

**Сергей Stanisлавович Жардецкий** – младший научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий. Область научных интересов: регуляция биосинтеза ИУК у бактерий. Автор более 10 научных публикаций.

**Ирина Николаевна Феклистова** – младший научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий. Область научных интересов: регуляция биосинтеза антибиотиков у бактерий. Автор более 25 научных публикаций.

**Юлия Михайловна Кулешова** – аспирант кафедры генетики. Область научных интересов: регуляция биосинтеза пигментов у бактерий. Автор более 17 научных публикаций. Научный руководитель – Н.П. Максимова.

УДК 577.21

Е.А. НИКОЛАЙЧИК, А.Л. ЛАГОНЕНКО, Л.Н. ВАЛЕНТОВИЧ, И.И. ЛЕШКОВИЧ,  
Т.В. ОВЧИННИКОВА, О.К. ПРИСЯЖНЕНКО, Н.Г. ДОРУЖИНСКАЯ, И.М. ЛИМОРОВА,  
А.Н. ЕВТУШЕНКОВ

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA* С РАСТЕНИЯМИ\*

Exploration of molecular mechanisms of interaction of plant pathogenic bacteria *Erwinia* with plants is the major research focus of the department of molecular biology which was formed in 2002. The investigation framework includes pathogen genome screening for genes involved in interaction with host plants, elucidation of global regulatory systems of the pathogen responsible for coordinated expression of virulence genes, studying the contribution of protein secretion to *Erwinia* pathogenesis and determining the functions of secreted proteins. The potential of practical use of the research results for plant protection against various pathogens is also being explored.

Бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) – широко распространенный в Беларуси фитопатоген, наносящий значительный ущерб растениям картофеля. Бактерии *Eca* вызывают «черную ножку» картофеля (заболевание, приводящее к гибели растений вскоре после прорастания клубней), а также мягкую гниль клубней при их хранении. Бактерии *Eca* являются факультативным некротрофным патогеном, в связи с чем способны вести сапрофитное существование на растительных остатках, а при заражении растений используют массивную продукцию широкого спектра гидролитических ферментов, разрушающих клеточную стенку растений и последующую утилизацию высвобождающихся питательных веществ.

Изучение механизмов взаимодействия *Erwinia* с растениями проводится на биологическом факультете БГУ достаточно давно. На начальном этапе значительная часть работ была посвящена характеристике отдельных молекул-факторов вирулентности *Erwinia*, в первую очередь пектатлиаз, причем первые исследования по молекулярному клонированию и характеристике пектатлиаз были выполнены еще в 1980-х гг. [1]. Работы на молекулярном уровне интенсифицировались к концу 1990-х, и сейчас изучение молекулярных механизмов взаимодействия фитопатогенных бактерий с растениями является основным научным направлением сформированной в 2002 г. кафедры молекулярной биологии. Далее приводится обзор последних, в том числе и до сих пор не опубликованных, работ сотрудников кафедры по этой теме.

Одним из подходов, используемых при изучении взаимодействия патогена с хозяином, является масштабный скрининг генома патогена с целью выявления генов, экспрессия которых изменяется при контакте с хозяином. Наиболее успешным вариантом такого подхода явилось использование мутагенеза при помощи транспозона *mini-Tn5xylE* [2]. Наличие в составе этого транспозона беспромоторного гена-репортера (*xylE*) дает возможность оценивать экспрессию мутантных генов, а удобный селективный маркер (ген канамицинрезистентности) – легко клонировать мутантный ген, что позволяет определить место инсерции транспозона путем секвенирования клонированных фрагментов ДНК. В ходе такого скрининга был идентифицирован ряд генов, экс-

\* Авторы статьи – сотрудники кафедры молекулярной биологии, за исключением Т.В. Овчинниковой.

прессия которых меняется при контакте с растением [3]. Охарактеризованные таким образом гены (их продукты) участвуют в следующих клеточных процессах: расщепление полимеров клеточной стенки растения, транспорт и утилизация продуктов расщепления; анаэробное дыхание; сидерофорзависимое поглощение железа; инактивация фенольных соединений.

В связи с широким спектром физиологических процессов, в которых участвуют продукты идентифицированных нами генов, очевидно, что клетки *Eca* должны иметь глобальные регуляторные системы, координированно регулирующие экспрессию значительного количества генов патогена при контакте с растением. Первым из генов, кодирующих у *Eca* такие регуляторы, был охарактеризован *expN*. Мутант по этому гену (JN23), полученный путем химического мутагенеза в начале 1990-х гг., обладал рядом интересных свойств. В первую очередь это относится к существенно повышенной продукции внеклеточных ферментов-деполимераз клеточной стенки растений (пектиназ, целлюлаз и протеаз), однако идентификация мутантного гена стала возможной только после определения полной нуклеотидной последовательности генома *Eca* штамма SCRI 1043 [4]. Поскольку позиция мутантного локуса (возле гена *recA*) на хромосоме штамма JN23 была точно определена путем генетического картирования [5], а у штамма SCRI 1043 в этом месте расположен гомолог описанного ранее для *E. carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) плеiotропного регулятора *rsmA* [6], было сделано предположение о том, что мутация *expN* могла произойти в таком же гене. Это предположение подтвердилось – амплификация и секвенирование локуса штамма JN23, соответствующего *rsmA*, показали наличие нуклеотидной замены во втором кодоне *rsmA*. Фенотипический эффект мутации *expN* у *Eca* отличается от такового мутации *rsmA* у *Ecc* тем, что продукция факторов вирулентности у *expN*-мутанта (значительно повышенная сама по себе) не только не снижается на среде с глюкозой (т. е. в условиях катаболитной репрессии), но еще более возрастает.

Другими важными регуляторами, исследуемыми на кафедре, являются альтернативные сигма-факторы РНК-полимеразы. В настоящий момент клонированы гены *rpoE*, *rpoS* и *hrpL*, детально изучены эффекты инактивации и повышенной экспрессии последнего из них. HrpL считается у ряда бактерий конечным регулятором генов *hrp*-регулона, продукты которого необходимы на ранних стадиях взаимодействия с растением [7, 8]. Инактивация *hrpL* у бактерий *Eca* привела к незначительному снижению вирулентности и полной утрате ими способности индуцировать реакцию гиперчувствительности (РГ) у растений, не являющихся для них естественными хозяевами. Инактивация этого гена предотвращала экспрессию *hrp/hrc*-генов, кодирующих компоненты системы секреции III типа (ССТТ), а введение в клетки *Eca* дополнительных копий этого гена резко усиливало экспрессию *hrp/hrc*-генов [9].

Исследованию секреции белков клетками *Eca* посвящена значительная часть работ кафедры. Для грамотрицательных бактерий описано шесть различных секреторных систем, причем, исходя из результатов анализа геномной последовательности *Eca*, можно ожидать, что эти бактерии имеют все шесть известных вариантов [4]. Интерес к секреторным системам обусловлен целым рядом факторов, из которых важнейшими являются, пожалуй, очевидная необходимость секреции для взаимодействия патогена со своим хозяином, а также биотехнологическая значимость секреции белков за пределы бактериальной клетки. В этом плане наибольший интерес представляют система секреции II типа (ССВТ), а также ССТТ.

ССВТ является основным каналом, по которому за пределы клетки транспортируется большинство деполимераз компонентов клеточной стенки растений. Секреция по II пути является четко выраженным двухстадийным процессом. Первая стадия – транслокация белков в периплазму с помощью Sec-системы; вторая – секреция белков из периплазмы через наружную мембрану во внешнюю среду. Для изучения роли сигнальной последовательности

ти белков, секретлируемых по II пути, и возможности ее использования с целью создания секреторных векторов были сконструированы химерные белки, состоящие из сигнального пептида пектатлиазы или целлюлазы *Erwinia* и следующей за ним последовательности фермента, активность которого легко детектируется (ксилозоизомераза). Показано, что сигнальная последовательность обеспечивает экспорт химерного белка в периплазматическое пространство клетки.

ССТТ интересна в первую очередь своей способностью доставлять белковые факторы вирулентности непосредственно в клетку растения, где эти белки могут распознаваться клетками растений на ранних стадиях взаимодействия с патогеном, что может приводить к индукции защитного ответа растения. Системы секреции III типа фитопатогенных бактерий были обнаружены около 20 лет назад в результате изучения фитопатогенных псевдомонад [10, 11]. Инактивация ССТТ у этих бактерий приводила не только к утрате ими вирулентности по отношению к растениям-хозяевам, но и к потере способности индуцировать реакцию гиперчувствительности (РГ) у других растений, в связи с чем гены, кодирующие компоненты ССТТ, получили название *hrp* (*hypersensitivity response and pathogenicity*). Индукция РГ оказалась в дальнейшем быстрым, легко воспроизводимым и надежным тестом на наличие у фитопатогенов функциональной ССТТ, и в исследовании этой секреторной системы РГ-тест как менее трудоемкий и столь же информативный часто используется вместо непосредственной проверки вирулентности на растении-хозяине.

Недавно нами была установлена существенная роль системы секреции III типа (ССТТ) во взаимодействии бактерий *Eca* с растениями-хозяевами (*Solanum tuberosum*) и не хозяевами (*Vicia faba*) [12]. Последующая работа шотландских исследователей [13] показала важность ССТТ на самых ранних этапах заражения растений картофеля, в связи с чем встал вопрос, какие из транспортируемых посредством ССТТ белков участвуют в таком взаимодействии.

Все белки фитопатогенных бактерий, транспортируемые с помощью ССТТ, можно разделить на эффекторы – белки, транслоцирующиеся в клетку растения и оказывающие на нее выгодное для патогена воздействие, и хелперы – белки, как правило, в цитоплазму растительной клетки не попадающие, но способствующие транслокации эффекторов. К числу хелперов относятся харпины – богатые глицином не содержащие цистеина термостабильные гидрофобные белки, транспортирующиеся в межклеточное пространство организма хозяина и, скорее всего, изменяющие проницаемость мембраны растительной клетки, что необходимо для транслокации эффекторов. Эффекторами являются Avr- и Dsp-белки (*avirulence* и *disease specific protein*). Несмотря на различия в названии, обе группы эффекторов являются фактически факторами вирулентности, однако Avr-белки могут узнаваться соответствующими R-белками резистентных растений, что приводит к проявлению РГ. Эффекторы составляют самую малоизученную группу белков, кодируемых *hrp*-кластером. Только для небольшого их числа определена функция, и даже сам факт транслокации отдельных эффекторов в клетки растений получил прямое доказательство совсем недавно с помощью аденилатциклазного домена (Cya) циклолизина *Bordetella pertussis* в качестве биохимического репортера транслокации бактериальных белков в клетки эукариот. Впервые Cya-домен был применен для демонстрации транслокации Yop-белков *Yersinia* в клетки HeLa [14], и лишь в 2002 г. этот репортер был использован для доказательства транслокации Avr-белков в растения из клеток *Xanthomonas campestris* [15] и совсем недавно – из *Pseudomonas syringae* [16].

ССТТ была обнаружена и по сей день наиболее активно изучалась у патогенов с узким кругом хозяев, таких как *P. syringae* и *X. campestris*. Бактерии

*Erwinia carotovora* являются фитопатогенами с широким кругом хозяев, и до настоящего времени основное внимание при их изучении уделялось другим факторам вирулентности, в первую очередь гидролитическим ферментам (пектатлиазам, целлюлазам и протеазам), а также сенсорным и регуляторным механизмам, контролирующим их синтез. Тщательный анализ геномной последовательности *Eca* по целому ряду признаков (сходство белковых продуктов с известными субстратами ССТТ, наличие на их N-конце предполагаемого секреторного сигнала, присутствие перед геном HrpL-зависимого промотора) позволил идентифицировать всего четыре гена, способных кодировать потенциальные субстраты ССТТ – *hrpN*, *hrpW*, *hrpJ* и *dspE*. Секреция продуктов трех из этих генов – HrpN, HrpW и DspE была ранее продемонстрирована у *E. amylovora* [17–19], однако возможность их транспорта через ССТТ бактерий *Eca* ранее не изучалась. При исследовании транспорта этих четырех белков посредством ССТТ бактерий *Eca* нами были получены следующие результаты:

- белки HrpW [20] и DspE *Eca* секретируются за пределы клетки и легко детектируются в культуральной среде;

- белок HrpJ *Eca* секретируется за пределы клетки, однако остается ассоциированным с ее поверхностными структурами и в культуральной среде не обнаруживается [21];

- бактерии *Eca* не способны секретировать свой собственный харпин HrpN (белок не обнаруживается ни в культуральной жидкости, ни на поверхности клетки), но в то же время успешно секретируют гомологичный белок HrpN *E. amylovora*;

- с использованием разработанной на кафедре биохимии БГУ высокочувствительной радиоиммунологической методики определения цАМФ [22] показана транслокация гибридного белка DspE-Cya из клеток *Eca* в клетки растений. Таким образом впервые для *Erwinia* получено прямое биохимическое доказательство транслокации бактериального белка в клетки растений [23].

Поскольку данные о секреции HrpJ получены впервые, был сделан особый акцент на исследовании роли этого белка в работе ССТТ и при взаимодействии бактерий *Eca* с растениями. Сконструированы полярный [12] и неполярный инсерционные мутанты по гену *hrpJ*. У неполярного мутанта сохранен нормальный уровень экспрессии нижележащих генов крупного *hrpJ*-оперона (кодирующего консервативные компоненты ССТТ), что позволяет специфически оценивать эффекты инактивации гена *hrpJ* на работу ССТТ. Оба мутанта не способны индуцировать РГ, но только у неполярного мутанта эта способность восстанавливается комплементирующей плазмидой, кодирующей белок HrpJ. Способность индуцировать РГ восстанавливается также у неполярного *hrpJ*-мутанта при введении плазмиды, кодирующей гетерологичный эффекторный белок AvrPto из *Pseudomonas syringae*. Поскольку AvrPto может индуцировать РГ, только попав в цитоплазму клеток растения, эти данные свидетельствуют о том, что неполярный *hrpJ*-мутант утратил способность транслоцировать нативный эффектор (или эффекторы) *Eca*, ответственный за индукцию РГ, но по-прежнему способен транслоцировать AvrPto. Такое предположение полностью подтверждается данными по транслокации химерных белков AvrPto-Cya и DspE-Cya. В настоящее время идет исследование причин различного участия белка HrpJ в транслокации эффекторов AvrPto и DspE.

Результатом контакта харпинов и Avr-белков с клетками растений является запуск защитного ответа растения, в связи с чем на кафедре ведутся работы по оценке возможности практического использования некоторых субстратов ССТТ в качестве индукторов устойчивости к заболеваниям. Такими субстратами выбраны описанные выше белки HrpN, HrpW и DspE. Исследуются

два возможных подхода – создание трансгенных растений, экспрессирующих один из указанных белков, и обработка растений белковыми препаратами перед контактом с патогеном. К настоящему моменту получены стабильные трансгенные линии растений табака, экспрессирующие белок HrpW, и показано, что такие линии обладают повышенной устойчивостью к *Pseudomonas tabaci*. Начата работа по оценке экспрессии PR-генов растений в ответ на контакт с белками HrpN, HrpW и DspE.

