

## ПЕПТИДНЫЕ ПАТТЕРНЫ МАМР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЛАГЕЛЛИНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РАСТИТЕЛЬНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ И КОЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТЫ

© 2024 г. С. Ю. Щеголев<sup>а, \*</sup>, Г. Л. Бурыгин<sup>а</sup>, Ю. В. Красова<sup>а</sup>, Л. Ю. Матора<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049, Россия

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

В аминокислотных последовательностях флагеллинов представителей фитопатогенной ассоциативной и клубеньковой микрофлоры идентифицированы консервативные мотивы (пептидные паттерны), определяющие элиситорные свойства фитопатогенных бактерий. У PGPR выявлены аналоги одного (flg22) из двух (flg22 и flgII-28) специфических пептидов, характерных для патогенов. Вместо глицина G18, являющегося признаком элиситора, в аналогах flg22 у большинства PGPR идентифицирован тирозин Y18, что препятствует растению задействовать для PGPR механизм фитоиммунитета. Молекулярный докинг с применением программного комплекса AlphaFold продемонстрировал достоверность взаимодействий растительного рецептора FLS2 с каноническим пептидом flg22 и его аналогами из фитопатогена и азоспириллы. Однако в случае растительного рецептора FLS3 достоверными оказались только его взаимодействия с каноническим пептидом flgII-28 и его аналогом из фитопатогена.

**Ключевые слова:** PGPR, фитопатогены, бактериальные флагеллины, пептидные паттерны, элиситорные свойства, фитоиммунитет, растительные рецепторы, коэволюционные изменения, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0026365624020155

Ассоциированные с микробами молекулярные паттерны МАМР (РАМР для фитопатогенов) представляют собой высоко консервативные пептидные мотивы во флагеллинах бактерий, распознаваемые поверхностными рецепторами растительных клеток (Felix et al., 1999). В случае патогенов это приводит к запуску систем фитоиммунитета (Fliegmann, Felix, 2016) с участием обогащенного лейцином киназного рецептора FLS2, вовлеченного в восприятие пептида из N-концевой части бактериального флагеллина, состоящего из 22 аминокислотных остатков (ao) (flg22) (Gómez-Gómez, Boller, 2000), и FLS3, взаимодействующего с другим пептидом длиной 28 ao (flgII-28) из той же части флагеллина (Hind et al., 2016). В работе (Cai et al., 2011) отмечается, что появление во флагеллине фитопатогенов характерного паттерна flgII-28 может быть обусловлено реакцией растений на ослабление FLS2+flg22-зависимого иммунитета при коэволюционных изменениях в геномах организмов.

Взаимодействие МАМР с растительными рецепторами является одной из основ механизма ассоциативных/симбиотических

растительно-микробных отношений (Проворов и соавт., 2018). Однако для широкого круга стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR) наличие указанных выше паттернов и их взаимодействия с растительными рецепторами практически мало изучены.

В данной работе нами была проведена сравнительная идентификация МАМР во флагеллинах различных типов — белке полярного (FliC) и латерального (LafI) жгутиков, соединительном белке крюка с филаментом (FlgL), весьма сходном в 3D-структуре с флагеллином (Hu, Reevesa, 2020) — у представителей фитопатогенной, ассоциативной и клубеньковой микрофлоры. При этом мы принимали во внимание отличия в размерах молекул среди флагеллинов одного и того же типа. В статье Thomson et al. (2018) дано много примеров бактериальных жгутиковых систем с флагеллинами, размеры которых варьируют в широких пределах и нередко значительно превышают общеизвестные, достигая порядка 1000 ao и выше. В таких случаях для обозначения размера белка мы использовали нижний индекс, к примеру, FliC<sub>274</sub>, FliC<sub>621</sub> и т.д.

Нашей целью было выяснение мотивов в последовательностях флагеллинов, определяющих наличие или отсутствие у них элиситорных (связанных с иммунитетом растений) свойств, и оценка взаимодействий МАР с растительными рецепторами методом молекулярного докинга.

В качестве канонических образцов МАР использованы аминокислотные последовательности пептидов flg22 и flgII-28, являющихся фрагментами флагеллинов FliC, соответственно, из животного патогена *Pseudomonas aeruginosa* ATCC700888 и фитопатогена *P. syringae* pv. tomato T1. Аминокислотная последовательность пептида flg22 идентична соответствующему участку флагеллинов многих штаммов рода *Pseudomonas*, включая указанный выше штамм, выделенный из промышленных вод. Учитывая его принадлежность к виду синегнойной палочки, данный штамм был условно отнесен нами к животным патогенам, при том, что известно его выраженное элиситорное действие на ряд растений (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez, Boller, 2000), дабы отличить его от признанных фитопатогенов и PGPR. Примеры взаимодействий энтеробактерий с растениями приведены также в работе (Garcia et al., 2014). Со стороны растений использованы последовательности рецепторов FLS2 и FLS3, соответственно, из *Arabidopsis thaliana* L. и *Solanum lycopersicum* L.

Были задействованы наборы из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) десятков гомологичных последовательностей FliC, LafI и FlgL представителей патогенной микрофлоры, использованных в работе (Garcia et al., 2014), и PGPR семейств *Azospirillaceae*, *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae*. При необходимости для указания длины аминокислотной последовательности белка в его обозначении использовали нижний индекс (см. выше).

