POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 39 2012 NR 3 (429–458)

RECEPTORY I SZLAKI SYGNAŁOWE REGULUJĄCE SYMBIOZĘ BRODAWKOWĄ I MIKORYZĘ ARBUSKULARNĄ*

RECEPTORS AND SIGNALING PATHWAYS GOVERNING ROOT NODULE SYMBIOSIS AND ARBUSCULAR MYCORRHIZA

Izabela TYLMAN, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet im. M. Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Symbiotyczne oddziaływania pomiędzy roślinami motylkowatymi a ryzobiami inicjowane są przez syntetyzowane w korzeniach i wydzielane do ryzosfery flawonoidy, indukujące u odpowiednich gatunków i szczepów ryzobiów biosyntezę lipo-chito-oligosacharydowych cząstek sygnałowych – nazywanych czynnikami Nod, aktywujących u rośliny-gospodarza proces brodawkowania (nodulacji). Wiązanie czynnika Nod przez odpowiednie białko receptorowe inicjuje szereg odpowiedzi, w tym m.in. wymusza swoiste zmiany w morfologii włośników korzeniowych, polegające na ich skręceniu i deformacji. Zamknięcie bakterii wewnątrz powstającego w końcowym odcinku włośników zagięcia zapoczątkowuje formowanie nici infekcyjnej i organogenezę brodawek korzeniowych, zasiedlanych następnie przez właściwe dla danej rośliny ryzobia. Białkami receptorowymi wiążącymi czynnik Nod, poznanymi dotychczas u czterech gatunków roślin motylkowatych (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Pisum sativum*), są błonowe, receptorowe kinazy białkowe (LysM-RLK) zawierające: zewnątrzkomórkową domenę z motywami lizynowymi (LysM), pojedynczą helisę transbłonową oraz wewnątrzkomórkową domenę kinazową. Eksperymentalnie dowiedziono, iż właściwym receptorem czynnika Nod, zlokalizowanym w błonie plazmatycznej komórek epidermalnych oraz w błonie nici infekcyjnej, jest heterodimer zbudowany z kinazy i pseudokinazy białkowej, który w *L. japonicus* tworzą białka *Lj*NFR1 i *Lj*NFR5, w *M. truncatula Mt*LYK3 i *Mt*NFP, w *G. max Gm*NFR1α/β i *Gm*NFR5α/β, a w *P. sativum Ps*SYM i *Ps*SYM10. W aktywacji symbiotycznego szlaku sygnałowego uczestniczy jeszcze inna błonowa kinaza białkowa z zewnątrzkomórkową domeną zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (LRR). W badanych roślinach motylkowatych kinazy typu LRR-RLK z cytoplazmatyczną domeną serynowo/treoninowej kinazy białkowej kodują geny: *LjSYMRK*, *MsNORK*, *MtDMI2*, *GmNORK*, i *PsSYM19*. Percepcja czynnika Nod aktywuje kaskadę sygnałową, w której funkcjonują trzy nukleoporyny budujące jądrowy kompleks porowy, kodowane przez *LjNup133*, *LjNup85* i *LjNENA*. Ponadto, w błonach otoczki jądrowej zidentyfikowano dwa typy kanałów K^+ kodowanych przez *LjCASTOR*, *LjPOLLUX* i *MtDMI*, a w nukleoplazmie poznano kinazę białkową aktywowaną przez Ca^{2+} i Ca^{2+}-kalmodulinę (CCaMK) kodowaną przez *MtDMI3*, *LjCCaMK* i *PsSYM9*. Aktywacja kompleksu receptorowego LysM-RLK przez wiążący się z motywami LysM czynnik Nod indukuje

*Artykuł jest skróconą i nieco zmienioną wersją pracy licencjackiej I. Tylman

w komórkach włośnikowych zmiany w stężeniu Ca^{2+}, które w pierwszych sekundach polegają na powolnym napływie jonów wapnia do cytozolu, by po kilkunastu minutach przerodzić się w długotrwałe, oscylacyjne wahania stężenia Ca^{2+} występujące na terenie nukleoplazmy oraz w przyjądrowej cytoplazmie. Zlokalizowana w jądrze komórkowym CCaMK pełniąca funkcję białka sensorowego rozkodowującego sygnaturę wapniową zawiera trzy funkcjonalne domeny: domenę serynowo/treoninowej kinazy białkowej, domenę autoinhibitorową wiążącą Ca^{2+}-kalmodulinę oraz domenę zbudowaną z trzech motywów EF-hand wiążących Ca^{2+}. Technikami biologii molekularnej udało się dotychczas zidentyfikować dwa białka oddziałujące z CCaMK (*Mt*IPD3/*Lj*CYCLOPS i *Mt*Vapyrin), które w szlaku sygnałowym położone są poniżej sensorowej kinazy białkowej. Poznano też szereg czynników transkrypcyjnych (NSP1 i NSP2, ERN1 do ERN3 i NIN) funkcjonujących w regulacji infekcji bakteryjnej i organogenezie brodawek. W inicjowaniu formowania brodawek korzeniowych uczestniczą także cytokininy, które w głębszych warstwach kory biorą udział w procesie odróżnicowywania i aktywacji podziałów komórkowych. Dzięki wyselekcjonowaniu odpowiednich mutantów dowiedziono, że receptor cytokinin (*Lj*LHK1/*Mt*CRE1) jest tutaj kluczowym elementem szlaku sygnałowego aktywującego regulatory odpowiedzi (RR) i czynniki transkrypcyjne ERN1, NSP2 i NIN. Zarówno organogeneza brodawek korzeniowych, jak również późniejsza redukcja N_2 do amoniaku, prowadzona przez osiadłe w brodawkach bakteroidy, są dla rośliny-gospodarza dużym obciążeniem energetycznym. W celu zachowania właściwego bilansu energetycznego w roślinach motylkowatych wykształcił się specjalny mechanizm autoregulacji brodawkowania (AON), pozwalający systemowo regulować liczbę powstających brodawek. Obecnie szacuje się, że około 80% roślin naczyniowych wchodzi w oddziaływania symbiotyczne z grzybami mikoryzowymi wspomagającymi roślinę w pobieraniu z gleby wody i soli mineralnych. Mikoryza arbuskularna, ewolucyjnie starsza o około 400 mln lat od symbiozy brodawkowej, zachodzi pomiędzy strzępkami grzybów typu Glomeromycota a korzeniami roślin z różnych grup systematycznych, w tym także roślin motylkowatych. Niezależnie od wielu zasadniczych różnic jakie występują pomiędzy endosymbiozą mikoryzową a symbiozą brodawkową, wyniki badań ostatnich lat dowodzą, iż szereg poznanych dotychczas genów, określanych jako wspólne geny symbiotyczne (*SYM*), funkcjonuje zarówno w symbiozie bakteryjnej, jak również w mikoryzie arbuskularnej.

Słowa kluczowe: receptory czynników Nod, wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy, symbioza brodawkowa, mikoryza arbuskularna

Summary: The symbiotic interactions between legumes and rhizobacteria are initiated by flavonoids exuded by the legume roots that in rhizobium species induce biosynthesis of lipo-chito-oligosaccharide signaling molecules, termed nodulation factors (Nod factors), which mediate the nodulation process in the receptive host. The Nod factor perception in legume roots causes curling of root hairs that entrap the rhizobacteria, leading to formation of infection thread and development of nitrogen-fixing root nodules. The Nod factor receptors, identified in four legume species (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Pisum sativum*), have a common structure composed of an extracellular lysine motif (LysM) anchored to a single-pass transmembrane domain and intracellular kinase domain, and are thus termed LysM receptor-like kinases (LysM-RLKs). The current model predicts two receptor-like kinases located on epidermal cells and infection thread that are involved in NF binding: in *L. japonicus Lj*NFR1 and *Lj*NFR5, in *M. truncatula Mt*LYK3 and *Mt*NFP, in *G. max Gm*NFR1α/β and *Gm*NFR5α/β, and in *P. sativum Ps*SYM and *Ps*SYM10. Another receptor-like kinase involved in symbiotic signaling has leucine rich repeat (LRR) and serine/threonine kinase domains and is encoded by *LjSYMRK*, *MsNORK*, *MtDMI2*, *GmNORK* and *PsSYM19*. Nod factor perception initiates a downstream signal transduction cascade. This involves three nucleoporins, encoded by *LjNup133*, *LjNup85* and *LjNENA*, potassium ion-channel proteins localized in the nuclear membranes, encoded by *LjCASTOR*, *LjPOLLUX* and *MtDMI1*, as well as, a calcium and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), encoded by *MtDMI3/LjCCaMK/ PsSYM9*. Following the perception of NF through LysM-RLK, biphasic Ca^{2+} signaling is induced in root hair cells, i.e. a rapid influx of Ca^{2+} into the hair cells cytosol and then periodical oscillation

(Ca^{2+} spiking) of calcium concentrations within the nucleus and at perinuclear region. CCaMK, a putative decoder of Ca^{2+} signals, contains three functional domains, i.e. a serine/threonine-kinase domain, a calmodulin-binding (autoinhibitory) domain, and a domain of three EF-hands which interact with Ca^{2+} ions. Genetic and protein-protein interaction studies have identified protein components that interacts with CCaMK, and are required for NF signaling, namely Interacting Protein of DMI3 (*Mt*IPD3), *Lj*CYCLOPS and *Mt*Vapyrin. Moreover, several transcription factors activated downstream of CCaMK have been identified, including Nodulation Signaling Pathway1 and 2 (NSP1, NSP2), Ets2 Repressor Factor (ERF) required for nodulation (ERN1, ERN2 and ERN3) and Nodule Inception (NIN). Moreover, recent data strongly support a crucial role for cytokinins in promoting the activation and re-differentiation of cortical cells that initiate nodule development. Cytokinin receptor (*Lj*LHK1/*Mt*CRE1) and response regulators (RRs) are required for activation of the downstream transcription factors ERN*1*, NSP2 and NIN. Nodulation and the subsequent nitrogen fixation carry a metabolic cost to host plants, therefore to keep an appropriate nodule number, legumes possess regulatory system called "autoregulation of nodulation" (AON).
Over 80% of the angiosperm plants establish symbiotic relationships with mycorrhizal fungi that improve their ability to acquire nutrients from the soil. Evolutionary older arbuscular mycorrhiza (AM) is established between fungi belonging to the phylum Glomeromycota and the roots of most vascular plants. Despite the remarkable morphological differences between AM and root nodule symbioses, to date, at least nine genes have been identified in legume, the so-called common symbiosis (*SYM*) genes, that are required for the establishment of both fungal and bacterial symbioses.

Key words: Nod factor receptors, common symbiotic signaling pathway, nodule symbiosis, mycorrhizal symbiosis

Wykaz stosowanych skrótów: *Lj*NFR1 i *Lj*NFR5 (*ang. Nod Factor Receptor1* i *5*) – białka receptorowe komonicy wiążące czynnik Nod; *Lj*SYMRK i *Mt*DMI2 – receptorowe kinazy białkowe typu LRR-RLK komonicy i lucerny; *Mt*DMI1, *Lj*POLLUX i *Lj*CASTOR – kanały kationowe lucerny i komonicy zlokalizowane w błonach otoczki jądrowej; *Mt*DMI3 i *Lj*CCaMK – zlokalizowane w jądrze komórkowym kinazy białkowe rozkodowujące sygnaturę wapniową; *Mt*LYK3 (*ang. LysM domain-containing receptor-like Kinase3*) i *Mt*NFP (*ang. Nod Factor Perception*) – białka receptorowe lucerny wiążące czynnik Nod

WSTĘP

Współdziałanie roślin motylkowatych (obecnie rodzina bobowatych, *Fabaceae*) z bakteriami glebowymi z grupy ryzobiów jest aktualnie najlepiej poznanym na poziomie molekularnym układem symbiotycznym. Już od ponad dwudziestu lat wiadomo, że infekcję rośliny-gospodarza aktywującą organogenezę brodawek korzeniowych poprzedza swoista wymiana informacji pomiędzy symbiontami. Ryzobia rozpoznają produkowane w korzeniu rośliny motylkowatej związki sygnałowe z grupy flawonoidów, które w komórkach bakteryjnych aktywują syntezę związków z grupy lipo-chito-oligosacharydów nazywanych ogólnie czynnikami nodulacji. Wiązanie czynnika Nod przez roślinne białko receptorowe wymusza w cytoplazmie komórki włośnikowej szereg zmian prowadzących do wykształcenia struktur prepenetracynych oraz inicjuje tworzenie nici infekcyjnych, a także uruchamia program genetyczny odpowiedzialny za organogenezę brodawek korzeniowych. Rosnące nici infekcyjne rozgałęziają się

i wrastają do komórek formujących się brodawek, gdzie ryzobia otoczone błoną peribakteroidalną uwalniane są do cytoplazmy, by w symbiosomach rozpocząć redukcję N_2 do amoniaku. W latach 90-tych w polskich kwartalnikach naukowych, w tym m.in. w Kosmosie [52] i Postępach Biochemii [33], opublikowano kilka prac przeglądowych podsumowujących najważniejsze osiągnięcia z tego okresu. Zupełnie nowy rozdział w badaniach symbiozy brodawkowej otwierają prace opublikowane w 2003 roku, w których doniesiono o zidentyfikowaniu w komonicy [54, 77] i lucernie [7, 49] genów kodujących receptory czynników nodulacji. Wraz z odkryciem białek receptorowych wiążących czynniki Nod rozpoczął się nowy fascynujący etap badań molekularnych poświęconych poszukiwaniu kolejnych elementów szlaków sygnałowych aktywowanych przez poznane receptory. Celem niniejszej pracy jest podsumowanie najważniejszych osiągnięć badań z ostatnich lat, szczególnie wyników, które już dzisiaj w badaniach symbiozy brodawkowej można uznać za przełomowe. Uwadze zainteresowanego Czytelnika polecamy także prace przeglądowe opublikowane w ostatnich latach w czasopismach o zasięgu ogólnoświatowym [15, 19, 42, 67, 71, 75].

