (рис. 3). Все они содержат специфичный для тионинов консервативный 6-цистеиновый С-концевой продомен. У транскрипта c32154\_g11 делегирована область цистеин-богатого зрелого тионина. Этот белок имеет 100 % сходство с uncharacterized protein

**Рис. 2.** Пространственная структура тионинов: геллетионин D (PDB: 1NBL) *H. purpurascens* и вискотоксин C1 (PDB: 1ORL) *V. album*.

$\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структурные элементы выделены серым и светло-серым цветом соответственно. N – N-конец молекулы; C – C-конец молекулы.

LOC109759362 из *A. tauschii* subsp. *tauschii* в базе данных NCBI. Еще у двух высоко гомологичных предшественников область зрелого пептида имеет всего четыре остатка цистеина, что не характерно для тионинов. Эти белки также аннотируются как uncharacterized proteins *A. tauschii* subsp. *tauschii* (99 и 100 % сходство для c41117\_g1 и c45947 соответственно). Все остальные предшественники имеют высокое сходство (64–100 %) с тионинами или тиониноподобными белками. У четырех предшественников – типичный для тионинов 8-цистеиновый домен с расположенными подряд двумя остатками цистеина в N-концевой области молекулы. У других предшественников в тиониновом домене расположены подряд три остатка цистеина, а число остатков цистеина варьирует от семи до десяти.

Интересно, что у другого представителя злаковых – колосняка песчаного (*Leymus arenarius* L.) – транскриптомным анализом нами было также выявлено 15 транскриптов, кодирую-

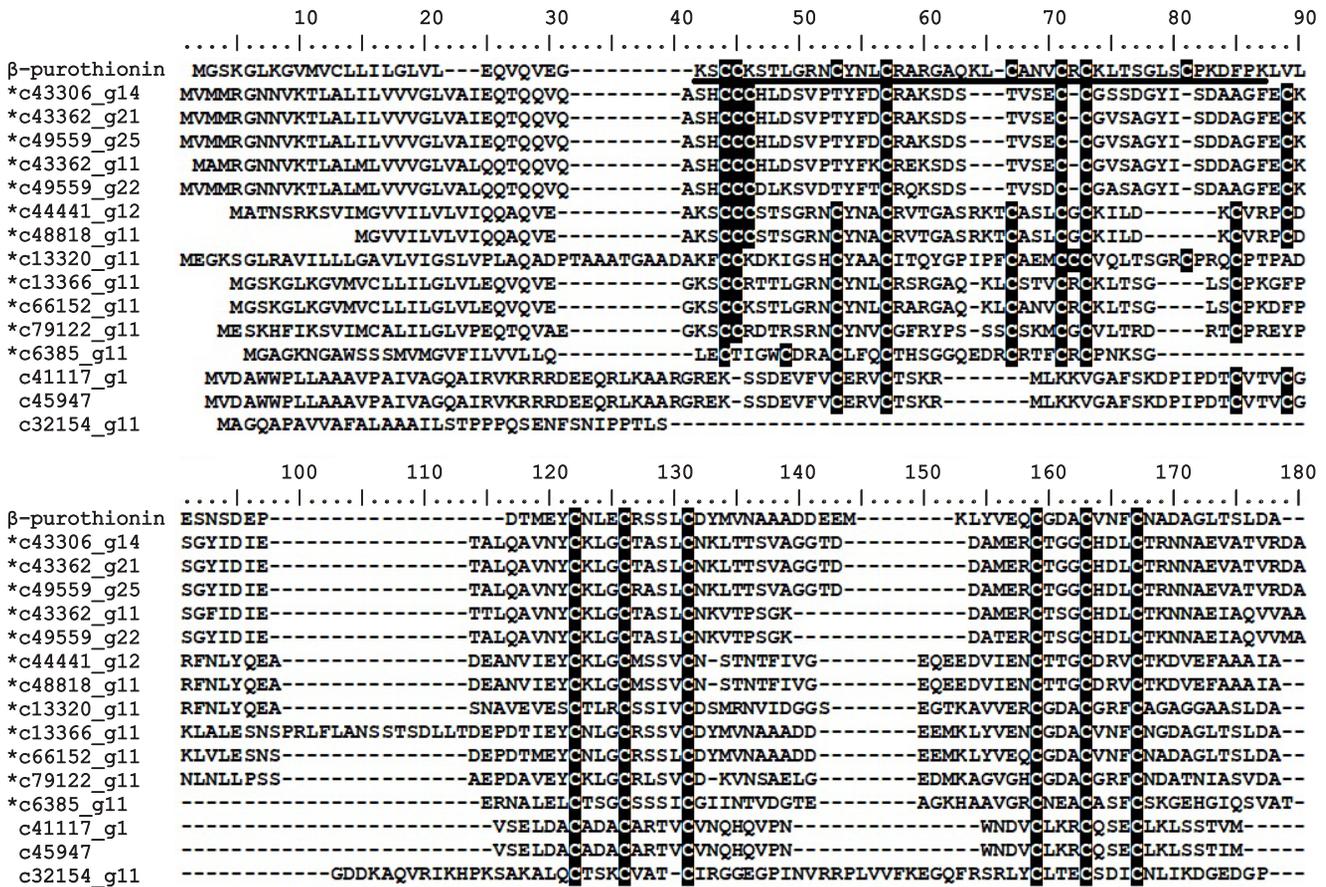


Рис. 3. Выравнивание транскрибированных последовательностей предшественников тионинов *T. kiharae*.

