

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ, ВИРУСНЫЕ СТРАТЕГИИ ЭВАЗИИ

УДК@@@

СИСТЕМА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У РАСТЕНИЙ

© 2011 г. О. А. Вахрушева^{1, 2*}, С. А. Недоспасов^{1, 2}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию и принята к печати 23.08.2010 г.

В обзоре рассмотрены некоторые механизмы врожденного иммунитета растений с акцентом на паттерн-распознающие рецепторы и с учетом недавно появившихся данных по расшифровке полных геномов нескольких видов растений. При иммунном ответе растения используют несколько семейств как мембранных, так и цитоплазматических рецепторов, содержащих консервативные домены с лейцин-богатыми повторами (LRRs). Отсутствие у растений адаптивного иммунитета и связанных с ним перестроек в генах иммунных рецепторов отчасти компенсируется механизмами “специфического” иммунитета для противодействия конкретным патогенам; причем эти механизмы полностью закодированы в геноме. На уровне передачи внутриклеточного сигнала, а также в эффекторных механизмах у растений прослеживаются аналогии с системами врожденной защиты животных, хотя системы животных устроены значительно сложнее.

Ключевые слова: растительный иммунитет, врожденный иммунитет, паттерн-распознающие рецепторы, ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны, лейцин-богатые повторы.

SYSTEM OF INNATE IMMUNITY IN PLANTS, by O. A. Vakhrusheva^{1, 2*}, S. A. Nedospasov^{1, 2} (¹Department of Bioengineering and Bioinformatics, Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: vakh57@rambler.ru; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). The review deals with the mechanisms of innate immunity in plants with a focus on families of pattern-recognition receptors and regard for recent data on complete sequencing of the genomes of several plant species. Plants utilize several families of such receptors, both membrane-bound and cytoplasmic ones, which contain conservative leucine-rich repeats. The lack of adaptive immunity and thereto related rearrangements in genes encoding immune receptors in plants are partly compensated by mechanisms of “specific” immunity to counter particular pathogens; such mechanisms being fully encoded within a plant genome. At the level of intracellular signal transduction, as well as in respect of effector mechanisms, similarities between plant and animal innate immune systems can be found, although the latter has many additional aspects.

Keywords: plant immunity, innate immunity, pattern recognition receptors, pathogen-associated molecular pattern, leucine-rich repeats.

ВВЕДЕНИЕ

Недавно произошли заметные сдвиги в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе врожденного иммунитета не только у излюбленного объекта молекулярных биологов – плодовой мушки, но и у млекопитающих. Это позволило по-новому взглянуть на эволюцию систем иммунной защиты. Большинство организ-

мов не обладает приобретенным (адаптивным) иммунитетом, а при защите от патогенов полагаются на весьма древние врожденные механизмы, закодированные в геноме. У позвоночных рецепторы врожденного иммунитета кодируются несколькими небольшими семействами генов (в том числе, кодирующими белки с лейцин-богатыми повторами, LRRs), что позволяет им отве-

Принятые сокращения: CC – домен типа “суперспираль”; ETI (effector-triggered immunity) – иммунитет, стимулируемый эффекторными белками; IL-1 – интерлейкин-1; LRRs (leucine-rich repeats) – лейцин-богатые повторы; NB-LRRs (nucleotide binding leucine-rich repeats) – нуклеотид-связывающие лейцин-богатые повторы; MAPKs (mitogen-activated protein kinases) – митоген-активируемые протеинкиназы; MAPKKs – киназы митоген-активируемых протеинкиназ; PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами; PRRs (pattern-recognition receptors) – паттерн-распознающие рецепторы; PTI (PAMPs-triggered immunity) – иммунитет, стимулируемый PAMPs; RLKs – рецептор-подобные киназы; RLPs – рецептор-подобные белки; TIR – домен, гомологичный Toll и рецептору IL-1; TLRs (Toll-like receptors) – Toll-подобные рецепторы; ЛПС – липополисахарид.

* Эл. почта: vakh57@rambler.ru

Таблица 1. Рецепторы врожденного иммунитета у дрозофилы, животных и растений

	Растения	Дрозофила	Животные
Трансмембранные рецепторы	Рецептор-подобные белки (RLPs) Рецептор-подобные киназы (RLKs)	Toll	Toll-подобные рецепторы (TLRs)
Цитоплазматические рецепторы	Цитоплазматические белки, содержащие лейцин-богатый и нуклеотид-связывающие домены (NB-LRRs)	—	NOD-подобные рецепторы (NLRs)

чать на широкий спектр патогенов по принципу паттерн-распознавания.

Адаптивный иммунитет (в частности, основанный на выработке антител) возник у круглоротых, хотя структурные особенности их адаптивных иммунных рецепторов не закрепились в эволюции. Уже у челюстных рыб работа системы приобретенного иммунитета обеспечивается белковыми структурами, содержащими иммуноглобулиновые домены. Таких механизмов у растений нет.

Отсутствуют у растений и специализированные мобильные клетки (аналогичные лейкоцитам позвоночных), так что реакция на инфекцию у них полностью зависит от функционирования неподвижных и неспециализированных на защитном действии клеток с изначально закодированным набором врожденных иммунных рецепторов. Врожденный иммунный ответ растений можно условно разделить на *неспецифический* — развивающийся в ответ на консервативные “молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами” (PAMPs), и зависящий от передачи сигнала через трансмембранные “паттерн-распознающие рецепторы” (PRRs); и *специфический*, или вторичный, — развивающийся в ответ на присутствующие у определенных патогенов эффекторные белки, распознаваемые цитоплазматическими рецепторами.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе системы врожденного иммунитета растений, в значительной степени сходны с некоторыми механизмами, которые опосредуют развитие врожденного иммунного ответа у животных, и именно этому аспекту посвящен настоящий обзор. Недавно были расшифрованы геномы нескольких растений: *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Vitis vinifera*, — что позволяет подойти к проблеме изучения врожденного иммунитета с позиций эволюционной геномики.