Wraz z postępem badań genetycznych okazało się, że symbioza brodawkowa pojawiająca się przed około 50 mln lat, przypuszczalnie wyewoluowała z ewolucyjnie starszej o około 400 mln lat endomikoryzy arbuskularnej [8, 48, 56]. Zagadnieniom ewolucji układów symbiotycznych poświęcono ostatnio pracę przeglądową opublikowaną w Postępach Biologii Komórki [46].

Mikoryza arbuskularna jest typem endosymbiozy zachodzącej pomiędzy korzeniami bardzo wielu roślin okrytonasiennych a grzybami typu Glomeromycota. Strzępki grzyba mikoryzowego, wrastające do komórek korzenia wewnątrz cytoplazmatycznych struktur prepenetracyjnych, tworzą w głębszych warstwach kory wewnątrzkomórkowe drzewkowate struktury nazywane arbuskulami [48]. Przestrzeń pomiędzy błoną plazmatyczną oddzielającą cytoplazmę komórki a błoną rozgałęziającej się w jej wnętrzu arbuskuli, nazywaną synapsą symbiotyczną, jest miejscem intensywnej wymiany metabolitów oraz soli między symbiontami. W ten sposób rozrastające się w glebie oraz wrastające do korzenia strzępki grzyba mikoryzowego efektywnie wspomagają zasilanie rośliny w wodę i sole mineralne, głównie fosforany i azotany [48]. Dzięki badaniom ostatniego dziesięciolecia wiadomo już, że receptory wiążące czynniki nodulacji, podobnie jak receptory czynnika mikoryzacji, aktywują w roślinach motylkowatych wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy regulujący zarówno procesy infekcji bakteryjnej jak i grzybowej oraz kontrolujący organogenezę brodawek i arbuskuli.

BŁONOWE RECEPTORY AKTYWUJĄCE WSPÓLNY SYMBIOTYCZNY SZLAK SYGNAŁOWY

Deformacja włośników korzeniowych, towarzysząca inokulacji korzeni roślin motylkowatych przez właściwy szczep ryzobiów bądź aplikacji odpowiedniego czynnika nodulacji, poprzedzona jest depolaryzacją błony, alkalizacją środowiska zewnątrzkomórkowego oraz napływem jonów wapnia do cytoplazmy przeradzającym się po upływie kilkunastu minut w regularne, oscylacyjne zmiany stężenia Ca^{2+} [67, 71]. Deformacja włośników, u komonicy (*Lotus japonicus*) zauważalna już po upływie 24 godzin od inokulacji korzeni *Mesorhizobium loti*, ułatwia selekcjonowanie mutantów z defektami w szybkich odpowiedziach na inokulację bakteryjną czy aplikację czynnika Nod [54, 77]. Analiza wyselekcjonowanych w ten sposób mutantów *sym1* i *sym5* doprowadziła do poznania dwóch genów kodujących 623- i 595-aminokwasowe białka *Lj*NFR1 i *Lj*NFR5 (ang. *Nod Factor Receptor1* i *5*) zawierające charakterystyczne motywy występujące w błonowych, receptorowych kinazach białkowych [34]. Białko *Lj*NFR1 w domenie zewnątrzkomórkowej ma dwa ewolucyjnie zachowane motywy LysM (ang. *Lysine Motiv*) oraz trzeci, położony najbliżej N-końca, nieco zmieniony motyw LysM (ryc. 1A) [77]. Trzy wyraźne motywy LysM występują także w domenie zewnątrzkomórkowej krótszego o 28 aminokwasów polipeptydu *Lj*NFR5 [54]. Obydwa białka posiadają w części cytoplazmatycznej wszystkie subdomeny występujące w serynowo/treoninowych kinazach białkowych, chociaż w *Lj*NFR5 brakuje niektórych motywów uczestniczących w katalizie. Otóż okazało się, że białko *Lj*NFR5 nie ma ewolucyjnie zachowanej reszty kwasu asparaginowego (D) oraz charakterystycznej 26 aminokwasowej pętli aktywacyjnej położonej pomiędzy VII a VIII subdomeną, a ponadto ma zmienioną sekwencję aminokwasową pętli P wiążącej ATP (ryc. 1A). Wyniki najnowszych doświadczeń pokazały, że syntetyzowany w komórkach *E. coli* polipeptyd *Lj*NFR1-CD, odpowiadający cytoplazmatycznemu odcinkowi *Lj*NFR1, wykazuje aktywność autofosforylacyjną, fosforyluje zasadowe białko mielinowe (MBP) zastępujące właściwy substrat oraz fosforyluje polipeptyd *Lj*NFR5-CD [53]. W pętli aktywacyjnej kinazy *Lj*NFR1 występuje ewolucyjnie zachowana reszta treoniny-481. Zastąpienie tej reszty alaniną skutkuje utratą aktywności kinazowej rekombinowanego białka *Lj*NFR1-CD-(T481A) [53]. Techniką spektrometrii mas wykazano, iż w wyniku autofosforylacji *Lj*NFR1-CD modyfikacji ulega co najmniej 21 reszt seryny i treoniny oraz 3-4 reszty tyrozyny [53]. W odróżnieniu od polipeptydu *Lj*NFR1-CD, białko *Lj*NFR5-CD nie wykazuje aktywności kinazowej, co sugeruje, że również kompletne białko *Lj*NFR5 jest pseudokinazą. W fosforylowanym przez kinazę *Lj*NFR1-CD polipeptydzie *Lj*NFR5-CD modyfikowana jest tylko pojedyncza reszta seryny w pozycji 282 [53]. Poszukiwania kluczowych dla aktywności katalitycznej reszt aminokwasowych dowiodły, iż tylko dwie mutacje substytucyjne (K350E i T481A) pozbawiające

białko *Lj*NFR1 aktywności kinazowej skutkują całkowitym upośledzeniem zmutowanej komonicy w organogenezie brodawek korzeniowych [53]. W przypadku mutacji K350E polegającej na zamianie w subdomenie II reszty lizyny na resztę kwasu glutaminowego, utrata aktywności katalitycznej spowodowana jest brakiem grupy aminowej łańcucha bocznego lizyny pośredniczącej w wiązaniu ATP. Mutacja T481A dotyczy położonej w pętli aktywacyjnej reszty treoniny-481, której obecność jest niezbędna w aktywności kinazowej *Lj*NFR1. Inaczej jest w przypadku *Lj*NFR5. Wprowadzenie sekwencji kodującej zmutowane białko *Lj*NFR5 (K339E) (odpowiednik mutacji K350E w *Lj*NFR1) do mutanta *nfr5-2 L. japonicus* pozbawionego *Lj*NFR5 komplementuje brak białka *Lj*NFR5. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie dowodzą, że *Lj*NFR5 jest pseudokinazą, która do pełnienia funkcji receptorowej nie wymaga aktywności kinazowej [53]. Jednakże brak u obu mutantów *Ljnfr1* i *Ljnfr5* szybkich odpowiedzi na aplikację czynnika nodulacji czy inokulację *M. loti* już od początku sugerował, że funkcjonalnym receptorem uruchamiającym swoiste odpowiedzi rośliny-gospodarza na infekcję jest heterodimer *Lj*NFR1-*Lj*NFR5. Potwierdzała to lokalizacja obu białek w błonie plazmatycznej [53], ale kluczowych argumentów dostarczyły doświadczenia polegające na wprowadzaniu genów *LjNFR1* i *LjNFR5* do lucerny (*Medicago truncatula*) i do *Lotus filicaulis* [78]. Otóż okazało się, iż transgeniczna lucerna może być infekowana bakteriami kolonizującymi tylko komonicę (*M. loti* bądź *Rhizobium legominosarum* bv. *Viciae*, szczepu DZL) jedynie wówczas, gdy zostały do niej wprowadzone równocześnie obydwa geny *LjNFR1* i *LjNFR5* [78]. W ten sposób dowiedziono ostatecznie, że receptorem czynnika Nod w *L. japonicus* umożliwiającym infekcję rośliny-gospodarza przez ryzobia oraz aktywującym organogenezę brodawek jest heterodimer *L*jNFR1-*Lj*NFR5 [78]. W ostatnich latach podjęto pierwsze próby identyfikowania reszt aminokwasowych pośredniczących w wiązaniu czynnika nodulacji. Wyniki nielicznych jeszcze badań sugerują, że niektóre reszty aminokwasowe położone w drugim motywie LysM *Lj*NFR5 faktycznie biorą udział w wiązaniu czynnika Nod [6, 78].

W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że genom *L. japonicus* zawiera co najmniej siedemnaście genów kodujących białka typu LysM-RLK, w tym osiem białek podobnych do *Lj*NFR1 i siedem homologicznych z *Lj*NFR5 [51]. Liczba *LysM-RLK* w genomach innych roślin jest znacząco mniejsza, bowiem rzodkiewnik ma tylko pięć, brzoza jedenaście, a w ryżu zidentyfikowano osiem genów kodujących kinazy białkowe z motywami LysM [51, 98]. W genomie rzodkiewnika nie znaleziono ortologa genu *Lj*NFR5, co w przypadku rośliny, która nie wchodzi w mikoryzę arbuskularną z grzybami typu Glomeromycota wydaje się być informacją mogącą mieć pewne znaczenie.

W dotychczasowych badaniach prowadzonych na roślinach niemotylkowatych udało się częściowo poznać rolę dwóch białek z motywami LysM. Kinaza białkowa *At*CERK1 rzodkiewnika i białko *Os*CEBiP ryżu funkcjonują jako błonowe receptory wiążące chitynę aktywujące tzw. odporność podstawową roślin.

Ponieważ białko *At*CERK1 ma w części cytoplazmatycznej kompletną domenę kinazy białkowej podobną do tej w *Lj*NFR1, dlatego postanowiono znaleźć sekwencje, które decydują o tym, że kinaza *At*CERK1 aktywuje reakcje obronne, a *Lj*NFR1 funkcjonuje w symbiozie brodawkowej [70]. Uzyskane wyniki pokazały, że w efekcie wprowadzenia niewielkich zmian w domenie kinazowej *At*CERK1, chimeryczne białko *Lj*NFR1-*At*CERK1, obejmujące domenę zewnątrzkomórkową *Lj*NFR1 i zmienioną domenę kinazową *At*CERK1, rzeczywiście aktywuje szlak sygnałowy regulujący organogenezę brodawek [70].

Ortologami genów *LjNRF1* i *LjNFR5* w lucernie (*Medicago truncatula*), drugiej obok komonicy modelowej roślinie motylkowatej, są geny *MtLYK3* i *MtNFP* [7, 49]. Gen *MtLYK3* (ang. *LysM domain-containing receptor-like Kinase3*) okazał się tożsamy z genem *HCL* (ang. *Hair Curling*) zidentyfikowanym u mutanta, u którego po infekcji *Sinorhizobium meliloti* nie dochodzi do deformacji włośników [87]. Wyniki najnowszych badań potwierdziły, że *Mt*LYK3, podobnie jak *Lj*NRF1, jest kinazą białkową o podwójnej specyficzności [39]. Fuzyjne białko *Mt*LYK3-GFP, lokalizowane w błonie plazmatycznej włośników i nici infekcyjnych, wyraźnie zmienia położenie w błonie kierując się w przypadku włośnika ku jego podstawie [25]. Co ciekawe, inokulacja *S. meliloti* hamuje dynamikę relokacji *Mt*LYK3-GFP, a ponadto sprzyja kolokalizacji *Mt*LYK3-GFP z FLOTYLINĄ4 (FLOT4) – białkiem powierzchniowo związanym z błoną plazmatyczną [24]. Rola białka FLOT4 nie została jeszcze poznana, chociaż wiadomo, że w lucernie pełni ważną funkcję zarówno w formowaniu nici infekcyjnej, jak również w organogenezie brodawek.

Ortologiem *LjNFR5* w lucernie jest gen *MtNFP* (ang. *Nod Factor Perception*), zidentyfikowany u mutanta C31 z defektem w szybkich odpowiedziach na infekcję *S. meliloti* [7]. Zbudowane z 595 reszt aminokwasowych *Mt*NFP jest pseudokinazą z trzema motywami LysM w części zewnątrzkomórkowej [3]. Obniżenie poziomu *Mt*NFP poprzez wprowadzenie do rośliny interferencyjnego RNA skutkuje defektami w formowaniu nici infekcyjnych oraz prowadzi do zmniejszenia liczby brodawek. Wykorzystując konstrukt obejmujący gen reporterowy *GUS* oraz promotor genu *MtNFP* wykazano, że ekspresja *MtNFP* w różnych częściach korzenia zmienia się w czasie. W pierwszym dniu po infekcji, ekspresja *MtNFP* zachodzi tylko w komórkach włośnikowych i komórkach epidermalnych, lecz w kolejnych dniach pojawia się również w komórkach głębszych warstw kory, także w miejscu formowania zawiązka brodawki, by następnie objąć również komórki zewnętrznych warstw kory [3].

