

УДК 577.25:577.218

О. А. БАДАЛЯН, Е. А. НИКОЛАЙЧИК

**РЕЦЕПТОРПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ RLK2 И RLK5 *NICOTIANA BENTHAMIANA*
УЧАСТВУЮТ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КЛЮЧЕВЫХ КОМПОНЕНТОВ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЯ ПРИ КОНТАКТЕ
С *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM***

Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: oliagg@bk.ru

(Поступила в редакцию 26.06.2014)

Введение. Растительные рецепторподобные киназы (RLK) – это трансмембранные белки, аминоконцевой экзодомен которых выполняет рецепторную функцию, а карбоксиконцевой является серин-треониновой киназой. В геноме *Arabidopsis thaliana* идентифицировано более 600, а у *Oryza sativa* – 1100 RLK [1]. RLK детектируют различные внеклеточные сигналы и таким образом участвуют в различных процессах: детекции биотических и абиотических стрессовых факторов, регуляции роста и развития, детекции гормонов и т. п. Из всех идентифицированных RLK лишь для 2 % известны выполняемые функции. О сигнальных компонентах, которые могут быть связаны с этими RLK и образовывать сигнальную цепочку, а также о лигандах, которые могут детектироваться RLK, на данный момент известно крайне мало. Цитоплазматический домен RLK, как правило, высококонсервативен, в то время как последовательности, кодирующие экзодомены, очень вариабельны, что определяется в первую очередь выполняемыми функциями RLK. На основании этого выделяют различные семейства RLK: LRR-RLK (RLK, содержащие множественные лейцин-богатые повторы), RLK с лектин-связывающими доменами, хитиназные рецепторы, WAK-подобные RLK и др.

LRR-RLK – самое большое семейство из всех RLK и составляет примерно одну треть из всех известных RLK. Предполагается, что основной функцией большинства LRR-RLK является детекция патогенов. К примеру, FLS2, экзодомен которого содержит 28 LRR, детектирует основной белок нити жгутиков бактерий (флагеллин) и индуцирует запуск реакции сверхчувствительности [2]. В растениях риса LRR-RLK Xa21 обеспечивает устойчивость к патогену *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [3].

Часто патогены с помощью своих эффекторных белков способны взаимодействовать с компонентами сигнальных цепей растений, в том числе и с RLK, вызывая тем самым нарушения в сигнальной цепи. Например, эффекторный белок AvrPto биотрофного фитопатогена *Pseudomonas syringae* взаимодействует с цитоплазматическими доменами LRR-RLK FLS2 и BAK1, тем самым инактивируя их киназную активность [4]. Результатом такого взаимодействия является блокирование реакции сверхчувствительности, что для биотрофного патогена крайне выгодно.

Некротрофный фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* (*Pca*) вызывает у своего растения-хозяина картофеля такие серьезные заболевания, как «черная ножка» стеблей растений и мягкие гнили клубней. Одним из факторов вирулентности данных бактерий является эффекторный белок DspE, секретируемый посредством системы секреции третьего типа (ССТТ). Ранее нами было показано, что в системной части клубней картофеля бактерии *Pca* способны репрессировать ряд ключевых *PR*-генов растения, причем при инфекции штаммами *Pca*, мутантными по системе секреции третьего типа или гену эффектора DspE, репрессии *PR*-генов не детектировалось [5]. Также ранее мы идентифицировали рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 (присут-

ствующие в растениях картофеля, томатов и табака), непосредственно взаимодействующие с DspE [6, 7].

Цель данной работы – выяснение роли данных киназ в индукции/репрессии защитных генов растений при инфекции *Pca*, а также их влияния на экспрессию друг друга.

Материалы и методы исследования. Растения *Nicotiana benthamiana* выращивались при 20 °С и 16-часовом световом дне. Штаммы бактерий *Pectobacterium carotovorum* JN42 и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 культивировали на среде LB при 28 °С. Клетки штаммов *Saccharomyces cerevisiae* SKY48 и SKY473 культивировали на среде YPD при 28 °С. Для выявления белок-белковых взаимодействий дрожжевые трансформанты культивировали на селективной среде с галактозой и раффинозой без лейцина [8] при 30 °С.