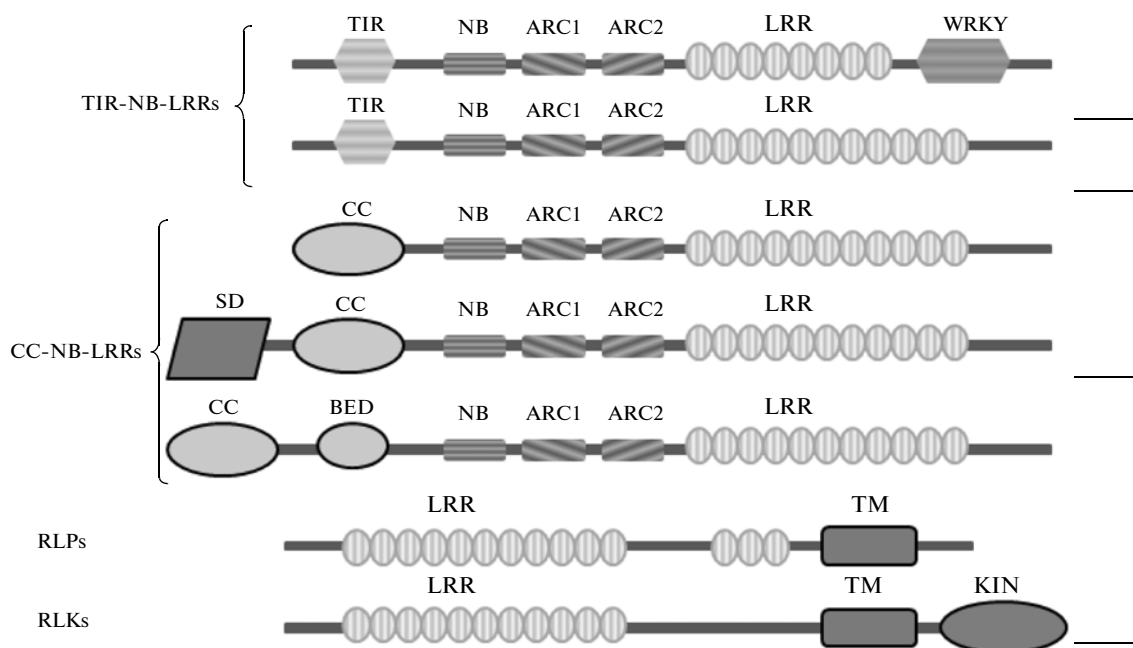
ИММУННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ РАСТЕНИЙ

У растений, как и у животных, имеются рецепторы, распознающие консервативные молекулярные паттерны патогенов — PAMPs (табл. 1). Интересно, что в рецепторах растений ключевым доменом, участвующим в распознавании PAMPs, служат

LRRs, в чем прослеживается аналогия с Toll-подобными рецепторами (TLRs) животных. Более того, примитивные антитела круглоротых, от которых “отказалась” эволюция, также содержат LRR-домены в отличие от закрепившихся в эволюции антител высших позвоночных, построенных из иммуноглобулиновых доменов.

Итак, и рецепторы, обеспечивающие врожденный ответ на PAMPs, и рецепторы, обеспечивающие специфичный (или вторичный) ответ, в качестве структурного блока содержат LRRs [1]. Растительные PRRs представляют собой трансмембранные белки, во внеклеточной части которых присутствуют LRRs, вовлеченные в связывание ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов. Множество PAMPs, узнаваемых растениями, в значительной степени перекрывается с многочисленными PAMPs, распознаваемыми млекопитающими. Так, например, у растений развивается защитная реакция на компоненты клеточной стенки грибов (хитин, глюкан, гликопротеины), бактериальный липополисахарид (ЛПС) и флагеллин [1]. Интересно, что у насекомых не развивается иммунный ответ на ЛПС [2], а защита от грамотрицательных бактерий основана у них на так называемом IMD-пути, запускаемом в ответ на специфические пептидогликаны клеточной стенки.

У растений есть два типа PRRs: 1) белки, имеющие внутриклеточный киназный домен — так называемые рецептор-подобные киназы (RLKs), и 2) белки, лишенные цитоплазматического домена, — рецептор-подобные белки (RLPs) (рисунок, табл. 1). Таким образом, RLKs растений напоминают TLRs млекопитающих по наличию у них внеклеточного лейцин-богатого домена, участвующего в распознавании PAMPs, и по механизму проведения внутриклеточного сигнала — за счет активации серин/треониновых киназ [3]. Однако, в отличие от RLKs, TLRs не обладают серин/треониновой киназной активностью и лишь через адаптерные белки передают сигнал на активацию киназ, действующих на более поздних стадиях сигнального каскада. Интересно, что в геноме *Arabidopsis* присутствует 233 гена LRR-RLKs и 110 генов LRR-RLPs, однако продукты многих из этих генов вовлечены в процессы, происходящие на различных стадиях развития растений, а не



