

Дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями

И.В. Леппянен¹, А.Н. Кириенко¹, А.А. Лобов², Е.А. Долгих¹ 

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий», научный парк, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В настоящей работе проведен анализ изменений в протеомном спектре корней гороха *Pisum sativum* L. при инокуляции клубеньковыми бактериями, направленный на выявление новых регуляторов развития симбиоза. Для изучения изменений в протеомном спектре корней гороха использован дифференциальный двумерный (2-D) электрофорез с флуоресцентными метками Cy2 и Cy5. Полученные изображения позволили выявить различия между контрольным вариантом (неинокулированные корни) и корнями, инокулированными ризобиями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 ч после инокуляции). Выявлено и идентифицировано 20 белков, синтез которых усиливался в процессе инокуляции корней гороха клубеньковыми бактериями. Для идентификации белков использовали масс-спектрометрический анализ триптических пептидов на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре, совмещенном с высокоэффективным жидкостным хроматографом. Среди таких белков впервые найдены бета-субъединица G-белка и дисульфид изомеразы/фосфолипаза C, функция которых может быть связана с сигнальной регуляцией симбиоза. Это показывает, что G-белки и фосфолипазы могут играть ключевую роль в развитии ранних стадий симбиоза у гороха. Дальнейшие эксперименты должны выявить, происходит ли взаимодействие бета-субъединицы G-белка с рецепторами к Nod-факторам и как это влияет на дальнейшую передачу сигнала. Среди других белков, изучение которых представляет интерес, обнаружены аннексин D8 и D1, протеинкиназа, взаимодействующая с кальцинерином B, актин-связывающий белок профилин, ГТФ-связывающий белок Ran1. Они могут быть вовлечены в регуляцию реакций с участием кальция, реорганизацию актинового цитоскелета и другие важные процессы у растений. Изучение роли таких белков-регуляторов в дальнейшем станет основой для понимания сложной системы сигнальной регуляции, которая активируется у растений гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями.

Ключевые слова: горох *Pisum sativum* L.; бобово-ризобияльный симбиоз; протеомный анализ; дифференциальный 2-D-электрофорез.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Леппянен И.В., Кириенко А.Н., Лобов А.А., Долгих Е.А. Дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):196-204. DOI 10.18699/VJ18.347

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Leppyanen I.V., Kirienko A.N., Lobov A.A., Dolgikh E.A. Differential proteome analysis of pea roots at the early stages of symbiosis with nodule bacteria. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):196-204. DOI 10.18699/VJ18.347 (in Russian)

УДК 635.656:631.847.211

Поступила в редакцию 09.12.2017

Принята к публикации 19.01.2018

© АВТОРЫ, 2018

 e-mail: dol2helen@yahoo.com

Differential proteome analysis of pea roots at the early stages of symbiosis with nodule bacteria

I.V. Leppyanen¹, A.N. Kirienko¹, A.A. Lobov², E.A. Dolgikh¹ 

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Resource Center "Development of Molecular and Cellular Technologies", Science Park, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

In this paper, we have analyzed changes in the proteomic spectrum of pea *Pisum sativum* L. roots during inoculation with rhizobial bacteria with the aim of revealing new regulators of symbiosis development. To study the changes in the proteome spectrum of pea roots, a differential two-dimensional (2-D) electrophoresis was performed using fluorescent labels Cy2 and Cy5. The images obtained made it possible to identify differences between the control variant (uninoculated roots) and the root variant after inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 hours after treatment). 20 proteins were revealed and identified, the synthesis of which was enhanced during the inoculation of pea roots by nodule bacteria. To identify the proteins, a mass spectrometric analysis of tryptic peptides was performed on a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer combined with a high-performance liquid chromatograph. Among such proteins, the beta-subunit of the G protein and the disulfide isomerase/phospholipase C were first found, whose function can be related to the signal regulation of symbiosis. This indicates that G-proteins and phospholipases can play a key role in the development of early stages of symbiosis in peas. Further experiments are expected to show whether the beta-subunit of the G protein interacts with the receptors to Nod factors, and how this affects the further signaling. Other proteins that might be interesting were annexin D8 and D1, protein kinase interacting with calcinerin B, actin-binding protein profilin, GTP-binding protein Ran1. They may be involved in the regulation of reactions with calcium, the reorganization of the actin cytoskeleton and other important processes in plants. The study of the role of such regulatory proteins will later become the basis for understanding the complex system of signal regulation, which is activated in pea plants by interaction with nodule bacteria.

Key words: pea *Pisum sativum* L.; legume-rhizobial symbiosis; proteomic analysis; differential 2-D electrophoresis.

Результатом взаимодействия бобовых растений с почвенными азотфиксирующими бактериями пор *Rhizobiales* является развитие новых специализированных латеральных органов, корневых клубеньков, в которых осуществляется процесс фиксации азота (Schultze, Kondorosi, 1998). В ходе последовательных взаимодействий между растениями и бактериями реализуется способность партнеров влиять на обмен веществ и защитные системы, пролиферацию и дифференцировку клеток, морфогенез. Такие процессы предполагают существенные изменения в качественном и количественном составе белков, участвующих в формировании новых органов у растений. Однако исследований по изучению изменений спектра белков при развитии симбиоза с ризобиями у бобовых растений выполнено не много (Morris, Djordjevic, 2001; Bestel-Corre et al., 2002; Schenkluhn et al., 2010; Marx et al., 2016).

В основе формирования бобово-ризобияльного симбиоза лежит обмен сигналами между партнерами. Выделяемые бактериями сигнальные молекулы, липохитоолигосахариды, Nod-факторы (nodulation – клубенькообразование), запускают комплекс специфичных ответов в эпидерме, перикле и коре корня растения, тем самым обеспечивая основу для последующего проникновения ризобий в клетки растений, развития инфекции и морфогенеза клубеньков. Как показали исследования последних лет, в узнавание хитоолигосахаридных сигнальных молекул могут быть вовлечены специализированные рецепторы, отличительной особенностью которых является присутствие LysM-мотивов во внеклеточных доменах (Morris, Djordjevic, 2001; Marx et al., 2016). У гороха – основного объекта наших исследований – предполагаемыми рецепторами к Nod-факторам могут быть LysM-рецепторподобные киназы SYM10, K1, SYM37 и LYR3, которые, объединяясь в комплексы, контролируют развитие разных этапов симбиоза (Madsen et al., 2003; Zhukov et al., 2008; Malkov et al., 2016). Активация под влиянием рецепторов компонентов сигнального пути необходима для развития в конечном итоге кальциевых волн в ядре и околядерном пространстве, что определяет стимуляцию ряда транскрипционных факторов и их взаимодействие с генами-мишенями.

