

© Ю. Б. Порозов¹,
А. Н. Мунтян², Е. П. Чижевская²,
Б. В. Симаров², Е. Е. Андронов²

¹СПбГУ ИТМО; ²ГНУ ВНИИСХМ

СОПРЯЖЕННЫЕ СИМБИОТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ. ЧАСТЬ II: АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА РЕЦЕПТОРНОГО ГЕНА *NFR5* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

ВВЕДЕНИЕ

✿ В настоящей работе был проведен анализ нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма рецепторной части гена *nfr5* у 15 растений сопряженной коллекции (растительный компонент — *Melilotus albus*; бактериальный компонент — *Sinorhizobium meliloti*). Определена доменная структура изучаемого участка и показано, что максимумы нуклеотидного полиморфизма приходятся на *LysM* домены этого гена. Выявлена четкая связь нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма растительного рецепторного участка гена *nfr5* с генетическим разнообразием ризобияльного компонента сопряженной системы (симбиотический локус *nodD*). На основании полученных данных проведено компьютерное моделирование связывания бактериального Nod-фактора с двумя вариантами растительного рецептора.

✿ **Ключевые слова:** сопряженная коллекция; *nfr5*; Nod-фактор; *Melilotus albus*; молекулярное моделирование; докинг.

Данная работа является продолжением исследования, начатого ранее, где была сформирована сопряженная коллекция природной симбиотической системы, представленной растительным компонентом (*Melilotus albus* и *Medicago lupulina*) и ризобияльным компонентом (*Sinorhizobium meliloti* и *Sinorhizobium medicae*), и проведен анализ генетического разнообразия ризобияльного компонента сопряженной системы (Мунтян и др. 2012).

Особый интерес в симбиотической интеграции макро- и микросимбионта представляют коэволюционные взаимоотношения ризобияльного сигнала (Nod-фактор) и растительного рецептора, участвующего в узнавании этого сигнала. В результате обмена сигнальными молекулами между партнерами запускается механизм образования специализированного органа — клубенька. В ответ на выделение корнем растения специфических индукторов — флавоноидов, азотфиксирующие бактерии начинают продуцировать сигнальные молекулы (Nod-факторы), запускающие процесс образования клубеньков у бобовых растений (Madsen et al., 2003). У бобовых растений имеются 7 генов, предположительно участвующих в распознавании и взаимодействии бактериальных сигналов микросимбионтов (Markmann, 2008). В рамках данной работы особый интерес представляет семейство генов, к которым относятся *nfr1* и *nfr5*, впервые выявленные у лядвенца японского (Madsen et al., 2003, Radutoiu et al., 2003), *Sym10* и *Sym2* у гороха посевного (Madsen et al., 2003), а также гомолог гена *nfr5* NFP у диплоидной люцерны (Limpens et al., 2003). Продукты этих генов, кодирующих *LysM*-содержащую рецепторную киназу, имеют довольно распространенную для растений доменную структуру, представленную внеклеточными *LysM*-доменами, предположительно участвующими в рецепции Nod-фактора, трансмембранный домен и внутриклеточный домен серин/треонин киназы. Однако в настоящее время еще недостаточно знаний, раскрывающих происхождение и механизмы функционирования группы рецепторных генов, а также взаимодействия их продуктов с сигнальными молекулами ризобияльных клеток.

Одна из самых малоисследованных проблем в области бобово-ризобияльного симбиоза — это эволюция ризобияльного Nod-фактора. Технические трудности анализа структуры Nod-факторов являются причиной того, что к настоящему времени известны структуры только типовых факторов (часто это смесь мажорных и минорных компонентов, продуцируемых одним и тем же штаммом) для одного-двух десятков видов ризобий. В то же время очень мало, или даже ничего не известно о внутривидовых структурных вариациях Nod-фактора. Тем не менее, существуют ясные свидетельства того, что даже в пределах одной и той же группы перекрестной инокуляции существуют генотипы ризобий одного и того же вида, которые предпочтительно выявляются в специфических растениях-хозяевах (Андронов и др., 1999). Перспективным направлением в исследованиях такого рода является использование методов компьютерного моделирования (Banks et al., 2005, Bellows, Floudas, 2010, Boutard et al., 2010, Byington et al., 1997, Gilson, Zhou, 2007). Возможности моделирования и его точность позволяют значительно сузить рамки последующих лабора-

Поступила в редакцию 07.11.2011
Принята к публикации 10.02.2012

торных исследований, глубже понять получаемые результаты, а в некоторых случаях — и вовсе обойтись без проведения дорогостоящих экспериментов.