Доменная структура иммунных рецепторов растений. У растений присутствуют как трансмембранные (RLPs и RLKs), так и цитоплазматические иммунные рецепторы (CC-NB-LRRs и TIR-NB-LRRs) (подробнее см. в тексте). Иммунные рецепторы растений содержат лейцин-богатый домен, вовлеченный в распознавание патогена, и различные комбинации других доменов. Лейцин-богатый домен содержит различное число LRRs, участвует в распознавании молекулярных паттернов патогена. Домен типа “суперспираль” (CC – coiled-coil domain) может участвовать в непрямом распознавании патогена благодаря взаимодействию с модифицированными в результате действия патогена собственными растительными белками. TIR – домен, гомологичный Toll и рецептору IL-1, – может участвовать в непрямом распознавании патогена благодаря взаимодействию с модифицированными патогеном растительными белками, а также в гомотипической олигомеризации. NB – нуклеотид-связывающий домен – участвует в связывании и гидролизе АТФ, что приводит к конформационным изменениям в молекуле рецептора и последующей активации сигнального каскада. TM – трансмембранный домен. KIN – киназный домен – участвует в передаче сигнала от рецептора.

связанные с иммунным ответом. В этом случае прослеживается аналогия с TLRs дрозофилы, большинство из которых (кроме собственно Toll) участвует не в иммунном распознавании, а связано с развитием организма насекомого [2].

Связывание PAMPs с рецепторами приводит к индукции базальной защитной реакции, обозначаемой как PTI (PAMPs-triggered immunity) [4, 5]. Эволюция патогенов, направленная на преодоление PTI, привела к появлению эффекторных белков, подавляющих эту первичную защитную реакцию. В свою очередь эволюция защитной системы растений связана с появлением белков-рецепторов, участвующих в специфическом распознавании эффекторных белков патогенов и индуцирующих развитие “вторичного” ответа (ETI, effector-triggered immunity). Такие рецепторы называются R-белки (R-proteins, resistance proteins). Большая часть R-белков структурно относится к семейству белков, содержащих нуклеотид-связывающий домен и лейцин-богатый домен (NB-LRRs).

Итак, для обеспечения второй линии защиты от патогенов, которым удалось преодолеть первую ли-

нию защиты, основанную на активации PRRs, у растений существуют уникальные внутриклеточные цитоплазматические рецепторы NB-LRRs (рисунков). В отличие от PRRs, распознающих PAMPs, NB-LRRs взаимодействуют со специфичными для определенных патогенов эффекторными белками. В системе NB-LRRs реализуется взаимодействие “ген на ген” [6]; это значит, что каждому рецептору растения соответствует распознаваемый им фактор авирулентности патогена. В связи с тем, что у растений нет соматической перестройки генов иммунных рецепторов, аналогичной той, которая происходит в лимфоцитах животных, число генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета, в геномах растений значительно выше, чем число генов PRRs в геномах млекопитающих.

Активация NB-LRRs в большей части случаев приводит к развитию программируемой смерти клеток в локальном участке растения, что, как считается, физически изолирует инфекцию и предотвращает дальнейшее распространение патогена. NB-LRRs содержат C-концевой лейцин-богатый домен (LRR-domain), центральный нуклеотид-связывающий до-

Таблица 2. Домены, входящие в состав различных семейств рецепторов врожденного иммунитета дрозофилы, животных и растений

	Семейство рецепторов	Домен		Лейцин-богатый	TM ^a	KIN ^b	NB	TIR	CC	Доп. ^c
Растения	RLPs			+	+	—	—	—	—	—
	RLKs			+	+	+	—	—	—	—
Дрозофила	NB-LRRs		TIR-	+	—	—	+	+	—	+
			CC-	+	—	—	+	—	+	+
Животные	Toll			+	+	—	—	+	—	—
	TLRs			+	+	—	—	+	—	—
	NLRs			+	—	—	+	—	—	+

^a Трансмембранный домен.

^b Цитоплазматический киназный домен.

^c Дополнительные домены у некоторых представителей семейства.

мен (NB-domain) и вариабельный N-концевой домен (рисунок, табл. 2). На N-конце CC-NB-LRRs находится предсказанный на основании первичной структуры домен типа “суперспираль” (coiled-coil, CC), а у TIR-NB-LRRs — домен, гомологичный Toll и рецептору IL-1 (TIR-domain). Домен NB входит в состав более крупной структурной составляющей, обозначаемой как NB-ARC-домен, что связано с присутствием этой же структуры в белках Araf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), R-белках и CED-4 (Caenorhabditis elegans death-4 protein) [7]. Похожие по структуре домены, называемые NACHT или NOD [8], присутствуют и в цитоплазматических белках животных (табл. 2). Многие из этих белков служат сенсорами каких-то внутриклеточных нарушений, например, присутствия соединений, характерных для бактерий (NACHT-LRRs), или выхода цитохрома C из митохондрий (Araf-1). Как и в R-белках, NB-ARC/NACHT/NOD-домены в белках животных присоединены к повторяющейся структуре, состоящей из лейцин-богатых или WD40-повторов [9]. Несмотря на то что белки, имеющие в своем составе NB-ARC/NACHT/NOD-домены, структурно схожи между собой, считается, что они возникли независимо [10]. А распространенность (как в животном, так и в растительном царстве) белковых структур, в состав которых входит NB-домен, присоединенный к домену, состоящему из повторов, видимо, указывает на физико-химическую “пригодность” такой структуры для осуществления двух сопряженных процессов: узнавания лиганда и дальнейшей передачи сигнала [11].

