



© Е. А. Долгих, И. В. Леппянен,
В. А. Жуков, В. Е. Цыганов,
И. А. Тихонович

Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной
микробиологии, лаборатория
молекулярной и клеточной
биологии

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ-РЕЦЕПТОРОВ SYM10 И SYM37 *PISUM SATIVUM*, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОХИТООЛИГОСАХАРИДОВ NOD-ФАКТОРОВ

☼ При бобово-ризобийном симбиозе Nod-факторы, выделяемые ризобиями, запускают комплекс специфических ответов в эпидермисе, перицикле и коре корня растения, тем самым обеспечивая основу для последующего развития инфекции и морфогенеза клубеньков. Nod-факторы проявляют свою биологическую активность при низких концентрациях, а специфичность ответов зависит от структурных особенностей этих молекул, что указывает на наличие у бобовых растений высокоаффинных рецепторов к Nod-факторам. Анализ мутантов гороха, позволил выявить гены, которые необходимы для развития симбиоза и среди них *PsSym10* и *PsSym37*, кодирующие рецептор-подобные киназы с LysM-мотивами (LysM-РПК) во внеклеточном домене. Предполагается, что эти белки могут быть потенциальными рецепторами к Nod-факторам. Однако экспериментальные доказательства связывания Nod-факторов с выявленными LysM-РПК, которые должны подтвердить биохимическую функцию рецепторов, отсутствуют. Главным образом, это связано с трудностью выделения мембранных рецепторов. В представленной работе впервые осуществлена экспрессия в бактериальных клетках белков SYM10 и SYM37, оптимизированы условия очистки рекомбинантных белков и получены специфические антитела для дальнейшего иммуоферментного анализа двух LysM-РПК в бобовых растениях.

☼ **Ключевые слова:** *Pisum sativum* L.; симбиоз; Nod-факторы; клубенькообразование; LysM-рецепторы; гетерологичная экспрессия.

Поступила в редакцию 03.12.2009

Принята к публикации 05.02.2010

ВВЕДЕНИЕ

Симбиоз между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями (ризобиями) приводит к образованию на корнях растений новых структур — корневых клубеньков, в которых бактерии фиксируют атмосферный азот, переводя его в доступную для растений форму. В основе развития симбиоза лежит взаимное узнавание партнеров, основанное на выделении ими специфических сигнальных соединений. Инициаторами молекулярного диалога выступают синтезируемые растением индукторные молекулы — флавоноиды, запускающие экспрессию специфических генов клубеньковых бактерий, которые контролируют синтез и секрецию липохитоолигосахаридных молекул Nod-факторов (Roth and Stacey, 1991; Schultze and Kondorosi, 1998). Структура Nod-факторов, продуцируемых ризобиями, является штаммо-специфичной.

Основная структура Nod-факторов — четыре—шесть остатков N-ацетилглюкозамина с присоединенной жирной кислотой является очень сходной у различных видов ризобий (Spaink, 2000). Однако в зависимости от вида ризобий, длина и структура жирной цепи, а также заместители на восстанавливающем и не восстанавливающем конце варьируют. Именно структурные различия Nod-факторов лежат в основе хозяйской специфичности симбиоза (Spaink, 1991; Schultze and Kondorosi, 1998). Специфичность взаимодействия Nod-факторов с растением-хозяином и очень низкие концентрации этих молекул (10^{-9} – 10^{-13} М), при которых проявляется их биологическая активность, предполагают существование специфических рецепторов для Nod-факторов у бобовых растений (Ehrhardt et al., 1992, 1996; Ardourel et al., 1994; Heidstra and Bisseling, 1996; Walker and Downie,

2000; Walker et al., 2000). Доказательством наличия рецепторов может являться тот факт, что небольшие изменения в структуре Nod-факторов могут изменять круг хозяев ризобияльных штаммов.

Исследования последних лет, направленные на выяснение механизмов рецепции Nod-факторов на корнях бобовых растений и передачи сигнала, позволили выявить гены растений, которые необходимы для развития симбиоза (Ane et al., 2004; Ben Amor et al., 2003; Borisov et al., 2000; Catoira et al., 2000, 2001; Endre et al., 2002; Tsyganov et al., 2002; Limpens et al., 2003; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003, 2007; Levy et al., 2004; Mitra et al., 2004; Lombardo et al., 2006; Imaizumi-Anraku et al., 2006; Kanamori et al., 2006; Smit et al., 2007). Некоторые из этих генов определяют специфичность ответов растения на Nod-факторы в зависимости от их структуры, что может указывать на то, что они кодируют рецепторы к Nod-факторам. У модельного бобового растения *Medicago truncatula* эти гены называются *MtNFP* и *MtLYK3* (Limpens et al., 2003; Smit et al., 2007), а у гороха *Pisum sativum* L. наиболее вероятными кандидатами являются *PsSym10*, *PsSym37* и *PsK1* (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2007; Zhukov et al., 2008). На основании анализа мутантов полагают, что NFP и SYM10 вовлекаются в рецепцию Nod-факторов на самых ранних этапах развития симбиоза, играя роль «сигнального» рецептора. Напротив, LYK3 и SYM37, также как K1 вовлекаются позже, во время проникновения ризобий в клетки корня (при развитии инфекции) и могут играть роль рецептора «проникновения». Клонирование данных генов показало, что они кодируют рецептор-подобные киназы с LysM-мотивами (LysM-РПК) во внеклеточных доменах — функционально мало охарактеризованный класс растительных белков. LysM-мотивы (~40 аминокислот) были выявлены в литическом ферменте бактериофагов — лизине (муреиновой гидролазе), они найдены в пептидогликан-лизирующих ферментах бактерий (литические трансгликозилазы), а также у эукариот — в ферментах хитиназах и лизоцимах, но не найдены у архей (Joris et al., 1992; Birkeland, 1994; Bateman and Bycroft, 2000). LysM-мотивы, как полагают, являются участками для связывания веществ, содержащих N-ацетилглюкозамин. Олигосахаридный остов Nod-фактора представляет собой олигомер N-ацетилглюкозамина, поэтому LysM-мотивы являются, наиболее вероятными участками соответствующих рецепторов, которые связываются с Nod-факторами. На основании анализа структуры LysM-мотивов литической трансгликозилазы *Escherichia coli* методом ядерного магнитного резонанса, была предложена молекулярная модель *in silico* пространственной организации LysM-участков как предполагаемых сайтов связывания (Mulder et al., 2006). Однако, физическое взаимодействие между Nod-факторами и LysM-РПК, которое должно подтвердить биохимическую функцию рецепторов, еще не показано.