Целью данной работы являлся анализ нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма экстрацеллюлярного рецепторного региона гена *nfr5* у части бобовых растений из сопряженной коллекции (*Melilotus albus*), сопоставление генетического разнообразия рецепторной части с данными RFLP-анализа симбиотических локусов ризобий, выделенных из-под растений донника, и анализ взаимодействия Nod-фактора *S. meliloti* с вариантами *LysM*-доменов рецептороподобной киназы, выявленных в популяции донника, ассоциированных с различными генотипами ризобий, с использованием протоколов докинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Сбор материала для сопряженной коллекции проводился на участке не возделываемых почв Северо-Западного региона (территория ВНИИСХМ) летом 2008 года (Мунтян и др., 2012).

Экстракция ДНК. Геномную растительную ДНК выделяли из 2-дневных проростков методом хлороформной экстракции с использованием СТАВ (Rogers & Bendich, 1984). Растительный материал тщательно гомогенизировали, затем ресуспендировали в СТАВ и инкубировали при температуре 65°C в течение 60 минут. После хлороформно-изоамиловой экстракции надосадочную жидкость, содержащую ДНК, осаждали равным объемом изопропанола, после чего промывали 70 %-м этиловым спиртом. Образец ДНК ресуспендировали в 50 мкл деионизированной воды.

Аmplификация участка гена *nfr5*. Полимеразную цепную реакцию участка гена *nfr5* проводили на термоциклере MyCycler (BioRad) с использованием пары вырожденных праймеров (*nfr5-for3* — 5'-AAGTCTTGGTTGTTAYTTGCCA-3' и *nfr5-Grev3* — 5'-TGCAGTCTCAGCTAATGAAGTAC-3'). Протокол ПЦР: начальная денатурация в течение 3 мин при 95 °C; последующие 30 циклов — 30 с при 94 °C, отжиг праймеров 30 с при 42 °C, элонгация 1 мин при 72 °C; конечная элонгация 4 мин при 72°C. Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 1 %-м агарозном геле с бромистым этидием. Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Kodak EDAS290.

Определение нуклеотидной последовательности. Продукты амплификации ДНК клонировали в векторе pTZ57R/T (Fermentas). Секвенирование проводили с использованием стандартных праймеров M13 на автоматическом приборе CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). Каждую последовательность секвенировали в двух направлениях. Нук-

леотидные последовательности были депонированы в GenBank (Don/9 JN870214, Don/8 JN870215, Don/7 JN870216, Don/6 JN870217, Don/4 JN870218, Don/21 JN870219, Don/19 JN870220, Don/18 JN870221, Don/16 JN870222, Don/15 JN870223, Don/14 JN870224, Don/13 JN870225, Don/11 JN870226, Don/10 JN870227. Don/1 JN870228).

Данные по определению нуклеотидных последовательностей участка гена *nfr5* обрабатывали с использованием программного обеспечения секвенатора CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA). Выравнивание и сборку нуклеотидных и белковых последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Suite 8 (www.invitrogen.com). Построение филогенетических деревьев осуществляли с использованием программы Mega 5 (www.megasoftware.net). Анализ нуклеотидного полиморфизма и статистику по аминокислотным заменам проводили с использованием программы DNASp (www.ub.es/dnasp).

Молекулярное моделирование. Для проведения моделирования связывания белка и лиганда и оценки силы взаимодействия и влияющих на нее факторов, восстанавливали структуру взаимодействующих молекул с использованием fragment-based моделирования гомологов и метода распознавания фолда. Данные методы комбинировали с моделированием AB-initio и одной или несколькими итерациями минимизации потенциальной энергии молекулы.