R-белки, принадлежащие к TIR-NB-LRR (TNL) и CC-NB-LRR (CNL) семействам, отличаются не только структурами N-концевых частей, но и определенными пептидными мотивами в составе NB-доменов.

Члены CNL-группы можно разделить на подгруппы — в зависимости от присутствия дополнительных доменов на N-конце (рисунок) [12]. Так, у некоторых CNL-белков на N-конце имеется домен, характерный для представителей семейства *Solanaceae* и в связи с этим получивший название SD (solanaceous domain) [13]. В состав других CNL-белков (например, некоторых NB-LRRs риса и тополя) входит BED-домен, относящийся к семейству цинковых пальцев (рисунок) [14]. В некоторых R-белках C-концы LRRs фланкированы аминокислотными последовательностями, которые не относятся ни к одному из известных доменов.

Таким образом, растительные NB-LRRs имеют структурные черты, характерные, с одной стороны, для TLRs млекопитающих, а с другой стороны, для NLRs (рисунок, табл. 2). В отличие от аналогичных рецепторов животных NB-LRRs распознают не PAMPs, а специфичные для патогенов эффекторных белки, тем самым выполняя функцию, схожую с таковой для адаптивной иммунной системы млекопитающих. Таким образом, LRRs — это структурная основа не только первичного, но и вторичного иммунного ответа растений, что свидетельствует об удивительной способности этих белковых модулей взаимодействовать с разнообразными по химической структуре лигандами.

Вышесказанное предполагает, что в геноме растений закодировано большое количество NB-LRRs, обеспечивающих специфичную защиту от патогенов. Так, в геноме *Arabidopsis* закодировано 149 предсказанных по структуре NB-LRRs, а в геномах риса и тополя — около 400 [15, 16]. NB-LRRs — одни из самых крупных растительных белков, по количеству аминокислотных остатков варьирующих от 890 до 1900 [17]. Изучение функциональных особенностей многих из них только начинается.

Интересно, что, как и в случае иммунных рецепторов круглоротых (также основанных на LRRs), у NB-LRRs иногда появляется новая специфичность, что может быть обусловлено, в частности, делецией или дубликацией целых LRRs. Так, в одном из локусов латука, содержащем кодирующие NB-LRRs гены, число LRRs варьировало от 40 до 47, причиной чего может быть неравный кроссинговер [18]. Другой движущей силой дивергенции NB-LRRs может быть генная конверсия между разными аллелями NB-LRRs [19]. Кроме того, внедрение мобильных генетических элементов в LRR-область также может увеличивать разнообразие генов устойчивости [20].

В плане механизмов действия одни NB-LRRs взаимодействуют с эффектором непосредственно, другие же — не напрямую, а в комплексе с адаптерным белком [21]. В случае прямого взаимодействия с эффектором связывается именно NB-LRR — аналогично тому, как это происходит в случае TLRs. В случае непрямого узнавания NB-LRR связывается с собственным растительным белком, который изменился из-за связывания или действия на него эффекторного белка патогена; т. е. узнавание происходит по принципу “измененного своего”, концептуально аналогичного иммунному распознаванию с участием T-клеточного рецептора (TCR-пептид-MHC) у млекопитающих. Интересно, что во многих случаях не прямое узнавание опосредуется не за счет LRR-домена, а N-концевым участком TIR- или CC-доме-на [22].

ПРИМЕРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ PRRs

Наиболее убедительно охарактеризованный PAMP растений — бактериальный флагеллин. Большинство растений распознают консервативный 22-аминокислотный участок, flg22, находящийся в N-концевой части молекулы [23]. PRR, ответственный за распознавание флагеллина у *Arabidopsis thaliana*, — это рецептор-подобная киназа с внеклеточным лейцин-богатым доменом (LRR-RLK), получившая название FLS2 (FLAGELLIN-SENSING 2) [24]. За счет лейцин-богатого домена FLS2 непосредственно связывается с flg22, после чего интернализуется и, предположительно, тем самым запускает регуляторный каскад. Функциональные ортологи FLS2 идентифицированы у растений семейства *Solanaceae*, в том числе у томата [25].

Интересно, что растения вида *Arabidopsis*, несущие мутации в FLS2, чувствительны к инфицированию штаммами *Pseudomonas syringae*, которые не поражают растения дикого типа [26]. Кроме того, существуют патогены, имеющие мутации в эпитопе flg22, что позволяет им избегать связывания с FLS2, что также свидетельствует о важности распознава-

ния флагеллина для защиты растений от бактерий [27]. Напомним, что у млекопитающих флагеллин распознается специализированным рецептором TLR5, причем FLS2 и TLR5 узнают разные домены флагеллина: flg22 не активирует TLR5 и, кроме того, мутации в участке flg22 не влияют на TLR-5-зависимую продукцию IL-8 линиями эпителиальных клеток человека, инкубированных с мутантным флагеллином [28]. Вероятно, системы распознавания флагеллина у растений и животных возникли независимо — как результат конвергентной эволюции.

Еще один из бактериальных PAMPs, распознаваемых *Arabidopsis* и другими растениями семейства *Brassicaceae*, — фактор элонгации Tu (EF-Tu) [29]. Высококонсервативный N-ацетилированный 18-аминокислотный пептид EF-Tu — elf18 — индуцирует такой же защитный ответ, как и полноразмерный белок. Паттерн-распознающий рецептор для EF-Tu — EFR (EF-Tu receptor) — тоже рецептор-подобная киназа. Интересно, что экспрессия EFR из *Arabidopsis thaliana* в растениях *N. benthamiana*, в норме нечувствительных к EF-Tu, приводит к возникновению способности связывать elf18 и развитию защитной реакции у этих растений, что указывает на то, что компоненты сигнального пути, находящиеся ниже уровня PRRs, консервативны между растениями различных семейств.