Один из первых компонентов сигнального пути – LRR-рецептор-подобная киназа (LRR-РПК, от англ. leucine-rich repeats), принадлежащая к семейству рецепторов с лейцин-богатыми повторами во внеклеточном домене, которая у гороха кодируется геном *Sym19* (рис. 1) (Endre et al., 2002). Эксперименты по локализации белка показали его присутствие в цитоплазматической мембране клеток эпидермы корня. LRR-РПК SYM19 взаимодействует непосредственно с комплексом рецепторов к Nod-факторам, что определяет возможность передачи сигнала к компонентам сигнального пути в цитоплазме. Эти компоненты участвуют в развитии кальциевого ответа, но еще не выявлены у бобовых растений.

Как регулируется выход кальция из внутриклеточных депо и генерация Ca^{2+} -волн в клетках эпидермы бобовых растений – остается неясным, но этот процесс может быть сходен с тем, который наблюдается в клетках животных. Активация рецепторов, сопряженных с G-белками, приводит к диссоциации тримерной молекулы G-белка на

две функциональные субъединицы: альфа-субъединицу, содержащую GTP, и бета-, гамма-комплекс. Далее альфа-субъединица взаимодействует с ферментами фосфолипазой С и фосфолипазой D, которые гидролизуют находящийся в мембране фосфатидилинозитол с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Появление этих вторичных мессенджеров приводит к связыванию с мишенями, находящимися на поверхности внутриклеточных депо кальция и, как следствие, генерации периодических выбросов кальция – Ca^{2+} -волн. Отдельные факты, подтверждающие эту гипотезу, получены для бобовых растений. Так, эксперименты с ингибиторами показали, что G-белок, фосфолипаза С и фосфолипаза D могут быть вовлечены в активацию кальциевого сигнального каскада при симбиозе (den Hartog et al., 2001; D'Haese, Holsters, 2002). Таким образом, в контроле изменений концентрации кальция в клетках участвуют пока не идентифицированные регуляторы внутриклеточных депо кальция.

Однако следующий компонент, который влияет на содержание кальция уже в ядре, идентифицирован у бобовых растений. В формировании Ca^{2+} -волн в ядре клеток важную роль играет АТФ-регулируемая кальциевая помпа MCA8 (АТФаза SERCA-типа), локализованная в ядерной оболочке (см. рис. 1) (Caroen et al., 2011), и калиевый канал, кодируемый геном *Sym8* у гороха (Ane et al., 2004). Наличие участков связывания с другими белками в SYM8 позволяет рассматривать эти катионные каналы как составную часть многокомпонентного комплекса.

К развитию Ca^{2+} -волн имеют отношение также белки нуклеопорины, образующие ядерную пору (см. рис. 1). По аналогии с клетками животных в состав ядерной поры должны входить несколько белков. В настоящее время среди них выявлены NUP133 (Kanamori et al., 2006), NUP85 (Saito et al., 2007) и NENA (Groth et al., 2010). Мутации по генам *nup85*, *nup133* и *nen1* блокируют развитие кальциевых волн, которые активируются при запуске Nod-фактор-зависимого сигнального каскада, что подтверждает важную роль этих белков в генерации кальциевого сигнала. Изменения в концентрации Ca^{2+} в ядре активируют кальций, кальмодулин-зависимую протеинкиназу CcCaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase), кодируемую геном *Sym9* у гороха (Levy et al., 2004). В свою очередь, CcCaMK фосфорилирует транскрипционный фактор IPD3/CYCLOPS (Ovchinnikova et al., 2011), который взаимодействует с набором других транскрипционных факторов NSP1, NSP2, NIN и CAAT-боксы-связывающими NF-YA1, NF-YA2, необходимыми для инициации и дальнейшего развития инфекции (формирования инфекционной нити в эпидерме) и органогенеза клубенька (см. рис. 1) (Smit et al., 2005; Marsh et al., 2007; Oldroyd, Downie, 2008).

Таким образом, в процессе передачи сигнала от Nod-факторов у растений могут быть задействованы дополнительные белки-регуляторы, которые в настоящее время остаются еще не известными. Одним из возможных подходов для выявления белков может быть дифференциальный протеомный анализ корней гороха при инокуляции ризобиями. Однако исследований по протеомному анализу растений гороха при симбиозе с ризобиями практически не проводилось. Проанализирован только протеом изо-

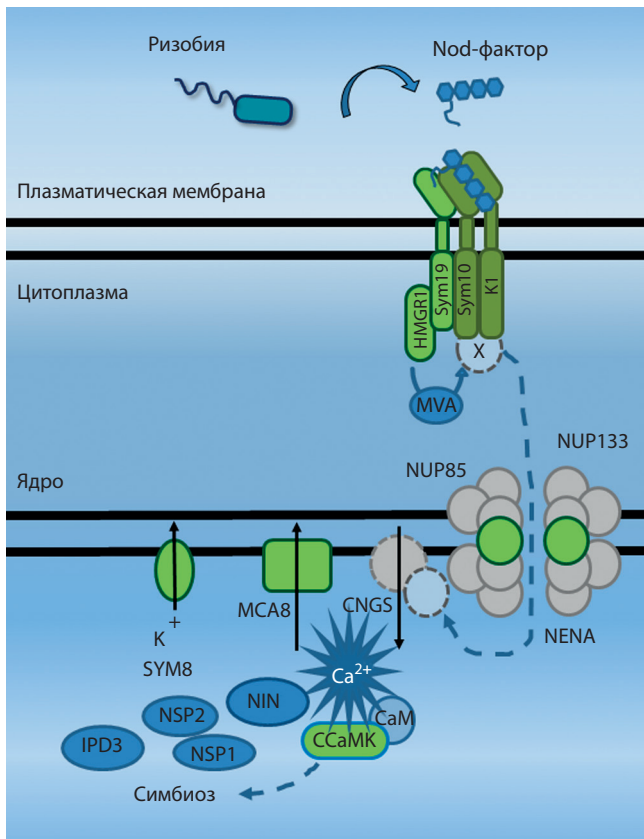


Рис. 1. Схема пути передачи сигнала при развитии бобово-ризобияльного симбиоза.

SYM10, K1 – LysM-рецепторы к Nod-факторам; SYM19 – LRR-рецептор-подобная киназа; MCA8 – АТФ-регулируемая кальциевая помпа (АТФаза SERCA-типа); HMGR1 – мевалонат синтаза (MVA – мевалонат, вторичный мессенджер); CNGS – кальциевый канал; SYM8 – калиевый канал; NUP133, NUP85 и NENA – белки нуклеопорины; CcCaMK – кальций, кальмодулин-зависимая протеинкиназа; IPD3, NSP1, NSP2 и NIN – транскрипционные факторы.

