

На правах рукописи

**Кириенко
Анна Николаевна**

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕЦЕПТОР-ПОДОБНОЙ КИНАЗЫ K1 ГОРОХА
В КОНТРОЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ
СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР**

03.01.05 Физиология и биохимия растений
03.02.03 Микробиология

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярной и клеточной биологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, г. Санкт-Петербург

Научный руководитель: доктор биологических наук
Долгих Елена Анатольевна

Официальные оппоненты:

Чумаков Михаил Иосифович, доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биоинженерии ФГБУН Институт
биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Марданов Андрей Владимирович, доктор биологических наук,
заведующий лабораторией геномики микроорганизмов и
метагеномики Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ведущая организация: ФГБУН Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН

Защита состоится 2018 г. в _____ на заседании диссертационного совета
Д 999.167.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при
Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034
Санкт-Петербург, Университетская наб.7/9, СПбГУ, Биологический факультет,
ауд. № _____

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте <http://spbu.ru>.

Факс для отзывов: +7(812) 470-43-62

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Шарова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Изучение молекулярных механизмов восприятия клеткой внешних сигналов и формирования функционального ответа является одной из основных задач биологии. Проведение таких исследований направлено на лечение заболеваний, связанных с изменениями в восприятии клетками внешних сигналов - диабет, рак, болезнь Альцгеймера (Pires-daSilva et al., 2003).

Известно, что за узнавание сигналов в клетке отвечают белки - рецепторы, которые активируют внутриклеточные мишени. Зачастую заболевания, сопряженные с изменением восприятия клеткой сигналов, связаны с мутациями в рецепторах (Pires-daSilva et al., 2003). Именно поэтому исследования активационных механизмов работы рецепторов лежат в основе современных биомедицины и фармакологии.

Не только у животных, но и у растений восприятие клетками сигналов необходимо для быстрой адаптации. Идентификация и изучение рецепторов растений значительно отстает от исследований, проведенных на млекопитающих. В связи с этим большой интерес представляет изучение рецепторов растений, для которых известна функция лигандов.

Среди сигнальных молекул, играющих важную роль в развитии взаимодействий растений с микроорганизмами, особое значение имеют соединения - производные хитина - хитоолигосахариды и липохитоолигосахариды. Такие молекулы выделяют патогенные и симбиотические микроорганизмы, при этом они очень похожи по своей структуре, однако вызываемые ими ответные реакции противоположны.

Индукторами развития симбиоза между бобовыми растениями и бактериями порядка *Rhizobiales* являются бактериальные липохитоолигосахариды - Nod-факторы. Они состоят из нескольких остатков N-ацетилглюкозамина (3-6), соединенных β -1,4-гликозидной связью, содержат жирную кислоту на невозстанавливаемом конце, а также ряд других заместителей (Spaink, 1991; Denarie et al., 1993). В результате взаимодействия с Nod-факторами у растений активируется комплекс ответных реакций, что приводит к развитию на корнях азотфиксирующих клубеньков. До сих пор представления о молекулярных механизмах рецепции Nod-факторов остаются далекими от понимания. Это определяет актуальность и важность поиска рецепторов к этим сигнальным молекулам, а также изучения принципов их работы.

Оказалось, что в узнавание Nod-факторов могут быть вовлечены рецептор-подобные киназы с LysM-мотивами во внеклеточном домене (LysM-ППК). Впервые они были выявлены у лядвенца японского *Lotus japonicus* - *LjNFR5* и *LjNFR1*, обе они необходимы для инициации развития симбиоза (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; 2007). Позже гомологи генов *LjNFR5* и *LjNFR1* были найдены и у других бобовых растений - люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula* Gaertn. (*MtNFP* и *MtLYK3*) и гороха посевного *Pisum sativum* L. (*PsSym10* и *PsSym37*) (Madsen et al., 2003; Zhukov et al., 2008). Исследования по влиянию ризобий, выделяющих Nod-факторы с измененной структурой, показали, что их рецепция у гороха и люцерны может быть организована более сложным образом, чем у *L. japonicus*. Была предложена гипотеза: в распознавание Nod-факторов у этих растений вовлечены два типа рецепторов, контролирующих

разные этапы развития симбиоза. Один из рецепторов, «сигнальный», контролирует развитие ранних симбиотических реакций, а другой - рецептор «проникновения» - вовлечен в регуляцию более поздних стадий симбиоза (развитие инфекции и органогенез клубенька). Это предположение согласуется с анализом мутантов люцерны и гороха по генам, кодирующим LysM-РПК. Анализ мутантов показал, что *MtNFP* и *PsSym10* могут быть необходимы для инициации симбиоза, тогда как *MtLYK3* и *PsSym37* контролируют более поздние стадии развития симбиоза.

Однако данные о том, что *MtNFP* и *PsSym10* обладают неактивными киназными доменами (не способны к авто- и трансфосфорилированию) (Madsen et al., 2003), а также представление о том, что для активации трансмембранных рецепторов необходима их олигомеризация, указывают на участие в контроле развития симбиоза дополнительных рецепторов, которые остаются неизвестными. Это определяет необходимость поиска дополнительных рецепторных киназ, участвующих в передаче сигнала от Nod-фактора, и дальнейшего изучения организации рецепторов и механизмов их активации.

Ранее у гороха были выявлены кандидаты на роль таких рецепторов. Сравнительный анализ развития симбиоза у европейских и афганских сортов гороха позволил выявить ген *Sym2*, определяющий штаммо-специфичный характер инокуляции (Разумовская, 1931). Необходимость выделения штаммами, заражающими афганские сорта гороха, Nod-факторов с ацетилом на невозстанавливаемом конце молекулы, предполагает функцию *Sym2* в качестве рецептора к этим молекулам. Однако до настоящего времени последовательность гена *Sym2* гороха остается не известной.

Более того, при скрининге библиотеки кДНК инокулированных корней гороха с помощью *LjNFR1*, помимо *Sym37*, был выявлен также ген *K1*, кодирующий LysM-РПК с полноценной киназой. Это определило значительный интерес к выяснению роли этого рецептора в развитии симбиоза.

Наличие у гороха большого числа LysM-рецептор-подобных киназ делает его удобной моделью для изучения рецепции Nod-факторов и позволяет подтвердить или опровергнуть гипотезу о двухэтапном распознавании этих сигналов у бобовых растений с недетерминированным типом клубенькообразования.

Цель исследования. Основной целью диссертационной работы являлось изучение роли LysM-РПК *K1* у гороха *P. sativum* L. при развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Задачи работы:

1. Анализ уровня экспрессии гена *K1* при развитии клубеньков с помощью метода количественной ОТ-ПЦР.
2. Выявление с помощью TILLING подхода мутантов по гену *k1* и их генотипическая и фенотипическая характеристика.
3. Комплементация мутантных генов *k1* и *sym37* с помощью полноразмерных последовательностей этих генов гороха дикого типа для проверки функциональной взаимозаменяемости.
4. Анализ способности рецептор-подобной киназы *K1* формировать олигомерные комплексы с другими известными рецепторными киназами гороха

Sym10 и Sym37 в различных гетерологичных системах (модифицированный FRET-анализ и дрожжевая двугибридная система).

5. Построение схемы работы рецепторов к Nod-факторам у гороха.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы была впервые изучена роль новой LysM-РПК K1 гороха в контроле развития симбиоза с клубеньковыми бактериями. Впервые были найдены с помощью TILLING подхода и фенотипически описаны мутанты по гену *k1*. Наличие двух мутантов с Nod-фенотипом и данные по комплементации позволили сделать вывод о том, что K1 необходим для контроля развития симбиоза у гороха. При этом впервые у бобовых с недетерминированным типом клубеньков охарактеризован рецептор с активным киназным доменом, который в составе гетеролигомерного комплекса участвует в инициации развития симбиоза. Впервые предложена модель работы нескольких олигомерных рецепторных комплексов, участвующих в узнавании Nod-факторов у гороха.

Теоретическое и практическое значение. Полученные в работе данные позволяют предложить новую схему организации работы LysM-содержащих рецепторов при развитии симбиоза гороха с ризобиями

Выполнение работы было поддержано: грантом РФФИ мол_а 16-34-01070 и РНФ 16-16-10043

Апробация работы. По результатам работы были представлены доклады на 16 и 17-ой Международной Пущинской школе - конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» в 2012 и 2013 (г. Пущино), постерные доклады на 19 и 20 международном конгрессе по азотфиксации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей и 7 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы (203 источника). Работа изложена на 112 страницах, содержит 15 рисунков и 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Штаммы микроорганизмов. Для стандартных процедур клонирования использовали *E. coli* DH5 α . Для инокуляций растений гороха был использован меченый *gusA* штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026 (WDCM 966), предоставленный Ахтемовой Г.А. (ФГБНУ ВНИИСХМ). Для трансформации гороха использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* Arqua 1. Трансформацию листьев *Nicotiana benthamiana* проводили с помощью штаммов *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (предоставлен доктором Cullimore, Тулуза, Франция) и *A. tumefaciens* GV3101:pMP90(RK), предоставленный в.н.с. Захарченко Н.С. (филиал института биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова, Пущино, Россия). При работе с дрожжевой двугибридной системой использовали коммерческий штамм *Saccharomyces cerevisiae* MaV203 (Invitrogen, США).

Условия культивирования микроорганизмов. Штаммы *E. coli* культивировали на среде LB (Bertani, 1951) при 37°C. Штаммы ризобий

культивировали в жидкой среде YEB (Krall et al. 2002) при 28°C. Штаммы *Agrobacterium* культивировали в среде TY (Beringer et al., 1974) при 28°C. Штамм дрожжей MaV203 выращивали на среде YPD (Murthy et al., 1975). Селекцию при анализе взаимодействий белков с помощью ДДС вели на синтетической среде (SC, Invitrogen, США) в отсутствие селективирующих агентов.

Условия выращивания растений. Семена *Nicotiana benthamiana* стерилизовали 5 мин 10% гипохлоритом натрия, затем промывали 5 раз водой. Растения выращивали 3 недели при +25°C, длительность светового дня - 16ч, 60% влажности. Семена гороха стерилизовали 5 мин концентрированной серной кислотой, затем 5 раз промывали водой. Семена проращивали на 1% водном агаре в темноте в течение 4-5 дней при комнатной температуре. После прорастания растения переносили в горшки с вермикулитом, политым жидкой средой Jensen (van Brussel et al., 1982). Растения выращивали при +21°C, длительности светового дня - 16 ч, 60% влажности. Инокуляцию проводили, добавляя 1 мл суспензии *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026 (OD₆₀₀ = 0,5).

Количественная ПЦР, совмещенная с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Выделение РНК проводили с помощью реагента PureZol (Bio-Rad, США). кДНК была синтезирована из 2,5 мкг РНК с помощью обратной транскриптазы RevertAidH (Thermo Scientific, США) с использованием олиго(дТ) праймеров. ПЦР в реальном времени проводили с использованием прибора CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) и смеси qPCRmix-HSSYBR (Евроген, Россия). Уровень мРНК был нормализован относительно убиквитина и актина. Значения уровней экспрессии были представлены как отношения уровней экспрессии генов в варианте с инокуляцией к контролю (растениям без инокуляции).

Создание конструкций для трансформации растений и дрожжей. Для создания конструкций использовали специфические праймеры и метод с использованием эндонуклеаз рестрикции и последующего лигирования, либо с помощью метода гомологичной рекомбинации. Амплификацию генов проводили с помощью высокоточной полимеразы PhusionFlash. Полученные плазмиды вводили в клетки *E. coli* методом электротрансформации. Доменная структура изучаемых белков была предсказана с использованием TMHMM Serverv. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Последовательность сигнального пептида выявляли, пользуясь сервером - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>.

Временная трансформация листьев *Nicotiana benthamiana*. *A. tumefaciens* LVA 4404 или GV3101:pMP90 (RK), несущие векторы для экспрессии полноразмерных копий генов, выращивали ночь в жидкой среде TY при 28°C, осаждали при 2000g и ресуспендировали в буфере (10мМ MES-KOH, 10мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ацетосирингон) до плотности культуры OD₆₀₀ = 0.5. Для трансформации брали 2-3 лист от земли. Иголкой делали прокол в листьях, прижимая к месту прокола шприц, вводили бактерии. Растения анализировали через 48 – 96 ч после инфильтрации. Локализацию белков наблюдали, используя конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (LSM 510 META NLO, CarlZeiss).

Выделение белков из листьев *N. benthamiana*, электрофорез белков в ПААГ и вестерн-блот гибридизация. Белковые пробы, полученные из листьев, разделяли в 12% ПААГ по методу Laemmli (1970) и переносили на нитроцеллюлозу. Для детекции белков использовали антитела к YFP и RFP

(Invitrogen). Для визуализации использовали антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой. Полосы выявляли после реакции с 4-хлор-1-нафтолом.

Трансформация растений с помощью *A. rhizogenes*. У 10-дневных проростков гороха обрезали корень в области гипокотилия, на место среза наносили бактерии. Проростки помещали в стеклянную банку с твердой средой Йенсен агар и инкубировали в течение 10-12 дней в фитотроне при +21°C, влажности 60% и режиме день/ночь 16/8 ч. После формирования каллуса растения переносили на среду Emergence (Limpens et al., 2004) с цифотоксином (150 мкг/мл) для подавления развития агробактерий. Через неделю растения переносили на среду Emergence без антибиотика на 4-5 дней для развития корней. Затем растения переносили в вермикулит и инокулировали *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM1026.

Дрожжевой двугибридный анализ. Для анализа использовали систему на основе GAL4 транскрипционного фактора (Invitrogen, США). Взаимодействие белков определяли по способности дрожжевых колоний расти на селективных средах. Оценку силы взаимодействия вели с помощью контрольных плазмид, предложенных производителем.

Поиск мутантных линий с помощью метода индуцированных локальных нарушений в геномах (TILLING). Поиск мутантов был осуществлен с помощью методики TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes — поиск индуцированных локальных нарушений в геномах). Анализ проведен на TILLING платформе группы исследования геномики растений (URGV, INRA, Франция). Изменения в аминокислотном составе, которые могут повлиять на функцию белка, были предсказаны с помощью программы SIFT. Мутантные линии были получены в М5 поколении и проверены на гомозиготность по гену *K1*.

Гистохимическая окраска и микроскопия. Корни и клубеньки окрашивали в течение ночи при +37°C циклогексиламмониевой солью 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуронид (X-Gluc) (Fermentas, США) (Voroshilova et al., 2001). Фиксацию окрашенных корней и клубеньков, а также получение срезов проводили по методу, описанному (Kitaeva et al., 2016). Использовались антитела MAC57 против компонентов ризобияльной клеточной стенки и MAC265 против инфекционных нитей, в качестве вторых антител использовали AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Срезы были проанализированы с помощью лазерной сканирующей конфокальной системы LSM 510 META (CarlZeiss, ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ экспрессии гена *K1* у гороха в процессе развития симбиоза с ризобиями с помощью количественной ОТ-ПЦР.

Для изучения роли *K1* в развитии симбиоза был оценен уровень экспрессии кодирующего ее гена *K1* в ответ на инокуляцию ризобиями, с 1 до 28 день после инокуляции (дни), с помощью количественной ОТ-ПЦР (Рис.1). Было проведено сравнение с уровнями экспрессии генов *Sym10* и *Sym37*, кодирующих другие известные LysM-РПК, для которых ранее было уже показано участие в симбиозе (Madsen et al., 2003, Zhukov et al., 2008). Анализ показал, что экспрессия *K1* увеличивалась на ранних этапах в 1,8 раза (2 дни), но в дальнейшем уровень экспрессии изменялся мало (Рис. 2). Однако несколько увеличенным уровень

экспрессии был в клубеньках 14 дни (в 1,5 раза). Сходным образом уровень экспрессии *Sym10* начинал повышаться на 2 дни (в 3,1 раза), достигая максимума на 4 дни, а затем оставался высоким на последующих этапах, а также в зрелом клубеньке (14 – 21 дни). Экспрессия гена *Sym37* также увеличивалась на ранних сроках (начиная со 2 дни, в 2,8 раза), однако наиболее существенно она возрастала, начиная с 5 дни и достигая максимума на 14 дни. Таким образом, все три гена *K1*, *Sym10* и *Sym37* показали повышенный уровень экспрессии на начальных этапах формирования симбиоза и в процессе развития клубеньков. Следовательно, активация гена *K1* может свидетельствовать о его вовлечении в контроль как ранних, так и более поздних этапов развития симбиоза.

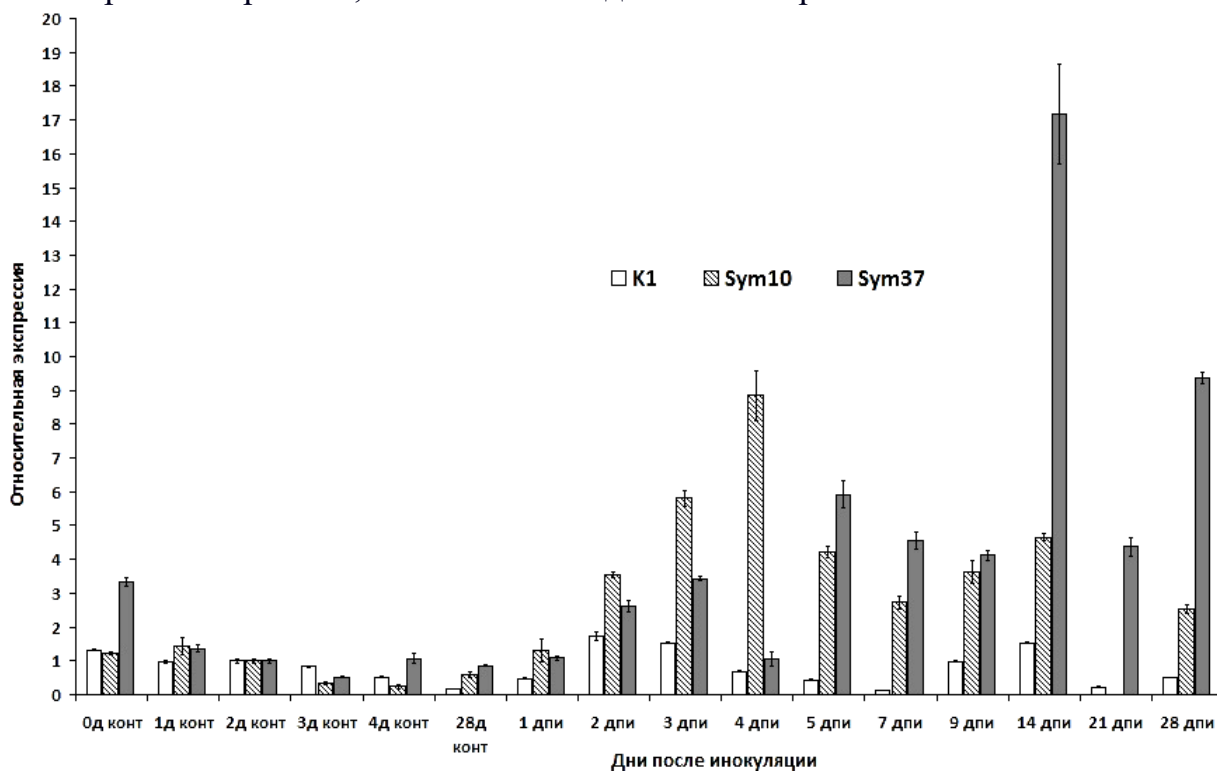


Рисунок 1. Анализ экспрессии генов *K1*, *Sym10* и *Sym37* при инокуляции гороха с помощью количественной ОТ-ПЦР. Бары - \pm SEM трех аналитических повторностей. На оси ординат указаны значения отношения уровней экспрессии генов в варианте с инокуляцией к контролю (варианте без инокуляции) (количество раз).

2. Поиск мутантов гороха по гену *k1* с помощью TILLING подхода, их генотипическая и фенотипическая характеристика.

Подбор праймеров и условий их работы для поиска в коллекции TILLING мутантов, выполнен диссертантом самостоятельно. Фенотипическая и генотипическая характеристика мутантных линий выполнена под руководством внс Долгих Е.А.

Поиск мутантов по гену *k1* был проведен с помощью TILLING подхода. Поиск проводили для 4 фрагментов гена (размером около 400 п.о.). Проведенный анализ позволил обнаружить 17 мутантных линий (Табл.1). С помощью программы SIFT среди них были выявлены 3 линии (817, 885 и 2265), у которых миссенс-мутации могли приводить к нарушению функции белка (Табл.2). Для фенотипической характеристики мутантных линий проводили анализ формирования у них клубеньков на корнях при инокуляции *gusA*- меченым *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026.

Таблица 1. Результаты TILLING анализа.

Фрагмент 1 гена *K1*: 180-684

Название праймера	Адаптор + Праймер		Длина фрагмента
Fw	TTCCSTACACGACGCTCTCCGATCTCAT GCSTTTAGTTGAACTCCCAAAC		420 п.о.
Rv	AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAC TATCCCACTTCTCTCTA		
Семейство	Мутация	Позиция в белке	
2265	C→T	S59F	нарушение
914	C→T	S79S	-
1751	C→T	T148I	толерантная
817	C→T	P169S	нарушение
627	G→A	L128L	-
1063	G→A	C151Y	толерантная

Фрагмент 3 гена *K1*: 1248-1761

Название праймера	Адаптор + Праймер		Длина фрагмента
Fw	TTCCSTACACGACGCTCTTCCGA TCTAAACITATGAAAACAACITTCGGT		490 п.о.
Rv	AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT CTAACCTGTTCATGCAAAAAGC		
Семейство	Мутация	Позиция в белке	
1015	G→A	G282E	толерантная
885	G→A	G332D	нарушение
1781	G→A	-	-

Фрагмент 2 гена *K1*: 963-1290

Название праймера	Адаптор + Праймер		Длина фрагмента
Fw	TTCCSTACACGACGCTCTTCCG ATCTGTCTTGATGGTGTGTGAGGCTA		327 п.о.
Rv	AGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCTACTCGAGGCTTAACGATAAACCGA		
Семейство	Мутация	Позиция в белке	
1486	C→T	L271F	толерантная
1324	C→T	-	-
885	G→A	G332D	нарушение
1781	G→A	-	-

Фрагмент 4 гена *K1*: 1778-2225

Название праймера	Адаптор + Праймер		Длина фрагмента
Fw	TTCCSTACACGACGCTCTTCCGA TCTCATGTTTAAATTTACSTACAAAT		440 п.о.
Rv	AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCG ATCTAACCATGATCAATAGTTTAAATTT		
Семейство	Мутация	Позиция в белке	
1232	G→A	R425Q	Толерантная
1317	G→A	E432K	Толерантная
2405	G→A	интрон	-

Таблица 2. Генотипическая характеристика мутантов по гену *k1*.

Линия	Мутация	Позиция в ДНК	Позиция в белке, замена а/к	Расположение
817	C→T	571	Pro169Ser	LysM3 мотив ECD
885	G→A	1445	Gly332Asp	Киназный домен
2265	C→T	242	Ser59Phe	LysM1 мотив ECD

Анализ **885 линии** показал полное отсутствие реакций на инокуляцию ризобиями, наблюдалось только редкое ветвление корневых волосков (Рис.2). С очень низкой частотой в корнях мутанта образовывались короткие abortивные инфекционные нити, связанные с маленькими скрученными корневыми волосками (Табл. 3), развитие которых останавливалось в эпидермисе (Рис.2).

Таблица 3. Деформации, скручивания корневых волосков и рост инфекционных нитей у дикого типа Sameor, 885 и 817 мутантных линий.

Вариант	Деформации и скручивания корневых волосков	Рост инфекционных нитей	Количество клубеньков
Дикий тип Sameor	301,7 ± 13,4	8, 3 ± 2,8	46,57±1,2
885 линия	4,8 ± 1,3	2,8 ± 0,9*	0
817 линия	125,2 ± 11,2	142,2 ± 4,7 (101,8± 6,6) **	0

Данные представляют число (± SEM) деформированных и скрученных волосков, а также количество инфекционных нитей на 21 dpi на 100 полей зрения микроскопа (20x увеличение). Различия между мутантной линией и растениями дикого типа достоверны (P> 0,95). *Были выявлены только abortированные инфекционные нити в маленьких корневых волосках (Nod⁻ фенотип). ** Развитие большинства выявленных инфекционных нитей были abortировано в эпидермисе.

У линий 885 и 817 не было выявлено клубеньков на корнях в ответ на инокуляцию (*Nod*⁻ фенотип). У линии 2265 на 14 дни количество клубеньков было сравнимо с количеством клубеньков у растений дикого типа ($38,7 \pm 3,1$ на 1 растение у линии 2265 и $41,7 \pm 5,2$ у дикого типа), однако, только часть из них ($22,3 \pm 3,7$) была инфицирована или находилась на начальной стадии заражения (Рис. 5Б). На 21 дни число клубеньков было сравнимо с количеством у дикого типа ($43 \pm 0,97$ у линии 2265 и $46,57 \pm 1,23$ у дикого типа; $P < 0,05$), структура клубеньков не отличалась от структуры клубеньков у растений дикого типа (Рис. 5 Г, Д).

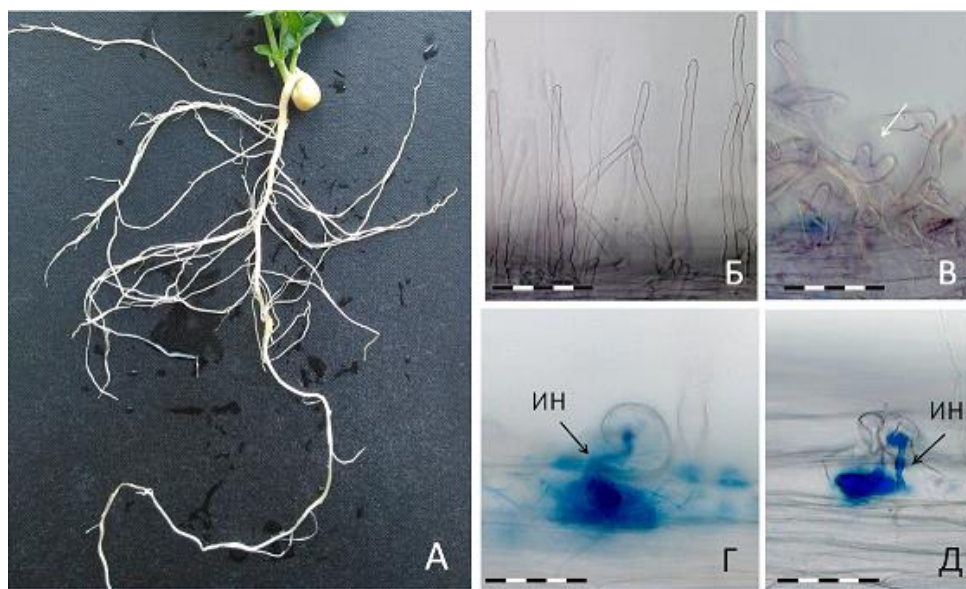


Рисунок 2. Фенотипический анализ мутантной линии 885 по гену *k1*. А – внешний вид растений линии 885, инокулированных *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026-*gusA* на 21 дни (*Nod*⁻ фенотип). Б – внешний вид корневых волосков без деформаций. В – редкие ветвления корневых волосков. Г, Д – формирование abortивных ИН, связанных с маленькими корневыми волосками. Шкала – Б – 200 мкм, В, Г, Д - 50 мкм. ИН – инфекционная нить.

У линии 817 мутация в гене *k1* приводила к нарушению развития инфекционных нитей: нарушалась полярность их роста, поэтому они часто имели сас-подобное строение (от англ. sac – мешок). Наблюдали формирование примордиев клубеньков, однако они оставались неинфицированными из-за отсутствия выхода бактерий из инфекционных нитей (Рис. 3).

Анализ мутантной линии 2265 показал нарушение развития инфекционных нитей из-за изменения полярности роста (Рис. 4А). Это приводило к значительной задержке развития инфекции на 14 дни - снижению количества клубеньков и увеличенному по сравнению с диким типом количеству инфекционных нитей ($322 \pm 25,1$ на растение у линии 2265 и $115,8 \pm 12,3$ у дикого типа) на 14 дни.

Таким образом, в результате проведенного анализа были выявлены 3 различные мутантные линии по гену *k1*, при этом у двух линий мутации приводили к нарушению развития клубеньков (*Nod*⁻ фенотип). Это подтверждает гипотезу об участии *K1* в развитии симбиоза гороха с ризобияльными бактериями.

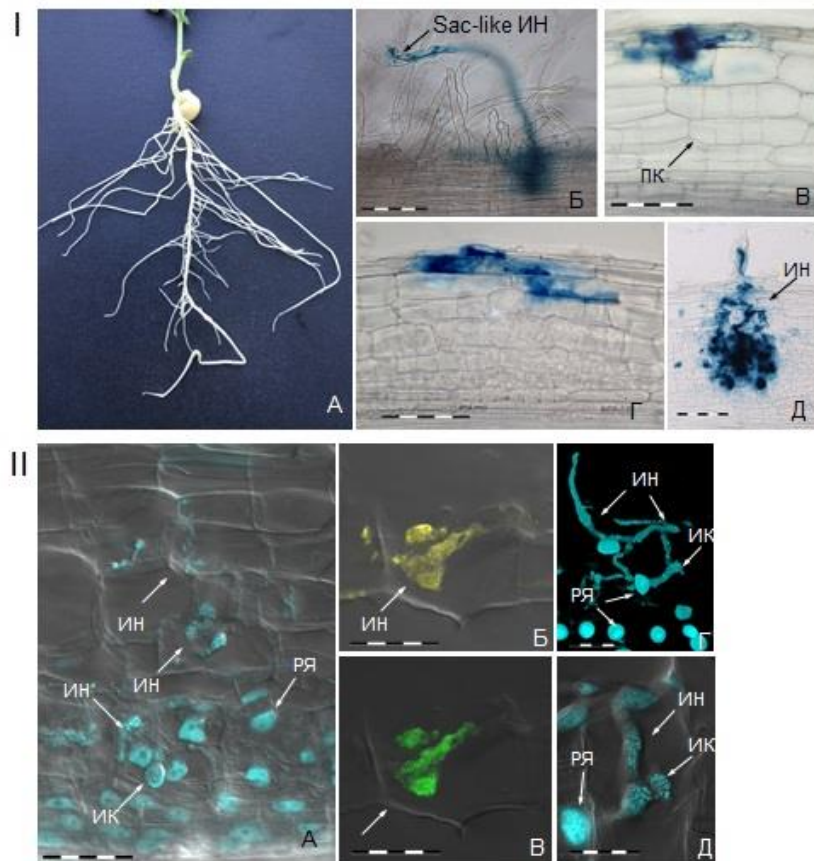


Рисунок 3. Фенотипический анализ мутантной линии 817 по гену *k1*. I. Микроскопический анализ 817 линии. А – внешний вид корней линии 817, инокулированных ризобиями на 21 дни (*Nod⁺* фенотип), Б - скрученный корневой волосок с инфекционной sac-подобной нитью, В, Г – примордий клубенька на 21 дни, Д - рост sac-подобной ИИ без выхода бактерий. Шкалы - Б, В - 50 мкм, Г, Д – 100 мкм II. Гистохимический анализ 817 линии. А – ИИ и отсутствие выхода бактерий из ИИ и инфекционных капель (бактерии и ядра синие), Б, В – отсутствие выхода бактерий из ИИ (нить – желтая, бактерии – зеленые). Г – 3D реконструкция ИИ (бактерии и ядра растительных клеток голубые) показала отсутствие выхода бактерий из ИИ, Д – Отсутствие выхода бактерий из ИИ. Шкалы – А, Г, Д - 20 мкм, Б, В - 10 мкм. ПК – примордий клубенька, ИИ - инфекционная нить, ИК – инфекционная капля, РЯ – растительное ядро. Толщина срезов – 50мкм. Белыми стрелками отмечены ИИ, инфекционные капли и ядра растительных клеток.

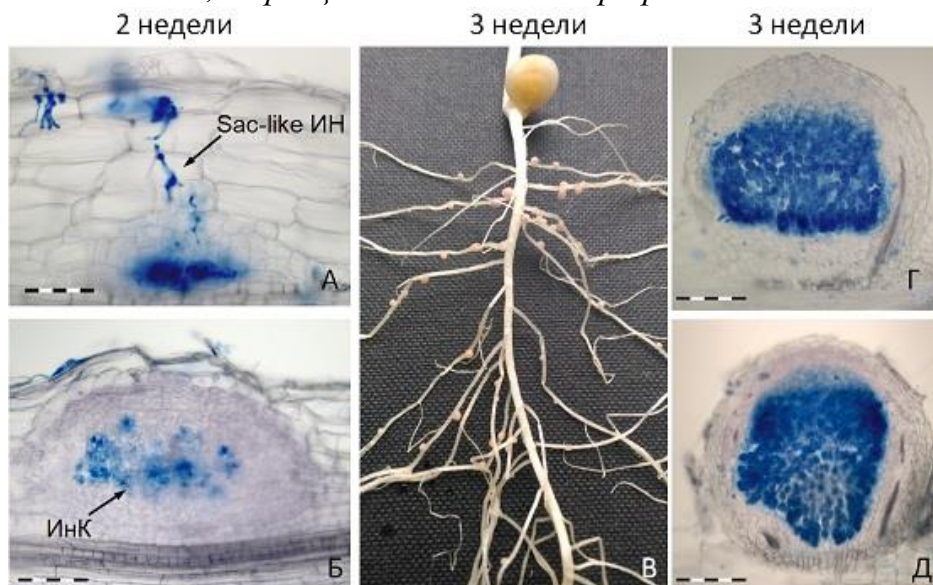


Рисунок 4. Фенотипический анализ мутантной линии 2265 по гену *k1*. А – формирование клубенькового примордия и развитие *sac*-подобной ИИ у мутантной линии 2265 на 14 дни, Б – развитие инфицированного клубенька у линии 2265, В – внешний вид корней линии 2265 на 21 дни, Г - продольный срез клубенька линии 2265 на 21 дни, Д - продольный срез клубенька растений исходной линии *Sateor* на 21 дни. ИнК – инфицированные клетки. ИИ – инфекционные нити. Шкалы - А, Б – 50 мкм, Г, Д -100 мкм. Толщина срезов – 50 мкм.

3. Анализ взаимодействия *LysM*-ППК *Sym10*, *Sym37* и *K1* гороха при трансформации листьев *N. benthamiana* для временного синтеза белка.

Получение генетических конструкций для синтеза белков *K1* и *Sym10* выполнено диссертантом самостоятельно. Эксперименты по трансформации листьев *N. benthamiana* были проведены под руководством внс Долгих Е.А.

Для трансформации были использованы два различных штамма *A. tumefaciens* LBA 4404 и GV3101. Инfiltrация агробактерий, содержащих конструкции для синтеза белков, слитых с флуоресцентными белками – желтым (YFP) и красным (RFP), приводила к их появлению в плазматической мембране клеток листьев при моно-трансформации, что соответствует представлению о том, что они являются трансмембранными рецепторами (Рис.5). О синтезе белков свидетельствовали результаты вестерн-блот анализа с антителами против RFP и YFP. Были выявлены белки с ожидаемой молекулярной массой (Рис. 5). При использовании штамма LBA4404 синтез был более эффективным по сравнению со штаммом GV3101 (Рис. 5). Для того, что избежать подавления синтеза белков при трансформации *N. benthamiana* дополнительно вносили вектор, необходимый для синтеза P19 (вирусного белка). При использовании P19 было показано увеличение уровня синтеза белков (Рис. 5). Реакция гиперчувствительности не развивалась при моно-трансформации *K1* и *Sym10*.

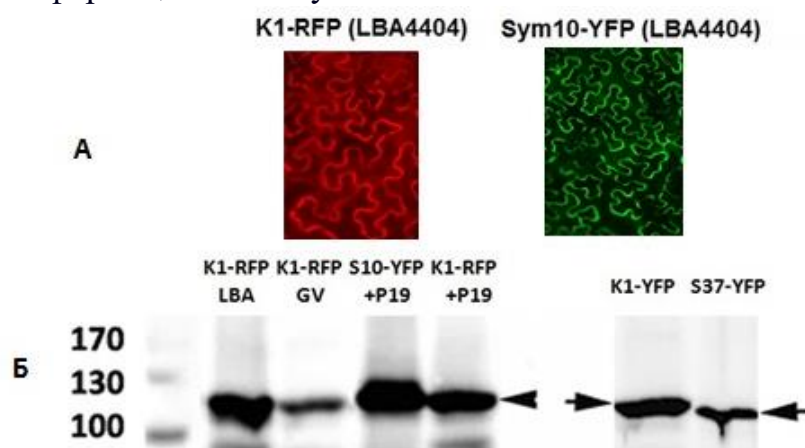


Рисунок 5. Синтез *K1*-RFP, *Sym10*-YFP и *Sym 37*-YFP в листьях *N. benthamiana* с использованием конструкций с промотором *CaMV 35S*. А – локализация полноразмерных белков в плазматических мембранах. Реакция гиперчувствительности при моно-трансформации не развивалась. Б – Вестерн-блот-анализ *K1*, *Sym10* и *Sym 37* белков в листьях *N. benthamiana* с помощью анти-RFP и анти-YFP антител.

На следующем этапе был осуществлен совместный синтез белков в различных комбинациях. Было показано, что совместный синтез *Sym10/K1* и *Sym10/Sym37* приводит к развитию реакции гиперчувствительности через 48 часов после трансформации (появление «мокнущих» участков в результате

разрушения клеток), что сопровождается некрозом тканей листьев через 5-6 дней (Рис.6). В качестве контроля был использован LRR-рецептор Sym19 с активным киназным доменом, который участвует в передаче сигнала от Nod-фактора при симбиозе (Schneider et al, 1999). Однако совместный синтез Sym10/Sym19 не вызывал развитие реакции гиперчувствительности. Поскольку синтез отдельных белков не приводил к гибели клеток, можно сделать вывод о том, что развитие реакции гиперчувствительности является специфичной реакцией при совместном синтезе изучаемых белков. Развитие такой реакции свидетельствует о том, что данные рецепторы могут активировать путь передачи сигнала, ведущий к развитию иммунного ответа у не бобового растения. Отсутствие реакции при совместном синтезе Sym10/Sym19, показывает специфичность взаимодействия между изучаемыми белками. Вместе с тем, мы наблюдали развитие реакции гиперчувствительности при совместном синтезе Sym10/Sym37, что указывает на то, что Sym10 способен взаимодействовать с двумя структурно сходными LysM-РПК K1 и Sym37. У мутантов по гену *sym37* нарушение развития симбиоза наблюдается на стадии формирования инфекционных нитей, что указывает на участие рецептора Sym37 в контроле инфекционного процесса у гороха (Zhukov et al., 2008). Способность Sym10 формировать комплекс с Sym37, необходимым для развития инфекции, позволяет предположить, что Sym10 также может быть вовлечен в контроль развития инфекции.

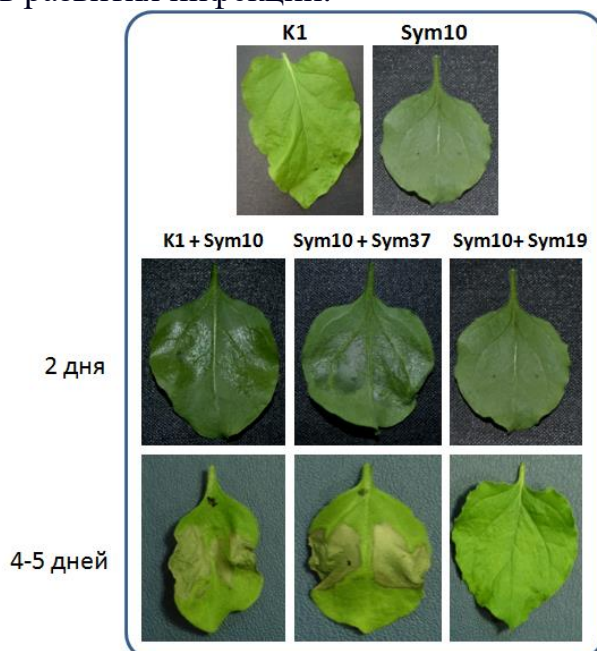


Рисунок 6. Анализ развития реакции гиперчувствительности при временном синтезе белков в листьях *N. benthamiana* LysM-РПК Sym10, K1 и Sym37. Синтез был осуществлен в результате трансформации листьев штаммами *A. tumefaciens*. Развитие реакции гиперчувствительности наблюдали при совместном синтезе Sym10/ K1 и Sym10/ Sym37 и не наблюдали при синтезе Sym10/ Sym19.

4. Анализ взаимодействий белков с помощью дрожжевой двугибридной системы.

Все изучаемые LysM-РПК гороха имеют трансмембранные домены и сигнальные пептиды, которые могут быть узнаны дрожжевой транспортной

системой. Поскольку взаимодействие белков в ДДС происходит в ядрах дрожжей, было проанализировано взаимодействие только внеклеточных доменов (ECD) Sym10, K1 и Sym37 (без сигнальных пептидов и трансмембранных доменов) (Рис. 7). Внеклеточный домен *AtCERK1* арабидопсиса был использован как контроль, поскольку является рецептором, не участвующим в развитии симбиоза. Было показано, что Sym10-ECD может взаимодействовать с K1-ECD и Sym37-ECD, но не образует комплекса с *AtCERK1*-ECD. Это позволяет сделать вывод о том, что между внеклеточными доменами Sym10 и K1, а также Sym10 и Sym37 могут формироваться гетероолигомерные комплексы. Это согласуется с данными, полученными при совместном синтезе этих рецепторов в листьях *N. benthamiana*. Также было выявлено сильное взаимодействие между Sym37-ECD и CERK1-ECD. При этом между K1-ECD и CERK1-ECD наблюдали только слабую реакцию (Рис. 7). Это может свидетельствовать о роли Sym37 и K1 не только в развитии симбиоза, но и в регуляции симбиоза с грибами арбускулярной микоризы и иммунном ответе растений при патогенезе. Сильное взаимодействие Sym37-ECD и CERK1-ECD может также свидетельствовать о том, что CERK1-подобный белок совместно с Sym37 может быть вовлечен в работу на поздних этапах симбиоза. Также было показано, что мутация в линии 2265 не оказывает влияние на взаимодействие внеклеточного домена K1 с Sym10, тогда как мутация в линии 817, напротив, приводит к невозможности такого взаимодействия.

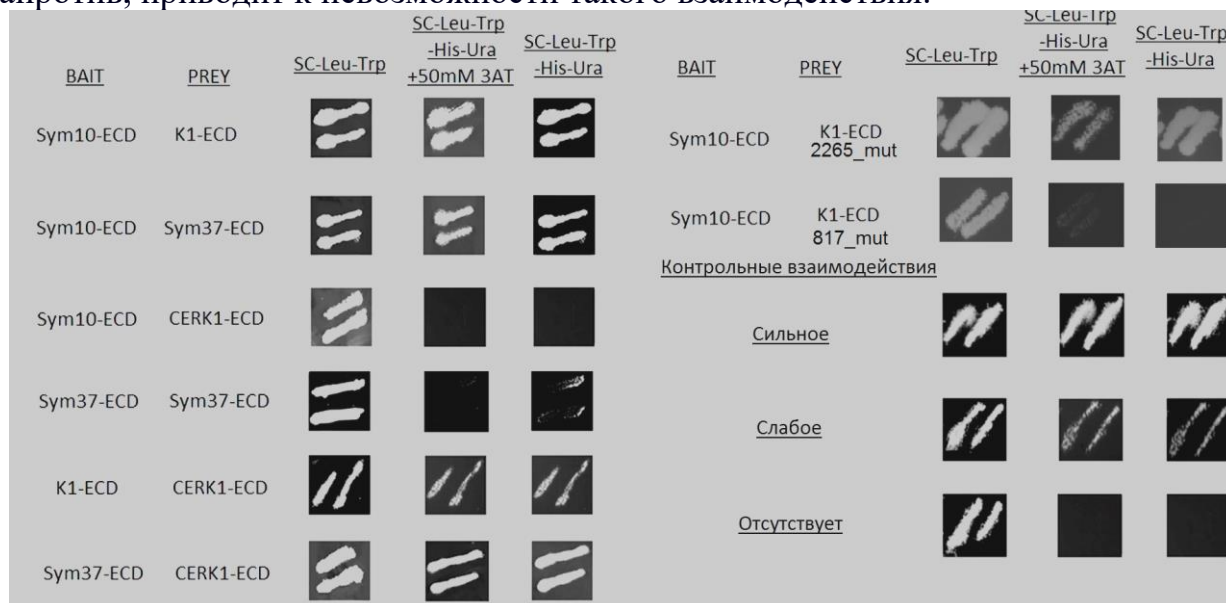


Рисунок 7. Анализ взаимодействия внеклеточных доменов *LysM*-РПК K1, *Sym37* и *Sym10* гороха с помощью дрожжевой двугибридной системы. После трансформации дрожжей штамма *S. cerevisiae* Mav203 конструкциями для синтеза белков анализировали возможность их роста на селективной среде без лейцина и триптофана (проверка на наличие двух векторов в клетках дрожжей). Рост на селективной среде в присутствии 50мМ 3АТ (3-амино-1,2,4-триазол) указывает на наличие взаимодействия. В качестве контроля были использованы векторы, предложенные производителем (Invitrogen).

5. Сравнительный анализ роли рецепторов K1 и Sym37 у гороха при развитии симбиоза.

5.1 Комплементация гена *K1* мутантной линии 817 полноразмерной последовательностью этого гена исходной линии Sameor.

Для анализа возможности мутантов по гену *k1* восстанавливать способность формировать симбиоз была проведена трансформация растений линии 817 конструкциями, содержащими полноразмерную последовательность гена *K1* и *Sym37* исходной линии Sameor. Безинтронные последовательности генов были клонированы в вектор pB7WG2D под промотором 35S. В качестве контроля использовали вектор pB7WG2D, в котором ген *GUS*, кодирующий β-глюкуронидазу, был также клонирован под промотором 35S. Так же в качестве негативного контроля использовали вектор pB7WG2D, в котором последовательность гена *K1*, несущая мутацию аналогичную мутации в линии 817, был клонирована под промотором 35S.

После инокуляции растений гороха ризобиями на 28 дни наблюдали формирование клубеньков на трансгенных корнях, полученных при трансформации pB7WG2D-*K1* (17 корней, $8,52 \pm 1,05$ клубеньков на один корень ($P < 0.05$, по t-критерию Стьюдента). Формирования клубеньков не наблюдали на корнях гороха, содержащих конструкцию pB7WG2D:*Sym37* (14 трансгенных корней) и pB7WG2D:*GUS* (15 трансгенных корней) (Рис. 8).

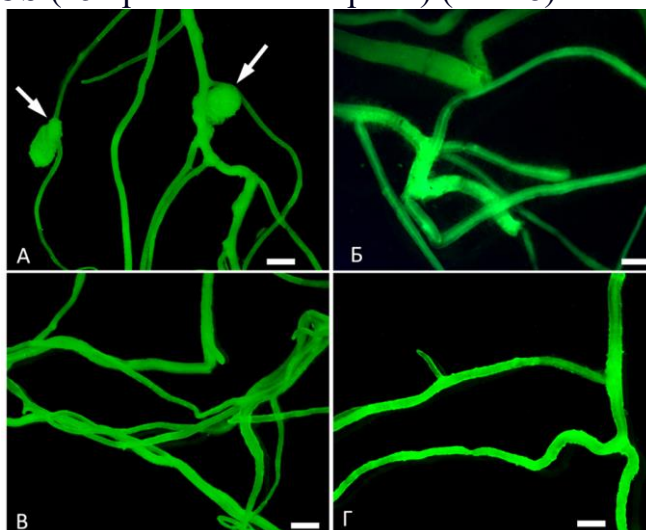


Рисунок 8. *Комплементация мутантной линии 817 по гену k1.* Для трансформации растений с помощью *A. rhizogenes* были использованы конструкции pB7WG2D:*K1* (А) и pB7WG2D:*Sym37* (Б), содержащие полноразмерные кодирующие последовательности генов *K1* и *Sym37* исходной линии Sameor. В качестве контроля использовали растения, трансформированные pB7WG2D: *GUS* (В) и pB7WG2D:p35S:*K1*:817, несущую мутантную копию *k1*, в которой мутация соответствовала мутации в линии 817. Образование клубеньков оценивали на 28 дни. Шкала: 2 мм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что фенотип Nod⁻ 817 линии определяется только мутацией в гене *k1*, а не влиянием других мутаций, полученных с помощью TILLING подхода. Кроме того, неспособность полноразмерной кодирующей последовательности гена *Sym37*, имеющего высокий уровень сходства с геном *K1*, восстанавливать способность к формированию клубеньков, свидетельствует о разной функции кодируемых этими генами рецепторов.

5.2. Коплементация линий K24 и RisNod4, несущих мутацию по гену *sym37*.

На основе высокого уровня сходства нуклеотидных последовательностей генов *Sym37* и *K1* было выдвинуто предположение о том, что *K1* и *Sym37* могут функционально замещать друг друга при развитии симбиоза. Однако ген *Sym37* был не способен замещать *K1* у мутанта 817. Мы проверили способность *K1* замещать *Sym37* у мутантов RisNod4 и K24 (*Nod*⁻ - мутантов) с помощью трансформации растений полноразмерными кодирующими последовательностями генов *Sym37* и *K1*. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Результаты комплементации мутантов K24 и RisNod4 по гену *sym37* с помощью последовательностей генов дикого типа *K1* и *Sym37*.

Мутантная линия	Конструкция	Число трансгенных корней	Число клубеньков на 1 корне
K24 (<i>sym37</i>)	pB7WG2D: <i>K1</i>	21	9,73 ± 2,05
	pB7WG2D: <i>Sym37</i>	22	9,92 ± 2,16
	pB7WG2D: <i>GUS</i>	27	Нет
RisNod4 (<i>sym37</i>)	pB7WG2D: <i>K1</i>	23	9,54 ± 1,71
	pB7WG2D: <i>Sym37</i>	20	9,72 ± 1,55
	pB7WG2D: <i>GUS</i>	25	Нет

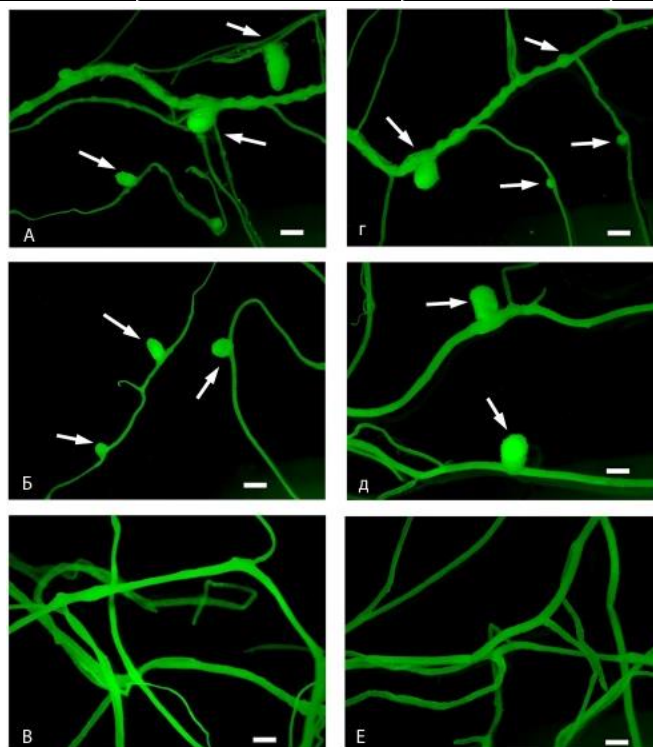


Рисунок 9. Коплементация мутантов K24 (А, Б, В) и RisNod4 (Г, Д, Е) по гену *sym37*. Были использованы конструкции pB7WG2D:*K1* (А, Г), pB7WG2D:*Sym37* (Б, Д) и pB7WG2D: *GUS* (В, Е) (контроль). Трансгенные растения были инокулированы *R. leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026. Образование клубеньков проверяли на 28 дни. Шкалы: А, Б, Г, Д- 2 мм; В, Е- 1 мм.

При трансформации мутантов по гену *sym37* полноразмерной последовательностью гена *K1* происходило восстановление способности формировать клубеньки (Рис. 9). Эти данные можно объяснить тем, что *K1* не только участвует в инициации развития симбиоза, но и контролирует развитие инфекции и эндоцитоз бактерий в клетки растений. Можно предположить, что *K1* работает дополнительно на этапе уже после активации рецепторного комплекса *Sym10/Sym37*, поэтому способен восстанавливать функцию *Sym37* (Рис.10). Отсутствие восстановления этой функции у мутантов по гену *sym37 in vivo* может быть связано с тем, что работа комплексов *Sym10/K1* и *Sym10/Sym37* может способствовать выработке сигнала, который необходим для активации событий, определяющих эндоцитоз бактерий с участием рецептора *K1*. В пользу этого предположения свидетельствуют данные по изучению 817.

6. Гипотеза об организации работы LysM-РПК гороха при развитии симбиоза с ризобиями.

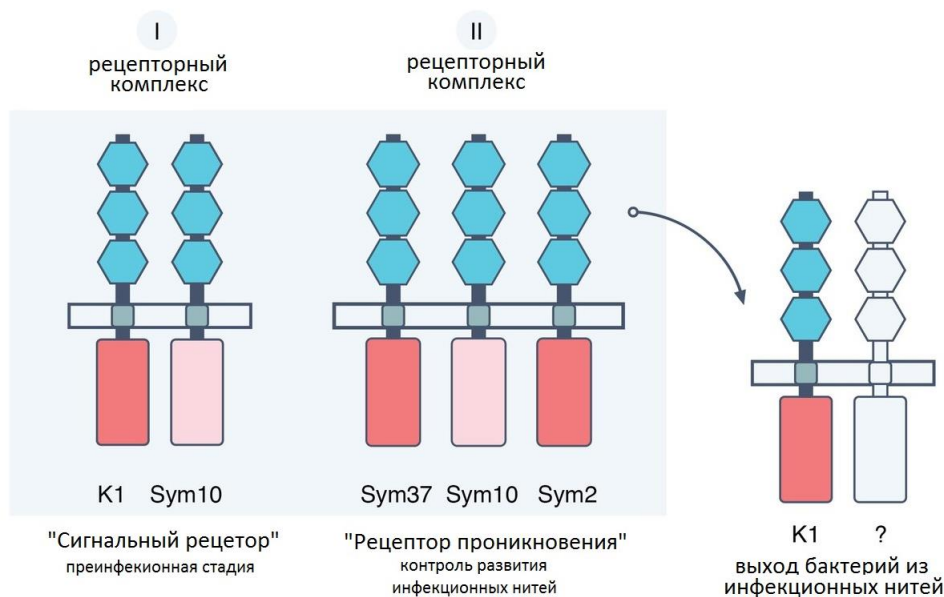


Рисунок 10. Схема организации работы рецепторных комплексов при узнавании Nod-факторов у гороха.

В результате проведенных исследований было получено экспериментальное подтверждение гипотезы о возможности участия двух типов рецепторов в контроле развития симбиоза у гороха, работающих на разных стадиях этого процесса. На основании полученных результатов может быть предложена модель работы не отдельных рецепторов, а олигомерных рецепторных комплексов *Sym10/K1* и *Sym10/Sym37*, контролирующих развитие симбиоза. При этом комплекс *Sym10/K1* необходим для инициации симбиоза. Рецепторы *Sym10/Sym37* могут участвовать в регуляции развития инфекционного процесса у гороха (инициации роста инфекционных нитей). Следует отметить, что ранее способность контролировать развитие инфекции, зависимым от структуры Nod-факторов образом, была показана для линий гороха афганского и европейского происхождения, несущих разные аллели гена *sym2* (*sym2^A* и *sym2^E*). В таком случае, в составе олигомерного рецепторного комплекса *Sym10* и *Sym37* может быть еще дополнительный рецептор *Sym2* (*Sym10/Sym37/Sym2*), контролирующий развитие инфекционного процесса (Рис. 10). С активацией этих

комплексов у гороха может быть связано появление дополнительного сигнала, который необходим для эндоцитоза бактерий из инфекционных нитей, в контроле которого вновь принимает участие рецептор K1.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа экспрессии гена *K1* методом количественной ОТ-ПЦР показано, что этот ген необходим для развития симбиоза у гороха.

2. С помощью TILINNG подхода выявлено 3 мутантных линии гороха 817, 885 и 2265, несущих мутации в гене *k1*. Фенотипическая характеристика мутантных линий показала, что LysM-рецептор-подобная киназа K1 необходима для инициации развития симбиоза у гороха, а также контролирует выход бактерий из инфекционных нитей.

3. Показана возможность формирования гетероолигомерных рецепторных комплексов между LysM-рецептор-подобными киназами K1 и Sym10, а также Sym10 и Sym37 при совместном синтезе в листьях *N. benthamiana*, а также в дрожжевой двугибридной системе.

4. Эксперименты по трансформации мутантов гороха по генам *k1* и *sym37* конструкциями, содержащими полноразмерные последовательности этих генов, показали, что рецепторы K1 и Sym37 могут контролировать разные этапы развития симбиоза.

5. Предложена новая модель функционирования рецепторов к Nod-факторам у гороха с участием нескольких рецепторных комплексов.

Список публикаций по теме диссертации:

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Кириенко А., Лепянен И., Долгих Е.А. Особенности организации и функционирования у растений уникального класса рецепторных киназ, содержащих LysM-мотивы во внеклеточных доменах // Экологическая генетика. 2013. Т.9, №4. С.12-22.
2. Azarakhsh M., Kirienko A., Zhukov V., Lebedeva M., Dolgikh E., Lutova L. KNOTTED1-LIKE HOMEBOX 3: a new regulator of symbiotic nodule development // J. Exp. Bot. 2015. V.22. P.7181-95. doi: 10.1093/jxb/erv414.
3. Долгих Е., Кириенко А., Лепянен И., Долгих А. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Цитокинины (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т.51, № 3. С.285-298. doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.285rus.
4. Долгих Е., Кириенко А., Лепянен И., Долгих А. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Ауксины (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2010. Т.51. № 5. С. 585-592. doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.585rus.
5. Кириенко А., Лепянен И., Грибченко Э., Долгих Е. Особенности выделения белков для анализа протеома растений гороха *Pisum sativum* L. при симбиозе с клубеньковыми бактериями // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т.52, №5. С.1012-1020. doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.1012rus.
6. Долгих Е., Кириенко А., Ковалева О., Тихонович И.А. Изучение биохимической функции рецептор-подобных киназ гороха *sym10*, *sym37* и *k1*, необходимых для развития бобово-ризобияльного симбиоза // Экологическая генетика. 2017. Т. 15, №4. С. 4-12. <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen1544-12>.

7. Kirienko A., Porozov Y., Malkov N., Akhtemova A., Le Signor C., Thompson R., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane A., Tikhonovich I., Dolgikh E. Role of a Receptor-Like Kinase K1 in Pea *Rhizobium* Symbiosis Development // *Planta*. 2018. – в печати

Тезисы:

1. Кириенко А., Долгих Е. Изучение организации и связывающей способности с лигандами трансмембранных рецепторов гороха SYM37, SYM10 и K1 при экспрессии в гомологичной системе – листьях *N. benthamiana*// **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2012. С. 466.**
2. Кириенко А., Порозов Ю., Долгих Е. Роль новой LysM-РПК K1 гороха в развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями // **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2013. С. 199.**
3. Kirienko A., Leppyanen I., Porozov Y., Dolgikh E. LysM-receptor-like kinase K1 – a new component involved in pea-rhizobium symbiosis development // 19-th International Congress on Nitrogen Fixation (Pacific Grove, CA, USA, 4-9 October, 2015). P.137.
4. Кириенко А., Долгих Е. Изучение роли LysM-РПК K1 гороха в развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями // **БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. 2016. С. 352-353.**
5. Долгих Е., Кириенко А., Порозов Ю., Тихонович И.А. Анализ способности LysM-рецепторных киназ гороха *P. sativum* L. различать сигнальные молекулы ризобий Nod-факторы // **Научные труды V съезда физиологов СНГ, V съезда биохимиков России. 2016. С. 210.**
6. Kirienko A., Saffray C., Dalmais M., Bendahmane B., Le Signor C., Thompson R., Akhtemova G., Tikhonovich I., Dolgikh E. LysM-receptor-like kinase K1 controls formation of symbiotic subcellular structure in pea-rhizobium symbiosis development // 20th International Congress on Nitrogen Fixation (Granada, Spain, 3-7 Sept. 2017). **Proceedings of 20th International Congress on Nitrogen Fixation. P.232**