

УДК:57.047

PR-БЕЛКИ РАСТЕНИЙ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ

А.И. Перфильева^{1,2}, Е.В. Рымарева¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Иркутский государственный технический университет»

Активация защитных реакций растения при контакте с патогенами может происходить посредством различных сигнальных путей, что выражается в изменении уровней экспрессии различных генов, кодирующих PR-белки. Охарактеризованы PR-белки растений и их роль в иммунитете при биотическом и абиотическом воздействии. Основное внимание в статье уделено PR-белкам семейств: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5; их строению и механизмам функционирования. Отмечается гетерогенная индукция синтеза PR-белков при бактериальном патогенезе. Наблюдается разница между экспрессией PR-генов при воздействии вирулентными и авирулентными штаммами бактерий. Рассмотрена роль бактериальных харпинов в индукции PR-белков растений.

Ключевые слова. PR-белки, растения, картофель, *Pseudomonas syringae*, *Arabidopsis thaliana*, устойчивость, экспрессия генов.

UDC:57.047

PR-PROTEINS OF PLANTS IN BACTERIAL PATHOGENESIS

Perfileva A. I.^{1,2}, Rymareva E. V.¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS

²Irkutsk State Technical University

Activation of plant's protective reactions in contact with pathogens can proceed through different signal ways, that expressed in changing levels of expression of various genes, that encode PR-proteins. Plant's PR-proteins and their role in immunity characterized in biotic and abiotic influence. The primary attention of the article is paid to the PR-proteins family: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5; described structure and mechanism of function of these proteins. Is observed heterogeneous induction of synthesis PR-proteins in bacterial pathogenesis. In the article is considered the difference between expression PR-genes during influence of virulent and avirulent bacteria's strains. Also is presented the role of bacterial harpins in induction of plant's PR-proteins.

Key words: PR-proteins, plants, potato, *Pseudomonas syringae*, *Arabidopsis thaliana*, resistance, expression of genes.

PR-белки (*pathogenesis-related proteins*) – экстраклеточные белки, синтезируемые в растительной клетке при атаке патогеном. Впервые эти белки были обнаружены у растений табака, проявляющих реакцию сверхчувствительности в ответ на инокуляцию вирусом табачной мозаики [3]. Позднее была показана индукция PR-белков в ответ на поражение растений грибами, вирусами и вироидами, а также в ответ на проникновение

нематод и насекомых. В настоящее время наименее изучена индукция синтеза PR-белков растений при бактериальном патогенезе. Данные белки являются одним из звеньев в механизмах неспецифической устойчивости растений. Роль PR-белков при патогенезе значительна и разнообразна. Они являются участниками сигнальных систем (липооксигеназной, NO-синтазной), катализируют образование молекул - вторичных мессенджеров (салициловая, жасмоновая и абсциссовая кислота, этилен, являются антимикробными компонентами, укрепляют клеточные стенки растения (пероксидаза, каллоза)) и способны вызывать повреждения клеточных стенок и цитоплазматических мембран патогенов [4, 16]. PR-белки реализуют механизм защиты клеток связанный с повышением образования активных форм кислорода (АФК) в растительной клетке. Так, известно, что один из механизмов образования перекиси водорода функционирует на уровне внешней поверхности плазматической мембраны и опосредован PR-белком – ферментом NADPH-зависимой оксидазой [9].

PR-белки подразделяются на 17 семейств (от PR-1 до PR-17) [19]. В разных источниках упоминается, что PR-белки содержатся в межклетниках, плазмодесмах, цитоплазме и в вакуолях клетки, встречаются в ксилемном соке [7], гуттационной жидкости, не транспортируются по растению [3]. В инфицированных клетках растения идет синтез данных белков *de novo*. Как правило, PR-белки выделяются в апопласт и действуют кооперативно, разрушая клеточную стенку патогена [8].

Многие PR-белки являются гидролазами. Так, белки семейства PR-2 являются β -1,3-эндоглюканазами, они накапливаются вокруг очага инфекции, являются медиатором, обеспечивающим взаимодействие инфицированных клеток со здоровыми, обладают также фунгицидной активностью. Белки семейств PR-3, PR-4, PR-8 и PR-11 обладают эндохитиназной активностью, способны расщеплять клеточную стенку грибов и пептидогликаны бактерий, их пул повышается при заражении. Члены семейств PR-7, PR-8, PR-9 и PR-10 проявляют протеиназную, лизоцимную, пероксидазную и рибонуклеазную активности соответственно. Белки семейства PR-6 – ингибиторы протеиназ. Активность других PR-белков связана с увеличением проницаемости мембран (семейства PR-5, PR-12, PR-13, PR-14), а также с производством пероксида водорода (семейства PR-15 и PR-16), синтез данных белков значительно усиливается при обработке элиситорами [2, 13, 18, 19]. PR-белки участвуют в формировании приобретенной системной устойчивости SAR (systemic acquired resistance). Показано, что многие PR-белки обладают фунгицидной и бактерицидной активностями *in vivo* и *in planta* [6]. Некоторые PR-белки обладают антифризной активностью [1].