лированных из клубеньков гороха бактериоидов (Saalbach et al., 2002). У гороха ранее были исследованы протеомы корней, пораженных заразой горождатой *Orobancha crenata* и микосфереллой *Mycosphaerella pinode* (Castillejo et al., 2010, 2011). Изучено влияние салициловой и жасмоновой кислот на белковый состав корней и листьев гороха (Тарчевский и др., 2010; Тарчевский, Егорова, 2015), а также температурного стресса на развитие вегетативных органов и семян (Bourgeois et al., 2009; Dumont et al., 2011). В нашей работе проведен дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с клубеньковыми бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026, направленный на выявление новых регуляторов пути, активируемых сигнальными молекулами эндосимбионта.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Ризобияльный штамм *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (WDCM 966) выращивали в жидкой среде В⁻ (van Brussel et al., 1977) при 28 °С с добавлением 0.5 мг/мл антибиотика стрептомицина. Для инокуляции использовали 1 мл суспен-

зии бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (OD₆₀₀ = 0.5) на проросток.

Условия выращивания растений и подготовки материала. Семена гороха *Pisum sativum* L. сорта Frisson стерилизовали 5 мин в серной кислоте, после этого три раза промывали дистиллированной водой и проращивали на 1 % водном агаре в темноте в течение четырех суток. Проростки переносили в горшки со стерильным вермикулитом, политым раствором Jensen (van Brussel et al., 1982). Инокуляцию проростков проводили штаммом *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026, OD₆₀₀ ~0.5 по 1 мл на проросток. В качестве контроля использовали неинокулированные проростки, собранные на тех же сроках после проращивания. Растения находились в фитотроне при 21 °С, 16-часовом световом периоде, 60 % влажности. Для анализа собирали фрагменты главных корней, соответствующие зоне восприимчивости к ризобияльной инфекции. Материал замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Выделение суммарного белка из корней гороха. Для выделения белков из корней гороха использовали модифицированный метод (Dam et al., 2013; Kirienko et al., 2017). 100 мг корней растирали в жидком азоте, затем к материалу добавляли буфер для экстракции (0.1 М трис-НСl (рН 8.0), 30 % сахароза, 10 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 2 % додецилсульфат натрия (ДСН), смесь протеазных ингибиторов (Sigma, США)) и проводили экстракцию при +4 °С. Центрифугировали 15 мин при 12000 g, надосадочную жидкость смешивали в соотношении 1:1 с фенолом (рН 8.0) (Invitrogen, США), центрифугировали при 12000 g 5 мин. Верхнюю фазу отбирали, для осаждения белков к ней добавляли пять объемов охлажденного 100 мМ ацетата аммония в метаноле и инкубировали 30 мин при –20 °С. Центрифугировали 5 мин при 12000 g. Осадок промывали два раза 100 мМ ацетатом аммония в метаноле и дважды 80 % ацетоном. Осадок сушили на воздухе и растворяли в буфере для изофокусировки (25 мМ трис-НСl (рН 8.0), 9 М мочевины, 4 % CHAPS, 50 мМ ДТТ, 0.2 % амфолиты (BioRad Laboratories, США)). Концентрацию белка измеряли по методу (Bradford, 1976).

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ). Двумерный электрофорез белков проводили с использованием дифференциальной окраски образцов разными флуоресцентными метками (дифференцирующий двумерный электрофорез, DIGE) (Voss, Haberl, 2000). Для этого образцы конъюгировали в течение 30 мин на льду с активированными эфирами флуоресцентных красителей, разработанными для двумерного электрофореза Cyanine 2 или Cyanine 5 (Cy2 и/или Cy5) (Lumiprobe, Россия) в различных комбинациях. Раствор для инкубации содержал 400 пМ каждого красителя, растворенного в диметилформамиде в течение 30 мин на льду. С момента конъюгации образцов с флуоресцентными метками все манипуляции проводили в темноте. Реакцию останавливали внесением 10 мМ L-лизина (Sigma-Aldrich, США) с последующей инкубацией в течение 10 мин на льду. После этого контрольные и экспериментальные образцы смешивали, добавляли ДТТ и амфолиты (50 мМ ДТТ, 0.2 % амфолитов (BioRad Laboratories, США)). Проводили пассивную регидратацию гелей с иммобилизованным

градиентом pH (BioRad Laboratories, США) в течение ночи при комнатной температуре. Общее количество образца, наносимого на 18 см гель (pH 3-10, BioRad Laboratories, США), составило 250 мкг.

ИЭФ проводили в приборе Protean IEF (BioRad Laboratories, США) при температуре 20 °С, образцы обессоливали при 250 В в течение 15 мин, после этого напряжение линейно увеличивалось до 4000 В в течение 2 ч, затем ИЭФ проводили при увеличении напряжения до 10000 В и ограничении силы тока до 35 мА на геле. После процедуры ИЭФ белки разделяли во втором направлении в полиакриламидном геле (ПААГ). Перед проведением электрофореза восстановление белков проводили в буфере с ДТТ (6 М мочевины, 0.375 М трис, pH 8.8, 2 % ДСН, 20 % глицерина, 2 % ДДТ) в течение 10 мин с последующим алкилированием в буфере с иодацетамидом (6 М мочевины, 0.375 М трис, pH 8.8, 2 % SDS, 20 % глицерина, 2.5 % иодацетамида) в течение 15 мин.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Второе направление двумерного электрофореза проводили в трис-глициновом буфере по Лэммли (25 мМ трис-НСl, 192 мМ глицина, 0.1 % SDS, pH 8.3) в 15 % ПААГ с использованием 4 % концентрирующего геля при силе тока 16 мА для концентрирующего геля и 24 мА на разделяющий геле. После разделения белков в двух направлениях гели визуализировали с использованием лазерного сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Германия). Гели промывали три раза в течение 5 мин водой MQ и окрашивали раствором SimpleBlue (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Для выявления дифференциальных белков разные флуоресцентные каналы (Cy2 и Cy5) одного геля окрашивали отличающимися псевдоцветами, после этого получали наложенное изображение. Анализ изображений осуществляли с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Трипсинолиз белков и масс-спектрометрический анализ. После окрашивания фрагменты геля, содержащие целевые белки, вырезали и измельчали скальпелем. Для вымывания красителя и ДСН фрагменты геля трижды промывали раствором 30 мМ трис, pH 8.2 в 50 % ацетонитриле в течение 15 мин при комнатной температуре и постоянном помешивании. Для регидратации к гелю добавляли 150 мкл 100 % ацетонитрила (LiChrosolv, Германия), затем ацетонитрил удаляли, пробы сушили на воздухе 10 мин. При трипсинолизе белки регидратировали в растворе трипсина (20 нг/мкл трипсина, 30 мМ трис, pH 8.2) на льду в течение одного часа, избыток раствора трипсина удаляли и вносили 50 мкл буфера (30 мМ трис, pH 8.2). Трипсинолиз проводили в течение одного часа при 56 °С. Триптические пептиды экстрагировали из геля 50 % ацетонитрилом, подкисленным 0.1 % муравьиной кислотой. Полученный раствор высушивали в вакуумном концентраторе CentriVap (Labronco) при 4 °С и растворяли в фазе А для последующей хроматографии (5 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота). Масс-спектрометрический анализ триптических пептидов проводили на квадруполь-время-пролетном масс-спектрометре Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies), совмещенном с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies). Хроматографическое разделение

осуществляли в системе вода–ацетонитрил в присутствии 0.1 % муравьиной кислоты (фаза А – 5 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота; фаза Б – 90 % ацетонитрил, 0.1 % муравьиная кислота) в градиенте ацетонитрила (от 5 до 60 % фазы Б за 25 мин и до 100 % фазы Б за 5 мин) на колонке Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies; 3.5 мкм, внутренний диаметр 0.10 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин.