Множественные выравнивания последовательностей (МВП) белков проводили с использованием программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Логотип, соответствующий МВП с гомологичными последовательностями, получали с помощью программы Blast2logo (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Blast2logo-1.1>). Предсказания 3D-структур белковых комплексов (молекулярный докинг) выполняли с применением программы AlphaFold2 в варианте AlphaFold-Multimer (<https://github.com/deepmind/alphafold#running-alphafold-multimer>), инсталлированной в вычислительном центре Саратовского госуниверситета (СГУ) (Щеголев и соавт., 2022). Достоверность предсказаний оценивали по параметру pDockQ с помощью программы FoldDock (<https://github.com/ElofssonLab/FoldDock>). Физико-химические свойства границ раздела между взаимодействующими белковыми структурами анализировали с программой PDBePISA ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)). Визуализацию 3D-структур белков и их комплексов

осуществляли с применением программы Jmol (<http://www.jmol.org>).

Расположение пептидов в высококонсервативных N-концевых доменах флагеллинов в пределах 30–51 ао (flg22) и 84–111 ао (flgII-28) характеризует логотип МВП на рис. S1 в дополнительных материалах, полученный нами с последовательностью FliC *P. aeruginosa* ATCC700888 и пятьюстами гомологичными последовательностями. Он иллюстрирует весьма существенное отличие в уровне консервативности N- и C-концевых участков белков от их высоковариабельной промежуточной части.

Результаты биохимических исследований и рентгеноструктурного анализа в работах (Garcia et al., 2014; Sun et al., 2013) продемонстрировали ключевую роль глицина G18 в 18-й позиции последовательности пептида flg22 в образовании тройного комплекса FLS2+flg22 с корцептором ВАК1, необходимого для запуска реакций фитоиммунитета. Мутационная замена G18 на иной остаток в аналогах flg22 делает невозможным проявление элиситорных свойств носителями такого пептида.

На дополнительном рис. S2 представлен фрагмент полученного нами МВП для флагеллинов из патогенов и PGPR семейства *Azospirillaceae*, иллюстрирующий такую замену во флагеллинах представителей PGPR. Это исключает образование отмеченного выше тримера, но не препятствует взаимодействиям между FLS2 и аналогами flg22 (Sun et al., 2013), что может служить сигналом для растения к установлению ассоциативных взаимоотношений с представителями PGPR (Проворов и соавт., 2018).

Полученные нами МВП с десятками белковых последовательностей показали, что пара специфических пептидов типа flg22 и flgII-28 неизменно присутствует во флагеллинах патогенной микрофлоры, в то время как у представителей семейств *Azospirillaceae*, *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae* в подавляющем большинстве случаев регистрируется только flg22. Неожиданным исключением оказался лишь “короткий” флагеллин FliC<sub>274</sub> представителей семейства *Azospirillaceae* размером 274 ао (в отличие от “длинного” FliC<sub>621</sub> размером около 600 ао), в составе которого были выявлены аналоги обоих пептидов flg22 и flgII-28 (рис. 1; А, В). Более того, в составе его аналогов flg22 в 18-й позиции оказался глицин G18 (рис. 1; А), что характерно для фитопатогенов. Эти факты переводят “короткий” флагеллин представителей *Azospirillaceae* в категорию элиситоров, в то время как сами эти бактерии проявляют себя в качестве несомненных PGPR.

Из литературы известны примеры образования гетерогенных филаментов флагеллинов бактерий и архей из белков с разными размерами и структурой. Среди вероятных причин для формирования жгутиков сложного состава отмечается расширение набора средств для взаимодействий бактерий с другими



**Рис. 1.** Фрагменты МВП с пептидами flg22 (A, C), flgII-28 (B) и последовательностями FliC<sub>274</sub> из представителей *Azospirillaceae* (A, B); фрагмент МВП с пептидом flg22 и последовательностями FliC из представителей PGPR (C). A. — *Azospirillum*, B. — *Brucella*, S. — *Sinorhizobium*.

организмами. Например, с бактериофагами для уклонения от фаговой инфекции и др. Результаты молекулярного моделирования (дополнительный рис. S3) для двух штаммов *Azospirillum*, целью которого была оценка принципиальной возможности образования комплексов FliC<sub>621</sub>+FliC<sub>274</sub>, дают основания предположить использование подобного механизма азоспириллами. Однако, в целом, роль “короткого” флагеллина у представителей *Azospirillaceae*, проявившего признаки элиситора, и возможность его вклада в формирование жгутика на сегодняшний день не выяснены и требуют дополнительных исследований.