PR-белки синтезируются в растительной клетке конститутивно и стресс-индуцибельно, в том числе под влиянием химических соединений [20]. Известно, что синтез белков PR-3, PR-4 и PR-5 индуцируется при солевом стрессе [3]. Считается, что значительное увеличение количества мРНК PR-белков при повышении концентрации соли в среде может

указывать на их участие в регуляции ответа клеток на раннюю стадию солевого стресса или на осмотический стресс, связанный с оттоком воды из клеток. Синтез PR-белков может индуцироваться при обработке растения экзогенной салициловой кислотой [13], при обработке растений тяжелыми металлами [7]. Имеются исследования экспрессии PR-генов в условиях космоса. Методом ДНК-микрочипов (microarray) анализировали транскриптом ячменя (*Hordeum vulgare*), выращенного на борту Международной космической станции. Не наблюдали индукции экспрессии генов PR-белков в условиях космического полета [11].

На картофеле (*Solanum tuberosum*) было показано, что устойчивость сорта картофеля к возбудителю мокрой гнили (*Pectobacterium carotovorum*) связана с интенсивностью синтеза PR-белков, у картофеля устойчивого сорта «Скарб» экспрессия гена PR-3 была значительно выше, чем у восприимчивого сорта «Веснянка» [5].

При заражении томатов (*Lycopersion esculentum*) патогенном *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* (*Cmm*) в растении изменялась экспрессия 122 генов, в том числе повышался синтез белков, относящихся к семейству PR-белков. Это белки - 1,3-β-глюкозидаза (PR-2), эндохитиназа (PR-3), гевеин-подобный белок (PR-4), тауматин/осмотин (PR-5), кукумзин-подобная сериновая протеаза [17]. Также при заражении патогенном повышалось количество липооксигеназы 1, способствующей защите растений от патогенов [17]. Активация экспрессии защитных генов томата зависит от присутствия острова патогенности в геноме *Cmm*. Показано, что экспрессия гена хитиназы класса III и PR-5 наблюдалась только в присутствии острова патогенности [12].

Экспрессия PR-белков активно исследуется на модельном объекте *Arabidopsis thaliana*. При обработке семян различными гормонами, изменяется экспрессия PR-1 арабидопсиса, особенно при обработке зеатином (на основе результатов Christian K. Widmer, с использованием базы данных AtGenExpress <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>). Также индукция синтеза PR-белков определяется при абиотических стрессах различной природы, так, например, экспрессия белка PR-2 в корнях *A. thaliana* повышается при осмотическом стрессе, обработке УФ лучами, обработке токсичными веществами и понижается при холодовом и тепловом стрессах. Синтез PR-5 в корнях арабидопсиса повышается при осмотическом стрессе, обработке УФ лучами, тепловом стрессе, но снижается при поранениях (согласно данным Christian K. Widmer).

Показано, что в *A. thaliana* недостаток неорганического фосфата и поранение индуцируют экспрессию PR-10 (S-РНКазы), также некоторый уровень экспрессии этого гена наблюдается при старении листьев [15].

Индукция защитных реакций растения при контакте с патогенами (или же с препаратами продуцируемых этими патогенами – элиситорами) может происходить посредством различных сигнальных путей, что в конечном итоге выражается в изменении уровней экспрессии различных PR-генов растений [9]. Согласно анализу изменения экспрессии PR-генов в листьях *A.*

thaliana при заражении *Pseudomonas syringae* (данные Christian K. Widmer) происходит следующее. Экспрессия гена *PR-1* при заражении вирулентным штаммом *P. syringae* постепенно увеличивается после заражения, максимальное увеличение регистрируется спустя 24 ч после заражения. При инфицировании авирулентным штаммом *P. syringae* экспрессия этого гена изменяется волнообразно: спустя 2 и 6 ч после обработки, экспрессия снижается, спустя 24 ч – значительно усиливается.