Анализ ионов проводили с частотой три спектра в секунду в режиме автоматического tandemного масс-спектрометрического (МС/МС) анализа с материнскими ионами 2+, 3+, *n*+. Анализ данных осуществляли с помощью программы Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Rev B.04.00.127; Agilent Technologies) с поиском по базе данных UniProt и базе данных, полученной на основе доступных транскриптомов гороха <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDTM01000000>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDTL01&display=contigs&page=1>, в режиме идентификации с учетом возможной ошибки определения массы материнских ионов не более 20 ppm. Оценку достоверности данных проводили с использованием процедуры автовалидации при пороговом значении отсека ложноположительных результатов (false discovery rate – FDR) в 1 %.

Результаты и обсуждение

Для изучения изменений в протеомном спектре корней гороха нами проведен дифференциальный двумерный (2-D) электрофорез с использованием флуоресцентных меток Cy2 и Cy5. Полученные таким образом изображения позволили выявить различия между контрольным вариантом (неинокулированные корни) и корнями, инокулированными ризобиями *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 (24 ч после инокуляции). В результате двух независимо проведенных экспериментов выявлены и идентифицированы 20 белков, синтез которых усиливался в процессе инокуляции корней гороха клубеньковыми бактериями (таблица и рис. 2). Среди них идентифицированы регуляторы синтеза белков и полисахаридов, а также белки, контролирующие защитные реакции растений, что согласуется с полученными ранее данными при изучении протеомов корней и клубеньков других бобовых растений (Marx et al., 2016). Однако наибольший интерес для нас представляли белки, которые могут потенциально участвовать в сигнальной регуляции развития симбиоза.

Среди выявленных белков, синтез которых увеличивался в корнях гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями, идентифицированы с помощью масс-спектрометрического анализа аннексин D8 и аннексин D1 (см. таблицу и рис. 2). Аннексины относятся к семейству кальций-зависимых белков, которые способны связывать фосфолипиды. В состав этого семейства входит около 160 белков, выявленных у самых разнообразных видов растений (Gerke, Moss, 2002). Все аннексины имеют сходную структуру, представленную входящими в состав белка четырьмя-восемью консервативными доменами, состоящими из 70 остатков аминокислот, так называемыми аннексиновыми повторами (Moss, Morgan, 2004). Эти домены позволяют аннексинам взаимодействовать с мембранами Ca²⁺-зависимым образом или формиро-

Белки, синтез которых усиливается в корнях гороха при заражении клубеньковыми бактериями (24 ч после инокуляции)

Номер пятна в геле	ID транскрипта по транскриптомным базам корней и клубеньков гороха	ID гомологов в NCBI	Функция белка
1	GDTL01033452.1	XM_003598600.2	Аннексин D8 <i>M. truncatula</i>
2	GDTL01002621.1	XM_013604591.1	Гамма-субъединица фактора элонгации трансляции EF1B <i>M. truncatula</i>
3	GDTL01020570.1	KJ808806.1 АНХ83821.1	Белок теплового шока HSP4 <i>C. arietinum</i> / белок теплового шока HSP70 <i>M. truncatula</i>
4	GDTL01005518.1	XM_013605823.1	Дисульфид изомеразы/фосфолипаза С <i>M. truncatula</i>
5, 25	GDTM01032258.1	XM_003625987.2	S-аденозил-метионин синтаза <i>M. truncatula</i>
6	GDTL01025284.1	XM_003629562.2	S-аденозил-L-гомоцистеин гидролаза <i>M. truncatula</i>
7	GDTL01011909.1	AB003549.1	F1 АТФаза <i>P. sativum</i>
8	GDTL01012229.1	XM_003616132.2	УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилил трансфераза <i>M. truncatula</i>
9	GDTM01040593.1	XM_013598882.1	Белок позднего эмбриогенеза LEA <i>M. truncatula</i>
10	GDTL01000457.1	XM_013602207.1	3,5-эпимераза/4-редуктаза <i>M. truncatula</i>
11, 13	GDTM01005945.1	XM_004516121.2	Аннексин D1 (LOC101505987) <i>C. arietinum</i>
12	GDTL01033302.1	XM_003631023.2	Бета-субъединица ГТФ-связывающего белка (бета-субъединица G-белка) <i>M. truncatula</i>
14	GDTL01014419.1	U84198.1	Липоксигеназа <i>P. sativum</i>
15	GDTM01017555.1	U65421.1	Защитный белок антипатогенного действия PR10 <i>P. sativum</i>
16	GDTL01001386.1	XM_003630650.2	Профилин <i>M. truncatula</i>
23	GDTM01018991.1	X71388.1	Нуклеозид-дифосфат киназа ndk-p1 <i>P. sativum</i>
24	GDTM01011284.1	L47968.1 EF208905	Белок каллуса P23/кальцинерин В взаимодействующая протеинкиназа <i>P. sativum</i>
26	GDTM01030585.1	Z25540.1	Порин <i>P. sativum</i>
27	GDTM01007003.1	EF194277.1	ГТФ-связывающий белок Ran1/TC4 (малый G-белок) <i>P. sativum</i>

вать потенциал-зависимые Ca²⁺-каналы (Pollard et al., 1990). В пользу этого предположения свидетельствуют результаты экспериментов по способности аннексинов формировать ионные каналы в искусственных мембранах.

Анализ литературных данных показал присутствие аннексина D8 (MtANN8) среди дифференциально синтезируемых белков близкого вида бобовых растений люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula*, формирующей симбиоз с клубеньковыми бактериями *Sinorhizobium meliloti* (Marx et al., 2016). Вероятно, аннексин D8 гороха *P. sativum* L. может выполнять сходную функцию с MtANN8 *M. truncatula*. Ранее другой аннексин, D1 (MtANN1), был выявлен и изучен в корнях *M. truncatula*, инокулированных ризобиями (Niebel et al., 1998). Индукцию экспрессии *MtAnn1* гена наблюдали в формирующихся клубеньках на 4-й и 16-й дни после инокуляции *S. meliloti*, но максимального уровня она достигала через 24 ч, что соответствовало нашим результатам для гороха. Гибридизация *in situ* показала локализацию *MtAnn1* в преинфекционной и инфекционной зоне II корневых клубеньков. Это свидетельствовало об участии аннексина D1 в контроле ранних стадий развития симбиоза. Рекомбинантный MtANN1 связывался с мембраной кальций-зависимым способом и формировал канал, который мог проводить ионы K⁺ и Na⁺ через билипидный слой с высокой эффективностью (Kodavali et al., 2013).