Моделирование *LysM2* домена

Для исследования были выбраны две последовательности рецептороподобной киназы — (Don/14 JN870224, Don/1 JN870228). Эти последовательности обладают высокой гомологией (sequence identity 98,2 %, sequence similarity 98,5 %). Для моделирования были выбраны *LysM2* домены. Их последовательности абсолютно идентичны, за исключением замены N₁₃₁S. Было высказано предположение, что эта замена может играть роль в определении характера и силы связывания Nod-фактора и *LysM2* домена киназы *S. meliloti*.

Для моделирования мы использовали возможности метасервера Protein Model Portal, PMP (Arnold et al., 2009) — <http://www.proteinmodelportal.org> и сервисов Modeller (Eswar et al., 2006), Robetta, (Kim et al., 2004) и Phyre (Kelley, Sternberg, 2009). PMP позволяет получать результаты сразу с нескольких сервисов для моделирования третичной структуры белка по его аминокислотной последовательности. В качестве запроса мы использовали последовательности *LysM2* домена — участок аминокислотной последовательности 115–161 рецепторного участка гена *nfr5*.

Модели, полученные от вышеперечисленных сервисов моделирования третичной структуры, были

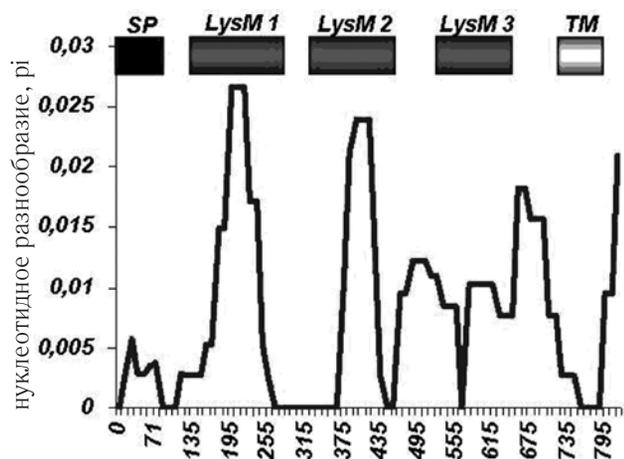


Рис. 1. Нуклеотидный полиморфизм доменной структуры рецепторного участка гена *nfr5* у *M. albus*

протестированы для выбора лучшей модели. Были использованы проверки качества геометрии (параметры и распределение торсионных углов, длины ковалентных связей, планарность пептидной связи, характеристики торсионных углов боковых цепей, расстояния $C_{\alpha}-C_{\alpha}$), предоставляемые сервисом WhatIf (Vriend, 1990), Procheck (Laskowski et al., 1993), а также использовали параметр потенциальной энергии молекулы (CHARMm, Gromos96). Ни одна из полученных моделей не обладала абсолютным преимуществом перед остальными моделями. Поэтому для последующего моделирования взаимодействия Nod-фактора и *LysM2* домена были выбраны две структуры, обладающие приемлемой потенциальной энергией и незначительными погрешностями в геометрии, не затрагивающими, однако, область связывания Nod-фактора (см. Результаты и обсуждение, рис. 3, а, б). Для последовательности с Asp131 (Don/14 JN870224) наилучшая модель была получена при помощи сервера I-Tasser (Roy et al., 2010; Zhang, 2008). Моделирование структуры *LysM2* домена с Ser131 при помощи Modeller дало наилучший результат. После выбора кандидатур была проведена финальная минимизация энергии и верификация обеих структур.

Моделирование структуры Nod-фактора.

Для моделирования структуры Nod-фактора был выбран мажорный фактор — основной компонент смеси Nod-факторов, продуцируемых *S. meliloti* (Denarie and Debelle, 1996). Для моделирования использовали сервер Ligand Expo (<http://ligand-expo.rcsb.org> (Feng et al., 2004)). Полученная структура была подвергнута процедуре минимизации энергии.

Моделирование связывания *LysM2* домена и Nod-фактора.

