

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

С.С. Сангаев¹, А.В. Кочетов^{1,2}, С.С. Ибрагимова¹, Б.А. Левенко³, В.К. Шумный^{1,2}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия,
e-mail: sangaevs@gmail.com;

³ Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

В экстраклеточном пространстве тканей растений содержится сложный комплекс белков, функции которых малоизучены. В обзоре рассмотрены современные представления о биологической роли экстраклеточных рибонуклеаз и, в частности, об их взаимосвязи с молекулярными механизмами защиты от фитопатогенов.

Ключевые слова: T₂ РНКазы, S-подобные РНКазы, стресс, фосфатное голодание, поранение, защита от патогенов.

Введение

Рибонуклеазы (РНКазы) – это фосфодиэстеразы, гидролизующие межнуклеотидную (фосфодиэфирную) связь в молекуле рибонуклеиновой кислоты (РНК). РНКазы, производящие в качестве первичного мономерного продукта 2',3'-циклические нуклеозидмонофосфаты, могут быть разделены на 3 семейства: РНКазы А, РНКазы T₁ и РНКазы T₂ (Deshpande, Shankar, 2002). Распространение РНКаз семейства А ограничено позвоночными животными, РНКазы семейства T₁ встречаются у бактерий и грибов. В отличие от них РНКазы семейства T₂ представлены у очень широкого спектра организмов, включая вирусы, бактерии, грибы, растения и животных. Такое широкое распространение РНКаз T₂ указывает на их эволюционно древнее происхождение и важную биологическую роль, однако к настоящему моменту накоплено мало данных, описывающих функции этого семейства РНКаз (Hillwig *et al.*, 2008; MacIntosh *et al.*, 2010).

В семействе РНКаз T₂ растений выделяют S- и S-подобные РНКазы. S-РНКазы относительно хорошо изучены, поскольку их функции связаны с механизмами гаметофитной самоне-

совместимости. S-подобные РНКазы растений не задействованы в генерации гаметофитной самонесовместимости и обнаружены как у самосовместимых, так и у самонесовместимых видов растений. Обнаруженные у широкого круга видов растений S-подобные РНКазы представляют собой удобный объект для изучения биологических функций РНКаз семейства T₂. В этом обзоре рассмотрена имеющаяся в настоящее время информация об экстраклеточных S-подобных рибонуклеазах и их возможной роли в контроле физиологических функций высших растений.

Экстраклеточные рибонуклеазы растений

S-РНКазы были первыми секреторными РНК-азами, открытыми у растений. Поиск гомологичных белков привел к открытию S-подобных РНКаз (Taylor, Green, 1991). Как и S-РНКазы, многие из них являются экстраклеточными. При этом несмотря на общее структурное сходство, S- и S-подобные РНКазы образуют 2 подсемейства в семействе T₂ РНКаз (Green, 1994).

Гаметофитная самонесовместимость, в которой задействованы S-РНКазы, является ярким примером цитотоксичного действия рибонук-

леаз и описана у растений семейств Rosaceae, Scrophulariaceae и Solanaceae. Самонесовместимость обычно контролируется одним мультиаллельным S-локусом. При гаметофитном типе самонесовместимости пыльца проявляет гаплоидный фенотип своего S-аллеля. При этом пыльца, несущая S-аллель, генетически идентичный S-аллелю пестика (несовместимая), распознается как «своя», и ее прорастание в пестике селективно подавляется.

S-РНказы являются продуктами S-локуса в пестике и секретируются в межклеточный матрикс. Отторжение пыльцы опосредуется РНказной активностью: S-РНказы могут проникать в цитоплазму пыльцевых трубок и ингибировать процесс трансляции. Показано, что в ходе реализации самонесовместимости происходит аллель-специфичная деградация рРНК пыльцевых зерен (Трифонова и др., 2000).

По своим биохимическим свойствам S-подобные РНказы – это неспецифические эндорибонуклеазы, обладающие низкой чувствительностью к ЭДТА и активные в кислой среде. Гены S-подобных РНказ имеются в геномах всех видов растений, исследованных на их наличие, и, по-видимому, у каждого вида представлены небольшим семейством (Taylor, Green, 1991; Dodds *et al.*, 1996; Ye, Droste, 1996; Van Nerum *et al.*, 2000; LeBrasseur *et al.*, 2002; MacIntosh *et al.*, 2010). Например, геном арабидопсиса содержит как минимум 5 генов с высокой степенью близости к РНказам семейства T₂ (LeBrasseur *et al.*, 2002). При этом РНказная активность была продемонстрирована для белковых продуктов трех из них (RNS1, RNS2, RNS3) (Bariola *et al.*, 1994). В геноме риса обнаружено 8 генов РНказ семейства T₂ (MacIntosh *et al.*, 2010).