\* Последовательности, аннотированные как тионины и тиониноподобные белки в базе данных NCBI. В последовательности предшественника β-пуротионина (GenBank CAA65312.1) область зрелого пептида подчеркнута. Остатки цистеина выделены белым шрифтом на черном фоне.

щих предшественники с характерными для тионинов мотивами, однако лишь 4 из них аннотировались как тиониноподобные белки в базе данных NCBI (Slavokhotova et al., 2015). У шести гипотетических тионинов, как и у типичных тионинов, шесть или восемь остатков цистеина в молекуле и два расположенных подряд остатка цистеина в N-концевой области. У остальных пептидов число остатков цистеина варьировало от 5 до 14. Заслуживает внимания факт, что тиониноподобные белки колосняка песчаного с тремя расположенными подряд остатками цистеина в N-концевой области молекулы сходны по аминокислотной последовательности с таковыми пшеницы.

Таким образом, транскриптомный анализ выявил новые структурные типы тиониноподобных белков у пшеницы и родственного вида злаков – колосняка. Дальнейшие исследования будут направлены на анализ антимикробной активности этих новых пептидов растений.

### Взаимосвязь между структурой и функцией тионинов

К настоящему времени ряд тионинов выделен и охарактеризован, что позволило провести исследования роли отдельных аминокислотных остатков в пространственной структуре пептидов и их биологической активности. Исследования пуротионина пшеницы показали, что модификация всех аминокислотных групп, существенно меняющая

заряд молекулы, обуславливает потерю токсичности для клеток дрожжей и мышей. Модификация единственного консервативного остатка тирозина (Tyr-13) также значительно снижает токсичность. Полученные результаты свидетельствуют о важности положительно заряженных групп лизина во взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью клеток-мишеней, а также остатка тирозина в положении 13 для проявления тионином пшеницы токсичных свойств (Wada et al., 1982). Сравнение аминокислотных последовательностей различных тионинов показало, что помимо остатков цистеина ряд других аминокислотных остатков, таких как остатки 1, 2, 9-14, включая Tyr-13, которые «выстилают» щель между двумя структурными доменами пептида, высоко консервативны, что дало основание предположить их важность для функционирования тионинов. Исходя из пространственной структуры тионинов, было высказано предположение, что эта консервативная область связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран и вытесняет их, что приводит к солубилизации и лизису мембран (Stec et al., 2004). Был синтезирован нанопептид, соответствующий последовательности тионина *Pyricularia pubera* с 7-го по 15-й аминокислотный остаток, в котором остаток Cys-12 заменен на серин. Этот пептид, предположительно, является активным сайтом тионина. Было установлено, что он связывается с «рецепторным

сайтом» – фосфатидилсеринем фосфолипидной мембраны, но менее прочно, чем нативный тионин (Osórgo e Castro, Vernon, 2003). Остатки Lys-1 и Arg-10 составляют фосфат-связывающий сайт, в то время как остатки Ser-2 и Tyr-13 образуют глицерин-связывающий сайт. Остатки Asn-11 и Asn-14 стабилизируют образование гомодимера за счет межмолекулярных водородных связей (Oard et al., 2007). L.P. Vernon с коллегами (1985) считает, что положение 8, Trp-8 в тионине *Pyricularia*, также важно для антимикробной активности.

Сравнение последовательностей токсичных тионинов с нетоксичным крамбином *C. abyssinica* показало, что остатками, решающими для проявления токсичных свойств, служат консервативные остатки Lys-1 и Tyr-13, поскольку у крамбина в аналогичных положениях расположены остатки Thr-1 и Phe-13. Кроме того, остаток Arg-10 считается важным для поддержания пространственной структуры тионинов (Rao et al., 1993).