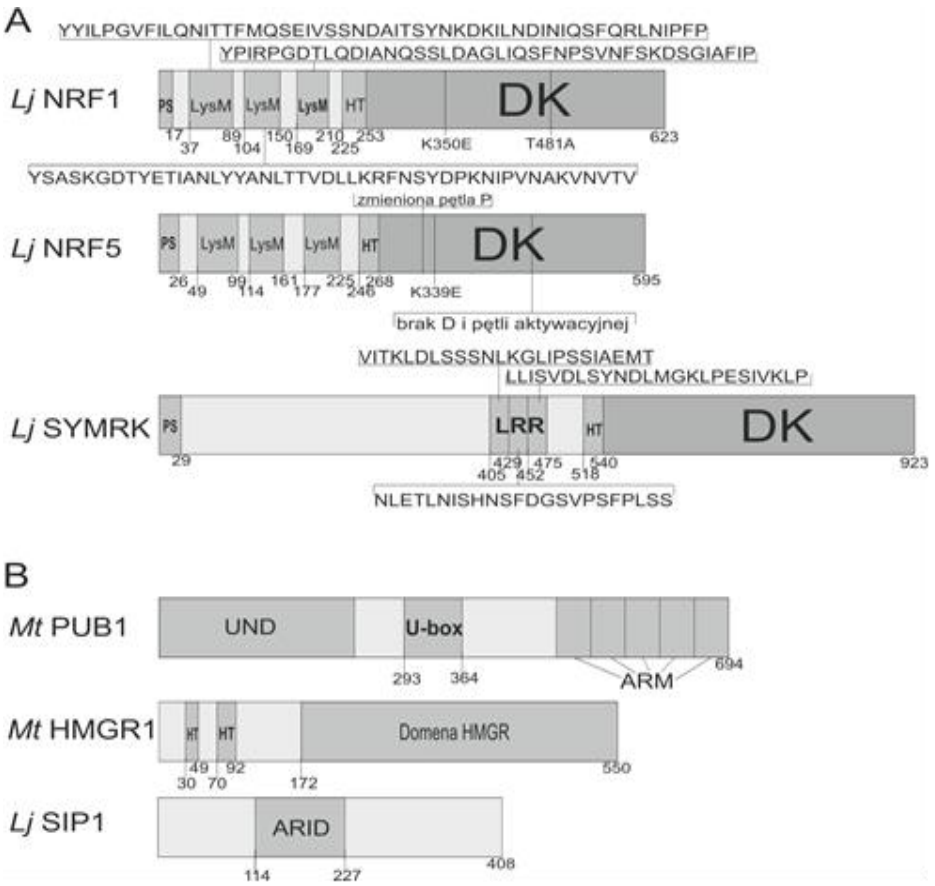
Genom *M. truncatula*, podobnie jak genom *L. japonicus*, zawiera co najmniej szesnaście genów kodujących kinazy lub pseudokinazy białkowe z motywami LysM, z czego dziewięć genów wykazuje homologię z *MtLYK3*, pięć z *MtNFP*, a dwa geny tworzą oddzielną podrodzinę. Wartym podkreślenia jest również fakt, iż w korzeniu oraz w brodawkach *M. truncatula* oprócz *MtLYK3* i *MtNFP* ekspresji ulega jeszcze sześć innych genów kodujących białka typu LysM-RLK [3].

Ortologami *LjNRF1* i *LjNFR5* w grochu (*Pisum sativum*) są odpowiednio geny *PsSYM37* i *PsSYM10* [100], a w soi (*Glycine max*) *GmNFR1α* i *β* [32] oraz *GmNFR5α* i *β* [31].

W kontekście poszukiwań receptorów czynników Nod wartymi odnotowania są wyniki najnowszych doświadczeń przeprowadzonych na *Parasponia andersonii* – drzewie strefy tropikalnej z rodziny wiązowatych wchodzącym w symbiozę z *Sinorhizobium* sp. NGR234. Otóż okazało się, że w genomie *P. andersonii* występuje tylko pojedynczy ortolog *MtNFP*/*LjNFR5* kodujący białko, które przypuszczalnie jest receptorem zarówno czynnika Nod produkowanego przez bakterię *S.*sp. NGR234, jak również nieznanego jeszcze czynnika mikoryzacji syntetyzowanego przez *Glomus intraradices* [72]. Wprowadzenie do *P. andersonii* odpowiedniego interferencyjnego RNA obniżającego w roślinie poziom białka *Pa*NFP skutkuje zmniejszeniem liczby brodawek, ale także zahamowaniem infekcji bakteryjnej i grzybowej na skutek zatrzymania wzrostu nici infekcyjnych i ograniczenia wzrostu strzępek grzyba [72].

W tym miejscu warto podkreślić, iż mutanty komonicy i lucerny, u których poznano receptory czynników nodulacji, nie wykazują żadnych upośledzeń w oddziaływaniach z symbiotycznymi grzybami typu Glomeromycota. Odrębną grupę tworzą mutanty roślin motylkowatych, u których oprócz defektów w procesach infekowania oraz organogenezy brodawek występują również upośledzenia w mikoryzie arbuskularnej. Analiza mutantów komonicy i grochu z zahamowanym formowaniem nici infekcyjnych oraz zatrzymanym na poziomie epidermy wzrostem strzępek grzyba doprowadziła do poznania genów *LjSYMRK* komonicy i *PsSYM19* grochu kodujących serynowo/treoninowe kinazy białkowe podrodziny LRR-RLK (ang. *Leucine Rich Repeat Receptor-Like Kinase*) (ryc. 1A) [89]. Ortologami tych genów w *M. sativa* i *M. truncatula* są odpowiednio *MsNORK* (ang. *Nodulation Receptor Kinase*) i *MtDMI2* (ang. *Does not Make Infections2*) [17, 50]. Szczegółowe analizy biochemiczne wykazały, iż większość allelicznych mutacji *symrk* komonicy i *sym* grochu to mutacje substytucyjne w obrębie subdomeny I uczestniczącej w wiązaniu ATP bądź w pętli aktywacyjnej położonej w subdomenie VII [97]. Wszystkie kinazy białkowe typu SYMRK/DMI2 w domenie zewnątrzkomórkowej mają sekwencję GDPC położoną w regionie poprzedzającym trzy powtórzenia LRR. Mutant *symRK-14*, w którym reszta proliny-386 została zastąpiona resztą leucyny wykazuje szereg defektów w szybkich odpowiedziach na infekcję bakteryjną i grzybową (oscylacyjne zmiany stężenia Ca^{2+}, formowanie nici infekcyjnej, wzrost strzępek grzybni, ekspresja genu *NIN*), bez wystąpienia wyraźnych zmian w komórkach warstwy kory [41]. Można zatem przypuszczać, że reszta proliny w motywie GDPC odgrywa pewną rolę w wiązaniu nieznanego jeszcze liganda [41]. Analiza ekspresji genu *MtDMI2* sugeruje, że białko *Mt*DMI*2* występuje w komórkach korzenia w strefie infekcji oraz w komórkach położonych w szczytowej części formującej się brodawki i jest zlokalizowane w błonie plazmatycznej oraz w błonie nici infekcyjnej [50]. Tak więc, wyniki dotychczasowych badań sugerują, że wiązanie do

zewnątrzkomórkowej domeny LRR niezidentyfikowanego jeszcze liganda stymuluje aktywność kinazową receptora, co w efekcie prowadzi do fosforylacji określonego białka/białek substratowego oraz aktywacji szlaku sygnałowego regulującego zarówno formowanie nici infekcyjnych, jak również wrastanie strzępek grzyba w głębsze warstw kory.



RYCINA 1. Schemat przedstawiający położenie charakterystycznych domen w kinazach LysM-RLK (*Lj*NRF1, *Lj*NRF5) i LRR-RLK (*Lj*SYMRK) (A) oraz w białkach oddziałujących z LysM-RLK (*Mt*PUB1) i z LRR-RLK (*Lj*SIP1, *Mt*HMGR1) (B). PS, pepty sygnałowy; LysM, domena LysM, HT, helisa przezbłonowa; DK, wewnątrzkomórkowa domena kinazowa; LRR, powtórzenia bogate w leucynę (na podstawie prac [37, 54, 59, 77, 89, 99])

FIGURE 1. Schematic representation of the domain structure of LysM-RLKs (*Lj*NRF1, *Lj*NRF5) and LRR-RLK (*Lj*SYMRK) (A), and schematic diagram of proteins interacting with LysM-RLK (*Mt*PUB1) and with LRR-RLK (*Lj*SIP1, *Mt*HMGR1) (B). PS, signal peptide; LysM, LysM domain; HT, transmembrane helix; DK, intracellular kinase domain; LRR, leucine rich repeats (based on [37, 54, 59, 77, 89, 99])

Kinaza typu SYMRK/DMI2 z dwoma motywami LRR w części cytoplazmatycznej uczestniczy również w regulacji mikoryzy arbuskularnej ryżu oraz innych roślin niemotylkowatych (kukurydza, pomidor, mak polny) [57]. W tym kontekście wartym podkreślenia jest fakt, iż gen *OsSYMRK* ryżu, mimo że koduje białko prawie dwukrotnie mniejsze niż *Lj*SYMRK, wprowadzony do mutanta *symrk L. japonicus* w pełni komplementuje mutację w odniesieniu do mikoryzy arbuskularnej, jednakże nie w przypadku symbiozy brodawkowej [57].
Kinaza białkowa typu SYMRK/DMI2 funkcjonuje również w organogenezie brodawek aktynoryzowych. Ten typ symbiozy z Gram-dodatnimi promieniowcami *Frankia* występuje u około 280 gatunków roślin z ośmiu rodzin, w tym m.in. u olchy, rokitnika czy woskownicy. Okazuje się, że ortolog kinazy SYMRK/DMI2 *Casuarina glauca* funkcjonujący zarówno w mikoryzie arbuskularnej, jak również w aktynoryzie komplementuje mutację *symrk L. japonicus* w symbiozie brodawkowej i mikoryzie arbuskularnej [21, 57].

Z kinazami *Mt*LYK3, *Mt*NFP i *Mt*DMI2 oddziałuje remoryna (*Mt*REM1) – 33 kDa białko powiązane z błoną plazmatyczną, w tym także z błoną nici infekcyjnej [45]. Infekcja lucerny przez *S. meliloti* aktywuje około 1000-krotnie ekspresję genu *MtREM1* [45]. Funkcja remoryn nie jest jeszcze znana, chociaż sugeruje się ich związek z mikrodomenami lipidowymi błon, określanymi jako tzw. tratwy lipidowe, gdzie remoryny miałyby tworzyć struktury typu filamentów.

W poszukiwaniach potencjalnych białek substratowych fosforylowanych przez poznane receptorowe kinazy białkowe udało się dotychczas zidentyfikować tylko trzy białka. Techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego wyselekcjonowano gen *MtPUB1* kodujący ligazę ubikwitynową oddziałującą z *Mt*LYK3 [59]. Białko *Mt*PUB1 (ang. *Plant U-Box protein1*) w regionie środkowym ma domenę U-box, zaś w części C-końcowej pięć powtórzeń ARMADILLO pośredniczących w oddziaływaniach z *Mt*LYK3 (ryc. 1B). Infekcja bakteryjna aktywuje biosyntezę białka *Mt*PUB1 lokalizowanego w pobliżu błony plazmatycznej, gdzie jest fosforylowane przez kinazę *Mt*LYK3. Na razie nie wiadomo czy ligaza *Mt*PUB1 bierze udział w ubikwitynylacji białka receptorowego *Mt*LYK3, czy może przenosi zaktywowaną ubikwitynę na nieznane jeszcze białko substratowe, podobnie jak to ma miejsce w przypadku ligazy ARC1 z domeną U-box funkcjonującej w samoniezgodności sporofitowej [34].

Również pozostałe dwa białka oddziałujące z kinazami typu SYMRK/NORK zidentyfikowano techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego [37, 99]. Z domeną kinazową *Mt*NORK wiąże się reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo--CoA (*Mt*HMGR1) – kluczowy enzym szlaku syntezy kwasu mewalonowego. Kwas mewalonowy jest prekursorem pirofosforanu 3-izopentylu, który jest aktywowaną jednostką izoprenową – substratem wykorzystywanym w biosyntezie różnych substancji lipidowych [37]. Domena katalityczna *Mt*HMGR1 położona jest w C-końcowej części polipeptydu (ryc. 1B), natomiast dwa hydrofobowe odcinki w N-końcowej części lokalizują enzym w błonie pęcherzyków pochodzących przypuszczalnie z siateczki śródplazmatycznej. Hamowanie

lawastatyną aktywności katalitycznej *Mt*HMGR1 bądź obniżenie jej poziomu interferencyjnym RNA powoduje zmniejszenie liczby brodawek korzeniowych [37]. Z kinazą *Lj*SYMRK oddziałuje również *Lj*SIP1 (ang. *SYMRK-Interacting Protein1*) zawierające domenę ARID (ang. *AT-Rich Interaction Domain*) (ryc. 1B) pośredniczącą w oddziaływaniu z DNA w miejscu bogatym w AT m.in. z sekwencją promotorową wczesnego genu nodulacji *LjNIN* [99].

