

УЧАСТИЕ ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ В СИГНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТЕНИЙ ГОРОХА С СИМБИОТИЧЕСКИМИ И ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

И.В. Леппянен, А.Д. Бовин, Е.А. Долгих

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, *leppyanen_irina@rambler.ru*, *andy-piter2007@mail.ru*, *dol2heen@yahoo.com*

Аннотация. Рецепторная киназа *PsLYK9* необходима для узнавания растениями гороха хитоолигосахаридов (ХОС) с разной степенью полимеризации. *PsLYK9* выполняет у гороха двойную функцию – при узнавании ХОС5 контролирует развитие симбиоза с грибами арбускулярной микоризы (АМ), но вместе с тем способна контролировать развитие защитных реакций при узнавании олигомеров хитина с более высокой степенью полимеризации (ХОС8). Остается далеким от понимания, как один и тот же рецептор способен различать столь сходные по структуре молекулы, но вызывающие совершенно противоположные реакции со стороны растений. Мы предположили, что узнавание разных по структуре ХОС происходит при объединении *PsLYK9* с разными ко-рецепторами, что приводит в активации различных сигнальных каскадов у гороха. Для поиска регуляторов сигнальных путей был проведен дифференциальный анализ протеомов корней гороха сорта Frisson, обработанных ХОС5 и ХОС8. Эти исследования необходимы для изучения молекулярных механизмов, с помощью которых растения различают хитоолигосахаридные сигналы, поступающие от симбиотических и фитопатогенных микроорганизмов. В результате выполненных исследований были выявлены несколько новых регуляторов (β -субъединица G-белка, фосфолипаза C), которые могут быть необходимы при передаче сигнала в процессе развития симбиоза или при активации защитных реакций.

Ключевые слова: бобово-ризобияльный симбиоз, протеомный анализ, дифференциальный 2-D электрофорез, бета субъединица G-белка

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-462-465

Бобовые растения взаимодействуют с широким спектром почвенных микроорганизмов, как симбиотических, так и патогенных. Как известно, в основе таких взаимодействий лежит обмен сигналами между партнерами. Важную роль в развитии взаимодействий растений с микроорганизмами играют хитоолигосахаридные сигнальные молекулы. Хитоолигосахариды со степенью полимеризации $n=5$ (ХОС5), а также липохитоолигосахариды, Nod-факторы и Мус-факторы, выделяемые симбиотическими микроорганизмами (клубеньковыми бактериями ризобиями и грибами арбускулярной микоризы) необходимы для развития симбиозов. Напротив, при взаимодействии растений с фитопатогенными грибами в среду выделяется смесь ХОС в результате разрушения клеточных стенок грибов, и эти соединения со степенью полимеризации $n = 6 - 8$ являются сильными элиситорами защитных реакций у растений. Представляет большой интерес выяснение того, как растения различают сходные по структуре сигнальные молекулы, но вызывающие разные ответные реакции.

У модельных растений арабидопсиса и риса выявлены рецепторные белки *AtCERK1* и *OsCERK1*, контролирующие узнавание коротких и длинных ХОС, выделяемых микроорганизмами, а также развитие ответных реакций [Kaku et al., 2006; Miya et al., 2007; Shimizu et al., 2010; Miyata et al., 2014]. Недавно нами был выявлен гомолог *CERK1* у гороха посевного *Pisum sativum* L – LysM-рецепторная киназа *LYK9*. Оказалось, что рецепторная киназа *PsLYK9* выполняет двойную функцию – при

узнавании ХОС5 контролирует развитие симбиоза с грибами арбускулярной микоризы (АМ), но вместе с тем способна контролировать развитие защитных реакций при узнавании олигомеров хитина с более высокой степенью полимеризации (ХОС8) [Leppuinen et al., 2018]. Однако остается далеким от понимания, как один и тот же рецептор способен различать столь сходные по структуре молекулы, но вызывающие совершенно противоположные реакции со стороны растений. Мы предположили, что узнавание разных по структуре ХОС происходит при объединении *PsLYK9* с разными ко-рецепторами, что приводит в активации различных сигнальных каскадов у гороха.

Основной целью нашей работы явились поиск и изучение компонентов путей передачи сигнала при узнавании растениями гороха ХОС с разной степенью полимеризации. Эти исследования необходимы для изучения молекулярных механизмов, с помощью которых растения различают хитоолигосахаридные сигналы, поступающие от симбиотических и фитопатогенных микроорганизмов.

Для поиска регуляторов сигнальных путей был проведен дифференциальный анализ протеомов корней гороха сорта Frisson, обработанных ХОС5 и ХОС8. Кроме того, интерес представлял анализ мутанта гороха P54 (*sym9*), дефектного по гену кальций, кальмодулин-зависимой киназы, необходимой для формирования симбиоза с грибами АМ. Для выявленных потенциальных регуляторов был проведен анализ экспрессии кодирующих генов в процессе развития симбиоза с грибами АМ, а также в ответ на обработку разными по структуре ХОС с помощью количественной полимеразной цепной реакции, совмещенной с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР).

При анализе протеомов корней гороха, обработанных ХОС5, были выявлены ферменты, контролирующие синтез аминокислот и белка, что соотносится с литературными данными [Marx et al., 2016]. Нами были выявлены белки, играющие важную роль в развитии защитных реакций у растений (халкон-флаванонизомераза, липоксигеназа, PR10), белки теплового шока и ферменты, контролирующие синтез этилена. Большой интерес для нас представляли белки, которые могут выполнять роль сигнальных регуляторов: β -субъединица G-белка, фосфолипаза C, аннексин D8, кальмодулин-зависимая киназа, протеинкиназа, взаимодействующая с кальцинерином В и другие.