Как правило, в нормальных условиях гены экстраклеточных S-подобных РНказ не характеризуются конститутивной экспрессией в листьях растений (Bariola *et al.*, 1994; Ye, Droste, 1996; Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998). Некоторые из них экспрессируются на ранних стадиях развития растения (Rogers S.W., Rogers J.C., 1999; Hillwig *et al.*, 2008; Hillwig *et al.*, 2009). В то же время для многих генов экстраклеточных S-подобных РНказ так же, как и для генов S-РНказ, характерна конститутивная экспрессия в цветках (Bariola *et al.*, 1994; Dodds *et al.*, 1996; Ma, Oliveira, 2000; Van Nerum *et al.*, 2000). Индукция

экспрессии генов экстраклеточных S-подобных РНказ в надземных частях растений обнаружена при нехватке неорганического фосфата (Nürnbergger *et al.*, 1990; Bariola *et al.*, 1994; Ma, Oliveira, 2000) во время старения (Bariola *et al.*, 1994; Lers *et al.*, 1998) в ответ на поражение патогенами (Galiana *et al.*, 1997; Hugot *et al.*, 2002; Ohno, Ehara, 2005), а также в ответ на поранение тканей (Ye, Droste, 1996; Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998; LeBrasseur *et al.*, 2002).

К числу наиболее исследованных генов, кодирующих ферменты этого класса, относятся *RNS1 Arabidopsis thaliana* и *LE Lycopersicon esculentum*. *RNS1* в нормальных условиях экспрессируется в цветках. В вегетативных органах активности этого гена не наблюдается, однако недостаток неорганического фосфата и поранение индуцируют его экспрессию (Bariola *et al.*, 1994; LeBrasseur *et al.*, 2002). Кроме того, некоторый уровень экспрессии *RNS1* наблюдается при старении листьев (Bariola *et al.*, 1994).

Экспрессия гена *LE* у взрослых растений томатов в нормальных условиях не детектируется, однако наблюдается в листьях на поздней стадии старения, причем максимальный уровень экспрессии РНказы *LE* наблюдается в полностью пожелтевших листьях (Lers *et al.*, 1998). В экспериментах транскрипционная активность промотора гена *LE* зафиксирована в развивающихся сосудах флоэмы и в зоне растяжения корней у 10-дневных проростков томатов. Индукция экспрессии наблюдается при нехватке неорганического фосфата и в ответ на поранение, причем поранением *LE* индуцируется в сосудах флоэмы и в клетках паренхимы (Nürnbergger *et al.*, 1990; Köck *et al.*, 2004). Этот белок, по-видимому, имеет двойную локализацию: вакуолярную и экстраклеточную (Köck *et al.*, 1995).

Функциональная роль экстраклеточных S-подобных РНказ, индуцируемых при фосфатном голодании и в ходе старения

Доступность фосфатов – один из факторов, лимитирующих рост и продуктивность растений, так как неорганический фосфат играет важную роль в первичном метаболизме. Индукция S-подобных РНказ в условиях недостатка

неорганического фосфата указывает на то, что активность этих ферментов может составлять один из компонентов системного ответа, обеспечивающего адаптацию к фосфатному голоданию. При этом, по-видимому, экспрессия S-подобных РНКаз не является общим ответом на нехватку необходимых минеральных компонентов. Так, РНКазы RNS1 экспрессируются при недостатке фосфата, но не индуцируются в условиях нехватки азота или калия (Variola *et al.*, 1994). Предполагается, что функциональная роль этих РНКаз связана с извлечением фосфата из молекул РНК в апопласте и/или в ризосфере, а также с рециркуляцией фосфата из старых отмирающих частей растений (Dodds *et al.*, 1996; Raghothama, Karthikeyan, 2005).

Подобно RNS1 и LE экстраклеточная РНКазы NE *Nicotiana glauca* индуцируется при фосфатном голодании. Экспрессия этой РНКазы наблюдается в корнях, но не в листьях (Dodds *et al.*, 1996). В целом для белков, связанных с поглощением фосфата из почвы, характерна экспрессия в корнях. Например, трансмембранные белки-переносчики с высокой аффинностью к фосфатам экспрессируются преимущественно в корнях растений, и многие из них индуцируются при нехватке неорганического фосфата. При этом способность растения поглощать фосфаты коррелирует с уровнем экспрессии генов, кодирующих эти белки (Raghothama, Karthikeyan, 2005). Экстраклеточные кислые фосфатазы, индуцируемые в корнях при недостатке фосфата и обладающие широкой субстратной специфичностью, задействованы в гидролизе органических соединений, содержащих фосфатную группу (Raghothama, Karthikeyan, 2005). S-подобные РНКазы в качестве первичного мономерного продукта производят 2',3'-циклические нуклеозидмонофосфаты, которые затем гидролизуются с образованием 3'-нуклеозидмонофосфатов (Nürnberg *et al.*, 1990; Deshpande, Shankar, 2002). Образующиеся 3'-нуклеозидмонофосфаты могут служить субстратом для экстраклеточных фосфатаз. Однако анализ реакции гидролиза РНК РНКазой LE показал, что скорость дециклизации 2',3'-циклофосфатов гораздо ниже скорости их образования (Nürnberg *et al.*, 1990). Поиск фермента, способного катализировать дециклизацию 2',3'-циклофосфатов, привел к открытию

экстраклеточной 2',3'-циклофосфат-2'-диэстеразы. Показано, что этот фермент, как и РНКазы LE, индуцируется в культуре клеток томатов при недостатке фосфата и катализирует гидролиз 2',3'-циклических нуклеозидмонофосфатов до 3'-нуклеозидмонофосфатов. Описанная циклофосфодиэстераза, как и экстраклеточные РНКазы, нечувствительна к действию ЭДТА, активна в кислой среде и обладает широкой субстратной специфичностью (Abel *et al.*, 2000).