Следует отметить, что распознавание PAMPs не всегда ведет к развитию защитной реакции у растений. Это можно объяснить тем, что некоторые растительные патогены способны подавлять развитие иммунного ответа на PAMPs или избегать распознавания. Так, например, рецептор-подобная киназа *Arabidopsis* CERK1, распознающая хитин, служит мишенью для бактериального эффекторного белка AvrPtoB, который убиквитинирует киназный домен CERK1, что служит сигналом к деградации CERK1 и предотвращает развитие защитной реакции — PTI. Таким образом, распознавание молекулярного паттерна может происходить, но защитная реакция, при наличии у патогена соответствующего эффекторного белка, может и не развиваться.

В качестве примера RLPs, имеющих лишь короткий цитоплазматический участок, но вовлеченных в обеспечение защитной реакции, можно привести два паттерн-распознающих рецептора томата, участвующих в связывании грибковых PAMPs — LeEIX1 и LeEIX2 [30]. Оба эти рецептора участвуют в узнавании ксиланазы, индуцирующей выработку этилена (EIX, ethylene-inducing xylanase). Механизм передачи сигнала пока не известен — предположительно RLPs образуют гетерокомплексы с RLKs.

ЛЕЙЦИН-БОГАТЫЕ ДОМЕНЫ В ИММУННЫХ РЕЦЕПТОРАХ РАСТЕНИЙ

Большая часть аминокислотной последовательности рецептор-подобных белков, RLPs, приходится на лейцин-богатый домен, состоящий из переменного количества повторов, первичная структура которых удовлетворяет 24-звенной аминокислотной консенсусной последовательности: LxxLxxLxLxxNxLxGxIPxxLGx [31]. В большинстве RLPs внеклеточный лейцин-богатый домен прерван спейсерным участком, разделяющим домен на три части: первая представлена 21–28 гипервариабельными LRRs, вторая – собственно спейсером, а третья – 3–4-мя относительно консервативными повторами [25]. У рецептор-подобных киназ, RLKs, не наблюдается деления лейцин-богатого домена на три субдомена [32].

Структура внутриклеточных лейцин-богатых доменов NB-LRRs отличается от структуры внеклеточных лейцин-богатых доменов RLKs и RLPs: в NB-LRRs они ограничены всего 14-членной консенсусной последовательностью LxxLxxLxLxxC/Nxx, входящей в состав 24–28-звенных повторов [31], не являющихся совершенными. В среднем в лейцин-богатом домене NB-LRRs *Arabidopsis* содержится 14 LRRs [16]. Среди LRRs растительных R-рецепторов можно выделить 2 класса: с высокой генетической разнородностью и с невысокой степенью вариабельности. Считается, что такое разделение может отражать различие между прямым и непрямым механизмами распознавания эффекторных белков патогенов [21].

Способность к передаче сигнала для многих NB-LRRs зависит от их взаимодействия с шаперонами, связывающимися с лейцин-богатыми доменами NB-LRRs, что, предположительно, обеспечивает правильный фолдинг последних [33]. Взаимодействующие с LRRs шапероны представлены как белками теплового шока (в том числе HSP90 и HSP17), так и кошаперонами (например, белковая фосфатаза 5, SGT1 и RAR1) [34–36]. Интересно, что в NB-LRRs лейцин-богатые домены взаимодействуют с N-концевым участком молекулы и эти внутримолекулярные взаимодействия, вероятно, обеспечивают регуляцию активности NB-LRRs и тем самым ETI [37].

N-КОНЦЕВАЯ ЧАСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ NB-LRRs

Белки растения, являющиеся потенциальными мишенями эффекторных белков патогена, могут взаимодействовать не только с LRR-доменами NB-LRRs, но в некоторых случаях и с N-концевыми доменами (т.е. CC- или TIR-доменами) этих рецепторов. Таким образом, CC- или TIR-домены NB-

LRRs, как и LRR-домены, в ряде случаев осуществляют “мониторинг” целостности собственных растительных белков. Так, с N-концевыми доменами NB-LRRs взаимодействуют некоторые растительные белки, которые подвергаются расщеплению (например, RIN4 и PBS-1), фосфорилированию (RIN4) или другим модификациям под действием эффекторных белков патогенов (AvrRpm1/AvrB и AvrRpt2 в случае RIN4, и AvrPphB в случае PBS-1) [38, 39]. Считается, что модификация этих растительных белков, целостность которых “отслеживается” NB-LRR-рецепторами, вызывает активацию ETI за счет передачи сигнала NB-LRRs. Кроме того, N-концевые домены, вероятно, вовлечены в дальнейшую передачу сигнала.

Остается неизвестным, участвуют ли в распознавании эффекторных белков патогенов N-концевые или другие домены тех NB-LRRs, которые непосредственно связываются с этими белками [11]. Показано, что N-концевые TIR-домены могут участвовать в TIR-TIR гомотипических взаимодействиях, приводящих к олигомеризации TIR-NB-LRRs после активации [40].

Как упоминалось выше, в состав некоторых NB-LRRs рецепторов входит дополнительный N-концевой BED-домен, относящийся к семейству цинковых пальцев – доменов, участвующих во взаимодействиях с ДНК [14]. Помимо NB-LRRs этот домен также встречается в белках дрозофилы BEAF и DREF, выполняющих роль регуляторов транскрипции, и в некоторых ДНК-связывающих белках из томата. В связи с этим представляется возможным непосредственное участие NB-LRRs, имеющих BED-домен, в регуляции транскрипции. Так, обнаружено, что при активации защитной реакции некоторые NB-LRRs, как содержащие, так и не содержащие BED-домен, транслоцируются из цитоплазмы в ядро и ассоциируют с другими транскрипционными факторами.

НУКЛЕОТИД-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН NB-LRRs

Домены NB-ARC вовлечены в связывание нуклеотидов, которое обеспечивается присутствием в этих доменах нескольких консервативных мотивов, характерных для определенного семейства АТФаз (P-loop ATPases). Основываясь на наличии этих мотивов, NB-LRRs и многие другие белки можно классифицировать как STAND-белки (signal transduction ATPases with numerous domains, передающие сигнал многодоменные АТФазы) [14]. STAND-белки представляют собой молекулы, которые содержат ДНК-и/или белок-связывающие домены и состоящие из повторов структуры, благодаря чему в одной и той

же молекуле совмещены две возможности: служить либо адаптером, либо платформой для сборки многокомпонентных комплексов, способных генерировать внутриклеточный сигнал. АТФ-разный домен STAND-белков передает конформационные изменения, вызванные обменом или гидролизом нуклеотидов, на другие домены молекулы, тем самым обеспечивая генерацию сигнала. Показано, что NB-ARC-домены R-белков I-2, Mi-1.2 и N, и в самом деле, обладают АТФ-разной активностью [41]. Гидролиз АТФ, вероятно, сопряжен с конформационными изменениями NB-ARC-доменов, так как после него значительно возрастает аффинность белка к ADP [42].

Развитие ETI часто приводит к гибели клеток, поэтому индуцирующая это развитие передача сигнала через NB-LRRs строго регулируется. Один из механизмов такой регуляции — аутоингибирование NB-LRRs, что обеспечивается внутримолекулярными взаимодействиями между различными доменами NB-LRRs. Удаление LRR-доменов вызывает слабую аутоактивацию некоторых NB-LRRs, что указывает на участие LRR-доменов в негативной регуляции активности рецепторов [43].

Согласно модели, предложенной для CC-NB-LRRs, прямое или опосредованное распознавание эффекторного белка патогена приводит к тому, что нарушаются внутримолекулярные взаимодействия между LRR- и NB-ARC-доменами. В результате в NB-ARC происходит замена АТФ на ADP, что вызывает конформационные изменения NB-ARC и N-концевого доменов и, предположительно, дальнейшую передачу сигнала [44]. Таким образом, внутримолекулярные взаимодействия в NB-LRRs могут предотвращать передачу сигнала, индуцирующего развитие иммунного ответа.

ПОСЛЕДСТВИЯ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У РАСТЕНИЙ

Распознавание патогена растениями вызывает комплексные изменения в клетке, в частности, активацию MAPKs (mitogen-activated protein kinases), изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме клетки, продукцию активных форм кислорода и оксида азота. И у животных, и у растений большая часть этих процессов связана как с передачей сигнала после распознавания PAMPs, так и с эффекторными функциями.

Так, кальциевые каналы, расположенные в мембране растительной клетки, активируются после распознавания элиситора PER-13 (элиситорами называют вещества, индуцирующие развитие иммунной реакции у растений; молекулярные паттерны патогенов также относятся к элиситорам), характер-

ного для оомицетов [45], а также других PAMPs, в частности, из *Cladosporium fulvum*. Вызванное распознаванием PAMPs повышение внеклеточного уровня кальция приводит к временному повышению его цитоплазматического уровня [46]. В системе врожденного иммунитета животных повышение цитоплазматического уровня кальция также является одним из ключевых сигнальных событий, регулирующих развитие у них защитной реакции. Основное различие между кальций-зависимой передачей сигнала у растений и животных заключается в том, что в животных клетках повышение цитоплазматического уровня кальция происходит, в первую очередь, за счет внутриклеточных источников (эндоплазматического ретикулума) [47], а у растений — опосредуется притоком ионов кальция из внеклеточного пространства.

Продуцирование активных форм кислорода на первых стадиях развития врожденного иммунного ответа как у растений, так и у животных — необходимое условие полноценного протекания защитной реакции [48]. В растительной клетке этот процесс напрямую связан с повышением концентрации кальция в цитоплазме и аналогичен окислительно-му взрыву у фагоцитов, который катализирует комплекс NADPH-оксидазы [49]. У растений имеется семейство генов, аминокислотная последовательность продуктов экспрессии которых обладает значительной гомологией с каталитической субъединицей комплекса NADPH-оксидазы, gp91 [50]. Инактивация гена, кодирующего NADPH-оксидазу табака, NtRbohD, локализованную в плазматической мембране, нарушает реакцию окислительного взрыва в ответ на криптогеин — элиситор из *Phytophthora cryptogea* [51]. Интересно, что внешние условия, такие как изменения температуры, могут влиять на протекание защитной реакции у растений [52].