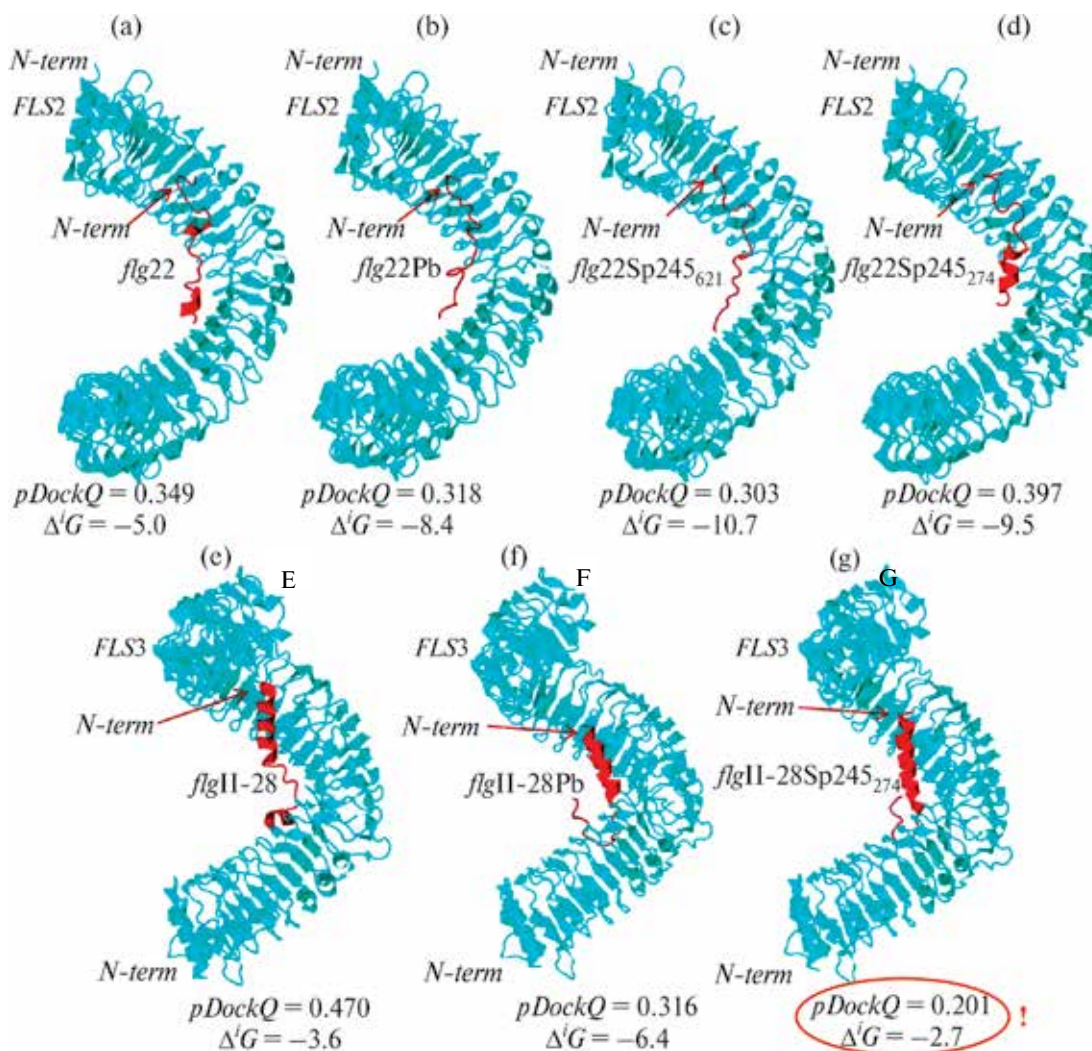
На рис. 1 (ряд C) приведен пример МВП с флагеллинами PGPR, иллюстрирующий замену G18 на тирозин Y18 в аналогах flg22 у представителей бруцелл и ризобий. В дополнительных материалах (рис. S4–S6) приведены результаты выявления паттернов flg22 и flgII-28 в более широком круге объектов из ассоциативной и клубеньковой микрофлоры: флагеллинах латеральных жгутиков *Azospirillum* и флагеллинах представителей *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae*. В них продемонстрирована универсальность замены G18 на Y18 в аналогах flg22 и отсутствие аналогов пептида flgII-28 во флагеллинах PGPR. В соединительных блоках FlgL во всех рассмотренных нами таксонах аналоги специфических пептидов flg22 и flgII-28 не обнаружены. Для иллюстрации этого на дополнительных рис. S7,

S8 приведены примеры для азоспирилл. С учетом специфической роли FlgL и его исчезающе малого количества в жгутике по сравнению с десятками тысяч основных белков филамента, данный результат можно рассматривать в качестве свидетельства эффективности (отрицательного контроля) использованной нами методики выявления flg22 и flgII-28.

На рис. 2 показаны результаты молекулярного докинга, нацеленные на выяснение принципиальной возможности и особенностей взаимодействий выявленных нами аналогов специфических пептидов flg22 и flgII-28 из фитопатогена (*Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043) и ассоциативной бактерии (*Azospirillum baldaniorum* Sp245) с растительными рецепторами FLS2 и FLS3.

В случае димера FLS2+flg22 (рис. 2; A–D) все представленные здесь пары по критерию pDockQ ≥ 0.23 (Bryant et al., 2022) относятся к категории истинно взаимодействующих протеинов. Однако для FLS3+flgII-28 эффективными по этому критерию (рис. 2; E, F) следует признать взаимодействия специфических пептидов с растительными рецепторами только для патогенов. В то время как для аналога flgII-28 из “короткого” флагеллина азоспириллы (рис. 2; G) предсказанная модель не может считаться достоверной (pDockQ < 0.23, выделено овалом на рис. 2; G).





**Рис. 2.** Молекулярный докинг растительных рецепторов FLS2 (*Ar. thaliana*) (A–D), FLS3 (*S. lycopersicum*) (E–G) с бактериальными пептидами flg22 (A–D), flgII-28 (E–G) и их аналогами из фитопатогена и PGPR: *P. aeruginosa* ATCC700888 (A); *Pc. atrosepticum* SCR11043 (B, F); *A. baldaniorum* Sp245, “длинный” флагеллин (C); *A. baldaniorum* Sp245, “короткий” флагеллин (D, G); *P. syringae* pv. *tomato* T1 (E). Овалом на рис. 2; G, выделены значения параметров, свидетельствующие о неэффективности взаимодействия для данной пары — рецептор + пептид.

Эти выводы согласуются с результатами независимых оценок интерфейсов взаимодействий, полученных с помощью программы PDBePISA. Изменения свободной энергии сольватации  $\Delta^iG$  (ккал/моль), представленные на рис. 2, свидетельствуют об эффективности взаимодействий в шести из семи рассмотренных вариантов (рис. 2; A–F). В отличие от них, самопроизвольное образование комплекса специфического пептида из “короткого” флагеллина азоспириллы с растительным рецептором FLS3 (рис. 2; G) по механизму гидрофобных взаимодействий оказывается невозможным ( $\Delta^iG > 0$ , выделено овалом на рис. 2; G).