Интересно, что эксперименты на растениях *M. truncatula*, обработанных экссудатами гриба арбускулярной микоризы *Rhizophagus irregularis*, также формирующего симбиозы с растениями, показали, что аннексин активируется и в ответ на действие сходных по структуре сигнальных молекул грибов несультатированных липохитоолигосахаридов Мус-факторов (24 ч обработки) (Sun et al., 2015). Причем индукция MtANN1 Мус-факторами зависела от транскрипционных факторов NSP1, NSP2 и RAM1 (Sun et al., 2015). Эти данные позволяют предположить, что аннексины могут играть существенную роль в сигнальной регуляции развития симбиоза гороха не только с азотфиксирующими бактериями, но и с грибами арбускулярной микоризы.

Среди других выявленных белков большой интерес для нас представляла бета-субъединица гетеротримерного ГТФ-связывающего G-белка (см. таблицу и рис. 2). При активации лигандом рецептора, связанного с G-белком, состоящим из трех субъединиц, альфа, бета и гамма (G_α, G_β и G_γ), происходит замещение гуанозиндифосфата (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ) в G_α-субъединице. Это изменяет ее конфигурацию и приводит к диссоциации комплекса и отделению димера G_{βγ} (из двух субъединиц – бета и гамма), который независимо активирует сигнальный путь, включающий фосфолипазы С и D, ионные каналы и митоген-активируемые протеинкиназы. Активность

гетеротримерного G-белка находится под контролем так называемого регулятора сигнального домена (regulator of G-protein signaling domain, RGS), который контролирует стабильность комплекса.

Общее количество разных субъединиц G-белка варьирует у разных растений. Например, у арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* выявлено по одной G α - и G β -субъединице, но две G γ -субъединицы (Mason, Botella, 2000). В геноме риса найдено по одной копии гена, кодирующей G α -, G β - и G γ -субъединицы. Напротив, в геноме бобового растения сои *Glycine max* L. обнаружено большее количество генов, кодирующих субъединицы G-белков 4 G α , 4 G β и 12 G γ (Choudhury et al., 2011).

Известно, что G-белки участвуют во множестве процессов у растений: органогенезе (Ullah et al., 2003), восприятию света (Chen, 2008), развитии защитных реакций при иммунном ответе (Zhang et al., 2012). G-белки могут быть вовлечены в сигнальные пути, активируемые фитогормонами – абсцизовой кислотой, брассиностероидами и ауксинами – при прорастании семян и на ранних стадиях развития проростков (Subramaniam et al., 2016).

Недавно для сои была показана ключевая роль G-белков в симбиозе. Существенное усиление синтеза G-белков, представленных двумя бета-субъединицами, G β 3 и G β 4, выявлено в клубеньках, формирующихся при инокуляции растений бактериями *Bradyrhizobium japonicum* (Choudhury, Pandey, 2015). Эксперименты по РНК-интерференции *GmG β 3* и *GmG β 4* показали снижение количества клубеньков на корнях растения, что свидетельствует об их положительном влиянии на формирование симбиотических органов у сои. Напротив, альфа-субъединицы G α могут являться негативными регуляторами формирования клубеньков. Возможность формирования комплекса между альфа-субъединицей G α и рецептором GmNFR1 к Nod-факторам показана в разных гетерологичных системах (Choudhury, Pandey, 2015). В этом случае GmNFR1 может фосфорилировать и активировать RGS, который поддерживает альфа-субъединицу G α -белка в неактивной конформации, что позволяет развиваться симбиозу (Choudhury, Pandey, 2015).

В результате выполненных нами экспериментов удалось показать увеличение синтеза бета-субъединицы G-белка в корнях гороха при инокуляции. Это указывает на то, что G-белки могут играть ключевую роль в развитии ранних стадий симбиоза у гороха, вероятно, через взаимодействие с рецептором к Nod-факторам. Дальнейшие эксперименты должны показать, происходит ли взаимодействие бета-субъединицы G-белка с рецепторами к Nod-факторам и как это влияет на развитие симбиоза у гороха. Такие исследования позволят найти другие компоненты, которые вовлечены в передачу сигнала от G-белка.

Одним из таких потенциальных компонентов может быть выявленная нами дисульфид изомеразы/фосфолипаза С. В дальнейшем предстоит выяснить, будет ли данная фосфолипаза С активироваться G-белком.

Следует отметить, что помимо гетеротримерного G-белка в корнях гороха увеличивался синтез другого мономерного ГТФ-связывающего Ran-белка (малого Ran-белка) (см. таблицу и рис. 2). Надсемейство малых ГТФ-связывающих белков (называемое также надсемейством Ras)

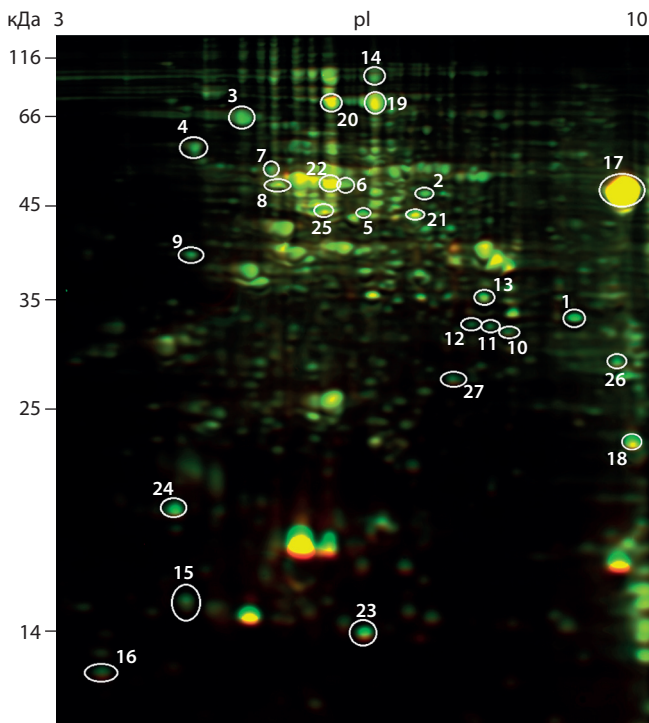


Рис. 2. Дифференциальный протеомный анализ корней гороха *Pisum sativum* L. при инокуляции клубеньковыми бактериями.

