

ЭФФЕКТОРНЫЕ БЕЛКИ ООМИЦЕТА PHYTOPHTHORA INFESTANS КАК ОСНОВА ДЛЯ СТРАТЕГИИ СОЗДАНИЯ СПОСОБОВ КОНТРОЛЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА

EFFECTOR PROTEINS OF THE OOMYCETE PHYTOPHTHORA INFESTANS AS THE BASIS FOR A STRATEGY FOR CREATING CONTROL METHODS OF LATE BLIGHT PATHOGEN

А. А. Мазавец, А. М. Ходосовская
A. A. Mazavets, A. M. Khodosovskaya

Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
someoneelse3158@gmail.com; hodosovskaya@bsu.by
Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

Патогенные оомицеты, в том числе фитопатоген *Phytophthora infestans*, способны секретировать белки-эффекторы, которые доставляются в клетки организма-хозяина и изменяют клеточный метаболизм. Некоторые эффекторы подавляют иммунитет растений, способствуя заражению, другие обладают авирулентными свойствами. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия *P. infestans* с растением с участием белков-эффекторов может стать перспективной базой для разработки экологически приемлимых способов борьбы с данным опасным для сельскохозяйственных растений возбудителем.

Pathogenic oomycetes, including the phytopathogen *Phytophthora infestans*, are able to secrete effector proteins that are delivered to the cells of the host organism and change cellular metabolism. Some effectors suppress plant immunity, promoting infection, while others have avirulent properties. The study of the molecular mechanisms of interaction of *P. infestans* and the plant with the participation of effector proteins can become a promising basis for the development of environmentally acceptable methods for combating this pathogen that is dangerous for agricultural plants.

Ключевые слова: оомицет *Phytophthora infestans*, секретируемые белки-эффекторы, контроль возбудителя фитофтороза.

Keywords: oomycete *Phytophthora infestans*, secreted effector proteins, control of late blight pathogen.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-402-405>

В природных местах обитания растения вынуждены сосуществовать с разнообразными видами микроорганизмов, многие из которых являются патогенами. С экономической и научной точки зрения наиболее значимым фитопатогеном является возбудитель фитофтороза *Phytophthora infestans* [1].

Сегодня фитофтороз остается основным препятствием для производства картофеля – третьей по величине основной сельскохозяйственной культуры в мире – и, следовательно, представляет собой постоянную угрозу продовольственной безопасности. Борьба с фитофторозом не может сводиться только к использованию химических методов защиты, так как химические методы борьбы требуют многократных дорогостоящих обработок и теряют свою эффективность в результате накопления в популяциях патогена резистентных штаммов, а также наносят вред экологии.

Попытки борьбы с фитофторозом терпят неудачу из-за высокой вариабельности возбудителя, его легкой адаптации к выращиваемым сортам растений и появления новых устойчивых к фунгицидам видов. Указанные причины привели к снижению эффективности традиционных методов защиты и повышению экологической пластичности, адаптивности и усиления патогенных свойств *P. infestans* [1].

В связи с этим особую значимость приобретают молекулярно-биотехнологические методы контроля фитофтороза и борьбы с ним. Фундаментальной основой для разработки новых эффективных мер борьбы с возбудителем заболевания должно стать исследование молекулярных механизмов взаимодействия патогена с растением. По мере развития технологий редактирования генов и расширения знаний о функциях генов хозяина и паразита этот подход демонстрирует новые перспективы [2].

В процессе заражения фитопатогены вступают со своими хозяевами в молекулярные взаимодействия, цели которых пройти покровы, защищающие ткани и клетки, подавить защитные свойства живых клеток и обеспечить питание содержимым клеток хозяина. В настоящее время общепризнано, что, подобно бактериальным патогенам, эукариотические патогены выделяют целый арсенал эффекторных белков, которые модулируют врожденный иммунитет растений и способствуют паразитарной инфекции [3].

Эффекторные белки (эффекторы) – это секретируемые молекулы, продуцируемые патогенами, которые изменяют структуру и функцию клетки-хозяина, тем самым облегчая инфекцию (факторы вирулентности или токсины)

или вызывая защитные реакции (факторы авирулентности или элиситоры). Эффекторы могут влиять на метаболизм клетки хозяина, приводить к некрозу или маскировать присутствие патогена. Эффекторы транслоцируются в клетки растения-хозяина через специальные структуры – гаустории и аппрессории – и функционируют в цитоплазме или ядре хозяина либо находятся в апопласте клеток растения и действуют в межклеточном пространстве.