Полученные результаты представляются достаточно обоснованными с коэволюционной точки зрения. В случае фитопатогена специфическое связывание рецептора с дополнительным паттерном flgII-28

нацелено на обнаружение патогена с усилением фитоиммунитета. Однако в случае PGPR у растения нет причин для столь строгого контроля за возможной “мимикрией” микропартнера с целью избежать действия фитоиммунитета, чем, вероятно, можно объяснить отсутствие аналогов flgII-28 в “длинном” флагеллине у представителей семейства *Azospirillaceae*. Несмотря на наличие в “коротком” флагеллине азоспириллы обоих паттернов flg22 и flgII-28, азоспириллы не проявляют себя как фитопатогены. Так что коэволюционные с растениями изменения в геномах данных представителей почвенной микрофлоры не должны достигать того состояния, при котором возможное взаимодействие дополнительного пептида flgII-28 с рецептором FLS3 могло бы послужить сигналом к проявлению фитоиммунитета.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.С. Тихонову и Д.К. Андрейченко за установку в вычислительном центре СГУ и помощь в использовании AlphaFold-Multimer и сопутствующего программного обеспечения.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Проворов Н.А., Тихонов И.А., Воробьев Н.И. Симбиоз и симбиогенез. СПб.: Информ-Навигатор, 2018. 464 с.

Шеголев С.Ю., Тихонов К.С., Андрейченко Д.К. Об опыте инсталляции и использования программного комплекса AlphaFold2 и его оптимизированных версий для определения 3D-структур белков и белковых комплексов // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине — 2022: Сборник статей Всероссийской школы-семинара / Ред. Ан.В. Скрипаль. Саратов: Изд-во "Саратовский источник", 2022. С. 100–106.

Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nat. Commun. 2022. V. 13. Art. 1265. P. 1–11.

Cai R., Lewis J., Yan S., Liu H., Clarke C.R., Campanile F., Almeida N.F., Studholme D.J., Lindeberg M., Schneider D., Zaccardelli M., Setubal J.C., Morales-Lizcano N.P., Bernal A., Coaker G., Baker C., Bender C.L., Leman S., Vinatzer B.A. The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity // PLoS Pathog. 2011. V. 7. Art. e1002130. P. 1–15.

Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin // Plant J. 1999. V. 18. P. 265–276.

Fliegmann J., Felix G. Immunity: flagellin seen from all sides // Nature Plants. 2016. V. 2. Art. 16136. P. 1–2.

Garcia A.V., Charriera A., Schikorab A., Bigearda J., Pateyronc S., de Tauzia-Moreau M.-L., Evrarda A., Mithöferd A., Martin-Magniettea M. L., Virlogeux-Payantg I., Hirta H. *Salmonella enterica* flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 657–674.

Gómez-Gómez L., Boller T. FLS2: a LRR receptor-like kinase involved in recognition of the flagellin elicitor in *Arabidopsis* // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 1–20.

Hind S.R., Strickler S.R., Boyle P.C., Dunham D.M., Bao Z., O'Doherty I.M., Baccile J.A., Hoki J.S., Viox E.G., Clarke C.R., Vinatzer B.A., Schroeder F.C., Martin G.B. Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system // Nature Plants. 2016. V. 2. Art. 16128. P. 1–8.

Hu D., Reevesa P.R. The remarkable dual-level diversity of prokaryotic flagellins // mSystems. 2020. V. 5. Art. e00705-19.

Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.-M., Chai J. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex // Science. 2013. V. 342. P. 624–628.

Thomson N.M., Rossmann F.M., Ferreira J.L., Matthews-Palmer T.R., Beeby M., Pallen M.J. Bacterial flagellins: does size matter? // Trends Microbiol. 2018. V. 26. P. 575–581.

## SHORT COMMUNICATIONS

## The MAMP Peptide Patterns of Bacterial Flagellins and Their Interaction with Plant Receptors: Bioinformatic and Coevolutionary Aspects

S. Yu. Shchyogolev<sup>1</sup>\*, G. L. Burygin<sup>1</sup>, Yu. V. Krasova<sup>1</sup>, and L. Yu. Matora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

Received September 4, 2023; revised October 24, 2023; accepted November 13, 2023

**Abstract**—Conservative motifs (peptide patterns) determining the elicitor properties of plant-pathogenic bacteria were revealed in amino acid sequences of the flagellins of phytopathogenic, associated, and root nodule microflora. In plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), analogs of one (flg22) out of two (flg22 and flgII-28) specific peptides, characterizing pathogens were revealed. Instead of glycine G18, characteristic of an elicitor, tyrosine Y18 was identified in flg22 analogs of most PGPR, which prevents actuation of the phytoimmunity mechanism against PGPR. Molecular docking with the AlphaFold software complex demonstrated reliability of the interaction between the plant receptor FLS2 and the canonical peptide flg22 and its analogs from a plant pathogen and an *Azospirillum*. However, in the case of the FLS3 plant receptor only its interactions with the canonical peptide flgII-28 and its analog from the plant pathogen were reliable.