Пятна 1–16 и 23–27 вырезаны из геля и идентифицированы как белки, синтез которых усиливается при инокуляции; пятна 17–22 вырезаны для идентификации конститутивно синтезируемых белков.

делится на пять семейств у дрожжей и животных (Rab, Ras, Arf, Rho и Ran), однако у растений семейство Ras не обнаружено (Rivero et al., 2017). Эти белки являются регуляторами многих клеточных процессов. Малые ГТФ-связывающие Ran-белки участвуют в везикулярном транспорте, передаче сигнала в клетках, перестройках цитоскелета и контроле митоза (контролируют работу структур, которые разделяют хромосомы между дочерними клетками при клеточном делении). У растений (арабидопсис) идентифицированы малые RanBP1 и RanGAP белки (Ach, Gruissem, 1994; Rivero et al., 2017). RanBP1 имеет высокий уровень сходства с гомологичными белками животных и дрожжей, в то время как RanGAP обладает рядом уникальных доменов (N-концевым доменом, который определяет локализацию в оболочке ядра клеток) и участвует в формировании митотических структур в клетках растений.

Выявленный нами малый ГТФ-связывающий белок PsRAN1 ранее уже был обнаружен у гороха, показана его важная роль в органогенезе корней (Lee et al., 2008). Большой интерес может представлять изучение роли PsRAN1 белка, найденного нами в протеоме корней гороха при заражении ризобиями, в контроле развития симбиотических клубеньков.

Среди белков, синтез которых усиливается при инокуляции, обнаружен профилин, который является актин-связывающим белком, участвующим в реорганизации актинового цитоскелета (см. таблицу и рис. 2). Для профилина экспериментально доказана возможность связывания с

актином (Valenta et al., 1993). Существенные изменения в организации цитоскелета наблюдаются при развитии инфекционных нитей, с помощью которых клубеньковые бактерии заражают клетки растений, а также при органогенезе клубеньков, что оказывает важное влияние на развитие симбиоза (Brewin, 1991). У бобовых профилин впервые найден у фасоли *Phaseolus vulgaris* L., изучена его локализация в клубеньках (Vidali et al., 1995). Однако у других бобовых роль профилинов при симбиозе не изучали.

Увеличение синтеза белка позднего эмбриогенеза (late embryogenesis abundant (LEA) protein) (см. таблицу и рис. 2), выявленное нами в корнях гороха при инокуляции, согласуется с ранее полученными данными для гомологичного LEA белка при анализе протеома корней и клубеньков люцерны слабоусеченной *M. truncatula* (Marx et al., 2016). Существенное усиление синтеза этого белка наблюдали в клубеньках *M. truncatula* на поздних стадиях развития (Marx et al., 2016). Сходным образом анализ данных по изучению транскриптомов позволил обнаружить несколько транскриптов, кодирующих LEA белки, экспрессия которых усиливается при развитии клубеньков бобовых растений *M. truncatula* и сои *Glycine max*.

Известно, что белки позднего эмбриогенеза синтезируются при созревании семян и в условиях водного дефицита. Они являются гидрофиллинами и защищают другие белки, в частности ферменты, от денатурации и агрегации в условиях недостатка воды (Battaglia et al., 2008). Кроме того, показано накопление LEA белков в меристемах растений, в том числе в апикальной меристеме главного корня и боковых корней (Colmenero-Flores et al., 1999). Такая локализация LEA белков позволяет предположить их участие в защите меристематических клеток от повреждений. Этим, вероятно, объясняется присутствие LEA белков в формирующейся меристеме клубеньков. Однако остается не ясным, какую именно роль выполняют эти белки в клубеньках, что требует дальнейшего изучения.

При развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями у бобовых растений активируются защитные реакции, обычно в течение 24–48 ч после инокуляции или обработки сигнальными молекулами Nod-факторами (Ramu et al., 2002; Nakagawa et al., 2011). Например, у люцерны *M. truncatula* на ранних сроках после инокуляции наблюдали усиление экспрессии генов, кодирующих защитные ферменты, такие как халконсинтаза, фенилаланин аммоний-лиаза и изофлавоноредуктаза (участвуют в синтезе фитоалексинов), а также белков, связанных с патогенезом PR6 и PR10 (pathogenesis related proteins) (Savouré et al., 1997). У другого бобового растения, *L. japonicus*, наблюдали увеличение экспрессии генов, кодирующих пероксидазу, хитиназу и транскрипционные факторы ERF и WRKY-семейств (Nakagawa et al., 2011). Однако при дальнейшем развитии симбиоза происходит подавление защитных реакций.

Действительно, анализ результатов выполненных нами экспериментов показал, что в протеоме инокулированных корней гороха наблюдается усиление синтеза белков PR10 и HSP70, а также липоксигеназы, имеющих отношение к развитию защитных реакций. Активация защитных реакций в ответ на заражение клубеньковыми бактериями

или обработку Nod-факторами может быть связана с развитием инфекционного процесса при симбиозе. Ранее необходимость образования активных форм кислорода была показана для формирования инфекционных нитей. Кроме того, с активацией защитных реакций (в частности, реакции гиперчувствительности) может быть связана негативная регуляция числа формирующихся инфекционных нитей, что ограничивает избыточное развитие инфекции (Vasse et al., 1993).

В протеоме инокулированных корней гороха обнаружен белок каллуса P23, который является протеинкиназой, взаимодействующей с кальцинерин B-подобными белками (calcineurin B-like interacting protein kinases, CIPK) (см. таблицу и рис. 2). Этот белок относится к семейству трансляционно контролируемых опухолевых белков (translationally-controlled tumor-like protein TCTP), широко распространенных среди эукариот. Основная функция белков семейства TCTP направлена на регуляцию содержания кальция в цитоплазме (Graidist et al., 2007). У млекопитающих белки этого семейства вовлечены главным образом в регуляцию пролиферации клеток и апоптоза, что связано с контролем содержания кальция в клетках.

Известно, что в регуляцию реакций с участием кальция могут быть вовлечены кальций-связывающие кальмодулины и кальмодулин-подобные белки (присутствуют у всех эукариот) и специфичные для растений кальций-зависимые протеинкиназы (calcium dependent protein kinase, CDPK) (Sanders et al., 2002), а также кальцинерин B-подобные белки (от англ. calcineurin B-like protein, CBL) и взаимодействующие с ними протеинкиназы CIPK (Battaglia, Kudla, 2009). Такое разнообразие позволяет формировать сложную динамическую сигнальную сеть, тонко регулирующую ответные реакции растения на разнообразные внешние и внутренние стимулы с участием кальция. У растений белки данного семейства участвуют в контроле развития апоптоза, при этом они могут связывать кальций и взаимодействовать с другими белками цитоплазмы и мембран (Zhang et al., 2012; Hoepflinger et al., 2013). Помимо апоптоза, белки способны регулировать реакцию растений на абиотический стресс и развитие иммунного ответа, в которых важную роль играет кальций (Sanders et al., 2002). Какую роль играет этот сигнальный регулятор в развитии симбиоза, еще предстоит выяснить.