На примере тионина Pp-TH *P. pubera* с четырьмя дисульфидными связями было показано, что удаление одной дисульфидной связи приводит к существенному изменению фолдинга пептида (Vila-Perelló, Andreu, 2005). Был синтезирован укороченный на 45 % Pp-TH, состоящий из остатков 7–32, которые образуют две антипараллельные  $\alpha$ -спирали, стабилизированные двумя дисульфидными связями. Оказалось, что этот укороченный пептид сохраняет такую же антимикробную активность по отношению к ряду микроорганизмов и механизм действия, как и интактный Pp-TH (Vila-Perelló et al., 2005). Кроме того, у тионина Pp-TH *P. pubera* в положении 32 расположен остаток аспарагиновой кислоты Asp-32 вместо Arg-32, характерного для других 8-Cys тионинов. Чтобы понять роль этой мутации, был получен аналог тионина Pp-TH(D32R) с заменой аспарагиновой кислоты на аргинин. Установлено, что при этом структура модифицированного пептида в целом сохранялась, хотя отмечалось некоторое уменьшение содержания  $\alpha$ -спиралей. В то же время такой пептид обладал более высокой ингибирующей активностью против ряда грамтрицательных бактерий при том, что активность против других патогенов оставалась неизменной (Vila-Perelló et al., 2003). Тионин *P. pubera* был использован в качестве матрицы для создания более коротких, но таких же активных, как и нативный пептид, антимикробных соединений (Vila-Perelló et al., 2006).

#### Биологическая активность тионинов

Способность тионинов ингибировать рост бактерий и грибов *in vitro* известна давно (Stuart, Harris, 1942). R. Fernandez de Caleya с коллегами (1972) впервые показал, что тионины подавляют рост фитопатогенных бактерий, и выдвинул предположение о защитной роли этих белков *in planta*. Последующие исследования выявили, что тионины ингибируют рост как грамположительных, так и грамтрицательных бактерий, а также ряд фитопатогенных грибов и оомицетов, причем  $IC_{50}$  (концентрация, необходимая для 50 % ингибирования роста патогена) обычно составляет от 1 до 15 мкг/мл (Stec, 2006). Так, для тионинов пшеницы и ячменя, относящихся к тионинам класса I, эффективная концентрация, дающая 50 % ингибирование роста бактерий *Clavibacter michiganensis*

subsp. *sepedonicus* и *Pseudomonas solanacearum*, составляла  $2-3 \times 10^{-7}$  М, а патогенных грибов, таких как *Rosellinia necatrix*, *Colletotrichum lagenarium* и *Fusarium solani*, –  $1-4 \times 10^{-6}$  М (Molina et al., 1993). Пуротионин пшеницы вызывал лизис клеток патогена риса *Rhizoctonia solani* (штамм LR172), причем видимые изменения в мембране патогена наблюдались при концентрации пуротионина, равной 0.5 мкМ (Oard et al., 2004).

Интересно, что тионины способны ингибировать рост не только растительных патогенов, но и микроорганизмов, патогенных для человека и животных. Так, было показано, что тиониноподобные пептиды *Capsicum annuum* ингибируют рост клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* и *Candida tropicalis*, а также бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (Taveira et al., 2014, 2016). Кроме того, тиониноподобный пептид *C. annuum* CaThi ингибировал рост гриба *Fusarium solani*, предотвращая образование гиф. Были отмечены увеличение проницаемости мембран, индукция образования  $H_2O_2$  и активация каспаз. Установлено, что пептид проникал внутрь клеток патогена. При совместном применении с флюконазолом наблюдался синергизм действия двух антифунгальных агентов, в результате чего достигалась 100 % гибель клеток *F. solani* (Taveira et al., 2017). Эти авторы полагают, что тионин перца вызывает апоптоз клеток гриба; возможно, что он действует также и на внутриклеточные мишени. Тионин арабидопсиса Thi2.1 при экспрессии в эндотелиальной клеточной линии BE-E6E7 ингибировал рост *E. coli* и *Staphylococcus aureus*, в частности изолята, вызывающего мастит у коров, а также *C. albicans* (Loeza-Ángeles et al., 2008; Ochoa-Zarzosa et al., 2008a, b). Показано, что тионины пшеницы убивают клетки паразитического простейшего *Leishmania donovani*, вызывающего висцеральный лейшманиоз (Berrocal-Lobo et al., 2009). Гибель клеток паразита происходит за счет резкого увеличения проницаемости мембран. Приведенные примеры открывают возможность использования тионинов для лечения заболеваний человека и животных.

Помимо микроорганизмов, тионины действуют и на культуры клеток млекопитающих (Carrasco et al., 1981; Loeza-Ángeles et al., 2008), организм животных (млекопитающих) в целом (Coulson et al., 1942) и личинки насекомых (Kramer et al., 1979; Stec, 2006). При инъекции тионинов пшеницы, ячменя и ржи в личинки *Manduca sexta* полулетальная концентрация составляла 17–46 мкг/г веса (Kramer et al., 1979).