Моделирование связывания производилось при помощи AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009; Rockey et al., 2000). Нами применялись протоколы гибкого докинга — боковые цепи аминокислот, образующие две

короткие α -спирали и петли, формирующие переход α -спиралей в β -структуру на задней поверхности (см. Результаты и обсуждение, рис. 3) и молекула Nod-фактора обладали определенной свободой и могли изменять локальную конформацию. Вышеуказанные аминокислоты образовывали борозду на поверхности молекулы *LysM2* домена, которая и была выбрана нами в качестве предполагаемого места связывания Nod-фактора. Важно отметить, что пространство между Pro140-Leu147 (петля) и Lys149-Val154 (образующие β -элемент на задней поверхности) также могут участвовать в связывании (данные не приводятся).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования были определены нуклеотидные и аминокислотные последовательности рецепторной части гена *nfr5* у 15 растений донника белого. Размер рецепторного участка у большинства растений составил 823 п. н., кроме 3 растений (Don/6, Don/8, Don/11), у которых размер рецепторного участка был больше на один триплет. Распределение нуклеотидного полиморфизма в доменной структуре рецепторного участка приведено на рисунке 1.

Показано, что максимумы нуклеотидного полиморфизма приходятся на все три *LysM* домена гена *nfr5* (рис. 1). Возможно, это свидетельствует о давлении эволюционного отбора гена *nfr5* в направлении создания множества модификаций растительного рецептора с различной избирательностью по отношению к Nod-фактору (Diévert et al., 2003; Johnson, et al., 2005; Torii, 2004; Walker, 1994). В связи с этим, особый интерес представляет анализ на синонимичность/несинонимичность нуклеотидных замен. Однако небольшой размер нашей выборки не позволяет провести полноценный анализ такого рода. В данной работе мы приводим только значения констант K_s / K_a (соответствующие синонимичным и несинонимичным заменам) для каждого из трех доменов: *LysM1* — 0,002 / 0,007, *LysM2* — 0,01 / 0,004, *LysM3* — 0,00 / 0,009. Из приведенных данных видно, что в большей степени несинонимичные замены характерны для *LysM3* домена, несмотря на то, что уровень нуклеотидного полиморфизма выше в доменах *LysM1* и *LysM2*.

Однако наиболее интересной особенностью созданной коллекции является ее генетическая сопряженность с ризобийным компонентом, которая была обнаружена при сравнительном анализе генетического полиморфизма по растительному рецепторному гену *nfr5* и участку ризобийного генома — симбиотический локус *nodD*, результаты анализа которого были опубликованы в предыдущей статье (Мунтян и др., 2012). Сопоставление полученных данных выявило тот факт, что из 7 изолятов *S. meliloti*, характеризующихся RFLP-типом «А» по симбиотическому

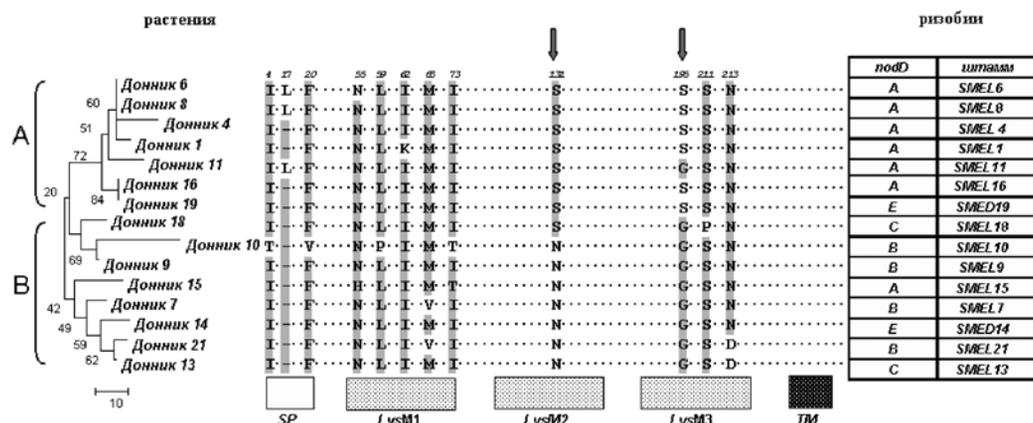


Рис. 2. Соотношение между генетическим разнообразием рецепторного участка гена *nfr5* растений донника и RFLP-типами по участку *nodD*. SMEL — штамм *S. meliloti*, SMED — штамм *S. medicae*.