Данные по активности РНКазы LE, 2',3'-циклофосфат-2'-диэстеразы и других ферментов, индуцируемых при фосфатном голодании, позволили группе Абеля предложить модель высвобождения фосфата из молекул РНК. Согласно этой модели, экстраклеточные РНКазы гидролизуют экстраклеточную РНК до 2',3'-циклических нуклеозидмонофосфатов, которые, будучи субстратом экстраклеточных 2',3'-циклофосфат-2'-диэстераз, дециклизируются последними с образованием 3'-нуклеозидмонофосфатов. Экстраклеточные кислые фосфатазы, секретлируемые корнями, отщепляют фосфат от рибонуклеотида, а высокоаффинные белки-переносчики осуществляют транспорт высвобождаемого фосфата внутрь клеток.

Стоит отметить, что при выращивании в среде, содержащей в качестве единственного источника фосфата дрожжевую РНК (вместо KH_2PO_4), скорость роста клеток томатов не отличалась от скорости, наблюдаемой при росте в стандартной среде. При этом анализ состава среды на третий день роста клеток показал, что рибонуклеозиды, как и ожидалось, составляли основной продукт гидролиза РНК. Эти данные указывают на то, что в условиях нехватки неорганического фосфата экстраклеточные ферменты, осуществляющие гидролиз молекул РНК, важны для выживания клеток.

По-видимому, сходную роль играют РНКазы, индуцируемые при старении. Процесс старения характеризуется разрушением макромолекул и уменьшением фотосинтетической способности. При этом молекулы РНК становятся источником фосфата, который распределяется по растению. Предполагается, что экстраклеточные РНКазы вносят вклад в рециркуляцию клеточной РНК и фосфата (Трифопова и др., 2000).

Роль экстраклеточных рибонуклеаз при повреждении тканей

При поранении содержимое поврежденных клеток может выходить в апопласт. Поэтому индукция экстраклеточных РНКаз при поранении может способствовать переработке рибонуклеиновых кислот и высвобождению неорганического фосфата, которые в дальнейшем могут быть использованы другими клетками.

В то же время детальный анализ паттерна экспрессии гена *RNS1* арабидопсиса показал, что он индуцируется не только в месте поранения (локально), но и в неповрежденных удаленных тканях (системно). Локальная активность РНКазы детектируется через 3 часа после поранения и сохраняется как минимум двое суток, а системная активность *RNS1* наблюдается в промежутке между 6 и 12 часами после повреждения. Системная индукция *RNS1* в интактных тканях в ответ на поранение указывает на то, что функциональная роль этой РНКазы не ограничена процессами локальной рециркуляции рибонуклеиновых кислот и неорганического фосфата (LeBrasseur *et al.*, 2002). Среди генов арабидопсиса, экспрессия которых индуцируется поранением, ген *RNS1* характеризуется одним из наиболее высоких уровней экспрессии, причем его индукция не связана с жасмоновой кислотой и этиленом (Reymond *et al.*, 2000; LeBrasseur *et al.*, 2002). Показано, что в индукцию экспрессии *RNS1* при поранении вносит частичный вклад абсцизовая кислота (Hillwig *et al.*, 2008). Аналогичный контроль экспрессии был показан для гена *LE* (Lers *et al.*, 1998). Существует предположение, что РНКазы *RNS1* и *LE*, а также другие индуцируемые поранением экстраклеточные РНКазы могут играть роль в защите от патогенов (Ye, Droste, 1996; Galiana *et al.*, 1997; Lers *et al.*, 1998; LeBrasseur *et al.*, 2002; Ohno, Ehara, 2005).

Для большинства экстраклеточных S-подобных РНКаз в нормальных условиях характерна экспрессия в цветках. Цветки редко инфицируются патогенами, несмотря на то что органы цветка, богатые питательными веществами, могут представлять для патогенов привлекательный объект для атаки. Это наблюдение в совокупности с данными по высокому уровню РНКазной активности в тканях цветка поз-

волило предположить, что экспрессия генов S-подобных рибонуклеаз в цветках может быть связана с защитной функцией (Dodds *et al.*, 1996). Предположение о защитной роли S-подобных РНКаз находит подтверждение в том, что некоторые из них индуцируются в ответ на атаку патогенов.