Ранее участие G-белков и фосфолипазы C и D было показано в регуляции развития симбиоза бобовых растений с клубеньковыми бактериями [Peleg-Grossman et al., 2007]. Более того, подавление экспрессии одной из форм G-белка вызывало существенное снижение количества формирующихся клубеньков у бобового растения сои при инокуляции клубеньковыми бактериями [Choudhury, Pandey, 2015]. В наших экспериментах было выявлено увеличение уровня синтеза β -субъединицы G-белка в ответ на обработку ХОС5 (сигнальная молекула, выделяемая грибами АМ), но не в ответ на обработку ХОС8. Таким образом, гетеротримерный G-белок у гороха может являться тем регулятором, на уровне которого происходит разделение сигнальных путей, ведущих к развитию симбиозов или активации защитных реакций при патогенезе.

Известно, что в клетках животных G-белки активируют фосфолипазы C и D, которые контролируют образование вторичных мессенджеров – инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола, регулирующие содержание внутриклеточного кальция [Harden, 1990; Brandenburg et al., 2014]. Для изучения возможного участия G-белков, фосфолипазы C и D в передаче сигнала при узнавании растениями ХОС5, нами был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих эти регуляторы у трансгенных растений гороха с подавленной с помощью РНК-интерференции экспрессии гена рецептора *PsLyk9*.

Таким образом, на основании анализа протеомов корней гороха, обработанных ХОС с разной степенью полимеризации, были выявлены несколько новых регуляторов, которые могут быть необходимы при передаче сигнала в процессе развития симбиоза или при активации защитных реакций.

Литература

Brandenburg L-O., Pufe T., Koch T. Role of phospholipase D in G-protein Coupled receptor function // *Membranes (Basel)*. – 2014. – V. 4(3). – P. 302–318.

Choudhury S.R., Pandey S. Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in Soybean // *Plant Cell*. – 2015. – V. 27(11). – P. 3260–3276.

Harden T.K. G protein-dependent regulation of phospholipase C by cell surface receptors // *Am Rev Respir Dis*. – 1990. – V. 141(3 Pt 2). – P. S119–S122.

Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103. – P. 11086–11091.

Leppyanen I.V., Shakhnazarova V.Y., Shtark O.Y., Vishnevskaya N.A., Tikhonovich I.A., Dolgikh E.A. Receptor-like kinase LYK9 in *Pisum sativum* L. is the CERK1-like receptor that controls both plant immunity and AM symbiosis development // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – P. 1–18.

Marx H., Minogue C.E., Jayaraman D., Richards A.L., Kwiecien N.W., Siahpirani A.F., Rajasekar S., Maeda J., Garcia K., Del Valle-Echevarria A.R., Volkening J.D., Westphall M.S., Roy S., Sussman M.R., Anñ J.M., Coon J.J. A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* // *Nat Biotechnol.* – 2016. – V. 34(11). – P. 1198–1205.

Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 104. – P. 19613–19618.

Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y., Ozawa K., Ishii K., Asamizu E., Okabe Y., Umehara Y., Miyamoto A., Kobae Y., Akiyama K., Kaku H., Nishizawa Y., Shibuya N., Nakagawa T. The bifunctional plant receptor, *oscerk1*, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – V. 55. – P. 1864–1872.

Peleg-Grossman S, Volpin H, Levine A. Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species // *J. Exp. Bot.* – 2007. – V. 58. – P. 1637–1649.

Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki Y., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Minami E., Okada K., Yamane H., Kaku H., Shibuya N. Two Lys M receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice // *Plant J.* – 2010. – V. 64. – P. 204–214.

ROLE OF HETEROTRIMERIC G-PROTEINS IN THE SIGNAL REGULATION OF LEGUME PLANTS AND SIMBIOTIC AND PATHOGENIC MICROORGANISMS INTERACTION

I.V. Leppyanen, A.D. Bovin, E.A. Dolgikh

Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Pushkin, Russia, *leppyanen_irina@rambler.ru*, *andy-piter2007@mail.ru*, *dol2heen@yahoo.com*

Abstract. The receptor kinase *PsLYK9* is necessary for the recognition of chitooligosaccharides (COs) with different degree of polymerization by pea plants. *PsLYK9* performs a double function - when recognizing CO5 it controls the development of symbiosis with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, but at the same time it is able to control the development of defense reactions when recognizing chitin oligomers with a higher degree of polymerization (CO8). It remains far from understanding how the same receptor is able to distinguish molecules with similar structure, but causing completely opposite reactions in the plants. We assumed that the recognition of different structure of the COs occurs when *PsLYK9* is combined with different co-receptors, which leads to the activation of different signaling cascades in pea. To search for signal regulators, a differential analysis of the proteomes of the Frisson pea roots treated with CO5 and CO8 was carried out. These studies are necessary to find out the molecular mechanisms by which plants distinguish the chitooligosaccharide signals coming from symbiotic or phytopathogenic microorganisms. As a result of the performed studies, several new regulators (β -subunit of G-protein, phospholipase C), which may be necessary for signal transmission in the course of symbiosis development or in the activation of defense reactions, were detected.

Keywords: *legume-rhizobium symbiosis, proteomic analysis, 2-D differential electrophoresis, beta-subunit of G-protein*