участку генома *nodD*, 6 были выделены из растений донника, принадлежащих к обособленному (bootstrap 72 %) кластеру А по рецепторной части гена *nfr5* (рис. 4). Налицо очевидная и статистически достоверная ($p < 0,005$, в соответствии с критерием χ^2) связь между генотипами растения-хозяина и микросимбионта. Интересно, что вряд ли существует функциональная связь между растительным рецептором и продуктом конститутивно экспрессирующегося гена *nodD*, который активирует транскрипцию структурных генов, вовлеченных в синтез Nod-фактора. Однако для объяснения выявленной сопряженности можно заметить, что ген *nodD* является составной частью оперона, ответственного за синтез Nod-фактора, взаимодействующего с растительным рецептором. Таким образом, в данном случае RFLP-типы по участку *nodD* лишь маркируют различные типы симбиотической плазмиды ризобий, с которыми, в свою очередь, и могут быть сопряжены особые варианты растительных рецепторов. Данные рассуждения опираются на предположение о существовании различных типов Nod-факторов, продуцируемых штаммами *S. meliloti*, ответственных за тонкие вариации хозяйской специфичности у различных штаммов *S. meliloti*. В то же время систематического изучения Nod-факторов этого вида ризобий не проводилось и к настоящему времени мало известно о разнообразии Nod-факторов в пределах вида *S. meliloti*, известно лишь то, что кроме мажорного компонента штаммы *S. meliloti* могут продуцировать несколько минорных вариантов Nod-фактора (Denagie and Debelles, 1996). Тем не менее, выявленное сопряжение трудно объяснить без предположения о существовании различных типов Nod-факторов у ризобий этого вида, либо об изменениях в составе смеси Nod-факторов, продуцируемой различными штаммами ризобий.

Полученные результаты являются хорошей отправной точкой для следующего этапа нашего исследования — молекулярного моделирования функционального взаимодействия растительных рецепторов с Nod-фактором, для мажорного варианта которого на

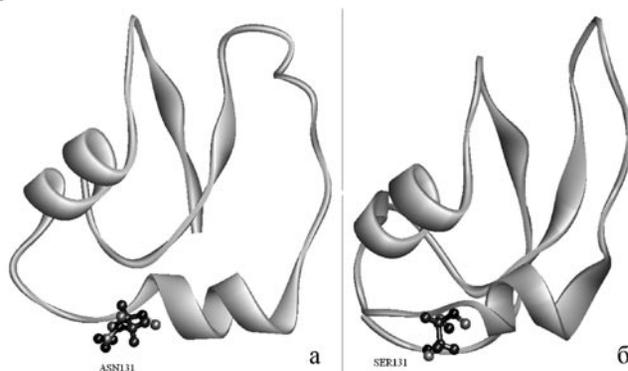


Рис. 3. Структура *LysM2* домена
а. Модель с Asn131. б. Модель с Ser131

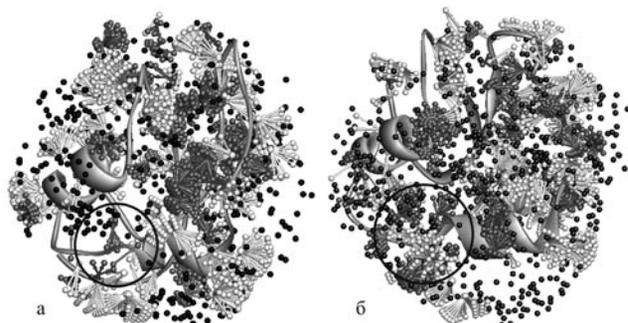


Рис. 4. Фармакофоры *LysM2* домена. Черные шары — области гидрофобного взаимодействия, белые шары и стрелки — области Н-доноров, серые шары и стрелки — области Н-акцепторов, а — область Ser131, б — область Asn131