Экстраклеточные белки растений, задействованные в механизмах защиты от патогенов

Считается, что компоненты апопласта играют ключевую роль во взаимодействиях растений с патогенами на первых стадиях инфекции. Распознавание патогена запускает защитный ответ, связанный, в основном, с индукцией синтеза и накоплением в апопласте антимикробных соединений и локальным укреплением клеточных стенок. Кроме того, во многих случаях запускается механизм запрограммированной гибели клеток (реакция сверхчувствительности). Этот механизм активной защиты, связанный с межклеточным пространством, подавляет жизнедеятельность бактериальных и грибных патогенов и ограничивает их распространение (Малиновский, 2009).

Экстраклеточные белки, индуцируемые при атаке патогенов, были впервые обнаружены у растений табака, проявляющих реакцию сверхчувствительности в ответ на инокуляцию вирусом табачной мозаики (ВТМ). Позднее была показана индукция этих белков в ответ на поражение грибами, вирусами и вироидами, а также в ответ на проникновение нематод и насекомых. Для обозначения этих белков был введен термин «PR-белки» (Pathogenesis-Related). Недавно был предложен более общий термин «индуцируемые белки, связанные с защитой» (Inducible defence-related proteins). Этим термином предложено называть белки, которые в основном не встречаются в здоровых тканях, но индуцируются при инфекции. В данном случае термин «связанный с защитой» подразумевает, что эти белки индуцируются в связи с защитным ответом, но не указывает на их функциональную роль в защите. Тем не менее такой паттерн экспрессии подразумевает, что их роль в формировании устойчивости весьма вероятна. К индуцируемым белкам, связанным с

защитой, относятся как уже известные PR-белки, так и другие, еще не классифицированные белки, соответствующие вышеупомянутому определению (Van Loon *et al.*, 2006).

В настоящее время PR-белки подразделяются на 17 семейств (от PR-1 до PR-17) (Van Loon *et al.*, 2006). Ряд PR-белков секретируется в апопласт, при этом многие из них являются гидролазами. Так, белки семейства PR-2 являются β -1,3-эндоглюканазами, а белки семейств PR-3, PR-4, PR-8 и PR-11 обладают эндохитиновой активностью. Члены семейств PR-7, PR-8, PR-9 и PR-10 проявляют протеиназную, лизоцимную, пероксидазную и рибонуклеазную активности соответственно. Белки семейства PR-6 – ингибиторы протеиназ. Активность других PR-белков связана с увеличением проницаемости мембран (семейства PR-5, PR-12, PR-13, PR-14), а также с производством пероксида водорода (семейства PR-15 и PR-16) (Van Loon, Van Strien, 1999; Малиновский, 2009).

PR-белки участвуют в формировании приобретенной системной устойчивости SAR (Systemic Acquired Resistance). Растения, проявляющие SAR, характеризуются неспецифической устойчивостью к широкому спектру патогенов грибковой, бактериальной и вирусной природы. При этом совокупность PR-белков рассматривается как один из основных элементов механизма, ответственного за индукцию неспецифической устойчивости к патогенам. Показано, что многие PR-белки обладают фунгицидной и бактерицидной активностями *in vivo* и *in planta*. Однако роль этих белков в формировании устойчивости к вирусам остается неясной (van Loon *et al.*, 2006; Трифонова и др., 2007; Малиновский, 2009).

РНКазная активность, обнаруженная у ряда белков семейства PR-10, может быть связана с формированием устойчивости к вирусам (Park *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006; Малиновский, 2009). В тесте *in vitro* показана гидролазная активность PR-10 белка *Capsicum annuum* в отношении вирусной РНК. Также в опытах по инокуляции листьев перца вирулентной линией ВТМ показано, что присутствие этого белка в инокуляте существенно снижает степень размножения вируса. Этот внутриклеточный белок индуцируется в листьях *Capsicum annuum*, развивающих реакцию сверхчувствительно-

сти в ответ на инокуляцию невирулентным для данного растения штаммом вируса табачной мозаики (ВТМ). Кроме того, экспрессия СаPR-10 индуцируется системно – в непораженных листьях – при развитии SAR. В то же время при инокуляции вирулентным штаммом ВТМ индукция этого белка не наблюдается, что может быть связано с его вкладом в вирусо-устойчивость (Park *et al.*, 2004). Характерно, что РНКазная активность у СаPR-10 регулируется фосфорилированием (в норме она отсутствует, что снимает цитотоксический эффект, неизбежный при внутриклеточной локализации) (Park *et al.*, 2004). Однако РНКазная активность обнаружена только у небольшого числа белков, относящихся к семейству PR-10 (Liu, Ekramoddoullah, 2006). Другие семейства PR-белков не проявляют специфической противовирусной активности (Van Loon *et al.*, 2006). Впрочем, имеется сообщение о наличии РНКазной активности у белка пшеницы, принадлежащего семейству PR-4 (Caporale *et al.*, 2004).

Среди индуцируемых белков, потенциально связанных с защитным ответом, экстраклеточные рибонуклеазы являются возможными кандидатами на участие в формировании устойчивости растений к вирусам. Экстраклеточная локализация, низкий уровень экспрессии в интактных листьях и сходная кинетика индукции при поранении и в ответ на атаку патогенов сближают экстраклеточные РНКазы с PR-белками.