Для изучения связывающей способности рецепторов по отношению к Nod-факторам необходимо знание про-

странственной структуры мембранных белков. Однако доступная на сегодняшний день информация о структуре и механизмах действия мембранных рецепторов крайне ограничена, что связано с трудностью их выделения. На сегодня количество мембранных белков, полученных в нативном виде, очень незначительно. Проблема заключается в невозможности выделения мембранных белков-рецепторов в достаточных количествах из их нативного окружения, так как они обычно присутствуют в биологических мембранах в очень низкой концентрации. Возможный путь решения этой проблемы состоит в экспрессии мембранных белков в бактериальных клетках и последующей экстракции белков из мембран. Однако этот подход зачастую не приносит желаемых результатов из-за токсичности экспрессируемых мембранных белков. Более удобным может быть другой подход — экспрессия внеклеточных или киназных доменов мембранных белков и изучение их свойств. Достаточно часто экспрессируемые белки синтезируются в значительных количествах и формируют так называемые тельца включения (inclusion bodies). При этом также требуется ренатурация (рефолдинг) мембранных белков в нативную структуру *in vitro* путем солюбилизации мембранных белков (Steinle et al., 2001).

В представленной работе основной акцент был сделан на экспрессию в бактериальных клетках белков, которые могут быть вовлечены в рецепцию Nod-факторов, подбор оптимальных схем очистки рекомбинантных белков и получение специфичных антител для дальнейшего иммуоферментного анализа изучаемых белков в корнях и клубеньках гороха. Нам удалось осуществить экспрессию в гетерологичных системах (в клетках *E. coli*) генов *PsSym10* и *PsSym37*, кодирующих LysM-рецепторы, подобрать условия для эффективной работы и очистки изучаемых белков, что позволило использовать их для получения специфичных антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды

Для экспериментальной работы были использованы штаммы *E. coli* DH-5 α (Stratagene, США), а также мутантный штамм C41 (Miroux and Walker, 1996), полученный на основе штамма BL21 (DE3) (Novagene, США). Кроме того, нами были использованы плаزمида pRSETb (Invitrogen, США), а также плазмиды для субклонирования pBluescript KS +/- (Stratagene, США).

Олигонуклеотиды и ферменты

Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Evrogen» (Москва). Были использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага T4 производства Fermentas (Литва), Pfu-полимераза производства «Силекс» (Москва).

Конструирование экспрессионных плазмид pRSETb/SYM10-EX, pRSETb/SYM37-EX, pRSETb/Trx-SYM10 и pRSETb/Trx-SYM37

Последовательности генов *PsSym10* и *PsSym37*, кодирующие внеклеточные домены белков-рецепторов,

амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции (BamHI и EcoRI (МБИ Fermentas, Литва)). Продукты амплификации очищали с помощью набора GIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя и клонировали либо непосредственно в плазмидный вектор pRSETb, либо предварительно субклонировали в векторе pBluescript KS +/–, согласно стандартным протоколам с использованием соответствующих эндонуклеаз рестрикции и T4 ДНК-лигазы (МБИ Fermentas, Литва).

Определение нуклеотидных последовательностей генов *PsSym10* и *PsSym37*

Соответствие клонированных последовательностей генам *PsSym10* и *PsSym37*, а также сохранность рамки считывания подтверждали путем определения нуклеотидной последовательности. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора GenomeLab DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, США). Реакцию проводили в объеме 10 мкл, содержащем 200 нг плазмидной ДНК, 3,2 пМ специфического праймера и реакционную смесь, предоставленную производителем. Продукты реакции анализировали с использованием автоматического секвенатора CEQ 8000 (Beckman Coulter, США).

Экспрессия рекомбинантных внеклеточных доменов белков-рецепторов SYM10 и SYM37 в клетках *E. coli*

Клетки штамма *E. coli* C41 трансформировали плазмидными конструкциями pRSETb/SYM10-EX, pRSETb/SYM37-EX и pRSETb/Trx-SYM10-EX, pRSETb/Trx-SYM37-EX. Несколькими свежими рекомбинантными колониями инокулировали 100–500 мл среды LB (Bertani, 1951), содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и растили при температуре 37°C, 220 об/мин на орбитальном шейкере до достижения культурой оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Экспрессию генов рекомбинантных белков индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ, либо инкубировали культуру без добавления IPTG. Культуры инкубировали 18 часов при 37°C, центрифугировали при 2500g 30 минут (Beckman J2-21, США), осадки замораживали при –80°C.

Выделение рекомбинантных белков из клеток *E. coli*

Осадки культур *E. coli* размораживали при 0°C и ресуспендировали в 5 мл буфера (100 мМ Na-фосфат pH 8,0; 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ)). Смесь подвергали ультразвуковой дезинтеграции 4 раза, в течение 30 сек с интервалом по 30 сек между циклами на льду (мощность ~70 %,.) до образования гомогенной суспензии. Далее суспензию центрифугировали при 4000g 30 минут 4°C (Hettich Micro 22R, Германия). Отбирали надосадочную фракцию и центрифугировали при 16000g 30 минут при 4°C. Нали-

чие рекомбинантного белка в осадках и надосадочной жидкости проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 12–15 % полиакриламидном геле согласно стандартной методике.

Для анализа белков из растворимой фракции клеточного лизата, использовали аликвоту экстракта в буфере 100 мМ Na-фосфат pH 8,0; 1 мМ ФМСФ. Для выделения рекомбинантного белка из нерастворимой фракции клеточного лизата осадки ресуспендировали в 1–5 мл буфера (8 М мочевины, 100 мМ Na-фосфат pH 8,0; 1 мМ ФМСФ), суспензию центрифугировали при 14000g 30 минут при 12°C (Hettich Micro 22R, Германия) для удаления нерастворившегося материала. Полученный раствор использовали для очистки металлохелатной аффинной хроматографией на колонке с Ni-SAM сефарозой (Sigma, США) в денатурирующих условиях. В качестве стартового буфера использовали буферный раствор того же состава, что для растворения белка, элюцию неспецифично связанных белков проводили в буфере аналогичного состава, но с pH 6,5, тогда как для элюции рекомбинантных белков использовали буфер — 8 М мочевины, 100 мМ Na-фосфат pH 4,0; 1 мМ ФМСФ. Собранные фракции анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

Получение субклеточных фракций клубеньков и корней гороха

Для получения различных субклеточных фракций были использованы клубеньки (3 недели после инокуляции) и инокулированные корни (4 дня после инокуляции) гороха линии Frisson. Для получения экстрактов клубеньки и корни растирали в охлажденной ступке с буфером, содержащим 100 мМ MES-КОН (pH 7,2), 15 % этиленгликоль, 100 мМ сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ФМСФ в соотношении ткани к буферу 1 : 3. Экстракт центрифугировали при 1000 g 15 минут при 4°C (Hettich Micro 22R, Германия), чтобы удалить грубый дебрис. Далее супернатант центрифугировали при 16000g 30 минут при 4°C. Аликвоту мембранной и растворимой фракций смешивали с 2-кратным буфером для нанесения на гель и разделяли методом денатурирующего электрофореза.

Иммунизация лабораторных животных

Иммунизацию кроликов осуществляли препаратами белков SYM10 и SYM37, полученными после очистки методом металлохелатной аффинной хроматографии. 100–200 мкг рекомбинантного белка в объеме 200 мкл смешивали с 200 мкл полного адьюванта Фрейда. Полученную смесь инъецировали кроликам четырехкратно с интервалом в 10 дней, после чего через 14 дней отбирали кровь.

Выделение и очистка поликлональных антител к рекомбинантным белкам SYM10 и SYM37

Для Вестерн-блот гибридации использовали либо сыворотку, либо очищенные антитела. Для очистки не-

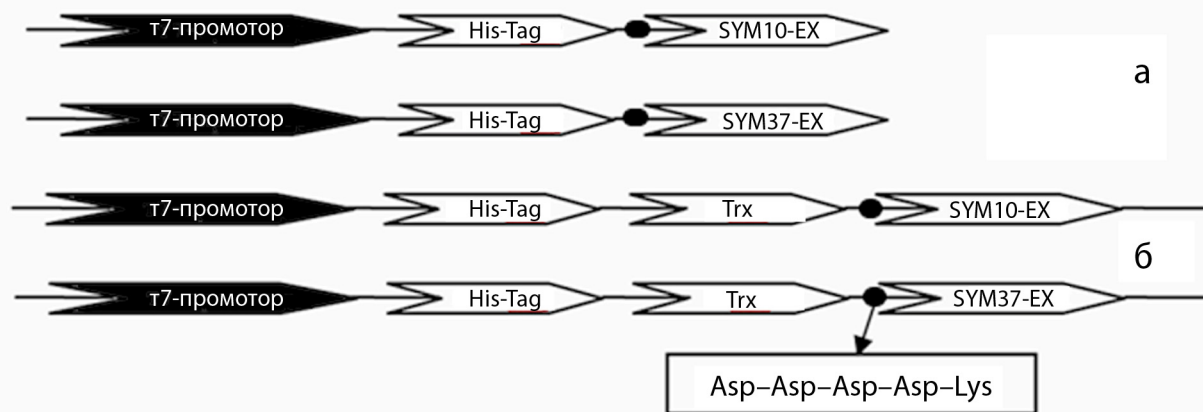


Рис. 1. Схема рекомбинантных конструкций для экспрессии LysM-внеклеточных доменов рецепторных киназ SYM10 и SYM37 *P. sativum* (а), на основе плазмидного вектора pRSETb. Схема конструкций, в которые был включен тиоредоксин (Trx) (б). Стрелкой указан сайт гидролиза энтерокиназой

большой аликвоты антител 200 мкл сыворотки крови кролика разводили в 5 раз буфером 100 мМ Na-фосфат (pH 8,0), инкубировали в пробирке «Eppendorf» против измельченных полосок PVDF мембраны, содержащей рекомбинантный белок. Инкубацию проводили в течение ночи при постоянном перемешивании при +4°C. Антитела смывали 0,2 М глицином (pH 2,2), нейтрализовали в растворе 1 М трис-HCl, 0,1 М NaCl и концентрировали с помощью Amicon Ultra (Millipore, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение экспрессирующих конструкций для внеклеточных доменов белков-рецепторов SYM10 и SYM37 *P. sativum*

Для наработки белков-рецепторов SYM10 и SYM37 *P. sativum* в *E. coli* были созданы несколько экспрессирующих конструкций (рис. 1 а, б). Нуклеотидные последовательности генов, кодирующие LysM-внеклеточные домены рецепторных киназ SYM10 и SYM37 *P. sativum*, были амплифицированы с помощью специфичных праймеров и высокоточной Pfu-полимеразы. В качестве матрицы для амплификации *Sym10* была использована геномная ДНК или кДНК линии гороха Frisson, поскольку ген не содержит интронов. В случае *Sym37* в качестве матрицы для амплификации была использована кДНК, поскольку *Sym37* ген содержит 11 интронов (схема 1). Амплифицированные продукты размером ~750 п. о. (*Sym10*) и ~630 п. о. (*Sym37*) были субклонированы в векторе pBluescript KS +/- и далее встроены по сайтам *Bam*HI и *Eco*R1 в вектор pRSETb с сохранением рамки считывания. Полученные конструкции были названы pRSETb/Sym10-EX и pRSETb/Sym37-EX (рис. 1 а), а образующиеся белки — Sym10-EX и Sym37-EX, соответственно. Sym10-EX и Sym37-

EX содержали последовательность из шести остатков гистидина (His₆-tag), позволяющую осуществлять быструю и эффективную очистку рекомбинантных белков металлохелатной аффинной хроматографией. Кроме того, нами были созданы две другие гибридные конструкции, в которых использовали тиоредоксин *E. coli* (Trx) — белок с молекулярной массой ~12 кДа. Последовательность, кодирующую Trx, встраивали между His6 и сайтом для узнавания энтерокиназой человека, а полученные конструкции были названы pRSETb/Trx-SYM10-EX и pRSETb/Trx-SYM37-EX, соответственно (рис. 1 б).

Оптимизация условий экспрессии белков

Полученные конструкции были использованы для трансформации штамма *E. coli* C41 (специальный мутантный штамм, созданный на основе штамма BL21 (DE3) для экспрессии высокотоксичных белков) (Migoux and Walker, 1996). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле показал в лизатах клеток, трансформированных рекомбинантной плазмидой, наличие белковых продуктов с молекулярными массами, соответствующими предсказанным для рекомбинантных SYM10-EX и SYM37-EX (29 и 27 кДа, соответственно), содержащих — His₆-tag (рисунок 2). Белки SYM10-EX и SYM37-EX появлялись после добавления изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) к 4 часу после индукции и далее уровень экспрессии белков несколько увеличивался при культивации в течение 18 часов. Однако, как показали наши эксперименты, при использовании конструкций pRSETb/Sym10-EX и pRSETb/Sym37-EX уровень экспрессии белков был достаточно низким, и белки содержались, главным образом, в мембранной фракции клеток *E. coli* (рис. 2а и 2б).

Для увеличения уровня экспрессии, мы также получили конструкции для синтеза гибридных белков, содержащих тиоредоксин (Trx) — pRSETb/Trx-SYM10-

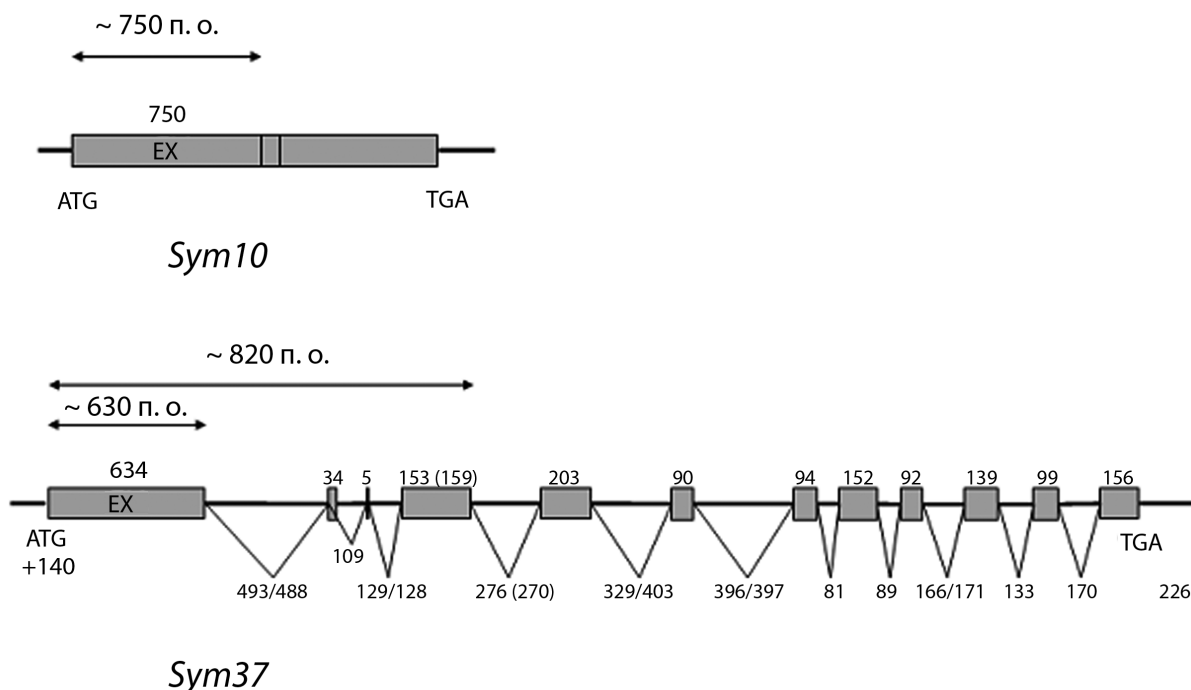


Схема. 1. Продукты амплификации, полученные на матрице кДНК гороха линии Frisson, которые были использованы для создания экспрессирующих конструкций для белков-рецепторов SYM10 и SYM37. EX — обозначение внеклеточного домена рецепторов.

EX и pRSETb/Tгх-SYM37-EX. Наличие Тгх в составе химерного белка может значительно увеличивать его уровень экспрессии в *E. coli* (Wieles et al., 1995). Экспрессия новых конструкций в *E. coli* позволила получить гибридные рекомбинантные белки ожидаемого размера. Однако значительным уровень экспрессии был только в случае гибридного белка Тгх-SYM10-EX. Данный белок с молекулярной массой ~45 кДа агрегировал в комплексы (тельца включения, inclusion bodies), что позволило наработать его в достаточном для дальнейших экспериментов количестве (рис. 3а). Вместе с тем уровень экспрессии рекомбинантного белка Тгх-SYM37-EX увеличился незначительно (данные не показаны). Поскольку попытки оптимизировать условия экспрессии не привели к повышению выхода белка SYM37, нами была получена новая конструкция pRSETb/Sym37-820, позволяющая экспрессировать белок, содержащий помимо внеклеточного домена, трансмембранный и небольшую часть киназного домена (размер клонированного продукта ~820 п. о. на кДНК) (схема 1). При экспрессии в штамме *E. coli* C41 уровень экспрессии белка SYM37 был достаточно высоким, а размер белка (~31 кДа) соответствовал предсказанному на основании анализа его первичной последовательности (рис. 3б).

В лизатах клеток, трансформированных конструкцией pRSETb/Tгх-Sym10-EX и pRSETb/Sym37-820, белки появлялись после добавления изопропил-β-D-

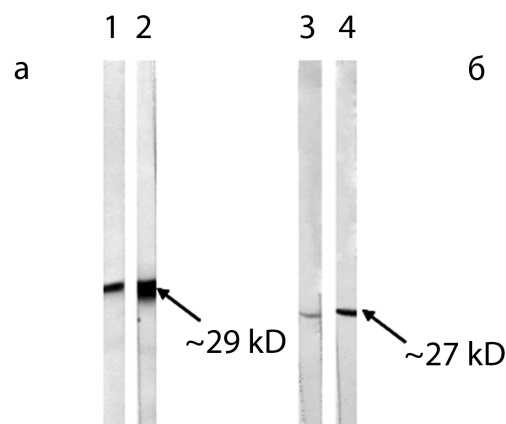


Рис. 2. Экспрессия рекомбинантных белков SYM10-EX (а) и SYM37-EX (б) в *E. coli* после 4 и 18 часов инкубации в присутствии ИПТГ. Иммуноблоттинг с использованием антител к полигистидиновой последовательности демонстрирует присутствие рекомбинантных белков. 1 — экспрессия SYM10-EX в присутствии 1 мМ ИПТГ после 4 часов инкубации; 2 — экспрессия SYM10-EX в присутствии 1 мМ ИПТГ после 18 часов инкубации; 3 — экспрессия SYM37-EX в присутствии 1 мМ ИПТГ после 4 часов инкубации; 4 — экспрессия SYM37-EX в присутствии 1 мМ ИПТГ после 18 часов инкубации.

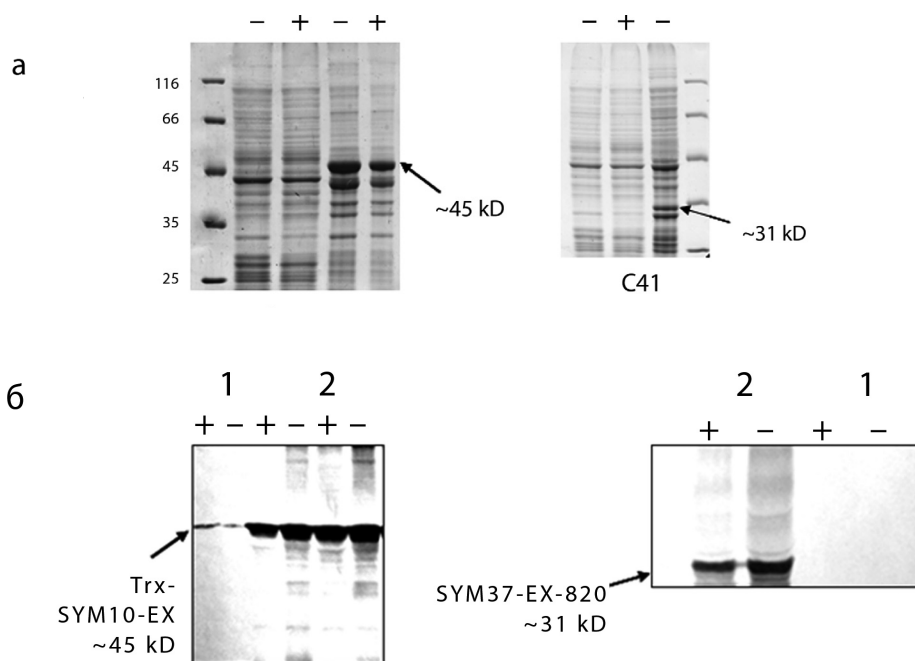


Рис. 3. Выделение и последующая солюбилизация в присутствии 8М мочевины рекомбинантных белков Тгх-SYM10-EX и SYM37-820 из клеток *E. coli*. Денатурирующий электрофорез с последующим окрашиванием Кумасси синим (а) и иммуноблоттинг с использованием антител к полигистидиновой последовательности (б) демонстрируют присутствие рекомбинантных белков в бактериях.

«+» — индукция экспрессии белка в течение 18 часов в присутствии 1 мМ ИПТГ;
«-» — индукция экспрессии белка в течение 18 часов без ИПТГ.

Содержание рекомбинантных белков было проанализировано во фракции 4000g (тельца включения — 2) и 16000g (мембранная фракция — 1). C41 клетки, трансформированные плазмидой pRSETb, были использованы в качестве контроля.

тиогалактозида, однако более высокий уровень экспрессии обоих белков наблюдали в клетках, выращенных без ИПТГ (рис. 3). Это может быть связано с высокой токсичностью для клеток *E. coli* обоих рекомбинантных белков Тгх-SYM10-EX и SYM37-820.

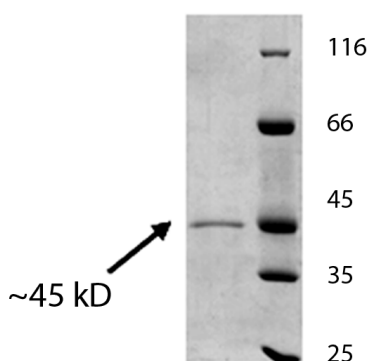


Рис. 4. Очистка рекомбинантного белка Тгх-SYM10-EX методом металлохелатной аффинной хроматографии на Ni-SAM сефарозе

Очистка рекомбинантных белков

Выделение и очистку рекомбинантных белков Тгх-SYM10-EX и SYM37-820 из клеток *E. coli* осуществляли методом металлохелатной аффинной хроматографии. Максимальное содержание рекомбинантных белков наблюдалось в лизатах 18-часовой культуры клеток *E. coli*, выращенных без ИПТГ. Выделение и очистку рекомбинантных белков Тгх-SYM10-EX и SYM37-820 из клеток *E. coli* осуществляли после солюбилизации в буфере с 8М мочевиной. В результате очистки нами были получены электрофоретически чистые белки SYM10 и SYM37 (на рисунке 4, в качестве примера представлены результаты очистки SYM10). При этом выход рекомбинантных белков после очистки металлохелатной хроматографией из 18-часовых культур клеток *E. coli* (500 мл) составил 0,3–0,4 мг.

Получение антител к белкам-рецепторам SYM10 и SYM37 *P. sativum*

С целью получения поликлональных антител к рекомбинантным белкам SYM10 и SYM37 *P. sativum* мы иммунизировали кроликов препаратами очищенных рекомбинантных белков. Полученные поликлональные

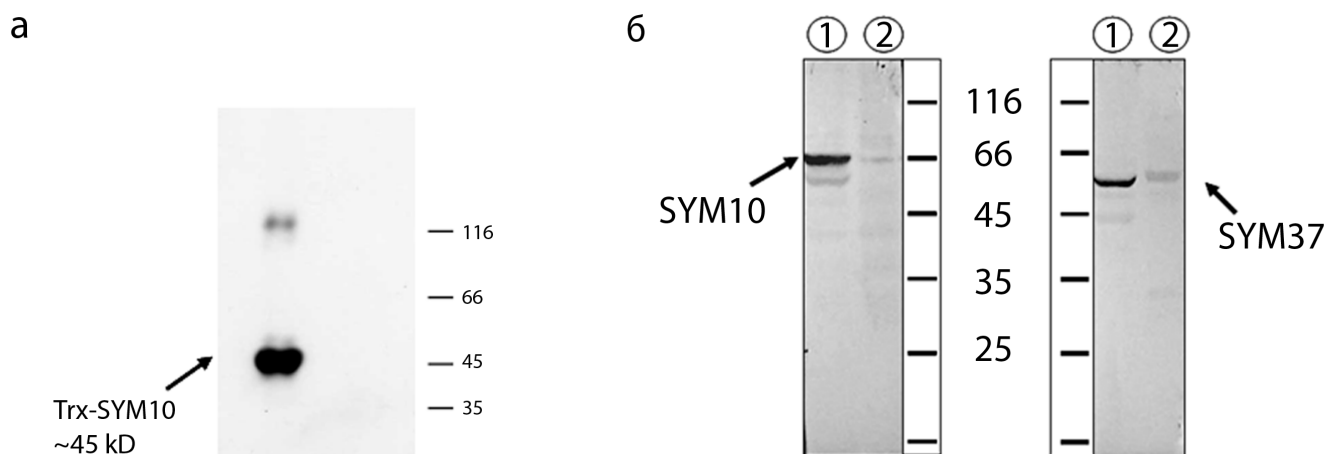


Рис. 5. Проверка специфичности антител против рекомбинантного белка Trx-SYM10-EX (а). Иммуноферментный анализ мембранных фракций корней (1) и клубеньков (2) гороха Frisson с поликлональными кроличьими антителами против SYM10 и SYM37 белков гороха (б)

антитела тестировали иммуноблоттингом против исходных антигенов (рис. 5а) и против мембранных фракций корней и клубеньков гороха, полученных при 16000g (рис. 5б). Показано, что поликлональные анти-SYM10 и анти-SYM37 антитела, очищенные из сыворотки иммунизированного кролика, специфически узнавали рекомбинантные белки в лизатах клеток *E. coli* C41 (рис. 5а). Вместе с тем, полученные антитела специфично реагировали с белками из экстрактов корней и клубеньков гороха, практически не показывая перекрестной реакции (рис. 5б). Иммуноферментный анализ показал, что антитела против SYM10 узнавали мембранный белок с молекулярной массой около 66 кДа, что примерно соответствует ожидаемому размеру полноразмерного рецепторного белка SYM10 *P. sativum* (Madsen et al., 2003). В инокулированных корнях гороха Frisson концентрация SYM10 была незначительной (рис. 5б), тогда как в клубеньках гороха, полученных после инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CIAM 1026, содержание белка было высоким. Поликлональные антитела против SYM37 узнавали мембранный белок размером около 55 кДа в корнях и клубеньках гороха, содержание которого было также более высоким в клубеньках гороха (рис. 5б). Данные о более высоком уровне экспрессии двух белков соответствуют литературным о более высоком уровне экспрессии генов *PsSym10* и *PsSym37* в клубеньках гороха по сравнению с корнями (Madsen et al., 2003; Zhukov et al., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была осуществлена экспрессия в бактериальных клетках рекомбинантных белков-рецепторов SYM10 и SYM37 гороха *P. sativum*, оптими-

зированы условия их очистки и получены специфичные антитела, которые могут быть использованы для иммуноферментного анализа двух LysM-РПК в бобовых растениях. Получение рекомбинантных рецепторных белков станет основой для дальнейшего изучения их связывающей способности и аффинности по отношению к Nod-факторам различной структуры и выяснения механизмов связывания Nod-факторов на корнях бобовых растений.

Работа была поддержана грантами РФФИ 07-08-00700а, РФФИ-НИСИ 09-04-92865а, РФФИ 08-04-01656а, РФФИ 08-04-12214-офи, грантом Президента для поддержки научных школ НШ-5399.2008.4, Государственным контрактом от Федерального агентства по науке и инновациям 02.740.11.0276, Государственным контрактом от Федерального агентства по образованию П1301.

Литература

1. Ane J.-M., Kiss G. B., Riely B. K. et al., 2004. *Medicago truncatula* DM11 required for bacterial and fungal symbioses in legumes // Science. Vol. 303. P. 1364–1367.
2. Ardourel M., Demont N., Debelle F. D. et al., 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair-cells and induction of plant symbiotic developmental responses // Plant Cell. Vol. 6. P. 1357–1374.
3. Ben Amor B., Shaw S. L., Oldroyd G. E. D. et al., 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation // The Plant Journal. Vol. 34. P. 1–12.

4. Bateman A., Bycroft M., 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD) // *J. Mol. Biol.* Vol. 299. P. 1113–1119.
5. Bertani G., 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* Vol. 62. P. 293–300.
6. Birkeland N. K., 1994. Cloning, molecular characterization, and expression of the genes encoding the lytic functions of lactococcal bacteriophage phi LC3: a dual lysis system of modular design // *Can. J. Microbiol.* Vol. 40. P. 658–665.
7. Borisov A. Y., Barmicheva E. M., Jacobi L. M. et al., 2000. Pea (*Pisum sativum* L.) mendelian genes controlling development of nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza // *Czech J. Genet. Plant Breed.* Vol. 36. P. 106–110.
8. Catoira R., Galera C., de Billy F. et al., 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway // *Plant Cell.* Vol. 12. P. 1647–1665.
9. Catoira R., Timmers A. C. J., Maillet F. et al., 2001. The *HCL* gene of *Medicago truncatula* controls Rhizobium-induced root hair curling // *Development.* Vol. 128. P. 1507–1518.
10. Ehrhardt D. W., Atkinson E. M., Long S. R., 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors // *Science.* Vol. 256. P. 998–1000.
11. Ehrhardt D. W., Wais R., Long S. R., 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals // *Cell.* Vol. 85. P. 673–681.
12. Endre G., Kereszt A., Kevei Z. et al., 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development // *Nature.* Vol. 417. P. 962–966.
13. Heidstra R., Bisseling T., 1996. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception // *New Phytologist.* Vol. 133. P. 25–43.
14. Imaizumi-Anraku H., Takeda N., Charpentier M. et al., 2006. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots // *Nature.* Vol. 433. P. 527–531.
15. Joris B., Englebert S., Chu C. P. et al., 1992. Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin // *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 70. P. 257–264.
16. Kanamori N., Madsen L. H., Radutoiu S. et al., 2006. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 103. P. 359–364.
17. Levy J., Bres C., Geurts R. et al., 2004. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses // *Science.* Vol. 303. P. 1361–1363.
18. Limpens E., Franken C., Smit P. et al., 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // *Science.* Vol. 302. P. 630–633.
19. Lombardo F., Heckmann A. B., Miwa H. et al., 2006. Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth // *Mol. Plant Microbe Interactions.* Vol. 19. P. 1444–1450.
20. Madsen E. B., Madsen L. H., Radutoiu S. et al., 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals // *Nature.* Vol. 425. P. 637–640.
21. Miroux B., Walker J. E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels // *J. Mol Biol.* Vol. 260. P. 289–298.
22. Mitra R. M., Gleason C. A., Edwards A. et al., 2004. A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 101. P. 4701–4705.
23. Mulder L., Lefebvre B., Cullimore J., Imberty A., 2006. LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitoooligosaccharides and Nod factors // *Glycobiology.* Vol. 16. P. 801–809.
24. Oldroyd G. E. D., Long S. R., 2003. Identification and characterization of *nodulation-pathway 2*, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor // *Plant Physiology.* Vol. 131. P. 1027–1032.
25. Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B. et al., 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // *Nature.* Vol. 425. P. 569–570.
26. Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B. et al., 2007. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range // *EMBO J.* Vol. 26. P. 3923–3935.
27. Roth L. E. and Stacey G., 1991. Rhizobium-legume symbiosis // *Microbial Cell-Cell Interactions* / Ed. Dworkin M, American Society of Microbiology, Washington, P. 255–301.
28. Schultze M., Kondorosi A., 1998. Regulation of symbiotic root nodule development // *Annu. Rev. Genet.* Vol. 32. P. 33–57.
29. Smit P., Limpens E., Geurts R. et al., 2007. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial Nod factor // *Plant Physiology.* Vol. 145. 183–191.
30. Spaink H. P., Sheeley D. M., van Brussel A. A. N. et al., 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of Rhizobium // *Nature.* Vol. 354. P. 125–130.
31. Spaink H. P., 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 54. P. 257–288.