1. Yankovsky N.K., Bukanov N.O., Gritzenko V.V. et al. // Gene. 1989. Vol. 81. P. 211.
2. de Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K. // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. P. 6568.
3. Nikolaichik Y., Myamin V., Limorova I. et al. // Beitrage für Züchtungsforschung Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen. 2002. Vol. 8. P. 20.
4. Bell K.S., Sebahia M., Pritchard L. et al. // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 11105.
5. Николайчик Е.А., Песнякевич А. Г. // Генетика. 1995. Vol. 31. P. 1052.
6. Cui Y., Chatterjee A., Liu Y. et al. // J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. P. 5108.
7. Xiao Y., Heu S., Yi J. et al. // Ibid. 1994. Vol. 176. P. 1025.
8. Wei Z. M., Beer S. V. // Ibid. 1995. Vol. 177. P. 6201.
9. Ovchinnikova T.V., Lagonenko A. L., Evtushenkov A.N., Nikolaichik Y.A. // Biotechnology in Agriculture and the Food Industry. New York, 2004. P. 141.
10. Lindgren P.B., Peet R.C., Panopoulos N.J. // J. Bacteriol. 1986. Vol. 168. P. 512.
11. Boucher C.A., Van Gijsegem F., Barberis P. A. et al. // Ibid. 1987. Vol. 169. P. 5626.
12. Ageichik A.V., Evtushenkov A.N., Nikolaichik Y.A. // Plant Protect. Sci. 2002. Vol. 38. P. 553.
13. Holeva M.C., Bell K.S., Hyman L.J. et al. // Mol. Plant-Microbe Interact. 2004. Vol. 17. P. 943.
14. Sory M.P., Cornelis G.R. // Mol. Microbiol. 1994. Vol. 14. P. 583.
15. Casper-Lindley C., Dahlbeck D., Clark E.T., Staskawicz B.J. // PNAS. 2002. Vol. 99. P. 8336.
16. Schechter L.M., Roberts K.A., Jamir Y. et al. // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186. P. 543.
17. Kim J. F., Beer S.V. // Ibid. 1998. Vol. 180. P. 5203.
18. Bogdanove A.J., Wei Z. M., Zhao L., Beer S. V. // Ibid. 1996. Vol. 178. P. 1720.
19. Bogdanove A.J., Bauer D.W., Beer S. V. // Ibid. 1998. Vol. 180. P. 2244.
20. Лагоненко А.Л., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50. № 1. С. 70.
21. Лагоненко А.Л., Овчинникова Т.В., Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. // Там же. 2004. Т. 48. № 5. С. 74.
22. Губич О.И., Шолух М. В. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2003. № 2. С. 11.
23. Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2005. Т. 49. № 5. С. 81.

Поступила в редакцию 27.06.06.

**Евгений Артурович Николайчик** – кандидат биологических наук, доцент. Область научных интересов: молекулярная биология, микробиология, фитопатология. Автор 73 научных работ.

**Александр Леонидович Лагоненко** – кандидат биологических наук, ассистент. Область научных интересов: молекулярная биология, фитопатология. Автор 23 научных работ.

**Леонид Николаевич Валентович** – аспирант. Область научных интересов: молекулярная биология, фитопатология. Автор 14 научных работ. Научный руководитель – Е.А. Николайчик.

**Иван Иванович Лешкович** – магистрант. Область научных интересов: молекулярная биология, биоинформатика. Автор 3 научных работ. Научный руководитель – Е.А. Николайчик.

**Татьяна Викторовна Овчинникова** – аспирант Эдинбургского университета. Область научных интересов: молекулярная биология. Автор 12 научных работ. Научный руководитель – профессор Дж. Беггс.

**Ольга Константиновна Присяженко** – аспирант. Область научных интересов: молекулярная биология, фитопатология, геномика. Автор 8 научных работ. Научный руководитель – А.Н. Евтушенков.

**Наталья Григорьевна Доружинская** – аспирант. Область научных интересов: молекулярная биология, микробиология. Автор 7 научных работ. Научный руководитель – А.Н. Евтушенков.

**Ирина Михайловна Лиморова** – ассистент. Область научных интересов: молекулярная биология, фитопатология. Автор 7 научных работ.

**Анатолий Николаевич Евтушенков** – доктор биологических наук, заведующий кафедрой. Область научных интересов: биотехнология, молекулярная биология, микробиология, фитопатология. Автор 140 научных работ.