Экспрессия гена *PR-2* усиливается в 2 раза по прошествии 2 ч после заражения, спустя 6 ч после заражения наблюдается в зависимости от условий инкубации некоторое снижение или увеличение экспрессии, однако, спустя 24 ч после заражения экспрессия данного белка усиливается в 3-10 раз. При инфицировании *A. thaliana* авирулентным штаммом происходит значительное усиление синтеза белка *PR-2*, спустя 6 ч после заражения отмечается пик, а спустя 24 ч наблюдается понижение экспрессии соответствующего гена.

Экспрессия гена *PR-4* при заражении как вирулентным, так и авирулентным штаммом *P. syringae* изменяется волнообразно так, спустя 2 ч снижается, а затем начинает значительно усиливаться (в 10-ки раз). Экспрессия гена *PR-5* при заражении как вирулентным, так и авирулентным штаммом *P. syringae* снижается (согласно данным Christian K. Widmer).

При заражении *A. thaliana* возбудителем фитофтороза (*Phytophthora infestans*) происходит значительное снижение экспрессии генов *PR*-белков в листьях, таких как *PR-1*, *PR-2* и *PR-5*, экспрессия гена *PR-4* изменяется волнообразно, сначала усиливается (2 ч), за тем падает (24 ч) (согласно данным Christian K. Widmer).

Харпины – класс внеклеточных хелперных белков секреторной системы III типа (ССТТ) фитопатогенных бактерий – изначально были охарактеризованы именно как белки, индуцирующие защитные реакции растений. Некоторые харпины обладают способностью активировать системную устойчивость у обработанных растений, что в перспективе может привести к созданию препаратов биологической защиты от фитопатогенных микроорганизмов [10].

При обработке листьев *A. thaliana* элиситором харпином экспрессия генов *PR-1*, *PR-2* и *PR-4* значительно подавляется, а экспрессия гена *PR-5* через 1 ч после обработки снижается, а спустя 4 ч после обработки повышается (данные Christian K. Widmer).

Существуют исследования по влиянию харпинов *Pectobacterium carotovorum* на экспрессию генов, кодирующих *PR*-белки в растениях томата. Оценивали активизацию защитного ответа клетки с применением метода количественной ПЦР уровней экспрессии нескольких *PR*-генов томата через 24 и 72 ч после обработки препаратами элиситоров. Было показано, что наибольшее влияние обработка препаратами харпинов оказала на экспрессию гена *PR-2*, уровень экспрессии этого гена оказался повышен в 5–7 раз. Менее значительной, оказалась индукция генов из семейства *PR-1*, она была выше в три раза по сравнению с контролем. Обработка харпинами снижала

экспрессию гена *PR-6*. Гетерогенный эффект харпинов на экспрессию генов, кодирующих *PR*-белки, авторы объясняют активацией салицилатного пути (влияние на экспрессию генов *PR-1* и *PR-2*) и ингибированием синтеза жасмоновой кислоты (влияние на экспрессию гена *PR-6*) [10].

Заключение. *PR*-белки являются важным звеном, участвующим в защите клетки растения от последствий биотического стресса. К их числу относятся протеазы, хитиназы, глюконазы, протеазы, антимикробные вещества. Экспрессия генов, кодирующих *PR*-белки наблюдается как при патогенезе, так и при обработке клеток харпинами, ультрафиолетовыми лучами, при засолении, тепловом и холодом воздействии на растения. Экспрессия *PR*-белков при стрессе является гетерогенной, что может быть связано с ограниченным пулом аминокислот в клетке.