Для проверки белок-белковых взаимодействий использовалась LexA-зависимая дрожжевая двухгибридная система [8]. Конструкции pJG4-5::*slRLK2*, pJG4-5::*slRLK5*, pJG4-5::*ntRLK5*, pJG4-5::*dspF* и pJK202::*dspE* описаны в [6, 7] и были использованы в качестве позитивных контролей. Фрагмент гена *slRLK2*, кодирующий цитоплазматический киназный домен, был клонирован в векторе pJK202 по сайтам *EcoRI* – *SalI* (≈1100 н. п.) из pUC18::*slRLK2*.

Фрагмент гена *nbTPK1b* был амплифицирован с помощью праймеров atagtcgacttaggagctcttagc ataaaggggagaagcag и ttgaattcttctagaggggattgttgagtgc и клонирован в векторе pK18 по сайтам *EcoRI* – *SalI*. Далее *EcoRI* – *SalI* фрагменты *nbTPK1b* были клонированы в векторы pJK202 и pJG4-5 [8].

Для амплификации цитоплазматического киназного домена ко-рецептора ВАК1 использовались праймеры ccgaattctggtgcgctcgaggaaac и cgcctcgagtgaagatcatcttggccctgac. Фрагмент *EcoRI* – *XhoI* гена *ntBAK1* был клонирован в вектор pJG4-5 по сайтам *EcoRI* – *SalI*.

Клетки штамма *Saccharomyces cerevisiae* SKY473 (*MATa ura3 trp1 his3 2LexAop-leu2*) трансформировались плазмидами pJG4-5, pJG4-5::*slRLK2*, pJG4-5::*slRLK5*, pJG4-5::*ntRLK5*, pJG4-5::*nbTPK1b*, pJG4-5::*ntBAK1* или pJG4-5::*dspF*. Дрожжевые трансформанты противоположного типа спаривания, SKY48 (*MATa ura3 trp1 his3 3LexAop-leu2*), содержали плазмиды pJK202, pJK202::*slRLK2*, pJK202::*nbTPK1b* или pJK202::*dspE*. Проверка взаимодействия исследуемых белков проводилась в диплоидных клетках, полученных в результате скрещивания дрожжевых штаммов SKY473 и SKY48, содержащих указанные плазмиды.

Для вирус-индуцированного сайленсинга генов (ВИГС) использовались конструкции, содержащие фрагменты генов *RLK2* и *RLK5*, описанные в работах [2, 3]. Сайленсинг проводился по методике, описанной в [9]. Способ заражения растений и отбора образцов описан в [10]. Методика ОТ-кПЦР описана в [5], использованные олигонуклеотиды – в [10]. Определение уровней экспрессии генов проводилось относительно двух референсных генов *EF-1a* и *CAC* с использованием программы REST [11].

Результаты и их обсуждение. Заражение растений *N. benthamiana* бактериями *Pca* дикого типа через 24 ч приводит к развитию реакции сверхчувствительности по всей зоне инфильтрации. Ранее нами было показано, что в растениях, подвергнутых сайленсингу генов *RLK2* или *RLK5*, при инфицировании *Pca* дикого типа реакция сверхчувствительности через 24 ч после заражения практически не развивалась [6, 7]. Растения с одновременным сайленсингом *RLK2* и *RLK5* отреагировали на заражение бактериями *Pca* так же, как и растения с сайленсингом только одной из указанных киназ (рис. 1). Мы не смогли заметить разницы в реакции на заражение *Pca* растений с сайленсингом *RLK2*, *RLK5* или генов обеих киназ, что могло быть обусловлено либо перекрестным сайленсингом родственных генов, либо сходными нарушениями в работе сигнальных цепочек, происходящими при инактивации этих генов. Оба этих предположения были проверены.