32. Steinle A., Li P., Morris D. L. et al., 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family // Immunogenetics. Vol. 53. P.279–287.
33. Tsyganov V. E., Voroshilova V. A., Priefer U. B. et al., 2002. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium-pea (Pisum sativum L.)* symbiosis // Annals of Botany. Vol. 89. P.357–366.
34. Walker S. A., Downie J. A., 2000. Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *NodO* and *NodE* // Mol. Plant Microbe Interactions. Vol. 13. P.754–762.
35. Walker S. A., Viprey V., Downie J. A., 2000. Dissection of nodulation using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P.13413–14418.
36. Wieles B., Noort J., Drijfhout J. W. et al., 1995. Purification and functional analysis of the *Mycobacterium leprae* thioredoxin/ thioredoxin reductase hybrid protein // Journal of biological chemistry. Vol.270. P.25604–25606.
37. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L. H. et al., 2008. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development // Mol. Plant Microbe Interactions. Vol. 21. P.1600–1608.

EXPRESSION OF RECOMBINANT RECEPTOR PROTEINS SYM10 AND SYM37 *PISUM SATIVUM* INVOLVED IN PERCEPTION OF LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDES NOD FACTORS

E. A. Dolgikh, I. V. Leppyanen, V. A. Zhukov,
V. E. Tsyganov, I. A. Tikhonovich

✿ **SUMMARY:** In the legume-*Rhizobium* interaction Nod factors emanating from rhizobia trigger a complex of specific responses in epidermis, pericycle and root cortex of the plant, thereby providing the basis for subsequent bacterial entry and organogenesis of root nodules. Since Nod factors are biologically active at pico-nanomolar concentrations and their activity depends on Nod factor structural features, it suggests the presence of high affinity receptors to these molecules. Genetic analysis of pea mutants allowed to identify genes that are essential for symbiosis development and among of them the *PsSym10* and *PsSym37*. These genes are predicted to encode LysM-receptor-like kinases with LysM motifs in extracellular domain (LysM-RLKs). These proteins may be potential receptors to Nod factors. However experimental evidence of Nod factor binding to the putative receptors is needed to confirm the biochemical function of receptors. Mainly, it depends on the problems with receiving of membrane receptors. In this work the heterologous expression of SYM10 and SYM37 was conducted in bacterial cells. We have also optimized the conditions for recombinant proteins purification and obtained specific antibodies for next immunoenzyme analysis of two LysM-RLKs in legume plants.

✿ **KEY WORDS:** *Pisum sativum L.*, symbiosis, Nod factor, nodulation, LysM-receptors, heterologous expression.

✿ Информация об авторах

Долгих Елена Анатольевна — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии, к. б. н. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: dol2helen@yahoo.com

Леппянен Ирина Викторовна — аспирант лаборатории молекулярной и клеточной биологии. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: leppyanen_irina@rambler.ru

Жуков Владимир Александрович — научный сотрудник лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: vzhukoff@yahoo.com

Цыганов Виктор Евгеньевич — заведующий лабораторией молекулярной и клеточной биологии, кандидат биологических наук. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: viktor_tsyganov@arriam.spb.ru

Тихонович Игорь Анатольевич — профессор, д. б. н., академик РАСХН. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, д. 3. E-mail: contact@arriam.spb.ru

Dolgikh Elena Anatolevna — senior researcher. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: dol2helen@yahoo.com

Leppyanen Irina Viktorovna — PhD student. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: leppyanen_irina@rambler.ru

Zhukov Vladimir Alexandrovich — researcher. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin, 8. 196608, Russia. E-mail: vzhukoff@yahoo.com

Tsyganov Viktor Evgenyevich — head of the laboratory. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: Viktor_Tsyganov@arriam.spb.ru

Tikhonovich Igor Anatolievich — director. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Podbelsky chausse 3, St.-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: arriam@arriam.spb.ru, contact@arriam.spb.ru