**Keywords:** PGPR, plant pathogens, bacterial flagellins, peptide patterns, elicitor properties, phytoimmunity, plant receptors, coevolutionary modifications, molecular docking

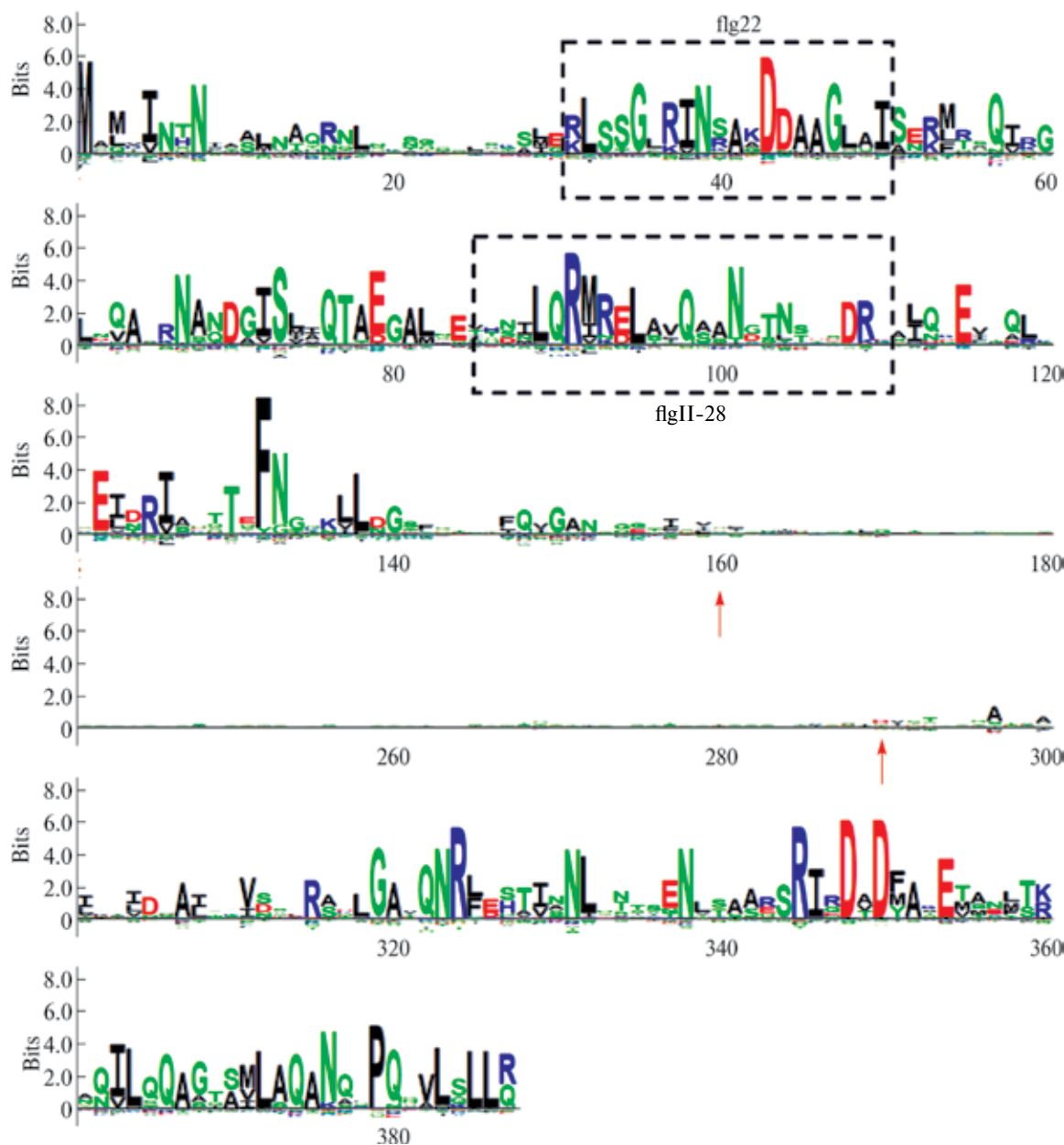
## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

### ПЕПТИДНЫЕ ПАТТЕРНЫ МАМР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЛАГЕЛЛИНОВ И ИХ КОЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТЫ

© 2024 г. С. Ю. Щеголев<sup>а, \*</sup>, Г. Л. Бурьгин<sup>а</sup>, Ю. В. Красова<sup>а</sup>, Л. Ю. Матора<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»,  
Саратов, 410049, Россия

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru



**Рис. S1.** Фрагменты логотипа профиля последовательности FlcC из *P. aeruginosa* ATCC 700888 с 500 гомологичными последовательностями демонстрируют весьма существенное отличие уровня консервативности N- и С-концевых участков белков от их высоковариабельной промежуточной части, отмеченной стрелками, в которой сигнал логотипа исчезающе мал по сравнению с остальными частями логотипа.