В зависимости от целевых участков эффекторный белок можно разделить на два класса: апопластические и цитоплазматические эффекторы. Апопластические эффекторы секретируются во внеклеточное пространство растения, где они взаимодействуют с внеклеточными мишенями и поверхностными рецепторами. Цитоплазматические эффекторы перемещаются внутрь растительной клетки через специализированные структуры, такие как везикулы и гаустории, которые проникают внутрь живых клеток-хозяев [3].

Апопластические эффекторы, ингибирующие секретируемые хозяином протеазы, были впервые описаны у *P. infestans* в 2004 году. Эффекторный белок данного класса обладает некоторыми общими свойствами. Апопластические эффекторы имеют N-терминальные сигнальные пептиды, которые необходимы им для транспорта через мембраны. Они содержат много цистеиновых остатков, формирующих дисульфидные мостики, которые стабилизируют молекулы белка в насыщенном протеазами апопласте. К апопластическим эффекторам *P. infestans* относят следующие белки: ингибиторы глюканазы GIP1 и GIP2, ингибиторы сериновой протеазы EPI1 и EPI10, ингибиторы цистеиновой протеазы EPIC1 и EPIC2B, малые цистеин-богатые белки элицитины INF1 и INF2A, INF2B и Nep-1-подобный белок PiNPP1 [3].

Ингибиторы глюканазы GIP1 и GIP2 были первоначально идентифицированы как секретируемые белки *P. sojae*, которые ингибируют эндо- β -1,3-глюканазу EGaseA сои. Эти белки-ингибиторы имеют значительное структурное сходство с трипсиновым классом сериновых протеаз, но несут мутированные каталитические остатки и являются протеолитически нефункциональными. Считается, что GIPs функционируют как контрзащитные молекулы, которые ингибируют деградацию β -1,3/1,6 глюканов в клеточной стенке патогена и/или высвобождение вызывающих защиту олигосахаридов β -1,3 эндоглюканазы хозяина. Четыре сходных с GIPs гена были идентифицированы у *P. infestans*, и их способность ингибировать эндоглюканазы томатов находится в стадии изучения [3].

Белки EPI1 и EPI10 – это многодоменные ингибиторы сериновых протеаз семейства Kazal (семейство MEROPS I1), которые действуют в качестве контрзащиты от PR-белка томатов P69B – субтилизиноподобной сериновой протеазы. Гены EPI1 и EPI10 экспрессируются во время заражения томатов *P. infestans*. Последние исследования показали, что EPI1 защищает несколько секретируемых белков *P. infestans* от деградации протеазой P69B, тем самым непосредственно способствуя вирулентности [3].

Будущие биохимические исследования этих белков будут направлены на то, в какой степени ингибирование протеаз хозяина является широко распространенной функцией вирулентности у оомицетов. Значимость подобных исследований заключается в том, что ингибирование протеаз хозяина Kazal-подобными белками может быть общей стратегией вирулентности между паразитами растений и млекопитающих. Установлено, что Kazal-подобные белки вовлечены в вирулентность представителей Apicomplexa – *Toxoplasma gondii* и *Neospora caninum*, группы паразитов млекопитающих, заражение которыми происходит через пищеварительный тракт. Четыре производных белка с Kazal-подобными доменами были также идентифицированы в последовательности генома другого представителя таксона Apicomplexa – простейшего-паразита *Cryptosporidium parvum* [3].

Белки EPIC1 и EPIC2 образуют класс цистатиноподобных ингибиторов цистеиновых протеаз. Недавние результаты показывают, что два данных ингибитора нацелены на апопластическую папаиноподобную цистеиновую протеазу томатов. Было обнаружено, что эффекторы EPIC1 и EPIC2B ингибируют протеазу растения-хозяина RCR3 и другие апопластические цистеиновые протеазы томатов [3].