Уровни экспрессии *RLK2* и *RLK5* у растений *N. benthamiana* с сайленсингом одной или двух киназ были измерены с помощью кПЦР (таблица). В этом эксперименте экспрессия *RLK5* в растениях, инфицированных TRV2::*RLK5*, находилась на уровне 32 % от контроля. Уровень экспрессии *RLK2* в растениях, инфицированных TRV2::*RLK2*, снижался менее значительно и составлял 66 % от контроля. При совместном сайленсинге *RLK2* и *RLK5* экспрессия этих генов составляла соответственно 44 и 55 % от контроля. Тем не менее наличие четкой фенотипической

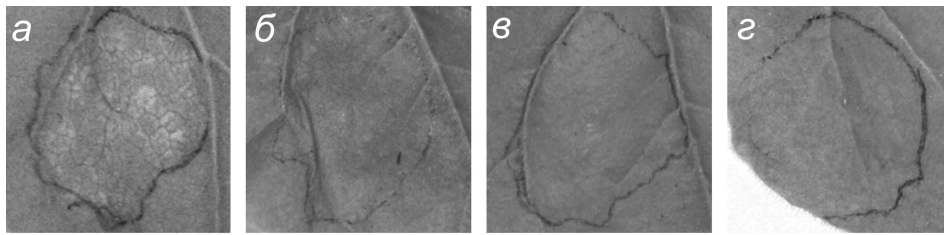


Рис. 1. Вирус-индуцированный сайленсинг *RLK2*, *RLK5* и *RLK2/5* блокирует развитие реакции сверхчувствительности *N. benthamiana*, индуцируемой *P. carotovorum* (а – TRV2::GFP, б – TRV2::slRLK2, в – TRV2::ntRLK5, г – TRV2::RLK2/5). Листья растений инфильтрованы суспензиями клеток *Pca* плотностью $1,5 \cdot 10^6$ клеток/мл и сфотографированы через 24 ч

разницы между контрольными растениями и зараженными TRV2::*RLK2* и TRV2::*RLK5* (как каждой из этих конструкций, так и обеими одновременно) при инфицировании бактериями *Pca* указывает на наличие сайленсинга этих рецепторных киназ. Следует отметить, что в растениях с инактивированной киназой *RLK5* уровень экспрессии гена *RLK2* снижался и составлял 61 % от контроля. Аналогичная ситуация наблюдалась в растениях с сайленсингом *RLK2*, где уровень экспрессии *RLK5* был на уровне 34 % от контроля. Используемые для сайленсинга фрагменты генов киназ имеют низкую степень гомологии друг с другом, что делает маловероятным возможность перекрестного посттранскрипционного сайленсинга их генов за счет деградации их мРНК (проверено при помощи VIGS Tool: [http:// solgenomics.net/tools/vigs](http://solgenomics.net/tools/vigs)). Имеющиеся у нас данные не позволяют исключить возможность трансляционного сайленсинга, для которого не требуется полной гомологии используемого для инициации сайленсинга фрагмента РНК с транскриптом-мишенью. Другой возможной, однако, более вероятной причиной наблюдаемого эффекта представляется взаимная регуляция (скорее всего непрямая) генов этих киназ. Вне зависимости от молекулярного механизма наблюдаемого феномена очевидно, что введение любой из двух конструкций для сайленсинга приводит к достоверному снижению количеств мРНК обеих рецепторных киназ и четкому фенотипу, не зависящему от используемых для сайленсинга конструкций.

Способность *RLK2* и *RLK5* взаимодействовать с эффекторным белком DspE [6, 7] указывает на то, что *Pca* как некротрофный патоген способен манипулировать защитными иммунными реакциями растений. Непосредственная функция рецепторподобных киназ заключается в детекции внецитоплазматическим доменом соответствующего лиганда и передаче сигнала через ряд посредников в ядро растительной клетки, вследствие чего меняются уровни экспрессии ряда генов, в том числе ответственных за развитие защитных реакций.

Оценка возможных нарушений в работе сигнальных цепочек у растений с сайленсингом *RLK2* и *RLK5* была проведена в два этапа. Сначала была проверена возможность участия в наблюдаемой реакции растений известных сигнальных белков ВАК1 и ТРК1b, а затем у подвергнутых сайленсингу растений были оценены изменения уровней экспрессии ряда связанных с иммунитетом генов.