Кроме того, фактор, необходимый для активации врожденного иммунного ответа, как у животных, так и у растений, — продуцирование оксида азота (NO) [53]. У растений отсутствует гомолог человеческой NO-синтазы, но ингибиторы NO-синтазы человека блокируют вызванную инфекцией продукцию NO, клеточную смерть и активацию защитных генов у растений [54]. Выделенная из табака растительная NO-синтаза активируется в ответ на инфекцию [55] и, несмотря на отсутствие гомологии с белками, выполняющими такие же функции у животных, ее требования к кофакторам, субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам схожи с NO-синтазами животных.

Еще одно сходство между механизмами системы врожденного иммунитета у животных и растений — это активация MAPKs как ключевого компонента

при индукции защитной реакции в ответ на патогены [56]. Как у растений, так и у животных распознавание PAMPs ведет к активации каскада MAPKs. В обоих случаях функционирование MAPKs необходимо для развития полноценного врожденного иммунного ответа. Распознавание эффекторных белков патогена вызывает активацию множества сигнальных путей, что приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция, активации MAPK-каскадов, окислительному взрыву и в итоге — к развитию гиперчувствительного ответа. В геноме *Arabidopsis thaliana* закодировано 20 MAPKs, находящихся под регуляторным контролем приблизительно 10 MAPKKs (киназ митоген-активируемых протеинкиназ), которые в свою очередь активируются 60 MAPKKKs [57]. В ответ на различные PAMPs грибов и бактерий, а также на целые фитопатогенные организмы происходит временная активация энзиматической активности MAPKs на посттрансляционном уровне. В частности, развитие инфекции у *Arabidopsis* приводит к активации MAPK3 и MAPK6. В клетках петрушки после стимуляции PAMPs происходит активация MAPKs и последующая транслокация, по крайней мере, одной из киназ MAPKs в ядро, где она участвует в независимой от окислительного взрыва индукции экспрессии генов защитного ответа [58]. Наиболее убедительно значимость активации MAPKs для иммунной реакции у растений показана при вирус-индуцированном подавлении активности генов — ортологов *MAPK3* и *MAPK6 Arabidopsis* — у растения *Nicotiana benthamiana*, в результате чего оно становится более восприимчивым к патогенной бактерии *Pseudomonas cichorii* [59].

Взаимодействие молекулярных паттернов патогенов с RLKs приводит к активации MAPKs, что, в свою очередь, вызывает активацию транскрипционных факторов семейства WRKY, индуцирующих экспрессию защитных генов. В результате происходит окислительный взрыв, повышается уровень внутриклеточного кальция и развивается гиперчувствительный ответ. Интересно, что некоторые NB-LRRs и сами содержат домен WRKY в качестве структурной составляющей (см. рисунок) и, предполагается, могут действовать как транскрипционные факторы.

В *Arabidopsis* NBS-LRRs активируют, по крайней мере, три независимых сигнальных пути. У TIR-NB-LRRs и CC-NB-LRRs механизмы проведения сигнала различны. Так, TIR-NB-LRRs проводят сигнал через белок EDS1 (enhanced disease susceptibility), а CC-NB-LRRs — через NDR1 (non-race specific disease resistance), хотя такое разделение не абсолютно. Отдельный путь проведения сигнала, не зависящий ни от EDS1, ни от NDR1, у *Arabidopsis* активируется

двумя CC-NB-LRRs: RPP8 и RPP13. Последние этапы сигнальных каскадов, активируемых различными NBS-LRRs, обеспечиваются действием небольших сигнальных молекул, таких как салициловая и жасмоновая кислоты, этилен и NO [60].

Стоит добавить, что у растений присутствуют и другие общие с животными механизмы защиты, например, РНК сайленсинг при вирусной инфекции [61].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы, обеспечивающие врожденный ответ на патогены, у растений и животных схожи по ряду важных параметров. Так, защитную реакцию индуцируют такие элементы сигнальных каскадов, как изменение уровня кальция, активные формы кислорода, NO и MAPKs. Да и в основе распознавания патогенов животными и растениями лежат сходные структурные принципы, используются те же, проверенные в эволюции, белковые домены. С другой стороны, в животной клетке инструментарий, предназначенный для защиты организма, гораздо разнообразнее (в плане распознавания патогенов) и, в совокупности с системой подвижных иммуноцитов и специализированными органами для развития адаптивного иммунного ответа, гораздо надежнее, чем в растительных клетках.

Работа выполнена при поддержке программы Президента Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”, гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (соглашение № 02.120.11.8796-НШ от 28.06.2010), программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (договор № 16.740.11.0005 от 01.09.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nurnberger T., Brunner F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **5**, 318–324.
2. Imler J., Ferrandon D., Royet J., Reichhart J.M., Hetru C., Hoffmann J.A. 2004. Toll-dependent and Toll-independent immune responses in *Drosophila*. *J. Endotoxin. Res.* **10**, 241–246.
3. Pålsson-McDermott E.M., O’Neill L.A.J. 2007. Building an immune system from nine domains. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1437–1444.
4. Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.* **444**, 323–329.
5. Тарчевский И.А. 2001. Патоген-индуцируемые белки растений. *Прикл. микробиология и биохимия.* **37**, 1–15.