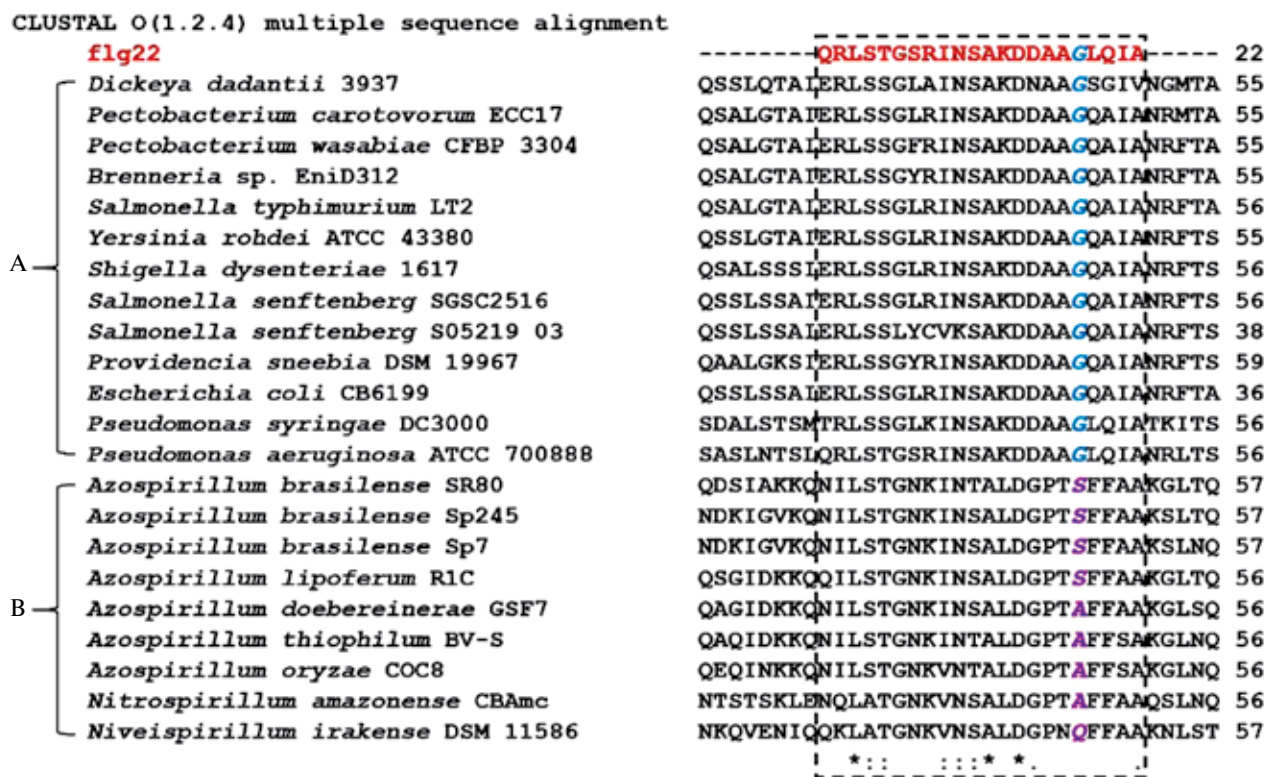


Рис. S2. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей (МВИ) с flg22 для FliC бактерий — патогенных (A) и PGPR семейства *Azospirillaceae* (B) — демонстрирует присутствие у патогенов остатка G18 — ключевого для наличия у них элиситорных свойств — но замену его иными остатками у *Azospirillaceae*.

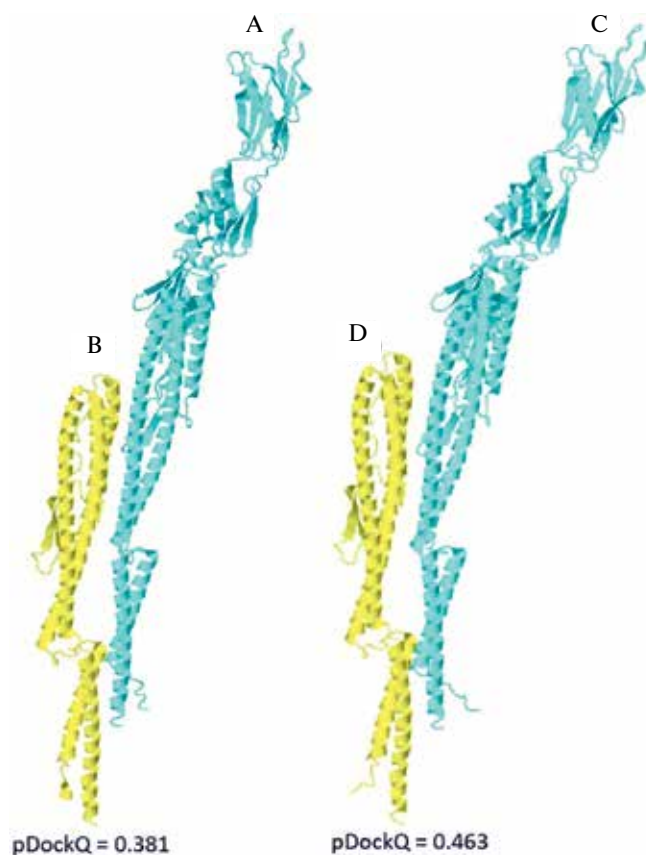


Рис. S3. 3D-модели AlphaFold-Multimer димерных комплексов FliC<sub>621</sub>(A, C)+FliC<sub>274</sub>(B, D) для *A. brasilense* Sp7 (A, B) и *A. baldaniorum* Sp245 (C, D). Значения pDockQ ≥ 0.23 свидетельствуют о достаточно высоком качестве моделирования и о принципиальной принадлежности димера FliC<sub>621</sub>+FliC<sub>274</sub> к категории истинно взаимодействующих белков (Bryant *et al.*, 2022).



```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22 -----QRLSTGSRINS AKDDAA GLQIA----- 22
...
A. rugosum IMMIB AFH-6 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTDDLATTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMRADVAGF 60
A. formosense CC-NFb-7 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTDDLATTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMRADVAGF 60
...
A. baldaniorum Sp245 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTDDLATTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMRADVAGF 60
...
A. brasilense Sp7 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTDDLATTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMRADVAGF 60
...
A. halopraeferens DSM 3675 MASILTNASAMTALQTLRRVTGDLATTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
...
A. thiophilum BV-S MASIMTNTS AMTALQTLRRVTGDLETTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
A. ramasamyi M2T2B2 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTGDLETTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
...
A. melinis TMCY0552 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTGDLETTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
...
A. humicireducens SgZ-5 MASIMTNTS AMTALQTLRRVTGDLETTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
A. lipoferum 4b MASIMTNTS AMTALQTLRRVTGDLETTQDRISTGLKVNNAKDNAA YWSIAITMKADVAGF 60
...
35 lines
::*** ::*::** **