ВАК1 и ТРК1b являлись наиболее вероятными кандидатами на роль компонентов сигнальной цепочки, ответственной за активацию иммунитета растений при контакте с бактериями *Pca*, так как ВАК1 входит в состав многих рецепторных комплексов, в том числе с FLS2 [12, 13]. ТРК1b участвует в реакции растений на некротрофные патогены [14], а ближайший гомолог это-

Уровень экспрессии генов *RLK2* и *RLK5* в растениях *N. benthamiana*, подвергнутых сайленсингу *RLK2*, *RLK5* и *RLK2/5*

Ген	Конструкции для ВИГС		
	TRV2:: <i>RLK2</i>	TRV2:: <i>RLK5</i>	TRV2:: <i>RLK2/5</i>
<i>RLK2</i>	66% (49–97%)	61% (46–95%)	44% (27–68%)
<i>RLK5</i>	34% (26–46%)	32% (25,5–39%)	55% (36–76%)

Примечание. В скобках указан 95%-ный доверительный интервал.

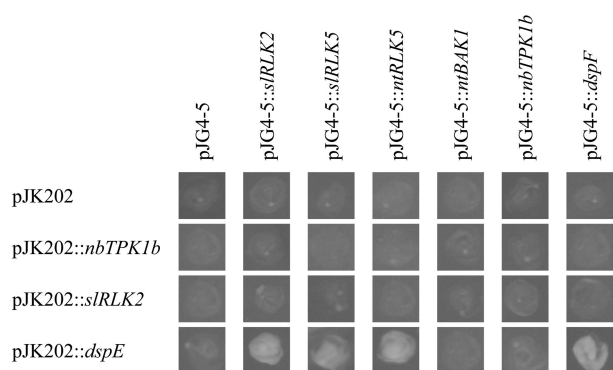


Рис. 2. Проверка возможных взаимодействий компонентов сигнальной цепи растений сем. Пасленовые с эффекторным белком, а также друг с другом в клетках *S. cerevisiae*

им шапероном DspF, RLK2 и RLK5 (рис. 2). Полученные данные также свидетельствуют об отсутствии взаимодействия TPK1b с киназными доменами RLK2, RLK5 и BAK1, а также киназных доменов RLK2, RLK5 и BAK1 между собой. Тем не менее исключить возможность взаимодействия указанных киназ между собой нельзя, поскольку для многих рецепторных комплексов такие взаимодействия детектируются только при связывании сенсорных доменов с соответствующими лигандами [15, 16]. Поэтому полная проверка взаимодействий белков RLK2, RLK5, BAK1 и TPK1b между собой требует идентификации пока неизвестного лиганда, распознаваемого RLK2 и RLK5.

Уровни экспрессии ключевых генов, вовлеченных в развитие защитных реакций, были измерены у подвергнутых сайленсингу рецепторных киназ и контрольных растений *N. benthamiana* методом ОТ-кПЦР (рис. 3).

У растений, не контактировавших с бактериями *Pca*, сайленсинг исследуемых *RLK* изменил уровни экспрессии примерно половины проверенных генов, причем эффекты сайленсинга *RLK5* были более выражены (рис. 3). Так, инактивация *RLK2* достоверно повысила уровень экспрессии только одного гена – *PR-1a*, тогда как сайленсинг *RLK5* – семи: *PR-1a*, *PR-3a*, *PR-4b*, *PR-5a*, *COI1*, *HIN1* и *TPK1b*. Достоверное снижение уровней экспрессии наблюдалось только для генов *RLK2* и *RLK5*.

Заражение растений бактериями *Pca* оказало значительное влияние на уровни экспрессии *PR*-генов: уровни транскрипции многих (*PR-2b*, *PR-4b*, *EAS*, *HIN1*, *GST1*, *JAZ3*) возросли в 10–100 раз. Также было зарегистрировано небольшое (в 2–3 раза), но достоверное снижение