Список литературы

1. Бильданова Л.Л. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков / Л.Л. Бильданова, Е.А. Салина, В.К. Шумный // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012. – Т.16, №1. – С.250-270.
2. Малиновский В.И. *PR*-белки и фитовирусы / В.И. Малиновский // Усп. соврем. Биологии, 2009. – Т. 129, № 3. – С. 1–9.
3. Малиновский В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам / В.И. Малиновский. – Владивосток: Дальнаука. – 2010. - 324 с.
4. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский. - М.: Наука. – 2002. - 294 с.
5. Третьякова О.М. Экспрессия *PR*-генов при бактериальной инфекции / О.М. Третьякова, А.И. Евтушенко // Труды БГУ, 2011. – Т. 6, №1. – С. 163-167.
6. Трифонова Е.А. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений / Е.А. Трифонова, А.В. Кочетов, В.К. Шумный // Усп. соврем. Биологии, 2000. – Т. 120. – С. 395–405.
7. Пастухова Н. Л. Детоксикация тяжелых металлов у растений / Н. Л. Пастухова // Available: www.nbuu.gov.ua/portal/Chem_Biol/peop/2008/218-226.pdf. [Accessed Okt. 05, 2010].
8. Сангаев С.С. Роль экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений / С.С. Сангаев, А.В. Кочетов, С.С. Ибрагимова, Б.А. Левенко, В.К. Шумный // Вестник ВОГиС, 2010. – Т.14, №2. – С. 232-242.
9. Удинцев С.Н. Механизмы индукции резистентности растений к фитопатогенным гуминовым веществам / С.Н. Удинцев, Т.И. Бурмистрова, А.В. Заболотская, Т.П. Жильякова // Вестник Томского государственного университета. Биология, 2011. – №4 (16). – С. 100-107.
10. Чжан Янь Анализ действия харпинов на растения томата / Чжан Янь, Е.А. Николайчик, М.А. Стадниченко, В.Д. Поликсенова // Вестник БГУ. Серия 2, 2010. – №1. – С. 17-29.
11. Шагмарданова Е.И. Экспрессия генов стрессового ответа ячменя *Hordeum vulgare* в условиях космического полета / Е.И. Шагмарданова, О. А. Гусев, В. Н. Сычев, М. А. Левинских, М. Р. Шарипова, О. Н. Ильинская, G. Bingham, M. Sugimoto // Молекулярная биология, 2010. – Т. 44, № 5. – С. 831-838.
12. Chalupowicz L. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / L. Chalupowicz, M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash, S. Manulis-Sasson // Phytopathology, 2010. – V. 100, №3. – P. 252-261.

13. Chandran P. Scope of horticultural land-use system in enhancing carbon sequestration in ferruginous soils of the semi-arid tropics / P. Chandran, S.K. Ray, S.L. Durge, P. Raja, A.M. Nimkar, T. Bhattacharyya // *Curr. Sci.*, 2009. – V. 97. – P. 1039-1046.
14. Garcia-Brugger A. Early signaling events induced by elicitors of plant defences / A. Garcia-Brugger, O. Lamotte, E. Vandelle // *Molec. Plant-Microbe Interact*, 2006. – Vol. 7. – P. 711–724.
15. Liu J.-J. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses / J.-J. Liu, A.K.M. Ekramoddoullah // *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2006. –V. 68. – P. 3–13.
16. Neill S.J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants / S.J. Neill, R. Desikan, A. Clarke // *J. Experim. Botany*, 2002. – V. 53. – P. 1237–1247.
17. Savidor D. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection / D. Savidor, K.H. Teper, R. Gartemann, L. Eichenlaub, S. Chalupowicz, I. Manulis-Sasson, H. Barash, K. Tews, R.J. Mayer, R.L. Giannone, G. Hettich, I. Sessa // *J. Proteome Res.*, 2012. – V. 11, №2. – P. 736-750.
18. Scherer N.M. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins / N.M. Scherer, C.E. Thompson, L.B. Freitas // *Genetics & Molec. Biol.*, 2005. – V. 28. – P. 645–653.
19. Van Loon L.C. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / Van L.C. Loon, E.A. Van Strien // *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1999. – V. 55. – P. 85–97.
20. Van Loon L.C. Significance of Inducible defense-related proteins in infected plants / Van L.C. Loon, M. Rep, C.M.J. Pieterse // *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006. – V. 44. – P. 135-162.

References

1. Bil'danova L.L. Osnovnye svoystva i osobennosti evoluzii antifrisnykh belkov / L.L. Bil'danova, E.A. Salina, V.K. Shumnyi [Basic properties and qualities evolution of antifreeze proteins] // *Vavilovskii zhurnal genetiki i selekzii* [Vavilov's journal of genetics and breeding], 2012, v.16, no. 1, pp. 250-270.
2. Malinovskij V.I. PR-belki I phitovirusy / V.I. Malinovskij [PR-proteins and phytoviruses] // *Usp. sovrem. biologii*, 2009, v. 129, no. 3, pp. 1–9.
3. Malinovsky V.I. Resistance mechanisms of plants to viruses / V.I. Malinovsky. - Vladivostok: Dalnauka, 2010, 324 p.
4. Tarchevskij I.A. Signal'nye sistemy kletok rastenij [Signal systems of plant's cells] / I.A. Tarchevskij. – M.: Nauka, 2002, 294 p.
5. Tret'jakova O.M. Ekspressia PR-genov pri bakterial'noj infekzii / O.M. Tret'jakova, A.I. Evtushenkov [Expression of PR-gens in bacterial infections] // *Trudy BGU*, 2011, v.6, no. 1, pp. 163-167.
6. Trifonova E.A. Rol' nukleaz v fiziologicheskikh prozessah vysshyh rastenij / E.A. Trifonova, A.V. Kochetov, V.K. Shumnyj // *Usp. Sovrem. Biologii* [Role of nucleases in physiological processes of highest plants], 2000, v. 120, pp. 395–405.
7. Pastushova N.L. Detoksikazija tjajelyh metallov u rastenij [Detoxification of heavy metals in plants] / N.L. Pastushova // Available: www.nbu.gov.ua/portal/Chem_Biol/peop/2008/218-226.pdf. [Accessed Okt. 05, 2010].
8. Sangaev S.S. Rol' ekstrakletochnykh ribonukleaz v fiziologicheskikh prozessah vysshyh rastenij [Role of extracellular ribonucleases in the physiological processes of highest plants] / S.S. Sangaev, A.V. Kochetov, S.S. Ibragimova, B.A. Levenko, V.K. Shumnyj // *Vestnik VOGiS*, 2010, v.14, no. 2, pp. 232-242.

9. Udinzhev S.N. Mechanizmy indukzii resistantnosti pasteniji k phytopatogennym veshestvam [Mechanisms of induction plant's resistance to phytopathogenic humic substances] / S.N. Udinzhev, T.N. Burmistrova, A.V. Zabolotskaja, T.N. Zhiljakova // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologija [], 2011, no. 4 (16), pp. 100-107.
10. Chjan Jan' Analiz dejstvija harpinov na pastenija tomata [Analysis of harpin's influence on tomato plants] / Chjan Jan', E.A. Nikolajchik, M.A. Stadnichenko, V.D. Poliksenova // Vestnik BGU. Serija 2, 2010. – no. 1. – pp. 17-29.
11. Shagimardanova E.I. Expressia genov stressovogo otveta jachmenja Hordenium vulgare v uslovijah kosmicheskogo poljeta [Expression of genes of the stress response of barley Hordenium Vulgare in terms of open space] / E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, V.N. Sychev, M.A. Levinskish, M.R. Sharipova, O.N. Il'inskaja, G. Bingham, M. Sugimoto // Molekularnaja biologija [Molecular of biology], 2010, v. 44 (5), pp. 831-838.
12. Chalupowicz L. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* / L. Chalupowicz, M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenlaub, K.H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash, S. Manulis-Sasson // Phytopathology, 2010, v. 100, no. 3, pp. 252-261.
13. Chandran P. Scope of horticultural land-use system in enhancing carbon sequestration in ferruginous soils of the semi-arid tropics / P. Chandran, S.K. Ray, S.L. Durge, P. Raja, A.M. Nimkar, T. Bhattacharyya // Curr. Sci., 2009, v. 97, pp. 1039-1046.
14. Garcia-Brugger A. Early signaling events induced by elicitors of plant defences / A. Garcia-Brugger, O. Lamotte, E. Vandelle // Molec. Plant-Microbe Interact, 2006, v. 7, pp. 711–724.
15. Liu J.-J. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses / J.-J. Liu, A.K.M. Ekramoddoullah // Physiol. Mol. Plant Pathol., 2006, v. 68, pp. 3–13.
16. Neill S.J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants / S.J. Neill, R. Desikan, A. Clarke // J. Experim. Botany, 2002, v. 53, pp. 1237–1247.
17. Savidor D. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection / D. Savidor, K.H. Teper, R. Gartemann, L. Eichenlaub, S. Chalupowicz, I. Manulis-Sasson, H. Barash, K. Tews, R.J. Mayer, R.L. Giannone, G. Hettich, I. Sessa // J. Proteome Res., 2012, v. 11, no. 2, pp. 736-750.
18. Scherer N.M. Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins / N.M. Scherer, C.E. Thompson, L.B. Freitas // Genetics & Molec. Biol., 2005, v. 28, pp. 645–653.
19. Van Loon L.C. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / Van L.C. Loon, E.A. Van Strien // Physiol. Mol. Plant Pathol., 1999, v. 55, pp. 85–97.
20. Van Loon L.C. Significance of Inducible defense-related proteins in infected plants / Van L.C. Loon, M. Rep, C.M.J. Pieterse // Annu. Rev. Phytopathol., 2006, v. 44, pp. 135-162.

Information about the authors

Perfileva Alla I. – leading engineer lab of fitoimmunology Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, tel. (3952) 425009, e-mail: alla.light@mail.ru), undergraduate of Irkutsk State Technical University (83, Lermontov street, Irkutsk, Russia, 664074).

Rymareva Elena V. – Ph. D. of Biology, research scientist of fitoimmunology Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, tel. (3952) 425009, e-mail: elena.rymareva@mail.ru).