```

Рис. S4. Фрагмент МВП с flg22 для флагеллина FliC<sub>414</sub>=LafI латерального жгутика представителей рода *Azospirillum* демонстрирует замену глицина G18 на тирозин Y18, что исключает наличие у LafI элиситорных свойств. Показанные строки отражают видовое разнообразие использованных объектов. МВП с тем же набором последовательностей LafI показало отсутствие в них аналогов flgII-28.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22 -----QRLSTGSRINS AKDDAA GLQIA----- 22
B. haematophila MASILTNS SALTALQTLAATNKALETTQNRISTGLRIGEASDNAA YWSIAITSMTSDNKAN 60
...
Ochrobactrum quorumnocens MASILTNS SALTALQTLSSSTNKSLETTQNRISTGLRIGEAAADNAA YWSIAITSMKSDNKAN 60
...
B. intermedia MASILTNS SALTALQTLSSSTNKALESTQNRISTGLKVAGASDNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
O. soli MASILTNS AALTALQTLSTTNKSLEATQNRISTGLKVAGASDNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
B. tritici MASILTNS SALTALQTLSSSTNKALESTQNRISTGLKVAGASDNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
...
O. teleogrylli MASILTNS AALTALQTLSTTNKSLEATQNRISTGLKVAGASDNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
...
B. anthropi MASILTNS SALTALQNLATTNKALETTQGRISTGLRIGEASDNAA YWSIAITMKSDNKAN 60
B. pecoris MASLLTNS SALTALQNLASTNRSLETTQGRISTGLRVGEAADNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
...
B. cytisi MASLLTNS SALTALQNLASTNRSLETTQGRISTGLRVGEAADNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
B. pseudintermedia MASLLTNS SALTALQNLASTNRALETTQGRISTGLRVGEAADNAA YWSIAITMRS DNKAN 60
...
35 lines
::*** ::*::** **

```

Рис. S5. Фрагмент МВП с flg22 для FliC<sub>300</sub> представителей семейства *Brucellaceae* демонстрирует замену глицина G18 на тирозин Y18, что исключает наличие у FliC<sub>300</sub> элиситорных свойств. Показанные строки отражают видовое разнообразие использованных объектов. МВП с тем же набором последовательностей FliC<sub>300</sub> показало отсутствие в них аналогов flgII-28.



```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22
S. meliloti 1021      MTSILTNNsAMAALSTLRsISSsMEDTQ-----QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA----- 22
E. adhaerens Casida A MTSIMTNTAAMAALQTLRSINSDMAEVQ-----DRISSGRLRVGSASDNAA YWSIAFTTMRSDNQAL 60
S. kostiense DSM 13372 MTSILTNPAAAMAALQTLRAINRNLEITQ-----SRISSGGYRVQTAADNAA YWSIAFTTMRSDNSAL 60
Ensifer sojae CCBAU 05684 MTSILTNPAAAMAALQTLRAINRNLEVTQ-----ARISSGGYRVETAADNAG YWSIAFTTMRSDNSAL 60
S. arboris LMG 14919  MTSIMTNPAAMAALQTLRAINHNLETTQ-----GRISSGFRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNAAL 60
S. medicae WSM419     MTSIMTNPAAMAALQTLRAINHNLETTQ-----GRISSGGYRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNAAL 60
E. aridi LMR013      MTSIMTNAAMAALQTLRSINRNLEETQ-----NRISSGGYRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNTAL 60
S. saheli LMG 7837   MTSILTNAAMAALQTLRAITRNMDETQ-----SRVSSGGYRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNTAL 60
S. fredii CCBAU 25509 MTSIMTNAAMAALQTLRSINRNLEDETQ-----SRVSSGGYRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNAAL 60
S. americanum CCGM7  MTSIMTNAAMAALQTLRSINRNLEDETQ-----SRVSSGGYRVETAADNAA YWSIAFTTMRSDNAAL 60
                                     |*:*:* *:*:* *:*:* .**|
    
```

Рис. S6. Фрагмент МВП с flg22 для FliC<sub>320</sub> представителей семейства *Rhizobiaceae* демонстрирует замену глицина G18 на тирозин Y18, что исключает наличие у FliC<sub>320</sub> элиситорных свойств. Аналогичный результат был получен с более многочисленными наборами гомологичных флагеллинов ризобий FliC<sub>320</sub> и FliC<sub>395</sub> количеством по несколько десятков. МВП с тем же набором последовательностей FliC<sub>320</sub> показало отсутствие в них аналогов flgII-28.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22
1 -QRLST-----GSRINSAKDDAAG----- 18
WP_029009299.1 61 ERYVDEGEVVGNGRIQAMHSAVGGMIDLTNRVEALVTSLQGAAGKGAEGIRSEAAALLEEF 120
WP_094302698.1 61 ERYVDEGEVVGNGRIQTMHDAVGGMVDLANRVRSLVASLQAGGGSAEGIKSEAQALMSEF 120
WP_137140038.1 61 ERYVDEGEVVGNGRIQTMHDAVGGMVDLANRVRSLVASLQAGGGSAEGIKSEAQALMSEF 120
WP_109070079.1 61 ERYVDEGEVVGNGRIQTMHDAVGGMIDLANRVRGLVASLQAGGGSAEGIRSEAAALMTEF 120
WP_119507627.1 61 ERYVDEGEVVGNGRIQTMHDTVGGMIDLANRVRSLVASLQAGGSAADGIKSEAQALMTEF 120
...
WP_109048479.1 61 EQYIDEGEVVGNGRIQSMYDAVGGMSDLTSRSLSALITGLQGNNAAAGVEGVVAEAGQLMEEL 120
WP_109447154.1 61 EQYIDEGEVVGNGRIQSMYDAVGGMSDLTSRSLSALITGLQGNNAAAGVEGVVAEAGQLMEEL 120
WP_127001928.1 61 EQYVDEGEVVGNGRIQSLYDAVGGMSDLTSRSLSALITGLQGNNAAAGVEGVTAEAGQLMQEF 120
WP_126616929.1 61 ESYIDQGEVVGNGRIQSMYDSVGGMADLTSLRSLSALITGLQGDNAAGVEGVVAEAGELMKEF 120
WP_119828889.1 61 EQYVDEGEVVGNGRIQSMYDAVGGMSDLTSRSLSALITGLQGDNAAGVEGVTAEAGELMKEF 120
          ..      ..***: . . . .
35 lines

flg22
19 -----LQIA----- 22
WP_029009299.1 180 LILEYGVTDADNPAIEKALRAINLLATMPDTPIDTDRVNEAAELADAASDALTVVQTRLGA 239
WP_094302698.1 178 LIVQYGVTDADDPsIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADGLTVVQTKLGS 237
WP_137140038.1 178 LIVQYGVTDADDPsIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADGLTVVQTKLGS 237
WP_109070079.1 178 LIIQYGVTDADDPsIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADGLTVVQTTLGS 237
WP_119507627.1 178 LIVQYGVTDADDPsIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADRLTVVQTKLGS 237
...
WP_109048479.1 178 FVLSYGVTDADQPAFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_109447154.1 178 FVLSYGVTDADQPAFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_127001928.1 179 LILSYGVTDADQPAFEKALRAFNLIANLQTDVDTDLVLAEATKLASDSTDALAVTQAKLGA 238
WP_126616929.1 181 LILSYGVTDADQPAFEQALRAFNLIANMSTSPVDTDLVLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 240
WP_119828889.1 181 LILSYGVTDADQPAFEKALRAFNLIANLTTTPVDDDLVLAEATQLASDATDGLAVTQAKLGA 240
          : :
35 lines
    
```