Роль экстраклеточных рибонуклеаз при взаимодействии растений с патогенами

Давно известно, что в ответ на поражение грибами и вирусами в инфицированных тканях растений наблюдается повышение РНКазной активности (Chakravorty *et al.*, 1974; Barna *et al.*, 1989; Lusso, Kuc, 1995; Galiana *et al.*, 1997). При этом в спектре белков с РНКазной активностью из грубых листовых экстрактов или смывов апопластной жидкости можно наблюдать появление нескольких новых фракций (Barna *et al.*, 1989). Такое повышение РНКазной активности не обязательно представляет собой прямой ответ на атаку патогена и может быть связано с поранением или преждевременным старением (Green, 1994).

Однако некоторые данные указывают на то, что индукция экстраклеточных РНКаз может быть связана не только с сопутствующими инфекционному процессу событиями, но и непосредственно с формированием устойчивости к патогену. У табака увеличение суммарной РНКазной активности в ответ на инокуляцию *Phytophthora parasitica* по времени совпадает с индукцией гена, кодирующего экстраклеточную рибонуклеазу NE. Экспрессия этого гена наблюдается в промежутке между 4 и 12 часами после инокуляции. Контрольная инокуляция водой тоже вызывает индукцию этого гена (вероятно, связанную с поранением тканей), однако наблюдаемый при этом уровень экспрессии существенно ниже, чем при воздействии патогена. По-видимому, стресс, вызванный процессом инокуляции (повреждением тканей листа), индуцирует некоторый базальный уровень экспрессии гена РНКазы NE, который увеличивается при грибковой инфекции (Galiana *et al.*, 1997). С помощью иммуноблот-анализа было показано, что этот белок детектируется в межклеточной жидкости уже через 8 часов после инфильтрации грибка. В тестах *in vitro* также была показана противогрибковая активность РНКазы NE в концентрациях от 1 до 50 мкг/мл. Присутствие РНКазы в инокуляте в концентрации 50 мкг/мл снижает суточный рост гифов *P. parasitica* и *Fusarium oxysporum* на 60 % и 90 % соответственно. Ферментативно-неактивная форма этой РНКазы, полученная с помощью направленного мутагенеза, теряет такую способность. Это указывает на то, что антимикробное действие этого белка связано с его рибонуклеазной активностью, а не с какими-то другими функциональными свойствами (Hugot *et al.*, 2002).

Экзогенное введение рибонуклеазы NE в межклеточное пространство тоже приводит к подавлению развития *P. parasitica*, однако эффективные концентрации белка *in planta* выше эффективных концентраций *in vitro*. Это указывает на то, что в растении патоген менее чувствителен к антимикробному действию РНКазы (Hugot *et al.*, 2002). Стоит отметить, что подобная картина часто наблюдалась также при изучении антимикробных свойств PR-белков (Van Loon *et al.*, 2006).

РНКазы Nk1, еще одна экстраклеточная РНКазы растений рода *Nicotiana*, почти идентичная

РНКазе NE (уровень идентичности аминокислотных последовательностей 97 %), индуцируется в листьях табака в ответ на механическую инокуляцию вирусом огуречной мозаики. Уровень мРНК, соответствующей РНКазе Nk1, значительно возрастает в промежутке между 3 и 6 часами после инокуляции (Ohno, Ehara, 2005). Довольно ранняя индукция этого белка, по-видимому, не связана с преждевременным старением и апоптозом, которые могут наблюдаться при развитии инфекционного процесса. В целом особенности экспрессии этой рибонуклеазы говорят в пользу ее участия в молекулярном механизме вирусостойчивости.

Считается, что во многих случаях степень поражения растения патогенами определяется скоростью развития защитного ответа, определяющей его эффективность. По-видимому, именно ранняя индукция некоторых экстраклеточных РНКаз может означать их связь с защитным ответом. В настоящее время возможные механизмы противовирусного и фунгицидного действия экстраклеточных РНКаз остаются неясными. В случае вирусной инфекции, вероятно, экстраклеточные РНКазы могут повреждать геномную РНК вирусов на тех стадиях инфекционного процесса, когда она уязвима. Также можно предположить, что во время инокуляции при поранении тканей РНКазы из апопласта могут проникать в поврежденные клетки и убивать их (разрушая пул клеточных мРНК), что не даст вирусу возможности размножиться (Trifonova *et al.*, 2007). Последний механизм может действовать и в естественных условиях: проникновение вирусов в растение, как правило, связано с механическим повреждением тканей растения, что в свою очередь позволяет экстраклеточным РНКазам проникать в клетки и должно вызывать гибель поврежденных клеток вследствие цитотоксического действия этих белков.