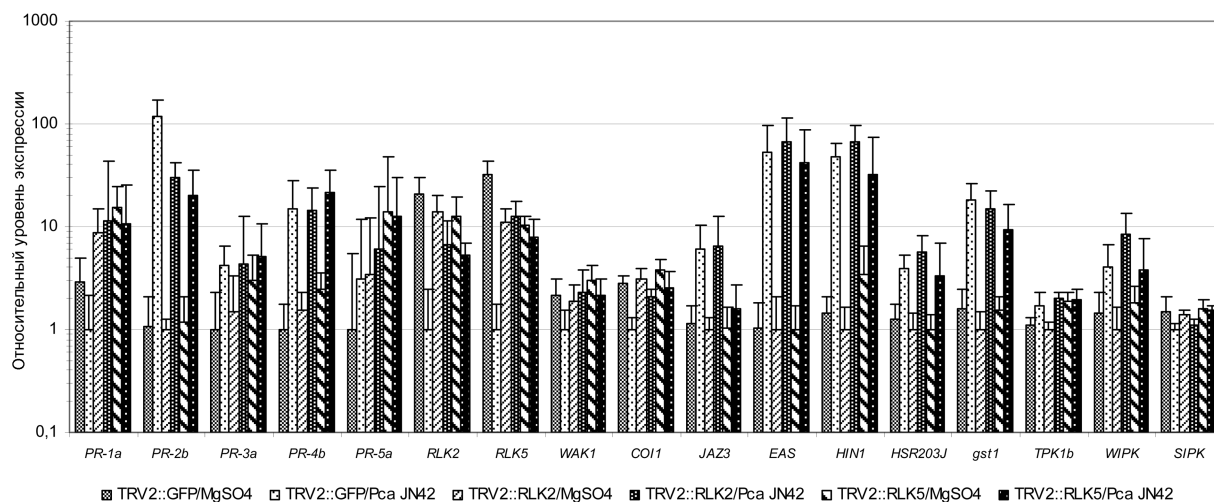


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов в листьях растений *N. benthamiana*, инфицированных конструкциями TRV2::GFP, TRV2::RLK2 и TRV2::RLK5 через 24 ч после инфильтрации суспензиями клеток *Pca* JN42 или раствором 10 mM MgSO4. Представлены средние значения 3–5 измерений относительного числа копий мРНК с 95%-ным доверительным интервалом

го белка BAK1 играет важную роль в обеспечении устойчивости к различным бактериальным патогенам, фосфорилируясь BAK1 и в свою очередь фосфорилируя FLS2 и BAK1 [15]. Поскольку такое фосфорилирование предполагает непосредственный контакт BAK1 и TPK1b с компонентами рецепторных комплексов, взаимодействие этих белков с киназными доменами RLK2 и RLK5, а также белком DspE, основным эффектором ТТСС бактерий *Pca*, было проверено в дрожжевой двухгибридной системе.

С помощью двухгибридной системы четко детектировалось взаимодействие DspE со сво-

уровней экспрессии генов *PR-1a* (единственного среди *PR*-генов с четко продемонстрированной антибактериальной активностью), ключевого регулятора жасмонатного сигнального пути *COI1* и специфического рецептора олигогалактуронатов *WAK1*. Однако наиболее существенным в контексте настоящей работы представляется сильное снижение уровней экспрессии генов *RLK*: в 32 раза для *RLK5* и в 21 раз – для *RLK2* (рис. 3).

Сайленсинг гена любой из двух *RLK* полностью или почти полностью снимал супрессию при заражении бактериями *Pca* всех пяти генов, для которых она наблюдалась, включая гены самих *RLK*. Для наиболее сильно индуцируемого гена *PR-2b* у подвергнутых сайленсингу растений степень индукции снижалась примерно в 4 раза. Следует отдельно отметить, что присутствие у растений интактных генов *RLK2* и *RLK5* было необходимо для репрессии транскрипции гена ключевого активатора жасмонатного сигнального пути *COI1*, а ген *RLK5* требовался для индукции транскрипции гена репрессора жасмонатзависимых генов *JAZ3*.

Закключение. При контакте растений *N. benthamiana* с некротрофным патогеном *P. carotovorum* взаимодействие рецепторподобных киназ *RLK2* и *RLK5* растения с эффекторным белком бактерий *DspE* вызывает сильную индукцию целого ряда *PR*-генов и активацию программируемой гибели клеток растения в области первичного контакта с патогеном. Однако для активируемых при контакте с бактериями *Pca* *PR*-генов *N. benthamiana* антибактериальная активность не показана, а экспрессия единственного *PR*-гена с выраженной антибактериальной активностью (*PR-1a*) ингибируется. Программируемая смерть клеток растения в зоне инфекции не только не является препятствием для размножения некротрофного патогена, но, наоборот, является благоприятной, а окислительному взрыву (о наличии которого свидетельствует активация генов *GST1* и *EAS*) большинство некротрофов, в том числе и пектобактерии, способны успешно противостоять.