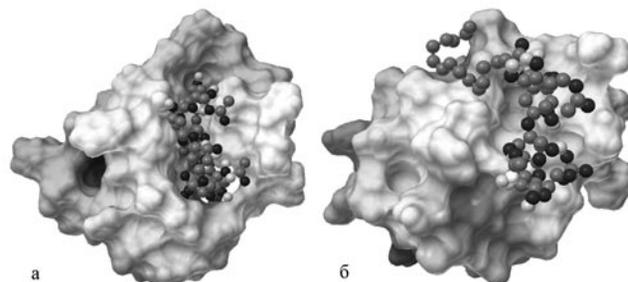


Рис. 5. Докинг Nod-фактора и *LysM2* домена рецептороподобной киназы *Sinorhizobium meliloti*. а — *LysM2* домен с Asn131, б — *LysM2* домен с Ser131

сегодняшний день известна химическая структура. На рисунке 2 видно, что характерной особенностью кластера А по гену *nfr5* являются две замены — в позиции 131 (*LysM2* домен) и в позиции 195 (*LysM2* домен). Эффект одной из этих замен (131 позиция) на взаимодействие с типичным Nod-фактором *S. meliloti* был детально проанализирован в ходе экспериментов по молекулярному докингу.

Для предсказания возможного связывания на поверхности обоих *LysM2* доменов, была построена карта центров гидрофобности, Н-доноров и Н-акцепторов (рис. 4). Анализ показал, что предполагаемые сайты связывания Nod-фактора, включая борозду на передней поверхности, имеют достаточно точек гидрофобного взаимодействия. Существенные различия между двумя моделями имеются в области мутации N131S.

Комплексы, обладающие наименьшей энергией связывания, представлены на рисунке 5. Энергия связывания Nod-фактора и варианта *LysM2* домена рецептороподобной киназы *S. meliloti* с *Asn131* (рис. 5 а) была меньше (5.39 kcal/mol), чем варианта этого домена с *Ser131* (6.89 kcal/mol, рис. 5 б). Кластеризация комплексов *LysM2-Nod* показала, что кластеры *LysM2(Asn131)-Nod* расположены значительно кучнее, чем кластеры *LysM2(Ser131)-Nod*. Разброс энергий связывания составил 5,39–24,65 kcal/mol в первом случае и 6,89–123,18 kcal/mol во втором.

Компьютерное моделирование связывания Nod-фактора и *LysM2*-домена не позволяет сделать однозначный вывод о влиянии полиморфизма *LysM2* домена на характер и силу взаимодействия. Однако анализ результатов моделирования показал, что вариант *LysM2* с *Asn131* более предпочтителен для взаимодействия с Nod-фактором не только благодаря меньшей энергии связывания, но и более выгодной конформации молекулы Nod-фактора. Обращает на себя внимание и плотность кластеров конформаций Nod-фактора. Это говорит о том, что вероятность связывания Nod-фактора с *LysM2 (Asn131)* в целом выше, чем с *LysM2 (Ser131)*. Выявленная экспериментально избирательность связывания Nod-фактора может быть обусловлена как их разнообразием, так и участием в рецепции остальных доменов белка.

Таким образом, в настоящем исследовании, по всей видимости, впервые продемонстрирован феномен генетической сопряженности симбиотических систем бобово-ризобияльного симбиоза, выражающийся в статистически достоверном предпочтении растениями донника, относящимися к специфическому генотипу (по рецепторному гену *nfr5*) специфических генотипов ризобий (по симбиотическому участку *nodD*). В качестве рабочей гипотезы, способной объяснить данное предпочтение, использовали допущение о существовании различных вариантов ризобияльного

Nod-фактора, экскретируемого штаммами *S. meliloti*, относящихся к различным генотипам. Данная гипотеза была проверена с использованием молекулярного докинга, «примеряющего» стандартный мажорный Nod-фактор *S. meliloti* к двум вариантам растительного рецептора, выявленным в настоящем исследовании. Выявленные различия в интеграции бобово-ризобияльной системы иллюстрируют принципиальную возможность связи аминокислотного полиморфизма в рецепторных участках растительного гена *nfr5* при взаимодействии с различными (но неустановленными) вариантами Nod-фактора *S. meliloti*.