Механизм, аналогичный описанному выше, действует у дрожжей во время окислительного стресса. При обработке дрожжевых клеток пероксидом водорода H_2O_2 РНКазы Rny1, в норме локализованная вакуолярно или экстраклеточно, попадает в цитоплазму, где она напрямую разрушает молекулы транспортных и рибосомных РНК и способствует смерти клетки. При этом в клетках дрожжей, лишенных этой РНКазы или несущих ее неактивную форму, в стрессовых

условиях разрушение молекул транспортных РНК не наблюдается, что указывает на то, что другие РНКазы в данных условиях не проявляют такой специфической гидролитической активности (Thompson, Parker, 2009).

Имеются основания предполагать, что у растений подобное разрушение молекул транспортных РНК в стрессовых условиях может являться функцией S-подобных РНКаз. Действительно, разрушение молекул транспортных РНК вследствие окислительного стресса наблюдается также у растений и животных (Thompson *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009). При этом несмотря на то, что у млекопитающих функцию гидролиза транспортных РНК при стрессе выполняет ангиогенин (представитель РНКаз семейства А) (Fu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009), сверх-экспрессия T₂ РНКазы человека (RNASET2) в клетках дрожжей, лишенных РНКазы Rny1, восстанавливает процесс разрушения транспортных РНК (Thompson, Parker, 2009). В силу того что у растений секреторные РНКазы представлены только семейством T₂-РНКаз, S-подобные РНКазы остаются единственными кандидатами на выполнение этой функции в клетках растений.

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). Это предположение поддерживается вышеописанными данными по участию секреторных РНКаз в разрушении клеточной РНК во время стресса. 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 (MacIntosh *et al.*, 2001). Высказано предположение о том, что некие (в настоящий момент неизвестные) молекулы РНК могут участвовать в формировании пор в мембране клеток дрожжей, что может объяснять эффект рибонуклеаз на их проницаемость. Известно

также, что активность многих PR-белков связана с увеличением проницаемости мембран. При этом показано, что они обладают фунгицидным действием (Van Loon *et al.*, 2006).

Трансгенные растения как модель для изучения рибонуклеаз

Рассмотрение свойств экстраклеточных РНКаз растений показывает, что они могут быть задействованы в механизмах адаптации к различным видам стресса, включая фосфатное голодание, поранение и атаку патогенов. Однако нет данных, демонстрирующих прямую связь между синтезом этих белков и развитием устойчивости к стрессовым факторам. Поэтому необходимы дальнейшие исследования роли экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений. Изучение функциональной роли растительных РНКаз затруднено присутствием в тканях растений одновременно нескольких ферментов с РНКазной активностью (Трифорова и др., 2000.) Одним из оптимальных подходов для изучения функций растительных рибонуклеаз является создание трансгенных растений с измененной активностью конкретных РНКаз.

В 1999 г. были получены растения арабидопсиса, несущие антисмысловой супрессор гена *RNS1*. У полученных растений накопление транскрипта гена *RNS1* было снижено на 90 %. Было обнаружено, что у трансгенных растений такое снижение экспрессии гена *RNS1* сопровождалось аномально высоким содержанием антоцианов, накопление которых часто связано с различными видами стресса, включая фосфатное голодание. При этом обнаруженный феномен проявлялся сильнее, когда растения выращивались на среде с недостатком фосфата. Таким образом, было обнаружено, что другие РНКазы не могут компенсировать уменьшение активности экстраклеточной РНКазы *RNS1* (Bariola *et al.*, 1999).

В 2007 г. было впервые продемонстрировано, что экспрессия гетерологичной экстраклеточной РНКазы может существенно повысить вирусостойкость растений. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген панкреатической секреторной рибонуклеазы быка (относящейся к семейству рибонуклеазы А), характеризуются

повышенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики. Устойчивость проявляется в отсутствии или существенной задержке проявления типичных мозаичных симптомов и в замедленном накоплении вируса. Показано, что уровень рибонуклеазной активности в листьях и стеблях полученных растений значительно повышен по сравнению с контролем. При этом также показано, что трансгенные растения характеризуются повышенным уровнем РНКазной активности во фракции апопласта, что указывает на секрецию трансгенной рибонуклеазы в апопласт (Trifonova *et al.*, 2007).

В лаборатории генной инженерии ИЦиГ СО РАН также были созданы две новые генетические модели: трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum*, характеризующиеся увеличенным уровнем активности растительной S-подобной рибонуклеазы, и растения со сниженным уровнем экспрессии собственной экстраклеточной S-подобной рибонуклеазы. В первом случае был использован трансген экстраклеточной РНКазы ZRNaseII *Zinnia elegans*, и полученные линии характеризовались значительно более высоким (в 10–15 раз по сравнению с контролем) уровнем РНКазной активности в апопласте (Сангаев и др., 2007). Во втором случае трансгенные растения табака несли дцРНК-супрессор гена экстраклеточной РНКазы Nk1 табака и характеризовались сни-

женным уровнем РНКазной активности в апопласте (Сангаев и др., 2010). На рис. 1 приведен спектр белков с рибонуклеазной активностью в листовых экстрактах из трансгенных растений этих линий. При проращивании в стандартных условиях полученные трансгенные растения не характеризовались существенными отличиями по морфологическим характеристикам и срокам развития от нетрансгенных растений. Этот результат показывает, что исследуемые белки не задействованы в контроле процессов роста и развития растений. Дальнейшие эксперименты позволяют определить их связь с молекулярными механизмами стрессоустойчивости.