Równolegle z poszukiwaniami białek fizycznie oddziałujących z receptorowymi kinazami białkowymi LysM-RLK i LRR-RLK, od szeregu lat pojawiają się doniesienia sugerujące, że białkowymi elementami szlaków sygnałowych położonymi poniżej receptorów są enzymy metabolizujące fosfolipidy (ryc. 4) [67,71]. Aktywacji miałaby ulegać fosfolipaza D produkująca kwas fosfatydowy oraz fosfolipaza C uwalniająca diacyloglicerol, który jest następnie fosforylowany do kwasu fosfatydowego przez kinazę diacyloglicerynową (DGK). Jednakże wyniki dotychczasowych, pojedynczych doniesień nie dają na razie podstaw do twierdzenia, iż to związki lipidowe pełnią w szlaku sygnałowym aktywowanym przez kinazy białkowe LysM-RLK i LRR-RLK funkcję przekaźników drugiego rzędu.

BIAŁKOWE ELEMENTY SZLAKU SYGNAŁOWEGO FUNKCJONUJĄCE W GENEROWANIU SYGNATURY WAPNIOWEJ

Syntetyzowany przez ryzobia czynnik nodulacji już w 1 nM stężeniu indukuje w komórkach włośników oraz w komórkach epidermalnych korzenia regularne zmiany stężenia Ca^{2+}, pojawiające się po około 10-15 minutach od aplikacji czynnika Nod. Obserwowane oscylacje wapniowe pozostają ciągle wyraźne nawet po trzech godzinach od rozpoczęcia doświadczenia [92, 93]. Jednakże czynnik nodulacji w stężeniu 10 nM wywołuje w komórkach włośników jeszcze inne zmiany stężenia Ca^{2+}, obserwowane jako pojawiający się niemal natychmiast po aplikacji czynnika Nod stosunkowo powolny napływ jonów wapnia do cytoplazmy [83]. Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, inicjowany w części wierzchołkowej włośnika, trwa w tym wypadku zaledwie kilka minut i jest przypuszczalnie związany z aktywacją kanałów wapniowych bramkowanych napięciem i hamowanych przez werapamil [83]. Napływ Ca^{2+} do cytoplazmy nie występuje w komórkach mutantów pozbawionych funkcjonalnego receptora LysM-RLK, natomiast pozostaje niemal niezmieniony u mutantów z nieaktywną kinazą *Mt*DMI2/LRR-RLK [83]. Powolnemu, jednorazowemu wzrostowi stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie towarzyszy aktywacja błonowej oksydazy NADPH produkującej aniony ponadtlenkowe, przekształcane następnie w nadtlenek wodoru (ryc. 4).
Całkowicie odmienny charakter oraz inne miejsce inicjowania oscylacyjnych zmian stężenia Ca^{2+} w komórkach włośnikowych, lokalizowane w okolicy jądra, skierowało uwagę badaczy na nukleoplazmę, jako ewentualne miejsce

generowanych oscylacji wapniowych [83]. W śledzeniu wewnątrzjądrowych zmian stężenia Ca^{2+} w komórkach włośnikowych *M. truncatula* niezwykle przydatny okazał się konstrukt kodujący hybrydowe białko NupYC2.1, obejmujące sekwencję białka sensorowego kameleonYC2.1 oraz sekwencję nukleoplazminy [86]. Wzbudzana przez jony wapnia fluorescencja zlokalizowanego w jądrze komórkowym białka NupYC2.1 analizowana jest w mikroskopie konfokalnym z wykorzystaniem techniki FRET. Dzięki tej technice wykazano, że jony wapnia, napływające do nukleoplazmy i w mniejszej ilości do przyjądrowej cytoplazmy, pochodzą z przestrzeni zawartej pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną błoną jądrową [11, 86]. Zmiany stężenia Ca^{2+} mają charakter regularnych oscylacji, niezwiązanych z początkowym, powolnym wzrostem stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. W przeważającej liczbie komórek włośnikowych, generowane z regularną częstotliwością co 70–110 sekund piki Ca^{2+} mają podobną amplitudę i charakteryzują się podobnym kształtem (ryc. 5B). Częstotliwość pików wapniowych w komórkach epidermalnych i korowych jest wyraźnie mniejsza [64]. Próby ustalenia ewentualnych zależności pomiędzy częstotliwością zmian stężenia Ca^{2+} a ekspresją wczesnych genów nodulacji wykazały, że ekspresja genu *ENOD11* zachodzi po wystąpieniu co najmniej 36-40 pików wapniowych [64]. Aplikacja kwasu jasmonowego powodująca zmniejszenie częstotliwości oscylacji wapniowych wyraźnie opóźnia ekspresję *ENOD11*, która w tym wypadku pojawia się dopiero po około 60 pikach [64].

Oscylacyjne zmiany stężenia Ca^{2+} w jądrze komórkowym generowane są również w warunkach, gdy w pobliżu korzenia rosną strzępki grzyba mikoryzowego *Glomulus intraradices* [40]. Porównując częstotliwość oraz kształt pików wapniowych generowanych w wyniku aplikacji czynnika Nod z tymi, jakie towarzyszą obecności strzępek *G. intraradices* wyraźnie widać, że zarówno częstotliwość oscylacji, jak również kształt pików wapniowych wyraźnie się różnią (ryc. 5B) [40].

Powstający w określonej komórce powtarzalny wzorzec zmian stężenia jonów wapnia nazywany jest obecnie sygnaturą wapniową. Obejmuje ona częstotliwość, amplitudę i kształt pików wapniowych. Informacja zakodowana w sygnaturze wapniowej może być rozszyfrowana przez odpowiednie białka sensorowe. Tak więc, w przypadku symbiozy brodawkowej i mikoryzy arbuskularnej, generowane w nukleoplazmie odmienne sygnatury wapniowe muszą zostać rozkodowane prze białko/białka sensorowe aktywujące różne szlaki sygnałowe regulujące procesy infekcji bakteryjnej i grzybowej oraz kontrolujące organogenezę brodawek i arbuskuli.

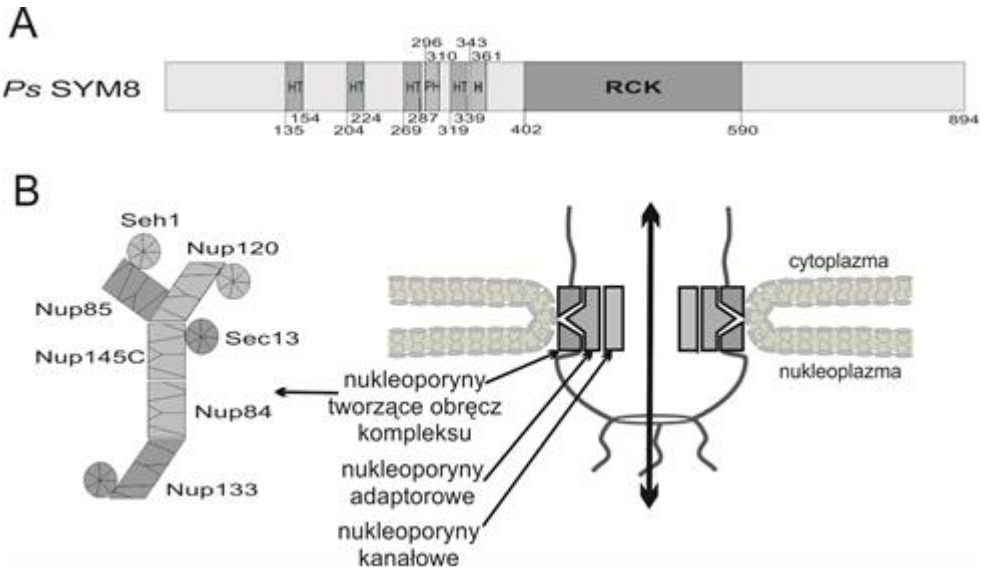
W generowaniu określonej sygnatury wapniowej na terenie nukleoplazmy powinny uczestniczyć odpowiednie kanały i pompy wapniowe zlokalizowane w błonach otoczki jądrowej. Niestety, aktualna wiedza na temat białek pośredniczących w transporcie Ca^{2+} przez błony jądrowe jest jeszcze zupełnie fragmentaryczna [44, 60]. Mimo to udało się wyselekcjonować szereg allelicznych mutantów *dmi1* (ang. *does not make infections1*) *M. truncatula* z defektem w genie

MtDMI1 kodującym 883-aminokwasowe białko funkcjonujące jako kanał kationowy [2]. Udział białka *Mt*DMI1 w generowaniu oscylacji wapniowych w jądrze komórkowym potwierdzono w najnowszych badaniach, w których m.in. wykazano, że *Mt*DMI1 jest rzeczywiście zlokalizowane w błonach otoczki jądrowej, głównie w błonie wewnętrznej [11, 74, 80]. Ortologami *MtDMI1* w *L. japonicus* są dwa geny *LjPOLLUX* i *LjCASTOR* kodujące białka, których sekwencja aminokwasowa jest identyczna w 75% [12,13]. Białko *Lj*POLLUX jest podobne do *Mt*DMI1 (94% identyczności), natomiast sekwencja aminokwasowa *Lj*CASTOR jest w 90% identyczna z jedną z sekwencji *M. truncatula* zdeponowaną w bazie danych [13]. Ortologiem *MtDMI1* w grochu jest gen *PsSYM8* [16]. Wszystkie poznane białka mają podobną wielkość (około 900 reszt aminokwasowych) i wszystkie w N-końcowej części mają cztery helisy transbłonowe, zaś w części środkowej domenę RCK (ang. *Regulator of Conductance of* K^+) poznaną wcześniej w bakteryjnym kanale K^+ regulowanym przez Ca^{2+} (ryc. 2A). W strukturze pierwszorzędowej można także wyróżnić motywy charakterystyczne dla kanału potasowego MthK *Methanobacterium thermoautotrophicum*, takie jak: motyw filtra, helisę porową i region zawiasowy, a w regionie C-końcowym domenę regulacyjną (ryc. 2A). Obecność tych sekwencji nasuwa przypuszczenie, że białka *Lj*CASTOR i *Lj*POLLUX/*Mt*DMI1/*Ps*SYM8, tworzące niezależne homooligomeryczne kompleksy, funkcjonują jako kanały potasowe regulujące niezidentyfikowane jeszcze kanały wapniowe bramkowane napięciem. Odmienny pogląd wyrażają badacze zajmujący się białkiem *Ps*SYM8 grochu sugerując, że tworzy ono homotetrameryczne kanały wapniowe [16]. Ortologi genów *LjCASTOR* i *LjPOLLUX* zidentyfikowano również w genomach innych roślin, chociaż w *A thaliana* występuje tylko homolog genu *LjPOLLUX* [13].

W ostatnim czasie opublikowano wyniki sugerujące, że pompą wapniową zlokalizowaną w obu błonach otoczki jądrowej oraz w błonie siateczki śródplazmatycznej jest białko *Mt*MCA8 (ryc. 4) [11]. Pompa wapniowa *Mt*MCA8 powinna usuwać jony wapnia z nukleoplazmy oraz z przylegającej do jądra cytoplazmy z powrotem do przestrzeni zawartej pomiędzy błonami jądrowymi, która, jak wiadomo, stanowi ciągłość z wewnętrznymi cysternami siateczki śródplazmatycznej.

Kolejnymi trzema białkami niezbędnymi w generowaniu oscylacyjnych zmian stężenia Ca^{2+} w jądrze komórkowym są białka błonowe poznane u mutantów *nup133*, *nup85* i *nena L. japonicus* z defektami w procesach infekowania korzenia oraz organogenezy brodawek i arbuskuli [23, 36, 81]. Wszystkie trzy mutacje dotyczą genów kodujących białka homologiczne z drożdżowymi nukleoporynami tworzącymi podkompleks Nup107 budujący „obręcz" kompleksu porowego (ryc. 2B) [29]. Mutacje w genach wszystkich trzech nukleoporyn skutkują upośledzeniem w generowaniu oscylacji wapniowych oraz defektami w symbiozie brodawkowej i arbuskularnej. Wszystkie trzy mutacje wpływają również negatywnie na liczbę i wielkość produkowanych nasion, natomiast, co może

zaskakiwać, nie wywołują innych bardziej drastycznych zmian fenotypowych [23, 36, 81].