Тионины обладают цитотоксическим и противоопухолевым действием на клетки млекопитающих (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). Так, тионин *P. pubera* ингибирует рост клеток меланомы мыши (B16) и рака шейки матки (HeLa), при этом  $IC_{50} = 50$  мкг/мл. Одновременно этот тионин обладает цитотоксическим действием, вызывая гемолиз. Противоопухолевое действие связывают с деполаризацией мембран, приводящей к активации эндогенной фосфолипазы  $A_2$ , в результате чего происходит изменение структуры мембран и гибель клеток. К другой группе тионинов с противоопухолевым и цитотоксическим действием относятся вискотоксины. Вискотоксин В2 подавляет рост клеток саркомы крыс с  $IC_{50} = 1.6$  мкг/л (Kong et al., 2004). Вискотоксины А1, А2 и А3 обладают цитотокси-

ческим действием на лимфоциты человека, что связывают с индукцией образования активных форм кислорода и увеличением проницаемости мембран. Тем не менее у вискотоксинов гемолитические свойства выражены значительно слабее, чем у других тионинов (Coulon et al., 2002). Лигатоксин В *P. leaque* при концентрации 100 мкг/мл ингибирует рост клеток лимфомы (U937GTВ) и аденокарциномы человека (ACHN). В молекуле этого тионина есть ДНК-связывающий домен. Полагают, что связывание тионина с ДНК приводит к ингибированию синтеза нуклеиновых кислот (Li et al., 2002). Все фторатоксины (А–F) обладают токсичностью для клеток млекопитающих: А и В токсичны для крыс в концентрации 0.5–1 мг/кг; С–F подавляют рост клеток различных солидных опухолей, причем фторатоксин С отличается высокой избирательной активностью в отношении клеток рака груди (Johansson et al., 2003). Тионин *A. thaliana* Thi2.1 имеет также антиканцерогенное действие: он подавляет рост клеток MCF-7 на 94 % и HeLa на 38 %. В то же время этот тионин обладает цитотоксическим действием на эндотелиальные клетки быка и эпителиальные клетки молочной железы (Loeza-Ángeles et al., 2008). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксичность тионинов не является селективной, однако эти пептиды могут быть использованы при разработке новых противораковых препаратов.

Токсичность тионинов для различного типа клеток подтверждает их защитную роль от патогенов *in vivo*. В пользу этого говорит и целый ряд других данных, таких как синтез тионинов в ответ на действие патогенов (Bohlmann et al., 1998), локализация их в «уязвимых» тканях (Ortu et al., 1997), повышение устойчивости трансгенных растений, экспрессирующих тионины (см. ниже), а также снижение устойчивости к патогенам при сайленсинге генов тионинов (Rayapuram et al., 2008). Так, в частности, исследования транскриптома ячменя при заражении тлей *Rhopalosiphum padi*, *Myzus persicae* и *Myzus cerasi* выявили усиление экспрессии нескольких генов тионинов, особенно при инфицировании *M. persicae*, и в меньшей степени при заражении *R. padi*. Эктопическая экспрессия двух из этих генов в *Nicotiana benthamiana* снижала чувствительность к *M. persicae*, что указывало на то, что тионины участвуют в защите от тли (Escudero-Martinez et al., 2017). В то же время сайленсинг генов тионинов приводит к ослаблению устойчивости. Так, было показано, что при сайленсинге гена тионина растения *Nicotiana attenuata* в большей степени, чем растения табака дикого типа, поражаются оппортунистическими видами *Pseudomonas* и грибами от инфекции (Rayapuram et al., 2008).

Высокая токсичность тионинов по отношению к различным патогенам и клеткам насекомых и млекопитающих открывает перспективы их практического использования для создания на их основе биологически активных структурно более простых аналогов при разработке новых антимикробных соединений (Vila-Perelló et al., 2006).

Хотя основная роль тионинов состоит в защите от патогенов, они служат запасными белками и участвуют в таких процессах, как созревание и прорастание семян, упаковка запасных белков в белковые тела и их мобилизация при прорастании.

## Механизм действия

Считается, что токсичность тионинов связана с увеличением проницаемости мембран (Carrasco et al., 1981), которая ингибируется одно- и двухвалентными ионами металлов (Oard et al., 2007). На примере  $\alpha$ -гордотионина ячменя с использованием молекулярного моделирования был предложен механизм увеличения проницаемости мембран. Согласно представленной модели, тионин образует в мембране водный канал, что приводит к поступлению воды в липидный бислой и локальному разрушению мембраны (Oard, 2011). Вызванное тионинами изменение проницаемости мембран влечет за собой целый ряд других процессов, таких как деполяризация мембран, увеличение проницаемости для ионов  $Ca^{2+}$  и  $K^{+}$ , а также активация некоторых ферментов (Stec, 2006). Все эти вторичные процессы могут усилить первичный токсический эффект, который завершается полным разрушением клеток. Очевидно, что индуцированное тионинами увеличение проницаемости мембран основано на некоем универсальном процессе, а не связано с взаимодействием со специфическими рецепторами на поверхности клеточных мишеней. Согласно (Hughes et al., 2000), токсичность тионинов обусловлена формированием ионных каналов в клеточных мембранах путем непосредственного связывания с поверхностью липидов. J.A. Richard с коллегами (2002) считает, что тионины частично встраиваются в липидную мембрану за счет электростатических взаимодействий, что приводит к повышению жесткости мембран и увеличению текучести по краям межфазных участков. Образованию отрицательно заряженных участков, состоящих из фосфолипидов, способствует электростатическое взаимодействие между тионинами и отдельными группами молекул фосфолипидов. Эти участки, образованные токсинами, увеличивают текучесть мембран и вытесняют из них фосфолипиды, следствием чего становится усиление нестабильности мембран и необратимый лизис клеток (Stec et al., 2004).