Таким образом, проведенный нами дифференциальный протеомный анализ корней гороха на ранних этапах развития симбиоза с *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1026 позволил выявить ряд потенциальных регуляторов, детальное изучение роли которых в дальнейшем станет основой для понимания сложной системы сигнальной регуляции, активирующейся у растений гороха при взаимодействии с клубеньковыми бактериями.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-16-10043), с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» на базе ФГБНУ ВНИИСХМ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Тарчевский И.А., Егорова А.М. Протеомный анализ влияния циклогексимида на корни гороха. Физиология растений. 2015;62: 883-895. DOI 10.7868/S0015330315060172.
- Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. Протеомный анализ салицилат-индуцированных белков листьев гороха (*Pisum sativum* L.). Биохимия. 2010;75:689-697.
- Ach R.A., Gruissem W. A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell-cycle mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994;91(13):5863-5867. DOI 10.1073/pnas.91.13.5863.
- Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R., Oldroyd G.E., Ayax C., Lévy J., Debellé F., Baek J.M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B.A., Long S.R., Dénarié J., Cook D.R. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. Science. 2004; 303:1364-1367. DOI 10.1126/science.1092986.
- Batistic O., Kudla J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. Bioch. Biophys. Acta. 2009;1793(6):985-992. DOI 10.1016/j.bbamcr.2008.10.006.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcíarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. Plant Physiol. 2008;148:6-24. DOI 10.1104/pp.108.120725.
- Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Poinso V., Dieu M., Dierick J.F., van Tuinen D., Remacle J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Electrophoresis. 2002;23:122-137. DOI 10.1002/1522-2683(200201)23:1<122::aid-elps122>3.0.co;2-4.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254. DOI 10.1006/abio.1976.9999.
- Brewin N.J. Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell. Biol. 1991;7:191-226. DOI 10.1146/annurev.cellbio.7.1.191.
- Bourgeois M., Jacquín F., Savoie V., Sommerer N., Labas V., Henry C., Burstin J. Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. Proteomics. 2009; 9:254-271. DOI 10.1002/pmic.200700903.
- Capoen W., Sun J., Wysham D., Otegui M.S., Venkateshwaran M., Hirsch S., Miwa H., Downie J.A., Morris R.J., Ané J.M., Oldroyd G.E. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108:14348-14353. DOI 10.1073/pnas.1107912108.
- Castillejo M.Á., Curto M., Fondevilla S., Rubiales D., Jorrín J. Two-dimensional electrophoresis based proteomic analysis of the pea (*Pisum sativum*) in response to *Mycosphaerella pinodes*. J. Agric. Food Chem. 2010;58:12822-12832. DOI 10.1021/jf1036917.
- Castillejo M.Á., Fernández-Aparicio M., Rubiales D. Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. Exp. Bot. 2011;63:107-119. DOI 10.1093/jxb/err246.
- Chen J.G. Heterotrimeric G-protein signaling in *Arabidopsis*. Puzzling G-protein-coupled receptor. Plant Signal Behav. 2008;12:1042-1045. DOI 10.4161/psb.3.12.6064.
- Choudhury S.R., Bisht N.C., Thompson R., Todorov O., Pandey S. Conventional and novel G γ protein families constitute the heterotrimeric G-protein signaling network in soybean. PLoS ONE. 2011; 6(8):e23361. DOI 10.1371/journal.pone.0023361.
- Choudhury S.R., Pandey S. Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in soybean. Plant Cell. 2015;27(11):3260-3276. DOI 10.1105/tpc.15.00517.
- Colmenero-Flores J.M., Moreno L.P., Smith C., Covarrubias A.A. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. Plant Physiol. 1999;120:93-103. DOI 10.1104/pp.120.1.93.
- Dam S., Dyrlund T.F., Ussatjuk A., Jochimsen B., Nielsen K., Gofard N., Ventosa M., Lorentzen A., Gupta V., Andersen S.U., Eng-hild J.J., Ronson C.W., Roepstorff P., Stougaard J. Proteome referen-
- ce maps of the *Lotus japonicus* nodule and root. Proteomics. 2013; 14:230-240. DOI 10.1002/pmic.201300353.
- Den Hartog M., Musgrave A., Munnik T. Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. Plant J. 2001;25:55-65. DOI 10.1111/j.1365-313x.2001.00931.x.
- D'Haese W., Holsters M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology. 2002; 12:79R-105R. DOI 10.1093/glycob/12.6.79r.
- Dumont E., Bahrman N., Goulas E., Valot B., Sellier H., Hilbert J.L., Vuylsteker C., Lejeune-Hénaut I., Delbreil B. A proteomic approach to decipher chilling response from cold acclimation in pea (*Pisum sativum* L.). Plant Sci. 2011;80:86-98. DOI 10.1016/j.plantsci.2010.09.006.
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. Nature. 2002;417:962-966. DOI 10.1038/nature00842.
- Gerke V., Moss S.E. Annexins: from structure to function. Physiol. Rev. 2002;82:331-371. DOI 10.1152/physrev.00030.2001.
- Graidist P., Yazawa M., Tonganunt M., Nakatomi A., Lin C.C., Chang J.Y., Phongdara A., Fujise K. Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo. Biochem. J. 2007;408:181-191. DOI 10.1042/BJ20070679.
- Groth M., Takeda N., Perry J., Uchida H., Dräxl S., Brachmann A., Sato S., Tabata S., Kawaguchi M., Wang T.L., Parniske M. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. Plant Cell. 2010;22:2509-2526. DOI 10.1105/tpc.109.069807.
- Hoepflinger M.C., Reitsamer J., Geretschlaeger A.M., Mehlmer N., Tenhaken R. The effect of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) on programmed cell death in plants. Plant Biol. 2013;13:1-10. DOI 10.1186/1471-2229-13-135.
- Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantesco M., Quistgaard E.M., Miwa H., Downie J.A., James E.K., Felle H.H., Haaning L.L., Jensen T.H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. 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. 2006;103(2):359-364. DOI 10.1073/pnas.0508883103.
- Kirienko A.N., Leppyanen I.V., Gribchenko E.S., Dolgikh E.A. Features of protein isolation for pea *Pisum sativum* L. root proteome analysis during symbiosis with rhizobia. Agrobiology. 2017;52(5):1012-1020. DOI 10.15389/agrobiology.2017.5.1012rus.
- Kodavali P.K., Skowronek K., Koszela-Piotrowska I., Strzelecka-Kiliszek A., Pawlowski K., Pikula S. Structural and functional characterization of annexin 1 from *Medicago truncatula*. Plant Physiol. Biochem. 2013;73:56-62. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.08.010.
- Lee Y., Kim M.H., Kim S.K., Kim S.H. Phytochrome-mediated differential gene expression of plant Ran/TC4 small G-proteins. Planta. 2008;228:215-224. DOI 10.1007/s00425-008-0745-x.
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ané J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debellé F. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. Science. 2004;303: 1361-1363. DOI 10.1126/science.1093038.
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. Nature. 2003;425(6958):637-640. DOI 10.1038/nature02045.
- Malkov N., Fliegmann J., Rosenberg C., Gascioli V., Timmers A., Nurisso A., Cullimore J., Bono J.J. Molecular basis of lipo-chitooligosaccharide recognition by the lysin motif receptor-like kinase LYR3 in legumes. Biochem. J. 2016;473:1369-1378. DOI 10.1042/BCJ20160073.
- Marsh J.F., Rakocevic A., Mitra R.M., Brocard L., Sun J., Eschstruth A., Long S.R., Schultze M., Ratet P., Oldroyd G.E. *Medicago truncatula*

- NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 2007;144:324-335. DOI 10.1104/pp.106.093021.
- 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., Westphal M.S., Roy S., Sussman M.R., Ané J.M., Coon J.J. A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nat. Biotechnol.* 2016;34:1198-1205. DOI 10.1038/nbt.3681.
- Mason M.G., Botella J.R. Completing the heterotrimer: isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:14784-14788. DOI 10.1073/pnas.97.26.14784.
- Morris A.C., Djordjevic M.A. Proteome analysis of cultivar-specific interactions between *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup. *Electrophoresis.* 2001;22:586-598. DOI 10.1002/1522-2683(200102)22:3<586::AID-ELPS586>3.0.CO;2-L.
- Moss S.E., Morgan R.O. The annexins. *Genome Biol.* 2004;5(4):219. DOI 10.1186/gb-2004-5-4-219.
- Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J.* 2011;65:169-180. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04411.x.
- Niebel F.C., Lescure N., Cullimore J., Gamas P. The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 1998;11:504-513. DOI 10.1094/MPMI.1998.11.6.504.
- Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008;59:519-546. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.
- Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* spp. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2011;24:1333-1344. DOI 10.1094/MPMI-01-11-0013.
- Pollard H.B., Burns A.L., Rojas E. Synexin (annexin VII): a cytosolic calcium-binding protein which promotes membrane fusion and forms calcium channels in artificial bilayer and natural membranes. *J. Membr. Biol.* 1990;117:101-112. DOI 10.1007/bf01868677.
- Ramu S.K., Peng H.M., Cook D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2002;15:522-528. DOI 10.1094/MPMI.2002.15.6.522.
- Rivero C., Traubenik S., Zanetti M.E., Blanco F.A. Small GTPases in plant biotic interactions. *Small GTPases.* 2017;23:1-11. DOI 10.1080/21541248.2017.1333557.
- Saalbach G., Erik P., Wienkoop S. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics.* 2002;2:325-337. DOI 10.1002/1615-9861(200203)2:3<325::aid-prot325>3.0.co;2-w.
- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J.A., Parniske M., Hayashi M., Kawaguchi M. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell.* 2007;19:610-624. DOI 10.1105/tpc.106.046938.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell.* 2002;14:S401-S417. DOI 10.1105/tpc.002899.
- Savouré A., Sallaud C., El-Turk J., Zuanazzi J., Ratet P., Schultze M., Kondorosi A., Esnault R., Kondorosi E. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *Plant J.* 1997;11:277-287. DOI 10.1046/j.1365-313X.1997.11020277.x.
- Schenkluh L., Hohnjec N., Niehaus K., Schmitz U., Colditz F. Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. *J. Proteomics.* 2010;73:753-768. DOI 10.1016/j.jprot.2009.10.009.
- Schultze M., Kondorosi A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 1998;32:33-57. DOI 10.1146/annurev.genet.32.1.33.
- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debelle F., Gough C., Bisseling T., Geurts R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science.* 2005;308:1789-1791. DOI 10.1126/science.1111025.
- Subramaniam G., Trusov Y., Lopez-Encina C., Hayashi S., Batley J., Botella J. R. Type B heterotrimeric G protein γ subunit regulates auxin and ABA signaling in tomato. *Plant Physiol.* 2016;170:1117-1134. DOI 10.1104/pp.15.01675.
- Sun J., Miller J.B., Granqvist E., Wiley-Kalil A., Gobbato E., Maillet F., Cottaz S., Samain E., Venkateshwaran M., Fort S., Morris R., Ané J.M., Dénarié J., Oldroyd G.E. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell.* 2015;27:823-838. DOI 10.1105/tpc.114.131326.
- Ullah H., Chen J.-G., Temple B., Boyes D.C., Alonso J.M., Davis K.R., Ecker J.R., Jones A.M. The β -subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell.* 2003;15:393-409. DOI 10.1105/tpc.006148.
- Valenta R., Ferreira F., Grote M., Swoboda I., Vrtala S., Duchêne M., Deviller P., Meagher R.B., McKinney E., Heberle-Bors E., Krafts D., Scheiner O. Identification of profilin as an actin binding protein in higher plants. *J. Biol. Chem.* 1993;268:22777-22781.
- Van Brussel A.A.N., Planqué K., Quispel A. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *J. Gen. Microbiol.* 1977;101:51-56. DOI 10.1099/00221287-101-1-51.
- Van Brussel A.A.N., Tak T., Wetselaar A., Pees E., Wijffelman C.A. Small *Leguminosae* as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other rhizobia and agrobacteria harbouring a *leguminosarum* Sym plasmid. *Plant Sci. Lett.* 1982;27:317-325. DOI 10.1016/0304-4211(82)90134-1.
- Vasse J., Billy F., Truchet G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 1993;4:555-566. DOI 10.1046/j.1365-313x.1993.04030555.x.
- Vidal L., Pérez H.E., Valdés V., Noguez R., Zamudio F., Sánchez F. Purification, characterization, and cDNA cloning in profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 1995;108:115-123. DOI 10.1104/pp.108.1.115.
- Voss T., Haberl P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: Consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis.* 2000;21(16):3345-3350. DOI 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3345::AID-LPS3345>3.0.CO.
- Zhang C., Srinivasan Y., Arlow D.H., Fung J.J., Palmer D., Zheng Y., Green H.F., Pandey A., Dror R.O., Shaw D.E., Weis W.I., Coughlin S.R., Kobilka B.K. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature.* 2012;492:387-392. DOI 10.1038/nature11701.
- Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 2008;21:1600-1608. DOI 10.1094/MPMI-21-12-1600.