Работа поддержана Министерством науки и образования РФ (ГК № 16.552.11.7047) и грантом РФФИ 12-04-01768-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андронов Е. Е., Румянцева М. Л., Сагуленко В. В., Сударов Б. В., 1999. Влияние растения-хозяина на генетическое разнообразие природной популяции *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. № 10, С. 1169–1177.
2. Мунтян А. Н., и др. 2012. Сопраженные симбиотические популяции. Часть I: анализ генетического разнообразия ризобияльного компонента. // Экологическая генетика. Т. 1, N1, С. 3-11
3. Albrecht C., Geurts R., Bisseling T., 1999. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet // The EMBO journal. Vol. 18. № 2. P. 281–288.
4. Arnold K., Kiefer F., Kopp J. et al., 2009. The Protein Model Portal // Journal of structural and functional genomics. Vol. 10. № 1. P. 1–8.
5. Arrighi J. F., Barre A., Ben Amor B. et al., 2006. The Medicago truncatula lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes // Plant physiology. Vol. 142. № 1. P. 265–279.
6. Banks J. L., Beard H. S., Cao Y. et al., 2005. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT) // Journal of Computational Chemistry. Vol. 26. № 16. P. 1752–1780.
7. Bellows M. L., Floudas C. A., 2010. Computational methods for de novo protein design and its applications to the human immunodeficiency virus 1, purine nucleoside phosphorylase, ubiquitin specific protease 7, and histone demethylases // Current drug targets. Vol. 11. № 3. P. 264–278.
8. Boutard N., Jamieson A. G., Ong H. et al., 2010. Structure-activity analysis of the growth hormone secretagogue GHRP-6 by alpha- and beta-amino gamma-lactam positional scanning // Chem Biol Drug Des. Vol. 75. № 1. P. 40–50.

9. Byington C. L., Dunbrack R. L., Jr., Cohen F. E. et al., 1997. Molecular modeling of phosphofructokinase from *Entamoeba histolytica* for the prediction of new antiparasitic agents // Archives of medical research. Vol. 28. Spec. №. P. 86–88.
10. Denarie J., F. Debelle. 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis // Annu Rev. Biochem. Vol. 65. P. 503–535.
11. Diévert A, Clark S E., 2003. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases // Curr Opin Plant Biol. Vol. 6. № 5. P. 507–516.
12. Eswar N., Webb B., Marti-Renom M. A. et al., 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller // Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis et al., Chapter 5. P. Unit 5 6.
13. Feng Z., Chen L., Maddula H. et al., 2004. Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules // Bioinformatics. Vol. 20. № 13. P. 2153–2155.
14. Gilson M. K., Zhou H. X., 2007. Calculation of protein-ligand binding affinities // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. Vol. 36. P. 21–42.
15. Johnson, K. L., Ingram G. C., 2005. Sending the right signals: Regulating receptor kinase activity // Curr. Opin. Plant Biol. Vol. 8. P. 648–656.
16. Kelley L. A., Sternberg M. J., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server // Nature protocols. Vol. 4. № 3. P. 363–71.
17. Kim D. E., Chivian D., Baker D., 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server // Nucleic acids research. Vol. 32 (Web Server issue). P. 526–531.
18. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. et al., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // Journal of Applied Crystallography. Vol. 26. № 2. P. 283–291.
19. Lerouge P., Roche P., Faucher C. et al., 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal // Nature. Vol. 344. P. 781–784.
20. Limpens E., Franken C., Smit P. et al., 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection // Science. Vol. 302. № 5645. P. 630–633.
21. Madsen E. B., Madsen L. H., Radotoiu 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.
22. Markmann K., Giczey, G., Parniske M., 2008. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria // PLoS Biol. Vol. 6. P. 496–506.
23. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W. et al., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // Journal of Computational Chemistry. Vol. 30. № 16. P. 2785–2791.
24. Mulder L., Lefebvre B., Cullimore J. et al., 2006. LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors // Glycobiology. Vol. 16. № 9. P. 801–809.
25. Navarro-Gochicoa M. T., Camut S., Timmers A. C., et al., 2003. Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in roots of *Medicago truncatula*. Structure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* // Plant physiology. Vol. 133. № 4. P. 1893–910.
26. 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. 585–592.
27. Rockey W. M., Laederach A., Reilly P. J., 2000. Automated docking of alpha-(1->4)- and alpha-(1->6)-linked glucosyl trisaccharides and maltopentaose into the soybean beta-amylase active site // Proteins. Vol. 40. № 2. P. 299–309.
28. Rogers S. O., Bendich A. J., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. Vol. 5. P. 69–76.
29. Roy A., Kucukural A., Zhang Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // Nature protocols. Vol. 5. № 4. P. 725–738.
30. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. Torii K. U., 2004. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: Structure, function, and signal transduction pathways // Int. Rev. Cytol. Vol. 234. P. 1–46.
32. Vriend G., 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program // Journal of Molecular Graphics. Vol. 8. № 1. P. 52–56, 29.
33. Walker J. C., 1994. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants // Plant Mol. Biol. Vol. 26. P. 1599–1609.
34. www.invitrogen.com
35. www.megasoftware.net.