Элицитины – семейство структурно связанных секретируемых белков, индуцирующих гиперчувствительную гибель клеток и другие биохимические изменения, связанные с защитными реакциями у *Nicotiana spp.* – растения, которое не является хозяйским для *P. infestans*, но используется в экспериментах, т.к. реагирует на контакт с патогенным появлением зон некроза на листьях в области непосредственного контакта с клетками патогена в результате развития реакции гиперчувствительности. Штаммы *P. infestans*, дефицитные по элицитину INF1, вызывают проявления заболевания у *Nicotiana benthamiana*. Это позволяет предположить, что белок INF1 обуславливает авирулентность *P. infestans* по отношению к этому виду растений [3]. Все гены элицитинов кодируют предполагаемые внеклеточные белки, которые имеют 98-аминокислотный домен элицитина с ядром из 6 консервативных цистеинов. Некоторые гены (*inf2A*, *inf2B*, *inf5*, *inf6*, *inf7* и M-25) кодируют предсказанные белки с C-концевым доменом в дополнение к N-концевому домену элицитина. Анализ последовательностей этих C-концевых доменов выявил высокую частоту встречаемости серина, треонина, аланина и пролина. Аминокислотный состав и распределение этих четырех остатков предполагают наличие кластеров O-связанных сайтов гликозилирования. Эти белки могут образовывать структуру “леденец на палочке”, в которой O-гликозилированный домен образует удлиненный стержень, который прикрепляет белок к клеточной стенке, оставляя внеклеточный N-концевой домен экспонированным на поверхности клетки. Следовательно, эти атипичные белки INF могут быть гликопротеинами, связанными с поверхностью или клеточной стенкой, которые могут взаимодействовать с растительными клетками во время инфекции [3].

Биологическая функция элицитинов фитотоксины давно является предметом изучения. Было продемонстрировано, что элицитины I-ого класса могут связывать стеринны, такие как эргостерол, и функционировать как

белки-переносчики стеролов. Была выдвинута гипотеза о том, что элицитины обладают биологической функцией, имеющей существенное значение для *Phytophthora spp.* потому, что эти организмы не могут синтезировать стерины и должны усваивать их из внешних источников. Кроме того, к элицитиноподобным белкам была отнесена фосфолипаза из *P. capsici* со значительным сходством с белками INF5 и INF6, что указывает на общую роль связывания/процессинга липидов для различных членов семейства элицитинов. Анализ эффектов, вызванных образованием элицитинов с измененной способностью к связыванию стеролов, позволил предположить, что поступление стеролов важно для специфического связывания белков с рецепторами плазматической мембраны клетки растения и формирования реакции гиперчувствительности у табака. Однако точную взаимосвязь между связыванием стерола и индукцией клеточной гибели еще предстоит выяснить. Ген M25, имеющий сходство с элицитинами, индуцируется во время взаимодействия мицелиев *P. infestans* различных типов половой совместности [3].

Nep1-подобные белки (NLP) – белки с массой около 25 кДа, широко представлены в бактериях и грибах. У оомицетов, особенно у видов, взаимодействующих с растениями, NLP-белки также присутствуют. В родах *Phytophthora* и *Pythium* эффекторы PaNle *Pythium aphanidermatum*, NPP1 *P. parasitica*, PsojNI *P. sojae* и PiNPP1 *P. infestans* являются наиболее изученными белками данного класса. Несмотря на их разнообразное филогенетическое распределение, NLP-белки имеют высокую степень сходства последовательностей, и несколько представителей семейства обладают способностью индуцировать гибель клеток у 20 видов двудольных растений. Широкий спектр действия NLP-белков отличают их от большинства факторов, вызывающих гибель клеток, однако вклад NLP-белков в патогенез остается все-же неясным. Эти эффекторы индуцируют защитные реакции как у восприимчивых, так и у устойчивых растений. У *P. sojae* и *P. infestans* гены *nlp* экспрессировались поздно во время инфекции хозяина и, таким образом, они могут функционировать, вызывая наблюдаемый некроз тканей хозяина во время некротрофной фазы инфекции, тем самым способствуя колонизации. Роль NLP-белков в вирулентности подтверждается недавним открытием, что нарушения в генах NIPecс и NIPeca у *Erwinia carotovora subsp. carotovora* и *E. carotovora subsp. atrosepticum*, соответственно, приводили к снижению фенотипических проявлений вирулентности на клубнях картофеля [3].