Заключение

РНКазы семейства T₂ широко распространены в растительном мире и задействованы во многих физиологических процессах высших растений, включая селективное отторжение несовместимой пыльцы (у растений с гаметофитным типом самонесовместимости), процессы старения, адаптацию к фосфатному голоданию и защитный ответ на поранение и атаку патогенов. При этом они характеризуются высокой степенью функциональной диверсификации. Это позволяет провести параллель между РНКазами семейства T₂ растений и РНКазами семейства А позвоночных животных. Действи-

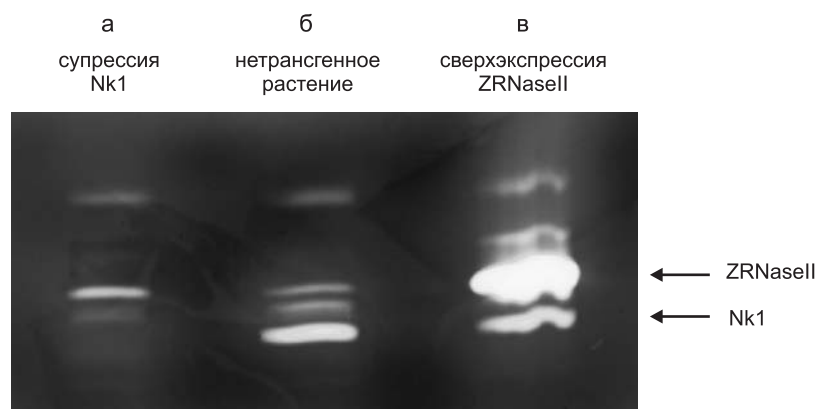


Рис. 1. Спектр белков с рибонуклеазной активностью в листовых экстрактах из: а – трансгенных растений табака, несущих супрессор гена экстраклеточной РНКазы Nk1 *Nicotiana tabacum* (супрессия Nk1) (описаны (Сангаев и др., 2010)); б – контрольных растений табака (нетрансгенное растение); в – растений табака, экспрессирующих экстраклеточную РНКазу ZRNaseII *Zinnia elegans* (сверхэкспрессия ZRNaseII) (описаны (Сангаев и др., 2007)). (Энзимограмма. В качестве субстрата в полиакриламидном геле использовалась высокомолекулярная РНК дрожжей).

тельно, РНКазы семейства А, как и секреторные РНКазы растений, задействованы во многих процессах, причем их биологические функции сходны с функциями S-подобных РНКаз. К тому же, несмотря на некоторые различия в ферментативной активности, основной субстрат РНКаз семейств Т₂ и А один и тот же.

Однако несмотря на такое сходство, РНКазы семейства А, по-видимому, не смогли полностью функционально заменить РНКазы семейства Т₂ у позвоночных животных, так как по крайней мере один ген, кодирующий РНКазу семейства Т₂, обнаружен у каждого животного, геном которого полностью секвенирован (Hillwig *et al.*, 2009). Причина такой консервативности (очевидно, связанная с выполняемыми белком функциями) пока не известна. Существует гипотеза, что экстраклеточные РНКазы, экспрессия которых наблюдается на ранних стадиях развития (в эмбриональных тканях), могут быть связаны с метаболизмом микроРНК (miRNA), транспортируемых по экстраклеточному пространству, и, как следствие, с регуляцией экспрессии генов (Hillwig *et al.*, 2009).

Таким образом, с одной стороны, изучение экстраклеточных РНКаз растений может углубить наши знания о механизмах адаптации растений к различным формам стресса, что имеет большое теоретическое и прикладное значение. С другой стороны, возможно, Т₂ РНКазы не только играют роль в процессах, рассмотренных в данной статье, но также выполняют какие-то иные важные функции, которые могут быть эволюционно консервативными.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (2.1.1/6382), РФФИ-НАНУ (10-04-90411), интеграционным проектом СО РАН (№ 28) и грантом программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (№ 23.22). Авторы также выражают свою признательность фонду РФФИ грант № 09-04-01452 за частичную поддержку проводимых исследований.