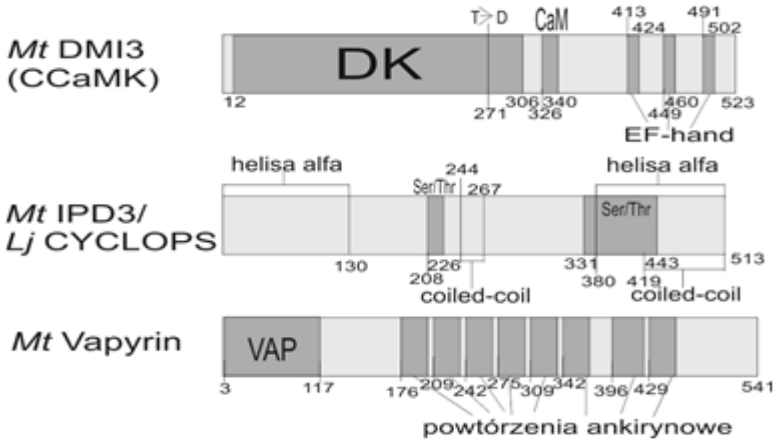


RYCINA 2. Schemat budowy białka *Ps*SYM8 (A) oraz model jądrowego kompleksu porowego zbudowanego z nukleoporyn trzech klas (B). HT, helisa przezbłonowa; PH, helisa porowa; H, łącznik; RCK, domena regulująca przepływ K^+ (na podstawie prac [16, 23, 29, 36 ,81])
FIGURE 2. The domain structure of *Ps*SYM8 (A), and a model of the nuclear pore complex assembled from three classes nucleoporins (B). HT, transmembrane helices; PH, pore helix; H, hinge; RCK, regulation of conductance of K^+ domain (based on [16, 23, 29, 36, 81])

ROZKODOWYWANIE SYGNATURY WAPNIOWEJ I AKTYWACJA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Kodowanie informacji w postaci sygnatury wapniowej wiąże się z koniecznością udziału w szlaku sygnałowym specjalnych białek sensorowych rozkodowujących charakterystyczny wzorzec zmian stężenia Ca^{2+}. Liczba poznanych już białek sensorowych funkcjonujących w rozszyfrowywaniu zmian w stężeniu jonów wapnia w komórkach roślin jest zaskakująco duża i wraz z rozwojem biologii molekularnej ciągle się jeszcze powiększa [44]. W przypadku oscylacji wapniowych związanych z symbiozą brodawkową i mikoryzą arbuskularną, białkiem sensorowym okazała się być kinaza białkowa aktywowana przez jony wapnia i Ca^{2+}/kalmodulinę. Gen kodujący poszukiwane białko poznano u mutanta *dmi3 M. truncatula* (ang. *does not make infections3*) z defektem w procesie nodulacji, lecz zachowaną zdolnością do generowania oscylacji wapniowych w odpowiedzi na aplikację czynnika Nod bądź infekcję grzybem

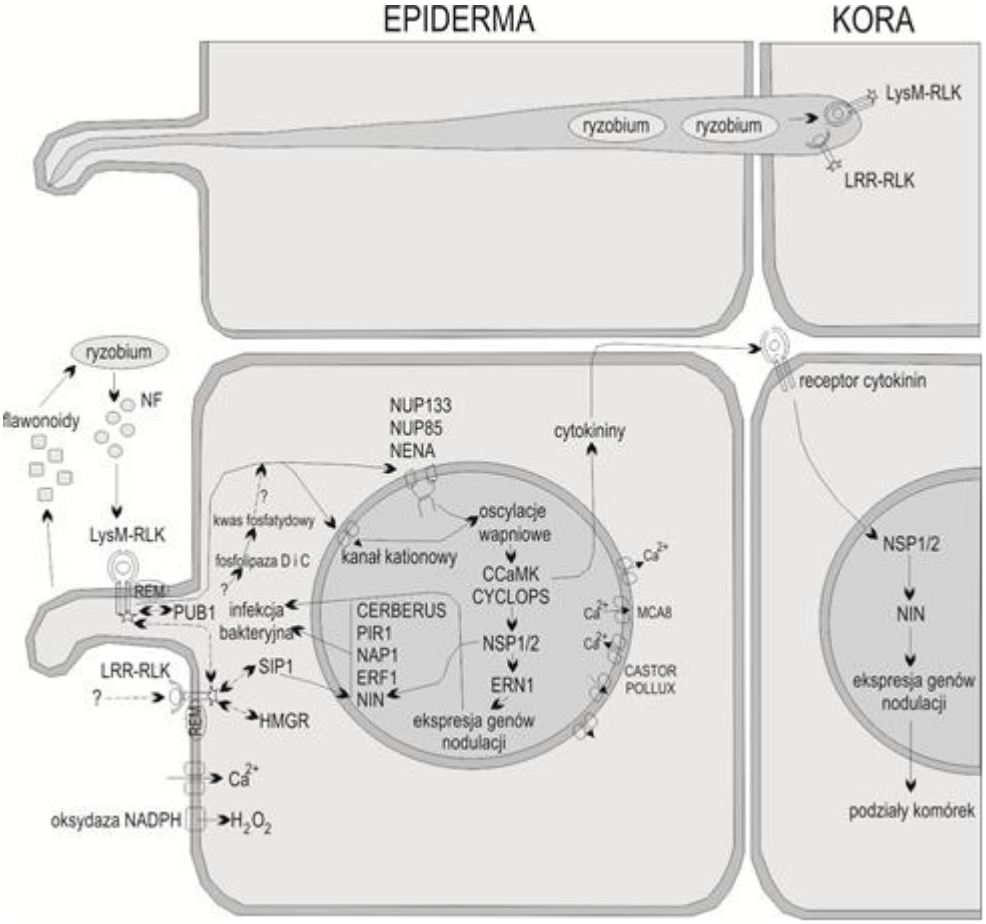
mikoryzowym [47, 63]. Białko *Mt*DMI3 zbudowane jest z 523-aminokwasów i wykazuje wyraźną homologię z poznanym u lilii dziesięć lat wcześniej białkiem CCaMK (ang. *Calcium-binding calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase*) [47, 63, 82]. Zlokalizowana w jądrze komórkowym kinaza *Mt*DMI3/CCaMK w części N-końcowej ma domenę charakterystyczną dla serynowo/treoninowych kinaz białkowych, natomiast w C-końcowej części zawiera domenę regulacyjną (ryc. 3). Aktywność kinazową regulują jony wapnia wiązane przez trzy motywy EF-hand, a dodatkowo Ca^{2+}/kalmodulina (Ca^{2+}/CaM) oddziałująca z motywem wiążącym kalmodulinę. Sekwencja wiążąca Ca^{2+}/CaM położona jest w regionie środkowym polipeptydu (od 326 do 341 aminokwasu) w obrębie domeny autoinhibitorowej (odcinek pomiędzy 326 a 355 aminokwasem) (ryc. 3) [63].



RYCINA 3. Schemat przedstawiający położenie charakterystycznych domen w kinazie *Mt*DMI3 (CCaMK) oraz w białkach oddziałujących z *Mt*DMI3 (*Mt*IPD3/*Lj*CYCLOPS, *Mt*Vapyrin). DK, domena kinazowa; CaM, domena wiążąca kalmodulinę; Ser/Thr, motyw bogaty w serynę i treoninę; VAP, domena VAP/MSP (na podstawie prac [30, 47, 61, 63, 69, 73, 76, 95])
FIGURE 3. Schematic illustration of the domain structure of *Mt*DMI3 (CCaMK), and structure of the proteins interacting with *Mt*DMI3 (*Mt*IPD3/*Lj*CYCLOPS, *Mt*Vapyrin). DK, kinase domain; CaM, calmodulin binding domain; Ser/Thr, serine/threonine-rich region; VAP, VAP/MSP domain (based on [30, 47, 61, 63, 69, 73, 76, 95])

Wiązaniu Ca^{2+} towarzyszy autofosforylacja *Mt*DMI3 w domenie kinazowej, a przypuszczalnie także w regionie autoinhibitorowym. Wydaje się, że w wyniku autofosforylacji *Mt*DMI3 rośnie powinowactwo motywu wiążącego kalmodulinę do Ca^{2+}/CaM, co w efekcie prowadzi do odblokowania aktywności katalitycznej enzymu [22]. Przedstawiony ogólny mechanizm regulacyjny *Mt*DMI3/CCaMK wynika po części z doświadczeń prowadzonych na rekombinowanych białkach uzyskiwanych z bakterii *E. coli* transformowanych fragmentami sekwencji *MtDMI3* [22]. Okazało się, że białka kodowane przez N-końcowe odcinki *MtDMI3* (od 1 do 311 lub do 326 aminokwasu), pozbawione motywów wiążących

Ca^{2+}/CaM i Ca^{2+}, wykazują *in vitro* aktywność kinazową niezależnie od obecności jonów wapnia. Co więcej, wprowadzenie tych samych sekwencji *MtDMI3* do mutanta *dmi3-1 M. truncatula* w pełni komplementuje brak funkcjonalnej kinazy *Mt*DMI3. Innymi słowy, domena kinazowa białka *Mt*DMI3 nie tylko aktywuje ekspresję wczesnych genów nodulacji (*ENOD11*), ale w lucernie pozbawionej *Mt*DMI3 (mutant *dmi3-1*) inicjuje organogenezę brodawek bez konieczności infekowania korzenia *S. meliloti* bądź aplikacji czynnika nodulacji [22].



RYCINA 4. Aktualny model przedstawiający szlaki sygnałowe regulujące infekcję korzenia przez ryzobia oraz kontrolujące organogenezę brodawek. Wiązanie czynnika Nod do kompleksu LysM-RLK aktywuje w komórkach korzenia szereg wczesnych odpowiedzi, takich jak: napływ Ca^{2+} do cytoplazmy, aktywacja oksydazy NADPH, produkcja kwasu fosfatydowego, oscylacyjne zmiany stężenia Ca^{2+} w nukleoplazmie, deformacja włośników, podziały komórek kory, formowanie nici infekcyjnej wprowadzającej ryzobia do powstającej brodawki. Kluczowym elementem szlaku sygnałowego jest sygnatura wapniowa rozkodowywana przez kinazę CCaMK aktywującą czynniki transkrypcyjne. Receptor cytokinin w błonach komórek kory aktywuje szlak sygnałowy regulujący

podziały komórek i organogenezę brodawki. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie prac [8, 15, 19, 20, 42, 55, 67, 71])

FIGURE 4. A current model of early symbiotic signaling pathways associated with rhizobial infection and nodule organogenesis. Nod factor perception through LysM-RLK complexes triggers several early symbiotic responses in the plant root, such as: Ca^{2+} fluxes, NADPH oxidase activation, phosphatidic acid production, calcium spiking, root hair deformation, cortical cell division, formation of an infection tread that guides the rhizobia to the emerging primordium. Calcium signature is decoded by the kinase CCaMK, thereby activates the transcription factors. A cytokinin receptor in the cortex is required for cell divisions and nodule primordia formation. Detailed descriptions are in the text (based on [8, 15, 19, 20, 42, 55 ,67, 71])

Ortologami *MtDMI3* w *L. japonicus* jest *LjCCaMK*, a w grochu *PsSym9* [63, 90]. Gen *LjCCaMK* zidentyfikowano u mutanta *snf1* (ang. *spontaneous nodule formation1)* tworzącego brodawki niezależnie od obecności *M. loti* bądź aplikacji czynnika Nod. Okazało się, że zmutowany gen *SNF1*/*LjCCaMK* koduje białko, w którym reszta treoniny-265 (reszta odpowiadająca fosforylowanej treoninie-271 w *Mt*DMI3) została zastąpiona resztą izoleucyny [90]. Można zatem wysnuć wniosek, że autofosforylacja *Lj*CCaMK nie odgrywa istotnej roli w fosforylowaniu odpowiedniego białka/białek substratowego, lecz raczej warunkuje wystąpienie określonych zmian konformacyjnych, powstających samorzutnie na skutek mutacji substytucyjnej T265I u mutanta *snf1*.

Wyniki szczegółowych analiz z ostatnich lat dowodzą, że spontaniczna organogeneza brodawek zachodzi także u podwójnych mutantów *L. japonicus*, u których oprócz mutacji substytucyjnej T265D w *Lj*CCaMK nieaktywne było jeszcze jedno z białek położone w szlaku sygnałowym powyżej *Lj*CCaMK (ryc. 5A) [26]. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazały, że defekty w organogenezie brodawek wynikające z mutacji: *nfr1*, *nfr5*, *symrk*, *nup85*, *castor* i *pollux* znoszone są przez mutację T265D w *LjCCaMK*. Wyraźnie odmienne wyniki uzyskano w przypadku podwójnych mutantów *nfr1*/*LjCCaMK* (T265D) i *nfr5*/*LjCCaMK* (T265D). Okazało się bowiem, że powstające również w tym wypadku brodawki korzeniowe nie są kolonizowane przez ryzobia. Przyczyny takiej odmienności należy upatrywać w tym, że inokulacja *M. loti* podwójnych mutantów z defektami w genach receptorów czynników Nod (*LjNFR1* i *LjNFR5*) nie pociąga deformacji włośników i formowania nici infekcyjnych. Wyniki tych doświadczeń pokazują, że oscylacje Ca^{2+} indukowane przez czynnik Nod są niezbędne w organogenezie brodawek, lecz procesy związane z infekcją bakteryjną wymagają dodatkowych sygnałów. Obecnie przyjmuje się, że receptor LysM-RLK aktywuje równocześnie dwa szlaki sygnałowe, jeden regulujący organogenezę brodawek, a drugi kontrolujący inicjowanie i wzrost nici infekcyjnych (ryc. 4) [26, 55, 67, 90].

Podwójne mutanty *L. japonicus* wykorzystano również w badaniach poświęconych mikoryzie arbuskularnej [26]. W przeprowadzonych doświadczeniach w pełni potwierdzono wyniki wcześniejszych obserwacji pokazujących, iż mutacjom *symrk*, *castor*, *pollux*, *nup85*, *cyclops* towarzyszą

defekty uniemożliwiające wrastanie strzępek grzyba w głąb kory oraz wynikające z tego upośledzenia w organogenezie arbuskuli. Defekty występujące u pojedynczych mutantów są niemal całkowicie znoszone u podwójnych mutantów z konstytutywnie aktywną kinazą *LjCCaMK* (T265D), bowiem strzępki wrastają do głębszych warstw kory, gdzie następnie tworzone są arbuskule [26]. W tym miejscu warto przypomnieć, że wzrost strzępek grzyba w głąb korzenia odbywa się wewnątrz struktur prepenetracyjnych powstających pomiędzy oraz wewnątrz komórek kory.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pokazują, że kinaza CCaMK, funkcjonująca w rozkodowywaniu sygnatury wapniowej, zajmuje miejsce kluczowe we wspólnym symbiotycznym szlaku sygnałowym (ryc. 5A) [40]. Powyższy wniosek potwierdzają także wyniki doświadczeń prowadzonych na roślinach niemotylkowatych. Okazało się, że gen *OsCCaMK*, a także *OsCASTOR* i *OsPOLLUX* ryżu, nie tylko funkcjonują w mikoryzie arbuskularnej ryżu, ale przeniesione do mutantów *L. japonicus* w pełni komplementują mutacje w ich ortologach zarówno w symbiozie arbuskularnej, jak również w symbiozie bakteryjnej [5].

W poszukiwaniach potencjalnych białek substratowych fosforylowanych przez kinazę CCaMK, techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego wyselekcjonowano w lucernie 58 kDa białko *Mt*IPD3 (ang. *Interacting Protein of DMI3*) (ryc. 3) [61]. Niedługo później w *L. japonicus* zidentyfikowano gen *LjCYCLOPS*, a u mutanta grochu z defektem w formowaniu symbiosomów jego ortolog *PsSYM33* [73, 95]. Zlokalizowane w jądrze komórkowym *Mt*IPD3/*Lj*CYCLOPS/*Ps*SYM33 oddziałują fizycznie z aktywnymi formami CCaMK, w tym również z *Lj*CCaMK (T265I), a efektem takiej interakcji *in vitro* jest ich fosforylacja [95]. Rola poznanych białek na razie nie jest znana, lecz wyniki dotychczasowych badań pokazują, że uczestniczą one w infekowaniu brodawek i w infekowaniu korzenia przez grzyby mikoryzowe, oraz że w symbiotycznym szlaku sygnałowym położone są poniżej CCaMK (ryc. 5A) [30, 95].

W ostatnich czasie w lucernie i petunii poznano geny *MtVapyrin* (*MtVPY*) i *PhPAM1* (ang. *Penetration, Arbuscule Morphogenesis1*) kodujące białka cytoplazmatyczne, których funkcję wiązano początkowo tylko z mikoryzą arbuskularną [18, 76]. Jednakże wyniki najnowszych badań pokazują, że *Mt*VPY nie tylko uczestniczy w infekcji mikoryzowej, ale także bierze udział w organogenezie i kolonizacji brodawek. Tak więc, *Mt*Vapyrin jest w roślinach motylkowatych dziewiątym poznanym białkiem współtworzącym wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy (ryc. 5A) [69]. Obydwa białka *Mt*VPY/*Ph*PAM1 mają domenę VAP/MSP oraz osiem powtórzeń ankirynowych (ryc. 3) pośredniczących w oddziaływaniach z innymi białkami.

Oprócz białek współtworzących wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy udało się jeszcze poznać kilka białek położonych w szlaku sygnałowym poniżej CCaMK oraz poniżej *Mt*IPD3/*Lj*CYCLOPS i *Mt*VPY, ale funkcjonujących tylko w regulacji

symbiozy brodawkowej. W *M. truncatula* poznano geny *MtNSP1* i *MtNSP2* (ang. *Nodulation Signaling Pathway1* and *2*) [35,88], a w *L. japonicus* ich ortologi *LjNSP1* i *LjNSP2* [27,66] kodujące białka, które bezpośrednio uczestniczą w regulacji ekspresji genów. Wyniki szczegółowych badań potwierdziły, że białko NSP1 wiąże się z sekwencją AATTT w promotorze genu *ENOD11* oraz z sekwencjami promotorowymi genów innych czynników transkrypcyjnych (*MtNIN* i *MtERN1*) [28,66].

Kolejne czynniki transkrypcyjne poznano dzięki wyselekcjonowaniu mutantów z defektami w tworzeniu nici infekcyjnych i organogenezie brodawek. W ten sposób w grochu, komonicy i lucernie poznano geny *PsSYM3*, *LjNIN* i *MtNIN* (ang. *Nodule Inception*) [9,58]. Uzyskane wyniki dowodzą, że kodowane białka położone są w szlaku sygnałowym poniżej kinazy CCaMK [58,64].

Również trzy kolejne czynniki transkrypcyjne ERN1 do ERN3 (ang. *ERF Required for Nodulation*) poznano u mutanta *bit1-1 M. truncatula* z defektami w formowaniu nici infekcyjnych i organogenezie brodawek [62]. Wyniki nielicznych jeszcze badań dowodzą, że białka ERN1 i 2 są pozytywnymi regulatorami genów aktywowanych przez czynnik Nod, natomiast białko ERN3 funkcjonuje jako represor bądź modyfikuje aktywność ERN1/ERN2 [1].

W komórkach merystematycznych brodawek *M. truncatula* ekspresji ulega gen *MtHAP2-1* kodujący czynnik transkrypcyjny funkcjonujący w organogenezie brodawek [14]. Ortologiem *MtHAP2-1* w *L. japonicus* jest gen *LjERF1* [4].

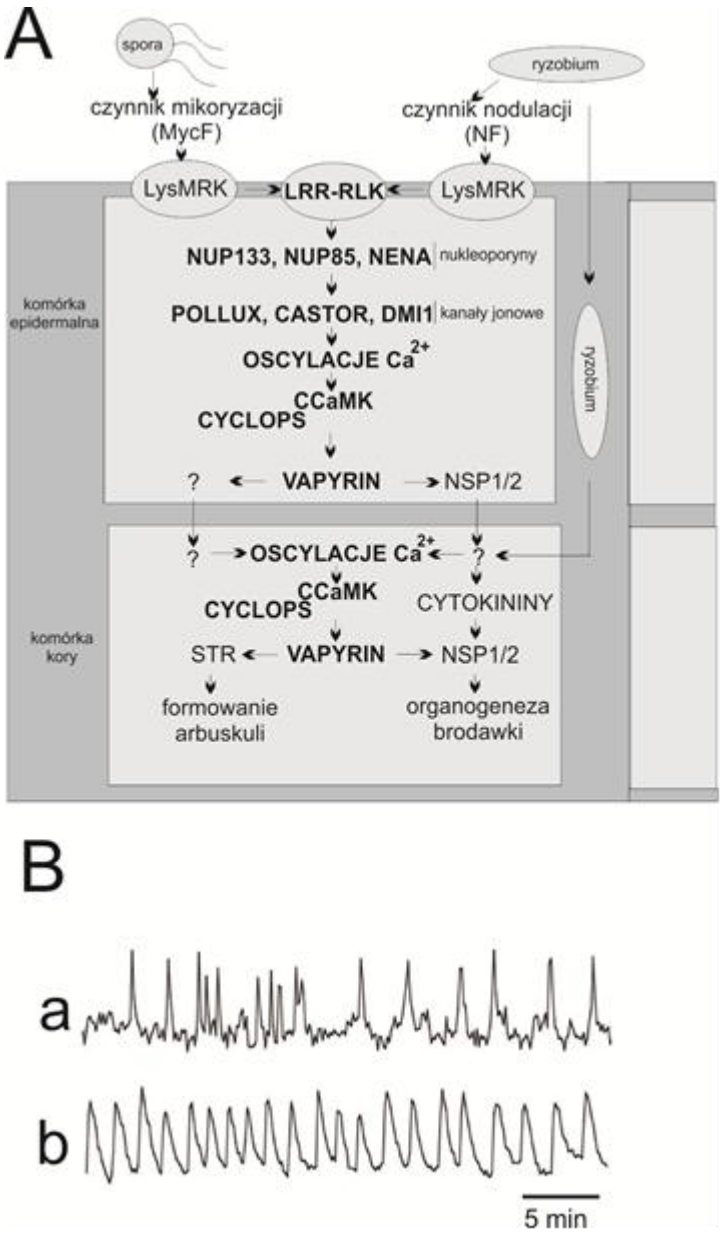
Oprócz czynników transkrypcyjnych udało się jeszcze poznać kilka białek, których funkcja wiązana jest z infekcją bakteryjną poprzez włośniki korzeniowe. W *L. japonicus* zidentyfikowano geny *NAP1* i *PIR1* kodujące białka uczestniczące w reorganizacji filamentów aktynowych [96]. W infekcji bakteryjnej biorą również udział białka *Lj*CERBERUS i *Lj*LIN/*Mt*NIN zawierające kasetę U występującą w niektórych ligazach ubikwitynowych (ryc. 4) [38,94].

Od ponad trzydziestu lat z procesem organogenezy brodawek korzeniowych wiązane są także niektóre fitohormony, szczególnie cytokininy, lecz dopiero wyniki opublikowane w 2007 roku jednoznacznie potwierdzają udział tych substancji w formowaniu brodawek [20, 71]. Przedmiotem szczególnego zainteresowania stały się dwa mutanty *L. japonicus*, a mianowicie *hit1* (ang. *hiperinfected1*) oraz *snf2* (ang. *spontaneous nodule formation2*) [68, 91]. Infekowanie mutanta *hit1* bakterią *M. loti* inicjuje powstawanie nici infekcyjnych, jednakże w głębszych warstwach kory nie dochodzi do podziałów komórek, a w efekcie nie tworzą się brodawki [68]. Inaczej jest w przypadku mutanta *snf2*, u którego powstają zawiązki brodawek bez udziału bakterii lub czynnika Nod [91]. Okazało się, że obydwie mutacje dotyczą genu *Lhk1* (ang. *Lotus histidine kinase1*) kodującego jeden z receptorów cytokinin. Receptory cytokinin są błonowymi, histydyno/asparaginianowymi kinazami białkowymi fosforylującymi małe białka HP, z których reszta fosforanowa jest przenoszona dalej na czynniki transkrypcyjne (regulatory odpowiedzi RR) [43]. Szczegółowe analizy wykazały, że wszystkie alleliczne mutanty *hit1* mają skrócony polipeptyd LHK1 i nie

wykazują aktywności kinazowej, natomiast mutacja *snf2* polega na zastąpieniu reszty leucyny-266 przez fenyloalaninę w obrębie zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej cytokininę. Taka zamiana pojedynczego aminokwasu prowadzi do zmian konformacyjnych w LHK1 skutkujących konstytutywną aktywacją domeny kinazowej. Kinaza LHK1 aktywuje ekspresję genu regulatora odpowiedzi *Lrr5*, a co równie ciekawe, aktywuje w komórkach kory ekspresję genów *NSP2* i *NIN*. Tak więc, czynniki transkrypcyjne NSP1/NSP2 i NIN nie tylko regulują proces infekcji bakteryjnej, ale również uczestniczą w organogenezie brodawek (ryc. 4) [55].

UWAGI KOŃCOWE

Poznanie przed niemal dziesięciu laty receptorów czynników Nod wyraźnie zintensyfikowało badania molekularne, których niewątpliwym osiągnięciem jest zidentyfikowanie w komonicy i lucernie dziewięciu białek współtworzących razem tzw. wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy. Kluczowym elementem tego szlaku jest generowana w nukleoplazmie sygnatura wapniowa rozkodowywana przez kinazę białkową regulowaną przez Ca^{2+} i Ca^{2+}/kalmodulionę (ryc. 5A i 5B). Poznanie w roślinach motylkowatych wspólnego symbiotycznego szlaku sygnałowego przyczyniło się także do ukierunkowania badań molekularnych prowadzonych na roślinach niemotylkowatych poświęconych endo- i ektomikoryzie oraz bakteryjnej symbiozie aktynoryzowej. Świadczą o tym m.in. wyniki szeregu pojedynczych doniesień dotyczących oddziaływań presymbiotycznych. To dzięki tym badaniom wiemy już dzisiaj, że w oddziaływaniach pomiędzy *L. japonicus* a *Gigaspora margarita* cząsteczką sygnałową produkowaną w korzeniu komonicy jest przypuszczalnie 5-deoksy-strigol stymulujący wzrost i rozgałęzianie strzępek grzyba mikoryzowego [8]. Strigolaktony miałyby zatem pełnić w mikoryzie funkcję podobną do tej, jaką flawonoidy pełnią w symbiozie brodawkowej. Na razie nie wiadomo czy strigolaktony aktywują także biosyntezę czynników mikoryzacji (MycF) – cząsteczek sygnałowych, których synteza w strzępkach grzyba do ubiegłego roku była tylko sugerowana. Dzisiaj już wiadomo, że czynnikiem mikoryzacji produkowanym przez *Glomus intraradices* jest związek typu lipo-chito--oligosacharydu (LCO) podobny do bakteryjnych czynników nodulacji [56]. Wyizolowany Myc-LCO oraz jego siarczanowa pochodna stymulują rozgałęzianie korzeni roślin z różnych grup systematycznych, a w przypadku *M. truncatula* aktywują również mikoryzację [56]. Kolejnym ważnym odkryciem było poznanie w *Parasponia andersonii* genu *PaNFP* kodującego białko z rodziny *Mt*NFP/*Lj*NFR5, które przypuszczalnie współtworzy kompleksy receptorowe wiążące czynnik Nod i czynnik mikoryzacji [72].



RYCINA 5. Wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy regulujący mikoryzę arbuskularną i symbiozę brodawkową (A) oraz oscylacyjne zmiany stężenia jonów wapnia indukowane przez strzępki grzyba mikoryzowego – a lub czynnik nodulacji – b (B). Sygnały pochodzące od receptorów LysM-RLK są integrowane na poziomie receptora LRR-RLK, który następnie aktywuje wspólny szlak sygnałowy. Elementy wspólnego szlaku sygnałowego są zaznaczone pogrubioną czcionką (A). Sygnatura wapniowa indukowana przez strzępki grzyba (a); oscylacje Ca^{2+} indukowane przez czynnik Nod (b) (na podstawie prac [40, 55, 67, 71])

FIGURE 5. The common symbiosis pathway in arbuscular mycorrhiza and root nodule symbiosis (A), and mycorrhizal- or Nod factor-induced calcium oscillations (B). Signals from LysM-RLKs are integrated by symbiosis receptor kinase (LRR-RLK) and transduced through the common symbiotic pathway. Components of common signaling pathway are bolted (A). Fungal-induced calcium signature (a); Nod-factor-induced Ca^{2+} oscillations (b) (based on [40, 55, 67, 71])

Wiele pytań i wątpliwości budzą nadal procesy towarzyszące infekcji bakteryjnej i grzybowej. Przypuszcza się, że infekcja bakteryjna poprzez włośniki korzeniowe wyewoluowała z bardziej pierwotnego sposobu zakażania poprzez pęknięcia lub inne uszkodzenia warstwy epidermalnej korzenia. Taki międzykomórkowy sposób wnikania ryzobiów do głębszych warstw kory występuje powszechnie u *Sesbania rostrata* w warunkach okresowego zalewania wodą. Jednakże, jak pokazują wyniki ostatnich badań, w pewnych warunkach międzykomórkowo infekowane mogą być również inne rośliny motylkowate (ryc. 5A) [10, 67, 71].

Obecnie wiadomo, że w fazie preinfekcyjnej, w cytoplazmie komórek infekowanych dochodzi do szeregu zmian, w tym m.in. do reorganizacji filamentów aktynowych i przemieszczenia jądra w kierunku błony w pobliżu miejsca infekcji. Prowadzi to do utworzenia charakterystycznych preinfekcyjnych struktur pomostowych – w przypadku mikoryzy nazywanych aparatami prepenetracyjnymi [48, 67, 85]. Powstawaniu struktur preinfekcyjnych towarzyszą bardzo wyraźne zmiany w sygnaturze wapniowej infekowanych komórek [85]. Okazuje się, że w fazie preinfekcyjnej brodawkowania i mikoryzacji, częstotliwość oscylacji wapniowych w komórkach, które zostaną zainfekowane jest niewielka [85]. Inaczej jest w przypadku komórek, do których zaczyna wnikać nić infekcyjna z bakteriami lub wrasta wewnątrz aparatu prepenetracyjnego strzępka grzyba. Częstotliwość oscylacji wapniowych w takich komórkach kory jest wyraźnie większa i upodabnia się do oscylacji obserwowanych w nukleoplazmie komórek włośnikowych [40, 64, 83, 86]. Co ciekawe, wraz z „przerośnięciem” nici infekcyjnej lub strzępki grzyba przez analizowaną komórkę, oscylacje wapniowe w nukleoplazmie ulegają częściowemu lub całkowitemu wygaszeniu [85].

W kontekście powyższych obserwacji dodatkowego znaczenia nabierają najnowsze wyniki badań dotyczące mechanizmów rozkodowywania przez CCaMK sygnatury wapniowej [84]. Autorzy wykorzystując szereg nowych mutacji położonych w poszczególnych motywach kinazy *Lj*CCaMK wykazali, że wiązanie Ca^{2+} do motywów EF-hand rzeczywiście prowadzi do autofosforylacji treoniny-265 skutkującej likwidacją wiązania wodorowego pomiędzy jej grupą hydroksykową a resztą argininy-317. Towarzyszące tej przemianie zmiany konformacyjne aktywują *Lj*CCaMK, a w konsekwencji uruchamiają szlak sygnałowy regulujący organogenezę brodawek i infekcję mikoryzową, podczas gdy infekcja bakteryjna miałaby zależeć od interakcji Ca^{2+}/kalmoduliny z *Lj*CCaMK [84].

Kolejnym, interesującym zagadnieniem badawczym jest problem regulacji liczby powstających na korzeniu brodawek. Wiadomo, że regulacja brodawkowania może mieć charakter lokalny, zależny od etylenu i kwasu abscysynowego, ale może także obejmować geny, których ekspresja zachodzi w korzeniu oraz w nadziemnej części rośliny [65, 79]. W autoregulacji systemowej AON (ang. *Autoregulation of Nodulation*) uczestniczą geny aktywowane w korzeniu zainfekowanej rośliny kodujące białka, z których wycinane są 12-14 aminokwasowe peptydy sygnałowe transportowane do nadziemnej części rośliny. W komórkach floemowych liści i pędu peptydy sygnałowe stają się ligandami dla błonowych, serynowo/treoninowych kinaz białkowych z rodziny LRR-RLK. Wiązanie peptydu sygnałowego do receptorowej kinazy białkowej aktywuje szlak/szlaki sygnałowy odpowiedzialny za biosyntezę innej, nieznanej jeszcze cząsteczki sygnałowej, która po przetransportowaniu do korzenia miałaby hamować proces brodawkowania [65,79]. Duże zainteresowanie badaczy problemami regulacji brodawkowania pozwala mieć nadzieję, że poznanie w niedalekiej przyszłości molekularnych podstaw systemowego mechanizmu autoregulacji przyczyni się do zrozumienia mechanizmu bilansowania energetycznego w roślinach motylkowatych.

LITERATURA

[1] ANDRIANKAJA A, BOISSON-DEMIER A, FRANCES L, SAUVIAC L, JAUNEAU A, BARKER DG, DE CARVALHO-NIEBEL F. AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor-dependent Mt *ENOD11* activation in root hairs via a novel *cis*-regulatory motif. *Plant Cell* 2007; **19**: 2866-2885.

[2] ANÉ J-M, KISS GB, RIELY BK, PENMETSA RV, OLDROYD GED, AYAX C, LÉVY J, DEBELLÉ F, BAEK J-M, KALO P, ROSENBERG C, ROE BA, LONG SR, DÉNARIÉ J, COOK DR. *Medicago truncatula DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 2004; **303**: 1364-1367.

[3] ARRIGHI J-F, BARRE A, BEN AMOR B, BERSOULT A, SORIANO LC, MIRABELLA R, DE CARVALHO-NIEBEL F, JOURNET E-P, GHÉRARDI M, HUGUET T, GEURTS R, DÉNARIÉ J, ROUGÉ P, GOUGH C. The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 2006; **142**: 265-279.

[4] ASAMIZU E, SHIMODA Y, KOUCHI H, TABATA S, SATO S. A positive regulatory role for *LjERF1* in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 2008; **147**: 2030-2040.

[5] BANBA M, GUTJAHR C, MIYAO A, HIROCHIKA H, PASZKOWSKI U, KOUCHI H, IMAIZUMI-ANRAKU H. Divergence of evolutionary ways among common *sym* genes: *CASTOR* and *CCaMK* show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol* 2008; **49**: 1659-1671.

[6] BEK AS, SAUER J, THYGESEN MB, DUUS JØ, PETERSEN BO, THIRUP S, JAMES E, JENSEN KJ, STOUGAARD J, RADUTOIU S. Improved characterization of Nod factors and genetically based variation in LysM receptor domains identify amino acids expendable for Nod factor recognition in *Lotus* spp. *Mol Plant-Microbe Interact* 2010; **23**: 58-66.

[7] BEN AMOR B, SHAW SL, OLDROYD GED, MAILLET F, PENMETSA RV, COOK D, LONG SR, DÉNARIÉ J, GOUGH C. The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 2003; **34**: 495-506.

[8] BONFANTE P, REQUENA N. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 451-457.
[9] BORISOV AY, MADSEN LH, TSYGANOV VE, UMEHARA Y, VOROSHILOVA VA, BATAGOV AO, SANDAL N, MORTENSEN A, SCHAUSER L, ELLIS N, TIKHONOVICH IA, STOUGAARD J. The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus. Plant Physiol* 2003; **131**: 1009-1017.
[10] CAPOEN W, OLDROYD G, GOORMACHTIG S, HOLSTERS M. *Sesbania rostrata*: a case of natural variation in legume nodulation. *New Phytol* 2010; **186**: 340-345.
[11] CAPOEN W, SUN J, WYSHAM D, OTEGUI MS, VENKATESHWARAN M, HIRSCH S, MIWA H, DOWNIE JA, MORRIS RJ, ANÉ J-M, OLDROYD GED. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 14348-14353.
[12] CHARPENTIER M, BREDEMEIER R, WANNER G, TAKEDA N, SCHLEIFF E, PARNISKE M. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 2008; **20**: 3467-3479.
[13] CHEN C, FAN C, GAO M, ZHU H. Antiquity and function of *CASTOR* and *POLLUX*, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol* 2009; **149**: 306-317.
[14] COMBIER J-P, FRUGIER F, DE BILLY F, BOUALEM A, EL-YAHYAOUI F, MOREAU S, VERNIÉ T, OTT T, GAMAS P, CRESPI M, NIEBEL A. *MtHAP2-1* is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Gen Dev* 2006; **20**: 3084-3088.
[15] CRESPI M, FRUGIER F. De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci Signal* 2008; **1**: 1-8.
[16] EDWARDS A, HECKMANN AB, YOUSAFZAI F, DUC G, DOWNIE JA. Structural implications of mutations in the pea *SYM8* symbiosis gene, the *DMI1* ortholog, encoding a predicted ion channel. *Mol Plant-Microbe Interact* 2007; **20**: 1183-1191.
[17] ENDRE G, KERESZT A, KEVEI Z, MIHACEA S, KALÓ P, KISS GB. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002; **417**: 962-966.
[18] FEDDERMANN N, REDDY DUVVURU MUNI R, ZEIER T, STUURMAN J, ERCOLIN F, SCHORDERET M, REINHARDT D. The *PAM1* gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *Plant J* 2010; **64**: 470-481.
[19] FERGUSON BJ, INDRASUMUNAR A, HAYASHI S, LIN M-H, LIN Y-H, REID DE, GRESSHOFF PM. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 2010; **52**: 61-76.
[20] FRUGIER F, KOSUTA S, MURRAY JD, CRESPI M, SZCZYGLOWSKI K. Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 115-120.
[21] GHERBI H, MARKMANN K, SVISTOONOFF S, ESTEVAN J, AUTRAN D, GICZEY G, AUGUY F, PÉRET B, LAPLAZE L, FRANCHE C, PARNISKE M, BOGUSZ D. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 4928-4932.
[22] GLEASON C, CHAUDHURI S, YANG T, MUÑOZ A, POOVAIAH BW, OLDROYD GED. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 2006; **441**: 1149-1152.
[23] GROTH M, TAKEDA N, PERRY J, UCHIDA H, DRÄXI S, BRACHMANN A, SATO S, TABATA S, KAWAGUCHI M, WANG TL, PARNISKE M. *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of *Sec13*, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 2010; **22**: 2509-2526.
[24] HANEY CH, LONG SR. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 478-483.
[25] HANEY CH, RIELY BK, TRICOLI DM, COOK DR, EHRHARDT DW, LONG SR. Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3. *Plant Cell* 2011; **23**: 2774-2787.

[26] HAYASHI T, BANBA M, SHIMODA Y, KOUCHI H, HAYASHI M, IMAIZUMI-ANRAKU H. A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* 2010; **63**: 141-154.
[27] HECKMANN AB, LOMBARDO F, MIWA H, PERRY JA, BUNNEWELL S, PARNISKE M, WANG TL, DOWNIE JA. *Lotus japonicus* nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol* 2006; **142**: 1739-1750.
[28] HIRSCH S, KIM J, MUÑOZ A, HECKMANN AB, DOWNIE JA, OLDROYD GED. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 2009; **21**: 545-557.
[29] HOELZ A, DEBLER EW, BLOBEL G. The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 2011; **80**: 613-643.
[30] HORVÁTH B, YEUN LH, DOMONKOS Á, HALÁSZ G, GOBBATO E, AYAYDIN F, MIRÓ K, HIRSCH S, SUN J, TADEGE M, RATET P, MYSORE KS, ANÉ J-M, OLDROYD GED, KALÓ P. *Medicago truncatula IPD3* is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Mol Plant-Microbe Interact* 2011; **24**: 1345-1358.
[31] INDRASUMUNAR A, KERESZT A, SEARLE I, MIYAGI M, LI D, NGUYEN CDT, MEN A, CARROLL BJ, GRESSHOFF PM. Inactivation of duplicated nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Physiol* 2010; **51**: 201-214.
[32] INDRASUMUNAR A, SEARLE I, LIN M-H, KERESZT A, MEN A, CARROLL BJ, GRESSHOFF PM. Nodulation factor receptor kinase 1α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant J* 2011; **65**: 39-50.
[33] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S. Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. *Post Biochem* 1998; **44**: 72-82.
[34] JAKUBOWSKA A, OSTROWSKI M, KOWALCZYK S. Kinazy receptorowe roślin. *Post Biochem* 2007; **53**: 133-142.
[35] KALÓ P, GLEASON C, EDWARDS A, MARSH J, MITRA RM, HIRSCH S, JAKAB J, SIMS S, LONG SR, ROGERS J, KISS GB, DOWNIE JA, OLDROYD GED. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 2005; **308**: 1786-1789.
[36] KANAMORI N, MADSEN LH, RADUTOIU S, FRANTESCU M, QUISTGAARD EMH, MIWA H, DOWNIE JA, JAMES EK, FELLE HH, HAANING LL, JENSEN TH, SATO S, NAKAMURA Y, TABATA S, SANDAL N, STOUGAARD J. A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 359-364.
[37] KEVEI Z, LOUGNON G, MERGAERT P, HORVÁTH GV, KERESZT A, JAYARAMAN D, ZAMAN N, MARCEL F, REGULSKI K, KISS GB, KONDOROSI A, ENDRE G, KONDOROSI E, ANÉ J-M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 2007; **19**: 3974-3989.
[38] KISS E, OLÁH B, KALÓ P, MORALES M, HECKMANN AB, BORBOLA A, LÓZSA A, KONTÁR K, MIDDLETON P, DOWNIE JA, OLDROYD GED, ENDRE G. LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol* 2009; **151**: 1239-1249.
[39] KLAUS-HEISEN D, NURISSO A, PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, MBENGUE M, CAMUT S, TIMMERS T, PICHEREAUX C, ROSSIGNOL M, GADELLA TWJ, IMBERTY A, LEFEBVRE B, CULLIMORE JV. Structure-function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *J Biol Chem* 2011; **286**: 11202-11210.
[40] KOSUTA S, HAZLEDINE S, SUN J, MIWA H, MORRIS RJ, DOWNIE JA, OLDROYD GED. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 9823-9828.
[41] KOSUTA S, HELD M, HOSSAIN MS, MORIERI G, MACGILLIVARY A, JOHANSEN C, ANTOLIN-LLOVERA M, PARNISKE M, OLDROYD GED, DOWNIE AJ, KARAS B, SZCZYGLOWSKI K. *Lotus japonicus symRK-14* uncouples the cortical and epidermal symbiotic program. *Plant J* 2011; **67**: 929-940.