К цитоплазматическим эффекторам *P. infestans* относят белки семейства RXLR: AVR3a и CRN-белки (CRN1, CRN2, CRN8 и др.). Эффекторы RXLR – это модульные белки с двумя основными функциональными доменами. В данных эффекторах можно выделить N-концевой домен, включающий сигнальный пептид и консервативную область RXLR (аргинин, любая аминокислота, лейцин, аргинин), участвующую в секреции и нацеливании на клетки растения-хозяина, и C-концевой домен, имеющий эффекторную функцию и действующий внутри растительных клеток [3].

Интересно, что мотив RXLR похож по последовательности и положению на мотив (HT)/Pexel простейшего *Plasmodium falciparum*, который отвечает за транслокацию белков паразитов в эритроциты хозяев млекопитающих. Домены RXLR-белка AVR3a *P. Infestans* и другого RXLR-белка PH001D5 способны опосредовать в эксперименте экспорт репортерного белка GFP из *P. falciparum*, указывая на то, что эукариотические патогены растений и животных имеют сходные секреторные сигналы для доставки эффекторов в клетки-хозяева [3].

Первым выявленным эффектором *P. infestans*, относящимся к продуктам генов вирулентности, т.е. генам, кодирующим белки, не способные вызвать инфекционный процесс, был AVR3a – аналог белка устойчивости R3a. Avr3a был идентифицирован с помощью анализа взаимосвязи полиморфизмов в генах-эффекторах фитопатогена с его авирулентностью на картофеле, несущим ген резистентности R3a [4]. Эффектор AVR3a имеет N-концевой мотив RXLR, который обеспечивает доставку белка внутрь растительных клеток, где он изменяет иммунитет организма хозяина. Ген *Avr3a* кодирует по меньшей мере два полиморфных секретируемых белка из 147 аминокислот, которые отличаются только тремя остатками, два из которых находятся в зрелом белке. Изоляты *P. infestans*, которые являются авирулентными на картофеле R3a, несут ген авирулентности *Avr3a_C¹⁹K⁸⁰I¹⁰³*, тогда как вирулентные изоляты несут только аллель вирулентности *Avr3a_S¹⁹E⁸⁰M¹⁰³*. С помощью биолистической и агрофильтрационной коэкспрессии было показано, что R3a-опосредованная гибель клеток специфически индуцировалась вирулентным аллелем Avr3a, подтверждая взаимодействие между парой генов.

Эффектор Avr3a способен подавлять гиперчувствительную гибель клеток, индуцируемую элицитином INF1, что указывает на его возможную функцию вирулентности [3]. Однако на сегодняшний день Avr3a является единственным супрессором клеточной гибели, описанным у мицелиальных патогенов. Степень, в которой другие эффекторы могут подавлять гибель клеток, является предметом интенсивного исследования.

CRN-белки (Кринклеры) образуют особый класс секретируемых белков, которые доставляются в клетки растения и изменяют клеточный метаболизм. Белки CRN1 и CRN2 были идентифицированы после скрининга фенотипических проявлений экспрессии *in planta* генов потенциальных секретируемых белков *P. Infestans* (Pex) с помощью вектора, полученного на основе X-вируса картофеля. Эктопическая экспрессия обоих генов в растениях *Nicotiana spp.* и в растении-хозяине – томатах приводила к сморщиванию листьев и фенотипу гибели клеток, что сопровождалось индукцией защитных генов растения. Torto и др. предположили, что CRN1 и CRN2 функционируют как эффекторы, которые нарушают клеточные процессы хозяина по аналогии с бактериальными эффекторами, которые обычно вызывают гибель клеток, хлороз и потемнение тканей при экспрессии в клетках хозяина [3].