Литература

- Малиновский В.И. РР-белки и фитовирусы // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 3. С. 1–9.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е. и др. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 // Генетика. 2007. Т. 43. № 2. С. 1002–1005.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е. и др. Инактивация гена *Nk1* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 за счет РНК-интерференции // Генетика. 2010. Т. 46. № 1. С. 131–134.
- Трифопова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. С. 395–405.
- Трифопова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Молекулярные механизмы системной устойчивости растений к вирусным инфекциям и способы повышения вирусоустойчивости путем трансгенеза // Усп. соврем. биологии. 2007. Т. 127. С. 13–24.
- Abel S., Nürnberg T., Ahnert V. *et al.* Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 543–552.
- Bariola P.A., Howard C.J., Taylor C.B. *et al.* The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation // Plant J. 1994. V. 6. P. 673–685.
- Bariola P.A., MacIntosh G.C., Green P.J. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of *RNS1* or *RNS2* elevates anthocyanin accumulation // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 331–342.
- Barna B., Ibenhal W.D., Heitefuss R. Extracellular RNase activity in healthy and rust infected wheat leaves // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989. V. 35. P. 151–160.
- Caporale C., Di Berardino I., Leonardi L. *et al.* Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity // FEBS Lett. 2004. V. 575. P. 71–76.
- Chakravorty A.K., Shaw M., Scrubb L.A. Ribonuclease activity of wheat leaves and rust infection // Nature. 1974. V. 247. P. 577–580.
- Deshpande R.A., Shankar V. Ribonucleases from T2 family // Crit. Rev. Microbiol. 2002. V. 28. P. 79–122.
- Dodds P.N., Clarke A.E., Newbiggin E. Molecular characterization of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. P. 227–238.
- Fu H., Feng J., Liu Q. *et al.* Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 437–442.
- Galiana E., Bonnet P., Conrod S. *et al.* RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 1557–1567.
- Green P.J. The ribonucleases of higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V. 45. P. 421–445.

- Hillwig M.S., LeBrasseur N.D., Green P.J., MacIntosh G.C. Impact of transcriptional, ABA-dependent, and ABA-independent pathways on wounding regulation of *RNS1* expression // *Mol. Genet. Genomics*. 2008. V. 280. P. 249–261.
- Hillwig M.S., Rizhsky L., Wang Y. *et al.* Zebrafish RNase T2 genes and the evolution of secretory ribonucleases in animals // *BMC Evolutionary Biology*. 2009. DOI: 10.1186/1471-2148-9-170.
- Hugot K., Ponchet M., Marais A. *et al.* A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // *MPMI*. 2002. V. 15. P. 243–250.
- Kariu T., Sano K., Shimokawa H. *et al.* Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998. V. 62. P. 1144–1151.
- Köck M., Löffler A., Abel S., Glund K. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 27. P. 477–485.
- Köck M., Gross N., Stenzel I., Hause G. Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato // *Planta*. 2004. V. 29. P. 233–242.
- 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 // *The Plant J.* 2002. V. 29. P. 393–403.
- Lers A., Khalchitski A., Lomaniec E. *et al.* Senescence-induced RNases in tomato // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 36. P. 439–449.
- Liu J.-J., Ekramoddoullah A.K.M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2006. V. 68. P. 3–13.
- Lusso M., Kuc J. Increased activities of ribonuclease and protease after challenge in tobacco plants with induced systemic resistance // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1995. V. 47. P. 419–428.
- Ma R.-C., Oliveira M.M. The RNase PD2 gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionary distinct class of S-like RNase genes // *Mol. Genet.* 2000. V. 263. P. 925–933.
- MacIntosh G.C., Bariola P.A., Newbiggin 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., Flagel L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. DOI: 10.1007/s00438-010-0524-9.
- Nürnberg T., Abel S., Jost W., Glund K. Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation // *Plant Physiol.* 1990. V. 92. P. 970–976.
- Ohno H., Ehara Y. Expression of ribonuclease gene in mechanically injured or virus-inoculated *Nicotiana tabacum* leaves // *Tohoku J. Agric. Res.* 2005. V. 55. P. 99–109.
- 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.
- Raghothama K.G., Karthikeyan A.S. Phosphate acquisition // *Plant and Soil*. 2005. V. 274. P. 37–49.
- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 707–719.
- Rogers S.W., Rogers J.C. Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 1457–1464.
- Taylor C.B., Green P.J. Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1991. V. 96. P. 980–984.
- Thompson D.M., Lu C., Green P.J., Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes // *RNA*. 2008. V. 14. P. 2095–2103.
- Thompson D.M., Parker R. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *JCB*. 2009. V. 185. P. 43–50.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L. *et al.* Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1121–1126.
- Van Loon L.C., Van Strien E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. V. 55. P. 85–97.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
- Van Nerum I., Certal A.C., Oliveira M.M. *et al.* PD1, an S-like RNase gene from a self-incompatible cultivar of almond // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 1108–1114.
- Yamasaki S., Ivanov P., Hu G.-F., Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. P. 35–42.
- Ye Z.H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans* // *Plant. Mol. Biol.* 1996. V. 30. P. 697–709.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASES IN HIGHER PLANTS

S.S. Sangaev¹, A.V. Kochetov^{1,2}, S.S. Ibragimova¹, B.A. Levenko³, V.K. Shumny^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: sangaevs@gmail.com;

³ N.N. Grishko National Botanical Garden of the Ukraine, Kiev, Ukraine

Summary

The extracellular space of plant tissues contains a complex set of proteins whose functions are poorly understood. This paper represents the current view on biological roles of extracellular ribonucleases. In particular, their relation to molecular mechanisms conferring resistance to pathogens is discussed.

Key words: T₂ RNases, S-like RNases, stress, phosphate deficiency, wounding, protection against pathogens.