Помимо увеличения проницаемости мембраны, тионины действуют и на внутриклеточные мишени: активируют эндогенную фосфолипазу  $A_2$  (Vernon, Bell, 1992) и аденилатциклазу (Huang et al., 1994).  $\beta$ -пуротионин ингибирует протеинкиназу С и связывается с кальмодулином. Кроме того, пуротионины ингибируют рибонуклеотидредуктазу и  $\beta$ -глюкуронидазу (Diaz et al., 1992). Предполагают, что вискотоксины могут непосредственно взаимодействовать с ДНК или РНК и ингибировать синтез нуклеиновых кислот и белка (Woynarowski, Konopa, 1980; Li et al., 2002); показано, что они обладают иммуномодулирующим действием (Tabiasco et al., 2002). Все обнаруженные у тионинов токсические свойства, начиная с разрушения мембран, затрагивают ключевые процессы в клетке, что в конечном итоге может привести к их гибели. Появляются данные о том, что тионины действуют не только на внутриклеточные мишени, но и на секретируемые белки патогенов. Так, исследование механизма действия антифунгального тионина *A. thaliana* Thi2.4 показало, что он связывается с секретируемым лектином *Fusarium graminearum*, который вызывает гибель клеток листьев, таким образом защищая растение от токсического действия лектина (Asano et al., 2013).

### Использование генов тионинов для повышения устойчивости растений к болезням

Гены тионинов с успехом применяли для трансформации растений и получения трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью как к бактериальным, так и грибным патогенам. В большинстве случаев в качестве трансгена использовали гены тионинов злаков. Остановимся на нескольких примерах.

Ген  $\beta$ -пуротионина пшеницы под контролем эндогенного промотора карбоангидразы был встроен в геном *A. thaliana* (Oard, Enright, 2006). Хотя в трансгенных растениях не происходила гиперэкспрессия гена  $\beta$ -пуротионина, они обладали повышенной устойчивостью к бактериальным и грибным патогенам – *Pseudomonas syringae* (штамм DC3000) и *F. oxysporum*. Экспрессия  $\beta$ -пуротионина в трансгенных растениях вызывала аномалии морфологии гиф гриба, а экстракт листьев трансгенных растений увеличивал проницаемость мембран у гриба *R. solani*.

Экспрессия гена  $\alpha$ -тионина ячменя под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в растениях табака приводила к увеличению устойчивости к двум бактериальным патогенам – *P. syringae* pv. *tabaci* и *P. syringae* pv. *syringae* (Carmona et al., 1993).

Черная гниль батата, вызванная грибом *Ceratocystis fimbriata*, представляет существенную проблему для тропических и субтропических районов земного шара, где выращивается батат, особенно для таких стран, как Индия, КНР и Индонезия. Патогенный гриб тормозит рост растений и отрицательно влияет на хранение клубней. Были созданы трансгенные растения батата со встроенным геном  $\alpha$ -гордотионина ячменя и показан высокий уровень экспрессии мРНК  $\alpha$ -гордотионина в листьях и клубнях трансгенных растений. По сравнению с нетрансгенными у трансгенных растений при инфекции *C. fimbriata* в меньшей степени желтели листья, и зоны некроза вокруг сайтов инокуляции спорами гриба также были меньше, чем у исходных нетрансформированных растений. Эти результаты свидетельствуют о перспективности использования генов тионинов для повышения устойчивости батата к черной гнили (Muramoto et al., 2012).

Ген тионина риса OsTH17 использовали для получения трансгенных линий риса сорта Nipponbare (Ji et al., 2015). Трансгенные растения обладали меньшей чувствительностью к оомицету *Pythium graminicola* и нематоду *Meloidogyne graminicola*, – двум наиболее вредоносным патогенам, поражающим корни риса. Основные бактериальные патогены риса – *Burkholderia plantarii* и *Burkholderia glumae* – также представляют большую проблему при выращивании риса. Гены эндогенных тионинов конститутивно экспрессируются в coleoptile, который является органом-мишенью для бактерий. Однако экспрессии эндогенных генов тионинов недостаточно для устойчивости к этим патогенам. В связи с этой проблемой были созданы трансгенные растения риса с геном тионина овса, который накапливался в значительных количествах в клеточных стенках. При проращивании семян нетрансгенных растений риса в присутствии патогена проростки быстро желтели и погибали, чего не происходило с трансгенными растениями риса, в которых экспрессировался ген тионина клеточных стенок овса. Таким образом, этот

тионин эффективно защищал растения риса от бактериальной инфекции (Iwai et al., 2002).

Ген  $\alpha$ -гордотионина ячменя был использован для трансформации яблонь (Krens et al., 2011). Четыре из шести полученных трансгенных линий оказались значительно более устойчивы к грибному патогену *Venturia inaequalis*, вызывающему паршу яблонь, в полевых условиях, причем этот признак сохранялся в течение четырех лет наблюдений. Экспрессия гена гордотионина у трансгенных растений также сохранялась на постоянном уровне.

Ген тионина арабидопсиса Thi2.1 под контролем неактивного в плодах промотора использовали для получения трансгенных растений томата, устойчивых к бактериальному и фузариозному вилту. Была достигнута конститутивная экспрессия трансгена в корнях и листьях растений томата. Трансгенные растения оказались более устойчивыми, чем не трансгенные к бактериальному и фузариозному вилту. Проведенные исследования показали, что в трансгенных линиях подавлена репликация бактериального патогена (Chan et al., 2005). Этот же ген тионина арабидопсиса был использован для повышения устойчивости чувствительного экотипа Columbia (Col-2) *A. thaliana* к заражению *F. oxysporum* f. sp. *matthiolaе*. О повышении устойчивости свидетельствовало подавление роста гриба на трансгенных растениях; более того, наблюдались аномалии роста гиф, проявлявшиеся, в частности, в виде гиперветвления (Epple et al., 1997).

В заключение следует отметить, что, хотя тионины известны уже давно, высокая токсичность этих пептидов в отношении широкого круга бактерий и грибов, патогенных для растений и человека, а также насекомых и опухолевых клеток человека, делает их молекулы чрезвычайно перспективными для разработки новых лекарственных препаратов и средств борьбы с болезнями растений. Детальные исследования механизмов действия тионинов позволят создать на их основе новые соединения с улучшенными свойствами, которые найдут применение в сельском хозяйстве и медицине.

### Благодарности

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-16-00032).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

- Asano T., Miwa A., Maeda K., Kimura M., Nishiuchi T. The secreted antifungal protein thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* suppresses the toxicity of a fungal fruit body lectin from *Fusarium graminearum*. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003581. DOI 10.1371/journal.ppat.1003581.
- Balls A.K., Hale W.S., Harris T.H. A crystalline protein from a lipoprotein of wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:279-288.
- Berrolcal-Lobo M., Molina A., Rodriguez-Palenzuela P., Garcia-Olmedo F., Rivas L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. Exp. Parasitol. 2009;122: 247-249.
- Bohlmann H. The role of thionins in plant protection. Crit. Rev. Plant Sci. 1994;13:1-16.
- Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K. Wounding and chemicals induce expression of the Arabi-

- dopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett. 1998;437(3):281-286.
- Carmona M.J., Molina A., Fernandez J.A., Lopez-Fando J.J., Garcia-Olmedo F. Expression of the  $\alpha$ -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. Plant J. 1993; 3(3):457-462.
- Carrasco I., Vazquez D., Hernandez-Lucas C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. Eur. J. Biochem. 1981;116(1): 185-189.
- Castagnaro A., Marañón C., Carbonero P., García-Olmedo F. Extreme divergence of a novel wheat thionin generated by a mutational burst specifically affecting the mature protein domain of the precursor. J. Mol. Biol. 1992;224(4):1003-1009.
- Chan Y.L., Prasad V., Sanjaya, Chen K.H., Liu P.C., Chan M.T., Cheng C.P. Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis* thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta. 2005;221(3):386-393. DOI 10.1007/s00425-004-1459-3.
- Coulon A., Berkane E., Sautereau A.M., Urech K., Rouge P., Lopez A. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3. Biochim. Biophys. Acta. 2002;1559(2):145-159. DOI 10.1016/S0005-2736(01)00446-1.
- Coulson E.J., Harris T.H., Axelrod B. Effect on small laboratory animals of the injection of the crystalline hydrochloride of a sulfur protein from wheat flour. Cereal Chem. 1942;19:301-307.
- de Souza Cândido E., e Silva Cardoso M.H., Sousa D.A., Viana J.C., de Oliveira-Júnior N.G., Miranda V., Franco O.L. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. Peptides. 2014;55:65-78. DOI 10.1016/j.peptides.2014.02.003.
- Díaz I., Carmona M.J., García-Olmedo F. Effects of thionins on beta-glucuronidase *in vitro* and in plant protoplasts. FEBS Lett. 1992; 296(3):279-282. DOI 10.1016/0014-5793(92)80304-Y.
- Egorov T.A., Odintsova T.I. Defense peptides of plant immune system. Russ. J. Bioorg. Khim. 2012;38(1):1-9. DOI 10.1134/S1068162012010062.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. Plant Cell. 1997;9(4):509-520. DOI 10.1105/tpc.9.4.509.
- Escudero-Martínez C.M., Morris J.A., Hedley P.E., Bos J.I.B. Barley transcriptome analyses upon interaction with different aphid species identify thionins contributing to resistance. Plant Cell Environ. 2017;40(11):2628-2643. DOI 10.1111/pce.12979.
- Fernández de Caleyá R., González-Pascual B., García-Olmedo F., Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. Appl. Microbiol. 1972;23(5):998-1000.
- Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., López-Meza J.E. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. Biomed. Res. Int. 2015;2015:735087. DOI 10.1155/2015/735087.
- Huang W., Vernon L.P., Bell J.D. Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cell membranes by the toxin thionin from *Pyricularia pubera*. Toxicon. 1994;32(7):789-797.
- Hughes P., Dennis E., Whitecross M., Llewellyn D., Gage P. The cytotoxic plant protein,  $\beta$ -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. J. Biol. Chem. 2000;275(2):823-827. DOI 10.1074/jbc.275.2.823.
- Iwai T., Kaku H., Honkura R., Nakamura S., Ochiai H., Sasaki T., Ohashi Y. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. Mol. Plant Microbe Interact. 2002;15(6):515-521. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.6.515.
- Ji H., Gheysen G., Ullah C., Verbeek R., Shang C., De Vleeschauwer D., Höfte M., Kyndt T. The role of thionins in rice defence against root pathogens. Mol. Plant Pathol. 2015;16(8):870-881. DOI 10.1111/mpp.12246.
- Johansson S., Gullbo J., Lindholm P., Ek B., Thunberg E., Samuelsson G., Larsson R., Bohlin L., Claeson P. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. Cell. Mol. Life Sci. 2003; 60(1):165-175. DOI 10.1007/s000180300011.
- Kong J.L., Du X.B., Fan C.X., Xu J.F., Zheng X.J. Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity. Acta Pharmaceutica Sinica. 2004;39(10):813-817.
- Kramer K.J., Klassen L.W., Jones B.L., Speirs R.D., Kammer A.E. Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). Toxicol. Appl. Pharmacol. 1979;48:179-183.
- Krens F.A., Schaart J.G., Groenwold R., Walraven A.E.J., Hesselink T., Thissen J.T.N.M. Performance and long-term stability of the barley hordeothionin gene in multiple transgenic apple lines. Transgenic Res. 2011;20:1113-1123. DOI 10.1007/s11248-011-9484-z.
- Li S.-S., Gullbo J., Lindholm P., Larsson R., Thunberg E., Samuelsson G., Bohlin L., Claeson P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. Biochem. J. 2002;366(2):405-413. DOI 10.1042/bj20020221.
- Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. Biotechnol. Lett. 2008; 30(10):1713-1719. DOI 10.1007/s10529-008-9756-8.
- Molina A., Goy P.A., Fraile A., Sanchez-Monge R., Garcia-Olmedo F. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. Plant Sci. 1993;92:169-177.
- Muramoto N., Tanaka T., Shimamura T., Mitsukawa N., Hori E., Koda K., Otani M., Hirai M., Nakamura K., Imaeda T. Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. Plant Cell Rep. 2012;31(6):987-997. DOI 10.1007/s00299-011-1217-5.
- Oard S.V. Deciphering a mechanism of membrane permeabilization by  $\alpha$ -hordeothionin peptide. Biochim. Biophys. Acta. 2011;1808(6): 1737-1745. DOI 10.1016/j.bbamem.2011.02.003.
- Oard S.V., Enright F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Cell Rep. 2006;25(6):561-572. DOI 10.1007/s00299-005-0102-5.
- Oard S., Karki B., Enright F. Is there a difference in metal ion-based inhibition between members of thionin family: molecular dynamics simulation study. Biophys. Chem. 2007;130(1-2):65-75. DOI 10.1016/j.bpc.2007.07.005.
- Oard S., Rush M.C., Oard J.H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. J. Appl. Microbiol. 2004;97(1):169-180. DOI 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Angeles H., Sagrero-Cisneros E., Villagómez-Gómez E., Lara-Zárate L., López-Meza J.E. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 2008a;127(3-4):425-430. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.08.031.