[42] KOUCHI H, IMAIZUMI-ANRAKU H, HAYASHI M, HAKOYAMA T, NAKAGAWA T, UMEHARA Y, SUGANUMA N, KAWAGUCHI M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol* 2010; **51**: 1381-1397.
[43] KOWALCZYK S, HETMANN A. Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Post Biochem* 2003; **49**: 298-318.
[44] KUDLA J, BATISTIČ O, HASHIMOTO K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 2010; **22**: 541-563.
[45] LEFEBVRE B, TIMMERS T, MBENGUE M, MOREAU S, HERVÉ C**,** TÓTH K, BITTENCOURT-SILVESTRE J, KLAUS D, DESLANDES L, GODIARD L, MURRAY JD, UDVARDI MK, RAFFAELE S, MONGRAND S, CULLIMORE J, GAMAS P, NIEBEL A, OTT T. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 2343-2348.
[46] LEGOCKI AB. Ewolucja układów symbiotycznych. *Post Biol Kom* 2009; **36** Suplement: 9-17.
[47] LÉVY 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 Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 2004; **303**: 1361-1364.
[48] LIMA PT, FARIA VG, PATRAQUIM P, RAMOS AC, FEIJÓ JA, SUCENA É. Plant-microbe symbioses: new insights into common roots. *BioEssays* 2009; **31**: 1233-1244.
[49] LIMPENS E, FRANKEN C, SMIT P, WILLEMSE J, BISSELING T, GEURTS R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science* 2003; **302**: 630-633.
[50] LIMPENS E, MIRABELLA R, FEDOROVA E, FRANKEN C, FRANSSEN H, BISSELING T, GEURTS R. Formation of organelle-like N_2-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10375-10380.
[51] LOHMANN GV, SHIMODA Y, NIELSEN MW, JØRGENSEN FG, GROSSMANN C, SANDAL N, SØRENSEN K, THIRUP S, MADSEN LH, TABATA S, SATO S, STOUGAARD J, RADUTOIU S. Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family. *Mol Plan-Microbe Interact* 2010; **23**: 510-521.
[52] ŁOTOCKA B, GOLINOWSKI W. Powstawanie i rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowatych. *Kosmos* 1995; **44**: 569-578.
[53] MADSEN EB, ANTOLIN-LLOVERA M, GROSSMANN C, YE J, VIEWEG S, BROGHAMMER A, KRUSELL L, RADUTOIU S, JENSEN ON, STOUGAARD J, PARNISKE M. Autophosphorylation is essential for the *in vivo* function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* 2011; **65**: 404-417.
[54] MADSEN EB, MADSEN LH, 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**: 637-640.
[55] MADSEN LH, TIRICHINE L, JURKIEWICZ A, SULLIVAN JT, HECKMANN AB, BEK AS, RONSON CW, JAMES EK, STOUGAARD J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus. Nat Commun* 2010; **1**: 1-12.
[56] MAILLET F, POINSOT V, ANDRÉ O, PUECH-PAGÈS V, HAOUY A, GUEUNIER M, CROMER L, GIRAUDET D, FORMEY D, NIEBEL A, MARTINEZ EA, DRIGUEZ H, BÉCARD G, DÉNARIÉ J. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 2011; **469**: 58-64.
[57] MARKMANN K, GICZEY G, PARNISKE M. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol* 2008; **6**: 0497-0506.
[58] MARSH JF, RAKOCEVIC A, MITRA RM, BROCARD L, SUN J, ESCHSTRUTH A, LONG SR, SCHULTZE M, RATET P, OLDROYD GED. *Medicago truncatula NIN* is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 2007; **144**: 324-335.
[59] MBENGUE M, CAMUT S, DE CARVALHO-NIEBEL F, DESLANDES L, FROIDURE S, KLAUS-HEISEN D, MOREAU S, RIVAS S, TIMMERS T, HERVÉ C, CULLIMORE J, LEFEBVRE B. The *Medicago truncatula* E3 ubiquitin ligase PUB1 interacts with the LYK3 symbiotic receptor and negatively regulates infection and nodulation. *Plant Cell* 2010; **22**: 3474-3488.
[60] MCAINSH MR, PITTMAN JK. Shaping the calcium signature. *New Phytol* 2009; **181**: 275-294.

[61] MESSINESE E, MUN J-H, YEUN LH, JAYARAMAN D, ROUGÉ P, BARRE A, LOUGNON G, SCHORNACK S, BONO J-J, COOK DR, ANÉ J-M. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2007; **20**: 912-921.
[62] MIDDLETON PH, JAKAB J, PENMETSA RV, STARKER CG, DOLL J, KALÓ P, PRABHU R, MARSH JF, MITRA RM, KERESZT A, DUDAS B, VANDENBOSCH K, LONG SR, COOK DR, KISS GB, OLDROYD GED. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 2007; **19**: 1221-1234.
[63] MITRA RM, GLEASON CA, EDWARDS A, HADFIELD J, DOWNIE JA, OLDROYD GED, LONG SR. A Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 4701-4705.
[64] MIWA H, SUN J, OLDROYD GED, DOWNIE JA. Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* 2006; **48**: 883-894.
[65] MORTIER V, HOLSTERS M, GOORMACHTIG S. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ* 2011; **35**; 245-258.
[66] MURAKAMI Y, MIWA H, IMAIZUMI-ANRAKU H, KOUCHI H, DOWNIE JA, KAWAGUCHI M, KAWASAKI S. Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Res* 2006; **13**: 255-265.
[67] MURRAY JD. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant-Microbe Interact* 2011; **24**: 631-639.
[68] MURRAY JD, KARAS BJ, SATO S, TABATA S, AMYOT L, SZCZYGLOWSKI K. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 2007; **315**: 101-104.
[69] MURRAY JD, REDDY DUVVURU MUNI R, TORRES-JEREZ I, TANG Y, ALLEN S, ANDRIANKAJA M, LI G, LAXMI A, CHENG X, WEN J, VAUGHAN D, SCHULTZE M, SUN J, CHARPENTIER M, OLDROYD G, TADEGE M, RATET P, MYSORE KS, CHEN R, UDVARDI MK. *Vapyrin*, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula. Plant J* 2011; **65**: 244-252.
[70] 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.
[71] OLDROYD GED, DOWNIE JA. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 519-546.
[72] OP DEN CAMP R, STRENG A, DE MITA S, CAO Q, POLONE E, LIU W, AMMIRAJU JSS, KUDRNA D, WING R, UNTERGASSER A, BISSELING T, GEURTS R. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for Rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* 2011; **331**: 909-912.
[73] OVCHINNIKOVA E, JOURNET E-P, CHABAUD M, COSSON V, RATET P, DUC G, FEDOROVA E, LIU W, OP DEN CAMP R, 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 Interact* 2011; **24**: 1333-1344.
[74] PEITER E, SUN J, HECKMANN AB, VENKATESHWARAN M, RIELY BK, OTEGUI MS, EDWARDS A, FRESHOUR G, HAHN MG, COOK DR, SANDERS D, OLDROYD GED, DOWNIE JA, ANÉ J-M. The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol* 2007; **145**: 192-203.
[75] POPP C, OTT T. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 458-467.
[76] PUMPLIN N, MONDO SJ, TOPP S, STARKER CG, GANTT JS, HARRISON MJ. *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J* 2010; **61**: 482-494.

[77] RADUTOIU S, MADSEN LH, MADSEN EB, FELLE HH, UMEHARA Y, GRØNLUND M, SATO S, NAKAMURA Y, TABATA S, SANDAL N, STOUGAARD J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 2003; **425**: 585-592.
[78] RADUTOIU S, MADSEN LH, MADSEN EB, JURKIEWICZ A, FUKAI E, QUISTGAARD EMH, ALBREKTSEN AS, JAMES EK, THIRUP S, STOUGAARD J. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* 2007; **26**: 3923-3935.
[79] REID DE, FERGUSON BJ, HAYASHI S, LIN Y-H, GRESSHOFF PM. Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann Bot* 2011; **108**: 789-795.
[80] RIELY BK, LOUGNON G, ANÉ J-M, COOK DR. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J* 2007; **49**: 208-216.
[81] 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 JA, 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.
[82] SATHYANARAYANAN PV, SIEMS WF, JONES JP, POOVAIAH BW. Calcium-stimulated autophosphorylation site of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 32940-32947.
[83] SHAW SL, LONG SR. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* 2003; **131**: 976-984.
[84] SHIMODA Y, HAN L, YAMAZAKI T, SUZUKI R, HAYASHI M, IMAIZUMI-ANRAKU H. Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin-dependent protein kinase in *Lotus japonicus. Plant Cell* 2012; **24**: 304-321.
[85] SIEBERER BJ, CHABAUD M, FOURNIER J, TIMMERS ACJ, BARKER DG. A switch in Ca^{2+} spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula. Plant J* 2012; **69**: 822-830.
[86] SIEBERER BJ, CHABAUD M, TIMMERS AC, MONIN A, FOURNIER J, BARKER DG. A nuclear-targeted cameleon demonstrates intranuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol* 2009; **151**: 1197-1206.
[87] SMIT P, LIMPENS E, GEURTS R, FEDOROVA E, DOLGIKH E, GOUGH C, BISSELING T. Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* 2007; **145**: 183-191.
[88] SMIT P, RAEDTS J, PORTYANKO V, DEBELLÉ 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.
[89] STRACKE S, KISTNER C, YOSHIDA S, MULDER L, SATO S, KANEKO T, TABATA S, SANDAL N, STOUGAARD J, SZCZYGLOWSKI K, PARNISKE M. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 2002; **417**: 959-962.
[90] TIRICHINE L, IMAIZUMI-ANRAKU H, YOSHIDA S, MURAKAMI Y, MADSEN LH, MIWA H, NAKAGAWA T, SANDAL N, ALBREKTSEN AS, KAWAGUCHI M, DOWNIE A, SATO S, TABATA S, KOUCHI H, PARNISKE M, KAWASAKI S, STOUGAARD J. Deregulation of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 2006; **441**: 1153-1156.
[91] TIRICHINE L, SANDAL N, MADSEN LH, RADUTOIU S, ALBREKTSEN AS, SATO S, ASAMIZU E, TABATA S, STOUGAARD J. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 2007; **315**: 104-107.
[92] WAIS RJ, GALERA C, OLDROYD G, CATOIRA R, PENMETSA RV, COOK D, GOUGH C, DÉNARIÉ J, LONG SR. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13407-13412.
[93] WALKER SA, VIPREY V, DOWNIE JA. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13413-13418.
[94] YANO K, SHIBATA S, CHEN W-L, SATO S, KANEKO T, JURKIEWICZ A, SANDAL N, BANBA M, IMAIZUMI-ANRAKU H, KOJIMA T, OHTOMO R, SZCZYGLOWSKI K,

STOUGAARD J, TABATA S, HAYASHI M, KOUCHI H, UMEHARA Y. CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J* 2009; **60**: 168-180.

[95] YANO K, YOSHIDA S, MÜLLER J, SINGH S, BANBA M, VICKERS K, MARKMANN K, WHITE C, SCHULLER B, SATO S, ASAMIZU E, TABATA S, MUROOKA Y, PERRY J, WANG TL, KAWAGUCHI M, IMAIZUMI-ANRAKU H, HAYASHI M, PARNISKE M. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 20540-20545.

[96] YOKOTA K, FUKAI E, MADSEN LH, JURKIEWICZ A, RUEDA P, RADUTOIU S, HELD M, HOSSAIN MS, SZCZYGLOWSKI K, MORIERI G, OLDROYD GED, DOWNIE JA, NIELSEN MW, RUSEK AM, SATO S, TABATA S, JAMES EK, OYAIZU H, SANDAL N, STOUGAARD J. Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* 2009; **21**: 267-284.

[97] YOSHIDA S, PARNISKE M. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 9203-9209.

[98] ZHANG X-C, WU X, FINDLEY S, WAN J, LIBAULT M, NGUYEN HT, CANNON SB, STACEY G. Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol* 2007; **144**: 623-636.

[99] ZHU H, CHEN T, ZHU M, FANG Q, KANG H, HONG Z, ZHANG Z. A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 2008; **148**: 337-347

[100] ZHUKOV V, RADUTOIU S, MADSEN LH, 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 Interact* 2008; **21**: 1600-1608.

Redaktor prowadzący – A. Kononowicz

Otrzymano: 10.04.2012
Przyjęto: 19.07.2012
Izabela Tylman
Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet im. M. Kopernika
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
tel:. 0 56 61 14 542
e-mail: izabela.tylman@wp.pl