Рис. S7. Фрагменты МВП с flg22 для FlgL представителей рода *Azospirillum* демонстрируют отсутствие в данных белках структур, гомологичных пептиду flg22, поскольку выровненными являются лишь отдельные, разделенные брешами части flg22 в областях МВП за пределами высококонсервативного участка, соответствующего flg22 во флагеллине FliC бактерий (см. рис. S1), весьма сходного в 3D-структуре с FlgL (Hu, Reevesa, 2020).

## CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

flgII-28          1 -----ESTNILQRMRE-----L----- 12
WP_029009299.1  180 LILEYGVTADNPAIEKALRAINLLATMPDTPIDTDRVNEAAELADAASDALTVVQTRLGA 239
WP_094302698.1  178 LIVQYGV TADDP SIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADGLTVVQTKLGS 237
WP_137140038.1  178 LIVQYGV TADDP SIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADAAADGLTVVQTKLGS 237
WP_109070079.1  178 LIIQYGV TADDP SIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADAAADGLTVVQTTLGS 237
WP_119507627.1  178 LIVQYGV TADDP AIEKALRSISLIANMSTNPVDTALVDEASDLADAAADRLTVVQTKLGS 237
...
WP_109048479.1  178 FVLSYGV TADQP AFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_109447154.1  178 FVLSYGV TADQP AFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_127001928.1  179 LILSYGV TADQP AFEKALRAFNLIANLQTDVDTDLAEATKLASDSTDALAVTQAKLGA 238
WP_126616929.1  181 LILSYGV TADDP AFEQALRAFNLIANMSTSPVDTDLVDEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 240
WP_119828889.1  181 LILSYGV TADQP AFEKALRAFNLIANLTTTPVDDDLVDEASQLASDATDGLAVTQAKLGA 240

```

## 35 lines

```

flgII-28          13 -----AVQSRNDSNSATDRDA----- 28
WP_029009299.1  240 TSATLERTIDRHLEEQLVLETRVDDVRAIDLAEAAATRASQLRTSLEATLSLIRLETTLNL 299
WP_094302698.1  238 ASATLERTIDRHLEEQLVLTQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
WP_137140038.1  238 ASATLERTIDRHLEEQLVLTQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
WP_109070079.1  238 ASATLERTIDRHLEEQLVLTQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTLSLMKILQQTNL 297
WP_119507627.1  238 ASATLERTIDRHLEEQLVLTQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
...
WP_109048479.1  238 ASSSLENTIDRHVDEQLVLTQVQVEDIRSVDLAEESTTKLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 297
WP_109447154.1  238 ASSSLENTIDRHVDEQLVLTQVQVEDIRSVDLAEESTTKLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 297
WP_127001928.1  239 SSASLERTIDRHVDEQLVLTQSHVDDIRSVDLAEESTTRLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 298
WP_126616929.1  241 TSASLERTIDRHVDEQLVLTQTHVDDIRSVDLAEESTVRLSQLQASLEATMSLMKILEDTSL 300
WP_119828889.1  241 TSASLERTIDRHVDEQLVLTQTHVDDIRSVDLAEESTTRLSQLTASLEATMSLMNSLEENSL 300

```

## 35 lines

**Рис. S8.** Фрагменты МВП с flgII-28 для FlgL представителей рода *Azospirillum* демонстрируют отсутствие в данных белках структур, гомологичных пептиду flgII-28, поскольку выровненными являются лишь отдельные, разделенные брешами части flgII-28 в областях МВП за пределами высококонсервативного участка, соответствующего flgII-28 во флагеллине FlcC бактерий (см. рис. S1), весьма сходного в 3D-структуре с FlgL (Hu, Reevesa, 2020).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nat. Commun. 2022. V. 13. № 1265. P. 1–11.
2. Hu D., Reevesa P.R. The remarkable dual-level diversity of prokaryotic flagellins // mSystems. 2020. V. 5. № 5. e00705-19.