- Ochoa-Zarzosa A., Loeza-Lara P.D., Torres-Rodríguez F., Loeza-Angeles H., Mascot-Chiquito N., Sánchez-Baca S., López-Meza J.E. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008b;94(2):199-206. DOI 10.1007/s10482-008-9230-6.
- Orru S., Scaloni A., Giannattasio M., Urech K., Pucci P., Schaller G. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. Biol. Chem. 1997; 378(9):989-996.
- Osório e Castro V.R., Vernon L.P. Stimulation of prothrombinase activity by the nonapeptide Thr-Trp-Ala-Arg-Asn-Ser-Tyr-Asn-Val, a segment of a plant thionin. Peptides. 2003;24(4):515-521. DOI 10.1016/S0196-9781(03)00115-3.
- 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(29):18056-18067. DOI 10.1074/jbc.M115.647859.
- Rao U., Teeter M.M. Improvement of turn structure prediction by molecular dynamics: a case study of alpha 1-purothionin. *Protein Eng.* 1993;6(8):837-847.
- Rayapuram C., Wu J., Haas C., Baldwin I.T. *PR-13/Thionin* but not *PR-1* mediates bacterial resistance in *Nicotiana attenuata* in nature, and neither influences herbivore resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008;21(7):988-1000. DOI 10.1094/MPMI-21-7-0988.
- Richard J.A., Kelly I., Marion D., Pezolet M., Auger M. Interaction between  $\beta$ -purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a  $^{31}\text{P}$ -NMR and infrared spectroscopic study. *Biophys. J.* 2002;83: 2074-2083. DOI 10.1016/S0006-3495(02)73968-4.
- Romero A., Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F. Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. *Eur. J. Biochem.* 1997;243(1-2):202-208. DOI 10.1111/j.1432-1033.1997.0202a.x.
- Sánchez-Monge R., Delibes A., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F. Homoeologous chromosomal location of the genes encoding thionins in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 1979; 54(2):61-63. DOI 10.1007/BF00265470.
- Sarethy I.P. Plant peptides: bioactivity, opportunities and challenges. *Protein Pept. Lett.* 2017;24(2):102-108. DOI 10.2174/0929866523 666161220113632.
- Schrader-Fischer G., Apel K. cDNA-derived identification of novel thionin precursors in *Viscum album* that contain highly divergent thionin domains but conserved signal and acidic polypeptide domains. *Plant Mol. Biol.* 1993;23(6):1233-1242.
- Silverstein K.A., Moskal W.A., Jr., Wu H.C., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D., VandenBosch K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* 2007;51(2):262-280. DOI 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x.
- Slavokhotova A.A., Shelenkova T.I., Odintsova T.I. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant. Mol. Biol.* 2015;89(3):203-214. DOI 10.1007/s11103-015-0346-6.
- Stec B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63(12):1370-1385. DOI 10.1007/s00018-005-5574-5.
- Stec B., Markman O., Rao U., Heffron G., Henderson S., Vernon L.P., Brumfeld V., Teeter M.M. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J. Pept. Res.* 2004;64(6):210-224. DOI 10.1111/j.1399-3011.2004. 00187.x.
- Stotz H.U., Waller F., Wang K. Innate immunity in plants: The role of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity.* Eds. S. Hiemstra, S.A.J. Zaai. Springer, 2013;29-51.
- Stuart L.S., Harris T.H. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.* 1942;19: 288-300.
- Tabiasco J., Pont F., Fournie J.J., Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(10):2591-2600. DOI 10.1046/j.1432-1033.2002.02932.x.
- Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(4):711-757. DOI 10.3390/ ph8040711.
- Taveira G.B., Carvalho A.O., Rodrigues R., Trindade F.G., Da Cunha M., Gomes V.M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiol.* 2016;16:12. DOI 10.1186/ s12866-016-0626-6.
- Taveira G.B., Mathias L.S., da Motta O.V., Machado O.L., Rodrigues R., Carvalho A.O., Teixeira-Ferreira A., Perales J., Vasconcelos I.M., Gomes V.M. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers.* 2014;102(1):30-39. DOI 10.1002/bip.22351.
- Taveira G.B., Mello É.O., Carvalho A.O., Regente M., Pinedo M., de La Canal L., Rodrigues R., Gomes V.M. Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Biopolymers.* 2017;108(3). DOI 10.1002/bip.23008.
- Vernon L.P., Bell J.D. Membrane structure, toxins and phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Pharmacol. Ther.* 1992;54(3):269-295. DOI 10.1016/0163- 7258(92)90003-I.
- Vernon L.P., Evett G.E., Zeikus R.D., Gray W.R. A toxic thionin from *Pyricularia pubera*: purification, properties, and amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;238(1):18-29. DOI 10.1016/0003- 9861(85)90136-5.
- Vila-Perelló M., Andreu D. Characterization and structural role of disulfide bonds in a highly knotted thionin from *Pyricularia pubera*. *Biopolymers.* 2005;80(5):697-707. DOI 10.1002/bip.20270.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Synthetic and structural studies on *Pyricularia pubera* thionin: a single-residue mutation enhances activity against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 2003;536(1-3):215-219. DOI 10.1016/S0014- 5793(03)00053-X.
- Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Structural dissection of a highly knotted peptide reveals minimal motif with antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280(2): 1661-1668. DOI 10.1074/jbc.M410577200.
- Vila-Perelló M., Tognon S., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. *J. Med. Chem.* 2006;49(2):448- 451. DOI 10.1021/jm050882i.
- Wada K., Ozaki Y., Matsubara H., Yoshizumi H. Studies on purothionin by chemical modifications. *J. Biochem.* 1982;91(1):257-263.
- Wojnarowski J.M., Konopa J. Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe Seylers Z. *Physiol. Chem.* 1980;361:1535-1545.

#### ORCID ID

T.I. Odintsova [orcid.org/0000-0002-5563-9755](https://orcid.org/0000-0002-5563-9755)  
M.P. Slezina [orcid.org/0000-0003-1653-5993](https://orcid.org/0000-0003-1653-5993)  
E.A. Istomina [orcid.org/0000-0001-6426-6009](https://orcid.org/0000-0001-6426-6009)