6. van der Biezen E.A., Jones J.D. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454–456.
7. van der Biezen E.A., Jones J.D. 1998. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr. Biol.* **8**, R226–227.
8. Koonin E.V., Aravind L. 2000. The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 223–224.
9. Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. 2004. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* **343**, 1–28.
10. Ausubel F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* **6**, 973–979.
11. Tameling W., Takken F. 2008. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 243–255.
12. Pan Q., Wendel J., Fluhr R. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* **50**, 203–213.
13. Mucyn T.S., Clemente A., Andriotis V.M., Balmuth A.L., Oldroyd G.E., Staskawicz B.J., Rathjen J.P. 2006. The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase *in vivo* to regulate specific plant immunity. *Plant Cell.* **18**, 2792–2806.
14. Aravind L. 2000. The BED finger, a novel DNA-binding domain in chromatin-boundary-element-binding proteins and transposases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 421–423.
15. Monosi B., Wisser R.J., Pennill L., Hulbert S.H. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1434–1447.
16. Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H., Michelmore R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* **15**, 809–834.
17. McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* **7**, 212.
18. Kuang H., Woo S., Meyers B.C., Nevo E., Michelmore R.W. 2004. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell.* **16**, 2870–2894.
19. Chin D.B., Arroyo-Garcia R., Ochoa O.E., Kesseli R.V., Lavelle D.O., Michelmore R.W. 2001. Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in Lettuce (*Lactuca sativa*). *Genetics.* **157**, 831–849.
20. Дьяков Ю., Багирова С. 2001. Что общего в иммунитете растений и животных. *Природа.* **11**, 5–14.
21. Ellis J.G., Dodds P.N., Lawrence G.J. 2007. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 289–306.
22. Caplan J., Padmanabhan M., Dinesh-Kumar S.P. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell. Host. Microbe.* **3**, 126–135.
23. Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265–276.
24. Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. 2006. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell.* **18**, 465–476.
25. Robatzek S., Bittel P., Chinchilla D., Köchner P., Felix G., Shiu S.H., Boller T. 2007. Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Mol. Biol.* **64**, 539–547.
26. Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G., Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature.* **428**, 764–767.
27. Sun W., Dunning F.M., Pfund C., Weingarten R., Bent A.F. 2006. Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell.* **18**, 764–779.
28. Donnelly M.A., Steiner T.S. 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chemistry.* **277**, 40456–40461.
29. Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell.* **16**, 3496–3507.
30. Ron M., Avni A. 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell.* **16**, 1604–1615.
31. Kajava A.V. 1998. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**, 519–527.
32. Sun X., Cao Y., Wang S. 2006. Point mutations with positive selection were a major force during the evolution of a receptor-kinase resistance gene family of rice. *Plant Physiol.* **140**, 998–1008.
33. Takahashi A., Casais C., Ichimura K., Shirasu K. 2003. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 11777–11782.
34. Liu Y., Burch-Smith T., Schiff M., Feng S., Dinesh-Kumar S.P. 2004. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* **279**, 2101–2108.
35. Hubert D.A., Tornero P., Belkhadir Y., Krishna P., Takahashi A., Shirasu K., Dangl J.L. 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.* **22**, 5679–5689.
36. de la Fuente van Bentem S., Vossen J.H., de Vries K.J., et al. 2005. Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *Plant J.* **43**, 284–298.

37. Leister R.T., Dahlbeck D., Day B., Li Y., Chesnokova O., Staskawicz B.J. 2005. Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. **17**, 1268–1278.
38. Shao F., Golstein C., Ade J., Stoutemyer M., Dixon J.E., Innes R.W. 2003. Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science*. **301**, 1230–1233.
39. Mackey D., Holt B.F., Wiig A., Dangl J.L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*. **108**, 743–754.
40. Mestre P., Baulcombe D.C. 2006. Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein. *Plant Cell*. **18**, 491–501.
41. Ueda H., Yamaguchi Y., Sano H. 2006. Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **61**, 31–45.
42. Tameling W.I., Vossen J.H., Albrecht M., Lengauer T., Berden J.A., Haring M.A., Cornelissen B.J., Takken F.L. 2006. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. *Plant Physiol.* **140**, 1233–1245.
43. Bendahmane A., Farnham G., Moffett P., Baulcombe D.C. 2002. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J.* **32**, 195–204.
44. Rairdan G., Moffett P. 2007. Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. *Microbes Infect.* **9**, 677–686.
45. Zimmermann S., Nürnberger T., Frachisse J.M., Wirtz W., Guern J., Hedrich R., Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 2751–2755.
46. Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*. **14**, 2627–2641.
47. Galione A., Churchill G.C. 2002. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium*. **32**, 343–354.
48. Nürnberger T., Scheel D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**, 372–379.
49. Blume B., Nürnberger T., Nass N., Scheel D. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*. **12**, 1425–1440.
50. Torres M.A., Onouchi H., Hamada S., Machida C., Hammond-Kosack K.E., Jones J.D. 1998. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J.* **14**, 365–370.
51. Simon-Plas F., Elmayan T., Blein J. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* **31**, 137–147.
52. Zhu Y., Qian W., Hua J. 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS Pathog.* **6**, e1000844.
53. Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 10328–10333.
54. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. **394**, 585–588.
55. Chandok M.R., Ytterberg A.J., van Wijk K.J., Klessig D.F. 2003. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*. **113**, 469–482.
56. Dong C., Davis R.J., Flavell R.A. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 55–72.
57. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**, 796–815.
58. Ligterink W., Kroj T., zur Nieden U., Hirt H., Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*. **276**, 2054–2057.
59. Sharma P.C., Ito A., Shimizu T., Terauchi R., Kamoun S., Saitoh H. 2003. Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Genet. Genomics*. **269**, 583–591.
60. Тарчевский И. 2002. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука.
61. Дорохов Ю.Л. 2007. “Умолкание” генов растений. *Молекуляр. биология*. **41**, 579–592.