

УДК 577.112:578.76:632.4

PR-БЕЛКИ С РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕННЫМ ГРИБАМ

© 2013 г. Е.А. Филипенко¹, А.В. Кочетов^{1,2}, У. Канауама³,
В.И. Малиновский⁴, В.К. Шумный^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,

e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan;

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Поступила в редакцию 28 мая 2013 г. Принята к публикации 6 июня 2013 г.

PR-белки (pathogenesis-related proteins) принимают участие в комплексной системе защиты растений от патогенов. Известно, что представители двух семейств PR-белков (PR4 и PR10) в ряде случаев обладают нуклеазной активностью. Установлено, что эти белки способны ингибировать рост патогенных грибов и РНКазная активность необходима для проявления этого эффекта. В обзоре обсуждаются современные данные о молекулярных механизмах фунгицидного действия рибонуклеаз, связанных как с непосредственным цитотоксическим воздействием на клетки патогена, так и с участием в индукции апоптоза и развитии гиперчувствительной реакции.

Ключевые слова: РНКазы, PR-белки, фитопатоген, апоптоз.

При взаимодействии с фитопатогенами у растений включается комплекс защитных механизмов, к числу которых относится синтез PR-белков (pathogenesis-related proteins). На основе структурных особенностей и биологической активности эти белки разделяют на 17 семейств, к которым относятся бета-1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы, ингибиторы протеаз и т. д. (van Loon, van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006; Малиновский, 2009). Считалось, что некоторые PR-белки ингибируют рост грибов за счет специфической гидролазной активности, разрушающей их клеточные стенки. В последнее время было найдено, что PR-белки, принадлежащие к семействам 4 и 10, также обладают рибонуклеазной активностью, причем эта активность связана с их фунгицидными свойствами. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, пока не ясны: согласно некоторым данным, РНКазная активность может быть важна как для непосредственного воздействия (за счет разрушения пула

мРНК гриба при проникновении молекул нуклеазы внутрь клеток патогена), так и для индукции апоптоза собственных клеток растения в месте инвазии (гиперчувствительная реакция) (Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Следует отметить, что белки с неспецифической рибонуклеазной активностью не могут в свободной активной форме присутствовать в цитоплазме, поскольку они разрушают РНК и клетка погибает. Однако это свойство делает РНКазы удобным инструментом для использования в контроле процессов развития, требующих направленной элиминации определенных клеточных структур (например, участие S-РНКаз в механизме самонесовместимости у высших растений) (Сангаев и др., 2010). По-видимому, использование рибонуклеаз для борьбы с фитопатогенами требует либо определенной субклеточной локализации этих белков (апопласт, вакуоли), либо строгого контроля ферментативной активности за счет посттрансляционных модификаций. При этом

механизмы, с помощью которых молекулы нуклеаз могут проникать внутрь клеток патогенного гриба, пока остаются неизвестными. Кроме этого, в последнее время появляются данные о существовании пула экстраклеточных нуклеиновых кислот, выполняющих определенные функции в системе иммунитета растений, что также говорит в пользу возможной функциональной значимости нуклеаз, принадлежащих к семейству PR-белков (Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011). В статье рассмотрены литературные данные о функциях PR-белков с нуклеазной активностью.

PR10

PR10 – семейство внутриклеточных кислых белков с молекулярной массой 16–19 кДа, расположенных в вакуолях и (единственный класс PR-белков) цитоплазме (Somssich *et al.*, 1988; Warner *et al.*, 1992; van Loon *et al.*, 1994). Эти белки были найдены у многих видов двудольных растений, включая горох (Fristensky *et al.*, 1988), фасоль (Walter *et al.*, 1996), сою (Crowell *et al.*, 1992), люцерну (Breda *et al.*, 1996; Bahramnejad *et al.*, 2010), картофель (Matton, Brisson, 1989), хлопчатник (Zhou *et al.*, 2002), перец (Park *et al.*, 2004), а также у некоторых представителей однодольных – лилии (Huang *et al.*, 1997), риса (Midoh, Iwata, 1996).

PR10 кодируются небольшим числом генов, например, у *Lupinus luteus* найдено 9 генов. Анализ аминокислотных последовательностей соответствующих полипептидов показал, что по особенностям структурной организации их можно разделить на две группы – PR10.1 и PR10.2 (Pasternak *et al.*, 2005). Было найдено, что гены этих субсемейств существенно различаются по паттерну экспрессии: например ген *LIPR10.B* конститутивно экспрессируется в листьях и черешках, в то время как активность гена *LIPR10.A* в этих органах появляется только в ответ на инокуляцию *Pseudomonas syringae*, а также при старении листьев (Sikorski *et al.*, 1999). Похожие семейства генов найдены у винограда, березы, яблони и персика; у *Vitis vinifera* анализ 17 генов, расположенных в виде tandemного повтора на хромосоме 5, выявил различные паттерны их экспрессии. Интересно, что у арабидопсиса *PR10* гены не экспрессируются (Lebel *et al.*, 2010).

Белки семейства PR10 активно изучаются по нескольким причинам. Во-первых, они являются аллергенами (например, Bet v1 березы, Mal d 1 яблони, Pru ar 1 абрикоса, Pru v1 вишни, Dau s 1 моркови и т. п.) (Bufe *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Neudecker *et al.*, 2001; Puehringer *et al.*, 2003). Во-вторых, их синтез существенно повышается в ответ на инфекцию, что говорит о возможной роли в защите от патогенов; наконец, некоторые из этих белков синтезируются в разных органах и тканях конститутивно или в ответ на абиотические стрессы различной природы, что может быть связано с участием PR10 в разнообразных клеточных процессах (рост, развитие, молекулярные механизмы стрессоустойчивости (Chen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011 и др.)).

По-видимому, одна из биологических функций этих белков заключается в том, что они способны связывать фитогормоны и некоторые другие биологически активные вещества (Srivastava *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008). Цитокинины регулируют рост и развитие растений, а также могут выполнять определенные функции в контроле стрессового ответа (Chung *et al.*, 2008). Показано, что повышенная экспрессия гена *PR10* гороха (*ABR-17*) в растениях арабидопсиса приводит к увеличению содержания цитокининов, а также уровня экспрессии генов, регулируемых этим фитогормоном (Krishnaswamy *et al.*, 2008, 2011). Многие представители этого семейства проявляют рибонуклеазную активность, выявленную в тестах *in vitro*, например, у березы (Bufe *et al.*, 1996), желтого люпина (Bantignies *et al.*, 2000), хлопчатника (Zhou *et al.*, 2002), перца (Park *et al.*, 2004), риса (Kim *et al.*, 2008), возможно, связанную с наличием в структуре белка Р-петли (GXGGXGXK) (Bantignies *et al.*, 2000).

Считается, что гены белков семейства PR10 экспрессируются конститутивно в корнях и индуцируются во всех частях растения в ответ на биотические/абиотические стрессы и повреждение тканей. Индукция экспрессии генов *PR10* при взаимодействии с патогенами была выявлена у ряда растений, включая шпинат (в ответ на *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*; Somssich *et al.*, 1986), картофель (*Phytophthora infestans*; Matton, Brisson, 1989), рис (*Magnaporthe grisea* и *Acidovorax avenae*;

McGee *et al.*, 2001), виноград (*P. syringae* pv. *pisi*; Robert *et al.*, 2001), люцерну (*P. syringae* pv. *pisi*, Borsics, Lados, 2002), *Capsicum annuum* (вирус табачной мозаики; Park *et al.*, 2004), *Pinus monticola* (*Cronartium ribicola*; Liu *et al.*, 2003). PR10 также индуцируется некоторыми абиотическими факторами: NaCl, высокими и низкими температурами, осмотическим стрессом (Borsics, Lados, 2002), ультрафиолетом (Rakwal *et al.*, 1999), озоном (Agrawal *et al.*, 2002). В некоторых случаях было показано, что транскрипционная активность генов семейства PR10 возрастает при обработке растений жасмоновой кислотой, кинетином (Rakwal *et al.*, 1999; McGee *et al.*, 2001; Borsics, Lados, 2002), салициловой кислотой (McGee *et al.*, 2001), этиленом (Poupard *et al.*, 2003), абсцизовой кислотой (Borsics, Lados, 2002).

В ряде случаев было показано, что рекомбинантные варианты белков этого семейства подавляют рост фитопатогенных грибов *in vitro*. Например, PR10 арахиса проникает в клетки патогенов и, являясь РНКазой, проявляет фунгицидную активность *in vitro*, в то время как его мутантные варианты, лишённые РНКазной активности, теряют фунгицидные свойства. Характерно, что способность проникать внутрь клеток патогенных грибов (и фунгицидная активность) была избирательной и наблюдалась для *Fusarium oxysporum* и *Rhizostonia solani*, но не для *Sclerotium rolfii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* и *P. infestans* (Chadha, Das, 2006). Синтез CaPR-10 *C. annuum* происходит в корне (конститутивно) и индуцируется в листьях в ответ на инвазию патогена, обработку салициловой и жасмоновой кислотами, этиленом и NaCl. Рекомбинантный белок обладает РНКазной активностью и подавляет рост *Phytophthora capsici in vitro*. При добавлении к инокуляту вируса табачной мозаики белка CaPR-10 размножение вируса резко подавляется, причем денатурированный белок такого действия не проявляет (Park *et al.*, 2004).

У кукурузы ген *ZmPR10.1* экспрессируется конститутивно в корне и малоактивен в остальных тканях растения, его активность индуцируется в ответ на салициловую кислоту, соли тяжелых металлов, перекись водорода, холод, повреждение тканей и инфекцию (*Erwinia stewartii* и *A. flavus*). Ген кодирует белок с РНКазной

активностью, ингибирующий рост *P. syringae in vivo* и *A. flavus in vitro* (Xie *et al.*, 2010). Кукуруза восприимчива к *A. flavus*, и заражение афлатоксинами является одной из важных проблем этой хозяйственно важной культуры. Сравнительный анализ протеомов устойчивого и восприимчивого фенотипов позволил выявить различия в содержании некоторых белков, в том числе PR10. Исследование трансгенных растений с ингибированной экспрессией гена *PR10* показало, что они являются гораздо более восприимчивыми к патогену, а также характеризуются повышенной чувствительностью к тепловому шоку (Chen *et al.*, 2010).

Недавно было показано, что PR10 используется растением не только для подавления роста фитопатогенных грибов, но и для контроля развития эндосимбионтов, например *Lolium perenne* – для контроля *Neotyphodium lolii*. В этом случае уровень экспрессии PR-гена был значительно ниже, чем в ответ на воздействие патогена, что свидетельствует об эволюционной коадаптации взаимодействующих организмов (Zhang *et al.*, 2011).

Рибонуклеазная активность белков PR10 может быть важна для их фунгицидных свойств и индукции апоптоза в гиперчувствительном ответе. Поскольку PR10 локализован в цитоплазме, то наличие рибонуклеазной активности делает этот белок опасным для клетки, а значит должны существовать механизмы, контролирующие его активность. Детальный анализ CaPR-10 *C. annuum* показал, что синтез этого белка индуцируется в ответ на вирусную инфекцию, причем также происходит его фосфорилирование, существенно увеличивающее рибонуклеазную активность (Park *et al.*, 2004). Было обнаружено, что Ca-PR10 взаимодействует с рецептором LRR1 (Leucine-rich repeat protein) (Choi *et al.*, 2012): LRR1 *C. annuum* распознает присутствие патогена и взаимодействует с белком HIR1, активирующим апоптоз при гиперчувствительном ответе на авирулентный штамм *Xanthomonas campestris*. Взаимодействие LRR1 и Ca-PR10 происходит в цитоплазме и приводит к следующим последствиям: во-первых, PR10 фосфорилируется, вследствие чего увеличивается его рибонуклеазная активность, во-вторых, в сайте инокуляции патогена в результате апоптоза гибнут клетки растения; в-третьих,

часть комплексов LRR1-Ca-PR10 переходит в апопласт, по-видимому, в составе внутриклеточного содержимого в результате разрушения клеток. Показано, что выключение экспрессии гена *Ca-PR10* приводит к потере устойчивости растений к авирулентному штамму *X. campestris*, тогда как экспрессия *LRR1* и *Ca-PR10* в клетках арабидопсиса, наоборот, придает устойчивость к *P. syringae* и *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Авторы предполагают, что РНКазная активность PR10 может служить в качестве одного из инструментов апоптоза (Choi *et al.*, 2012).

У риса один из белков семейства PR10 (PBZ1) также участвует в процессе апоптоза (Kim *et al.*, 2011). Отметим, что добавление рекомбинантного белка индуцирует программируемую клеточную гибель в культуре клеток риса и табака, а также в клетках листьев табака и арабидопсиса, причем РНКазная активность необходима для проявления этого эффекта. Анализ паттерна экспрессии гена *PBZ1* показал, что он быстро активируется в ответ на инфекцию, на некоторые абиотические стрессы (холод, абсцизовую кислоту) (Rakwal *et al.*, 2001) и на соответствующие фитогормоны (жасмоновую кислоту, салициловую кислоту) (Rakwal *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2008).

У винограда патоген *Plasmopara viticola* вызывает серьезный ущерб. Был проведен сравнительный анализ экспрессии генов *PR10.2* у восприимчивого вида *V. vinifera* и устойчивого вида *V. pseudoreticulata*. Показано, что у устойчивого вида экспрессия генов семейства PR10 индуцируется в значительно большей степени. Рекомбинантный белок, обладающий ДНКазной и РНКазной активностью, ингибировал рост фитопатогенного гриба *Alternaria alternata in vitro*, а увеличенная экспрессия трансгена *VpPR10.2* в трансгенных растениях *V. vinifera* повышала их устойчивость к *P. viticola*. Интересно, что белок был найден не только в клетках, но и в экстраклеточном пространстве, а также в гаусториях патогена *P. viticola*; присутствие белка в ядрах растительных клеток коррелировало с их апоптозом на 10-й день после инокуляции. В целом *VpPR10.2* может играть важную роль в защите растений винограда от этой инфекции (He *et al.*, 2013).

Таким образом, согласно имеющимся данным, белки семейства PR10 могут функциони-

ровать в качестве фунгицидов, причем эта их способность, связанная с нуклеазной активностью, может проявляться как при прямом воздействии на патоген – проникновении внутрь клетки и разрушении клеточных РНК (He *et al.*, 2013), так и за счет участия в апоптозе – создания барьера из мертвых клеток (гиперчувствительная реакция) (Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012). В то же время существует ряд нерешенных вопросов: например, для чего гены *PR10* индуцируются при абиотических стрессах, какие механизмы опосредуют проникновение молекул этих белков в клетки патогенов (часто специфическое) (Chadha, Das, 2006).

PR4

Белки этого семейства (размером 13–16 кДа) содержат консервативный С-концевой домен BARWIN, включающий шесть остатков цистеина, которые формируют три внутримолекулярные дисульфидные связи (Ludvigsen, Poulsen, 1992). По структуре N-конца молекулы PR4 разделяют на два подкласса: в структуре белков класса I содержится консервативный N-концевой цистеин-богатый хитин-связывающий домен (hevein-подобный домен), у молекул класса II такого домена нет (Broekaert *et al.*, 1990). Большинство белков содержат N-концевой сигнальный пептид, некоторые представители этого семейства также содержат на С-конце сигнал, направляющий их в вакуоли (Neuhaus *et al.*, 1991). Гены, кодирующие PR4, были впервые найдены у картофеля (тандемно расположенные *WIN 1* и *WIN 2*) (Stanford *et al.*, 1989) и впоследствии были определены у ряда других растений – томата, арабидопсиса, капусты, пшеницы, кукурузы, перца и др. (Linthorst *et al.*, 1991; Caruso *et al.*, 1993; Potter *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Guevara-Morato *et al.*, 2010). PR4 были первоначально классифицированы как эндохитиназы, однако у них данная ферментативная активность выражена слабо и не является основной. Гены *PR4* обычно формируют небольшие семейства, например, у риса найдено пять генов, расположенных в виде тандемного повтора и характеризующихся различиями в паттернах экспрессии (Wang *et al.*, 2011).

Основным индуктором синтеза белков семейства PR4 является инвазия патогена, однако

в ряде случаев их синтез активируется при других воздействиях. У кукурузы ген *ZmPR4* индуцируется при повреждении тканей в месте инвазии патогена и при обработке клеток метилжасмонатом или абсцизовой кислотой (Bravo *et al.*, 2003). У арабидопсиса и персика содержание PR4 увеличивается при обработке этиленом (Gu *et al.*, 2002; Ruperti *et al.*, 2002) или озоном (Rao *et al.*, 2002). У риса экспрессия всех генов семейства PR индуцировалась в ответ на инокуляцию *M. grisea*, кроме этого, разные гены индуцировались в условиях абиотических стрессов (засуха, засоление, холод, повреждение тканей, тепловой шок, ультрафиолет, воздействие абсцизовой или жасмоновой кислоты). Повышенная экспрессия *OsPR4a* в трансгенных растениях риса увеличивала их устойчивость к засухе как у проростков, так и у взрослых растений. Таким образом, спектр функций белков этого семейства также может быть шире, чем это предполагается в настоящее время (Wang *et al.*, 2011).

У пшеницы PR4-белок Wheatwin1 обладает РНКазной активностью и проявляет фунгицидные свойства *in vitro* (Caporale *et al.*, 2004), которые также связаны именно с рибонуклеазным действием (Bertini *et al.*, 2009). Показано, что присутствие PR4-рибонуклеаз в нектаре акации защищает ее от развития грибов (Gonzalez-Teuber *et al.*, 2009). Представители белков семейства FaPR4 *Ficus awkeotsang* обладают в разной степени выраженности рибонуклеазной и хитиназной активностью; показано, что фунгицидные свойства FaPR4-С коррелируют с его способностью гидролизовать РНК (Lu *et al.*, 2012).

У *Capsicum chinense* устойчивость к табачному вирусу PMMoV-S включает гиперчувствительную реакцию с формированием локальных некрозов и ограничением распространения вируса в местах первичной инокуляции. Найдено, что при гиперчувствительной реакции индуцируется синтез PR4, обладающего РНКазной и ДНКазной активностью (Guevara-Morato *et al.*, 2010). У яблони ген *MdPR-4* экспрессируется в цветках и листьях, индукция экспрессии наблюдается при взаимодействии с *Botryosphaeria dothidea*, обработке салициловой кислотой или метилжасмонатом. Рекомбинантный белок MdPR-4 обладает рибонуклеазной активно-

стью против одноцепочечных матриц *in vitro* и угнетает рост патогенных для яблони грибов *B. dothidea*, *Valsa ceratosperma* и *Glomerella cingulata*, причем субстрат-специфическое ингибирование РНКазной активности снижает фунгицидный эффект (Bai *et al.*, 2013).

Был проведен углубленный анализ структурной организации вакуолярного белка PR4 *Arabidopsis thaliana*, ориентированный на выявление функций N-концевого гевеин-подобного домена и С-концевого BARWIN-домена. Было найдено, что оба домена обладают фунгицидной активностью и не способны гидролизовать хитин. N-концевой домен связывает хитин и взаимодействует с лектином патогенных грибов, нуклеазная активность характерна для С-концевого домена. Авторы предположили, что N-концевой домен отвечает за связывание с поверхностью фитопатогенных грибов и перенос белка внутрь клетки, в то время как за собственно цитотоксический эффект отвечает рибонуклеазный домен (Bertini *et al.*, 2012).

Таким образом, на примере PR-белков семейств PR4 и PR10 можно видеть, что в ходе эволюции они приобрели рибонуклеазную активность, которая используется как для цитотоксического воздействия на клетки патогенных грибов, так и в механизмах апоптоза собственно клеток растений в ходе гиперчувствительной реакции. Помимо вышеописанных PR-белков у растений обнаружено несколько других рибонуклеаз, локализованных в экстраклеточном пространстве, которые также могут участвовать в механизмах защиты от фитопатогенных вирусов и грибов (Трифорова и др., 2000; Сангаев и др., 2010). В частности, это касается S-подобных РНКаз, по структуре относящихся к семейству T2 (MacIntosh *et al.*, 2010). Так, *RNS1 A. thaliana* индуцируется при инвазии патогена и локально (в месте повреждения тканей), и системно (LeBrasseur *et al.*, 2002). У табака увеличение суммарной РНКазной активности в ответ на инокуляцию *Phytophthora parasitica* по времени совпадает с индукцией гена, кодирующего S-подобную экстраклеточную рибонуклеазу NE, которая проявляет фунгицидную активность против *P. parasitica* и *F. oxysporum in vitro*, а также при введении в апопласт. Ферментативно неактивная форма рекомбинантного белка, полученная

с помощью направленного мутагенеза, теряет такую способность (Hugot *et al.*, 2002). В нектаре *Petunia hybrida* были найдены S-подобные РНКазы, также обладающие фунгицидными свойствами (Hillwig *et al.*, 2010).

Молекулярные механизмы фунгицидной активности экстраклеточных S-подобных РНКаз в настоящее время не известны. Существует предположение, что РНКазы могут проникать в цитоплазму грибов и останавливать трансляцию, разрушая мРНК (Hugot *et al.*, 2002). Однако предложенный механизм подразумевает перенос РНКазы из экстраклеточного пространства в цитоплазму гриба. Другая возможность связана с тем, что РНКазы могут изменять проницаемость клеточных мембран грибов: ранее было показано, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* супрессия гена экстраклеточной РНКазы из семейства T2 приводит к увеличению размеров дрожжевой клетки, причем этот эффект может быть снят при добавлении к культуральной жидкости других РНКаз (MacIntosh *et al.*, 2001). Высказано предположение об участии неких (в настоящий момент неизвестных) молекул РНК в формировании пор в мембране клеток дрожжей, что может объяснять эффект рибонуклеаз на их проницаемость.

Логично предположить, что фитопатогены также могут использовать белки с РНКазной активностью в процессе взаимодействия с клетками растения, однако по этой теме информации пока очень мало (Hadwiger, Polashock, 2013). В некоторых работах было показано, что ДНК является одним из элементов слизи, защищающей от фитопатогенов кончик корня, который в силу своей функции механически уязвим и часто подвергается опасности заражения. Клетки корня выделяют в окружающую среду более 100 белков, а также ДНК. Удаление экстраклеточной ДНК с помощью обработки ДНКазой привело к потере устойчивости кончика корня к фитопатогенам (Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011). Считается, что фитопатогены могут связываться с экстраклеточной ДНК, что каким-то образом делает их уязвимыми для других защитных белков, однако в целом этот механизм пока не изучен. По всей видимости, содержимое апопласта растений, представляющее собой сложный комплекс белков и метаболитов, играет важную роль в процессе взаимодействия

с фитопатогенами. Дальнейшие исследования, возможно, покажут, каким образом белки с нуклеазной активностью могут использоваться в качестве эффекторов, опосредующих взаимодействие клеток растений и грибов.

Работа частично поддержана интеграционным проектом СО РАН – ДВО РАН, программой РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и грантом РФФИ (12-04-01478).

ЛИТЕРАТУРА

- Малиновский В.И. PR-белки и фитовирусы // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 3. С. 1–9.
- Сангаев С.С., Кочетов А.В., Ибрагимов С.С. и др. Роль экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 232–242.
- Трифорова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 4. С. 395–405.
- Agrawal G.K., Rakwal R., Tamogami S. *et al.* Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings // Plant Physiol. Biochem. 2002. V. 40. P. 1061–1069.
- Bai S., Dong C., Li B., Dai H. A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea* // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 62. P. 23–32.
- Bantignies B., Se'guin J., Muzac I. *et al.* Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 871–881.
- Bahramnejad B., Goodwin P.H., Zhang J. *et al.* A comparison of two class 10 pathogenesis-related genes from alfalfa and their activation by multiple stresses and stress-related signaling molecules // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 1235–1250.
- Bertini L., Caporale C., Testa M. *et al.* Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins // FEBS Letters. 2009. V. 583. P. 2865–2871.
- Bertini L., Proietti S., Aleandri M.P. *et al.* Modular structure of HEL protein from Arabidopsis reveals new potential functions for PR-4 proteins // Biol. Chem. 2012. V. 393. No. 12. P. 1533–1546.
- Borsics T., Lados M. Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1831–1832.
- Bravo J.M., Campo S., Murillo I. *et al.* B. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize // Plant Mol. Biol. 2003. V. 52. P. 745–759.
- Breda C., Sallaud C., El-Turk J. *et al.* Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles // Mol. Plant Microbe Interact. 1996. V. 9. P. 713–719.
- Broekaert W., Lee H.H., Kush A. *et al.* Wound-induced ac-

- cumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7633–7637.
- Bufe A., Spangfort M.D., Kahlert H. *et al.* The major birch pollen allergen, bet v1, shows ribonuclease activity // Planta. 1996. V. 199. P. 413–415.
- Caporale C., Di Bernardino I., Leonardi L. *et al.* Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity // FEBS Letters. 2004. V. 575. P. 71–76.
- Caruso C., Caporale C., Poerio C. *et al.* The amino acid sequence of a protein from wheat kernels closely related to proteins involved in the mechanism of plant defense // J. Protein Chem. 1993. V. 12. P. 379–386.
- Chadha P., Das R.H. A pathogenesis related protein, AhPR10, from peanut: an insight of its mode of antifungal activity // Planta. 2006. V. 225. P. 213–222.
- Chen Z.Y., Brown R.L., Damann K.E., Cleveland T.E. PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production // Mol. Plant Pathol. 2010. V. 11. No. 1. P. 69–81.
- Choi D.S., Hwang I.S., Hwang B.K. Requirement of the cytosolic interaction between PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN10 and LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 for cell death and defense signaling in pepper // Plant Cell. 2012. V. 24. No. 4. P. 1675–1690.
- Chung K.M., Igari K., Uchida N., Tasaka M. New perspectives on plants defense responses through modulation of developmental pathways // Mol. Cells. 2008. V. 26. P. 107–112.
- Crowell D., John M.E., Russell D., Amasino R.M. Characterization of a stress-induced developmentally regulated gene family from soybean // Plant Mol. Biol. 1992. V. 18. P. 459–466.
- Fernandes H., Pasternak O., Bujacz G. *et al.* *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin // J. Mol. Biol. 2008. V. 378. P. 1040–1051.
- Fristensky B., Horovitz D., Hadwiger L.A. cDNA sequences for pea disease response genes // Plant Mol. Biol. 1988. V. 11. P. 713–715.
- Gonzalez-Teuber M., Eilmus S., Muck A. *et al.* Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation // Plant J. 2009. V. 58. P. 464–473.
- Gu Y.Q., Wildermuth M.C., Chakravarthy S. *et al.* Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 817–831.
- Guevara-Morato M.A., de Lacoba M.G., García-Luque I., Serra M.T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. No. 12. P. 3259–3271.
- Hadwiger L.A., Polashock J. Fungal mitochondrial DNases: effectors with the potential to activate plant defenses in nonhost resistance // Phytopathology. 2013. V. 103. No. 1. P. 81–90.
- Hawes M.C., Curlango-Rivera G., Wen F. *et al.* Extracellular DNA: the tip of root defenses? // Plant Sci. 2011. V. 180. No. 6. P. 741–745.
- He M., Xu Y., Cao J. *et al.* Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection // Protoplasma. 2013. V. 250. No. 1. P. 129–1240.
- Hillwig M.S., Liu X., Liu G. *et al.* Petunia nectar proteins have ribonuclease activity // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. No. 11. P. 2951–2965.
- Huang J.C., Chang F.C., Wang C.S. Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins // Plant Mol. Biol. 1997. V. 34. P. 681–686.
- Hugot K., Ponchet M., Marais A. *et al.* A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // Mol. Plant Microbe Interact. 2002. V. 15. No. 3. P. 243–250.
- Hwang S.H., Lee I.A., Yie S.W., Hwang D.J. Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid // Planta. 2008. V. 227. P. 1141–1150.
- Kim S.T., Yu S., Kang Y.H. *et al.* The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity // Plant Cell Rep. 2008. V. 27. P. 593–603.
- Kim S.G., Kim S.T., Wang Y. *et al.* The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants // Mol. Cells. 2011. V. 31. No. 1. P. 25–31.
- Krishnaswamy S., Baral P.K., James M.N., Kav N.N. Site-directed mutagenesis of histidine 69 and glutamic acid 148 alters the ribonuclease activity of pea ABR17 (PR10.4) // Plant Physiol. Biochem. 2011. V. 49. No. 9. P. 958–962.
- Krishnaswamy S.S., Srivastava S., Mohammadi M. *et al.* Transcriptional profiling of pea ABR17 mediated changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2008. DOI: 10.1186/1471-2229-8-91.
- Lebel S., Schellenbaum P., Walter B., Maillot P. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family // BMC Plant Biol. 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-184.
- LeBrasseur N.D., MacIntosh G.C., Pérez-Amador M.A. *et al.* Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in Arabidopsis: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway // Plant J. 2002. V. 29. No. 4. P. 393–403.
- Linthorst H.J.M., Danhash N., Brederode F.T. *et al.* Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the «hevein» domain // Mol. Plant Microbe Interact. 1991. V. 4. P. 586–592.
- Liu J.-J., Ekramoddoullah A.K.M., Yu X. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening // Physiol. Plant. 2003. V. 119. P. 544–553.
- Ludvigsen S., Poulsen F.M. Three-dimensional structure in solution of Barwin, a protein from barley seed // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 8783–8789.
- Lu H.C., Lin J.H., Chua A.C. *et al.* Cloning and expression of pathogenesis-related protein 4 from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes associated with ribonuclease, chitinase and anti-fungal activities // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 56. P. 1–13.
- McGee J.D., Hamer J.E., Hodges T.K. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea* // Mol. Plant Microbe Interact. 2001. V. 14. P. 877–886.
- MacIntosh G.C., Bariola P.A., Newbigin E., Green P.J. Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes? // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 1018–1023.

- MacIntosh G.C., Hillwig M.S., Meyer A., Fligel L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. V. 283. No. 4. P. 381–396.
- Matton D.P., Brisson N. Cloning, expression and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1989. V. 2. P. 325–331.
- Midoh N., Iwata M. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis related protein in rice // *Plant Cell Physiol.* 1996. V. 37. P. 9–18.
- Neuhaus J.M., Sticher L., Meins F.Jr., Boller T. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 10362–10366.
- Neudecker P., Schweimer K., Nerkamp J. *et al.* Allergic Cross-reactivity made visible solution structure of the major cherry allergen Pru av 1 // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 22756–22763.
- Park C.-J., Kim K.-J., Shin R. *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 186–198.
- Park Y.S., Jeon M.H., Lee S.H. *et al.* Activation of defense responses in chinese cabbage by a nonhost pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. tomato // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 538. P. 748–754.
- Pasternak O., Biesiadka J., Dolot R. *et al.* Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to novel subclass // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2005. V. 61. P. 99–107.
- Potter S., Uknes S., Lawton K. *et al.* Regulation of a hevein-like gene in Arabidopsis // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1993. V. 6. P. 680–685.
- Poupard P., Parisi L., Campion C. *et al.* A wound- and ethphon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2003. V. 62. P. 3–12.
- Puehringer H., Zinoecker I., Mazban G. *et al.* MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1 // *Gene*. 2003. V. 321. P. 173–183.
- Rakwal R., Agrawal G.K., Yonekura M. Separation of proteins from stressed rice *Oryza sativa* L. leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3472–3478.
- Rakwal R., Agrawal G.K., Yonekura M. Lightdependent induction of OsPR10 in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by the global stress signaling molecule jasmonic acid and protein phosphatase 2A inhibitors // *Plant Sci.* 2001. V. 61. P. 469–479.
- Rao M.V., Lee H., Davis K.R. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death // *Plant Cell*. 2002. V. 32. P. 447–456.
- Robert N., Ferran J., Breda C. *et al.* Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein // *Eur. J. Plant. Pathol.* 2001. V. 7. P. 249–261.
- Rupert B., Cattivelli L., Pagni S., Ramina A. Ethylene response genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*) // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 429–437.
- Sikorski M.M., Biesiadka J., Kasperska A.E. *et al.* Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules // *Plant Sci.* 1999. V. 149. P. 125–137.
- Somssich I.E., Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding «pathogenesis-related» proteins in cultured parsley cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. No. 8. P. 2427–2430.
- Somssich I.E., Schmelzer E., Kawalleck P., Hahlbrock K. Gene structure and *in situ* transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley // *Mol. Gen. Genet.* 1988. V. 213. No. 1. P. 93–98.
- Srivastava S., Emery R.J.N., Kurepin L.V. *et al.* Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels // *Plant Growth Regul.* 2006. V. 49. P. 17–25.
- Stanford A., Bevan M., Northcote D. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 215. P. 200–208.
- van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T., Conejero V. Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994. V. 12. P. 245–264.
- van Loon L.C., van Strien E.A. The family of pathogenesis related proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. V. 55. P. 85–97.
- van Loon L.C., Rep M., Pietersen C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
- Walter M.H., Liu J.W. *et al.* Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 281–293.
- Wang N., Xiao B., Xiong L. Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 2212–2224.
- Warner S.A.J., Scott R., Draper J. Characterization of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 19. P. 555–561.
- Wen F., White G.J., VanEtten H.D. *et al.* Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. No. 2. P. 820–829.
- Xie Y.R., Chen Z.Y., Brown R.L., Bhatnagar D. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays* // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 121–130.
- Yamamoto M., Torikai S., Oeda K. A major root protein of carrots with high homology to intracellular pathogenesis-related (PR) proteins and pollen allergens // *Plant Cell Physiol.* 1997. V. 38. P. 1080–1086.
- Zhang N., Zhang S., Borchert S. *et al.* High levels of a fungal superoxide dismutase and increased concentration of a PR-10 plant protein in associations between the endophytic fungus *Neotyphodium lolii* and ryegrass // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011. V. 24. No. 8. P. 984–992.
- Zhou X.J., Lu S., Xu Y.H. *et al.* A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity // *Plant Sci.* 2002. V. 162. No. 4. P. 629–636.

ASSOCIATION BETWEEN PR PROTEINS WITH RIBONUCLEASE ACTIVITY AND PLANT RESISTANCE AGAINST PATHOGENIC FUNGI

E.A. Filipenko¹, A.V. Kochetov^{1,2}, Y.Kanayama³, V.I. Malinovsky⁴, V.K. Shumny^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

³ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan;

⁴ Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russia

Summary

Pathogenesis-related (PR) proteins participate in complex plant defense response to pathogens. It is known that members of two PR-proteins families (PR-4 and PR-10) exhibit ribonuclease activity in some cases. These proteins were found to be able to inhibit the growth of pathogenic fungi, and the ribonuclease activity is necessary for manifestation of this effect. This paper presents current data on molecular mechanisms governing the antifungal activity of PR-ribonucleases connected both with their direct cytotoxic impact on pathogen cells and with possible participation in induction of plant cell apoptosis and development of the hypersensitive reaction (HR).

Key words: RNase, PR proteins, PR-10, PR-4, plant pathogen, apoptosis.