CRN-белки являются модульными и имеют определенные структурные домены. Они характеризуются отчетливым консервативным N-концевым участком, имеющим консенсусный LXLFLAK мотив. У возбудителя ложной мучнистой росы крестоцветных *Hyaloperonospora parasitica* мотив LXLFLAK перекрывается с мотивом RXLR, что приводит к возникновению нового мотива RXLRLFLAK. Это открытие, наряду с наблюдением, что N-концевая область CRN-белков пригодна для индукции гибели клеток при экспрессии *in planta*, предполагает, что мотив LXLFLAK способствует нацеливанию белка на клетки хозяина, аналогично механизму функционирования мотива RXLR. Биоинформационный анализ показал, что CRN образуют сложное семейство относительно крупных белков (около 400-850 аминокислот) у представителей рода *Phytophthora* [4]. CRN-белки демонстрируют высокие скорости преобразования генов, и после консервативных N-концевых мотивов присутствует заметный сайт рекомбинации. Анализ последовательностей выявил признаки конверсии и/или рекомбинации генов *crn*-семейства *P. infestans*. Ряд CRN-белков *P. infestans* является химерами, которые демонстрируют уникальные ассоциации между консервативным N-концевым доменом и множеством различающихся C-концевых эффекторных областей. Эти результаты указывают на альтернативный способ адаптации *P. infestans* к защитным механизмам организма хозяина и предполагают, что белки CRN могут выполнять функции, отличные от функций белков RXLR-семейства [4].

На основе геномной ДНК, выделенной из 20 белорусских изолятов *P. infestans*, были амплифицированы фрагменты генов *crn1* и *crn2* размером около 700 пар нуклеотидов, соответствующие C-концевым эффекторным областям соответствующих белков [5]. Рестрикционный анализ с использованием трех рестриктаз для гена *crn1* и двух рестриктаз для гена *crn2* показал преимущественно однотипный характер рестрикции для каждого из ферментов. Тем не менее, в некоторых случаях присутствовали негидролизированные ПЦР-продукты либо гидролиз не удалось осуществить, несмотря на увеличение активности ферментов [5, 6]. Использование метода биоинформационного анализа позволило установить наличие в референсном геноме *P. infestans* (Т-30-4) 3-х кластеров *crn1*-подобных генов и 4-х кластеров *crn2*-подобных генов, имеющих комплементарные последовательности в области отжига использованных праймеров. Построенные методом *in silico* рестрикционные карты для всех возможных участков амплификации генов *crn1* и *crn2* объясняют экспериментально полученный характер рестрикции продуктов амплификации *crn*-подобных генов и допускают отличия в спектре образующихся продуктов гидролиза. Полученные результаты свидетельствуют о возможности существования полиморфизма нуклеотидной последовательности в области семейства *crn*-генов в геномах белорусских изолятов *P. infestans* [6].

Выявление эффекторных белков *P. infestans*, обладающих авирулентными свойствами, а также дальнейшее изучение на молекулярном уровне механизмов взаимодействия данного патогенна с растениями-хозяевами может стать основой для разработки стратегии создания экологически приемлимых способов борьбы с возбудителем фитофтороза – опасного заболевания культивируемых пасленовых растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяков, Ю.Т. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* / Ю.Т. Дьяков, С.Н. Еланский // Микология сегодня. – М., 2007. – Т.1. – С.107-139.
2. *Phytophthora infestans*: An Overview of Methods and Attempts to Combat Late Blight / [А. А. Ivanov et al.] // J. Fungi. – 2021. – Vol. 7. – P. 1–19.
3. Kamoun, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes / S. Kamoun // Ann. Rev. Phytopathol. – 2006. – Vol. 44. – P. 41–60.
4. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* / В. J. Haas [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 393-398.
5. Выявление экспрессии некоторых генов *crn*-семейства фитопатогена *Phytophthora infestans*, способных вызвать защитную реакцию у растений томатов / А.М. Ходосовская [и др.] // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве: Материалы междунар. науч.- практ. конф., 29 июня - 8 июля 2009, г.Брянск – г.Минск, г.Жодино – г.Варшава. С.99-104.
6. Царь, А.И. Анализ особенностей рестрикции амплифицированных фрагментов генов *crn1* и *crn2* в различных изолятах *Phytophthora infestans* / А.И. Царь, А.М. Ходосовская // Биологическая осень 2017 : к Году науки в Беларуси : тезисы докладов Международной научной конференции молодых ученых, 9 ноября 2017 г, Минск, Беларусь / БГУ, Биологический фак-т., Совет молодых ученых ; редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2017. – С. 68-71. – <http://elib.bsu.by/handle/123456789/184697>.