Очевидна перекрестная негативная регуляция генов *RLK2* и *RLK5* при контакте с бактериальным патогеном; кроме того, эти рецепторные киназы участвуют в супрессии генов рецепторов флагеллина *FLS2* [10] и олигогалактуронатов *WAK1*. Данные по экспрессии ключевых регуляторов жасмонатной сигнализации, считающейся ответственной за активацию механизмов устойчивости, специфичных против некротрофных патогенов, предполагают способность бактерий *Pca* подавлять активацию этого сигнального пути, несмотря на возможное из-за активации транскрипции *WIPK* повышение продукции жасмоната. Ингибирование экспрессии субстратраспознающей субъединицы убиквитинлигазного комплекса *COI1* и активация экспрессии транскрипционного репрессора *JAZ3* могут поддерживать жасмонатзависимые гены в репрессированном состоянии. Интересно, что полученные ранее данные [10] свидетельствуют об участии в сигнальной цепочке, ответственной за ингибирование экспрессии исследуемых генов, наряду с мембранными рецепторными киназами *RLK2/5* цитоплазматических *MAP*-киназ *SIPK/WIPK*.

Полученные в настоящей работе и ранее для этой патосистемы данные свидетельствуют в пользу того, что трансмембранные рецепторподобные киназы *RLK2* и *RLK5* при взаимодействии с основным эффекторным белком *DspE* бактерий *Pca* радикально меняют работу сигнальных цепочек, связанных с активацией иммунитета растения, начиная со стадии первичной детекции этого патогена, что способствует успешному преодолению патогеном первой линии защиты организма-хозяина.

Литература

1. Morillo S. A., Tax F. E. // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. Vol. 9, № 5. P. 460–469.
2. Gómez-Gómez L., Felix G., Boller T. // Plant J. 1999. Vol. 18, № 3. P. 277–284.
3. Song W. Y., Wang G. L., Chen L. L. et al. // Science. 1995. Vol. 270, № 5243. P. 1804–1806.
4. Block A., Alfano J. R. // Curr. Opin. Microbiol. 2011. Vol. 14, № 1. P. 39–46.
5. Николайчик Е. А., Хомская Л. Л., Игнатенко Е. И. // Тр. БГУ. 2009. Т. 4. С. 197–204.
6. Бадалян О. А., Кулик Е. В. // Сб. работ 69-й науч. конф. студентов и аспирантов БГУ, 14–17 мая 2012. Т. 69, № 1. С. 3–6.
7. Николайчик Е. А., Кулик Е. В., Бадалян О. А. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 1. С. 112–117.
8. Serebriiskii I. G., Golemis E. A., Uetz P. // The Proteomics Protoc. Handb. / Ed. J. M. Walker. Totowa; NJ, 2005. P. 653–682.
9. Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. // Plant J. 2002. Vol. 31, № 6. P. 777–786.

10. Бадалян О. А., Николайчик Е. А. // Докл. НАН Беларуси. 2013. Т. 57, № 6. С. 75–81.
11. Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, № 9. P. e36.
12. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S. et al. // Nature. 2007. Vol. 448, № 7152. P. 497–500.
13. Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. Vol. 104, № 29. P. 12217–12222.
14. AbuQamar S., Chai M.-F., Luo H. et al. // Plant Cell Online. 2008. Vol. 20, № 7. P. 1964–1983.
15. Lu D., Wu S., Gao X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. Vol. 107, № 1. P. 496–501.
16. Zhang J., Li W., Xiang T. et al. // Cell Host Microbe. 2010. Vol. 7, № 4. P. 290–301.

O. A. BADALYAN, Y. A. NIKOLAICHIK

**RECEPTOR-LIKE KINASES RLK2 AND RLK5 OF *NICOTIANA BENTHAMIANA*
ARE INVOLVED IN REGULATION OF GENE EXPRESSION OF KEY PLANT IMMUNE SYSTEM
COMPONENTS DURING THE CONTACT WITH *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM***

Summary

The main function of receptor-like kinases with leucine-rich repeats (LRR-RLK) in sensory domains is detection of infectious pathogens. For the two plant LRR-RLK interaction with the effector protein DspE of phytopathogenic bacterium *Pectobacterium carotovorum* is shown. We have measured expression levels of the key immunity related genes and identified the ones whose expression is controlled via the two RLKs under study.