36. www.ub.es/dnasp
37. Zhang Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction // BMC Bioinformatics. Vol. 9. P. 40.

LINKED SYMBIOTIC POPULATIONS: ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN NFR5 RECEPTOR GENE BY USING MOLECULAR DOCKING

Porozov Y. B., Muntyan A. N., Chizhevskaya E. P., Simarov B. V., Andronov E. E

✿ **SUMMARY:** In the present work a molecular genetic analysis of the receptor part of the *nfr5* gene in 15 plants of the conjugate collection (the plant component *Melilotus albus*, the bacterial component *Sinorhizobium meliloti*) has been done. Was studied the *LysM* domains structure and found a high level of the nucleotide polymorphism in *LysM* domains of this gene. A clear relationship of nucleotide and amino acid polymorphism in the receptor region of the *nfr5* gene with the genetic diversity of the rhizobial component (bacterial symbiotic locus *nodD*) was observed. Based on these data, the computer modeling of binding of the bacterial Nod-factor with two different variants of the plant receptor was performed.

✿ **KEY WORDS:** conjugate collection; *nfr5*; Nod-factor; *Melilotus albus*; molecular modeling; docking.

✿ Информация об авторах

Порозов Юрий Борисович — зав. лабораторией, к. м. н., лаборатория биоинформатики. Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр. 49. E-mail: porozov@ifc.cnr.it.

Мунтян Алексей Николаевич — мл. н. с., лаборатория № 6. E-mail: mirtrudmay@yandex.ru.

Чижевская Елена Петровна — ст. н. с., к. б. н., лаборатория № 6. E-mail: genet@yandex.ru.

Симаров Борис Васильевич — зав. лабораторией, д. б. н., профессор, лаборатория № 6. E-mail: genet@yandex.ru.

Андронов Евгений Евгеньевич — зав. лабораторией, к. б. н., лаборатория № 8. E-mail: eeandr@gmail.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д.3.

Porozov Yuri Borisovich — Head of the Laboratory, Candidate of Medical Sciences, Laboratory of bioinformatics. National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics. E-mail: porozov@ifc.cnr.it.

Muntyan Alexey Nikolaevich — Junior Researcher, Lab № 6. E-mail: mirtrudmay@yandex.ru.

Chizhevskaya Elena Petrovna — Senior research associate, Candidate of Biological Sciences, Lab. № 6. E-mail: genet@yandex.ru.

Simarov Boris Vasilievich — Head of the Laboratory, Doctor of Biological Sciences, Professor, Lab № 6. E-mail: genet@yandex.ru.

Andronov Evgeny Evgenievich — Head of the Laboratory, Candidate of Biological Sciences, Lab № 8. E-mail: eeandr@gmail.ru.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia.