

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К.А. ТИМИРЯЗЕВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Ломин Сергей Николаевич

**Свойства, функционирование и эволюция
рецепторов цитокининов**

1.5.21 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание учёной
степени доктора биологических
наук

Научный консультант:

д.б.н., профессор, Романов Георгий Александрович

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Цитокининовый сигналинг: многоступенчатый фосфатный каскад	20
1.2 Рецепторные гистидинкиназы	21
1.3 Передача сигнала: фосфотрансмиттерные белки	23
1.4 Регуляторы ответа	24
1.5 Регуляторы ответа типа В	25
1.6 Регуляторы ответа типа А	26
1.7 CRF (Cytokinin Response Factors)	27
1.8 Биосинтез и метаболизм цитокининов	28
1.9 Транспорт цитокининов	30
1.10 Связь цитокининового сигналинга с обменом азота и углерода	32
1.11 Различная роль <i>tZ</i> и его предшественника (<i>tZR</i>) при дальнем транспорте цитокининов по ксилеме	35
1.12 Побеговые цитокинины в регуляции образования азотфиксирующих клубеньков у бобовых	36
1.13 Взаимодействие ауксина и цитокинина в корнях	36
1.13.1 Формирование и поддержание апикальной меристемы корня	36
1.13.2 Анатомическое строение корня	38
1.13.3 Архитектура корня	39
1.14 Взаимодействие ауксина и цитокинина в побеге	40
1.14.1 Организации и поддержания работы побеговой апикальной меристемы	40
1.14.2 Формирование SAM в культуре тканей	43
1.14.3 Органогенез и филлотаксис	45
1.14.4 Развитие гинеция и женского гаметофита	47
1.15 Цитокинины и абиотический стресс	48

1.15.1 Осмотический стресс: засуха и соль	50
1.15.2 Низкотемпературный стресс	50
1.15.3 Фотоокислительный стресс	51
1.15.4 Взаимодействие между АБК и цитокининовым сигналингом	51
1.16 Цитокинины и биотический стресс	52
1.16.1 Взаимодействие цитокининов с салициловой кислотой	52
1.16.2 Взаимодействие цитокининов с жасмонатным путем устойчивости	53
1.17 Происхождения цитокининовой TCS	54
1.18 СНК у других групп живых организмов	55
1.19 Роль цитокининового сигналинга у мохообразных	57
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	59
2.1 Методы рекомбинантной ДНК	60
2.2 Выделение бактериальных сферопластов	67
2.3 Транзиентная экспрессия генов рецепторов в растениях табака	67
2.4 Растительный материал и условия роста	69
2.5 Трансформация растений	69
2.6 Выделение микросомальной фракции растительных мембран	70
2.7 Фракционирование мембран при анализе субклеточной локализации рецепторов кукурузы	70
2.8 Фракционирование мембран при анализе локализации рецепторов арабидопсиса	72
2.9 Выделение митохондрий	74
2.10 Выделение хлоропластов	74
2.11 Выделение ядер	75
2.12 Радиолигандный метод для изучения связывания гормонов	76
2.13 Математические и статистические методы	77
2.14 Анализ экспрессии генов у арабидопсиса	78
2.15 Анализ экспрессии генов у картофеля	78
2.16 Измерение активности GUS	79

2.17 Моноклональные антитела против ZmHK1	79
2.18 Иммуноблоттинг в экспериментах по анализу локализации рецепторов кукурузы	80
2.19 Иммуноблоттинг в экспериментах по анализу локализации рецепторов арабидопсиса	80
2.20 Мембранные маркеры и использованные антитела	81
2.21 Оценка функциональности рецепторов	82
2.22 Метод защиты от протеазы	82
2.23 Эксперимент по фосфотрансферу АНК-АНР	83
2.24 Методы биоинформатики	84
2.24.1 Анализ последовательностей при характеристике цитокининовой системы картофеля	84
2.24.2 Анализ промоторов	85
2.24.3 Поиск последовательностей рецепторов за пределами группы цветковых растений	86
2.24.4 Структурное моделирование по гомологии	87
2.24.5 Оптимизация, валидация и модификация структуры	88
2.24.6 Исследование свойств интерфейса	88
2.24.7 Окрашивание поверхности	90
2.24.8 Докинг белок-белок	90
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	91
3.1. Структура сенсорной области рецепторов цитокининов	91
3.1.1 Сенсорные модули цитокининовых рецепторов	92
3.1.2 Фланкирующие области домена CHASE	100
3.1.3 К вопросу о механизме активации рецептора	108
3.1.4 Обсуждение к части 3.1	110
3.2 Лиганд-связывающие свойства рецепторов цитокининов	113
3.2.1 Зависимость связывания цитокинина от условий среды	113
3.2.2 Лигандная специфичность рецепторов	118

3.2.3	Взаимодействие рецепторов с рибозидами цитокининов_____	120
3.2.4	Исследование полноразмерного рецептора АНК2_____	123
3.2.5	Анализ работы цитокининовых рецепторов арабидопсиса <i>in planta</i> _____	125
3.2.6	Лиганд-связывающие свойства рецепторов кукурузы_____	128
3.2.7	Восприятие цитокининов у картофеля_____	131
3.2.7.1	Анализ генома моноплоидного картофеля Phureja_____	131
3.2.7.2	Экспериментальные исследования на автотетраплоидном картофеле сорта Дезире_____	139
3.2.7.3	Лигандная специфичность рецепторов цитокинина картофеля_____	140
3.2.7.4	Характер экспрессии StНК <i>in planta</i> _____	146
3.2.8	Обсуждение к части 3.2_____	151
3.2.8.1	Лиганд связывающие свойства рецепторов цитоткининов_____	151
3.2.8.2	Цитокининовые рецепторы картофеля_____	158
3.3	Установление субклеточной локализации рецепторов цитокининов _____	160
3.3.1	Анализ субклеточной локализации рецепторов цитокининов кукурузы_____	160
3.3.1.1	Анализ связывания лигандов с мембранными фракциями кукурузы_____	161
3.3.1.2	Видимое сродство цитокининов к микросомам листьев и корней_____	163
3.3.1.3	Субклеточная локализация ZmНК1-GFP в протопластах кукурузы_____	164
3.3.1.4	Иммунологическая детекция ZmНК1 с помощью моноклональных антител_____	166
3.3.1.5	Субклеточное фракционирование с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы_____	166
3.3.2	Анализ субклеточной локализации рецепторов цитокининов арабидопсиса_____	170
3.3.2.1	Эндомембраны демонстрируют более высокое связывание цитокинина, чем ПМ_____	170
3.3.2.2	Рецепторы цитокинина, меченые флуоресцентными белками, демонстрируют преимущественную локализацию в ЭР_____	173

3.3.2.3 Биохимическое фракционирование подтверждает ЭР-локализацию рецепторов цитокинина_____	176
3.3.3 Субклеточная локализация рецепторов картофеля_____	181
3.3.4 Новый подход для количественной оценки разделения мембранных белков между различными клеточными мембранами_____	186
3.3.4.1 Метод для пересчета_____	187
3.3.4.2 Конкретные примеры применения алгоритма пересчета_____	189
3.3.5 Определение функциональности рецепторов из различных мембран растительной клетки_____	193
3.3.5.1 Исследования взаимодействия цитокининовых рецепторов и фосфотрансмиттеров_____	193
3.3.5.2 Цитокининовые рецепторы, расположенные в ЭР, образуют димеры_____	197
3.3.5.3 Топология рецептора в ЭР благоприятна для передачи сигнала_____	200
3.3.5.4 Цитокининовые рецепторы, расположенные в ЭР, активны в фосфотрансфере АНК-АНР <i>in vitro</i> _____	202
3.3.6 Обсуждение к части 3.3_____	204
3.4 Моделирование белок-белковых взаимодействий в сигнальной трансдукции цитокинина_____	229
3.4.1 Интерфейсы димеризации сенсорного модуля_____	229
3.4.2 Взаимодействия рецептор-фосфотрансмиттер_____	235
3.4.3 Влияние фосфорилирования на взаимодействие НКrd-HPt_____	240
3.5 Эволюционное становление рецепторного аппарата цитокининов_____	242
3.5.1 Древние СНК-рецепторы в сравнительном и эволюционном аспектах_____	244
3.5.2 Лигандсвязывающие свойства СНК-рецепторов из раннодивергировавших растений_____	252
3.5.3 Новый подход к определению K_D в экспериментах по конкуренции_____	259
3.5.4 Обсуждение к части 3.5_____	262
ВЫВОДЫ_____	270
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ_____	273

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

a. o. (aa) – аминокислотные остатки

RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions) – наименьшее среднеквадратическое отклонение между структурами, полученное в результате структурного выравнивания и совмещения наборов координат атомов. RMSD указывает на степень расхождения выравниваемых структур.

Ade – аденин

ASA – accessible surface area

BA - N6-бензиламинопуридин

BiFC – бимолекулярная флуоресцентная комплементация

BSA – buried surface area

CHASE - Cyclase/Histidine kinase-Associated SEnsing Extracellular

DMAPP – диметилаллилпирофосфат

DMSO – диметилсульфоксид

DZ - дигидрозеатин

E. coli – *Escherichia coli*

FAD – флавинадениндинуклеотид

GFP – зелёный флуоресцирующий белок

HisKA / CAD – гистидинкиназный домен

HK – гистидинкиназа

HP (HPt) – фосфотрансмиттер

iP - изопентениладенин

iPR – N6-(Δ^2 -изопентенил)аденинрибозид

ИПТГ (IPTG) – изопропилтиогалактозид

Kin – кинетин

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

PDB – Protein Data Bank, банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот.

PDB ID: идентификационный номер структуры в PDB.

PMSF – фенилметансульфонилфторид

SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия

SM – сенсорный модуль

TD - тидиазурон

tZ* – *транс*-[2-³H]зеатин

tZR – *транс*-зеатинрибозид

WT – дикий тип

YFP – желтый флюоресцирующий белок

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотрейтол

ПМ (PM) – плазматическая мембрана

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

тРНК – транспортная РНК

ЦК (СК) – цитокинин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭР (ER) – эндоплазматический ретикулум

REC – ресиверный домен

RR – регулятор ответа

RR-A (RRA) – регулятор ответа типа А

RR-B (RRB) – регулятор ответа типа В

ETR – этиленовый рецептор

CKI - Cytokinin Independent, один из типов гистидинкиназ не являющихся рецепторами цитокининов

MSP – multistep-phosphorelay system, система многоступенчатого фосфопереноса, являющаяся сигнальной системой цитокининов

ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины (ЦК) являются классическими фитогормонами широкого спектра действия. Они вовлечены в такие процессы, как стимуляция клеточного деления, клеточная пролиферация в апикальной меристеме побега, ингибирование роста корней, клубнеобразование, формирование клубеньков у бобовых, кроме того, ЦК участвуют в защите растений от биотических и абиотических неблагоприятных факторов и выполняют еще целый ряд функций в растительном организме (Romanov, 2009; Kieber & Schaller, 2014). Сигналинг ЦК осуществляется по His-Asp пути, с использованием т.н. Системы многоступенчатого фосфопереноса (MSP) - модифицированной прокариотической двухкомпонентной системы (TCS). Сигнальная система цитокининов состоит из трех основных типов белков: рецепторов ЦК – сенсорных гистидинкиназ (HK), фосфотрансмиттеров (HPt) и регуляторов ответа типа-B (RR-B).

К началу нашей работы многие аспекты, связанные с восприятием цитокининового сигнала, не были известны. Важным этапом была публикация пространственной структуры сенсорного модуля АНК4 (Hothorn et al., 2011). Это дало возможность детально исследовать структуру сенсорной области рецепторов цитокининов. Благодаря расшифровке геномов большого числа видов растений появилась возможность проводить данные исследования в сравнительном ключе. Выявить общие закономерности и ключевые отличия между различными группами рецепторов.

Исследования лиганд-связывающих свойств рецепторов были выполнены при экспрессии индивидуальных рецепторов в гетерологичных системах (Romanov et al., 2005; 2006). Это не дает абсолютной гарантии сохранения выявленных особенностей при работе этих белков в растении. Соответственно, требовалось провести исследования в гомологичной системе, максимально приближенной к естественной. К тому же имелось некоторое противоречие в особенностях восприятия цитокинового сигнала. Так, в гетерологичных системах рецепторы

высокоаффинно связывали рибозиды цитокининов (Spichal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004; Romanov et al., 2006). Но при этом при исследовании синтеза цитокининов была показана важнейшая роль цитокининовых оснований (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009).

Не было ясности в расположении внутриклеточного сайта восприятия цитокининового сигнала. Ряд исследований указывали на локализацию рецепторов в плазматической мембране (Müller & Sheen, 2001; Kim et al., 2001). В то же время результаты анализа лиганд-связывающих свойств (рН – зависимость) указывали на внутриклеточную локализацию (Romanov et al., 2005; 2006). При этом рецепторы этилена, другие гистидинкиназные сенсорные белки, локализованы в клетке в эндоплазматическом ретикулуме (Chen et al., 2001). Тем самым, для идентификации данного сайта требовались специальные эксперименты. Рецепторы для своего функционирования должны образовывать димеры. В принципе могут образовываться как гомо- так и гетеродимеры. Знание об этом должно заметно дополнить картину восприятия сигнала.

Ко всему прочему, были расшифрованы геномы нескольких растений из групп, не принадлежащих цветковым растениям. Это дало возможность исследовать свойства рецепторных аппаратов растений в эволюционном ключе. В совокупности с анализом всей цитокининовой системы биоинформатическими методами появилась возможность проследить ее эволюционное становление.

Прояснение обозначенных выше вопросов важно для понимания молекулярных механизмов цитокининового сигналинга, что свидетельствует об актуальности и значимости проблемы, которой посвящено настоящее исследование.

Цель и задачи исследования

Цель работы: комплексно исследовать свойства рецепторов ЦК, особенности организации рецепторного аппарата в клетке растения, в том числе в контексте его эволюционного становления.

Задачи:

1. - Исследовать структуру сенсорных модулей рецепторов ЦК растений из различных групп;
2. - Охарактеризовать лиганд-связывающие свойства рецепторов ЦК в экспериментальной системе, максимально приближенной к естественным условиям растительной клетки;
3. - Установить место инициации цитокининового сигнала в клетке;
4. - На основе изучения свойств рецепторов ЦК растений за пределами группы покрытосеменных проследить эволюционный путь становления рецепторного аппарата этого гормона.

Научная новизна работы

Впервые исследована структура сенсорных модулей рецепторов цитокининов из различных групп. В частности, выявлен высоко-консервативный участок, предшествующий CHASE-домену. Доказано, что рецепторы с высокой аффинностью взаимодействуют только с основаниями цитокининов. По лигандной специфичности рецепторы образуют группы, которые хорошо соответствуют их филогенетическому положению. Впервые были клонированы и изучены рецепторы картофеля. В работе установлено, что рецепторы в основном локализируются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и, в меньшей степени, в плазмалемме. Различными способами продемонстрирована функциональность ЭР-пула рецепторов. Впервые охарактеризованы лиганд-связывающие свойства рецепторов из раннедивергировавших групп растений. При этом рецепторы из плауновых (селагинеллы) и голосеменных (ели) были исследованы впервые. Установлено, что цитокинин-связывающими свойствами обладают только канонические рецепторы. С учетом этих данных была предложена обновленная версия эволюционного становления цитокининовой системы у наземных растений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Объектом исследования являлись белки сигналинга цитокининов многих видов растений - *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Picea abies*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrium patens*. Цитокинины являются одними из

важнейших регуляторов клубнеобразования у картофеля на разных стадиях и факторами урожайности у кукурузы. В частности, цитокинины являются прямыми позитивными регуляторами клубнеобразования на стадиях индукции, инициации образования клубней и их прорастания. Это делает изучение молекулярных механизмов цитокининового сигналинга не только важной задачей фундаментальной науки, но и открывает перспективы использования полученных знаний в прикладных областях биологии, таких как картофелеводство и выращивание злаковых культур.

Методология диссертационного исследования

При выполнении работы использовались три разных методологических подхода: *in vivo (in planta)*, *in vitro* и *in silico*. Исследования *in planta* (в частности BiFC) позволили изучить белок-белковые взаимодействия в гетерологичной системе, в то время как эксперименты *in vitro* (радиолигандный метод и др.) дают возможность большего контроля над объектами исследования, обладают большей точностью и исключают случайное влияние среды на взаимодействия. Методы *in silico*, применяемые в данной работе, такие, как молекулярное моделирование и филогенетический анализ, служат основой для новых экспериментов, выполняя прогностическую функцию.

Положения, выносимые на защиту:

- В ходе проведенного биоинформатического анализа более сотни рецепторов цитокининов покрытосеменных для групп НК2, НК3, НК4 и всех СНК были определены среднестатистические размеры структурных компонентов типичного сенсорного модуля рецептора и установлены консенсусные последовательности его CHASE домена.

- В результате анализа прилегающих к CHASE-домени последовательностей выявлена высококонсервативная область длиной ~ 40 аминокислот в форме α -спирали, непосредственно предшествующей CHASE-домени и входящей в димеризационный интерфейс. Также обнаружена короткая (~ 10 аминокислот)

консервативная последовательность между С-концом CHASE домена и замыкающим сенсорный модуль "правым" (downstream) трансмембранным доменом.

- Число предшествующих CHASE-домену "левых" (upstream) трансмембранных доменов у рецепторов различается и зависит от группы. В группе НК2 их, как правило, 3-4, в группе НК4 – обычно 1, у ортологов НК3 однодольных – также 1, тогда как у ортологов двудольных – 2.

- Разработан метод для анализа лиганд-связывающих свойств рецепторов на основе микросомальной фракции мембран из листьев табака *Nicotiana benthamiana*, в которых гены индивидуальных рецепторов были транзientно экспрессированы. Анализ в подобной гомологичной системе наиболее близок к естественному среди всех ранее использованных тест-систем.

- Установлено, что рецепторы различных видов растений связывают природные цитокинины (*транс*-зеатин, изопентениладенин) высокоаффинно с константами диссоциации, лежащими в наномолярном диапазоне. Сродство рецепторов к *цис*-зеатину и дигидрозеатину, как правило, существенно слабее.

- Высокоаффинное связывание лиганд-рецептор наблюдается только для оснований цитокининов, но не для их рибозидов. Тем самым, впервые напрямую показано, что только основания, но не рибопроизводные, являются активными цитокининами.

- Рецепторы цитокининов обладают выраженной лигандной специфичностью, в том числе к природным цитокининам. Анализ свойств рецепторов растений из разных групп цветковых растений показал, что представители групп НК2 и НК4 имеют, как правило, сходную аффинность к *транс*-зеатину и изопентениладенину, тогда как представители группы НК3 явно предпочитают *транс*-зеатин. Особняком стоит рецептор кукурузы ZmНК1 (группа НК4), который является выраженным

изопентениладениновым рецептором и при этом связывает *цис*-зеатин с тем же сродством, что и *транс*-зеатин.

- рН-зависимость рецепторов характеризуется заметным уменьшением связывания при значениях рН ниже 7, что предполагает ослабление связывания цитокининов в кислом содержимом апопласта клеток.

- Биоинформатический анализ показал, что способность рецепторов к димеризации на уровне сенсорных модулей также уменьшается при кислых значениях рН.

- На основе комплексного анализа субклеточной локализации рецепторов цитокининов арабидопсиса, картофеля и кукурузы установлено, что рецепторы цитокининов преимущественно локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулула, а не плазмалеммы. Среди органелл митохондрии и хлоропласты цитокинины не связывают, что предполагает отсутствие в них рецепторов цитокининов.

- В серии различных экспериментов установлено, что рецепторы в эндоплазматическом ретикулуме являются функциональными. Соответственно, эндоплазматический ретикулум может быть основным местом инициации цитокининового сигнала в клетке.

- Компьютерный анализ *in silico* взаимодействия ресиверного домена фосфотрансмиттера показал важность фосфорилирования соответствующих аминокислот, аспартата и гистидина, соответственно. При этом показано, что термодинамически выгодно передавать фосфат в системе именно в прямом направлении, от рецептора к фосфотрансмиттеру.

- Филогенетический анализ рецепторов всех доступных отделов высших растений показал, что разделение на группы НК2/3 и НК4 существует только у

семенных растений. У эволюционно более древних таксонов рецепторы образуют свои специфичные группы.

- Выскокоаффинное связывание цитокининов характерно только для канонических рецепторов и не наблюдается у представителей сестринской группы PpСНК, сохранившейся у мохообразных. Не исключено, что белки группы PpСНК способны генерировать цитокинин-подобный сигнал в отсутствие гормона.

- Канонические рецепторы мохообразного *Physcomitrium patens* специфичны к изопентениладенину.

- Активнее других природных цитокининов *транс*-зеатин связывается только у сосудистых растений. Это согласуется с эволюцией пути биосинтеза этого гормона. Причем специализация рецепторов к отдельным цитокининам нарастает по мере движения в направлении покрытосеменных растений.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя заключается в анализе данных литературы, планировании экспериментов, их постановке, обработке полученных экспериментальных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций. Основные результаты получены непосредственно автором, включая клонирование генов, анализ лиганд-связывающих свойств рецепторов, исследования методами ViFC, иммуноблоттинга, биоинформатические подходы.

Степень достоверности работы

Все эксперименты были проведены многократно. Достоверность результатов была подтверждена их воспроизводимостью, а также статистической обработкой данных и результатами независимых исследований другими авторами. Представленные в работе структуры, полученные методом молекулярного моделирования, прошли многоступенчатую проверку с использованием независимых сервисов и программ. При этом были получены однотипные

результаты. Практически все результаты опубликованы в научных рецензируемых изданиях.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на целом ряде конференций:

Съезды общества физиологов растений России в 2011, 2015, 2019 гг. В 2015 году был сделан пленарный доклад.

Международные конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино) в 2009, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019 гг.

International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology, Москва, 2014 г.

VI Всероссийский симпозиум «ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, 2016 г.

8th International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'17), Москва, 2017 г.

Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» - 2018 г. Был сделан пленарный доклад.

4th International Symposium Plant Signaling and Behavior в 2015 г.

Botanikertagung 2011 «Diversity makes the difference» (Берлин) в 2011 г.

ACPD - “Auxins and Cytokinins in Plant Development” (Прага, Чешская республика) в 2014 и 2018 гг.

45th FEBS Congress, entitled “Molecules of Life: Towards New Horizons” в 2021 г.

Связь с научными программами

Работа выполнялась в 2012-2020 гг. в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) по теме: «Молекулярные основы регуляции онтогенеза растений: роль систем гормонального сигналинга» (номер государственной регистрации 01201055721).

Исследования автора поддержаны грантами РФФИ: № 12-04-33282 «Регуляторная система цитокининов: исследование рецепции и инициации внутриклеточной трансдукции сигнала» (руководитель), № 14-04-01714 «Цитокининовая сигнальная система и ее участие в адаптивных реакциях растений» (исполнитель), № 16-04-01502 «Исследование эволюционного становления системы восприятия цитокининового сигнала у высших растений» (руководитель), № 16-34-01065 «Структурные особенности взаимодействующих белков системы трансдукции цитокининового сигнала» (исполнитель), 19-04-01106 «Цитокининовая система голосеменных растений» (руководитель), № 20-04-00797 «Исследование взаимозависимости сигналинга цитокининов и рН внутренней среды растительной клетки» (исполнитель), а также грантами РФФИ: № 14-14-01095 «Молекулярные основы гормональной регуляции морфогенеза, продуктивности и устойчивости растений картофеля» (исполнитель), № 17-74-20181 «Исследование эндогенных систем регуляции клубнеобразования с целью повышения продуктивности картофеля» (руководитель).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 100 работ, из которых 20 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура диссертации

Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список использованной литературы. Работа изложена на 328 страницах машинописного текста, включает 75 рисунков и 20 таблиц. Список литературы включает 487 наименований, все на английском языке.

4. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Цитокинины были открыты в ходе поиска факторов, способствующих пролиферации клеток в культуре совместно со вторым фитогормоном - ауксином. Так был обнаружен первый синтетический цитокинин кинетин (Miller et al., 1955, 1956). Последующие исследования выявили эндогенный цитокинин, названный зеатином (Letham, 1965). С тех пор было установлено, что цитокинины связаны с многочисленными аспектами роста и развития растений (Kieber and Schaller, 2014; Mok and Mok, 1994).

Цитокинины существуют в нескольких различных молекулярных формах. Природные цитокинины представляют собой N6-замещенные производные аденина, которые различаются структурами своих боковых групп (рис. 1). Почти все организмы производят цитокинины; например, изопентенильные производные аденина находятся рядом с антикодоновой петлей подмножества тРНК у большинства эукариот и бактерий (Persson et al., 1994). При этом биологическая активность цитокинина сильно зависит от их природы. Наиболее часто встречающимися цитокининами являются *транс*-зеатин (*tZ*), изопентениладенин (*iP*), *цис*-зеатин (*cZ*) и дигидрозеатин (*DZ*). *Цис*-изомер, *cZ*, является менее активной формой, чем *tZ*, и слабо проявляет себя в биологических тестах, но он может иметь первостепенное значение в определенных органах или некоторых видах растений, например, в таких как кукуруза и рис (Mok & Mok, 2001, Kudo et al., 2012, Veach et al., 2003; Gajdošová et al., 2011). Существует также множество синтетических цитокининов, включая как соединения на основе аденина, такие как кинетин, так и фенилмочевины (рис. 1), в частности N-фенил-N'-(2-хлор-4-пиридил) мочевины (CPPU) и тидиазурон (TD), которые могут использоваться в качестве мощных гербицидов. Фенилмочевины в природе пока не обнаружены (Sakakibara, 2006). Были обнаружены природные формы цитокининов с ароматическим остатком. Но они едва ли являются универсальными цитокининами,

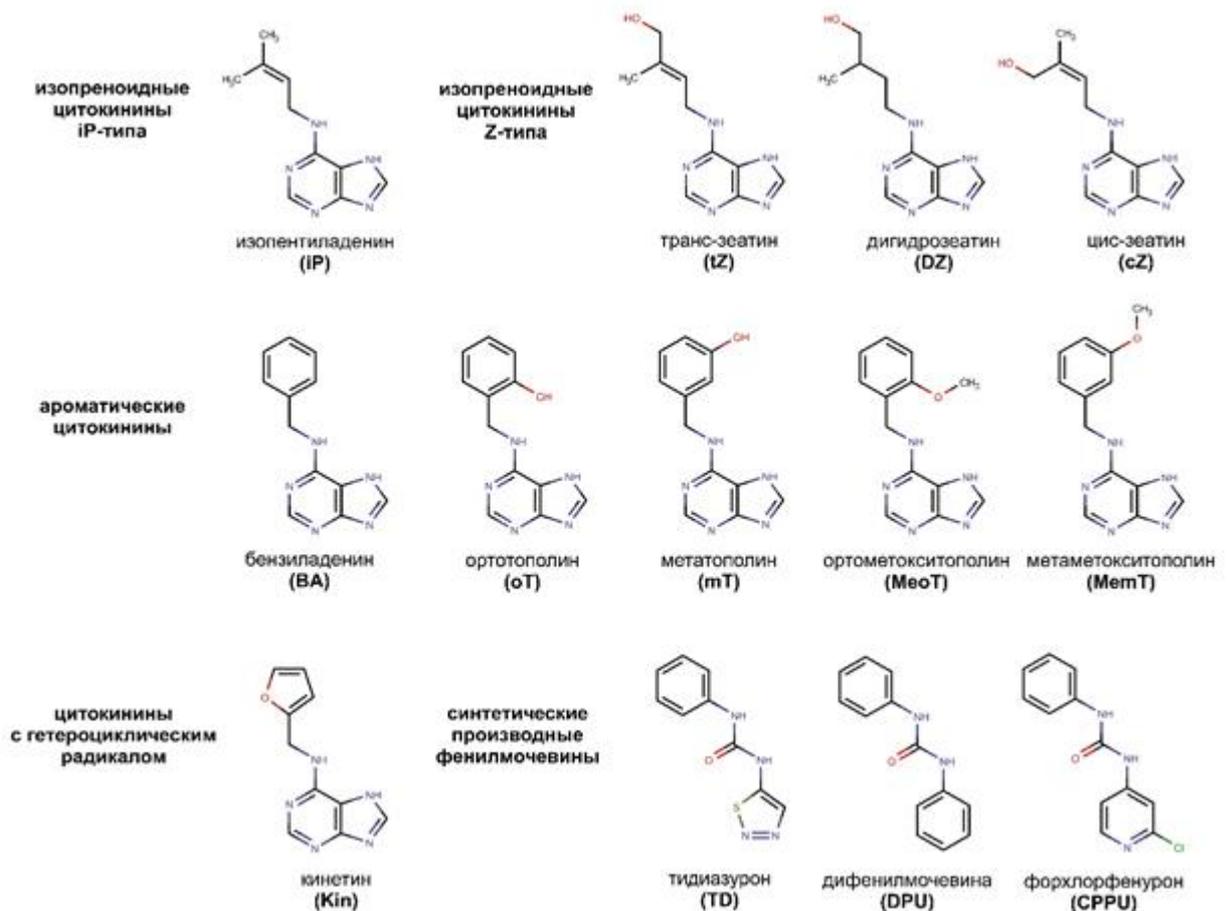


Рис. 1. Структуры природных и синтетических цитокининов.

так как найдены только в нескольких видах растений, и они, как правило, присутствуют в очень малых количествах (Sakakibara, 2006).

Биологическая активность цитокининов напрямую связана со способностью молекулы связываться с цитокининовыми рецепторами. В работе Nothorn et al. (Nothorn et al., 2011), представлена кристаллическая структура цитокининового рецептора АНК4 арабидопсиса и связывание различных цитокининов на основе аденина, а TD на основе фенилмочевины. Белково-рецепторный связывающий карман для цитокинина состоит в основном из неполярных аминокислот, при этом несколько полярных остатков способствуют стабилизации молекулы, такие как аспартат 262, который образует водородные связи с адениновым кольцом (Nothorn et al., 2011). При связывании *tZ* дополнительная водородная связь образуется с треонином 294 и гидроксильным кислородом на замещенной изопреноидной боковой цепи, образуя более стабильное соединение, и, вероятно, именно это

является причиной того, что *tZ* является наиболее биологически активной формой цитокинина. Молекулы воды в активном сайте также служат для стабилизации цитокинина, взаимодействуя как с ним, так и с другими аминокислотными остатками, которые находятся слишком далеко, чтобы связываться непосредственно с самим цитокинином. В TD фенольная часть молекулы ведет себя очень похоже на адениновое кольцо и стабилизируется тем же остатком аспартата 262.

1.1 Цитокининовый сигналинг: многоступенчатый фосфатный каскад

Более 20 лет назад один из первых генов, участвующих в осуществлении цитокининового сигналинга, был клонирован и идентифицирован как гистидинкиназа, которая была очень похожа на сенсорные гистидинкиназы прокариот (Kakimoto, 1996). Позже было обнаружено, что гены регуляторов ответа могут реагировать на добавление цитокинина увеличением своей экспрессии (Brandstatter & Kieber, 1998). Стало понятно, что цитокининовый сигналинг основывается на двухкомпонентной модели (рис. 2). У бактерий двухкомпонентный путь обычно состоит из рецептора гистидинкиназы (НК), который воспринимает сигнал, и белка-регулятора ответа (RR), который опосредует ответ на сигнал (Rowland et al., 2014, Stock et al., 2000). Рецепторная НК - это трансмембранный белок, который существует в виде гомодимера. На одной стороне мембраны находится сенсорный домен, где происходит восприятие сигнала окружающей среды, после чего происходит активация АТФ-зависимой реакции на другой стороне мембраны. Одна гистидинкиназа катализирует фосфорилирование консервативного остатка гистидина на другой молекуле гистидинкиназы в димере. Затем этот фосфат передается на консервативный аспартат в ресиверном домене белка RR (Stock et al., 2000). Активированный белок RR затем получает возможность работать определенным образом в этом сигнальном пути; например, индуцируя или репрессировав гены как фактор транскрипции.

Цитокининовый сигнальный путь функционирует как модифицированная бактериальная двухкомпонентная система, но с рядом явных отличий, которые во многом связаны с необходимостью передавать сигнал в ядро. Цитокининовые

рецепторы - это CHASE-домен содержащие гибридные гистидинкиназы (CHK), которые содержат как НК-домен, так и ресиверный домен (рис. 2). Когда цитокинин связывается с рецептором, гистидинкиназный домен активируется и автофосфорилируется, а фосфат передается от консервативного остатка гистидина к консервативному остатку аспартата, расположенному в ресиверном домене молекулы. Фосфорилирование продолжается, и фосфат передается новому компоненту пути, гистидин-фосфотрансферному белку (HPt), который перемещается в ядро, где расположены RR. Оказавшись в ядре, HPt передает фосфат на ресиверный домен RR, которые осуществляют переключение с трансдукции сигнала на первичный ответ (Dortay et al., 2006).

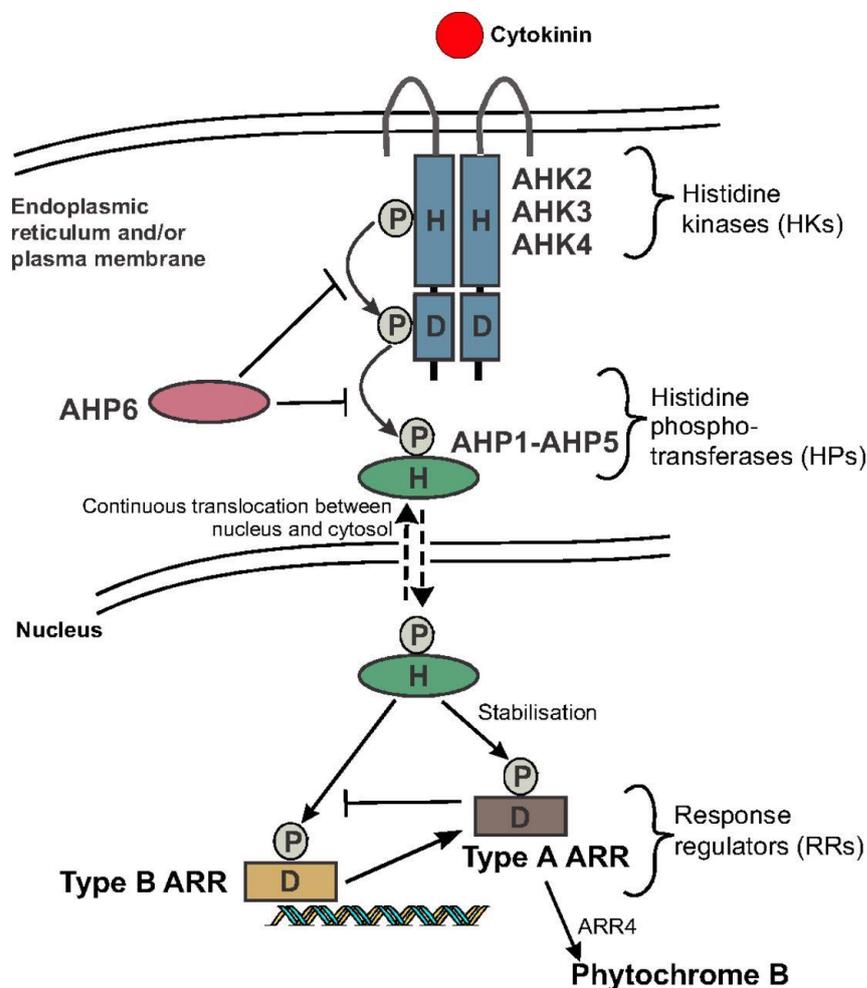


Рис. 2. Схема передачи цитокининового сигнала (из El-Showk et al., 2013)

1.2 Рецепторные гистидинкиназы

Цитокинин воспринимается мембранно-связанными рецепторами CHK. У арабидопсиса, на котором проводилось большинство исследований сигнального

пути цитокинина, существует три рецептора СНК, а именно АНК2, 3 и 4, и это, по-видимому, характерно и для большинства других видов покрытосеменных растений (Pils & Heyl, 2009). Рецепторы СНК способны воспринимать цитокинин с помощью своего циклаза/НК-ассоциированного сенсорного внеклеточного домена (CHASE), который представляет собой консервативный 200-230-аминокислотный домен, способный воспринимать лиганды с низкой молекулярной массой, такие как, например, цитокинины (Anantharaman & Aravind, 2001). Считается, что при связывании цитокинина происходит конформационное изменение, рецептор автофосфорилируется, а затем переносит фосфатную группу с соответствующего остатка гистидина в гистидинкиназном домене СНК на остаток аспартата своего ресиверного домена, так начинается каскад переноса фосфата в системе.

Было показано, что рецепторы цитокининов имеют разное сродство к различным цитокининам (Romanov et al., 2006). Обобщения в отношении ортологов рецепторов часто делаются на основе детального изучения рецепторов арабидопсиса, хотя существуют и межвидовые различия. Было установлено, что АНК обладают следующим сродством к связыванию цитокининов. В порядке убывания от наибольшего к наименьшему, сродство АНК2 – $iP > tZ > iPR > tZR > DZ$, сродство АНК3 – $tZ > tZR > DZ > iP > cZ$, а сродство АНК4 – $tZ > iP > tZR > iPR$. Паттерны экспрессии рецепторов были в основном установлены на основе экспериментов с репортерными линиями АНК слитыми с β -глюкуронидазой (GUS). АНК2 и АНК3 экспрессируются преимущественно в тканях наземных органов, тогда как экспрессия АНК4 наиболее высока в корнях. Соответственно рецепторы имеют различные функциональные роли в растении, которые во многом связаны паттернами их экспрессии (Nishimura et al., 2004; Higuchi et al., 2004; Riefler et al., 2006). Например, сигналинг цитокининов в процессе старения листьев осуществляется через АНК2 и АНК3, которые сильнее экспрессируются в этих органах. При этом в системе все же наблюдается функциональная избыточность, которая, как предполагается, действует как буфер для этой важной гормональной сигнальной системы. Избыточность была продемонстрирована при анализе

мутантов арабидопсиса, где одиночные и двойные мутанты имеют мало морфологических дефектов, хотя чувствительность к цитокинину явно была изменена. Сильнейшие морфологические дефекты в размерах, формировании сосудистой ткани и фертильности наблюдаются только при нокауте всех трех рецепторов цитокининов (Nishimura et al., 2004; Higuchi et al., 2004; Riefler et al., 2006).

1.3 Передача сигнала: фосфотрансмиттерные белки

Поскольку рецепторы локализованы на мембране, а регуляторы ответа – в основном в ядре, необходима еще одна молекула, которая поможет передать сигнал по этому пути. Эту функцию выполняют белки HPt. HPts – это белки длиной около 150 аминокислот с консервативным остатком гистидина в фосфотрансмиттерном домене, который принимает фосфат от СНК (Shi & Rashotte, 2012). HPt функционируют как посредники и переносят фосфат из цитозоля в ядро, где передают его на RR (рис. 2). Фосфотрансмиттеры в клетке находятся как в ядре, так и в цитоплазме. И цитокинин, собственно фосфорилирование, не влияют на их локализацию. Хотя первоначально считалось, что HPts перемещаются в ядро только после фосфорилирования. Сейчас же считается, что они постоянно циркулируют в ядро и из него между рецепторами и RR (Punwani & Kieber, 2010).

В арабидопсисе существует пять истинных фосфотрансмиттеров (АНР), которые функционируют в цитокининовой сигнализации, а именно АНР 1, 2, 3, 4 и 5 (Hutchison et al., 2006) (рис. 2), а также АНР6, псевдо-HPt, в котором отсутствует консервативный остаток гистидина, необходимый для фосфорилирования. Филогенетическое исследование HPts показывает, что АНР 2, 3 и 5 наиболее тесно связаны между собой, АНР1 находится в отдельной кладе с другими HPts двудольных, АНР4 попадает в кладу псевдо-HPt у риса, а АНР6 не входит в эти группы. Настоящие HPt обычно рассматриваются как положительные регуляторы цитокининового сигналинга, поскольку они передают сигнал на RR. В отличие от них, псевдо-HPt действуют как негативные регуляторы цитокининового сигналинга, взаимодействуя с рецепторами и конкурентно препятствуя фосфотрансферу и, таким

образом, позитивной сигнализации (Mahonen et al., 2006). Как было отмечено для СНК-рецепторов, NPR1 также имеют функциональную избыточность. Ни одиночные, ни двойные мутанты *ahp* не показывают фенотипических изменений, хотя мутанты более высокого порядка показывают возрастающие фенотипические аномалии, а у пятикратного мутанта *ahp1-5* наблюдается аномальное развитие стручков, уменьшение количества семян, нарушения в развитии ксилемы и флоэмы, чрезвычайно укороченный первичный корень и увеличение придаточных корней, что указывает на их важность в развитии растений.

1.4 Регуляторы ответа

Регуляторы ответа представляют собой группу белков в сигнальном пути цитокинина, которые функционируют, как следует из их названия, регулируя ответ при восприятии сигнала цитокинина. Все регуляторы ответа содержат двухкомпонентный ресиверный домен, который включает консервативный N-концевой остаток аспаратата (DD-бокс), центральный фосфопоглощающий остаток аспаратата (D1-бокс) и C-концевой остаток лизина (K-бокс) (Kieber and Schaller, 2014). Регуляторы ответа могут быть разделены на три класса на основе наличия или отсутствия дополнительного домена фактора транскрипции GARP и регуляции транскрипции цитокинином: регуляторы ответа типа А, регуляторы ответа типа В и регуляторы ответа типа С (Kieber and Schaller, 2014) (рис.2). Регуляторы ответа типа А и регуляторы ответа типа С не имеют домена транскрипционного фактора и функционируют как негативные регуляторы цитокининового сигналинга, конкурируя с регуляторами типа В за фосфат. Между собой классы А и С можно различить по их транскрипционной индукции цитокинином, при этом регуляторы ответа типа А сильно индуцируются, а регуляторы ответа типа С остаются незатронутыми. В отличие от них, регуляторы ответа типа В имеют домен транскрипционного фактора, функционируют как позитивные регуляторы цитокининового сигналинга и не индуцируются цитокинином. Регуляторы ответа являются самой большой группой белков в сигнальном пути цитокинина. Существует 24 регулятора ответа арабидопсиса (ARR), которые можно разделить по

классам RR следующим образом: десять типа А, 11 типа В и два типа С (рис. 2). Существует также один дополнительный регулятор ответа, ARR23, который не принадлежит ни к одному классу; он имеет усеченный ресиверный домен и может не выполнять свою фосфоакцепторную функцию (Kiba et al., 2004). Регуляторы ответа типа А и типа В являются основными группами регуляторы ответа во всех растениях и будут более подробно рассмотрены ниже. Большинство исследований регуляторы ответа типа С проводилось с использованием регуляторов ответа, обнаруженных в арабидопсисе, а именно ARR22 и ARR24. Экспериментально было показано, что ARR22 взаимодействует с AHP2, 3 и 5 как в растительных, так и в дрожжевых клетках. Было показано, что он экспрессируется в семени в развивающейся халазе, но не на более поздних стадиях жизненного цикла (Horak et al., 2008). Конститутивная сверхэкспрессия ARR22 приводит к сильному карликовому фенотипу. Однако мутант *arr22* не демонстрирует заметных фенотипических дефектов (Kiba et al., 2004; Horak et al., 2008). ARR24 экспрессируется в пыльце, бутонах, цветках и стручках. Одиночные мутанты *arr24* не проявляют фенотипа, как и двойные мутанты *arr22 arr24* (Gattolin et al., 2006).

Следует отметить, что в дополнение к описанным RR существуют псевдрегуляторы ответа (PRR). Они содержат ресиверный домен, но лишены консервативного фосфоакцепторного аспартата, который, например, заменен глутаматом. PRR не являются частью цитокининового сигнального пути, но вместо этого, как было показано, играют роль в циркадных ритмах (Makino et al., 2000).

1.5 Регуляторы ответа типа В

Регуляторы ответа типа В имеют как ресиверный домен, так и С-концевой домен фактора транскрипции GARP. Он так назван по первым идентифицированным генам семейства: GOLDEN2 *Zea mays*, ARR и Psr1, белка, обнаруженного у *Chlamydomonas reinhardtii* (Hosoda et al., 2002). Домен GARP - это домен из более широкого семейства MYB. Детальная характеристика домена GARP в ARR10 типа В выявила домен длиной около 60 аминокислот, который образует три α -спирали и гибкий рукав на N-конце. В комплексе с ДНК этот GARP-домен

связывается мотивом спираль-поворот-спираль с основной бороздкой ДНК, а рука связывается с соседней минорной бороздкой (Hosoda et al., 2002). Всего в арабидопсисе существует 11 RR типа В, которые можно разделить на три подсемейства (рис. 2). Подсемейство I содержит основных участников цитокининового сигналинга, а именно ARR1, ARR2, ARR10, ARR11, ARR12, ARR14 и ARR18 (Kieber & Schaller, 2014). Подсемейство II содержит ARR13 и ARR21, а подсемейство III - ARR19 и ARR20. Подсемейства II и III изучены не так хорошо, как подсемейство I, но, судя по результатам проведенных на сегодняшний день исследований, они играют существенно меньшую роль (Hill et al., 2013; Tajima et al., 2004).

Известно, что в основном сигнал передается через члены подсемейства I RR типа-В у арабидопсиса ARR1, 2, 10 и 12. При этом они в значительной степени дублируют друг друга, как и другие компоненты цитокининового сигналинга. Мутанты высшего порядка регуляторов ответа типа В, среди прочих эффектов, по сравнению с диким типом демонстрируют пониженную чувствительность к цитокинину, удлиненные корни и увеличенное количество боковых корней. Также у них нарушается регуляция известных генов первичного ответа на цитокинин (Mason et al., 2005). Было показано, что белок ARR1 связывается с нуклеотидной последовательностью AAGAT(T/C) или GAT(T/C)TT, которая неоднократно встречается в промоторной области многих генов, регулируемых цитокинином, таких как *ARR* типа-А, цитокининооксидазах и цитокинин гидроксилазах (CYP735A, которая участвует в биосинтезе *tZ*) (Taniguchi et al., 2007). В тройном мутанте *arr1,10,12*, где при добавлении цитокинина не наблюдается увеличения транскриптов генов-мишеней регуляторов ответа типа В, что подтверждает, что эти гены являются важной частью сигнального пути цитокинина (Argyros et al., 2008).

1.6 Регуляторы ответа типа А

Регуляторы ответа типа А состоят и включают консервативный ресиверный домен, который присутствует во всех RR, но не имеют других доменов, включая домен GARP, и, соответственно, не работают как транскрипционные факторы (рис.

2). Вместо этого RR типа А функционируют как негативные регуляторы цитокининового сигналинга. У большинства растений имеется несколько RR типа А. В арабидопсисе имеется десять RR типа А, которые имеют очень похожие аминокислотные последовательности (D`Agostino et al., 2000) (рис. 2). Как и в случае других компонентов сигнального пути регуляторы ответа типа А дублируют друг друга, и сильно отличающийся от дикого типа фенотип имеется у мутантов высокого порядка. При этом арабидопсиса наблюдается повышенная чувствительность к цитокинину. Например, каллусы мутанта *arr3,4,5,6,8,9* демонстрируют большее образование побегов и меньшее количество корней по сравнению с диким типом при увеличении концентрации цитокинина, а также большее ингибирование боковых корней по сравнению с проростками дикого типа. Было показано, что все RR типа А содержат по крайней мере один мотив для связывания RR типа В в своих промоторах. И они могут непосредственно взаимодействовать с АНР (Dortay et al., 2006). Кроме *ARR17* гены всех RR типа А способны сильно индуцироваться цитокинином (Rashotte et al., 2003).

RR типа А, по-видимому, негативно регулируют сигналинг цитокининов посредством нескольких механизмов. Одним из таких механизмов является прямое взаимодействие с НРts (Dortay et al., 2006), поэтому они могут конкурировать с RR типа В за получение фосфата, передаваемого по сигнальному пути (рис. 2). Кроме того, RR типа А могут работать независимо от фосфорилирования и взаимодействовать с другими клеточными компонентами, исходя из структуры и функции самого белка, как это иногда наблюдается в бактериальном двухкомпонентном сигналинге (Stock et al., 2000; To et al., 2007).

1.7 CRF (Cytokinin Response Factors)

Еще один дополнительный набор белков, связанных с цитокининовым сигналингом, состоит из факторов ответа на цитокинин (CRF). CRF не участвуют в передаче фосфата в системе напрямую, но могут функционировать как боковая ветвь этого пути, поскольку известно, что они непосредственно взаимодействуют с НРt.

CRF являются подмножеством суперсемейства транскрипционных факторов APETALA2 (AP2)/ (ERF) ответа на этилен (Rashotte et al., 2006; Zwack et al., 2012).

Было показано, что CRFs являются цитокинин-регулируемыми транскрипционными факторами, которые вовлечены в контроль ряда важных цитокинин-регулируемых процессов, аналогично RR типа В. В частности, CRF6 связан с регулируемым цитокинином старением и рядом различных стрессов, включая осмотический, окислительный, солевой и от ультрафиолета В (UV-B) стрессы (Zwack et al., 2013). CRF2 также связан с делением хлоропластов, которое является процессом, связанным с цитокинином (Okazaki et al., 2009). При более широком исследовании *CRF* у томата (*SICRF*) было обнаружено, что большинство этих генов демонстрируют транскрипционную регуляцию в ответ на стрессы, которые также связаны с цитокининовым сигналингом (Zwack et al., 2012). В целом ясно, что CRF являются частью сигнального пути цитокининов.

1.8 Биосинтез и метаболизм цитокининов

Биосинтез цитокининов начинается с присоединения пренильной группы, полученной из диметилаллилдифосфата, к *N6*-положению ADP/АТР. Эта реакция катализируется изопентенилтрансферазой (IPT) (Sakakibara, 2006), которая в большинстве растений кодируется мультигенным семейством (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001) (рис. 3). Полученные в результате *iP*-риботиды впоследствии могут быть преобразованы в цитокинины типа *tZ* путем гидроксирования изопреноидной боковой цепи в процессе, который осуществляется ферментами цитохромами P450 монооксигеназами CYP735A1 и CYP735A2 (Takei et al., 2004b). Это гидроксирование боковой цепи *iP* с образованием цитокининов типа *tZ* играет важную роль в стимулировании роста побегов у арабидопсиса (Kiba et al., 2013). Биосинтез *cZ*, напротив, изучен недостаточно хорошо, но, вероятно, в нем участвуют тРНК-IPT, катализирующие *N6*-пренилирование аденина в тРНК (Kasahara et al., 2004). Свободные основания как активные формы цитокининов синтезируются из риботидов цитокинина за один ферментативный этап, который катализируется

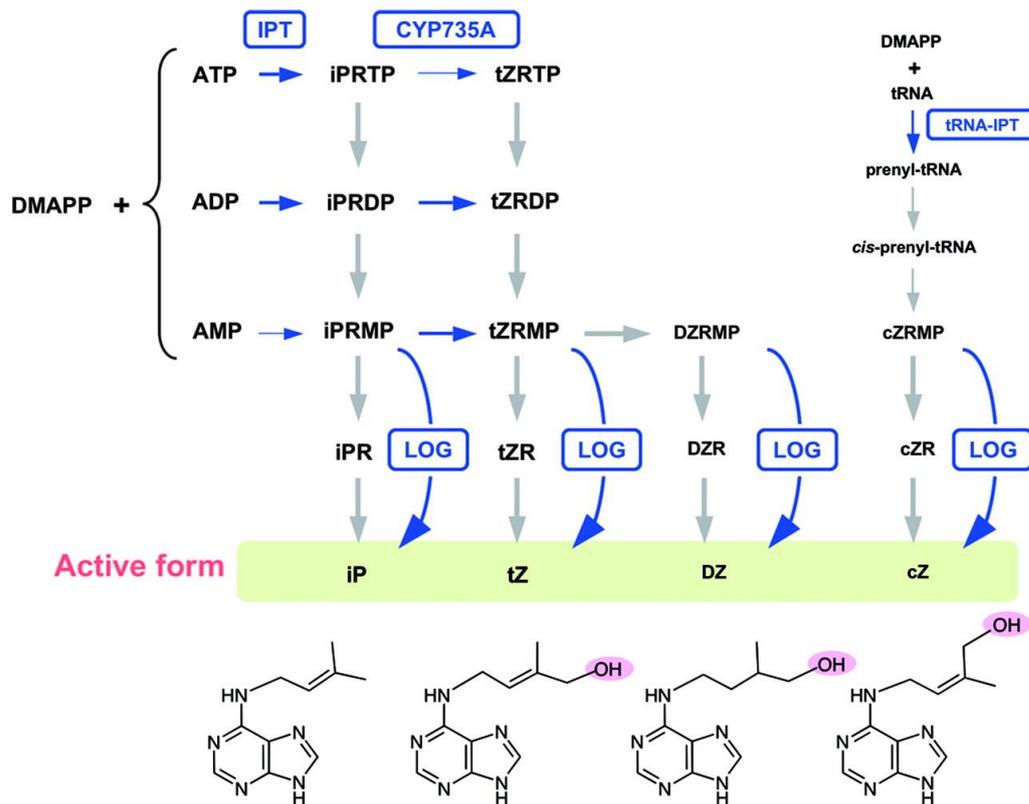


Рис. 3. Текущая схема биосинтеза цитокининов (из Hirose et al., 2008)

цитокининовыми нуклеозид-5'-монофосфатфосфорибогидролазами семейства LONELY GUY (LOG) (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009).

Уровни активных цитокининов также могут модулироваться посредством конъюгации с сахаром, чаще всего глюкозой, или путем необратимого расщепления цитокининоксидазами (СКХ) (Werner et al., 2006). *O*-гликозилирование, которое происходит по кислороду на боковых цепях цитокининов, катализируется глюкозилтрансферазами, расщепление же этих соединений осуществляется β -глюкозидазами (Brzobohaty et al., 1993). В отличие от этого, *N*-гликозилирование, которое происходит в основном на *N7* или *N9* пуринового кольца, считается необратимым. Глюкозильные конъюгаты неактивны в биотестах, и эти конъюгированные цитокинины также не связываются с цитокининовыми рецепторами (Spichal et al., 2004). СКХ необратимо расщепляют как свободные основания цитокининов, так и их рибозидные формы по *N6*-положению, снижая уровни активных цитокининов (Werner et al., 2006). Примечательно, что сверхэкспрессия СКХ приводит к снижению уровня эндогенного цитокинина и вызывает различные дефекты развития (Werner et al., 2003, 2001). И *tZ*, и *iP*

расщепляются СКХ, но дигидрозеатин и синтетические цитокинины кинетин и 6-бензиламинопуридин устойчивы к расщеплению СКХ (Galuszka et al., 2007; Zalabák et al., 2014).

Синтез и деградация цитокининов регулируются множеством факторов, включая эндогенные сигналы развития, а также биотические и абиотические факторы (Sakakibara, 2005; Werner et al., 2006). Например, гены LOG дифференциально экспрессируются в различных тканях в ходе развития растения, что важно для регуляции активности апикальной меристемы побега (Chickarmane et al., 2012; Kuroha et al., 2009). Члены семейства СКХ в арабидопсисе также демонстрируют различные паттерны экспрессии, внутриклеточную локализацию, ферментативные свойства и ответы на внешние факторы (Galuszka et al., 2007; Kowalska et al., 2010; Schmülling et al., 2003). Кроме того, экспрессия нескольких генов СКХ индуцируется цитокинином, обеспечивая механизм обратной связи для ингибирования функции цитокинина. Уровень доступных макроэлементов, таких как нитрат и фосфат, также регулирует экспрессию СКХ, а также генов IPT (Argueso et al., 2009). С использованием общедоступных транскриптомных данных, был описан ответ всех генов, участвующих в цитокининовой сигнализации и метаболизме, на различные воздействия окружающей среды (Ramireddy et al., 2014). Кроме того, было показано, что различные организмы, взаимодействующие с растениями, включая бактерии, грибы, нематоды и насекомых, могут модулировать уровни цитокинина в растениях, часто производя цитокинины сами (Naseem and Dandekar, 2012; Siddique et al., 2015).

1.9 Транспорт цитокининов

Первоначально считалось, что цитокинины синтезируются в корнях, а затем транспортируются в побеги, но теперь ясно, что цитокинины синтезируются во многих типах клеток как в корнях, так и в побегах, и что существует как локальный, так и дальний транспорт (Hirose et al., 2008; Kamada-Nobusada & Sakakibara, 2009; Miyawaki et al., 2004). При дальнем транспорте цитокининов различные их виды неравномерно распределены между ксилемой и флоэмой. Исследования на

арабидопсисе показали, что *транс*-зеатиновые цитокинины являются основной формой в ксилемном соке (Hirose et al., 2008; Ko et al., 2014; Osugi et al., 2017). Причем, это паравило действует и в рисе, в котором *цис*-зеатин преобладает в других органах (Osugi & Sakakibara, 2015). Напротив, *N*6-(Δ 2-изопентенил) аденин (iP)- и *цис*-зеатин-типы преобладают во флоэмном соке у арабидопсиса (Corbesier et al., 2003; Hirose et al., 2008). Такое распределение цитокининов может быть объяснено различиями в пространственной локализации экспрессии генов синтеза. В корнях арабидопсиса *ADENOSINE PHOSPHATE-ISOPENTENYLTRANSFERASE3 (IPT3)* и *IPT7* экспрессируются в клетках флоэмы корня (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004 a,b). *CYP735A2* экспрессируется в сосудистой системе корня (Takei et al., 2004 a, b; Kiba et al., 2013). С другой стороны, в листовой пластинке *IPT3* экспрессируется в клетках флоэмы (Miyawaki et al., 2004), тогда как экспрессия *CYP735A* в этих клетках практически не наблюдается (Kiba et al., 2013). Что, в конечном итоге и приводит к различному составу цитокининов tZ-типа и iP-типа в ксилеме и флоэме. Причем, у двойного мутанта по генам синтеза *транс*-зеатиновых цитокининов *CYP735A1* и *CYP735A2* (*супDM*) ксилемный сок становится о богатым iP-типом цитокининов (Kiba et al., 2013).

ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER SUBFAMILY G14 (ABCG14) необходимым для транслокации цитокинина из корня в побег по ксилеме (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014). Побег мутанта *abcg14* имеет фенотип, схожий с фенотипом цитокинин-дефицитных мутантов, а концентрация цитокинина в ксилемном соке сильно снижена (Ko et al., 2014). Он экспрессируется в основном сосудистой системе корня (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014). Опыты с прививками показали, что его роль в надземных частях растения незначительна. У риса его ортолог OsABCG18, тоже участвует в транспорте цитокининов (Zhao et al., 2019). Характер экспрессии и фенотипы мутантов позволяют предположить, что ABCG14 и OsABCG18 играют консервативную роль в переносе цитокинина на большие расстояния. Хотя, следует отметить, что их транспортный субстрат еще не полностью идентифицирован на биохимическом уровне.

Транспорт цитокининов на уровне клетки важен с точки зрения локализации места восприятия сигнала рецепторами. Этот аспект будет детально рассмотрен при обсуждении результатов данной работы.

1.10 Связь цитокининового сигналинга с обменом азота и углерода

В ранних работах было установлено, что азот оказывает значительное влияние на эндогенный уровень цитокининов у нескольких видов растений (Singh et al., 1992; Samuelson & Larsson, 1993; Wagner & Beck, 1993). Затем было обнаружено, что добавление неорганического азота к корням активирует сигнальную систему цитокининов в листьях кукурузы. В частности, экспрессия гена регулятора ответа типа А в листьях индуцировалась внесением нитрата или аммония (Sakakibara et al., 1998, 1999). В ксилеме транспорт *транс*-зеатинрибозида (*tZR*) значительно увеличивается под действием азота (Takei et al., 2001, 2002). Эти результаты позволяют предположить, что часть азотного сигнала преобразуется в цитокинин в корне. Последующие исследования различных видов растений, включая арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) и рис (*Oryza sativa*), показали, что растения имеют несколько способов регуляции синтеза цитокинина *de novo* в ответ на азотный статус: один из них - нитрат-специфический сигнал, а другой - сигнал, связанный с глутамином. У арабидопсиса азот-зависимая экспрессия *IPT3* и *CYP735A2* в основном регулируется системой нитрат-специфического ответа, управляемой NIN-LIKE PROTEIN (NLP) и NITRATE-INDUCIBLE GARP-TYPE TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR1 (NIGT1), ключевыми транскрипционными факторами первичного ответа на нитрат (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004a,b; Konishi and Yanagisawa, 2013; Maeda et al., 2018; Kiba et al., 2018). *IPT3* и *CYP735A2* находятся под той же регуляцией, что и ряд генов поглощения и ассимиляции нитратов (Maeda et al., 2018). Совместное регулирование может быть важным для координации синтеза строительных макромолекулярных блоков (т.е. аминокислот и нуклеотидов) и управляемых цитокинином программ развития. С другой стороны, в рисе *OsIPT4* и *OsIPT5*, очевидно, индуцируются нитратом и аммонием. Причем

выяснилось, что для этой сигнализации необходим сигнал связанный с метаболизмом глутамина. (Kamada-Nobusada et al., 2013).

Внесение нитратов увеличивает перенос цитокининов *tZ*-типа из корня в побег через ксилему. В одном из исследований было показано, что применение нитратов усиливает экспрессию *WUSCHEL*, ключевого регулятора гомеостаза стволовых клеток (Gordon et al., 2009; Chickarmane et al., 2012; Gruel et al., 2016), в меристемах побега через цитокининовый сигналинг, что сопровождается увеличением размера меристемы и снижением пластхронного отношения в нитрат-зависимой манере (Landrein et al., 2018). Таким образом, этот сигнальный путь весьма важен для азот-зависимой модуляции роста побега у арабидопсиса.

Цитокинины непосредственно влияют на поглощение азота. Так при экзогенном введении этих гормонов подавляется экспрессия транспортеров нитрата NRT корневого типа, включая NRT2.1, основного высокоаффинного транспортера нитратов (Lezhneva et al., 2014). Чувствительность ослаблена у двойного мутанта *cre1 ahk3* по рецептору цитокинина и усилена у шестерного мутанта *arr3 arr4 arr5 arr6 arr8 arr9* (Kiba et al., 2011), что позволяет предположить, что цитокинины действуют как сигналы избытка азота для подавления поглощения нитратов в корнях. Другие исследования с использованием экспериментальных систем с разделенными корнями позволили предположить, что цитокинины *tZ*-типа в побеге также участвуют в системной сигнализации об азотной потребности для регуляции NRT, включая NRT2.1 и других генов ассимиляции нитратов, и для контроля развития боковых корней (Ruffel et al., 2011; Poitout et al., 2018).

Цитокинины подавляют экспрессию транспортеров и других элементов минерального питания растений, таких как транспортеры сульфатов и железа (Maruyama-Nakashita et al., 2004; Sakakibara et al., 2006; Hirose et al., 2008; Seguela et al., 2008).

Помимо азота, доступность углерода также является основным фактором, определяющим рост и развитие растений (Duan et al., 2014; Haus et al., 2018; Nagatoshi & Fujita, 2019). Основное поступление углерода для растений происходит

через фиксацию CO_2 в процессе фотосинтеза. Таким образом важно понять, как концентрация CO_2 влияет на биосинтез цитокинина. При росте *Arabidopsis* в условиях повышенной концентрации CO_2 увеличивается не только биомасса растения (размер листьев), но и количество листьев по сравнению с условиями пониженной концентрации CO_2 , тем самым при акклиматизации осуществляется и регуляция развития растения (Kiba et al., 2019). Обработка более высоким CO_2 увеличивает экспрессию *IPT3*, *CYP735A2* и *ABCG14* в корнях, а за индукцию отвечают сахара, генерируемые фотосинтетически. Хотя двойной мутант *ipt3 cyp735a2* по-прежнему накапливает цитокинины и имеет усиленный рост в ответ на повышение CO_2 , эти реакции нарушены у мутантов *ipt357* и *cypDM* (Kiba et al., 2019), что позволяет предположить, что, помимо *IPT3* и *CYP735A2*, *IPT5*, *IPT7* и *CYP735A1* кооперативно участвуют в ответе на высокий CO_2 . Интересно, что активный фотосинтез в листьях может усиливать биосинтез цитокинина в корнях. Еще одним примечательным моментом является то, что в *cypDM* в ответ на повышение CO_2 накапливаются цитокинины *iP*-типа, но не *tZ*-типа, показывая, что синтез *de novo* цитокининов *tZ*-типа более важен для ответа, чем цитокининов *iP*-типа. Согласно данной модели, производимые в процессе фотосинтеза сахара поступают по флоэме в корни, где активируют синтез цитокининов *tZ*-типа. Те, в свою очередь, с помощью *ABCG14* транспортируются по ксилеме в побег, активируя там ростовые процессы.

Флоэма, которая распространена по всему телу растения, является транспортным путем продуктов фотосинтеза от органов-источников к органам-поглотителям, в нее загружается/выгружается ряд ассимилятов и неорганических ионов, подобно логистической магистрали. Поэтому она может быть одним из пространств, которое лучше всего отражает физиологическое состояние растений в аспекте обеспеченности питательными веществами. Модулирование нитрат-специфического и других сигналов во флоэме, где консолидируется информация о питании, может обеспечить надлежащее регулирование жизненных функций в зависимости от статуса питания растения.

1.11 Различная роль *tZ* и его предшественника (*tZR*) при дальнем транспорте цитокининов по ксилеме

В дополнение к трансгидроксилированию боковой пренильной цепи, транслокация из корня в побег через ксилему является еще одним фактором, который регулирует рост побега. Считается, что *tZR*, предшественник активного цитокинина, отвечает за перенос сигналов на большие расстояния по ксилеме, поскольку он является основной формой в ксилемном соке. *tZR* преобразуется в *tZ* в месте действия по механизму с участием LONELYGUY (LOG) (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009; Tokunaga et al., 2012). Однако *tZ*, активная форма цитокинина, также обнаруживается в соке ксилемы в виде минорной формы (Osugi et al., 2017) (рис. 1). Недавнее исследование показало, что корневые *tZ* и *tZR* могут контролировать различные наборы признаков в росте побега (Osugi et al., 2017; Daviere and Achard, 2017). Выяснилось, что транслокация *tZ* из корня в побег контролирует размер листьев, но не признаки, связанные с активностью меристемы, такие как пластохрон. И, напротив, транслокация *tZR* достаточна для регулирования обоих признаков. Причем, когда использовали в качестве привоя на корневую часть дикого типа семерной мутант по LOG генам, фенотип уменьшения побеговой апикальной меристемы сохранялся, но при использовании в качестве привоя тройного мутанта *ipt3 ipt5 ipt7 (ipt357)* (нарушен *de novo* синтез *tZ* и *tZR*) восстанавливался (Osugi et al., 2017). Таким образом, активность апикальной меристемы побега полностью зависит от LOG. Эти результаты также свидетельствуют о том, что *tZ*, транслоцируемый по ксилеме, не может напрямую попасть к рецептору цитокинина, экспрессированному в организационном центре апикальной меристемы побега. *CKX3* и *CKX5* экспрессируются в CLAVATA3 (CLV3)-WUSCHEL-экспрессионном домене апикальной меристемы побега, и мутации в *CKX* увеличивает область экспрессии *WUSCHEL* (Yadav et al., 2009, 2014; Bartrina et al., 2011). *LOG4* экспрессируется в клеточном слое L1, а *LOG7* - в домене CLV3 (Yadav et al., 2009; Chickarmane et al., 2012). Апикальный транспорт предшественников цитокининов к апикальной меристеме побега с последующей

активацией их с помощью LOG для восприятия рецепторами может быть важными для нормальной дифференциации органов побега (Gruel et al., 2016).

1.12 Побеговые цитокинины в регуляции образования азотфиксирующих клубеньков у бобовых

Экспрессия *IPT* в флоэме листа и обнаружение цитокининов во флоэмном соке предполагает, что цитокинины, выделяемые побегом, могут также играть роль в регуляции роста и развития подземных органов. Эксперименты по прививке корневой части мутанта *ipt1 ipt3 ipt5 ipt7* и привоя дикого типа показали убедительные доказательства того, что цитокинины iP-типа перемещаются из побега в корень у арабидопсиса (Matsumoto-Kitano et al., 2008). В *Lotus japonicus*, бобовом растении, работа *LjIPT3*, экспрессирующегося в флоэме, активируется через CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED-ROOT SIGNAL1 (CRE-RS1)/CRE-RS2-HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HAR1) (Nishimura et al., 2002; Okamoto et al., 2009, 2013), систему авторегуляции образования азотфиксирующих клубеньков (Sasaki et al., 2014). Прививка сверхэкспрессоров *Ljipt3* и *LjIPT3* на корневые подвои дикого типа значительно увеличила и уменьшила число клубеньков, соответственно, что убедительно свидетельствует о том, что цитокинин, выделяемый побегом, участвует в системе авторегуляции образования клубеньков (Sasaki et al., 2014).

1.13 Взаимодействие ауксина и цитокинина в корнях

1.13.1 Формирование и поддержание апикальной меристемы корня

Корневая меристема начинает формироваться на глобулярной стадии эмбриогенеза, когда клетка в основании зародыша, называемая гипофизом, претерпевает асимметричное деление клеток. После деления гипофизарной клетки цитокининовый ответ сохраняется в апикальной, линзовидной клетке, но подавляется в базальной клетке (Müller & Sheen, 2008). Детальный анализ промоторов RRA *ARR7* и *15* и серия генетических манипуляций показали, что ауксиновый сигнал непосредственно активирует транскрипцию *ARR7* и *ARR15*, а их индукция потенциально служит для снижения цитокининового ответа в базальной

клетке. С другой стороны, мутант по этим двум генам не приводил к серьезным нарушениям (Zhang et al., 2011). Но манипуляции с генами *RRB ARR10* подтвердили важность цитокининов в процессе онтогенеза.

Применение цитокинина уменьшает размер меристемы и способствует дифференциации клеток в ПЗ (Dello Ioio et al., 2007); обработка ауксином увеличивает размер меристемы и способствует делению клеток в проксимальной меристеме (Blilou et al., 2005). Анализ мутантов *ARR* типа В показывает, что этот процесс находится под транскрипционным контролем цитокинина, причем *ARR1*, *ARR10* и *ARR12* играют наибольшую роль, а *ARR2* и *ARR11* - меньшую (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Hill et al., 2013). Аук/IAA белок *SHY2* действует как центральный переключатель в механизме, контролирующем баланс ауксиновой и цитокининовой сигнализации. Ауксин выключает *SHY2* (Tian et al., 2002; Dharmasiri et al., 2003); цитокинин индуцирует (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010). *SHY2* также способствует биосинтезу цитокинина, повышая экспрессию *IPT5*.

Цитокинины регулируют активность ауксина через другие точки перекрестного взаимодействия в дополнение к контролю экспрессии *SHY2*. Например, цитокинины регулируют транспорт ауксина путем ингибирования работы выкачивающего ауксин переносчика *PIN1*, способствуя его деградации в вакуоли (Marhavý et al., 2011). Эта регуляция транспорта *PIN1* не зависит от *ARR* типа В. Кроме того, *ARR12* функционирует совместно с белком *RETINOBLASTOMA-RELATED*, стимулируя экспрессию *ARF19*, транскрипционного регулятора ауксинового ответа (Perilli et al., 2013). *ARF19* обычно функционирует как положительный регулятор ауксинового ответа, но, тем не менее, отрицательно регулирует размер корневой меристемы.

Применение экзогенного цитокинина или нарушение работы нескольких генов *ARR* типа А приводят к потере идентичности клеток покоящегося центра (ПЦ), о чем свидетельствует реактивация клеточного деления, снижение экспрессии маркерных генов ПЦ (*WOX5*) и дифференциация прилегающих клеток колумеллы (Zhang et al., 2011, 2013). Более того, транскрипционный фактор *SCARECROW*

(SCR) непосредственно подавляет экспрессию *ARR1*, ARR типа-B, в клетках ПЦ (Moubayidin et al., 2013). Цитокинин снижает экспрессию переносчика притока ауксина *LAX2* (Zhang et al., 2013). Нарушение гена *LAX2* фенотипирует эффекты цитокинина на ПЦ, что указывает на то, что снижение работы *LAX2* является ключевым медиатором влияния цитокинина на функцию ПЦ (Zhang et al., 2013). Подавление *ARR1* с помощью SCR регулирует биосинтез ауксина (Moubayidin et al., 2013). *ARR1* увеличивает биосинтез ауксина в кончике корня, но этот эффект уравнивается подавлением *ARR1* с помощью SCR. Наконец, цитокинин, изменяет уровень транспортеров PIN, в основном через посттранскрипционный механизм, что приводит к изменению распределения ауксина в нише стволовых клеток корня (Ruzicka et al., 2009; Zhang et al., 2013). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что для митотической неактивности и функционирования ПЦ, по-видимому, требуется среда с высоким содержанием ауксина и низким содержанием цитокинина.

1.13.2 Анатомическое строение корня

Сосудистые ткани корня арабидопсиса расположены бисимметрично: одна ось ксилемы пересекает сосудистый цилиндр, два полюса флоэмы расположены под углом 90° к этой оси, а промежуточные прокамбиальные клетки разделяют эти два домена. Клетки в пределах оси ксилемы показывают высокий ответ на ауксин (Bishopp et al., 2011b; Dubrovsky et al., 2011), в то время как клетки в доменах флоэма/прокамбий показывают самый высокий ответ на цитокинин (Mähönen et al., 2006). Пара взаимно ингибирующих взаимодействий поддерживает эти эксклюзивные домены выхода сигналов ауксина и цитокинина (Bishopp et al., 2011b).

Первый из них связан с псевдогистидинфосфотрансферным белком АНР6, который является негативным регулятором цитокининовой сигнализации, промотор которого содержит серию AuxRE, быстро индуцируется ауксином и является мишенью ARF5 в анализах *in vitro* (Bishopp et al., 2011b; Besnard et al., 2014). Вторая связана с цитокинин-опосредованной регуляцией PIN. Цитокинин регулирует экспрессию *PIN* как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях

(Laplaze et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008; Pernisová et al., 2009; Ruzicka et al., 2009; Zhang et al., 2011, 2013). Цитокинин способствует транскрипции *PIN7*, в результате чего экспрессия *PIN7* ограничивается прокамбиальными клетками, фланкирующими ось ксилемы (Bishopp et al., 2011b). Цитокинин влияет на полярность белка PIN1. В клетках с низким уровнем сигнала цитокинина, таких как ксилема, PIN1 поляризован на базальных мембранах, тогда как в клетках с высоким уровнем сигнала цитокинина, таких как прокамбий, PIN1 дополнительно локализован на латеральных мембранах (Bishopp et al., 2011b).

Транскрипционный фактор TMO5 является прямой мишенью ARF5. TMO5, который гетеродимеризуется с транскрипционным фактором под названием LONESOME HIGHWAY (LHW), локализован в пределах оси ксилемы и функционирует как ключевой регулятор судьбы сосудистых клеток (De Rybel et al., 2013). TMO5/LHW действуют как часть большего транскрипционного комплекса, способствующего периклиальному делению в стебле. Удивительно, но было обнаружено, что TMO5 непосредственно способствует экспрессии гена биосинтеза цитокинина LOG4 в оси ксилемы (De Rybel et al., 2014). Хотя это кажется нелогичным, за этим наблюдением последовал ряд генетических экспериментов, которые окончательно показали, что ауксин непосредственно стимулирует биосинтез цитокинина в оси ксилемы (через взаимодействие ARF5 и TMO5) и что производство этого цитокинина необходимо и достаточно для регулирования TMO5-опосредованных периклиальных делений клеток. Цитокинин синтезируется там, где он не проявляет ответа. В ходе математического моделирования выяснилось, что для создания правильного паттерна в корне нужно иметь зону на оси ксилеммы, где цитокинин не воспринимается.

1.13.3 Архитектура корня

Цитокинин играет ингибирующую роль в органогенезе боковых корней, и растения со сниженными уровнями цитокинина или сигналингом демонстрируют большее количество боковых корней (Werner et al., 2003; Mason et al., 2005; Hutchison et al., 2006; Riefler et al., 2006), в то время как мутанты, нечувствительные к

цитокинину, демонстрируют меньшее количество боковых корней (To et al., 2004). Более того, нечувствительный к цитокинину мутант *ahk2 ahk3* демонстрирует повышенную чувствительность к ауксину в образовании боковых корней, подчеркивая значимость ауксин-цитокининового перекрестного взаимодействия в этом процессе (Chang et al., 2013). Ауксин играет важную роль в определении общего размера корневой системы. Он способствует образованию новых примордиев боковых корней (LRP) (Himanen et al., 2002; Marchant et al., 2002; Casimiro et al., 2003). Кроме того, развивающийся LRP требует перенаправления потока ауксина для определения новой оси роста на вершине примордия, и это можно увидеть по постепенной реполяризации PIN1 (Benková et al., 2003).

Это взаимодействие опосредовано, по крайней мере, частично через модуляцию цитокинином полярного транспорта ауксина, так как нарушение функции цитокинина в протоксилема-ассоциированных клетках перицикла приводит к изменению экспрессии PIN и паттерна ответа на ауксин в LRP (Laplaze et al., 2007). CRE1/АНК4, АНК3 и АНР6, необходимы для правильной локализации PIN1 (Marhavý et al., 2011; Moreira et al., 2013). Цитокинин также играет ключевую роль в поляризации PIN1 и на более поздних стадиях органогенеза бокового корня, начиная со стадии III, когда LRP формирует куполообразную форму, а PIN1 четко поляризован на антиклинальной или периклиналильной мембранах (Marhavý et al., 2014). Клетки с повышенным содержанием цитокинина имеют тенденцию иметь большее количество PIN1, локализованного на периклиналильных мембранах. В боковых корнях это приводит к направлению потока ауксина к верхушке примордия. Увеличение количества ауксина в этом месте является достаточным для развития боковых корней. Процесс опосредованной цитокинином тонкой настройки потока ауксина не ограничивается только развивающимися примордиями и, вероятно, функционирует и в гравитационном ответе.

1.14 Взаимодействие ауксина и цитокинина в побеге

1.14.1 Организации и поддержания работы побеговой апикальной меристемы

При сравнении функций ауксина и цитокинина в побеговой апикальной меристеме и корневой апикальной меристеме существует ключевое различие: организационный центр в побеговой апикальной меристеме является местом максимальной активности цитокинина, а не ауксина. Цитокинин способствует пролиферации недифференцированных клеток в меристеме, а ауксин действует в периферической зоне, вызывая клеточную дифференциацию и рост органов. Хотя становится все более очевидным, что ауксин и цитокинин взаимодействуют друг с другом в разной степени и с помощью различных механизмов во всей меристеме.

Побеговая меристема (SAM) формируется в ходе эмбриогенеза, причем первые признаки его формирования у арабидопсиса появляются на стадии 16-клеточной глобулы, когда экспрессируется транскрипционный фактор *WUS* (Mayer et al., 1998). Структура SAM становится четко выраженной на стадии сердца, когда клетки, экспрессирующие *WUS*, определяют организационный центр (ОЦ). В этот момент цитокининовая активность становится четко связанной с SAM, что, является ключевым элементом для поддержания экспрессии *WUS* (Zürcher et al., 2013). Поддержание популяции стволовых клеток в SAM в дальнейшем зависит от петли обратной связи с участием *WUS* и сигнального пути *CLAVATA* (*CLV*). *WUS* действует как активатор транскрипции (например, индуцируя экспрессию *CLV3*), он также может функционировать как репрессор транскрипции (Busch et al., 2010; Yadav et al., 2013). В частности, *WUS* репрессирует экспрессию генов, связанных с дифференцирующимися клетками, связываясь с промоторными областями различных транскрипционных факторов, таких как *KANAD1*, *KANAD2*, *ASYMMETRIC LEAVES2* и *YABBY3*, которые регулируют ранние события в дифференциации листьев.

Цитокинин является положительным регулятором пролиферации клеток в SAM (Werner et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Leibfried et al., 2005; Miyawaki et al., 2006; Bartrina et al., 2011; Kieber & Schaller, 2014). Местонахождение максимального биосинтеза цитокинина и ответной реакции различаются в SAM, и это важно для позиционирования домена экспрессии *WUS*

(Yanai et al., 2005; Kurakawa et al., 2007; Gordon et al., 2009; Chickarmane et al., 2012; Zürcher et al., 2013). Биосинтез цитокининов в основном происходит в верхних слоях SAM, но максимальная чувствительность к цитокининам наблюдается в ОЦ. Активные цитокинины, диффундирующие вниз от вершины SAM, вместе с экспрессией *CLV3*, индуцированной *WUS* снизу, регулируют динамическое расположение паттерна экспрессии *WUS* таким образом, чтобы он соответствовал этому максимуму цитокининовой активности (Kurakawa et al., 2007; Chickarmane et al., 2012; Zürcher et al., 2013). В свою очередь *WUS* репрессирует гены *RRA ARR5*, *ARR6*, *ARR7* и *ARR15* (Leibfried et al., 2005). Ауксин тоже снижает экспрессию *ARR* типа А (Zhao et al., 2010). Эффект ауксина передается через *ARF5* (MONOPTEROS); у мутантов *arf5* наблюдается эктопическая экспрессия *ARR7* и *ARR15* во всей центральной зоне.

Следует отметить, однако, что у двойного мутанта *arr7 arr15* отсутствует четкий фенотип меристемы побега, так же, как и фенотип меристемы корня во время эмбриогенеза (Zhang et al., 2011), что контрастирует с фенотипами, полученными при микроРНК-опосредованном сайленсинге *ARR7* и *ARR15*. Таким образом, влияние ауксина на экспрессию *ARR* типа А, вероятно, включает не только эти два члена семейства *RRA*.

Недавно был идентифицирован еще один элемент в этой регуляторной цепи – транскрипционный фактор *HECATE1* (*HEC1*). В ОЦ *HEC1* репрессируется *WUS*. Его выключение ОЦ приводит к потере продукции стволовых клеток (Schuster et al., 2014). Среди прочего *HEC1* связан с сигнальным путем цитокинина, поскольку среди его мишеней находятся *ARR* типа А, *ARR5*, *ARR7* и *ARR15*.

И цитокинин, и ауксин играют положительную роль в регуляции деления клеток в побеге. Оба этих гормона могут влиять на переход клеточного цикла в S-фазу. Цитокинин индуцирует экспрессию трех генов *CYCD3*. Причем при сверхэкспрессии *CYCD3;1* цитокинин не нужен для роста в культуре тканей (Riou-Khamlichi et al., 1999; Dewitte et al., 2007; Scofield et al., 2013). *CYCD3* не являются абсолютно необходимыми для клеточного цикла, но поддерживают

недифференцированное состояние стволовых клеток и подавляют эндоредупликацию. Недавно было показано, что SHOOT-MERISTEMLESS (STM) подавляет клеточную дифференциацию и эндоредупликацию, действуя через индукцию цитокинином *CYCD3* (Scofield et al., 2013). Ауксин регулирует дополнительные элементы пути *CYCD/CDK*. Одной из потенциальных мишеней ауксина (при инициации роста боковых корней) является ингибитор циклин-зависимой киназы *KRP2/ICK2*; ауксин снижает экспрессию *KRP2*, а также способствует деградации белка *KRP2* (Himanen et al., 2002; Sanz et al., 2011). Второй потенциальной мишенью в клеточном цикле для регуляции ауксинами является семейство транскрипционных факторов E2F, которое функционирует после *CYCD/CDK* и регулирует вступление в S-фазу; эктопическая сверхэкспрессия *E2FB* в клетках табака (*Nicotiana tabacum*) BY2 делает их независимыми от ауксина для деления, и, по крайней мере, во время инициации бокового корня, ауксин стабилизирует белок E2FB (Magyar et al., 2005; Sanz et al., 2011). Влияние цитокинина и ауксина на клеточный цикл, вероятно, не ограничивается контролем входа в S-фазу. На самом деле, многочисленные данные указывают на то, что цитокинин также играет важную роль в контроле перехода G2/M, но лежащие в его основе механизмы еще менее понятны, чем те, которые регулируют вход в S-фазу (Schaller et al., 2014).

1.14.2 Формирование САМ в культуре тканей

Образование каллуса имеет много общего с начальными этапами формирования бокового корня, независимо от того, происходит ли культивируемая ткань из корней или побегов (Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2010; Motte et al., 2014). Как и во время образования примordia бокового корня, повышенные концентрации ауксина в среде (СИМ) вызывают экспрессию маркера ПЦ меристемы корня *WOX5* и антиклинальные деления перицикла, за которыми следуют периклиналильные деления для создания дополнительных слоев клеток. Каллус отличается от бокового корня наличием значительно расширенного субэпидермального слоя клеток с ПЦ-подобной идентичностью. Каллусная ткань имеет много общего с кончиком корня.

Для образования каллуса необходимы сигналы ауксина и цитокинина. Мутации, подавляющие передачу сигнала ауксина, такие как двойной мутант *arf7 arf19*, препятствуют образованию каллуса на СИМ (Fan et al., 2012). Ключевая роль ауксина заключается в индукции транскрипционных факторов *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD)*, некоторые из которых (*LBD16, LBD17, LBD18* и *LBD29*) являются прямыми мишенями ARF7 и ARF19 и участвуют в формировании боковых корней (Fan et al., 2012). Эктопическая экспрессия *LBD* стимулирует индукцию каллуса в отсутствие ауксина; напротив, их подавление ингибирует индукцию каллуса на СИМ. Хотя экзогенный цитокинин не является необходимым для образования каллуса, у нечувствительных к этому гормону мутантов способность образовывать каллус резко снижена (Nishimura et al., 2004; Mason et al., 2005; Hutchison et al., 2006; Riefler et al., 2006; Yokoyama et al., 2007; Argyros et al., 2008; Ishida et al., 2008). Роль цитокинина в образовании каллуса представляет интерес, поскольку цитокинин действует антагонистически по отношению к ауксину в образовании боковых корней. Активность ауксина высока на начальных стадиях, но затем снижается, поскольку активность цитокинина одновременно возрастает в делящейся каллусной ткани. Интересно, что цитокинин-гиперчувствительные мутанты оказываются не только более чувствительными к цитокинину, но и более чувствительными к ауксину при образовании каллуса, что противоречит антагонизму, обычно наблюдаемому при взаимодействии ауксина и цитокинина (Sakai et al., 2001; Mason et al., 2005; Ikeda et al., 2006; Kim et al., 2012; Hill et al., 2013).

Длительный рост каллуса на СИМ необратимо фиксирует примордии в стадии корневой идентичности (Christianson & Warnick, 1983). Перенос каллуса в богатую цитокинином среду (СИМ) приводит к разделению идентичности клеток в каллусе таким образом, что экспрессия *CUC2* снижается в целом и становится локализованной в регионах, способных формировать предшественники побегов. Важно отметить, что цитокинин также индуцирует экспрессию *WUS*, первоначально

в регионах, лежащих под обогащенными CUC2 примордиями побега (Gordon et al., 2007; Z.J. Cheng et al., 2013).

Продолжение инкубации на SIM приводит к формированию узорчатого SAM, который зависит от перекрестного взаимодействия между цитокинином и ауксином. Активность ауксина локализуется в кольце клеток, расположенном апикально и периферически к ограниченной зоне экспрессии *WUS*, при этом в ауксиновом кольце наблюдается повышенная экспрессия генов семейства *ARF*, которые опосредуют ауксиновый ответ (Z.J. Cheng et al., 2013). В этот момент ауксин и цитокинин проявляют антагонизм, который часто ассоциируется с их перекрестным взаимодействием. Ауксин подавляет активность цитокинина в пределах апикального кольца путем прямого подавления экспрессии семейства *IPT* генов биосинтеза цитокинина (Z.J. Cheng et al., 2013); экспрессия *IPT5* ограничивается зоной, расположенной непосредственно над зоной, экспрессирующей *WUS*, тем самым устанавливая градиент продукции цитокинина, характерный для SAM. Ключевые меристематические регуляторы *CLV3* и *STM* также демонстрируют изменения в экспрессии в процессе паттернинга SAM. *CLV3* экспрессируется в новой верхушке меристемы вскоре после того, как экспрессия *WUS* становится ограниченной (Gordon et al., 2007; Chatfield et al., 2013). Экспрессия *STM* изменяется таким образом, что первоначально, когда экспрессия *CUC2* высока во всем примордии побега, она обнаруживается на внешней границе примордия; позднее, после снижения экспрессии *CUC2*, *STM* начинает более широко экспрессироваться в меристеме (Gordon et al., 2007).

1.14.3 Органогенез и филлотаксис

Побеговая апикальная меристема поддерживает баланс между пролиферацией и дифференциацией клеток (Kerstetter et al., 1997; Peris et al., 2010; Besnard et al., 2011; Su et al., 2011). Клетки в центральной зоне (ЦЗ) медленно делятся, при этом стволовые клетки обеспечивают возобновляемый ресурс для недифференцированных клеток в ЦЗ; цитокинин является основным гормональным сигналом, участвующим в создании и поддержании ЦЗ. Дифференцировка

начинается, когда клетки перемещаются из ЦЗ в периферическую зону, в этот момент скорость деления клеток увеличивается и формируются примордии органов.

Взаимодействие между ауксином и цитокинином играет важную роль в способности ауксина устанавливать локальные максимумы, необходимые для органогенеза. Изменения размера меристемы у мутантов с нарушенной функцией цитокининов, потенциально могут косвенно изменять филлотаксис (Leibfried et al., 2005; Argyros et al., 2008; Bartrina et al., 2011). У арабидопсиса гены семейства *ERECTA*, которые участвуют в буферизации уровня цитокинина в SAM (Uchida et al., 2013), также играют роль в инициации органов и филлотаксисе через влияние на поток ауксина, по-видимому, благодаря роли в установлении соответствующего паттерна экспрессии PIN (Chen et al., 2013). Эти эффекты *ERECTA* коррелируют с изменениями размера SAM.

АНР6, негативный регулятор цитокининовой сигнализации у арабидопсиса, играет роль в установлении филлотаксиса у арабидопсиса (Besnard et al., 2014). Мутации *АНР6* приводят к изменению филлотаксиса во время развития соцветия, наиболее очевидным фенотипом является изменение угла расхождения стручков. В случае мутантов *ahr6* не наблюдалось значительного изменения размера меристемы, что предполагает более специфическую роль в регуляции филлотаксиса. Анализ экспрессии *АНР6*, а также репортеров активности ауксина и цитокинина поддерживает модель, в которой *АНР6* регулирует пространственно-временной паттерн активности цитокинина на периферии SAM. Ингибирующие цитокининовые поля помогают создать более четкие ауксиновые поля, тем самым способствуя надежному филлотаксическому паттернингу.

Органогенез не протекает с постоянной скоростью. Например, свет служит важным морфогенным сигналом для контроля активности SAM (Yoshida et al., 2011). Цитокинин необходим для инициации листьев: Активность цитокинина в центральной зоне снижается в темноте, и нанесение цитокинина на проросшие в темноте верхушки достаточно для индукции образования примордий новых листьев. Однако индукция примордий новых листьев также зависит от

распределения ауксина в SAM, при этом рост верхушки, но не инициация органов происходит, когда SAM обрабатывается цитокинином и ингибитором транспорта ауксина 1-N-нафтилфталаминовой кислотой. Распределение ауксина, необходимого для инициации органов, зависит от PIN1, который более активно интернализируется в темноте.

1.14.4 Развитие гинеция и женского гаметофита

Ауксин играет критическую роль в организации апикально-базальной структуры гинеция, причем в апикальной части развивающегося гинеция уровень этого гормона высок (Nemhauser et al., 2000; Hawkins & Liu, 2014). Изучался пространственно-временной паттерн ответов ауксина и цитокинина в развивающихся гиноцеях с использованием репортеров *DR5rev: GFP* и *TCS:GFP*, соответственно. Как и в некоторых других контекстах развития, ауксин и цитокинин демонстрировали взаимодополняющие паттерны активации. Например, экспрессия *TCS:GFP* наблюдалась в центре гинеция на ранних стадиях развития, тогда как *DR5rev:GFP* экспрессировался в окружающих его клетках (Marsch-Martínez et al., 2012, 2012b). Экзогенное применение цитокинина приводит к ситуации, сходной с обработкой 1-N-нафтилфталеиновой кислотой, и этот эффект усиливается у мутантов *pin3-4* или *tir1*. Более того, обработка цитокинином влияла на экспрессию *PIN1* (Zúñiga-Mayo et al., 2014). Цитокинин, вероятно, действует частично путем влияния на полярный транспорт ауксина в развивающемся гиноце. Это во многом похоже на взаимодействие ауксина и цитокинина при развитии женского гаметофита, который развивается в яйцеклетке гиноцея. Генетические исследования показали, что гистидинкиназа SKI1, родственная цитокининовым рецепторам АНК, но не имеющая цитокинин-связывающего CHASE-домена, необходима для развития женского гаметофита (Pischke et al., 2002; Hejátko et al., 2003), как и нижележащие АНР (Deng et al., 2010). Генетические исследования рецепторов цитокинина у арабидопсиса показали, что цитокинин необходим в спорофитной ткани при развитии женского гаметофита (Nishimura et al., 2004; Kinoshita-Tsujimura & Kakimoto, 2011), в отличие от SKI1, который действует в гаметофитных тканях

(Pischke et al., 2002; Hejatko et al., 2003). Более позднее исследование показало, что, хотя некоторые аллельные комбинации цитокининовых рецепторов АНК способны образовывать жизнеспособные семена, самая сильная комбинация (*ahk2-7 ahk3-3 cre1-12*) демонстрирует почти полную остановку развития женского гаметофита, причем дефект проявляется на гораздо более ранней стадии, чем у мутантов *ski1* (С.-У. Cheng et al., 2013). Кроме того, в части женских гаметофитов тройного мутанта *ahk2-2tk ahk3-3 cre1-12* была нарушена инициация интегумента и наблюдались семязачатки пальцевидной формы (Bencivenga et al., 2012), что во многом связано с ингибированием функции PIN1. Было высказано предположение (Lituev et al., 2013), что в самом женском гаметофите нет градиента ауксина, хотя он наблюдался в окружающей спорофитной ткани. Это позволяет предположить, что в спорофитных тканях существуют противоположные градиенты ауксина и цитокинина, которые играют взаимодополняющие роли на ранних стадиях развития женского гаметофита, включая спецификацию мегаспоры из четырех продуктов мейоза материнской клетки мегаспоры (С.-У. Cheng et al., 2013).

1.15 Цитокинины и абиотический стресс

Цитокинин играет важную и сложную роль в реакции на абиотический стресс. Принято считать, что цитокинин играет негативную роль в адаптации растений к стрессу, однако это не всегда так. На самом деле существуют доказательства того, что цитокинин имеет как положительное, так и отрицательное влияние на устойчивость к стрессу. Многочисленные исследования, проведенные на широком спектре растений, показали, что концентрация цитокининов снижается в ответ на длительный стресс (Itai & Vaadia, 1965; Hubick et al., 1986; Hansen & Dörffling, 2003; Kudoyarova et al., 2007; Ghanem et al., 2008). В других исследованиях, напротив, сообщалось о кратковременном и устойчивом повышении уровня цитокининов, особенно в ответ на сильный стресс (Hansen and Dörffling, 2003; Pospisilova et al., 2005; Alvarez et al., 2008). Анализ экспрессии генов биосинтеза цитокинина (*IPT*) и катаболизма (*CKX*) арабидопсиса после обработки NaCl показал, что *IPT5* и *IPT7* повышаются в течение 1-2 часов, после чего возвращаются к уровню до обработки.

И наоборот, *СКХ1*, *СКХ3* и *СКХ6* подавляются через 1 ч, после чего происходит постепенное увеличение, и повышенные уровни сохраняются в течение 5-10 ч (Nishiyama et al., 2011). Растения арабидопсиса, выращенные на среде с цитокинином, имели более высокий уровень выживаемости, чем растения без добавок, когда они подвергались замораживанию или обезвоживанию (Jeon et al., 2010; Kang et al., 2012). Ген изопентенилтрансферазы из *Agrobacterium tumefaciens*, который катализирует лимитирующий этап биосинтеза цитокинина, был введен в геном табака под контролем стресс-индуцибельного промотора. Полученные трансгенные растения повышают уровень цитокинина именно в ответ на стресс и обладают повышенной устойчивостью к засухе (Rivero et al., 2007). При этом мутанты *Arabidopsis* по генам *IPT*, у которых снижен уровень цитокинина, также более устойчивы к засухе по сравнению с диким типом (Nishiyama et al., 2011). Снижение уровня цитокинина, достигнутое путем избыточного производства фермента цитокинин-деградирующей цитокинин-оксидазы (*СКХ*) в конститутивном или корнеспецифическом режиме, также положительно влияет на устойчивость к засухе (Werner et al., 2010; Nishiyama et al., 2011; Mackova et al., 2013). Важно отметить, что корнеспецифический (*WRKY6*) промотор, использованный в данном исследовании, подавляется в ответ на стресс, поэтому избыточная продукция *СКХ* не сохраняется в условиях засухи. Поэтому повышение устойчивости было приписано растениям с усиленной корневой системой в результате уменьшения количества цитокинина (который подавляет рост корней) во время развития (Mackova et al., 2013). В совокупности эти эксперименты наглядно демонстрируют потенциальное влияние измененного метаболизма цитокинина на стрессовые реакции и еще больше подчеркивают сложную роль, которую он играет в таких реакциях.

1.15.1 Осмотический стресс: засуха и соль

Экспрессия *АНК2* и *АНК3* индуцируется засухой и осмотическим стрессом, что свидетельствует о повышенной чувствительности к цитокинину в этих условиях. Растения, лишенные одного или обоих рецепторов, обладают повышенной

устойчивостью к засухе, а также повышенной чувствительностью к абсцизовой кислоте (Tran et al., 2007). Это указывает на то, что цитокининовый сигналинг негативно влияет на засухоустойчивость. В отличие от АНК, экспрессия *AHP* у арабидопсиса подавляется в условиях засухи. Тройные мутанты *ahp2 ahp3 ahp5*, однако, демонстрируют фенотип засухоустойчивости, сходный с мутантами рецепторов (Nishiyama et al., 2013). Интересно, что индукция в условиях засухи RR типа А у арабидопсиса *ARR5* и *ARR15* и типа С *ARR22* не зависит от цитокининовых рецепторов, что предполагает, что эти нижележащие компоненты TCS могут регулироваться другими дополнительными сигнальными путями (Kang et al., 2012).

Роль цитокининового сигналинга при солевом стрессе также была изучена. Как и в случае с засухой, *АНК2* и *АНК3* индуцируются при повышении концентрации соли, а одиночные *ahk2*, *ahk3* и двойные *ahk2 ahk3* мутанты более устойчивы к этим условиям (Tran et al., 2007). Аналогично, двойной по RRB *arr1 arr12* демонстрирует повышенную солеустойчивость (Mason et al., 2010). Однако, несмотря на большую чувствительность к цитокинину, четверные RRA-мутанты *arr3 arr4 arr5 arr6* также более солеустойчивы (Mason et al., 2010). Это еще раз подтверждает идею о том, что RRA взаимодействуют с другими сигнальными системами, не зависящими от цитокинина.

1.15.2 Низкотемпературный стресс

Воздействие низких температур приводит к временной индукции экспрессии генов *ARR5*, *6*, *7* и *15*, которая зависит от функции рецепторов АНК2 и АНК3, а также АНП2, 3 или 5 и RRB *ARR1* (Jeon et al., 2010; Jeon & Kim, 2013). Растения, сверхэкспрессирующие *ARR1*, также поддерживают повышенные уровни этих RRA во время длительного холода и при предварительной обработке цитокинином становятся более морозоустойчивыми, чем контрольные WT (Jeon & Kim, 2013). Напротив, мутанты *arr5*, *arr6* и *arr7*, как сообщается, обладают повышенной морозоустойчивостью, а сверхэкспрессия *ARR7* приводит к большей восприимчивости к замораживанию (Jeon et al., 2010). В тоже время индуцибельная сверхэкспрессия RR типа С *ARR22* репрессирует экспрессию нескольких RRA,

включая *ARR5*, 6 и 7, и приводит к повышению устойчивости к холодovому (и засухе) стрессу (Kang et al., 2013). Эти противоречивые результаты затрудняют определение точной роли цитокининовой сигнализации в холодной акклиматизации.

1.15.3 Фотоокислительный стресс

Появившиеся данные указывают на участие цитокининовой сигнализации в дополнительных абиотических стрессах, связанных с дисфункцией фотосинтеза, приводящей к продукции реактивных форм кислорода (ROS). В двойные мутанты *ahk2,3* и *arr1,12* были гиперчувствительны к стрессу высокой освещенности, указывает на то, что цитокининовый сигналинг может играть положительную роль в этом ответе (Cortleven et al., 2014).

1.15.4 Взаимодействие между АБК и цитокининовым сигналингом

Некоторые из описанных выше изменений в стрессоустойчивости, связанных с цитокининовым сигналингом и метаболизмом, также сопровождаются изменениями в чувствительности к абсцизовой кислоте (АБК) (Tran et al., 2007; Jeon et al., 2010; Nishiyama et al., 2011). Кроме того, у цитокинин-дефицитных растений снижается уровень АВА, что связано с подавлением биосинтеза АБК (Nishiyama et al., 2011; Maskova et al., 2013). Было показано, что обработка растений арабидопсиса АБК подавляет экспрессию RR типа А *ARR6* и *ARR9*, причем этот эффект значительно снижается у двойных мутантов *ahk2,ahk4* и *ahk3,ahk4*. Это предполагает, что репрессия RRA происходит, по крайней мере частично, путем прямого взаимодействия с TCS-путем (Yang et al., 2014). Прямые взаимодействия между цитокининовым и АБК сигнальными путями были описаны в регуляции других (нестрессовых) процессов. Например, во время прорастания семян белки *ARR4*, 5 и 6 взаимодействуют с транскрипционным фактором ABI5, позитивным регулятором АБК-сигналинга, и подавляют его функцию (Wang et al., 2011). Другой компонент сигнального пути АБК, ABI4, который функционирует аналогично ABI5, индуцирует экспрессию *ARR5* при образовании боковых корней (Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010). Эти результаты подтверждают возможность существования

механизмов перекрестного взаимодействия этих гормонов. Недавно было сообщено о совершенно ином взаимодействии цитокинина и АБК, не связанном с TCS. АБК-опосредованное закрытие устьиц в ответ на засуху включает производство оксида азота (NO). Цитокинин ингибирует этот процесс (Liu et al., 2013). Таким образом, по крайней мере, в этом случае цитокинин сам непосредственно участвует в модуляции ответа на АБК.

1.16 Цитокинины и биотический стресс

1.16.1 Взаимодействие цитокининов с салициловой кислотой

Экзогенное применение цитокинов или трансгенная сверхэкспрессия генов *IPT1*, *3*, *5* и *7* повышали устойчивость арабидопсиса к инфекции Pst DC3000 (Choi et al., 2010; Naseem et al., 2012). Напротив, сверхэкспрессия генов *CKX2* и *CKX4* усиливала восприимчивость. Двойной мутант *ahk2 ahk3* был более восприимчив к инфекции Pst DC3000, чем растения дикого типа Col-0 (Choi et al., 2010). Кроме того, сверхэкспрессия регулятора ответа типа В *ARR2* значительно повышала устойчивость, а мутантные растения с дефектным *ARR2* имели повышенную восприимчивость к инфекции Pst DC3000. Применение экзогенного цитокинина или сверхэкспрессия генов *IPT* также индуцирует экспрессию *PR1* в *Arabidopsis* (Choi et al., 2010; Naseem et al., 2012), что свидетельствует о перекрестном взаимодействии между цитокининами и защитным сигналингом салициловой кислоты. Аналогичным образом, было показано, что синергетическое взаимодействие между салициловой кислотой и цитокининами повышает устойчивость риса к заражению грибом *Magnaporthe oryzae* (Jiang et al., 2013). Кроме того, цитокинин повышает устойчивость арабидопсиса к заражению патогеном *Verticillium longisporum* (Reusche et al., 2013). Вместе эти сообщения показывают, что цитокинины позитивно влияют на иммунитет, стимулируя путь салициловой кислоты. Физически регулятор ответа типа В *ARR2* взаимодействует с белком сигнального пути салициловой кислоты TGA3 (bZIP-фактор транскрипции) и индуцирует экспрессию генов, связанных с защитой, связываясь с их промоторами (Choi et al., 2010, 2011; Naseem et al., 2014). А *ARR* типа А отрицательно влияют на иммунитет растений.

Комплексный мутант ARR типа А *arr3,4,5,6,8,9* показал более высокую устойчивость к инфекции биотрофного патогена *Hyaloperonospora arabidopsidis Noco2* по сравнению с растениями дикого типа, тогда как трансгенные растения, сверхэкспрессирующие различные ARR типа А, показали значительно более высокий рост *H. arabidopsidis* по сравнению с растениями дикого типа (Argueso et al., 2012). Интересно, что растения-мутанты по биосинтезу салициловой кислоты *eds16* гиперчувствительны к очень низким концентрациям цитокининов (Argueso et al., 2012), что указывает на существование петли отрицательной обратной связи. Тем самым осуществляется компромисс между ростом и защитой у растений.

1.16.2 Взаимодействие цитокининов с жасмонатным путем устойчивости

Растения используют жасмонат/этилен-опосредованную иммунную защиту для отражения атак вирусов, травоядных животных и некротрофных патогенов (Erb et al., 2012; Pieterse et al., 2012). Повышение уровня цитокинина после ранения увеличивало эндогенный уровень жасмоната в растениях табака (Dervinis et al., 2010; Erb et al., 2012; Schäfer et al., 2015). Кроме того, трансгенные растения арабидопсиса *35S:IPT3* продемонстрировали повышенную устойчивость к заражению некротрофным патогеном *A. brassicicola* (Choi et al., 2010). Более того, трансгенная сверхэкспрессия гена *ARR2* повысила устойчивость за счет снижения споруляции *A. brassicicola*. Напротив, в случае *35S:CKX4* наблюдалась повышенная восприимчивость к этому патогену (Choi et al., 2010). Аналогичным образом, растения томата с геном IPT под контролем промотора, индуцируемого старением (*SAG12*), показало повышенную защиту от другого некротрофного грибкового патогена, *Botrytis cinerea* (Swartzberg et al., 2008). Растения с более высоким уровнем цитокининов также демонстрируют устойчивость ко многим вирусным патогенам, таким как вирус табачной мозаики, вирус некроза опухолей и вирусы картофеля X и Y (Sano et al., 1994; Masuta et al., 1995; Schnablová et al., 2006; Choi et al., 2011). Кроме того, трансгенные растения, экспрессирующие ген *IPT*, продемонстрировали лучшую защиту от нападения травоядных насекомых (Smigocki et al., 1993; Dervinis et al., 2010; Erb et al., 2012). По принципу обратной связи жасмонат также оказывает

репрессорирующее действие на восприятие цитокининов (Schäfer et al., 2015). Было показано, что ANP5 фосфорилирует (*in vitro*) ключевой транскрипционный фактор MYC2 (JIN1) жасмонатного пути (Yamashino et al., 2003).

1.17 Происхождения цитокининовой TCS

Все больше становится секвенированных геномов растений, не принадлежащих покрытосеменным растениям. Тем самым, стало проще определить происхождение цитокининового сигналинга у растений и, возможно, эволюцию TCS. Самым простым методом для этого был BLAST-поиск компонентов TCS во всех известных базах данных. Этот метод имел определенный успех благодаря тому, что компоненты TCS (CHK, Hpt, RRA и RRB) есть у многих видов нецветковых растений и, возможно, у всех наземных растений.

Таблица 1. Количество компонентов сигналинга цитокининов (из Rashotte, 2021)

Plant Group	Species	CHK	Hpt*	RRB	RRA
Eudicot	<i>Arabidopsis thaliana</i> ⁶	3	6(5/1)	15	10
Monocot	<i>Oryza sativa</i> – <i>Japonica</i> group ⁶	4	5(2/3)	10	13
Basal Angiosperm	<i>Amborella trichopoda</i> ⁶	2	4(3/1)	6	4
Gymnosperm	<i>Picea abies</i> ⁶	2	7(5/2)	7	12
Gymnosperm	<i>Pinus taeda</i> ⁶	3	3(3/0)	9	13
Lycophyte	<i>Selagenella moellendorffii</i> ⁶	2	2	10	3
Moss	<i>Physcomitrella patens</i> ^{6,7}	11 (3+8**)	2	7	5
Hornwort	<i>Anthoceros</i> sp. ⁸	1	1	1	1
Liverwort	<i>Marchantia polymorpha</i> ^{6,7}	2	1	1	1
Algae-Charophyte	<i>Klebsormidium (faccidum/nitens)</i> ^(6/7)	9/6	1/1	1/1	3/1
Algae-Charophyte	<i>Chara brauni</i> ⁹	2	1	0	1
Algae-Chlorophyte	<i>Osterococcus tauri</i> ⁹	–	+	+	+
Algae-Chlorophyte	<i>Volvox carteri</i> ⁹	–	+	–	+
Algae-Rhodophyta	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> ⁹	–	–	–	–

Анализ геномов *Physcomitrium. patens* и *Marchantia polymorpha* привел к предположению, что могло бы быть эволюционной отправной точкой для TCS: наличие одного члена на каждом этапе, 1 CHK, 1 Hpt, 1 RRB и 1 RRA (Kaltenegger et al., 2018; Nishiyama et al., 2018; Li et al., 2020). Этот самый минимальный цитокининовый сигнальный путь вероятно у антоцеротовых мхов рода *Anthoceros* (Li et al., 2020). Аналогичное состояние наблюдается и у более изученного

печеночника *M. polymorpha*: 2 СНК, 1 Нрт и по 1 RRB и RRA. Родственный мох *P. patens*, однако, демонстрирует значительное расширение компонентов TCS далеко за пределы минимального количества: 11 СНК, 2 Нрт, 5 RRB, 7 RRA. Неясно, почему в *P. patens* так много СНК, возможно, из-за давления отбора или событий дупликации генома, но это выглядит нехарактерно, поскольку большинство растений имеют 2-4 СНК (Kaltenegger et al., 2018). Одним из интересных результатов является то, что у *P. patens* есть три классических рецептора СНК, описанных ниже, а также восемь неклассических СНК (Таблица 1). Возможно, эти многочисленные неклассические СНК используются для другой функции, хотя это еще предстоит проверить (Gruhn et al., 2014; von Schwartzberg et al., 2016).

Дополнительные исследования выявили четыре типа генов TCS во всех линиях зеленых водорослей (Kaltenegger et al., 2018; Wang et al., 2015; Hori et al., 2014). Филогенетические исследования показывают, что TCS-путь СНК-Нрт-RR, минимально необходимый для цитокининового сигналинга, возник у харофитовых водорослей (Pils & Neyl, 2008; Wang et al., 2015). У хлорофитовых водорослей были обнаружены только фрагменты TCS пути. Например, *Ostreococcus tauri* имеет Нрт, RRA, RRB и гистидинкиназу. Правда, это скорее осмосенсор с *ervZ* доменом (Wang et al., 2015; Urao et al., 2000).

1.18 СНК у других групп живых организмов

Несколько СНК были идентифицированы у ряда групп грибов: жгутиковых (*Blastocladiomycota* и *Chytridomycota*) и нежгутиковыми (*Glomeromycotina* и *Micoromycotina*) (Kabbara et al., 2018; Hérivaux et al., 2017). Интересно, что между этими СНК-содержащие грибы взаимодействуют с растениями, образуя арбускулярную микоризу, являясь эндофитами в корнях и разлагая растительный материал. Правда, надо отметить, что при филогенетическом анализе последовательности СНК грибов группируются отдельно от последовательностей СНК растений. Возможно, предковые виды грибов содержали СНК и, возможно, другие части TCS, чтобы взаимодействовать с растениями, и эта ассоциация была полезной при переходе на сушу для всей группы грибов (Hérivaux et al., 2017).

Хотя известно несколько различных групп бактерий, которые вырабатывают цитокинин, прежде всего *Agrobacterium tumefaciens* и *Rhizobium*, только недавно были обнаружены бактерии, имеющие рецепторы СНК. Было обнаружено, что несколько патогенных для растений бактерий содержат СНК, родственные гену *PcrK* *Xanthomonas campestris* в родах *Pseudomonas*, *Dickeya* и *Xanthomonas* (Wang et al., 2017). Хотя этот СНК-ортолог является несколько необычным по сравнению с большинством растительных СНК, было показано, что *PcrK* способен связываться с растительным цитокинином изопентениладенином (iP), правда в очень высоких концентрациях, и проводить модифицированный сигнал TCS к регулятору ответа (Wang et al., 2017). Более того, *X. campestris* участвует в заражении растений крестоцветных болезнью черной гнили, и без гена рецептора цитокинина *PcrK* вирулентность бактерий снижается (Wang et al., 2017). Не исключено, что эти бактерии таким способом идентифицируют растения-хозяева в ходе своего жизненного цикла.

Помимо наземных растений существуют две совершенно разные фотосинтезирующие группы, в которых также были обнаружены СНК: цианобактерии и бурые водоросли (Kabbara et al., 2019; Frébortová et al., 2017). Цианобактерия *Nostoc* имеет СНК, для которой было исследовано связывание цитокинина. Оказалось, что iP может связываться с этим белком. Правда, аффинность данного связывания была очень низкой, если оно вообще наблюдалось достоверно. Во втором случае СНК была первоначально идентифицирована в мегавирусе *Ectocarpus siliculosus* EsV-1 (Kabbara et al., 2019). Этот вирус нитчатой бурой водоросли *Ectocarpus*. У *Ectocarpus* также был обнаружен этот СНК, который отсутствует у всех других исследованных бурых водорослей, что позволяет предположить, что это вероятный случай горизонтального переноса (Kabbara et al., 2019). Но про цитокининовый ответ у этой водоросли ничего не известно. Так же нет информации о наличии полного пути TCS у бурых и красных водорослей (Wang et al., 2015; Kabbara et al., 2019; Kabbara et al., 2018]. Тем не менее, это хороший пример участия горизонтального переноса частей этой системы.

Существует еще один вид, для которого не только известна СНК, но и проведена значительная работа по ее изучению: это слизевик *Dictyostelium discoideum* (Kabbara et al., 2018; Aoki et al., 2019). Цитокинин изопентениладанин был способен позитивно влиять на пролиферацию клеток в культуре.

1.19 Роль цитокининового сигналинга у мохообразных

Мохообразные определенно отличаются от покрытосеменных по целому ряду признаков. Помимо очевидного отсутствия цветов и настоящей сосудистой системы с ксилемой и флоэмой, у них нет ни корней, ни листьев. Важнейшим отличием является природа доминирующей формы в жизненном цикле. У мохообразных – это гаметофит, а у всех остальных наземных растений, включая покрытосеменные, – это спорофит.

Хотя цитокинин необходим мхам, таким как *P. patens*, чтобы пройти жизненный цикл от стадии нитевидной протонемы до формирования почек, что приводит к образованию "листовидного" гаметофора, похожего на растительный, который затем сможет производить споры (von Schwartzenberg et al., 2007), гены TCS, связанные с этим, не были хорошо изучены. В одном из исследований (von Schwartzenberg et al., 2016) изучались последствия отключения трех классических рецепторов СНК, которые, по-видимому, наиболее функционально ортологичны СНК покрытосеменных. Почти каждая стадия развития была изменена при нокауте нескольких СНК. PpСНК1 и PpСНК2 необходимы для нормального роста и общего размера колонии на стадии протонемы, а также гаметофора, в дополнение к формированию почек и спор - критических стадий жизненного цикла (von Schwartzenberg et al., 2016). При этом и PpСНК3 также важен для роста гаметофора и образования спор и существенно в меньшей степени вовлечен в другие стадии. Хотя трудно установить прямые связи между этими стадиями развития мхов и покрытосеменных в каждой из них есть четкие связи с ростом, вероятно, через регуляцию меристем. Регуляцию образования спор у мхов также трудно напрямую сравнить, однако образование гаметофита из спорофита регулируются

компонентами TCS у покрытосеменных, что указывает на потенциально консервативную регуляцию переходов развития при смене поколений.

За последние несколько лет было опубликовано три исследования, в которых непосредственно изучались регуляторы ответа в модельном печеночнике *M. polymorpha* [44-46]. *M. polymorpha* имеет очень простой путь TCS с 2 СНК, 1 Нрт, 1 RRA и 1 RRB (табл. 1). Поскольку многие растения имеют большее число RRA и RRB, вероятно, из-за дублирования и диверсификации функций, система с одним членом RRA и RRB является идеальной для изучения их функций (Kaltenegger et al., 2018). Было обнаружено что RR MpRRA и MpRRB отвечают за контроль многих цитокинин-регулируемых процессов развития у этого вида (Flores-Sandoval et al., 2016; Aki et al., 2019). Кроме того, анализ репортерных линий *MpRRA* и *MpRRB* показывает экспрессию этих генов в тех же регионах, где регулируется развитие (Aki et al., 2019). Каждый RR необходим для общего роста и нормального развития таллома. Апикальная клетка, ответственная за рост таллома, в значительной степени ортологична побеговой апикальной меристеме покрытосеменных. И ее функционирование регулируется цитокинином. MpRR также необходимы для нормального формирования ризоидов (Aki et al., 2019). MpRRA и MpRRB также необходимы для регуляции развития чашечек геммы, используемых для вегетативного размножения (Flores-Sandoval et al., 2016; Aki et al., 2019). *MpRRA* и *MpRRB* экспрессируются в спорообразующих структурах, что также потенциально связывает цитокинин с репродуктивным развитием. Важно также отметить, что морфологические изменения, наблюдаемые в процессе развития при изменении *MpRRA* и *MpRRB*, параллельны изменениям, обнаруженным при изменении уровня цитокинина в растениях. Такие изменения наблюдались как при добавлении цитокинина в среду выращивания *M. polymorpha*, так и при сверхэкспрессии цитокининоксидазы *MpCKX2* (Aki et al., 2019). Эти результаты показывают, что эффекты роста и развития, регулируемые MpRRA и MpRRB, действительно являются цитокинин-регулируемыми эффектами и функционально контролируются этими компонентами пути TCS.

5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Методы рекомбинантной ДНК

Таблица 2. Праймеры, использованные в данном исследовании. Подчеркнутые нуклеотиды обозначают сайты рестрикции или сайты рекомбинации att, соответственно.

Purpose	Gene	Primer name	Sequence (5' – 3')
GATEWAY® cloning of receptor-promoters	<i>AHK2</i>	AHK2 <i>att</i> B4	GGGGACAAC <u>TTTGTATAGAAAAGTTGGT</u> TTTTTCGCATATGCCAC
		AHK2 <i>att</i> B1r	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGTTCGACTCCTAAITCAGATTC
	<i>AHK3</i>	AHK3 <i>att</i> B4	GGGGACAAC <u>TTTGTATAGAAAAGTTGA</u> ACCCTGGACGATTTGCAT
		AHK3 <i>att</i> B1r	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCACCACCTTGAATACACG
GATEWAY® cloning of receptors	<i>AHK2</i>	gAHK2 <i>att</i> B1 fw	<u>AAAAAGCAGGCTT</u> AATGCTATAACTTGTGAGCTC
		gAHK2 <i>att</i> B2 rv	<u>AGAAAGCTGGGT</u> ATTAACAAGGTTCAAAG
		gAHK2 <i>att</i> B2 rv w/o stop codon	<u>AGAAAGCTGGGT</u> ACAAGGTTCAAAGAATC
	<i>AHK3</i>	AHK3 <i>att</i> B1 fw	<u>AAAAAGCAGGCTT</u> GATGAGTCTGTCCATG
		AHK3 <i>att</i> B2 rv	<u>AGAAAGCTGGGT</u> ATATGATCTGTATCTG
	<i>CRE1/AHK4</i>	CRE1/AHK4 <i>att</i> B1 fw	<u>AAAAAGCAGGCTT</u> CGCTTTGATCTGTGGATCATCATTG
CRE1/AHK4 <i>att</i> B2 rv		<u>AGAAAGCTGGGT</u> TACAGTATAATAACCCACCAA	
GATEWAY® cloning of 4x Myc-tag	<i>4xMyc</i>	4xMyc <i>att</i> B2r	<u>TTGTACAAAGTGGCGGGT</u> TAATTAACGGTGAACAAAAG
		4xMyc <i>att</i> B3	<u>GTATAATAAAAGTTGCT</u> TAGTACCGTTCAAGTCTTCCTCG
GATEWAY® cloning adapter primers	-	<i>att</i> B1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
		<i>att</i> B2 rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
Multisite GATEWAY® cloning adapter primers	-	<i>att</i> B2r	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCG
		<i>att</i> B3	GGGGACAAC <u>TTTGTATAATAAAAGTTGC</u>
Site-directed mutagenesis to remove stop codon	<i>CRE1/AHK4</i>	CRE1/AHK4 stop mutagenesis fw	CACCTTCGTCGCATACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG
		CRE1/AHK4 stop mutagenesis rv	CCACTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCCGACGAAGGTG
	<i>AHK3</i>	AHK3 stop mutagenesis fw	GATACAGAATCAGCATACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG
		AHK3 stop mutagenesis rv	CCAACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCTGATCTGTATC
Cloning of <i>gAHK2</i> for BiFC analysis	<i>AHK2</i>	gAHK2 <i>Sst</i> I fw	GTCACA <u>AGGCCT</u> ATGCTATAACTTGTGAGCTCTTG
		gAHK2 <i>Bam</i> HI rv	GTCACAGGATCCACAAGGTTCAAAGAATCTTGCTAC

Кодирующую область цитокининового рецептора *AHK4/CRE1 (At2g01830.1)* амплифицировали методом ПЦР с использованием библиотеки кДНК из *Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) C24* в качестве шаблона и клонировали в Gateway entry vector pDONR201 с помощью реакции рекомбинации ВР (Invitrogen). Кодирующая последовательность *AHK3 (At1g27320.1)* была амплифицирована с помощью ПЦР с обратной транскрипцией на общей РНК, выделенной из листьев арабидопсиса экотипа Columbia, с использованием соответствующих праймеров (Таблица 2) и клонирована в вектор pDONR222. *AHK2 (At5g35750.1)* амплифицировали со стоп-кодоном из геномной ДНК бактериальной искусственной хромосомы клона МХН1

(Liu et al., 1995) с использованием соответствующих праймеров, клонировали в pDONR221. Для конструирования С-концевых химерных конструкций АНК2 и АНК3 с GFP или 4×Мус-тагом стоп-кодона удаляли путем сайт-направленного мутагенеза с использованием набора Quick Change II (Stratagene).

Промоторы были клонированы в вектор pDONRP4-P1R с помощью технологии клонирования MultiSite GATEWAY® (Invitrogen) с использованием соответствующих праймеров:

$P_{АНК2-fw}$, ggggacaactttgtatagaaagttgTTTTTTTCGCATATGCCAC;

$P_{АНК2-rv}$, ggggactgctttttgtgtacaaactgTTCGACTCCTAATCTCAGATTС;

$P_{АНК3-fw}$, ggggacaac tttgtatagaaagttgAACCCCTGGACGATTTTGCAT;

$P_{АНК3-rv}$, ggggactgctttttgtgtacaaactgCCACCACTTGAATACACG;

$P_{АНК4-fw}$, ggggacaactttgtatagaaagttgCTTTCTCTCGGAAGAGCACAATG;

$P_{АНК4-rv}$, ggggactgctttttgtgtacaaactgATCTGAGCTACAACAATAGAG.

Последовательности в праймерах, написанные строчными буквами, обозначают сайты рекомбинации вектора GATEWAY®.

АНК2 и АНК3 были соединены с 4× меткой Мус, а сами гены были поставлены под контроль их собственных промоторов. Для клонирования использовали набор MultiSite Gateway Three Fragment Vector Construction Kit, а реакции рекомбинации проводили в соответствии с инструкцией производителя (Invitrogen). Метка 4× Мус была амплифицирована в двухэтапной ПЦР из бинарного вектора pGWB17 (Nakagawa et al., 2007) с использованием соответствующих праймеров и рекомбинирована в вектор pDONR P2R-P3. Все три фрагмента (промотор, ген и метка) были перенесены в целевой вектор pB7m34GW (Karimi et al., 2005) для получения $P_{АНК2}:АНК2-Мус$ и $P_{АНК3}:АНК3-Мус$.

Для исследований транзientной экспрессии GFP в табаке (*Nicotiana benthamiana*), АНК3 и CRE1/АНК4 были переклонированы в целевые векторы pB7FWG2 и pB7WGF2 (Karimi et al., 2002), где целевые последовательности слиты с GFP на С- и N-концах, соответственно, и находились под контролем промотора конститутивного промотора 35S. Геномный фрагмент АНК2 был также

амплифицирован без стоп-кодона и затем клонирован в векторы pSPYNE-35S и pSPYCE-35S (Walter et al., 2004), где он был соединен с с N- и С-концевыми фрагментами YFP, соответственно, на С-конце и использовался для BiFC анализа.

Штамм *E. coli* KMI001 К-12 [*rcsC::Kmr*, *wza::lacZ* (*cps*-оперон), $\Delta RcsC$] (Suzuki et al., 2001) трансформировали плазмидой pIN-III A3, содержащей рамки считывания генов рецепторов цитокинина кукурузы *ZmHK1*, *ZmHK2* или *ZmHK3a* (Yonekura-Sakakibara et al., 2004). Кодированные области *ZmHK1*, *ZmHK2* и *ZmHK3a* были амплифицированы методом ПЦР с праймерами 5'-CTGATCAGATGGGGGGCAAGTACC-3' и 5'-CCTCGAGTCAAACAGCCGAATCT-3' для *ZmHK1*, 5'-CGGATCCAATGACCGTTACGGCG-3' и 5'-CCTCGAGCTACTGAACTTGGTCT-3' для *ZmHK2*, и 5'-GAAGATCTGATGGTTCCGAACGGA-3' и 5'-CCTCGAGTTATTCTATTTTCATCAG-3' для *ZmHK3a*, и клонированы в pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). BclI/XhoI фрагмент *ZmHK1*, BamHI/XhoI фрагмент *ZmHK2* и BglII/XhoI фрагмент *ZmHK3a* были лигированы в сайт BamHI/SalI вектора pIN-III A3. В работе использовали так же конструкции pSTV28-АНК3 и pIN-III A3-АНК4 (Spíchal et al., 2004; Miwa et al., 2007).

Для создания экспрессионного вектора pB7FWG2-ZmHK1 последовательность АНК3 была удалена из pB7FWG2-АНК3 в сайтах BcuI/EcoRI. Кодированная область *ZmHK1* была амплифицирована методом ПЦР с использованием праймеров F (*ZmHK1/BcuI*) 5'-GTGCGACTAGTAAAATGGGGGGGGCAAGTA-3' и R (*ZmHK1/EcoRI*) 5'-ATCGAATTCCCAACCTCTTGAGGTGAT-3', и вектор pINIII A3(ΔЕН)-ZmHK1 в качестве шаблона, и лигировали в вектор pB7FWG2. Конструкции на основе вектора pB7FWG2 кодировали рецепторы, слитые на своем С-конце с флуоресцентным eGFP (Karimi et al., 2007). Геномная последовательность АНК4 была амплифицирована методом ПЦР из клона бактериальной искусственной хромосомы (BAC) T23K3 с использованием праймеров F (АНК4/XbaI) 5'-ACGTCTAGAATGAGAAGAGATTTTTGTG-3' и R (АНК4/Cfr9I) 5'-ATCCCGGCGACGAAGGTGAGAT-3', и

лигированы в векторы pSPYNE и pSPYCE. Все гены рецепторов были расположены под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV).

Трансформация *Escherichia coli* осуществлялась упрощенным методом теплового шока и хлорида кальция, а трансформация *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101) - методом замораживания-оттаивания.

Для транзientной трансформации протопластов вся рамка считывания *ZmHK1* была амплифицирована методом ПЦР с праймерами 5'-GCGTCGACATGGGGGGGGGGCAAGT-3' и 5'-CGCCCATGGAAGATCCTCCTCCAACAGCCGAATCTGT-3' и клонирована в pCR-BluntII-TOPO. Фрагмент SalI/NcoI был лигирован в вектор pCaMV35S-sGFP(S65T)-NOS (Sheen et al., 1995; Niwa et al., 1999) для слияния карбоксильного конца с геном GFP (обозначается *ZmHK1-GFP*). Последовательность линкера (Gly-Gly-Gly-Ser) была вставлена в сайт конъюгации между *ZmHK* и GFP. Также были сконструирована последовательность *ZmHK1 Met1 - Glu347* и GFP, и она обозначена как *ZmHK1TM-GFP*. Плазмиды были трансформированы в суспензионные культивируемые клетки кукурузы методом с использованием полиэтиленгликоля (Lyznik & Hodges, 1994). После ночной инкубации при 26 °C в темноте транзientная экспрессия детектировалась с помощью конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии (Fluoview IX5, Olympus). *Ara6-GFP* (N34-GFP) (Ueda et al., 2001) и [эндо-ксилоглюкантрансфераза]-GFP-[сигнал для локализации в ЭР] (SP-GFP-HDEL, pNMG3) (Takeuchi et al., 2000) были использованы в качестве маркеров плазматической мембраны и ЭР, соответственно.

В случае рецептора кукурузы для генерации стабильных трансформантов вся последовательность [CaMV 35S промотор]-[*ZmHK1TM-GFP*]-[Nos терминатор] была лигирована в сайт BamHI/EcoRI в pTH2 (Chiu et al., 1996).

В случае рецепторов картофеля использовали сорт Désirée. Растения размножали методом клонирования *in vitro* на агарозной среде Мурашиги и Скуга (MS), дополненной 1,5% сахарозы, при 20 °C и 16-часовом фотопериоде в контролируемой климатической камере с освещением люминесцентным белым

светом (Kolachevskaya et al., 2015). Тотальную РНК выделяли из отдельных побегов картофеля и обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific), не содержащей РНК. Обратную транскрипцию проводили с помощью RevertAid™ в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Общая ДНК была выделена из побегов отдельных растений с помощью метода ЦТАВ. Полученные кДНК и общая ДНК были использованы для амплификации генов, кодирующих предсказанные цитокининовые рецепторы картофеля, с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Дизайн праймеров был выполнен для амплификации полноразмерных и укороченных (сенсорные модули с фланкирующими трансмембранными доменами) CDS рецепторов цитокининов в соответствии с последовательностями в NCBI GenBank, а именно XM_015303261.1, XM_006352114.2 и XM_006354988.2. Последовательности праймеров приведены в таблице 3.

Таблица 3. Праймеры, использованные при клонировании рецепторов цитокининов картофеля.

Primer pair name	Single primer name	Primer sequences (5' – 3')
StHK2_cloning	StHK2_LP1	GCTTTTCTGCTCTGGGTG
	StHK2_RP3	TCAACCTGACCCGAAGAAG
StHK3_cloning	StHK3_LP1	GGGTTTGGTTTGAAATTGGG
	StHK3_RP3	GGTATTCTGAGTTGGCTTG
StHK4_cloning	StHK4_LP1	ATGGGTGAGAAGATGCAAAGCC
	StHK4_RP3	CTATTTGTCCGAGTTAGGCTTGG
StHK2_sensor module	StHK2_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGGCTCTTGTTATCTTTGTTATTG
	CHASE StHK2_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAAGCATGGAAGATATGACC
StHK3_sensor module	StHK3_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGCTTTTGATAGTATG
	CHASE StHK3_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAATAATTTGCCCTATAAGC
StHK2_full length	StHK2_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGAGCTTTTCTGCTCTGGGTG
	StHK2_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAACCTGACCCGAAGAAG
StHK3_full length	StHK3_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGAGTTTGTTCATGTTATTGGG
	StHK3_attB2	TTTGGTTTGAAA ACAAGAAAGCTGGGTTAGGTATTCTGAGTTGG
GATEWAY_standard primers	attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	attB2	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA
StHK4_truncated	StHK4_BcuI	ACTAGTATGGGTGAGAAGATGCAAAGCC
	StHK4_EcoRI	AGGAATTCCAAGTCTCTTCAGATGGTATC
StHK2_COLD	StHK2_XhoI	ATATCTCGAGATGAGCTTTTCTGCTCTGGG
	StHK2_NheI	TATGCTAGCTCAACCTGACCCGAAGAAGC
StHK4_COLD	StHK4_SacI	AAAGAGCTCATGGGTGAGAAGATGCAAAGCC
	StHK4_EcoRIa	GAATTCCTATTTGTCCGAGTTAGGCTTGG

Продукты ПЦР очищали в геле и клонировали с помощью набора для клонирования продуктов ПЦР (Thermo Fisher Scientific) в плазмиду pJET1.2/blunt в соответствии с инструкциями производителя с последующей трансформацией штамма *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen). *StHK4* был амплифицирован с использованием праймеров *StHK4_truncated*. Продукт был вставлен в конструкцию pB7FWG2-АНК3 вместо АНК3. Последний был удален по сайтам рестрикции *BcuI* и *EcoRI*. Нуклеотидные последовательности клонированных генов были подтверждены секвенированием ДНК.

Последовательности *StHK2* и *StHK3* были субклонированы в плазмиду pDONR_{TM}221 в реакции BP с использованием ферментной смеси Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific). Затем, используя реакцию LR с ферментом LR Clonase® II Plus (Thermo Fisher Scientific), клонированную последовательность переносили в экспрессионный вектор pB7FWG2 (Karimi et al., 2007), где она соединялась на 3'-конце с геном eGFP. Для экспрессии в *E. coli StHK2* и *StHK4* были амплифицированы с использованием праймеров *StHK2_COLD* и *StHK4_COLD*, соответственно (Таблица 3). Затем продукт был вставлен в плазмиду pCOLD IV (Takara Bio Inc.) по сайтам рестрикции *XhoI* и *XbaI* для *StHK2* и *SacI* и *EcoRI* для *StHK4* с последующей трансформацией штамма *E. coli* DH10B.

Таблица 4. Праймеры, использованные для работы с фосфотрансмиттерами

Primer name	Primer sequence
F <i>AHP1/BcuI</i>	5`-GCCACTAGTATGGATTTGGTTCAG-3`
R <i>AHP1/XhoI</i>	5`-CTCGAGAGATCCACCACCTCCACCAAATCCGAGTTCGAC-3`
F <i>AHP2/BcuI</i>	5`-GCCACTAGTATGGACGCTCTCAT-3`
R <i>AHP2/XhoI</i>	5`-GCCCTCGAGGTTAATATCCACTTGA-3`
F <i>AHP3/BcuI</i>	5`-GCCACTAGTATGGACACACTCATT-3`
R <i>AHP3/XhoI</i>	5`-ATCTCGAGAGATCCACCACCTCCACCTATATCCACTTGAGG-3`
F <i>AHP1/NcoI</i>	5`-TAACCATGGGGTGGAGGTGGTGGATCTATGGATTTGGTTCAG-3`
R <i>AHP1/BamHI</i>	5`-AAGGATCCTCAAATCCGAGTTCGACG-3`
F <i>AHP3/NcoI</i>	5`-TAACCATGGGGTGGAGGTGGTGGATCTATGGACACACTCATT-3`
R <i>AHP3/BamHI</i>	5`-AGGGATCCTTATATATCCACTTGAGGG-3`

AHP1, *AHP2*, *AHP3* были амплифицированы методом ПЦР (Таблица 4) из кДНК *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и pDEST_{TM}15-AHP2 (Dortay et al. 2006) и

лигированы в pSPYNE-35S и pSPYCE-35S. Для экспрессии *AHP* в *Escherichia coli* гены *AHP1* и *AHP3* были амплифицированы методом ПЦР (Таблица 4) из кДНК *Arabidopsis* и лигированы в pDEST_{TM}15 (Invitrogen), заменив *AHP2* в pDEST_{TM}15-*AHP2*. pDEST_{TM}15-*AHP1*, pDEST_{TM}15-*AHP2* и pDEST_{TM}15-*AHP3* были использованы для трансформации *E. coli* (штамм *BL21(DE3)pLysE*).

Выделение РНК из растений ели проводили в соответствии с методом (Kolosova et al., 2004) с некоторыми изменениями (Pashkovskiy et al., 2019). Для выделения РНК использовали следующий буфер: 200 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 1,5% додецилсульфат лития, 300 мМ LiCl, 10 мМ динатриевая соль ЭДТА, 1% дезоксихолат натрия, 1% Tergitol Nonidet® (Shell Chemicals, Гаага, Нидерланды) Р-40 (NP40) и, непосредственно перед использованием, добавляли 5 мМ тиомочевину, 1 мМ ауринтрикарбоновую кислоту, 10 мМ дитиотреитол и 2% поливинилпирролидон. Растительную ткань (200 мг) измельчали в жидком азоте и полученный порошок энергично встряхивали с 1,5 мл буфера для экстракции. Суспензия была моментально заморожена в жидком азоте. После оттаивания на льду экстракт центрифугировали при 8000 g в течение 60 мин при 4°C. Затем к супернатанту добавляли 40 мкл 3,3 М ацетата натрия (рН 6.1) и 100 мкл 100% этанола, после чего смесь охлаждали на льду в течение 10 мин. Полисахариды осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин при 4°C. Для осаждения нуклеиновых кислот добавляли 100 мкл 3.3 М ацетата натрия и доводили до полного заполнения пробирки ледяным изопропанолом, после чего суспензию оставляли при -20°C на 24 ч. Нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием в течение 60 мин при 3000g при 4°C, ресуспендировали в 600 мкл ТЕ (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ ЭДТА) и 600 мкл 5 М NaCl и выдерживали на льду в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Затем образцы смешивали с 300 мкл 10% цетилтриметиламмоний бромидом при комнатной температуре и инкубировали в течение 5 мин при 65°C для удаления остаточных полисахаридов. Смеси экстрагировали равным объемом хлороформа/изоамилового спирта (24:1, v/v), доводили до полной пробирки 10 М LiCl, перемешивали и выдерживали при 4°C в

течение ночи. РНК осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 60 мин при 4°C, осадок промывали в 100% этаноле, сушили и растворяли в 20 мкл ТЕ-буфера на льду.

Синтез кДНК проводили с использованием 250 нг общей РНК, набора для обратной транскриптазы M-MLV (Fermentas, Канада) и праймера oligo (dT) 21 в соответствии с инструкциями производителя. Последовательности сенсорных модулей рецепторов амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) и клонировали в плазмиду pJET1.2 с помощью CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific).

Таблица 5. Праймеры, использованные при клонировании рецепторов внешних групп растений.

Primer name	Primer sequences (5' – 3')
PpCHK3SM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGGTTTTTCGTTTTCTGGGTGG
PpCHK3SM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAGAGATTTTCGCTATGACAGC
PaCHK1SM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGTTGTTTCGTTCTGTGG
PaCHK1SM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAGTATATTATGTGACC
PaCHK2SM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGTTGATTTCTGTGGGTGTTTG
PaCHK2SM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTATATGTGCCCAACTAACAGAGC
PpCHK4SM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGGTGCTAGTCGTCGTG
PpCHK4SM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAGAGCACTAGGTAGAC
SmCHK4aSM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGTATCACGGCAAGCTG
SmCHK4aSM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTAGATTTGAGCCACCAG
SmCHK6SM_attB1	TACAAAAAAGCAGGCTTGATGTGGTATGGAACGCTAC
SmCHK6SM_attB2	ACAAGAAAGCTGGGTACAATATATGACCCACC
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA

Клонирование проводилось с использованием системы GATEWAY™ в соответствии с протоколами производителя. кДНК PpCHK1-3 были получены (von Schwartzenberg et al., 2016; Gruhn et al., 2014). Последовательности ДНК, кодирующие сенсорные модули со смежными трансмембранными доменами (SM + TM) из генов *CHK* PpCHK3, PaCHK1 и PaCHK2 были амплифицированы с использованием соответствующих пар праймеров (Таблица 5). ДНК-последовательности SM + TM предполагаемых рецепторов PpCHK4, SmCHK4a и SmCHK6 были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия) и

амплифицированы в двухстадийной ПЦР (праймеры см. в таблице 5). Кодированная последовательность была перенесена путем рекомбинации *in vitro* в целевые векторы pK7WGF2 (PpCHK1 и 2) и pB7FWG2 (все остальные); в этих конструкциях репортерный ген GFP был слит с геном CHK на его 5'- или 3'-конце, соответственно.

2.2 Выделение бактериальных сферопластов

Трансформанты выращивали в жидкой среде Лурия-Бертани с 50 мкг/мл ампициллина. Для индукции экспрессии цитокининовых рецепторов *E. coli*, трансформированные *ZmHK1* и *ZmHK2*, выращивали в присутствии 250 мкМ изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в течение 16 ч при 24°C на шейкере при 150 об/мин. *ZmHK3a*-трансформированные клетки выращивали в присутствии 25 мкМ ИПТГ без встряхивания в течение 24 ч, а затем при встряхивании при 100 об/мин в течение 16 ч.

40 мл бактериальной суспензии осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g при 4°C. Осадок повторно суспендировали в 4 мл 0,1 М Tris-HCl (pH 7,4) и 18% (w/v) сахарозы и центрифугировали при 4000 g при 4°C. Осадок повторно суспендировали в 2 мл 0,1 М Tris-HCl (pH 7,4) и 10% (w/v) сахарозы, затем добавили 2 мл 0,2 мг/мл лизоцима в 4 мМ ЭДТА (pH 7,4). После перемешивания суспензию инкубировали на льду в течение 15 мин, а затем центрифугировали при 4000 g при 4°C. Осадок сферопластов повторно суспендировали в 35 мл 50 мМ MES-KOH (pH 7), 150 мМ NaCl, 32 мМ KCl и 27 мМ NH₄Cl для использования в экспериментах по связыванию.

2.3 Транзиентная экспрессия генов рецепторов в растениях табака

Транзиентную трансформацию листьев табака (*Nicotiana benthamiana*) проводили согласно Sparkes et al. (2006). *Agrobacterium tumefaciens*, несущие гены рецепторов цитокинина, слитые с репортерными последовательностями, и хелперный штамм p19 (Voinnet et al., 2003) выращивали в течение 1-2 дней при 28°C в 1 мл среды LB в качестве предварительной культуры. Затем 50 мл среды LB инокулировали 0,5 мл прекультуры и инкубировали в течение 16 ч при 28°C. Бактерии осаждали в течение 5 мин при 10000 g при комнатной температуре и

ресуспендировали в инфльтрационном буфере (10 мМ MES-КОН, рН 5,7, 10 мМ MgCl₂, 0,15 мМ ацетосирингона), затем снова осаждали в течение 3 мин при 10000 g и ресуспендировали в 5 мл инфльтрационного буфера. Растения табака *N. benthamiana* выращивали в почве при температуре 25°C в условиях длинного дня (16 ч света/8 ч темноты). Использовали растения табака в возрасте 5-6 недель. Для инфльтрации листьев табака использовали следующий набор бактериальных суспензий: pB7FWG2-АНК3-GFP (OD600 ~0,7) и p19 (OD600 ~1,0) для анализа фосфотрансфера АНК-АНР; pSPYNE-35S-АНК/ АНР (OD600 ~0. 7), pSPYCE-35S-АНК/АНР (OD600 ~0.7) и штамм p19 (OD600 ~1.0) для бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC); и *P_{АНК3}:АНК3-Мус* (OD600 ~0.3) и p19 (OD600 ~0.1) для эксперимента защиты от протеазы. В качестве контроля локализации в ЭР, некоторые эксперименты BiFC проводились в сочетании с маркером ЭР CD3-959 (WAK2-mCherry-HDEL) (Nelson et al. 2007). Экспрессию генов и взаимодействие соответствующих белков в BiFC определяли через 3-5 дней после инфльтрации с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) или с помощью инвертированного флуоресцентного конфокального микроскопа Leica DMI 6000 CS, оснащенного блоком лазерного сканирования Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) и работающего с прикладным программным обеспечением Leica. Все изображения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии были получены с помощью водно-иммерсионного объектива HC PL APO 20X/0,70 IMM CORR при постоянных условиях визуализации (т.е. усиление, смещение и время экспозиции). Сигнал GFP получали путем возбуждения при 488 нм и детектирования в диапазоне 500-530 нм. Флуоресценция YFP была получена путем возбуждения при 514 нм и детекции в диапазоне 520-550 нм. Сигнал mCherry получали возбуждением при 561 нм и детекцией в диапазоне 580-640 нм. Для окрашивания ПМ и ядер листья табака инфльтровали красителями FM4-64 (Invitrogen) или 40,6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI) (Sigma) в концентрациях 50 мМ и 50 мг мл⁻¹ соответственно. Использовались следующие

линии возбуждения и диапазоны обнаружения: FM4-64, 488 нм и 625-665 нм; DAPI, 790 нм (двухфотонное возбуждение) и 400-470 нм.

2.4 Растительный материал и условия роста

Arabidopsis thaliana экотипа Columbia (Col-0) был использован в качестве дикого типа. Мутантные линии рецепторов, содержащие аллели *ahk2-5*, *ahk3-7* и *cre1-2*, были описаны Riefler et al. (2006). Репортерная линия *P_{ARR5}:GUS* была описана D'Agostino et al. (2000) и введена в рецепторный мутантный фон путем скрещивания. Эксперименты проводили с растениями, гомозиготными по репортерному гену. Если не указано иное, растения выращивали на почве или *in vitro* на среде MS, модифицированной Kempfer et al. (1992), при температуре 22°C и фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота. Для анализов *in vitro* семена стерилизовали поверхностно и яровизировали перед переносом в камеру для выращивания растений.

Семена кукурузы (*Zea mays* L., Ross 197 AMV) проращивали в темноте при 28°C на влажной фильтровальной бумаге. Корни собирали через 4 дня после прорастания. Для экспериментов с листьями растения кукурузы выращивали в почве в течение 2 недель при 28°C, 16/8 ч свет/темнота в камере для выращивания растений.

Для опытов с протопластами кукурузы суспензионную линию клеток Z86 (Kawaguchi et al., 1991) выращивали в среде Мурашиге-Скуга (Murashige & Skoog, 1962) с добавками в виде 3% сахарозы, 1 мкг мл⁻¹ тиамина, 20 мкг мл⁻¹ КН₂РО₄, 100 мкг мл⁻¹ мио-инозитола и 1 мкг мл⁻¹ 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, рН 5.6 при 25°C при встряхивании (120 об/мин) в темноте.

2.5 Трансформация растений

Трансгенные растения *Arabidopsis* были получены методом опускания соцветий в агробактериальную суспензию (Clough & Bent, 1998) с использованием *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101. Трансформированные проростки селектировали на среде, содержащей 10 мкг мл⁻¹ фосфинотрицина, или на почве, опрысканной гербицидным раствором BASTA (0,1%; Bayer CropScience).

2.6 Выделение микросомальной фракции растительных мембран

Все манипуляции проводили при температуре 4°C. Листья табака гомогенизировали в буфере, содержащем 300 мМ сахарозы, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 10 мМ Na₂-ЭДТА, 0,6% поливинилпирролидона К30, 5 мМ K₂S₂O₅, 5 мМ дитиотреитола (ДТТ) и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Гомогенат фильтровали через Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA), фильтрат центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g. Затем супернатант центрифугировали в течение 30 мин при 100000 g. Осадок микросом ресуспендировали в 10 мМ фосфатно-буферном солевом растворе (PBS; pH 7.4) или специальной среде (см. ниже) для изучения зависимости pH. После замораживания суспензию микросом можно хранить при температуре -70°C.

Применяли и упрощенный метод. Листья табака через 6 дней после инфильтрации гомогенизировали в буфере (3 мл на 1 г свежего веса), содержащем 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 2 мМ Na₂-ЭДТА, 50 мМ KCl, 1 мМ ДТТ и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат фильтровали через Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA), фильтрат центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. Затем супернатант центрифугировали в течение 40 мин при 15000 g. Осадок микросом ресуспендировали в растворе 50 мМ KCl и 10% глицерина, и суспензию микросом хранили при -70°C.

2.7 Фракционирование мембран при анализе субклеточной локализации рецепторов кукурузы

Растительный материал гомогенизировали в блендере Waring с двукратным количеством буфера: 50 мМ Tris (pH 7.6 при 22°C), 20% глицерина, 150 мМ NaCl с 2 мМ ЭДТА (для последующего разделения в градиенте сахарозы без Mg²⁺ и двухфазного разделения) или с 5 мМ MgCl₂ (для последующего разделения в градиенте сахарозы в присутствии Mg²⁺) (Chen et al., 2002), с незначительными изменениями). Ингибиторы протеаз [15 мкМ леупептина, 1 мкМ пепстатина А и 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF)] добавляли из исходных растворов непосредственно перед гомогенизацией. Гомогенат фильтровали через два слоя

Miracloth (Calbiochem). Фильтрат дважды центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4 °С, а надосадочную жидкость снова центрифугировали при 100000 g в течение 30 мин при 4°С. Полученные осадки микросом повторно суспендировали в 10 мл фазового буфера [250 mM сахарозы, 5 mM К-фосфатного буфера pH 7.8, 2 mM дитиотреитола (DTT)] для двухфазного разделения в водной полимерной системе или в 10 mM Tris (pH 7,6 при 22°С), 10% сахарозы, 1 mM DTT с 2 mM ЭДТА или 5 mM MgCl₂ для фракционирования в градиенте сахарозы. осадок повторно суспендировали с помощью стеклянного гомогенизатора (для дальнейшего фракционирования) или пипетированием (для анализа связывания в самой фракции микросом).

Для водного двухфазного разделения (Hodges & Mills, 1988) суспензию микросом добавляли к полимерному двухфазному раствору. Двухфазная система (6.2%) состояла из 12.4 г 20% (w/w) декстрана 500000, 6.2 г 40% (w/w) полиэтиленгликоля 3350, 7.5 мл 1 M сахарозы в 20 mM К-фосфатном буфере, 1 мл 0.8 M NaCl, 10 мл суспензии мембран в фазовом буфере, и была отрегулирована водой до 40 г общего веса. После перемешивания пробирки с двухфазными смесями центрифугировали с помощью бакетного ротора при 1500 g в течение 10 мин при 4°С. Те же смеси, но без клеточных мембран (пустые пробирки) центрифугировались параллельно и использовались в следующих операциях. Верхние фазы из проб с суспензией мембран переносили в новые пробирки, и к каждой фазе добавляли ее аналог из пустой пробирки. Разделение проводили три раза, используя чистые растворы верхней и нижней фаз (без мембран), полученные параллельно на том же этапе центрифугирования. Затем очищенные верхнюю (U3, обогащенную плазматической мембраной) и нижнюю (L3, обогащенную ЭР) фазы разбавляли в 10 раз фазовым буфером и центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч при 4°С. Осадки повторно суспендировали в буфере для связывания (50 mM MES-KOH pH 7, 150 mM NaCl, 32 mM KCl, 27 mM NH₄Cl) и использовали в экспериментах по связыванию. Нижние фазы обычно содержали в 15-25 раз больше белка, чем верхние.

При фракционировании мембран в градиенте плотности сахарозы, аналогично, все процедуры проводились при 4°C. Примерно 100 г корней промывали холодной деионизированной водой и нарезали на сегменты длиной около 2 мм. Сегменты гомогенизировали с помощью Polytron (Kinematica) в течение 30 с в 2 об. (w/v) буфера А (10 мМ Tris-MES, рН 7.5, 250 мМ сахарозы, 1 мМ EDTA, 2.5 мМ DTT, 0.5 мМ PMSF, 1% PolyclarVT). Гомогенат фильтровали через два слоя Miracloth (Calbiochem) и центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Оставшийся супернатант дополнительно центрифугировали при 100000 g в течение 30 мин. Микросомальную фракцию повторно суспендировали в небольшом объеме буфера А [25 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 10% (w/v) сахарозы, 1 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma)] и наслаивали на градиент 20-50% (w/w) сахарозы в 10 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 1 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА и 0,1 мМ PMSF. Градиент центрифугировали при 100000 g в течение 18 ч при 4°C, а затем разделили на аликвоты по 0.8 мл. Фракции разбавляли 2 объемами буфера А и центрифугировали при 100000 g в течение 30 мин. Осадки из каждой фракции повторно суспендировали в небольшом объеме буфера А и использовали для иммуноблот-анализа. В варианте с Mg²⁺, в буферы добавляли 5 мМ MgCl₂.

2.8 Фракционирование мембран при анализе локализации рецепторов арабидопсиса

Растения *Arabidopsis*, использованные для фракционирования мембран, выращивали в жидкой среде MS (Murashige & Skoog, 1962) в течение 6 дней или в почве в течение 18 дней. Растительный материал гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис (рН 7.6 при 22°C), 20% глицерина и 150 мМ NaCl с 5 мМ MgCl₂ и 2 мМ EGTA (для последующего разделения градиенте сахарозы в присутствии Mg²⁺) или только с 2 мМ ЭДТА (для последующего разделения в градиенте сахарозы без Mg²⁺ и двухфазного разделения). Ингибиторы протеаз (15 мкМ леупептина, 77 нМ апротинина, 1 мкМ пепстатина А и 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида) добавляли из исходных растворов непосредственно перед гомогенизацией. Шестидневные проростки гомогенизировали с 3-кратным

количеством буфера с помощью пестика и ступки. Восемнадцатидневные побеги гомогенизировали на низкой скорости в блендере три раза его включая (Waring Laboratory & Science) с 9-кратным количеством буфера. Гомогенаты фильтровали через четыре слоя марли и два слоя Miracloth (Merck) и затем центрифугировали в течение 10 мин при 10000g при 4°C. Супернатанты центрифугировали при 4°C. Супернатанты снова центрифугировали в течение 30 мин при 100000 g при 4°C. Полученный осадок микросом ресуспендировали в 2.5 мл фазового буфера (250 мМ сахарозы, 5 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7.8, и 2 мМ дитиотреитола [ДТТ]) для двухфазного разделения водной полимерной системе или в 10 мМ Tris (pH 7.6 при 22°C), 10% Сахарозы и 1 мМ ДТТ, либо с 2 мМ ЭДТА или 5 мМ MgCl₂ для фракционирования в сахарозном градиенте. Осадки ресуспендировали с помощью стеклянного гомогенизатора. Суспензию микросом добавляли в раствор для двухфазного разделения.

Для экспериментов по связыванию двухфазное разделение проводили в смеси 5.8% (w/w) декстран 500000/полиэтиленгликоль 3350, а для иммуноблоттинга белков - в смеси 5.9% (6-дневные проростки) или 6.1% (побеги 18-дневных растений). Водный полимерный двухфазный раствор (5.8%, w/w) включал 2.9 г 20% (w/w) декстрана 500000, 1.45 г 40% (w/w) полиэтиленгликоля 3350, 1.875 мл 1 м сахарозы в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.8, 250 мкл 0.7 М NaCl, и 2.5 мл суспензии мембран, доведенный до 10 г. После перемешивания пробы центрифугировали в бакет-роторе в течение 10 мин при 1000 g и 4°C. Разделение проводили три раза, используя чистые растворы верхней и нижней фаз (без мембран), полученные параллельно с помощью одного и того же этапа центрифугирования (Hodges & Mills, 1986). Затем очищенные верхнюю (обогащенную ПМ) и нижнюю (обогащенную эндомембранами) фазы разбавляли в 10 раз фазовым буфером и центрифугировали в течение 30 мин при 100000 g и 4°C. Полученные осадки ресуспендировали в 50 мМ MES-KOH, pH 7, 150 мМ NaCl, 32 мМ KCl и 27 мМ NH₄Cl для экспериментов по связыванию или в 10 мМ Tris (pH 7.6 при 22°C), 10% сахарозы, 1 мМ ДТТ и 2 мМ EDTA для иммуноблоттинга белков.

Градиент сахарозы получали путем наслаивания 16 мл 17%-ного раствора сахарозы на 16 мл 50%-ного раствора сахарозы в ультрацентрифужной пробирке объемом 32 мл с последующей горизонтальной инкубацией пробирки в течение 13 ч при 4°C. Леупептин (15 мкМ) добавляли в градиентообразующие растворы непосредственно перед формированием градиента. Затем суспензию мембран наслаивали на градиент 20%-50% (w/w) сахарозы в 10 мМ Tris (pH 7.6 при 22°C) и 1 мМ ДТТ с 2 мМ ЭДТА или 5 мМ MgCl₂. Градиенты центрифугировали в бакет-роторе в течение 16 часов при 100000g и 4°C. Двухмиллилитровые фракции собирали со дна перистальтическим насосом. Фракции хранили при -80°C до использования.

2.9 Выделение митохондрий

Митохондриальные фракции получали из клеток кукурузы по методу Douce et al. (1972) и da Silva et al. (2001), с небольшими изменениями. Корни кукурузы разрезали бритвенными лезвиями и гомогенизировали в блендере Уорринга (5 с, 3 раза, на низкой скорости) в 2-кратном количестве буфера А (5 мМ Tris-HEPES pH 7.4, 7 мМ цистеина, 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 1 мМ PMSF). Гомогенат фильтровали через восемь слоев марли. Фильтрат центрифугировали при 3000 g в течение 3 мин при 4 °C. Супернатант центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при 4°C. Осадок дважды промывали 40 мл буфера А и затем повторно суспендировали в 1.2 мл буфера А. Полученную неочищенную митохондриальную фракцию очищали на ступенчатом градиенте сахарозы. Слойми градиента (по 2 мл) были 1.8 М, 1.5 М, 1.2 М, 0.9 М и 0.6 М сахарозы в буфере А, к которым добавляли 1.2 мл неочищенного митохондриального экстракта (в 0.3 М сахарозе). Градиент центрифугировали в бакет-роторе при 40000 g в течение 45 мин при 4 °C. Фракцию на границе между слоями 1.2 и 1.5 М сахарозы аккуратно отбирали, разбавляли буфером А и центрифугировали при 9000 g в течение 10 мин при 4°C. Очищенный митохондриальный осадок повторно суспендировали в буфере А и использовали в экспериментах по связыванию.

2.10 Выделение хлоропластов

Фракция хлоропластов была получена из клеток кукурузы по методу Gualberto et al. (1995) с небольшими изменениями. Двадцать граммов листьев гомогенизировали в блендере Уорринга (дважды по 2 с, на низкой скорости) в 100 мл буфера С (0.66 М сорбитол, 0.1 М HEPES-КОН pH 7.3, 4 мМ ЭДТА). Гомогенат фильтровали через два слоя марли и один слой Miracloth (Calbiochem). Фильтрат центрифугировали при 1500 g в течение 2 мин при 4°C. осадок повторно суспендировали в 30 мл буфера С и снова центрифугировали. Осадок повторно суспендировали в 2 мл буфера С и наслаивали на непрерывный градиент перколла, полученный смешиванием 13 мл 2-кратно концентрированного буфера С с 13 мл жидкого перколла и центрифугированием в угловом роторе при 40000 g в течение 30 мин при 4°C. Градиент, с наслоенном на него образцом, центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Зеленую полосу, соответствующую фракции хлоропластов, извлекали, разбавляли в 5 раз буфером С и центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин при 4°C. Осадок повторно суспендировали в буфере С и использовали в экспериментах по связыванию.

2.11 Выделение ядер

Ядерная фракция была получена из клеток кукурузы по методу Saxena et al. (1985) с небольшими изменениями. Тридцать граммов корней гомогенизировали в блендере Уоррига (дважды по 2 с, на низкой скорости) в 300 мл буфера N (250 мМ сахарозы, 10 мМ MES-КОН pH 5.4, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 0.1 мМ спермидина, 0.5 мМ спермина, 10 мМ β-меркаптоэтанола и 5 мМ ЭДТА). Гомогенат фильтровали через три слоя Miracloth (Calbiochem) и два слоя нейлоновой сетки 25 мкм. Затем в гомогенат по каплям добавляли 10% Triton X100, непрерывно помешивая, до конечной концентрации 0.01%. Смесь инкубировали в течение 10 мин при 4°C, затем центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин при 4 °C. Осадок повторно суспендировали в 10 мл буфера N и поместили в ступенчатый градиент перколла: 10 мл 75% Перколла, 10 мл 25% Перколла в буфере N. Градиент центрифугировали при 1000 g в течение 40 мин при 4 °C. Фракцию на границе между слоями 25% и 75% отбирали, разбавляли в 3 раза буфером N и центрифугировали при 1000 g в течение

10 мин при 4 °С. Осадок повторно суспендировали в буфере N и повторили центрифугирование. Затем осадок ядер повторно суспендировали в 0.44 М сахарозе, 50 мМ Tris-HCl pH 7.8, 10 мМ β-меркаптоэтаноле и 5 мМ MgCl₂ и использовали в экспериментах по связыванию. Ядра, растворенные в 1% SDS, показали УФ-спектры, типичные для нуклеопротеинов (Bisswanger, 2004).

2.12 Радиолигандный метод для изучения связывания гормонов

Эксперименты по связыванию проводили при 0-4 °С и pH 7.4, за исключением экспериментов, направленных на изучение влияния температуры или pH на взаимодействие гормон-рецептор. Высокочеченый [2-³H]транс-зеатин ([³H]tZ, 851 ГБк ммоль⁻¹, радиохимическая чистота >99%) был получен из Института экспериментальной ботаники (Прага, Чешская Республика). Немеченые цитокинины были произведены компанией Olchemim (Оломоуц, <http://www.olchemim.cz>). Для одной пробы использовали 2,6 пмоль [³H]tZ. Аликвоту 750 мкл суспензии сферопластов или мембран (не менее 25 мкг белка в PBS) смешивали с 2,5 мкл меченого tZ, с 500-кратным избытком немеченого tZ или без него для определения неспецифического (NS) и тотального связывания (TB), соответственно (Romanov et al., 2005). Специфическое связывание (SB) рассчитывалось по формуле $SB = TB - NS$. Кажущиеся значения K_D для связывания [³H]tZ с различными рецепторами были определены в экспериментах по насыщению связывания с последующим анализом данных в координатах Скэтчарда. Для изучения лигандной специфичности связывания различные немеченые цитокинины в разных концентрациях добавляли вместе с [³H]tZ. Зонды инкубировали на ледяной бане в течение 40 мин (сферопласты) или 60 мин (мембраны), затем центрифугировали при 16000 g при 4 °С в течение 3 мин (сферопласты) или 20 мин (мембраны). Митохондрии, хлоропласты и ядра центрифугировали при 16 000 g в течение 3 мин при 4 °С. Надосадочная жидкость полностью удалялась с помощью вакуумного насоса. К осадку добавляли 200 мкл 96% (v/v) этанола и экстрагировали в течение 16 ч при комнатной температуре в плотно закрытой пробирке. Радиоактивность спиртового экстракта измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика в течение 10 мин для

каждой пробы в сцинтилляционном коктейле ACS-II (Amersham Bioscience). Исследования влияния pH на связывание гормонов проводили в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 32 мМ KCl, 27 мМ NH₄Cl, 2 мМ MgSO₄ и 0.1 мМ CaCl₂. pH корректировали с помощью 50 мМ буферов Tris-HCl или MES-KOH, соответственно, приготовленных в той же среде. Для контроля pH внутри микросом использовали флуоресцентный краситель пиранин (8-гидроксипирен-1,3,6-трисульфоновая кислота) (Clement & Gould, 1981).

2.13 Математические и статистические методы

K_D для взаимодействия рецептора с различными цитокинами определяли в конкурентных экспериментах методом расчета Ченга-Прусова (Cheng & Prusoff, 1975). Кривые конкуренции были построены с использованием опции простого связывания лиганда программы SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose, CA, USA). Правильность соответствия нелинейной регрессионной модели оценивали с помощью параметра R-квадрат (R^2), который является статистической мерой того, насколько близки данные к подогнанной линии регрессии. Значения R^2 для всех протестированных СНК были близки к максимальному значению 1,0. Альтернативный метод расчета K_D по результатам конкурентных анализов связывания был приведен в разделе результатов и использовался для независимого определения K_D .

Для сравнения значений (ТВ и NS для каждого рецептора), полученных в результате экспериментов по связыванию СК, был использован односторонний ANOVA. Для всех функциональных рецепторов были получены данные о статистически чрезвычайно значимом гормон-специфическом связывании (p -value \leq 0,001). При анализе экспрессии генов статистический анализ проводили с помощью t-теста Стьюдента, статистически значимым считали $P < 0,05$. В таблицах и на графике представлены средние значения со стандартными ошибками. Каждый эксперимент повторяли один или два раза.

2.14 Анализ экспрессии генов у арабидопсиса

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с РНК 5-дневных проростков, которые обрабатывали 20 мин или 30 мин различными концентрациями tZ или iP (1-40 нМ). Проростки выращивали в чашках Петри, содержащих жидкую среду MS. РНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen) и синтезировали кДНК из 5 мкг РНК с помощью обратной транскриптазы SuperScript™ III (Invitrogen). Каждый вариант имел две биологические и три аналитические повторности. UBC10 (At5g53300) и PDF1 (At3g25800) были использованы в качестве референсных генов (Czechowski et al., 2005). Последовательности праймеров были следующими: для ARR5 ARR5-qRT-fw (CTACTCGCAGCAGCTAAAACGC) и ARR5-qRT-rv (GCCGAAAGAATCAGGACA); для ARR6 ARR6-qRT-fw (GAGCTCTCCGATGCAAAT) и ARR6-qRT-rv (GAAAAAAAGGCCATAGGGGT); для UBC10 UBC10-qRT-fw (CCATGGGCTAAATGGAAA) и UBC10-qRT-rv (TTCATTTGGTCCTGTCTTCTTCAG); и для PDF1 PDF1-qRT-fw (CCATTAGATCTTGTCTCTCTGCT) и PDF1-qRT-rv (GACAAAACCCGTACCGAG). Анализ данных проводился с помощью программного обеспечения 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com>).

2.15 Анализ экспрессии генов у картофеля

Растения картофеля сорта Désirée выращивали в стандартных условиях *in vitro* при длинном (16 ч) дне в течение 5-6 недель на жидкой среде MS, содержащей 1,5% или 5% сахарозы. Для гормональной обработки среду заменяли на такую же, содержащую N6-бензиладенин (BA, 1 мкМ). Пробирки переворачивали несколько раз для обеспечения равномерного смачивания растений, а затем инкубировали в течение 1 ч в стандартных условиях. Органы растений (листья, стебли, корни, клубни) были отделены и немедленно заморожены в жидком азоте. Контрольные растения обрабатывали таким же образом, но без гормона. Общая РНК была выделена методом с Trizol (Brenner et al., 2005) и была использована для синтеза кДНК методом обратной транскрипции (Invitrogen). Все образцы РНК обрабатывали ДНКазой I без РНКазы. Полученную кДНК проверяли на загрязнение геномной ДНК

методом ПЦР с праймерами, различающими кДНК и геномную ДНК. Полоса, полученная из геномной ДНК, отсутствовала в образцах РНК. Экспрессию генов, кодирующих предсказанные белки сигнальной системы цитокининов, определяли методом количественной ОТ-ПЦР (Таблица 6). В качестве референсных генов использовали гены домашнего хозяйства картофеля *StEF1 α* (фактор элонгации 1- α , AB061263) и *StCYC* (циклофилин, AF126551) (Nicot et al., 2005).

Таблица 6. Последовательности праймеров.

Primer pair name	Single primer name	Primer sequences (5' – 3')
StHK2_qRT PCR(1)	StHK2_FPq1	ACCATTTGCAGAGACTGGGA
	StHK2_RPq1	GGTCAACAAAAACCACGGCTA
StHK3_qRT PCR(1)	StHK3_FPq1	CACAGCTCCCTTCAGGCTAC
	StHK3_RPq1	TACTCCACCAAGGTACCCGT
StHK4_qRT PCR(2)	StHK4_FPq2	TGCTGAGAGTGGGAAAGCTG
	StHK4_RPq2	GACGTGTAGCCTCAAACCCA
StRR4A	StRR4A_FPq1	ATCAACACCTTCACCGCCAT
	StRR4A_RPq1	TTGAGTCGTCTTGTGGCGA
StRR9A	StRR9A_FPq2	CCTCTTATCAAGTTACTGTTGTGGA
	StRR9A_RPq2	ACCAGTCATTTTCAGGCATGCTA
StRR9D	StRR9D_FPq1	CCTAGCAACCAACAGGAAGTG
	StRR9D_RPq1	TGTTCCCTCAGAGATGCAGATTCC
EF1_AB061263	EF1_FP	ATTGGAAACGGATATGCTCCA
	EF1_RP	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
CYC_AF126551	CYC_FP	CTCTTCGCCGATACCACTCC
	CYC_RP	TCACACGGTGGAAAGGTTGAG

2.16 Измерение активности GUS

Измерение активности фермента GUS также проводилось согласно Jefferson et al. (1987) с модификациями (Romanov et al., 2002) с использованием метилумбеллиферил- β -D-глюкуронида (MUG) в качестве субстрата.

2.17 Моноклональные антитела против ZmHK1

Последовательность кДНК, кодирующая псевдоресиверный и ресиверный домены ZmHK1 (Ala651-Val974), была амплифицирована методом ПЦР с праймерами 5'-TGCATGCCACACTGAAGCACTC-3' и 5'-TCTCGAGAAGTCCG GTCCATCG-3' и клонирована в сайт SphI/SalI в pQE31 (Qiagen). Рекомбинантный белок с His-тагом был сверхэкспрессирован в штамме *E. coli* M15 (Qiagen) и очищен с помощью NTA-агарозы (Qiagen). Моноклональные антитела против полипептида ZmHK1 было получено компанией Kohjin-Bio (Сайтама, Япония). Для оценки

специфичности моноклональных антител соответствующие участки ZmHK2 (Ala695-Gln1007) и ZmHK3a (Ala874-Glu1201) были получены в виде His-тагов аналогичным образом.

2.18 Иммуноблоттинг в экспериментах по анализу локализации рецепторов кукурузы

Козьи анти-мышинные и анти-кроличьи IgG пероксидазные конъюгаты были приобретены в Merck (Calbiochem). Равные аликвоты (10 мкл) отбирали из размороженных фракций для разделения белков методом 10% (w/v) полиакриламидного гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), как описано в статье Laemmli et al., 1970. Перед SDS-PAGE образцы белков смешивали с загрузочным буфером SDS-PAGE и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч (Schägger, 2006). После этого белки переносили на трансферные мембраны Immuno-Blot PVDF (Bio-Rad). Для детекции рецепторов антитела разводили 1:3000. Вторичные антитела разводили 1:10000 для выявления рецепторов и 1:30000 для выявления мембранных маркеров. Мембраны с перенесенными белками предварительно инкубировали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с 5% обезжиренным молоком в течение 1 ч; инкубацию с первичными антителами проводили в PBS с 5% обезжиренным молоком в течение 2 ч, затем мембраны трижды промывали в PBS с 0,05% Tween 20. Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 1 ч с последующей трехкратной промывкой в PBS с 0.05% Tween 20. Пероксидазную реакцию проводили с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal®West Pico (Thermo Fisher Scientific), а продукт детектировали с помощью рентгеновской пленки CL-XPosure™ Clear Blue (Thermo Fisher Scientific).

2.19 Иммуноблоттинг в экспериментах по анализу локализации рецепторов арабидопсиса

Моноклональные антитела Anti-Мус (из мыши) были приобретены в компании Millipore, а козьи анти-мышинные и анти-кроличьи IgG пероксидазные конъюгаты были приобретены в компании Merck. Белки разделяли с помощью 10%

Tricine-SDS-PAGE, как описано (Schägger, 2006). Перед Tricine-SDS-PAGE образцы белков смешивали с загрузочным буфером SDS-PAGE и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После этого белки переносили на трансферные мембраны Immobilon-P (Millipore). Для выявления рецепторов, меченных Мус, антитела разводили 1:300. Вторичные антитела разводили 1:10000 для выявления рецепторов и 1:30 000 для выявления мембранных маркеров. Мембрану с перенесенными белками предварительно инкубировали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) с 5% обезжиренным молоком в течение 1 ч, а инкубацию с первичными антителами проводили в PBS с 5% обезжиренным молоком в течение 2 ч, затем мембрану трижды промывали в PBS с 0.05% Tween 20. Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 1 ч с последующей трехкратной промывкой в PBS с 0.05% Tween 20. Пероксидазную реакцию проводили с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignalWest Pico (Thermo Fisher Scientific), а продукт выявляли с помощью рентгеновской пленки CL-XPosure Clear Blue (Thermo Fisher Scientific).

2.20 Мембранные маркеры и использованные антитела

При определении локализации рецепторов кукурузы в качестве мембранных маркеров использовали поликлональные (кроличьи) антитела против H⁺-прирофосфатазы тонопласта маша (Takasu et al., 1997), ViP тыквы (Natano et al., 1997) и H⁺-АТФазы плазматической мембраны кукурузы (Nagao et al., 1987).

При работах по определению локализации рецепторов арабидопсиса тип мембраны был детектировался с помощью набора поликлональных кроличьих антител (Agrisera) против специфических маркеров: ViP2 люмена ЭР, маркера H⁺-АТФазы ПМ, маркера тонопласта ε-субъединицы тонопластной H⁺-АТФазы, маркера митохондрий СОХII и маркера аппарата Гольджи Arf1. Антитела использовали в разведениях 1:2000, 1:1000, 1:2000, 1:1000 и 1:1000, соответственно. Тилакоидные мембраны идентифицировали путем спектрофотометрического анализа содержания хлорофилла (Arnon, 1949). Идентификация мембран Гольджи

была основана на измерении стимулированной Тритоном X-100 активности латентной УДФазы (Nagahashi & Nagahashi, 1982).

Анализ транзientной экспрессии рецепторов с помощью иммуноблотинга микросомальных мембран проводился с антителами против GFP (Agrisera, AS15 2987) в разведении 1:5000.

2.21 Оценка функциональности рецепторов

Плазмиды pCOLD IV с кодирующими последовательностями StHK2 и 4 были перенесены для экспрессии в штамм *E. coli* KMI001 (Suzuki et al., 2001). В этом штамме путь гистидинкиназный рецептор→YojN→RcsB→*cps::lacZ* может быть активирован экзогенными цитокинами (Takeda et al., 2001). Активация сигнального пути контролировалась путем детекции β-галактозидазной активности клеток *E. coli*. Культивирование клонов на чашках Петри, содержащих 40 мМ глюкозы, 40 мкг мл⁻¹ X-gal, 100 мкМ изопропил β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ), 50 мкг мл⁻¹ ампициллина при 15°C, проводили в течение 4 дней. Затем отдельные клоны высевали на новые чашки Петри, содержащие 40 мМ глюкозы, 40 мкг мл⁻¹ X-gal, 100 мкМ IPTG, 50 мкг мл⁻¹ ампициллина ± *транс*-зеатин в концентрации 0.5 мкМ. Клоны выращивали в течение 3 дней при 15°C. Экспрессию конструкции *cps::lacZ* оценивали по синему окрашиванию бактериальных клонов.

2.22 Метод защиты от протеазы

Эксперименты проводили согласно Sparkes et al. (2010) с изменениями. Один грамм инфильтрированных агробактериями секторов листьев табака, экспрессирующих конструкцию *P_{АНК3}:АНК3-Мус*, измельчали в охлажденной ступке с пестиком в 4 мл экстракционного буфера, содержащего 40 мМ HEPES-КОН pH 7.5, 0.4 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.4% PVP в течение 2 мин. Гомогенат центрифугировали при 1000g в течение 5 мин при 4°C. Микросомальную фракцию получали центрифугированием при 100000g в течение 5 мин при 4°C в ступенчатом градиенте сахарозы. Приблизительно 200 мл микросомальной фракции извлекали из интерфазы между слоями 20 и 60% сахарозы и осторожно ресуспендировали в свежей пробирке. Для одной пробы 15 мл микросомальной фракции смешивали с 30

мл буфера, содержащего 75 мМ Tris-HCl pH 8, 30 мМ CaCl₂ и 0,15% Triton X100. Реакцию инициировали добавлением 1 мл 2 мг мл⁻¹ раствора протеиназы К, выдерживали в течение 30 мин при 30°C, затем останавливали добавлением 1 мМ PMSF, 50 мМ ЭДТА и 16 мл загрузочного буфера. Образцы обрабатывали при 100°C в течение 5 мин и разделяли в 10% SDS- PAGE. После этого белки переносили на трансферные мембраны Immobilon-P (Millipore). Блотты обрабатывали анти-Myc-tag моноклональными (мышь) (Millipore) и анти-BiP2 поликлональными (кролик) антителами (Agrisera).

2.23 Эксперимент по фосфотрансферу АНК-АНР

Эксперименты проводились согласно Mähönen et al. (2006) с изменениями. Гены *GST-AHP1*, *GST-AHP2*, *GST-AHP3* были экспрессированы в штамме *E. coli* *BL21(DE3) pLysE*. Когда плотность культуры бактерий достигала OD₆₀₀ ~1, экспрессия трансгенов индуцировалась добавлением 1 мМ ИПТГ в течение 1 ч. Затем бактерии осаждали центрифугированием при 3000g в течение 20 мин при 4°C и ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Tris-HCl pH 7,6, 250 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,2% Тритон X100 и 1 мМ PMSF). Лизаты клеток получали соникацией, как в Verma et al. (2013), затем GST-АНР связывали с глутатион-агарозными бусами (аффинная хроматография) (Sigma-Aldrich) в течение 3 ч при встряхивании и 4°C. Бусы трижды промывали тем же буфером для лизиса. Наконец, GST-АНР элюировали в 50 мМ Tris-HCl pH 7.6, 50 мМ KCl, 10% глицерина, 10 мМ восстановленного L-глутатиона и 0.5 мМ PMSF.

Цитокининовый рецептор АНК3 был транзистентно экспрессирован в листьях табака, трансформированных конструкцией pB7FWG2-АНК3-GFP. Через шесть дней листья растений проверяли на наличие флуоресценции GFP, и в положительном случае мембраны выделяли и фракционировали в ступенчатом градиенте сахарозы для получения фракций ЭР и ПМ. Для этого один грамм ткани листьев гомогенизировали в охлажденной ступке с пестиком в 12 мл буфера для экстракции, содержащего 50 мМ Tris HCl pH 7,6, 10% (w/w) сахарозы, 50 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 2 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,5 мМ PMSF, 5 мкг/мл леупептина в течение

30 с при 4°C и затем фильтровали через ткань Miracloth (Merck, Millipore). Фильтрат центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин при 4°C. Градиент сахарозы делали в 5 мл ультрацентрифужных пробирках (ротор SW 55 Ti, Beckman Coulter, Мюнхен, Германия). На 1 мл 45% (w/v) наслаивали 1 мл 34% (w/v) сахарозы в экстракционном буфере. Супернатант (3 мл, 10% сахарозы) наслаивали на градиент, и мембраны разделяли ультрацентрифугированием при 100000 g в течение 30 мин при 4 °C. Фракции ЭР и ПМ были выделены из интерфаз 10%/34% и 34%/45%, соответственно. Чистоту мембранных фракций проверяли иммуноблоттингом с кроличьими поликлональными антителами (Agrisera) против маркера ViP2 (ЭР) и H⁺-АТФазы (ПМ), соответственно.

Фосфотрансфер проводили при 25°C в течение 10 мин в 15 мл реакционной смеси, содержащей 50 mM Трис-НСl pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 50 mM АТФ, 5 мКи [γ -³²P] АТФ, 2 мг GST-АНР, 0.8 мг мембран из табака и *транс*-зеатин в наномолярном диапазоне концентраций. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл 4-кратного загрузочного буфера (60 mM Трис-НСl pH 6.8, 10% SDS, 5% 2-меркаптоэтанола, 0.05% бромфенолового синего), 80 mM ЭДТА. Затем 15 мкл каждого образца без кипячения наносили на 10% SDS-PAGE, и электрофорезированные белки переносили на мембраны PVDF (BioRad). Радиоактивность детектировали инкубацией PVDF-мембраны с люминофорным экраном в течение 10 мин и анализировали с помощью Storm 860 Molecular Imager (GMI). Интенсивность полос измеряли с помощью программы ImageJ, условные удельные активности соответствуют обнаруженной радиоактивности, относящейся к равным количествам микросом.

2.24 Методы биоинформатики

2.24.1 Анализ последовательностей при характеристике цитокининовой системы картофеля

Нуклеотидные/полипептидные последовательности цитокининовых рецепторов и других белков, связанных с цитокининовым сигналингом, были получены из баз данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Phytozome 11

(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), MSU Rice Genome Annotation Project Release 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) и congenie.org (<http://congenie.org/>) с использованием инструмента BLASTP и АНК2 (AT5G35750), АНК3 (AT1G27320), АНК4 (AT2G01830) и других связанных с цитокининами генов арабидопсиса в качестве шаблонов. Доменную структуру белков определяли с помощью программы PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>). Трансмембранные домены определяли с помощью сервиса MESSA (<http://prodata.swmed.edu/MESSA/MESSA.cgi>; Cong & Grishin, 2012). Визуализация доменов проводилась с помощью сервиса MyDomains-Image Creator (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>).

Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA6.0 (Tamura et al., 2013). Выравнивание нуклеотидных последовательностей (кодирующая последовательность (CDS), режим кодонов) проводили с помощью алгоритма ClustalW. Для филогенетической реконструкции использовали метод максимального правдоподобия (ML). Поиск ключевых аминокислот в рецепторных доменах путем выравнивания и визуализации белковых последовательностей проводили в Clustal X2.1 (Larkin et al., 2007) и Jalview (Clamp et al., 2004) соответственно.

2.24.2 Анализ промоторов

Промоторные области генов цитокининовых рецепторов арабидопсиса (АНК2, АНК3 и АНК4) были получены из базы данных TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). Идентификацию промоторных областей генов цитокининовых рецепторов (*StHK2*, *StHK3* и *StHK4*) картофеля проводили с использованием баз данных Phytozome 11 и NCBI. За промоторную область принимали последовательность ДНК в 1000 нуклеотидов, которая предшествует сайту начала транскрипции гена. Поиск *cis*-регуляторных элементов в промоторах исследуемых генов проводили с помощью программ PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) и PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

2.24.3 Поиск последовательностей рецепторов за пределами группы цветковых растений

Белковые последовательности цитокининовых рецепторов арабидопсиса были использованы для поиска соответствующих генов у других видов растений. Для этого использовали онлайн-сервисы белкового BLAST в соответствующих базах данных. Гены *Oryza sativa*, *Amborella trichopoda*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrium patens* были найдены в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); *Picea abies* – в ConGenIE.org (<https://congenie.org/>); *Ginkgo biloba* – в Medicinal Plant Genomics Resource (<http://mpgr.uga.edu/>); *Azolla filiculoides* – в Fernbase (<https://www.fernbase.org/>); *Gnetum montanum* и *Anthoceros agrestis* – в The 1000 plant transcriptomes initiative (1KP) (<https://db.cngb.org/onekp/>); *Marchantia polymorpha* – в Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>).

Для поиска функциональных доменов использовался ряд различных онлайн-сервисов: HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) PROSITE (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Программа TMHMM2 на веб-сайте DTU Health Tech (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) была использована для поиска доменов трансмембранных доменов. Функциональные последовательности белков были проверены путем выравнивания с помощью алгоритма ClustalW в MEGA11 (Tamura et al., 2021; Tamura et al., 2006). Эволюционную историю определяли с помощью метода максимального правдоподобия, основанного на модели равного входа (Tajima & Nei, 1984). Показано дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием. Процент деревьев, в которых соответствующие таксоны кластеризуются вместе, показан рядом с ветвями. Исходные деревья для эвристического поиска были получены путем применения метода объединения соседей в матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT. Для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовалось дискретное гамма-распределение (2 категории (+G, параметр = 0,5877)). Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В

анализе участвовали 12 аминокислотных последовательностей. Всего в окончательном наборе данных было 1355 позиций. Эволюционный анализ проводился в программе MEGA11. Параметры для построения филогенетического дерева приведены в подписи к рисунку 68. Изображения структур генов были сделаны с помощью Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) (Hu et al., 2015). Структуры белков с доменами делали с помощью Illustrator for Biological Sequences (IBS 1.0).

2.24.4 Структурное моделирование по гомологии

Для поиска шаблонов при моделировании гомологии был использован веб-сервис SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014). Выравнивание последовательностей проводилось с помощью NCBI BLAST (Altschul et al., 1990) и Clustal X 2.1 (Larkin et al., 2007). Для компенсации низкой идентичности последовательностей между шаблонами и целевыми белками, во избежание неправильной геометрии, а также для унификации протоколов моделирования все комплексы НКrd-HPt и RRrd-HPt были смоделированы с использованием алгоритма мульти-шаблонов.

Моделирование белковых структур *A. thaliana* и *S. tuberosum* проводилось в программе Modeller 9.20 (Sali & Blundell, 1993) с использованием класса автомоделей для сравнительного моделирования. Для каждого белка было построено 200 моделей, и лучшая модель была выбрана в соответствии со значением оценки DOPE (дискретной оптимизированной энергии белка) (Shen & Sali, 2006), рассчитанной в Modeller.

Основной набор комплексов НКrd-HPt был построен в отсутствие ионов Mg^{2+} , чтобы сделать полученные файлы моделей совместимыми с широким спектром программного обеспечения. Дополнительная модель АНК3rd-АНР2 была построена в присутствии Mg^{2+} для дальнейшей модификации с целью изучения эффекта фосфорилирования.

2.24.5 Оптимизация, валидация и модификация структуры

Фосфоакцепторные остатки были модифицированы в веб-сервере Vienna-PTM (Margreitter et al., 2013). Гистидины были практически фосфорилированы по атому N ϵ . Модификация проводилась на выбранных моделях перед минимизацией.

Все лучшие модели были подвергнуты минимизации. После добавления атомов водорода модели были минимизированы по энергии в UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen et al., 2004) с использованием силового поля AMBER ff14SB (Maier et al., 2015) с 300 шагами крутого спуска и 300 шагами сопряженного градиента; размер шага в обоих случаях составлял 0,02 Å.

Стереохимическое качество моделей оценивалось с помощью ProCheck (Laskowski et al., 1993), реализованного в веб-сервисах PDBsum (Laskowski et al., 2018), SA-web (Wiederstein & Sippl, 2007) и QMEAN server (Benkert et al., 2009). Полученные модели имели приемлемые параметры по графикам Рамачандрана - после минимизации процент остатков в наиболее благоприятных регионах составлял не менее 87%, а процент остатков в запрещенных регионах не превышал 1,2%. Минимизация увеличила процент остатков в дополнительных разрешенных регионах и немного уменьшила их количество в наиболее благоприятных регионах в основной статистике диаграммы рамачандрановских моделей, но исправила большую часть искаженной геометрии, включая необычные длины связей и углы.

В некоторых случаях модели были уточнены с помощью UCSF Chimera: искаженная геометрия была исправлена вручную путем приведения углов и длин связей к их "идеальным" значениям по данным ProCheck; ориентация боковых цепей была уточнена с помощью библиотеки ротамеров Dunbrack (Dunbrack, 2002).

2.24.6 Исследование свойств интерфейса

Аланиновое сканирование проводили с помощью программы Rosetta, реализованной в Robetta (Kortemme et al., 2004) с настройками по умолчанию. Горячие точки (позиции, замена которых приводила к наибольшему изменению свободной энергии взаимодействия) были определены по значениям $\Delta\Delta G$ образования комплекса после виртуальной мутации одного остатка аминокислоты в

аланин. Позиции с $\Delta\Delta G$ 2 кДж/моль и более рассматривались как "горячие точки". Для дополнительного предсказания горячих точек использовали сервер Mitchell Lab KFC2 (Darnell et al., 2007) и сервер PPCheck (Sukhwal & Sowdhamini, 2013).

Визуализация и наложение моделей осуществлялись с помощью программы UCSF Chimera. Параметры интерфейсов, включая площадь интерфейса, ΔG (прирост энергии сольватации при образовании интерфейса), общую энергию связывания белков, гидрофобное p -значение и информацию о водородных связях, солевых мостиках и дисульфидных связях, образованных между взаимодействующими цепями, были получены с помощью инструмента QtPISA (Laddach et al., 2018; Krissinel & Henrick, 2007). Для изучения сродства к связыванию и констант диссоциации комплексов MSP использовался сервер PRODIGY с температурой 25°C по умолчанию (Xue et al., 2016).

Для изучения гидрофобности и электростатического потенциала интерфейсов были созданы 2D-карты с помощью сервиса MolSurfer (Gabdoulline et al., 2003). Электростатический потенциал рассчитывался с настройками по умолчанию: диэлектрическая проницаемость белка 4; диэлектрическая проницаемость растворителя 80; ионная сила 150 mM; ионный радиус 1,5 Å; радиус зонда для генерации молекулярной поверхности 0.0 Å (0.0 Å здесь приводило к использованию поверхности Ван-дер-Ваальса для разделения белка и растворителя). Файлы PQR генерировались с помощью сервера PDB2PQR версии 2.1.1 (Dolinsky et al., 2004) с силовым полем AMBER, выбранным для расчетов. PROPKA использовалась для назначения состояний протонирования при заданном pH. Значения pH были установлены различными для различных типов комплексов, в зависимости от их локализации: 7.3 для цитозоля (димеры доменов HisKA, комплексы HKrd-HP), 7.2 для ядра (димеры HP и комплексы RRrd-HP); для димеров сенсорных модулей были проведены два типа расчетов, с pH 7.1, соответствующим значению в люмене ЭР, и pH 5.5, как среднее значение для апопласта. Дополнительно было проведено исследование для гомодимера сенсорного модуля АНКЗ с более широким диапазоном значений pH: 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5 и 8.0.

2.24.7 Окрашивание поверхности

Анализ консервативности и соответствующее окрашивание было выполнено с помощью сервера ConSurf (Glaser et al., 2003; Ashkenazy et al., 2016). Использовался алгоритм поиска гомологов HMMER с одной итерацией и E-value 0.0001 и база данных CLEAN_UNIPROT Proteins. Кроме того, было отобрано 150 последовательностей с идентичностью не менее 35% и не более 95%. Для построения множественного выравнивания последовательностей использовался метод ClustalW. Использовался метод Байесовского расчета и модель эволюционного замещения по умолчанию (лучшая модель). Модели, полученные после расчета ConSurf, были окрашены в соответствии с консервативностью последовательности в UCSF Chimera.

Поверхности окрашивали по гидрофобности с помощью атрибута UCSF Chimera "kdHydrophobicity" в соответствии со шкалой гидрофобности Кайта и Дулиттла (Kyte & Doolittle, 1982).

Окрашивание поверхности по электростатическому потенциалу также проводилось в UCSF Chimera, используя кулоновское окрашивание поверхности, с диапазоном между -10 и 10 ккал/(моль-э). Опция диэлектрической зависимости от расстояния была установлена на "true" с диэлектрической проницаемостью по умолчанию 4.0 и расстоянием от поверхности по умолчанию 1.4 Å.

2.24.8 Докинг белок-белок

Слепой белок-белковый докинг был выполнен в ClusPro (Kozakov et al., 2017) и PatchDock (Schneidman-Duhovny et al., 2005). Кластеризационный RMSD в PatchDock составлял 4,0, а тип комплекса был установлен по умолчанию. ClusPro был запущен с настройками по умолчанию. ClusPro также применялся для проверки возможности шаблонных структур быть биологическим димером (не кристаллографическим артефактом), используя опцию "Классификация димеров" в этом сервисе

6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Структура сенсорной области рецепторов цитокининов

Цитокинины распознаются рецепторами, сенсорными гистидинкиназами, которые преимущественно расположены в мембранах эндоплазматического ретикулума (Lomin et al. 2011; Wulfetange et al. 2011; Caesar et al. 2011). Цитокининовые рецепторы образуют димеры по аналогии с их прокариотическими предками - бактериальными гистидиновыми киназами. Рецепторные гистидиновые киназы - это многодоменные белки, объединяющие сенсорный и эффекторный модули (Hwang et al. 2002; Kakimoto, 2003; Heyl & Schmülling 2003; Bishopp et al. 2009; Romanov 2009; Shi & Rashotte 2012; Lomin et al. 2012). Сенсорный домен был назван CHASE (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular (Anantharaman & Aravind 2001; Mougel & Zhulin 2001) и служит для связывания цитокинина (Heyl et al. 2007). Далее (от N- до C-конца) следуют каталитические гистидинкиназный и ресиверный домены, содержащие консервативные остатки гистидина и аспартата, соответственно. Образование цитокинин-рецепторного комплекса приводит к активации киназы и фосфорилированию консервативного гистидина в каталитическом модуле. Затем этот фосфат передается внутримолекулярно на консервативный аспартат в ресиверном домене рецептора.

Последующая передача цитокининового сигнала также основана на His-Asp фосфотрансфере (Grefen & Harter 2004; Müller & Sheen 2007; To & Kieber 2008; Schaller et al. 2011; Gupta & Rashotte 2012). В передаче сигнала участвуют два типа белков: мобильные фосфотрансферные белки (фосфотрансмиттеры), перемещающиеся между цитоплазмой и ядром, и регуляторы ответа типа В - транскрипционные факторы, находящиеся в ядре. Фосфотрансмиттеры связывают с помощью своего консервативного гистидина фосфат из ресиверного домена рецептора и переносят его далее на консервативный аспартат регуляторов ответа. После фосфорилирования последние становятся активными и запускают транскрипцию определенных генов, известных как гены первичного ответа на цитокинин (Brenner et al. 2012). Часть таких генов кодируют регуляторы ответа типа

А, которые подавляют активацию генов, конкурируя за "горячий" фосфат с регуляторами ответа типа В. Таким образом, регуляторы ответа типа А замыкают цепь отрицательной обратной связи, контролируя внутриклеточную цитокининовую сигнализацию.

3.1.1 Сенсорные модули цитокининовых рецепторов

CHASE-содержащие белки широко распространены в растительном царстве. Они обнаружены у всех изученных покрытосеменных растений, а также у примитивных наземных растений, таких как мох *Physcomitium patens* и плакновидное *Selaginella moellendorffii* (Pils & Heyl 2009; Schaller et al. 2011; Lomin et al. 2012). У высших растений домены CHASE почти исключительно входят в состав гибридных гистидиновых киназ. Единственным зарегистрированным исключением был предполагаемый цитокининовый рецептор OsCRL4 из риса, где CHASE домен был объединен с предполагаемым Ser/Thr киназным доменом (Han et al. 2004). Помимо высших растений, CHASE-домены были обнаружены в белках эукариотических водорослей: колониальной зеленой водоросли *Volvox carteri*, одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, нитчатой бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и диатомовой *Phaeodactylum tricornutum*. В *Ectocarpus* и *Phaeodactylum* существуют CHASE-содержащие гибридные гистидинкиназы, которые напоминают таковые у высших растений. Бактерии содержат большое количество CHASE-содержащих белков. Некоторые из этих белков являются простыми гистидинкиназами или даже гибридными гистидинкиназами, в то время как другие представляют собой различные типы каталитических рецепторов, в основном аденилил/гуанилилциклазы (Mougel and Zhulin 2001). Геномы свободноживущих амёб *Dictyostelium discoideum* и *Naegleria gruberi* также кодируют CHASE-содержащие белки. Слизевик *Dictyostelium* - единственный известный не растительный эукариот, кодирующий сенсорную His-киназу (DhkA), содержащую домен CHASE. Лигандом для сенсорного домена *Dictyostelium* рецепторной киназы DhkA является небольшой пептид SDF-2 (Wang et

al. 1999), поэтому кажется, что CHASE-домены склонны распознавать производные аденина или пептиды, по крайней мере, у эукариот.

По размеру CHASE-домены растений довольно однородны. Они, как правило, состоят из 203-226 аминокислотных остатков. 3D структура сенсорного модуля (включая весь CHASE домен) рецептора CRE1/АНК4 из *Arabidopsis thaliana* была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа (Hothorn et al. 2011). Фрагмент белка (около 270 аминокислот) был кристаллизован вместе с различными цитокининовыми лигандами.

Структурные данные показывают, что N-конец сенсорного модуля образует длинную α -спираль ($\alpha 1$), которая является каркасом для двух отдельных субдоменов, соединенных спиральным линкером (рис. 4). Hothorn et al. (2011) аннотировали эти субдомены как PAS (Per-Arnt-Sim)-подобные. N-концевая часть спирали $\alpha 1$ ковалентно связана дисульфидным мостиком с цепью $\beta 12$ проксимально к С-концу (см. схематическую структуру на рис. 5). Как и их бактериальные гомологи, сенсорные модули CRE1/АНК4 кристаллизуются в виде гомодимеров, причем спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ образуют интерфейс димеризации. Для распознавания цитокинина CRE1/АНК4 использует N-концевой PAS-субдомен, который находится дистальнее мембраны. Этот субдомен является обязательной составной частью всего CHASE-домена (Pas et al. 2004). Лиганд-связывающая полость рецептора полностью охватывает лиганд, как показано для различных цитокининов: *транс*-зеатина (рис. б), изопентениладенина, N6 -бензиладенина и кинетина. Структуры сенсорного домена в комплексе с различными цитокининами очень похожи. Нижняя часть сайта связывания цитокинина образована центральным β -листом субдомена PAS (цепи $\beta 7$ и $\beta 8$) и выстлана небольшими гидрофобными аминокислотными остатками. Замена этих остатков на более объемные аминокислоты предотвращает связывание цитокинина, тем самым инактивируя рецептор. Как раз это происходит в случае мутации *wol*, когда небольшой остаток треонина 278 заменен на изолейцин, имеющий более объемную боковую цепь. Гидрофобный "потолок" сайта связывания образован петлями $\beta 3$ - $\beta 4$ и $\beta 4$ - $\alpha 4$. Адениновая часть молекулы цитокинина

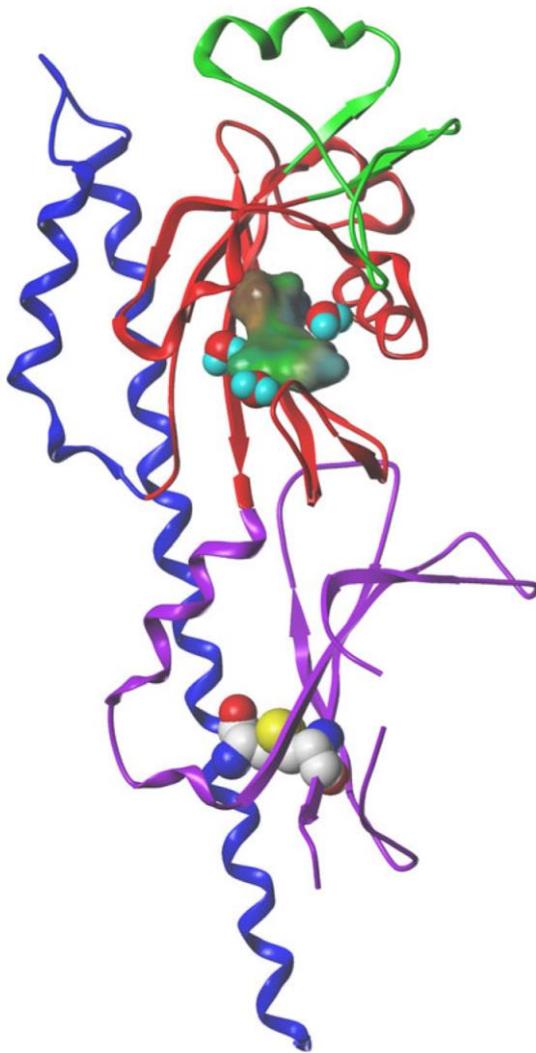


Рис. 4. Общая трехмерная структура мономерного сенсорного модуля цитокининового рецептора CRE1/АНК4 арабидопсиса со связанным *транс*-зеатином. Ленточная диаграмма была получена с использованием рентгеновской структуры, депонированной в Protein Data Bank, 3Т4L (Hothorn et al. 2011). Синие α -спирали, образующие интерфейс димеризации. Красный лиганд-связывающий субдомен PAS. Зеленая "верхняя" область лиганд-связывающего PAS-субдомена (крупные инсерции АНК2 и АНК3 расположены в петле между $\alpha 3$ и $\beta 3$). Фиолетовым обозначен PAS-подобный субдомен. Молекула цитокинина (верхняя часть) показана в поверхностном представлении, окрашенном по гидрофобному потенциалу (коричневые области наиболее гидрофобны, зеленые - промежуточные и синие - наиболее гидрофильные), молекулы воды и цистиинового мостика (нижняя часть) показаны в пространственном представлении. Мембрана расположена в

нижней части изображения. Рисунок подготовлен с помощью программы SybylX 2.0 (Tripos International, 1699 South Hanley Rd., Сент-Луис, Миссури, 63144, США).

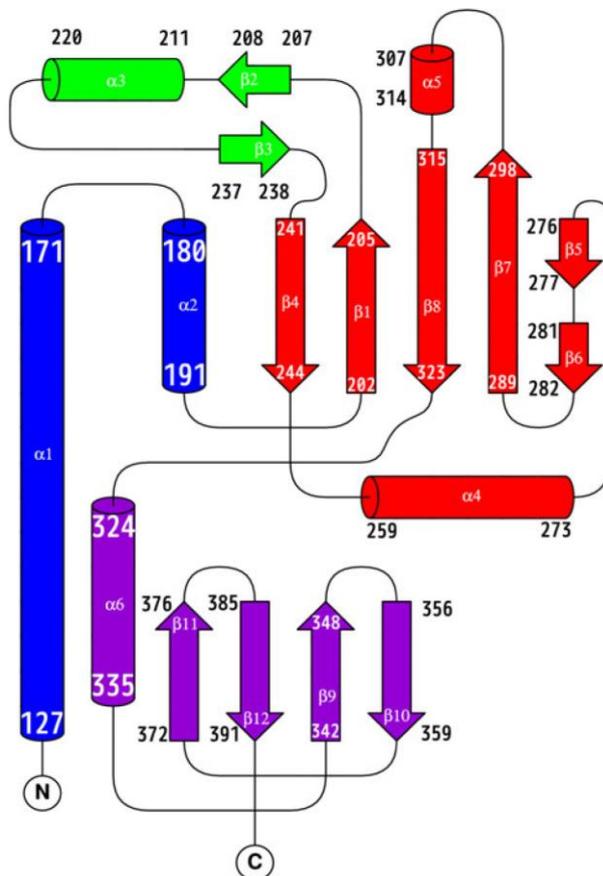


Рис. 5 Топологическая схема сенсорного модуля CRE1/АНК4 на основе рентгеноструктурного анализа (PDB 3T4L) (Hothorn et al. 2011). Цветовой код такой же, как на рис. 4. Нумерация элементов вторичной структуры и номера терминальных остатков даны в соответствии с программой ProOrigami (Stivala et al. 2011) с использованием карт HELIX и SHEET из файла PDB, исключая 3_{10} и π спирали. Рисунок подготовлен с помощью программы TopDraw (Bond, 2003).

ориентирована в полости связывания водородными связями с аспаратом 262 и лейцином 284. Две водородные связи между адениновой частью молекулы цитокинина и карбоксильной группой остатка аспартата 262 играют решающую роль в связывании лиганда (рис. 6). Молекулы воды в полости опосредуют образование дополнительных взаимодействий: одна молекула расположена между гидроксильной группой тирозина 250, карбонилем основной цепи лейцина 284 и N3-

атомом аденина, тогда как другая молекула воды образует водородную связь с N1-атомом аденина, но не образует водородных связей с белком. Третья молекула воды в сайте связывания гормона расположена вблизи пренильного хвоста цитокинина и участвует в образовании нечеткой сети водородных связей вместе с треонином 294, аспаргатом 262 и хвостовой гидроксигруппой *транс*-зеатина (рис. 6). Остальные остатки участвуют в гидрофобных взаимодействиях как с аденином, так и особенно с хвостовой частью цитокинина. Общее число аминокислот, контактирующих с лигандом, составляет около 20.

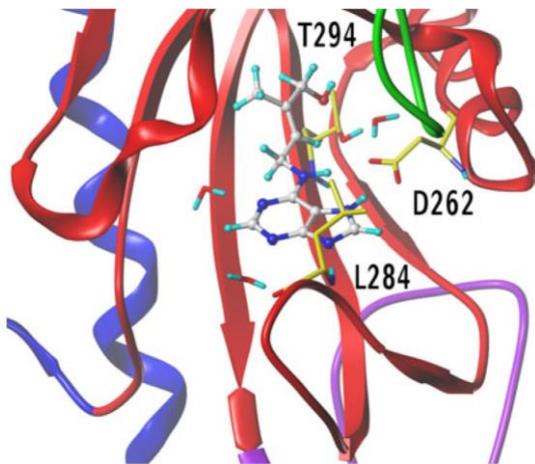


Рис. 6 Детальный вид цитокинин-связывающего кармана рецептора CRE1/АНК4 со связанным *транс*-зеатином [PDB 3T4L (Hothorn et al. 2011)]. Молекула *транс*-зеатина показана в виде шариков и палочек, окрашенных по типам атомов (С - белый, N - синий, O - красный, H - голубой). Аминокислотные остатки, образующие водородные связи с лигандом, показаны в виде палочек с желтыми углеродами и обозначены их порядковыми номерами. Молекулы воды, образующие водородные связи с лигандом, показаны в виде палочек. Рисунок подготовлен с помощью программы SybylX 2.0.

Аминокислоты, играющие важную роль в связывании, оказались сильно консервативными у различных цитокининовых рецепторах; замена этих консервативных остатков в CHASE-домене CRE1/АНК4 обычно приводит к инактивации рецептора (Hothorn et al. 2011).

Два цитокинина зеатинового типа, *транс*- и *цис*-зеатины, отличаются положением группы ОН-группы боковой цепи; *транс*-зеатин имеет гораздо более высокое сродство к рецептору CRE1/АНК4, чем *цис*-изомер. Структурные данные показывают, что *транс*-зеатин образует дополнительную водородную связь между гидроксилем боковой цепи и остатком треонина 294 (рис. 6). Такая связь отсутствует в *цис*-зеатине (Hothorn et al. 2011). Этот факт объясняет, почему CRE1/АНК4 связывает *транс*-зеатин гораздо сильнее, чем *цис*-зеатин (Romanov et al. 2006). Связывание ароматических цитокининов было продемонстрировано на примере кинетина и *N*6-бензиладенина. Как и изопреноидная группа *транс*-зеатина, фурфуроловый остаток кинетина образует водородную связь с треонином 294, хотя в последнем случае через молекулу воды. На примере тидиазурона, искусственного фенилмочевинного цитокинина, было подтверждено, что рецептор CRE1/АНК4 использует один и тот же сайт для связывания обоих типов цитокининов, *N*6-аденина или производных фенилмочевины (Romanov et al. 2006; Hothorn et al. 2011).

Были предложены основные структурные принципы для соединений, обладающих цитокининовой активностью (Hothorn et al. 2011). Такие соединения должны иметь плоскую кольцевую структуру, занимающую "адениновую" часть лиганд-связывающей полости, с линкером, способным образовывать водородные связи с консервативным остатком аспартата (Asp262 в CRE1/АНК4) и присоединять небольшую плоскую алифатическую или ароматическую хвостовую группу длиной около 5.5 Å.

Филогенетический анализ с использованием доступных геномов растений показал, что растительные CHASE-содержащие гистидинкиназы имеют монофилетическое происхождение, а число этих рецепторов видоспецифично, увеличиваясь от 2-3 у плауновидных (*Selaginella*) и мхов (*Physcomitrium*) до как минимум 7 (кукуруза) или 8 (соя) у покрытосеменных. CHASE-содержащие рецепторы цветковых растений разделяются три отдельные ветви филогенетического дерева, соответствующие цитокининовым рецепторам

CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2 арабидопсиса (Pils and Heyl 2009; Lomin et al. 2012) (рис. 7).

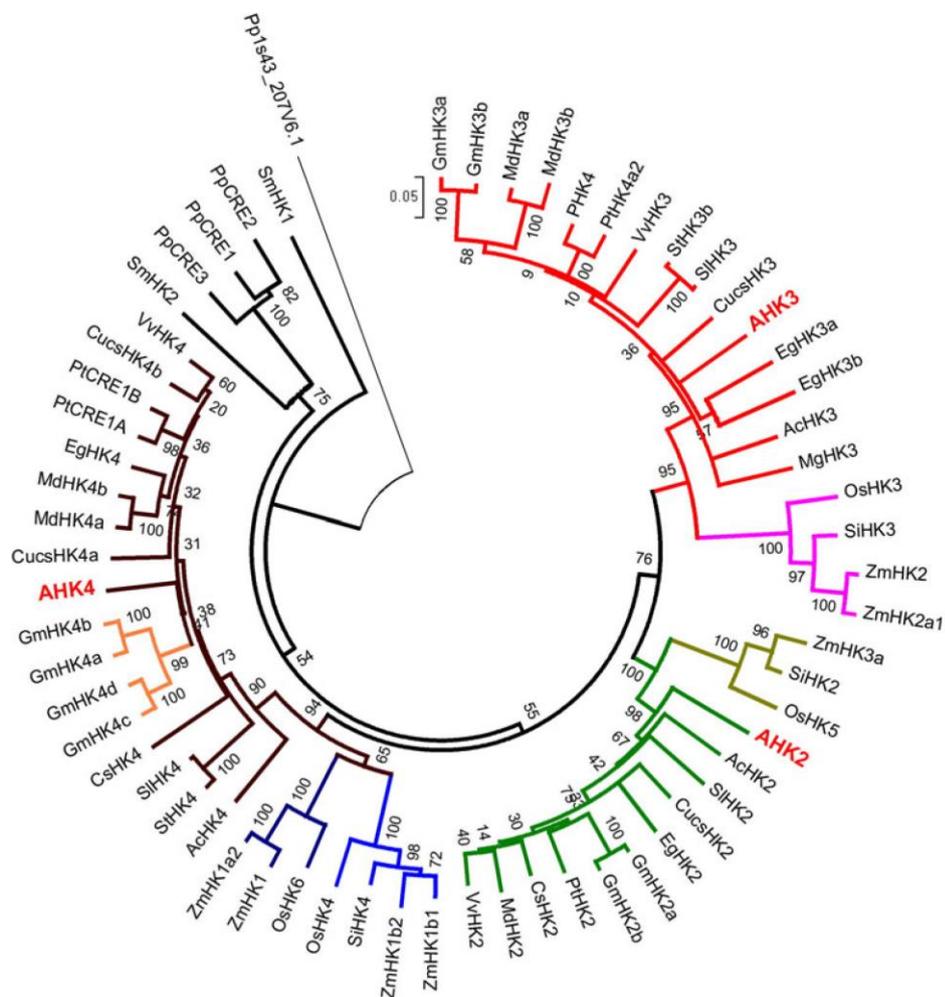


Рис. 7 Филогенетическое дерево цитокининовых рецепторов в соответствии с выравниванием их CHASE доменов. Цитокининовые рецепторы арабидопсиса показаны красным цветом. Ветви ортологов АНК2, АНК3 и CRE1/АНК4 отмечены зеленым, красным и коричневым цветом, соответственно. Розовые, бледно-зеленые и голубые ветви внутри основных ветвей обозначают рецепторы однодольных. Две отдельные подгруппы CRE1/АНК4 однодольных показаны светло- и темно-синим цветом, а представители ортологов CRE1/АНК4 Fabaceae - светло-коричневым цветом. Первые буквы в названиях рецепторов означают их принадлежность к следующим видам: A, *Arabidopsis*; Ac, *Aquilegia caerulea*; Cs, апельсин; Cucs, огурец; Eg, *Eucalyptus grandis*; Gm, соя; Md, яблоня; Mg, *Mimulus guttatus*; Os, рис; Pp, мох *P. patens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Si, могар; Sl, томат; Sm, плауновидное *S.*

moellendorffii; St, картофель; Vv, виноград; Zm, кукуруза. Выравнивание последовательностей CHASE проводилось с помощью программы ClustalW. Филогенетическое дерево было построено с использованием алгоритма присоединения соседей (NJ) (p-distance, попарное удаление) программы MEGA 5.05; бутстреп-анализ включает 1000 повторов. Бутстрэп-значения для отдельных ветвей приведены в процентах на основе 1000 бутстрэп-повторов.

(рис. 7). Консервативные белковые мотивы показаны на рис. 8. В пределах одной ветви CHASE-домены довольно похожи; доля полностью консервативных аминокислот довольно высока: 34.2, 32.6 и 35.0 % для АНК2-, АНК3- и CRE1/АНК4-ортологов, соответственно. Но если рассматривать весь набор цитокининовых рецепторов, то сходство резко снижается и составляет всего 8.9 %. Интересно, что рецепторы примитивных растений (*Physcomitrium*, *Selaginella*) не соответствуют этим ветвям и наиболее похожи друг на друга в пределах генома (Pils and Heyl 2009; Lomin et al. 2012) (рис. 7). Это означает, что общие предки ортологов CHASE-содержащих рецепторов появились у покрытосеменных растений после отделения примитивных растений (мхов, плауновидных) от общего эволюционного древа, но до его разделения на однодольные и двудольные (Pils and Heyl 2009; Heyl et al. 2012).

Как уже упоминалось выше, растения довольно сильно различаются по количеству и свойствам CHASE-содержащих рецепторов. Ортолог CRE1/АНК4 дублирован в Fabaceae; У сои идентифицировано четыре ортолога CRE1/АНК4 (по два в каждой группе дубликации). Остальные четыре рецептора принадлежат попарно к двум другим эволюционным ветвям. Хотя у люцерны *Medicago truncatula* был идентифицирован только единственный ортолог CRE1/АНК4. Фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* и *Lotus japonicus* имеют по два представителя ортолога CRE1/АНК4, но не имеют ортологов АНК2 или АНК3. Следует отметить, что в рецепторе PvНК4a из фасоли обыкновенной высоко консервативный лейцин (Leu284) заменен на триптофан, что вызывает некоторые сомнения в том, что этот белок функционирует как рецептор цитокинина. Несколько замен консервативных аминокислот было также обнаружено в рецепторе MeНК2b маниоки *Manihot*

esculenta. Различия касаются аминокислот, соответствующих консервативным Gly200, Ala202 и Ala204 из CRE1/АНК4 арабидопсиса. Виды, у которых мутировали цитокининовые рецепторы, одновременно имеют и их нормальные паралоги, принадлежащие, как правило, к эволюционной ветви CRE1/АНК4. Анализ показал, что представители группы CRE1/АНК4 исчезают существенно реже других.

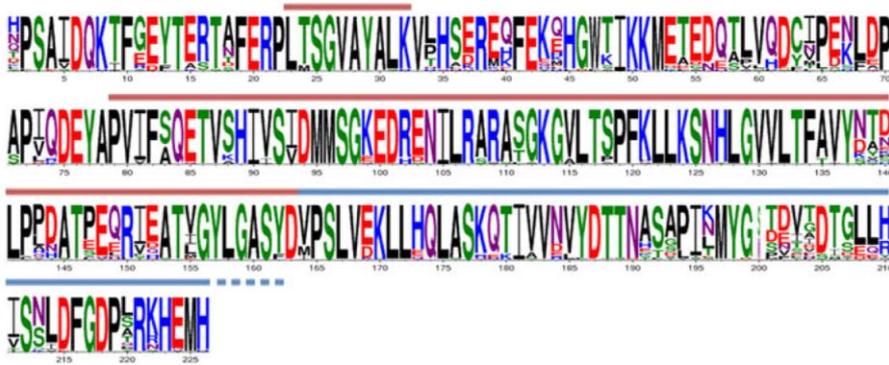
У злаков группа АНК4 разделяется на две подгруппы, соответствующие рецепторам кукурузы ZmНК1a и ZmНК1b. В кукурузе по два рецептора принадлежат к каждой из этих подгрупп. При этом ортологов АНК3 – всего два (ZmНК2, 2a1), а АНК2 – один (ZmНК3a). Однако у *Setaria italica* нет ортолога в одной из подгрупп (ZmНК1a). Сорго (*Sorghum bicolor*) и *Brachypodium distachyon* имеют три рецептора, но не имеют ортологов АНК2 (ZmНК3a). Таким образом, все известные геномы однодольных растений кодируют по крайней мере одного из представителей дублированного ортолога CRE1/АНК4, которые присутствуют преимущественно в двух вариантах. Согласно эволюционному анализу, предполагаемая значимость ортологов рецепторов имеет следующий порядок: CRE1/АНК4>АНК3>АНК2.

3.1.2 Фланкирующие области домена CHASE

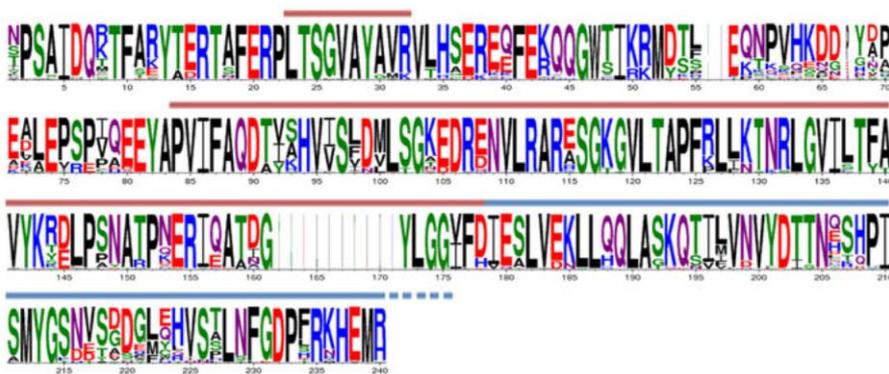
Почти во всех цитокининовых рецепторах CHASE и соседние домены фланкированы с обеих сторон трансмембранными доменами. Эти гидрофобные области, по-видимому, важны для правильной субклеточной локализации, а также для внутримолекулярной передачи сигнала. Особенно важен трансмембранный домен с С-конца от домена CHASE, который, очевидно, является обязательным для цитокининовых рецепторов. Выявлен ряд мутаций в этих нисходящих трансмембранных областях (D-ТМ), влияющих на трансдукцию сигнала.

Некоторые мутации в D-ТМ-спирали CRE1/АНК4 были получены с помощью ПЦР: Gly435Cys, Phe436Ser и Met447Thr1 (Miwa et al. 2007). Эти мутации привели к появлению конститутивной гистидин-киназной активности в CRE1/АНК4, т.е. этот рецептор приобрел способность посылать сигнал независимо от того, присутствовали цитокинины в среде или нет. Мутантные рецепторы сохранили

AHK2 orthologs:



AHK3 orthologs:



CRE1/AHK4 orthologs:



All CHASE domains:

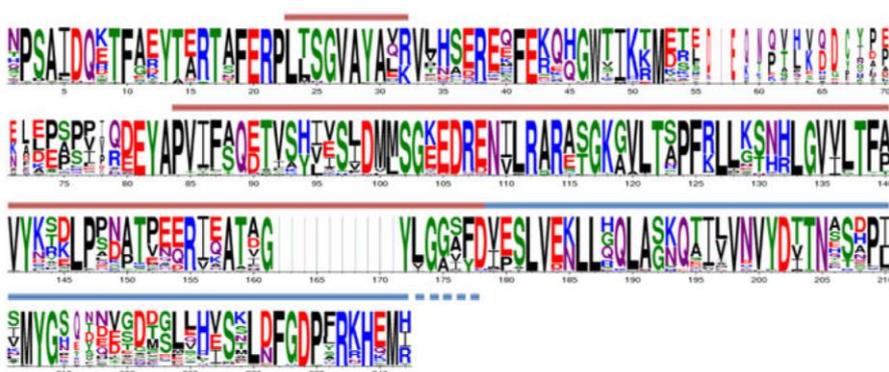


Рис. 8 Мотивы последовательности CHASE (логотипы). Консенсусные мотивы были получены в результате выравнивания доменов CHASE рецепторов. Каждый мотив состоит из стопок символов, по одной стопке на каждое положение в

последовательности. Высота символов внутри стопки указывает на относительную частоту каждой аминокислоты в данной позиции. Видимая ширина стопки определяется долей символов в столбце (столбцы с большим количеством пробелов или неизвестных остатков узкие). Прописные буквы указывают на полностью консервативную аминокислоту в данной позиции во всех выровненных белках, а строчные буквы указывают на наиболее часто встречающиеся аминокислоты в выравнивании. Абсцисса показывает общее количество позиций в последовательности. Аминокислоты окрашены в соответствии с химическими свойствами: полярные (G, S, T, Y, C) - зеленым, нейтральные (Q, N) - фиолетовым, основные (K, R, H) - синим, кислотные (D, E) - красным, гидрофобные (A, V, L, I, P, W, F, M) - черным. Логотипы были получены с помощью инструмента WebLogo 3. Логотипы последовательностей были получены путем выравнивания индивидуальных последовательностей CHASE ортологов АНК2-, АНК3- и CRE1/АНК4 отдельно и в целом, из 28, 33, 39 и 100 записей, соответственно. Положение лиганд-связывающего PAS-субдомена показано красной линией над стеками. Второй PAS-подобный субдомен показан синей линией над стеками, пять синих точек означают пять аминокислот PAS-подобного субдомена, которые находятся за пределами последовательности CHASE.

способность связывать цитокинины, что было подтверждено в экспериментах по связыванию меченного тритием изопентениладенина этими рецепторами в мембранах дрожжей. Интересно отметить, что рецептор CRE1/АНК4 с мутацией фенилаланин 436 сохранил свою конститутивную гистидин-киназную активность даже в сочетании с мутацией *wol*, несмотря на потерю цитокинин-связывающей способности. Таким образом, специфические мутации в спирали D-ТМ делают рецепторы конститутивно активными независимо от цитокинин-связывающей способности.

Введение мутаций в тот ТМ-домен других цитокининовых рецепторов также может дать такой же эффект (Miwa et al. 2007). Замена аминокислот в спирали D-ТМ может привести к изменению ее конформации и/или положения, аналогичному

тому, которое возникает при связывании цитокинина, стимулируя таким образом активность гистидинкиназы даже в отсутствие гормона.

Все эти данные подчеркивают роль соседних трансмембранных областей, особенно тех, которые находятся справа от CHASE, в рецепторной сигнализации. Анализ 100 цитокининовых рецепторов показывает, что число N-концевых трансмембранных доменов (U-TM) варьирует от 1 до 4, тогда как между CHASE и киназным доменами находится только одна трансмембранная область. Это означает, что домен CHASE и каталитическая часть белка всегда расположены по разные стороны мембраны. Количество U-TM в некоторой степени зависит от группы ортологов рецепторов. Все ортологи CRE1/АНК4 имеют только один U-TM домен, в то время как ортологи АНК2 обладают 3 или 4 трансмембранными доменами в этом положении. Что касается ортологов АНК3, количество областей U-TM не одинаково: известные однодольные (злаки) имеют один домен, а двудольные - два. Размер и количество этих областей может влиять на адресацию цитокининовых рецепторов к определенным участкам мембраны.

Анализ белковых последовательностей всех известных цитокининовых рецепторов выявил следующие особенности трансмембранных областей (рис. 9; табл. 7). Размер N-концевых ТМ-доменов и С-концевых ТМ-доменов был оценен как 18-23 (среднее значение 21) и 19-24 (среднее значение 22) аминокислот, соответственно (рис. 9). Выравнивание трансмембранных последовательностей ортологов рецепторов по отдельности и в целом позволило выявить некоторые новые мотивы последовательностей. В таблице 7 приведены логи последовательностей U-TM и D-TM спиралей, фланкирующих домен CHASE. Трансмембранные спирали каждой группы ортологов имеют консервативные остатки, причем С-концевые ТМ-домены гораздо более консервативны, чем N-концевые. Хотя N-концевые ТМ-домены из групп ортологов, особенно из ортологов АНК2- и АНК3, демонстрируют некоторые консервативные мотивы [(L/I)Lxx(F/G)xxxGxxxSxxxF в группе АНК2 и (L/V)(L/V)xxW(V/I)xxWxxx(S/A)

xxx(F/L) в группе АНК3], логотип всех рецепторов кажется в основном случайным, в результирующем мотиве для всех рецепторов (L/V)xx(W/F)(V/I)xxxxxxxx(F/Y)

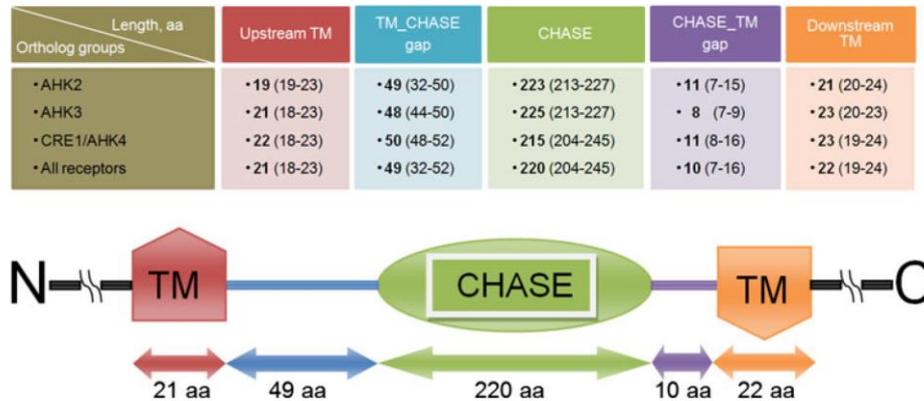
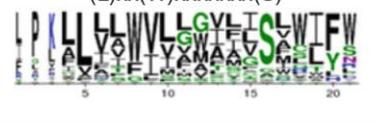


Рис. 9 Общие структурные особенности связывающего модуля и прилегающих трансмембранных (ТМ) доменов цитокининовых рецепторов. Данные в таблице показывают длину в аминокислотах (aa) составляющих модуля отдельно для АНК2-, АНК3- и CRE1/АНК4-ортологов, а также для всех рецепторов. Средние значения выделены жирным шрифтом, разброс данных показан в скобках. Всего было проанализировано 100 пептидных последовательностей, включая 28, 33, 39 последовательностей для АНК2-, АНК3- и CRE1/АНК4-ортологов, соответственно. На рисунке схематически показана средняя длина CHASE-домена, ТМ-доменов и расстояния между ними.

остатки лишь умеренно консервативны. В отличие от них, домены D-ТМ демонстрируют высокую степень преемственности последовательности (таблица 7). В отдельных группах ортологов 32-48 % остатков высоко (80-100 %) консервативны и представляют собой четкие мотивы, приводящие для всех рецепторов к основной консенсусной последовательности: $Axxx(S/A)x(G/L)x(L/F)VIx(L/F)LxG(Y/H)I$. Наличие консервативного мотива последовательности в домене D-ТМ подчеркивает его важную роль не только в закреплении на мембране, но и в передаче сигнала.

Таблица 7 Мотивы последовательностей N-концевых и С-концевых ТМ-доменов, фланкирующих лиганд-связывающий модуль цитокининовых рецепторов. Подробнее см. легенду к рис. 8

Sequence logo and core motif Ortholog group	Upstream TM helices	Downstream TM helices
АНК2	-LxxxxxxGxxxSxxxF- 	-AxxxSxxxxlTxLxGxIF 
АНК3	-WxxxWxxxS- 	-PxxAlxTSxGxLVlALLxxxI- 
CRE1/АНК4	--xxWxxx-- 	-AxxxxxxxFVlxxLVGYI- 
All receptors	-(L)xx(W)xxxxxxx(S)- 	-AxxxxxxxVlxxLxGxI- 

Расстояние между доменом CHASE и ближайшей трансмембранной областью варьируется в зависимости от положения спирали вверх или вниз по течению (рис. 9). Расстояние между CHASE и U-ТМ доменом довольно равномерно и соответствует (за очень редким исключением) примерно 50 аминокислотным остаткам. Очевидно, точная длина этой линкерной области важна для функции рецептора, хотя в настоящее время механизм, лежащий в ее основе, неизвестен. Домены D-ТМ, как правило, расположены ближе к доменам CHASE, в большинстве случаев их разделяют всего 7-16 (среднее значение 10) аминокислот. В то время как все идентифицированные CHASE-содержащие гистидиновые киназы растений обладают D-ТМ-доменами, рецепторов, лишенных U-ТМ-доменов, немного. Это касается ортологов АНК4 у могоара *Setaria italica* (SiНК4) и винограда *Vitis vinifera* (VvНК4), ортологов АНК2 у клещевины *Ricinus communis* (RcНК2) и маниока *M. esculenta* (MeНК2b). Отсутствие U-ТМ домена ставит под сомнение роль таких гистидиновых киназ в качестве рецепторов цитокининов. Эта роль может быть

особенно сомнительной для MeHK2b, где консервативные аминокислоты (Gly200, Ala202 и Ala204) отсутствуют в домене CHASE. С другой стороны, актуальные программы биоинформатики могут быть недостаточно мощными для выявления трансмембранных доменов необычной структуры/состава. Для прояснения этой проблемы необходимы дальнейшие исследования отдельных цитокининовых рецепторов.

Выравнивание последовательностей, прилегающих к домену CHASE, выявило неожиданно высокий уровень консервативности последовательностей (табл. 8). В коротком (10 остатков) линкере (D-линкер) между доменом CHASE и доменом D-TM почти половина остатков высоко консервативна, что приводит к основному мотиву CR(F/Y)x(Q/H)K(P/A)P. Мотивы групп ортологов, особенно ANK3 [(CRFKQK(P/A)], еще более консервативны. Сохранение левой части D-линкера можно объяснить тем, что она принадлежит к проксимальному PAS-подобному субдомену в связывающем модуле. Правая часть D-линкера, очевидно, участвует вместе с D-TM доменом в междоменной передаче сигнала. Последовательность левого линкера (U-линкер) между спиралью U-TM и доменом CHASE представляется чрезвычайно консервативной, особенно ее правая часть, прилегающая к CHASE (Таблица 8). Этот U-линкер содержит 13 полностью консервативных остатков из 50; эта доля (26 %) значительно превышает аналогичную долю в домене CHASE (около 9 %). Еще 15 остатков сильно консервативны, и в целом эти консервативные буквы составляют основной мотив этой рецепторной области: ...x(R/K) RxExLx(S/N)MCD(E/Q)RARMLQDQF(N/S)VS (M/V)NHV(H/Q)A(L/M)(A/S)IL(V/I)STFH(H/Y) xK

Таблица 8. Мотивы последовательностей линкеров, прилегающих к CHASE доменам цитокининовых рецепторов. Положение поворотных α 1-спиралей показано зеленой линией под стеками. Подробнее см. легенду к рис. 9.

Sequence logo Ortholog group	U-linker (TM_CHASE)	D-linker (CHASE_TM)
АНК2		
АНК3		
CRE1/ АНК4		
All receptors		

Согласно 3D-структуре рецепторов, эта область почти полностью соответствует длинной ("поворотной") α 1-спирали, предшествующей домену CHASE (α 1-спираль на рис. 5). Из 3D-структуры связывающего модуля было видно, что эта длинная α -спираль удерживает два субдомена домена CHASE (рис. 4). Однако функция удержания не обязательно требует высокого уровня консервативности аминокислот. Найденные консервативные мотивы указывают на более важную роль этой поворотной α -спирали в функционировании рецептора. Эта консервативная спираль может фиксировать соответствующую конформацию домена PAS и направлять его движение при связывании лиганда. Также эта поворотная α -спираль вместе с α 2-спиралью образует интерфейс димеризации, хотя консервативные N-концевые части поворотных спиралей соседних рецепторов не взаимодействуют напрямую. Функция одного из консервативных остатков α -спирали более очевидна - это консервативный цистеин (C18 в U-линкере, табл. 8), который образует дисульфидный мостик с другим консервативным цистеином (C1 в D-линкере, табл. 8). Оба реагирующих цистеина расположены за пределами домена CHASE и сближают фланкирующие трансмембранные домены. Интересно, что кислые остатки Asp (D) и Glu (E) (отмечены красным цветом в таблице 8) встречаются только в N-части поворотной α -спирали.

3.1.3 К вопросу о механизме активации рецептора

В настоящее время нет прямых экспериментальных доказательств того, как передается сигнал в цитокининовом рецепторе от его сенсорного модуля к киназному. Однако недавние исследования сенсорных трансмембранных гистидиновых киназ прокариот могут позволить сделать некоторые предположения относительно аналогичных киназ у растений. У бактерий и архей PAS-домены существуют почти исключительно в сенсорах двухкомпонентных регуляторных систем (Taylor and Zhulin 1999). Было показано, что PAS-домены имеют гибкую конформацию, приспособленную к восприятию различных входных сигналов и передаче сенсорных событий нижележащим компонентам сигнальной цепи (Vreede et al. 2003). Поэтому разумно предположить, что и в случае цитокининовых рецепторов высокоаффинное связывание цитокинина приводит к определенным конформационным перестройкам области PAS в сенсорном модуле. У прокариот PAS-домены легко вовлекаются в различные белок-белковые взаимодействия, включая гомодимеризацию (Möglich et al. 2009). Поэтому можно предположить, что связывание цитокинина влияет на режим взаимодействия между лиганд-связывающими PAS-доменами в димере(ах) рецептора. Такое изменение режима взаимодействия субдоменов PAS может вызвать взаимное вращение сенсорных модулей относительно друг друга. По данным рентгеновской кристаллографии, сенсорные домены рецептора CRE1/АНК4 с захваченным цитокинином не контактируют в димерах своими PAS-субдоменами (Hothorn et al. 2011), хотя нельзя исключить их взаимодействие в несвязанном состоянии. PAS-домены разных пар рецепторов также могут находиться в контакте. Скручивание сенсорных модулей может, в свою очередь, изменять взаимное расположение трансмембранных доменов и цитоплазматических частей рецепторов в димере. Поскольку фосфорилирование гистидина, очевидно, происходит в транс-способом параллельным рецептором, изменение взаимного положения рецепторов в димере может включать или выключать их киназную активность. Следует отметить, что во многих цитокининовых рецепторах идентифицирован короткий мотив coiled-coil,

соединяющий трансмембранную спираль с гистидиновым киназным доменом (база данных Pfam). По аналогии с бактериями, этот структурный мотив также может играть роль во внутрибелковой передаче сигнала (Möglich et al. 2009).

Другой способ активации был недавно обнаружен в исследованиях бактерий. *Azotobacter vinelandii* кодирует рецепторную гистидин-киназу NifL, содержащую тандемные PAS-домены в сенсорном модуле. Дистальный PAS1 отвечает за редокс-рецепцию, тогда как проксимальный PAS2 не имеет очевидного лиганда или кофактора, и его функция неизвестна. Важная роль PAS2 в передаче сигнала была выявлена благодаря тому, что некоторые мутации в этом домене были достаточны, чтобы либо блокировать передачу сигналов от PAS1, либо имитировать активное состояние в отсутствие сигнала. Авторы предположили, что домены PAS1 и PAS2 существуют в гомодимерной форме в димере рецептора. При конформационном изменении в результате сенсорного события (окисления) домены PAS поворачиваются относительно друг друга, что приводит к ножницеобразному движению, влияющему на четвертичную структуру доменов PAS2 (вызывая их диссоциацию) (Slavny et al. 2010).

Индукцированное сигналом конформационное изменение в сенсорном модуле может вызвать изменение положения, конформации и/или взаимодействий спирали D-ТМ. Исследования с бактериальной рецепторной гистидин-киназой NarX, которая реагирует на нитрат и нитрит для регуляции анаэробного дыхания, указали на возможный механизм такой сигнализации. Было установлено, что связывание нитрата с сенсорным модулем вызывает его конформационные изменения, которые приводят к поршнеобразному смещению С-концевой спирали на величину около 1 Å. Авторы пришли к выводу, что такое смещение должно передаваться через трансмембранную спираль и может представлять собой консервативный механизм передачи сигнала через липидный бислой (Cheung and Hendrickson 2009). Подобное смещение поршневого типа было обнаружено в сенсорном домене TorS, другой сенсорной трансмембранной гистидин-киназы бактерий (Moore and Hendrickson 2009). Анализ вышеупомянутых и других данных привел к выводу, что

маломассивное поршневое смещение спирали, наблюдаемое в сенсорных доменах бактерий, идеально подходит для трансмембранной передачи сигнала через длинные мембранные спирали (Falke and Erbse 2009). Последние экспериментальные данные подтверждают гипотезу о специфическом конформационном изменении сенсорного домена гистидинкиназ, вызванном связыванием лиганда. Связывание лиганда вызывает поворот домена, который может быть связан с поршнеобразным движением через трансмембранные спирали (Zhang and Hendrickson 2010). Что касается цитокининовых рецепторов, то для проверки этой гипотезы необходимы дальнейшие эксперименты по кристаллографии и мутациям.

3.1.4 Обсуждение к части 3.1

Цитокининовые рецепторы принадлежат к большому семейству мембраносвязанных сенсорных гистидиновых киназ, встречающихся у большинства прокариот и некоторых эукариот. Они являются частью двухкомпонентных систем, которые используют сенсорную киназу и регулятор ответа для специфической трансдукции сигнала к первичным клеточным мишеням. Предполагается, что цитокининовые рецепторы имеют монофилетическое происхождение; их предки происходят от цианобактерий, которые передали свою сенсорную гистидиновую киназу (киназы) высшим растениям, очевидно, через некоторые неизвестные виды водорослей. Цитокининовые рецепторы могут быть разделены в растениях на три основные эволюционные ветви. Между семействами ортологов рецепторов существуют явные структурные различия. Эти различия касаются, прежде всего, чувствительного домена CHASE, который довольно вариативен среди других доменов цитокининовых рецепторов. Структурные вариации доменов CHASE приводят к различной лигандной специфичности ортологов рецепторов (Romanov et al. 2006; Stolz et al. 2011). Различные свойства ортологов рецепторов могут влиять на регуляторные связи между подземными и надземными частями растений (Romanov et al. 2006; Hirose et al., 2008; Romanov et al. 2009; Lomin et al., 2012). Другой структурной особенностью, которая может быть важна для функционирования рецептора, является организация последовательностей,

прилегающих к CHASE-доменам. До сих пор этот аспект был недооценен. С помощью инструментов биоинформатики были выявлены новые особенности структуры сенсорного модуля. Мы проанализировали длину и структуру областей, фланкирующих CHASE-домен, включая трансмембранные спирали. Выявлена высокая степень консервности этих областей у различных цитокининовых рецепторов. Путем множественного выравнивания были найдены новые консервативные белковые мотивы, что указывает на важную роль CHASE-фланкирующих областей в функционировании рецептора. Особенно консервативной является длинная поворотная α -спираль, расположенная непосредственно перед доменом CHASE. В то же время, число трансмембранных доменов, расположенных слева, варьирует [от 1 (0) до 4], и это число, как было установлено, зависит от ветви ортологов рецепторов. Нельзя не отметить, что число трансмембранных доменов может каким-то образом влиять на субклеточную локализацию рецепторов (Brandizzi et al. 2002). С другой стороны, биологический смысл существования трех эволюционных ветвей цитокининовых рецепторов остается загадочным, поскольку рецепторы, принадлежащие к различным группам ортологов, могут легко компенсировать отсутствие паралогов у мутировавших арабидопсисов с нокаутированными генами цитокининовых рецепторов. Также пока не ясно, почему число генов для цитокининовых рецепторов у разных видов растений столь различно: от 1 до 8. Очевидно, в растениях, где число генов, кодирующих цитокининовые рецепторы, невелико, некоторые ортологи рецепторов отсутствуют. Вопрос о роли ортологов ветви рецепторов остается предметом дальнейших исследований.

Изучив около 100 последовательностей рецепторов, можно сделать вывод, что не только домен CHASE, но и весь модуль представляет собой консервативную белковую структуру. Этот модуль имеет длину около 280 аминокислотных остатков и состоит из отдельных областей. Центральная область, названная доменом CHASE (длиной около 220 остатков), в свою очередь состоит из двух субдоменов: уже известного PAS-домена, участвующего в связывании лигандов, и меньшего PAS-

подобного (или псевдо-PAS) субдомена. Весь связывающий модуль с обеих сторон фланкирован трансмембранными спиралями длиной 21-22 остатка. Может быть одна или несколько трансмембранных слева от CHASE, но всегда только одна спираль справа от него. Степень консервативности вдоль всей области различна в зависимости от положения последовательности. В целом домен CHASE имеет довольно умеренную степень консервативности: около 9 % полностью консервативных аминокислот. Конечно, внутри домена CHASE существуют короткие последовательности с более высокой степенью консервации. Наиболее консервативной является область, прилегающая к N-концу домена CHASE, т.е. линкер между доменом CHASE и доменом U-TM. Этот U-линкер представляет собой в основном длинную α -спираль фиксированного размера (около 45 остатков) и имеет высокую долю (26 %) полностью консервативных аминокислот, особенно в С-половине. Высокая степень консервативности этой поворотной α -спирали предполагает ее важную роль в функционировании модуля. Наличие этой поворотной спирали является отличительной чертой цитокининовых рецепторов; она была обнаружена во всех рецепторах высших растений, но не в сенсорных модулях гибридных гистидиновых киназ водорослей. D-линкер на другой стороне модуля довольно короткий (около 10 остатков), так как PAS-подобный субдомен соединяется почти напрямую с D-TM-доменом всего через несколько аминокислотных остатков. В отличие от доменов U-TM, которые не имеют четкого мотива в последовательности, при выравнивании последовательностей доменов D-TM был обнаружен четкий консенсусный мотив из шести консервативных остатков. Это предполагает важную роль домена D-TM, возможно, вместе с соседним PAS-подобным субдоменом, в передаче сигнала от сенсорного к каталитическому модулю.

Другим интересным вопросом является молекулярная основа междоменной сигнализации, индуцированной цитокинином. Очевидно, что полипептидные участки, прилегающие к домену CHASE, играют важную роль в этом процессе. Мы до сих пор точно не знаем, какие перестройки происходят в чувствительном модуле

рецептора при связывании лиганда, как этот сигнал передается через мембранный бислой и как он включает киназную активность рецептора. Однако мы уже знаем ряд специфических точечных мутаций в домене CHASE, в домене D-ТМ и в каталитическом модуле, которые делают рецептор конститутивно активным независимо от цитокининов. Мутировавшие гены рецепторов могут представлять собой новый инструмент для современной биотехнологии и биоинженерии, открывающий перспективы контроля роста и развития растений посредством эктопической экспрессии таких генов в трансгенных растениях.

3.2 Лиганд-связывающие свойства рецепторов цитокининов

Цитокининовые рецепторы расположены в мембранах и вызывают специфическое связывание цитокининов (Romanov et al., 2005; 2006). Мы решили использовать эту способность для систематического изучения свойств цитокининовых рецепторов в растительной системе анализа. Для этого сравнивали цитокинин-связывающую активность мембран, выделенных из листьев растений табака (*N. benthamiana*), которые были инфицированы или не инфицированы штаммом *Agrobacterium tumefaciens*, несущим кассету экспрессии рецептора в своей Т-ДНК. Экспрессию рецепторов проводили под контролем флуоресценции. Мембраны, выделенные из листьев контрольных растений *N. benthamiana*, обладали лишь низкой активностью связывания цитокинина ($[^3\text{H}]tZ$), которая увеличивалась в 20 раз при транзientной экспрессии генов цитокининового рецептора АНК3 из арабидопсиса или ZmНК1 из кукурузы (рис. 10). Этот рост активности в основном соответствовал специфическому связыванию, что свидетельствует о высокой аффинности взаимодействия. Более 95% $[^3\text{H}]tZ$ -специфического связывания было обусловлено чужеродными рецепторами. Такое значительное увеличение активности связывания микросом по сравнению с фоновым значением позволило изучить свойства каждого отдельного рецептора при его транзientной экспрессии.

3.2.1 Зависимость связывания цитокинина от условий среды

Как и в бактериальной тест-системе (Romanov et al., 2006), специфическое связывание меченого *tZ* с различными рецепторами происходило довольно быстро,

достигая плато через 20-40 минут (рис. 11). Температура неоднозначно влияла на связывание. АНКЗ показал значительное (на 20-30%) увеличение связывания гормона при 23°C по сравнению с 0°C (ледяная баня). Это противоречит бактериальному анализу, в котором самый высокий уровень связывания гормона с

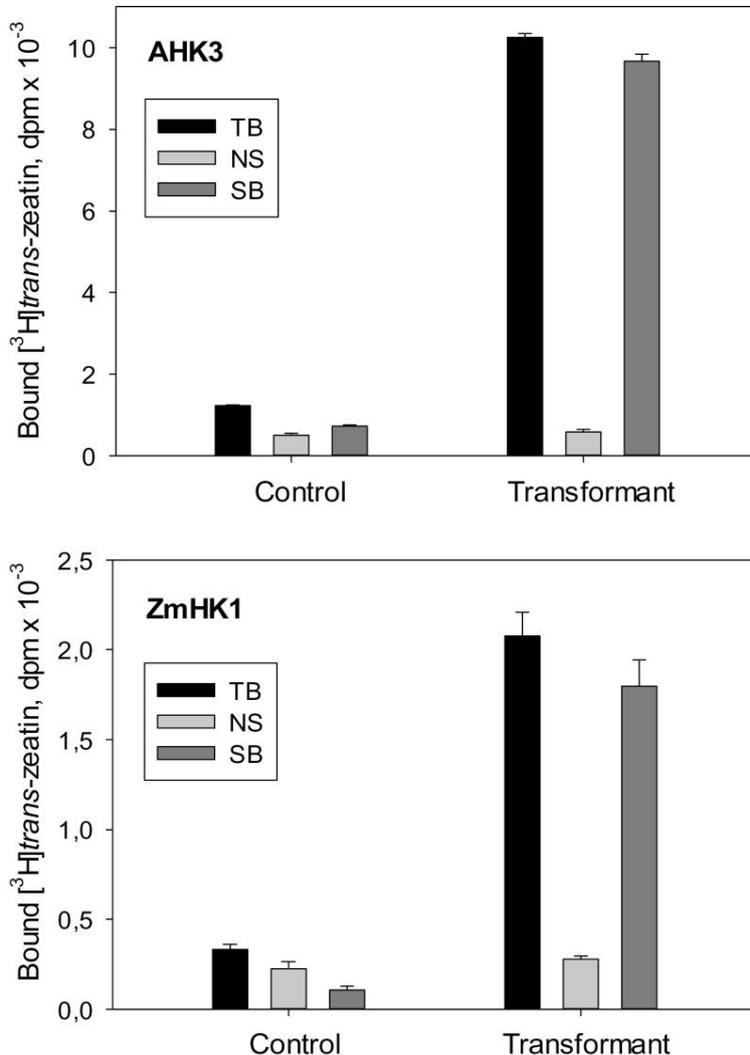


Рис. 10. Увеличение специфического связывания *транс*-зеатина с мембранами растений при транзientной экспрессии цитокининовых рецепторов в листьях табака. Показаны микросомы из контрольных и трансформированных ("Transformant") растений. TB, NS и SB обозначают тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно.

АНКЗ наблюдался при 0°C (Romanov et al., 2006). ZmHK1 не показал воспроизводимых изменений в связывании гормона в этих температурных условиях (Рис. 11). Все температурно-зависимые сдвиги были результатом изменений в *tZ*-

специфическом связывании, в то время как неспецифическое связывание не зависело от температуры и оставалось на низком и постоянном уровне.

Влияние pH на способность рецепторов АНК3, АНК4 и ZmHK1 связывать меченый *tZ* исследовали в интервале от pH 5 до pH 9.5. MES и Tris использовались для буферизации в интервалах pH 5-7 и 7-9.5, соответственно. Идентичность значений pH в среде и внутри мембранных везикул была подтверждена с помощью pH-чувствительного флуоресцентного красителя пиранина.

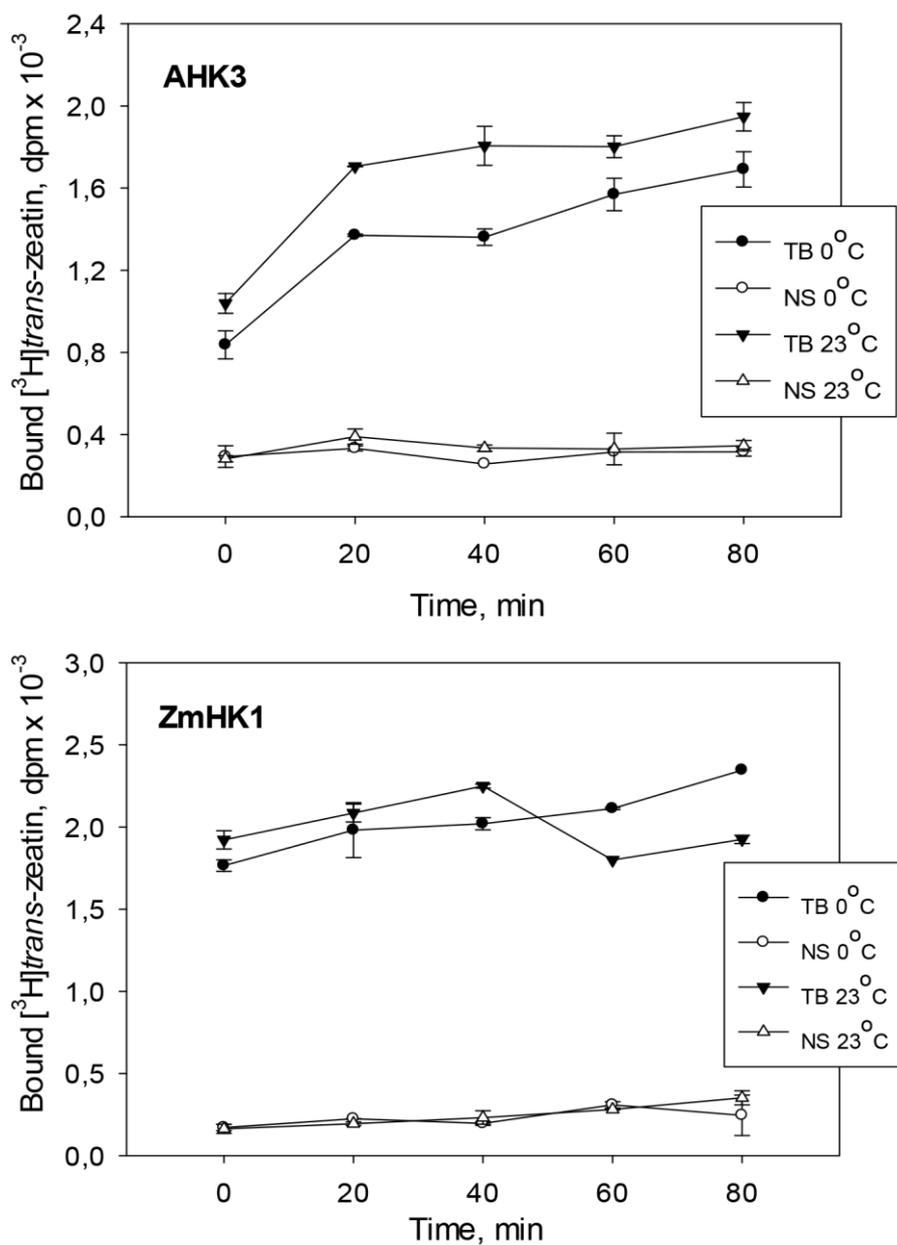


Рис. 11 Температурная зависимость и степень уровень связывания меченого *транс*-зеатина с рецепторами с мембранами из растений табака.

pH-зависимость связывания [^3H]tZ с рецепторами показана на рис. 12 А-С. При pH 5 гормон-специфическое связывание АНК3 было незначительным (рис. 12 А), в то время как АНК4 и ZmHK1 демонстрировали слабое, но заметное связывание (рис. 12 В, С). С увеличением pH наблюдался рост связывания гормона всеми рецепторами АНК, достигающий плато при pH около 6.5-7. Добавление каналообразующего пептида аламетицина (10 мкМ) не изменило форму кривой (за исключением небольшого изменения при самом высоком pH (рис. 13)). Это доказывает истинность измеренной зависимости от pH внутри везикул.

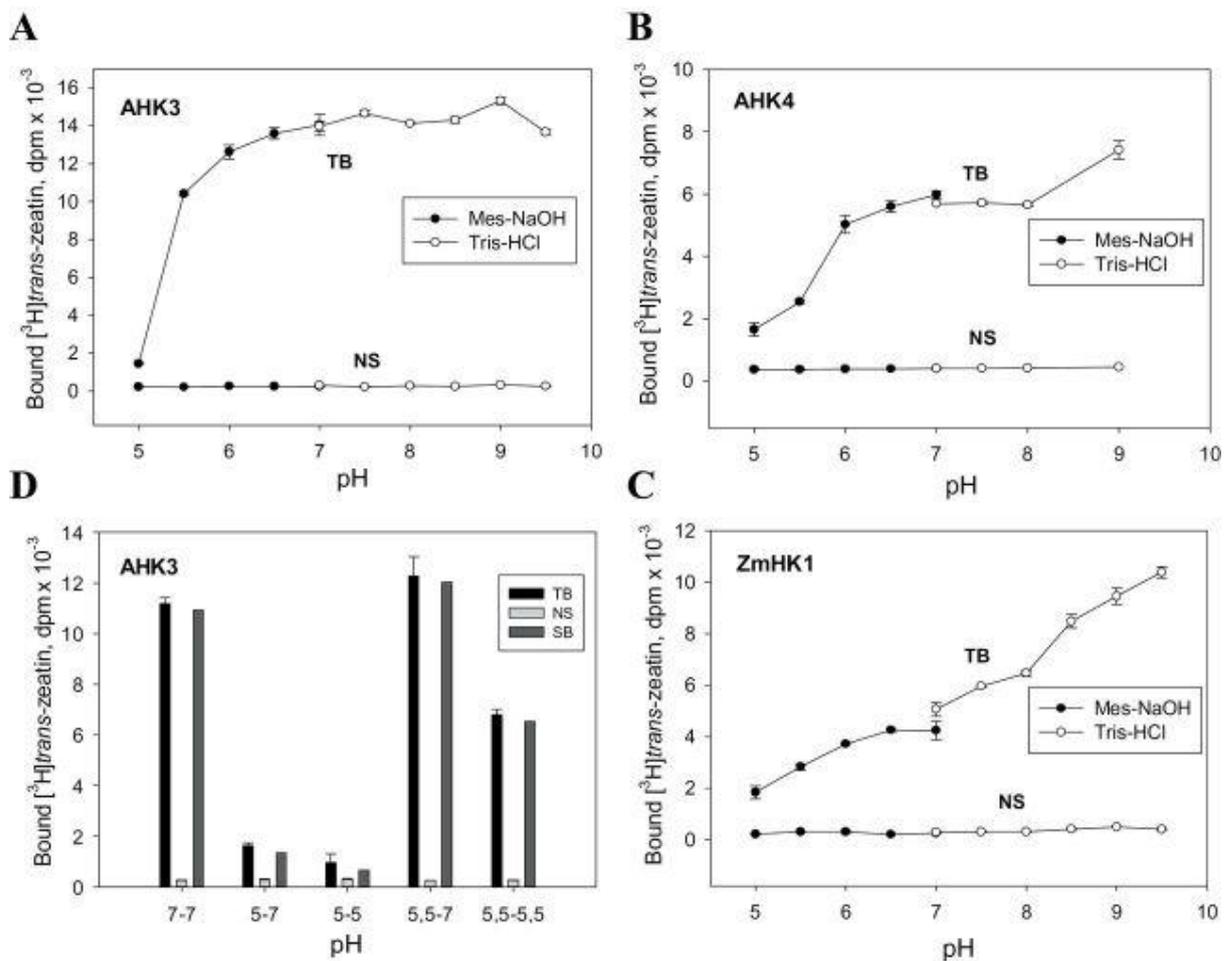


Рис. 12. pH-зависимость и обратимость взаимодействия цитокинин-рецептор. Связывание транс-зеатина с АНК3 (А), АНК4 (В) и ZmHK1 (С) в растительной системе анализа при различных значениях pH. Обратимость связывания лиганда с АНК3 после сдвига pH показана в (D); начальное и конечное значения pH обозначены цифрами под абсциссой. TB, NS и SB означают тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно.

Было проверено, является ли влияние pH на гормон-рецепторное взаимодействие обратимым. Для этого часть образцов микросом после инкубации при низком pH переносили в среду с pH 7 и определяли уровень гормон-специфического связывания. Полученные данные показали, что снижение связывания при pH 5.5 было полностью обратимым, когда мембраны, содержащие АНКЗ, снова переносили в буфер pH 7 (рис. 12 С). Однако после инкубации при pH 5 гормон-связывающая способность не восстанавливалась при переносе в оптимальные условия pH (рис. 12 С). Это указывает на необратимую перестройку в лиганд-связывающем домене АНКЗ, вызванную инкубацией при pH 5.

pH-зависимость специфического связывания *tZ* с ZmHK1 заметно отличалась от связывания с рецепторами АНК (рис. 12 D). Все рецепторы показали очевидный минимум специфического связывания при pH 5. Однако с увеличением pH наблюдался устойчивый рост связывания цитокинина с ZmHK1, достигающий

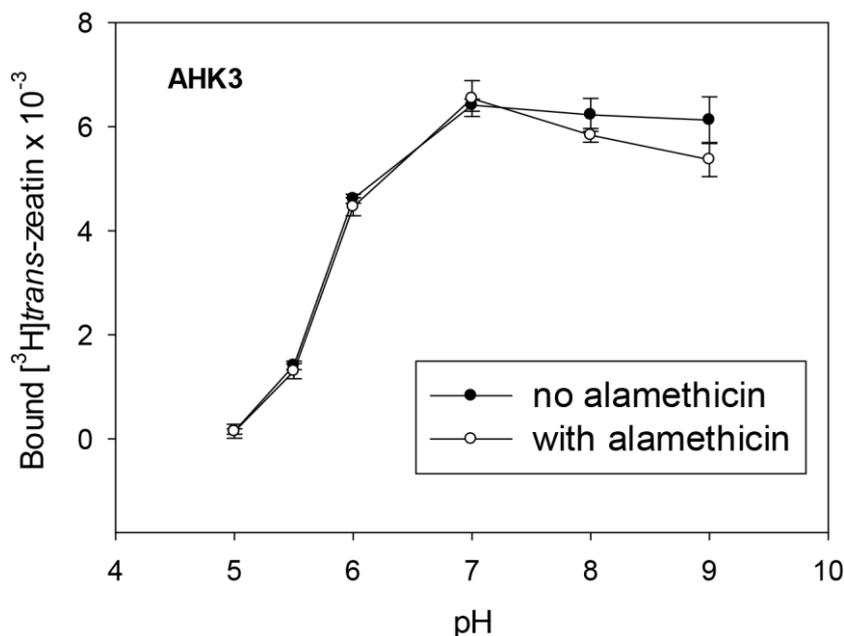


Рис. 13. pH-зависимость связывание меченного *транс*-зеатина с цитокининовым рецептором АНКЗ в растительной системе. Анализ проводился в отсутствии и присутствии агента, образующего поры, аламецитина (10 мкМ).

максимума при pH 9.5. В отличие от этого, такой щелочной диапазон pH практически не влиял на связывание лигандов с рецепторами АНК.

Неспецифическое связывание во всех случаях не зависело от pH и было близко к нулю.

3.2.2 Лигандная специфичность рецепторов

В растительной клетке присутствуют многочисленные метаболиты цитокинина, и присущая им биологическая активность часто не ясна. Поэтому особый интерес представляет определение сродства рецепторов к различным цитокининам и их производным. Исследование специфичности лигандов рецепторов было проведено с помощью серии доза-зависимых анализов связывания с основаниями цитокининов и их рибозидами.

Кажущиеся константы сродства (K_A , константа ассоциации= $1/K_D$, константа диссоциации) гормон-рецепторных комплексов были определены на основе экспериментов по насыщению с [3H]*tZ* и в конкурентных опытах с различными дозами немеченых цитокининов. Сравнение АНК3 и ZmHK1 показало (рис. 14), что рецепторы сильно различаются по абсолютному и относительному сродству к цитокининам, что соответствует ранее опубликованным данным (Spichal et al., 2004; Romanov et al., 2006; Lomin et al., 2011). Среди природных цитокининовых оснований наибольшим сродством к АНК3 обладал *tZ* ($K_A=0,23 \text{ нМ}^{-1}$), за ним следовали дигидрозеатин (DZ) и *iP*, тогда как ВА и особенно *cZ* проявляли наименьшее сродство. Сродство АНК3 к *tZ* было в 375 раз сильнее по сравнению со сродством к *cZ*. Аденин практически не конкурировал с *tZ* за связывание с рецептором (рис. 14, рис. 15).

Что касается ZmHK1, то он обладает высоким сродством ко многим цитокининовым основаниям, кроме TD и DZ. *iP* ($K_A=1,64 \text{ нМ}^{-1}$) и ВА ($K_A=0,82 \text{ нМ}^{-1}$) показали самое высокое сродство к этому рецептору в растительной системе, за ними следуют *tZ* и *cZ* со значениями K_A , близкими друг к другу, тогда как TD и DZ имели самое слабое сродство (рис. 14). Как и в случае с АНК3, аденин практически не взаимодействовал с рецептором ZmHK1.

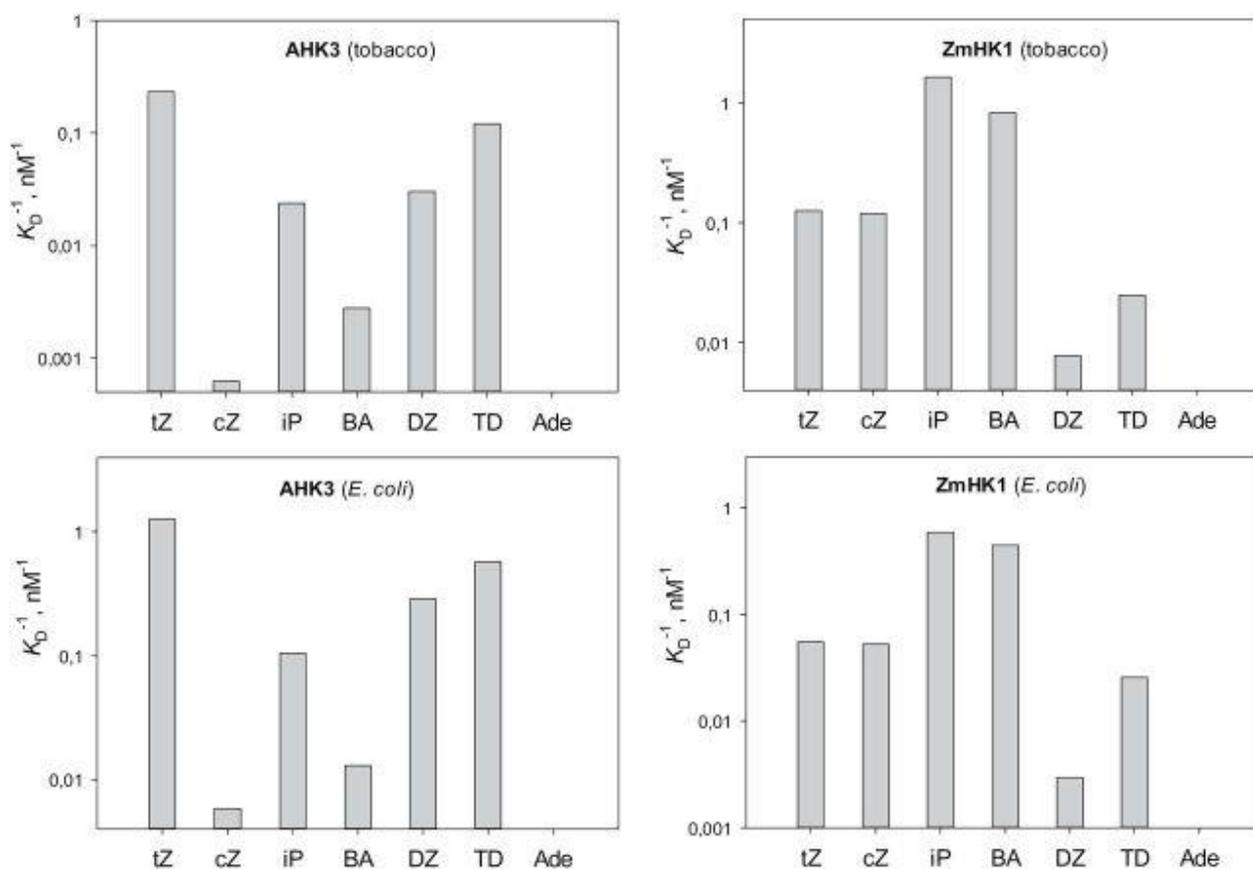


Рис. 14. Константы сродства различных цитокининовых оснований к рецепторам ANK3 и ZmHK1 в различных системах анализа. Константы сродства были измерены в растительной (микросомы табака) или бактериальной (сферопласты *E. coli*) системе анализа, как указано. Ордината (логарифмическая шкала) показывает кажущуюся $K_A=K_D^{-1}$, которая положительно коррелирует со сродством рецептора к лиганду. *tZ* - *транс*-зеатин; *cZ* - *цис*-зеатин; *iP* - изопентениладенин; *BA* - *N*6-бензиладенин; *DZ* - дигидрозеатин; *TD* - тидиазурон; *Ade* - аденин.

Лигандная специфичность цитокининовых рецепторов оценивалась параллельно в системе гетерологичного анализа с использованием сферопластов *E. coli*. Сравнение свойств отдельных рецепторов в двух различных системах анализа показало, что каждый рецептор сохраняет типичный профиль лигандной специфичности по отношению к цитокининовым основаниям (рис. 14). Хотя абсолютные значения констант сродства варьировали, их общая картина была очень похожа в обеих тест-системах, поэтому профили лигандной специфичности отдельных рецепторов стабильно воспроизводились независимо от используемой тест-системы.

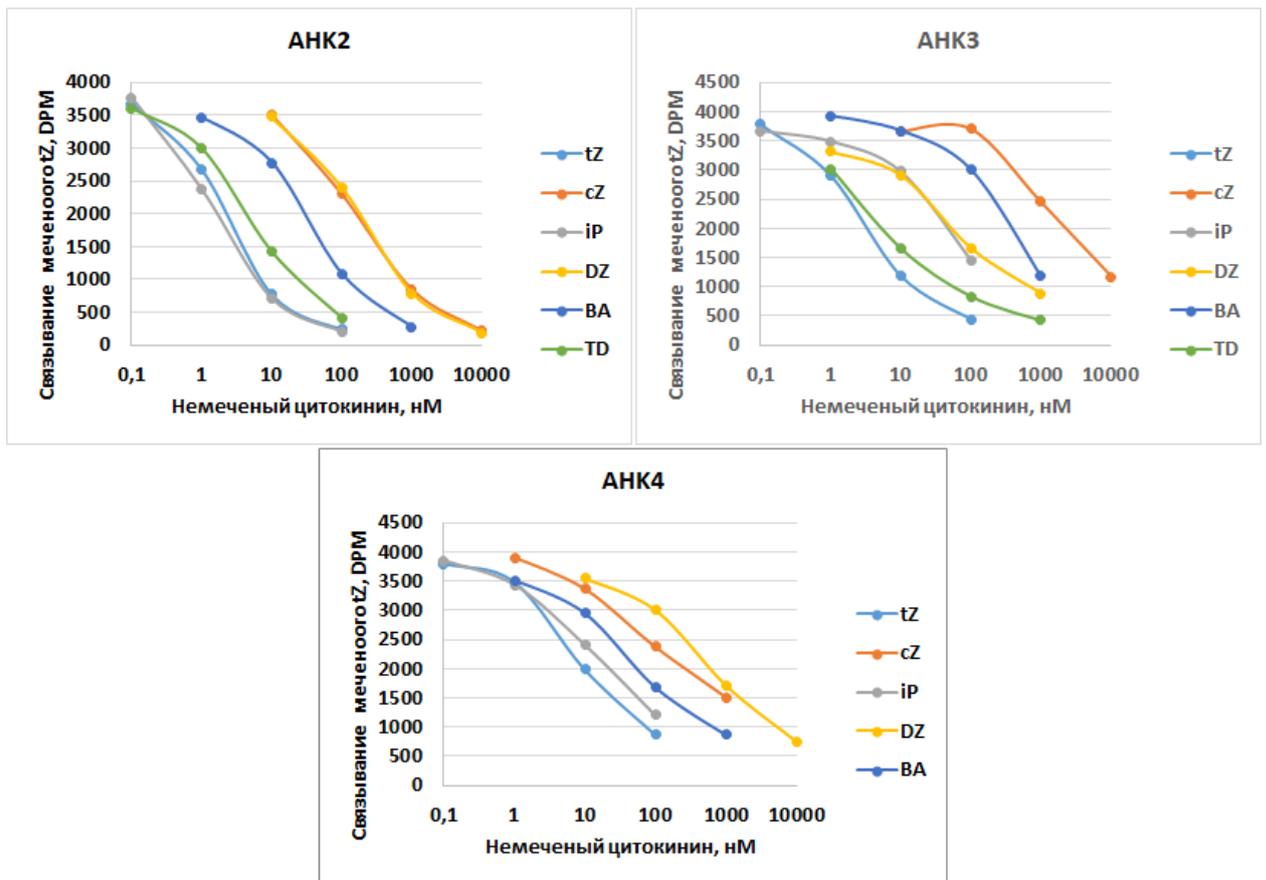


Рис. 15. Лигандная специфичность цитокининовых рецепторов *Arabidopsis thaliana* в растительной системе. Эксперименты по вытеснению немечеными лигандами меченого тритием *транс*-зеатина.

3.2.3 Взаимодействие рецепторов с рибозидами цитокининов

Особый интерес представляет взаимодействие рецепторов с рибозидами цитокининов, поскольку имеющиеся в литературе данные противоречивы (Neul et al., 2012). Средство двух повсеместно распространенных природных рибозидов, *транс*-зеатин рибозида (*tZR*) и изопентениладенозина (*iPR*), к рецепторам было проверено и сравнено со средством соответствующих оснований (рис. 16). Конкурентные эксперименты со сферопластами *E. coli* подтвердили предыдущие данные (Romanov et al., 2005; 2006): рибозиды способны вытеснять меченый *tZ* из гормон-рецепторного комплекса достаточно эффективно и аналогично соответствующим цитокининовым основаниям. Однако в системе анализа растений рибозиды вели себя по-другому (рис. 16): в большинстве случаев рибозиды почти не конкурировали с меченым *tZ* за связывание с рецепторами. Единственным исключением было взаимодействие *ZmHK1* с *iPR*, хотя средство рецептора к

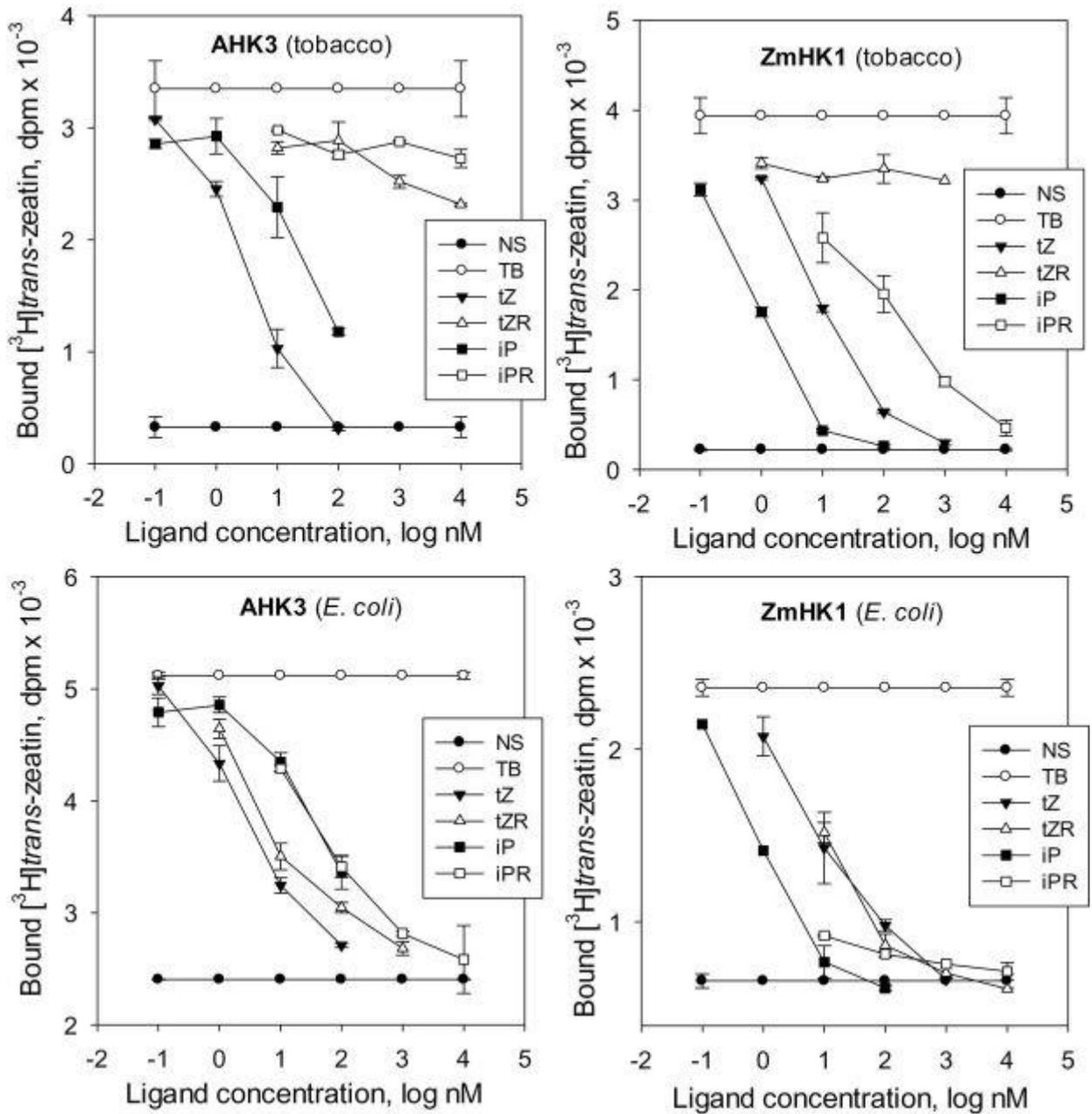


Рис. 16. Взаимодействие рибозидов и оснований цитокинина с рецепторами АНК3 и ZmHK1. Взаимодействие рецептор-лиганд измеряли в растительной (микросомы табака) или бактериальной (сферопласты *E. coli*) системе анализа, как указано. *tZ* - *транс*-зеатин; *tZR* - *транс*-зеатинрибозид; *iP* - изопентениладенин; *iPR* - изопентениладенозин; NS и TB - неспецифическое и тотальное связывание, соответственно.

лиганду было по крайней мере на два порядка ниже, чем в случае взаимодействия ZmHK1 с iP. Дополнительные эксперименты с АНК4 подтвердили неспособность цитокининовых рецепторов связывать *N*9-рибозилированные цитокинины с высокой аффинностью (Рис. 17). Таким образом, в случае рибозидов цитокинина результаты экспериментов по связыванию сильно зависят от тест-системы.

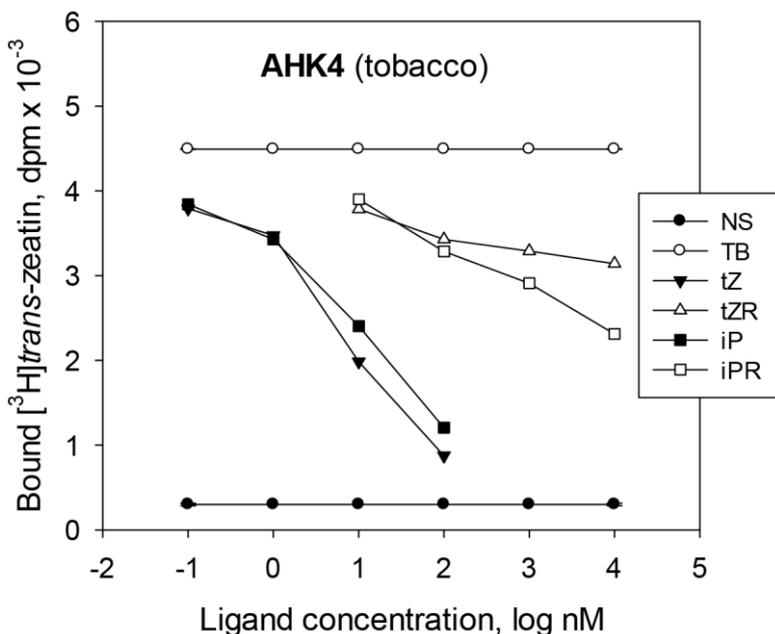


Рис. 17. Взаимодействие оснований цитокининов и рибозидов с рецептором АНК4 в растительной системе анализа. *tZ*, *транс-зеатин*, *tZR*, *транс-зеатинрибозид*, *iP*, *изопентениладенин*, *iPR*, *изопентениладенинрибозид*. NS и TB соответственно обозначают неспецифическое и тотальное связывание. Кажущаяся K_D для *tZ* и *iP* при взаимодействии с АНК4 (рН 7.4, 0-4°C) вычислены как как 4.6 и 7.6 нМ, соответственно.

Кроме того, изолированные мембраны *E. coli*, содержащие цитокининовые рецепторы, были проверены на способность взаимодействовать с рибозидами цитокинина. Эксперименты показали, что рибозиды цитокинина сильно взаимодействовали с рецепторами в изолированных бактериальных мембранах, аналогично взаимодействию рибозидов со сферопластами (Рис. 18). Таким образом, гомологичная система анализа на основе изолированных растительных мембран

обладает уникальными свойствами и не может быть заменена изолированными бактериальными мембранами (по крайней мере, из *E. coli*).

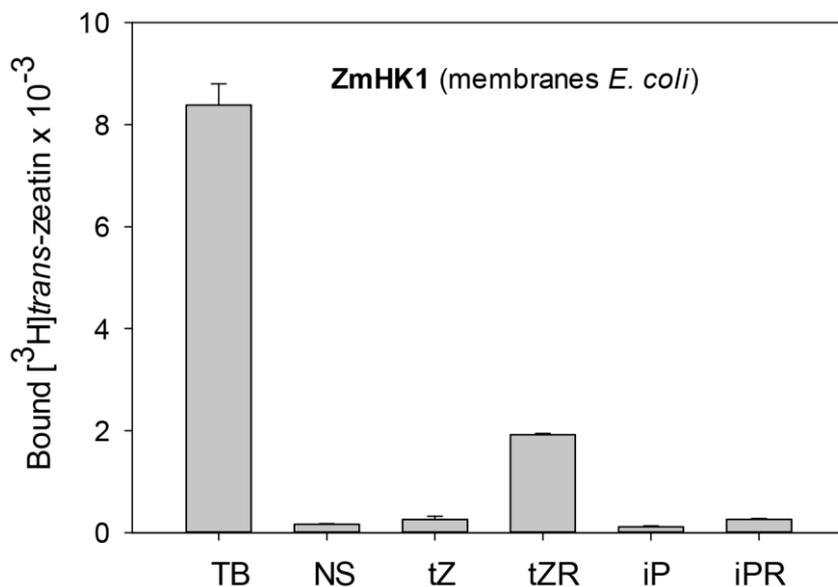


Рис. 18. Связывание меченого *транс*-зеатина с изолированными мембранами из *E. coli*, которые экспрессируют *ZmHK1*. TB и NS – тотальное и неспецифическое связывание. Другие колонки показывают связанный меченный *транс*-зеатин в присутствии 1 мкМ немеченных оснований цитокининов или соответствующих рибоозидов как обозначено. Все исследованные лиганды, *транс*-зеатин (*tZ*), *транс*-зеатинрибозид (*tZR*), изопентениладенин (*iP*) и изопентениладенинрибозид (*iPR*) сильно конкурировали по связанию с меченым *tZ*.

3.2.4 Исследование полноразмерного рецептора АНК2

Еще одним преимуществом растительной тест-системы является возможность изучения полноразмерных рецепторов, которые практически не экспрессируются в бактериях. Например, экспрессия АНК2 в *E. coli* столкнулась с трудностями, предположительно из-за токсичности этого белка для бактерий. Как следствие, до сих пор в гетерологичной системе анализа связывания был изучен только отделенный сенсорный модуль АНК2 (Stolz et al., 2011). Однако этот же рецептор был успешно экспрессирован в листьях табака после опосредованной *Agrobacterium* трансформации ДНК-конструкцией, содержащей полноразмерный ген АНК2 (Wulfetange et al., 2011). Для анализа лигандной специфичности полноразмерного

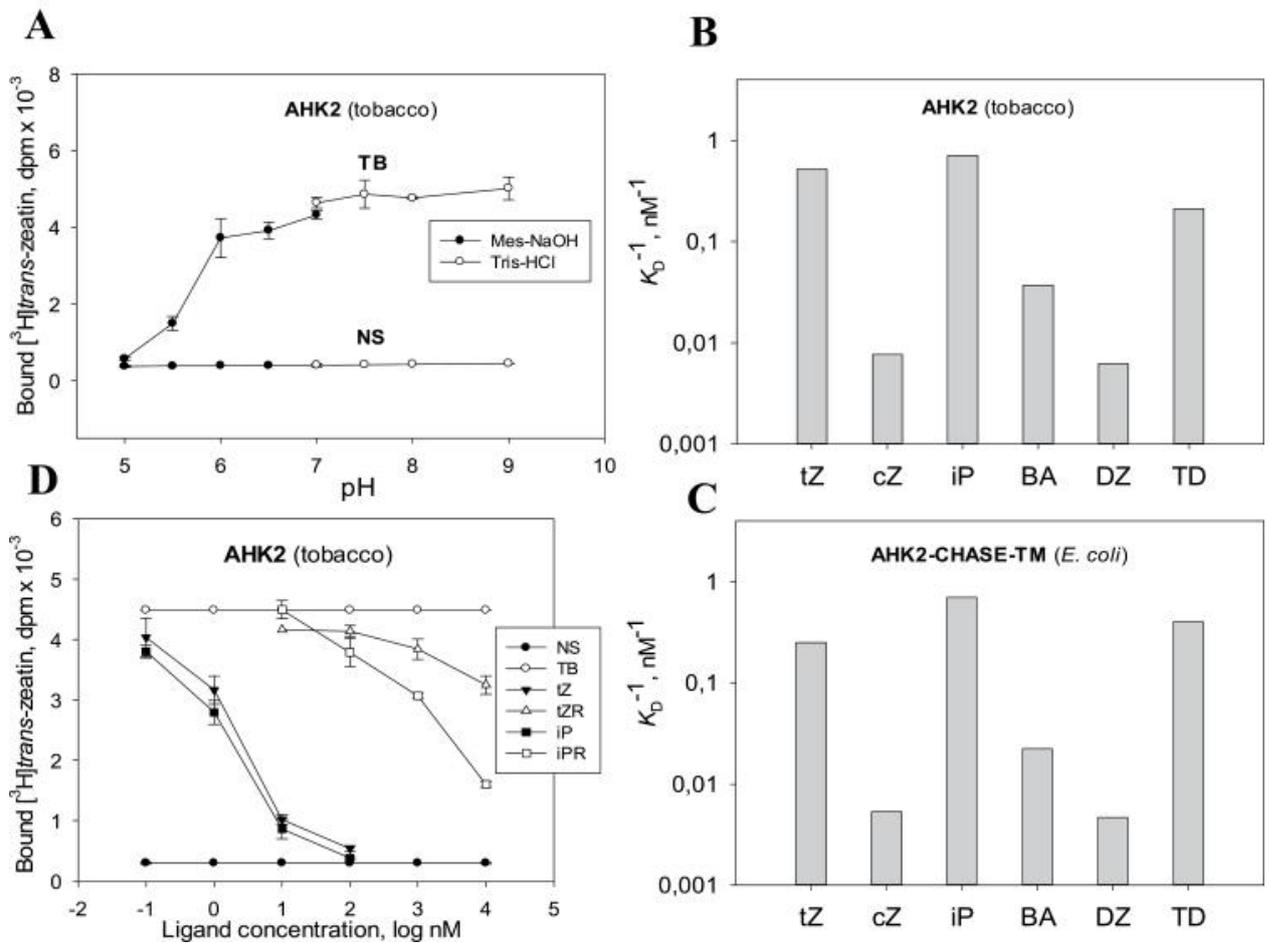


Рис. 19. Особенности связывания лигандов с полноразмерным рецептором АНК2 в растительной системе анализа. Типичная зависимость связывания лиганда от рН показана на (А). Константы средства для различных цитокининовых оснований (В) показаны в сравнении с константами тех же лигандов для сенсорного модуля АНК2 (АНК2-CHASE-TM) (С), изученных в бактериальной (*E. coli*) системе (Stolz et al., 2011). В отличие от свободных оснований, рибозиды цитокинина практически не связываются с рецептором (D). Сокращения см. в легендах к рис. 14.

АНК2 были выделены мембраны из листьев табака, экспрессирующих этот рецептор под контролем флуоресценции. Экспрессия АНК2 привела к сильному повышению цитокинин-связывающей способности выделенных мембран, аналогично другим экспрессированным цитокининовым рецепторам. Это позволило впервые исследовать лиганд-связывающие свойства полноразмерного АНК2 (рис. 19). Зависимость связывания цитокинина АНК2 от рН близко напоминала таковую для АНК3, с почти нулевым связыванием при рН 5 (рис. 19 А). Опять же, основания

цитокинина сильно взаимодействовали с рецептором (рис. 19 В), тогда как рибозиды цитокинина не взаимодействовали (рис. 19 С). Профиль лигандной специфичности полноразмерного АНК2 (рис. 19 В) оказался очень похож на профиль его сенсорного модуля (Stolz et al., 2011; рис. 19 D) с незначительными отклонениями.

Кажущиеся константы сродства и профили предпочтения лигандов для отдельных цитокининовых рецепторов, изученных в системе растительного анализа, представлены в таблице 9. В целом, все исследованные рецепторы (включая АНК4) демонстрировали высокое и сходное сродство к *tZ* с K_D в диапазоне 2-8 нМ, но сродство к другим цитокининам сильно различалось. В первую очередь это касалось *cZ*, *iP* и *BA*, которые различались по сродству к рецепторам иногда в 200-300 раз.

Таблица 9. Кажущиеся K_D (нМ \pm SD) различных цитокинин-рецепторных комплексов, протестированных в растительной тест-системе. Эксперименты проводились при pH 7,4 и 0 - 4 °C

Cytokinin base	АНК2	АНК3	ZmHK1
<i>trans</i> -Zeatin (<i>tZ</i>)	1.93 \pm 0.26	4.26 \pm 1.69	7.97 \pm 1.96
<i>cis</i> -Zeatin (<i>cZ</i>)	130 \pm 18	1602 \pm 326	8.39 \pm 2.58
Isopentenyladenine (<i>iP</i>)	1.42 \pm 0.52	42.0 \pm 13.5	0.61 \pm 0.27
Benzyladenine (<i>BA</i>)	26.9 \pm 9.9	359 \pm 10	1.22 \pm 0.56
Dihydrozeatin (<i>DZ</i>)	161 \pm 55	33.1 \pm 6.2	128 \pm 47
Thidiazuron (<i>TD</i>)	4.76 \pm 2.05	8.23 \pm 1.20	40.1 \pm 12.9
Adenine	ND	>10 000	>10 000
Activity ranking	<i>iP</i> \geq <i>tZ</i> > <i>TD</i> > <i>BA</i> > <i>cZ</i> \geq <i>DZ</i>	<i>tZ</i> > <i>TD</i> > <i>DZ</i> \geq <i>iP</i> > <i>BA</i> > <i>cZ</i>	<i>iP</i> \geq <i>BA</i> > <i>tZ</i> \approx <i>cZ</i> > <i>TD</i> > <i>DZ</i>

ND - не определялось.

3.2.5 Анализ работы цитокининовых рецепторов арабидопсиса *in planta*

Чтобы проверить, действительно ли особенности связывания гормонов будут также проявляться при работе рецепторов *in planta*, мы изучили активность каждого из трех рецепторов арабидопсиса по отдельности *in planta*, сосредоточившись на сравнении *tZ* и *iP* и используя два различных подхода. Во-первых, мы измерили транскрипционную активацию двух основных генов первичного цитокининового ответа *ARR5* и *ARR6*. Во-вторых, мы анализировали активацию чувствительного к цитокинину репортерного гена *pARR5:GUS* (D'Agostino et al., 2000; Romanov et al.,

2002). Все эксперименты были проведены на трех различных двойных мутантах по рецепторам, каждый из которых сохранял один рецептор, и в диком типе.

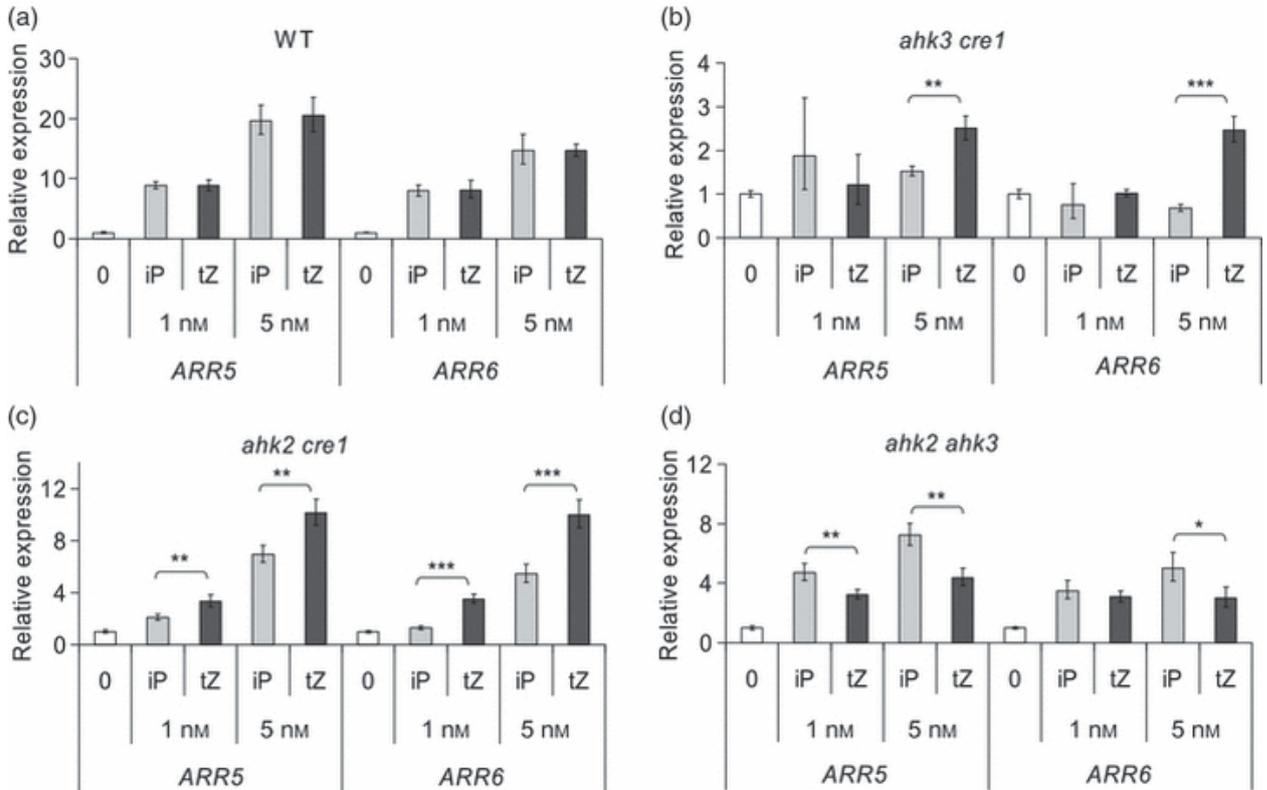


Рис. 20. Активация генов первичного ответа на цитокинины. Индукция экспрессии *ARR5* и *ARR6* различными цитокининами у дикого типа (a); и у двойных мутантов по рецепторам *ahk3 cre1* (b); *ahk2 cre1* (c); и *ahk2 ahk3* (d). Пятидневные проростки индуцировали в течение 20 мин различными концентрациями (1 нМ или 5 нМ) цитокинина (iP или tZ). Уровни экспрессии двух генов цитокининового ответа *ARR5* и *ARR6* анализировали методом количественного ОТ-ПЦР. Уровень экспрессии необработанных образцов был равен 1. Данные представляют собой средние значения (\pm SD) из трех технических повторов. Для сравнения значений растений, обработанных равными концентрациями iP и tZ, использовали ANOVA. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Рисунок 20 (a) показывает, что активация *ARR5* и *ARR6* у дикого типа под действием iP и tZ была практически одинаковой. Одного нМ каждого из них было достаточно, чтобы вызвать значительное увеличение количества транскриптов, и дальнейшее увеличение было получено при 5 нМ обоих цитокининов и для обоих генов первичного ответа. Чувствительность к iP и tZ различалась у мутантов,

которые сохраняли АНК3 или CRE1/АНК4 в качестве единственного рецептора цитокинина. Мутанты *ahk2 cre1* показали более низкую чувствительность к iP, в то время как мутанты *ahk2 ahk3* были менее чувствительны к tZ (Рисунок 20 с,d). Для сравнения, АНК2 показал более низкую общую чувствительность по сравнению с двумя другими рецепторами. Уровни транскриптов *ARR5* и *ARR6* не были значительно увеличены при 1 нМ iP или tZ (Рисунок 20 b). При более высокой концентрации (5 нМ) активация генов под действием tZ была сильнее, чем под действием iP. Полный ответ у дикого типа, а также у рецепторных мутантов, сохраняющих отдельные рецепторы, достигался при 10-40 нМ iP и tZ. Даже более высокие концентрации не приводили к дальнейшему повышению уровня транскриптов, что свидетельствовало о насыщении реакции.

Для дальнейшего изучения дифференциального ответа на iP и tZ в мутанты с двойным рецептором был введен цитокинин-специфический репортерный ген *P_{ARR5}:GUS* (D'Agostino et al., 2000). Рисунок 21 (а) показывает, что репортерный ген активировался у дикого типа как iP, так и tZ, с более низкой активностью iP в диапазоне низких концентраций. Растения, сохранившие только АНК2 или CRE1/АНК4, демонстрировали сравнимую активацию как спомощью iP, так и tZ (рис. 21 b,d). Полная активация достигалась уже при 10 нМ любого из цитокининов для CRE1/АНК4, в то время как для АНК2 требовалось 40 нМ. АНК3 реагировал на tZ с такой же чувствительностью, как и CRE1/АНК4, однако для такого же ответа требовалась в несколько раз более высокая концентрация iP (рис. 21 c). Интересно отметить, что рецепторы обладают довольно сходной максимальной активностью (т.е. в диапазоне 150-200 нмоль 4-метилумбеллиферона (4-MU) на мг белка в час) и что сумма активностей отдельных рецепторов соответствует активности, измеренной для дикого типа. Ответ репортерного гена у дикого типа, как и у всех трех мутантных линий, не увеличивался далее при концентрациях более 10-40 нМ tZ (рис. 21), что указывает на насыщение реакции, аналогичное описанному выше для транскрипционной активации генов первичного ответа (рис.20). В целом, АНК2 показывает более низкую чувствительность *in planta* в этих анализах, чем два других

рецептора, в то время как АНКЗ показывает более низкую чувствительность к iP по сравнению с tZ.

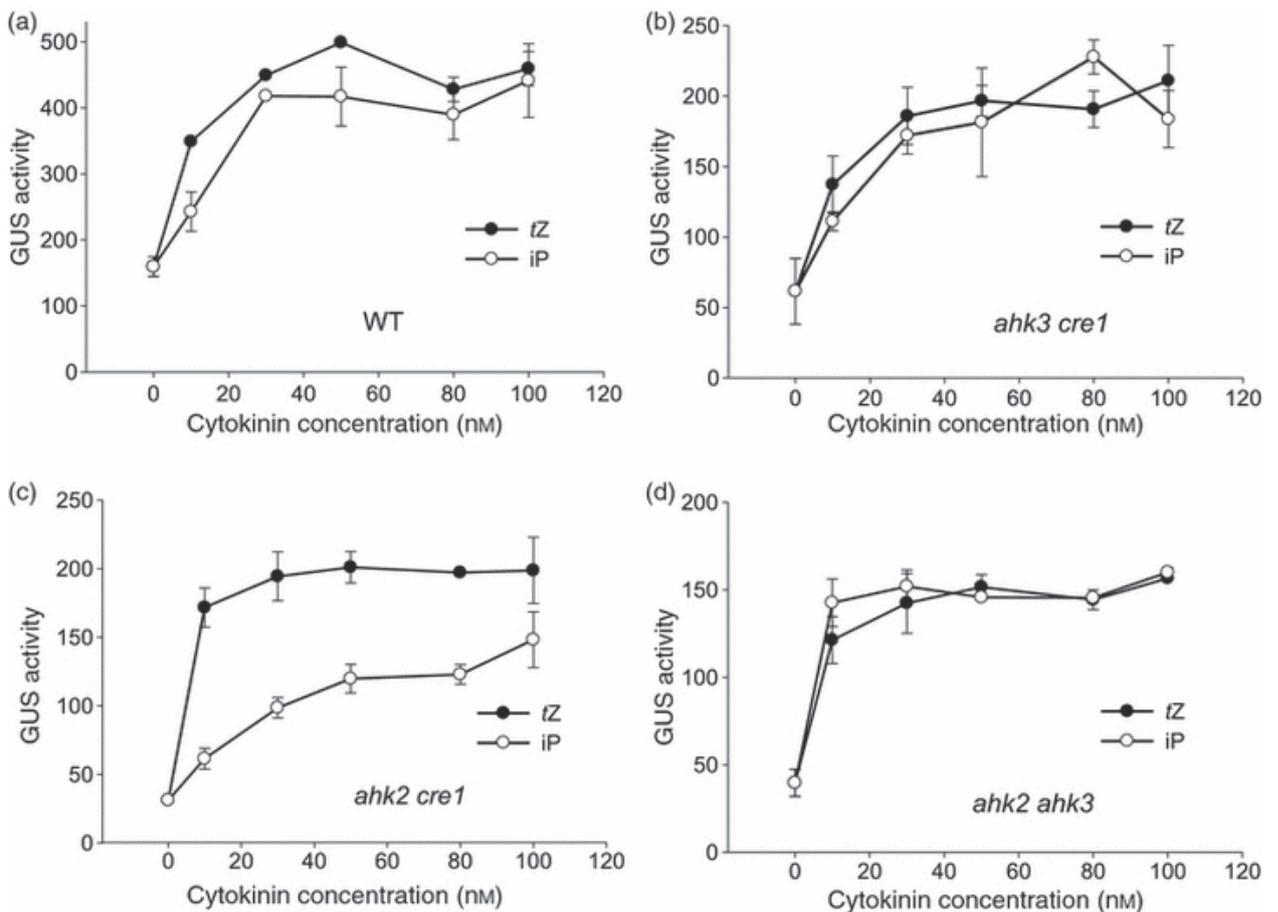


Рис. 21. Активация репортерного гена $P_{ARR5}:GUS$ различными цитокининами у мутантов с двойным цитокининовым рецептором. Индукция репортерного гена $P_{ARR5}:GUS$ различными цитокининами у дикого типа (a); и двойных мутантов по рецепторам $ahk3 cre1$ (b); $ahk2 cre1$ (c); и $ahk2 ahk3$ (d). Пятидневные проростки инкубировали с tZ или iP в течение 5 ч при 22°C. Активность GUS определяли в нмоль 4-метилумбеллиферона (4-MU) на мг белка в час. Данные представляют собой средние значения \pm SD (n = 2).

3.2.6 Лиганд-связывающие свойства рецепторов кукурузы

Эксперименты по связыванию лигандов с живыми клетками проводились с рекомбинантными *E. coli*, экспрессирующими рецепторы цитокинина кукурузы. Сферопласты трех бактериальных клонов, экспрессирующих рецепторы ZmHK1, ZmHK2 и ZmHK3a, были подготовлены и инкубированы с [3 H]tZ отдельно или в смеси с различными немечеными цитокининами. Было определено специфическое

связывание; кривые конкуренции для шести цитокининов (рис. 22) позволили оценить константы сродства для взаимодействия различных цитокининов со специфическими сайтами связывания (табл. 10). Все кажущиеся константы диссоциации K_D^* для цитокининов находились в наномолярном диапазоне, что разумно для высокоаффинного взаимодействия, и были в основном близки к значениям K_D^* рецепторов арабидопсиса для цитокининовых лигандов (Yamada et al., 2001; Romanov et al., 2005, 2006). Результаты также показали специфичность рецепторов к некоторым лигандам. ZmHK1 почти одинаково хорошо связывал *tZ* и

Таблица 10. Кажущиеся константы сродства K_D^* для взаимодействия различных цитокининов с рецепторами кукурузы

Receptor	K_D^* for cytokinins (nM)					
	<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	Ade	DZ	BA
ZmHK1	24	26	2.3	>10000	630	3.3
ZmHK2	0.4	8.4	0.6	>10000	2	5.5
ZmHK3a	7.2	21	2.7	>10000	232	13.8

K_D^* рассчитывали по уравнению Cheng и Prusoff (1973) выражали в нМ. Сокращения см. в легенде к рис. 22.

cZ с умеренным сродством; его сродство к дигидрозеатину (DZ) было очень слабым (рис. 22; табл. 10). При этом надо отметить, что этот рецептор всем цитокининам предпочитает *iP* ($K_D = 2.3$ нМ). ZmHK2 продемонстрировал самое высокое сродство почти ко всем протестированным цитокининам, включая DZ; единственным исключением был 6-бензиладенин (BA), к которому ZmHK2 имел более низкое сродство, чем ZmHK1 (рис. 22; табл. 10). Свойства ZmHK3a похожи на свойства ZmHK1, за исключением того, что ZmHK3a имеет более высокое сродство к *tZ*, чем к *cZ*, а BA является довольно умеренным конкурентом (рис. 22; табл. 10). Как для ZmHK1, так и для ZmHK3a DZ был самым слабым конкурентом. Аденин не оказывал конкурентного эффекта.

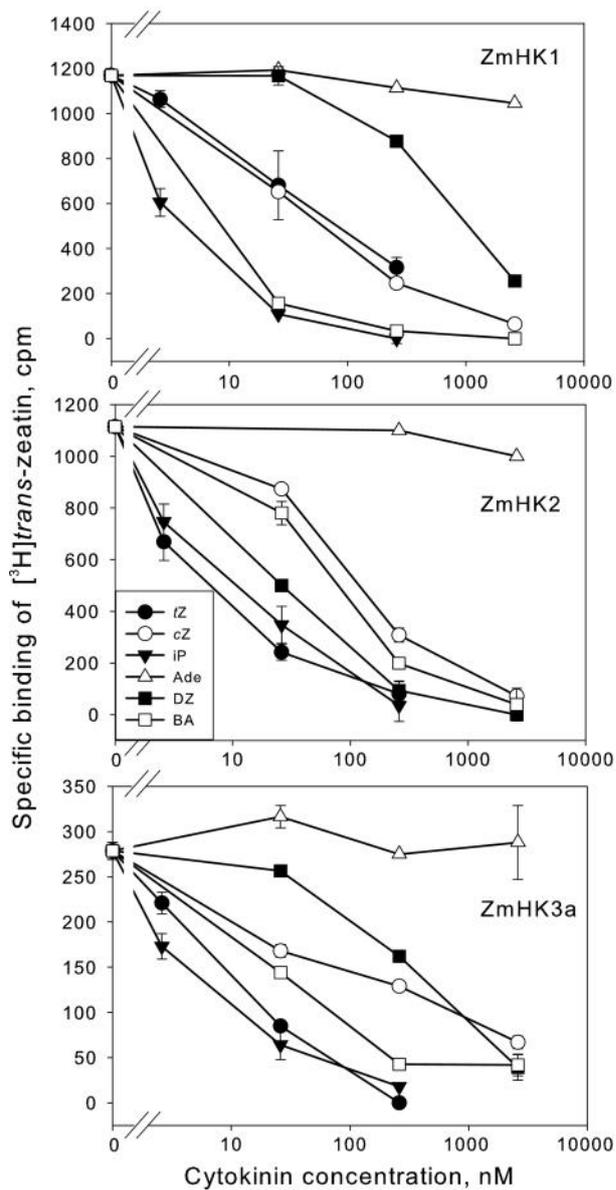


Рис. 22. Конкуренция различных цитокининов с $[^3\text{H}]$ транс-зеатином за связывание с цитокининовыми рецепторами кукурузы ZmHK1, ZmHK2 и ZmHK3a, экспрессированными в бактериальных сферопластах. *tZ*, транс-зеатин; *cZ*, цис-зеатин; *iP*, *N*6-(Δ^2 -изопентенил)аденин; Ade, аденин; DZ, дигидрозеатин; BA, 6-бензиладенин. Показано специфическое связывание $[^3\text{H}]tZ$, неспецифическое связывание (обычно около 30% от общего связывания, для ZmHK3a около 50%) было вычтено. Столбики ошибок указывают на стандартные ошибки в двух повторах.

3.2.7 Восприятие цитокининов у картофеля

3.2.7.1 Анализ генома моноплоидного картофеля Phureja

У картофеля есть все необходимое для ЦК-сигналинга по пути MSP. Поиск белковых последовательностей и кодирующих генов, вовлеченных в ЦК-сигналинг, проводился на основе дублированного генома моноплоидного картофеля Phureja (DM1-3 516 R44) (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). В целом, все потенциальные компоненты канонической сигнальной системы цитокининов, описанные у арабидопсиса и других видов растений с секвенированным геномом (Kieber & Schaller, 2014, 2018), были идентифицированы и у картофеля. Потенциальные гены, связанные с цитокинином, обнаруженные у картофеля, кодируют гомологи гистидинкиназ с доменом CHASE (CHK), фосфотрансмиттеров (HPt) и регуляторов ответа типов А (RR-A) и В (RR-B) (Таблица 11). Это указывает на функционирование MSP в клетках картофеля для трансдукции сигнала цитокинина с участием белков двухкомпонентной системы. В протеоме моноплоидного картофеля были обнаружены три предсказанные белок-кодирующие последовательности, XP_015158747.1, XP_006352176.1 и XP_006355050.1, ортологичные рецепторам АНК2, АНК3 и CRE1/АНК4 арабидопсиса, соответственно. По аналогии с ортологами арабидопсиса эти белки были аннотированы в NCBI как StHK2, StHK3 и StHK4. Они соответствуют последовательностям мРНК XM_015303261.1, XM_006352114.2 и XM_006354988.2, соответственно. Белки StHK2, StHK3 и StHK4 имеют 59,35%, 67,75% и 67,52% сходства с ортологами арабидопсиса, соответственно. Длина генов *StHK2*, *StHK3* и *StHK4* составляет 5361, 4352 и 3988 п.н., соответственно, а длина предсказанных белков - 1263, 1032 и 992 аминокислот, соответственно (табл. 11).

Филогенетический анализ классифицировал StHK на три клады. Филогенетический анализ был проведен для сравнения консервативных и уникальных особенностей предсказанных цитокининовых рецепторов картофеля с особенностями рецепторов арабидопсиса, риса, томата и других видов (рис. 23). ЦК-рецепторы цветковых растений можно объединить в три основные клады,

соответствующие рецепторам *Arabidopsis* АНК2, АНК3 и CRE1/АНК4 (Pils & Heyl, 2009). Предполагаемые рецепторы картофеля и томата однозначно распределены

Таблица 11. Белки и гены, связанные с цитокининовой сигнальной системой картофеля

Protein type	Protein name	Gene ID	mRNA	Protein	Protein length (aa)
CHK	StHK2	LOC102591086	XM_015303261.1	XP_015158747.1	1263
CHK	StHK3	LOC102587294	XM_006352114.2	XP_006352176.1	1032
CHK	StHK4	LOC102603756	XM_006354988.2	XP_006355050.1	992
HPT	StHP1a	LOC102590747	XM_006365209.2	XP_006365271.1	151
			XM_006365208.2	XP_006365270.1	151
			XM_006365207.2	XP_006365269.1	151
HPT	StHP1b	LOC102603297	XM_006352731.2	XP_006352793.1	152
HPT	StHP1c	PGSC0003DMG400028593	PGSC0003DMT400073603	PGSC0003DMT400073603	148
HPT	StHP6	LOC102601463	XM_006364157.2	XP_006364219.1	156
HPT	StHP4a	LOC102589200	XM_015304066.1	XP_015159552.1	112
			XM_006364659.2	XP_006364721.1	136
HPT	StHP4b	LOC102584884	XM_015315420.1	XP_015170906.1	137
RR-B	StRR1a	LOC102578736	XM_006363517.2	XP_006363579.1	675
			XM_006363518.2	XP_006363580.1	675
RR-B	StRR1b	LOC102586468	XM_006345914.1	XP_006345976.1	663
RR-B	StRR1c	LOC102596771	XM_006349891.2	XP_006349953.1	556
RR-B	StRR14	LOC102606335	XM_006354997.1	XP_006355059.1	653
			XM_006354996.1	XP_006355058.1	656
RR-B	StRR11	LOC102593308	XM_006341706.2	XP_006341768.1	581
			XM_006341705.2	XP_006341767.1	581
			XM_015306278.1	XP_015161764.1	481
RR-B	StRR18a	LOC102598455	XM_006343619.2	XP_006343681.1	681
RR-B	StRR18b	LOC102587717	XM_006350015.2	XP_006350077.1	707
ARR19	StRR19	LOC107060895	XM_015309426.1	XP_015164912.1	371
RR-A	StRR4	LOC102602758	XM_015313344.1	XP_015168830.1	248
RR-A	StRR9a	LOC102590336	XM_006355533.2	XP_006355595.1	163
RR-A	StRR9b	LOC102588738	XM_015314746.1	XP_015170232.1	214
			XM_015314747.1	XP_015170233.1	211
RR-A	StRR9c	LOC102599826	XM_006351210.2	XP_006351272.1	226
RR-A	StRR9d	LOC102601166	XM_006351214.2	XP_006351276.1	226
RR-A	StRR8	LOC102588738	XM_015314747.1	XP_015170233.1	211
			XM_015314746.1	XP_015170232.1	214
RR-A	StRR15	LOC102605280	XM_006344933.2	XP_006344995.1	202
RR-A	StRR17	LOC102583233	XM_006357236.2	XP_006357298.1	156
RR-C	StRR22a	LOC107058083	XM_015303399.1	XP_015158885.1	186
RR-C	StRR22b	LOC107058085	XM_015303400.1	XP_015158886.1	184
RR-C	StRR22c	LOC107059982	XM_015307157.1	XP_015162643.1	137
RR-C	StRR22d	LOC102580685	XM_006361561.2	XP_006361623.2	115

Использована номенклатура базы данных NCBI, за исключением StHP1c, найденного только в базе данных Phytozome. Количество записей РНК превышает количество генов из-за альтернативного сплайсинга. Данные, соответствующие белкам/генам рецепторов цитокининов и белкам/генам регуляторов ответа типа А, изученным в данной работе, выделены жирным шрифтом.

между этими тремя кладами. Эволюционно они ближе к рецепторам арабидопсиса, чем к рецепторам риса, что было ожидаемо, так как картофель, томат и арабидопсис - двудольные, тогда как рис – однодольное растение.

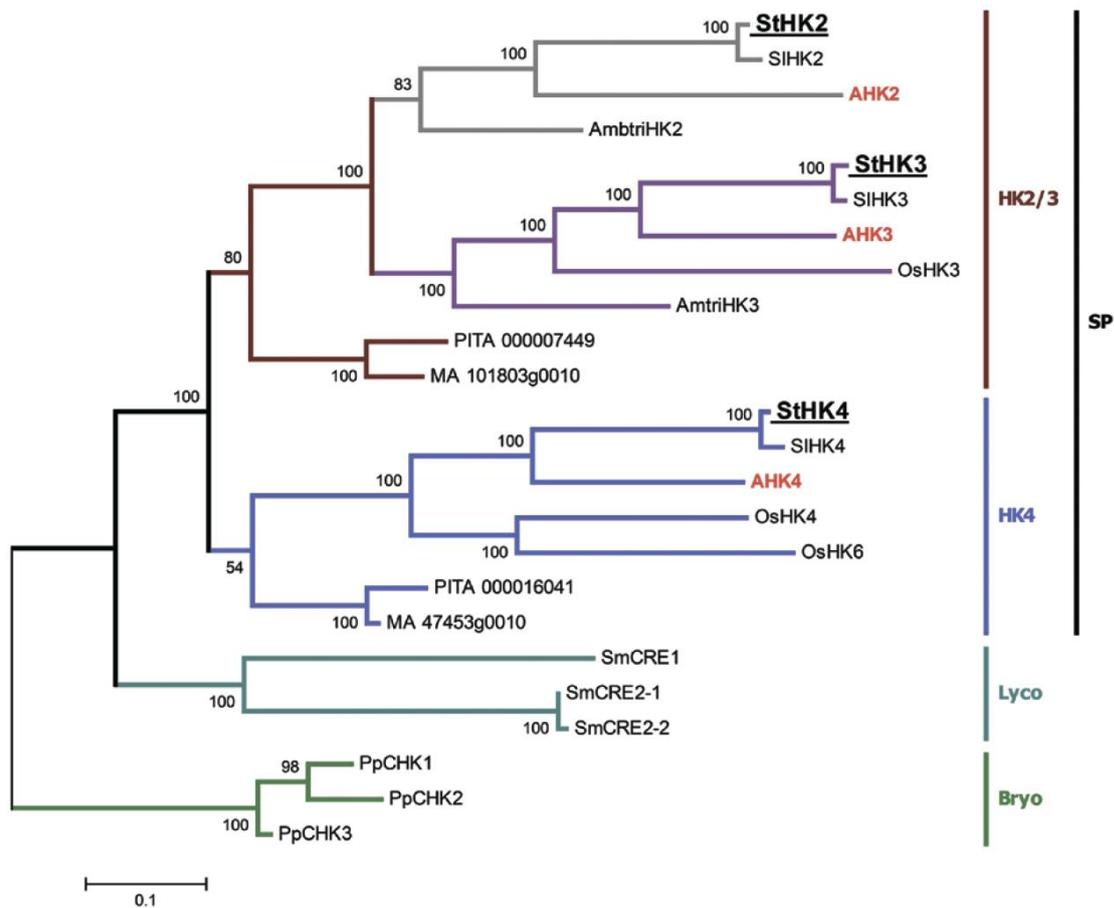


Рис. 23. Филогенетическое древо рецепторов цитокининов. Виды показаны следующим образом: АНК2-4, *Arabidopsis*; AmbtriHK2,3, *Amborella trichopoda*; PpCHK1-3, *Physcomitrium patens*; SmCRE1,2-1,2-2, *Selaginella moellendorffii*; MA 101803g0010 и MA 47453g0010, *Picea abies*; OsHK3,4,6, *Oryza sativa*; PITA 000007449 и PITA 000016046, *Pinus taeda*; SIHK2-4, *Solanum lycopersicum*; StHK2-4, *Solanum tuberosum*. SP, семенные растения; Lyco, плауновидные; Bryo, мохообразные. Параметры алгоритма максимального правдоподобия: тест филогении – бутстрэп число бутстрэп повторов - 100; тип замен - аминокислотные; модель - модель равных входов; число дискретных гамма-категорий - 3; полное удаление пробелов и пропущенных данных.

Множественное выравнивание выявило общие и уникальные черты StHK. Мы исследовали модульную архитектуру предсказанных рецепторов цитокинина картофеля. Были проанализированы экзон-интронная структура соответствующих генов, а также встречаемость и положение функциональных доменов в рецепторных белках.

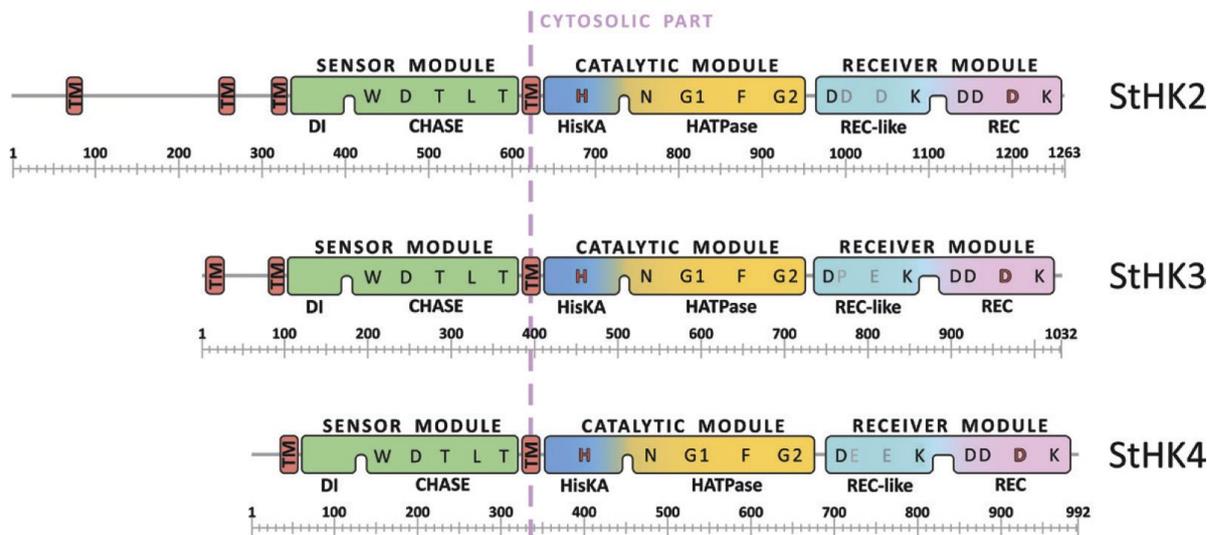


Рис. 24. Модульно-доменные структуры предсказанных ЦК-рецепторов картофеля. Белковые домены: CHASE, циклаза/гистидинкиназы ассоциированный сенсорный домен; DI, димеризационный интерфейс; HATPase, аденозинтрифосфатазный домен; HisKA, домен гистидинкиназы A; Rec, ресиверный домен; Rec-like, псевдоресиверный домен; TM, трансмембранный домен. Указаны консервативные аминокислоты и консенсусные мотивы (N, G1, F, G2). Согласно общепринятой терминологии, каталитический модуль состоит из домена димеризации и гистидинфосфотрансферазы (DHpD), каталитического и АТФ-связывающего домена (CAD) (Mayerhofer et al., 2015; Pekárová et al., 2016). Шкалы в нижней части структур показывают длину в аминокислотных остатках.

Известные СК-рецепторы имеют типичную организацию, включающую (от N- до C-конца) сенсорный модуль с доменом CHASE, каталитический модуль с доменами HisKA и HATPase и ресиверный модуль с псевдоресиверным и ресиверным доменами (Kakimoto, 2003). Сенсорный модуль фланкирован предсказанными трансмембранными (TM) доменами. Всегда имеется один TM-домен на C-конце модуля, в то время как количество TM-домпнов на N-конце модуля варьирует. Доменная структура предполагаемых рецепторов картофеля полностью соответствует канонической (рис. 24).

На N-концевых участках цитокининовых рецепторов картофеля число TM-доменов составляет три, два и один у StHK2, StHK3 и StHK4, соответственно. Гены цитокининовых рецепторов имеют сходную организацию экзонов и интронов.

Границы экзонов в генах рецепторов разных видов в большинстве случаев совпадают. Было проведено множественное выравнивание последовательностей рецепторов из картофеля, риса и арабидопсиса (рис. 25). Все канонические мотивы, присутствующие в известных рецепторах цитокининов, были обнаружены и в ортологах картофеля. Мотивы H, N, G1, F и G2 были идентифицированы в каталитическом модуле, а мотивы DD-D-K - в ресиверном домене рецепторов картофеля. Консервативные последовательности содержат фосфорилируемые остатки гистидина (H) и аспартата (D). StHK2 имеет консервативный аспартат в своем псевдоресиверном домене (Rec-like), аналогично ортологам из арабидопсиса (ANK2), томата (SlHK2) и риса (OsHK5). Однако в целом DD-D-K-подобные мотивы в псевдоресиверных доменах имеют мало общего с соответствующими последовательностями в ресиверных доменах (рис. 25 С).

Как описано в предыдущем разделе, высококонсервативные мотивы были обнаружены в сенсорных модулях и С-концевых ТМ-доменах рецепторов цитокининов. Эти мотивы, очевидно, важны для связывания лигандов и трансмембранной передачи сигнала. В рецепторах картофеля эти мотивы также присутствуют, хотя и с некоторыми особенностями. В частности, StHK2 имеет отклонение от канонического мотива в домене CHASE, где в положении 90 находится либо глутамат, либо аспартат, в то время как StHK2 имеет глутамин в этом положении. StHK3 имеет отклонение в положении 177, сильно консервативное в кладе НК3. В каноническом мотиве в этом положении находится фенилаланин, а в StHK3 - лейцин. В общем для всех СНК мотиве в положении 177 находится либо фенилаланин, либо тирозин. StHK4 отличается положениями 83 (Ala→Ser) и 172 (Tyr→Phe) в консервативных мотивах. Отметим, что глутамин 90, лейцин 177 и серин 83 присутствуют у соответствующих рецепторов томата, поэтому эти замены могут быть характерны для семейства пасленовые. А вот фенилаланин 172, по-видимому, уникален для картофеля.

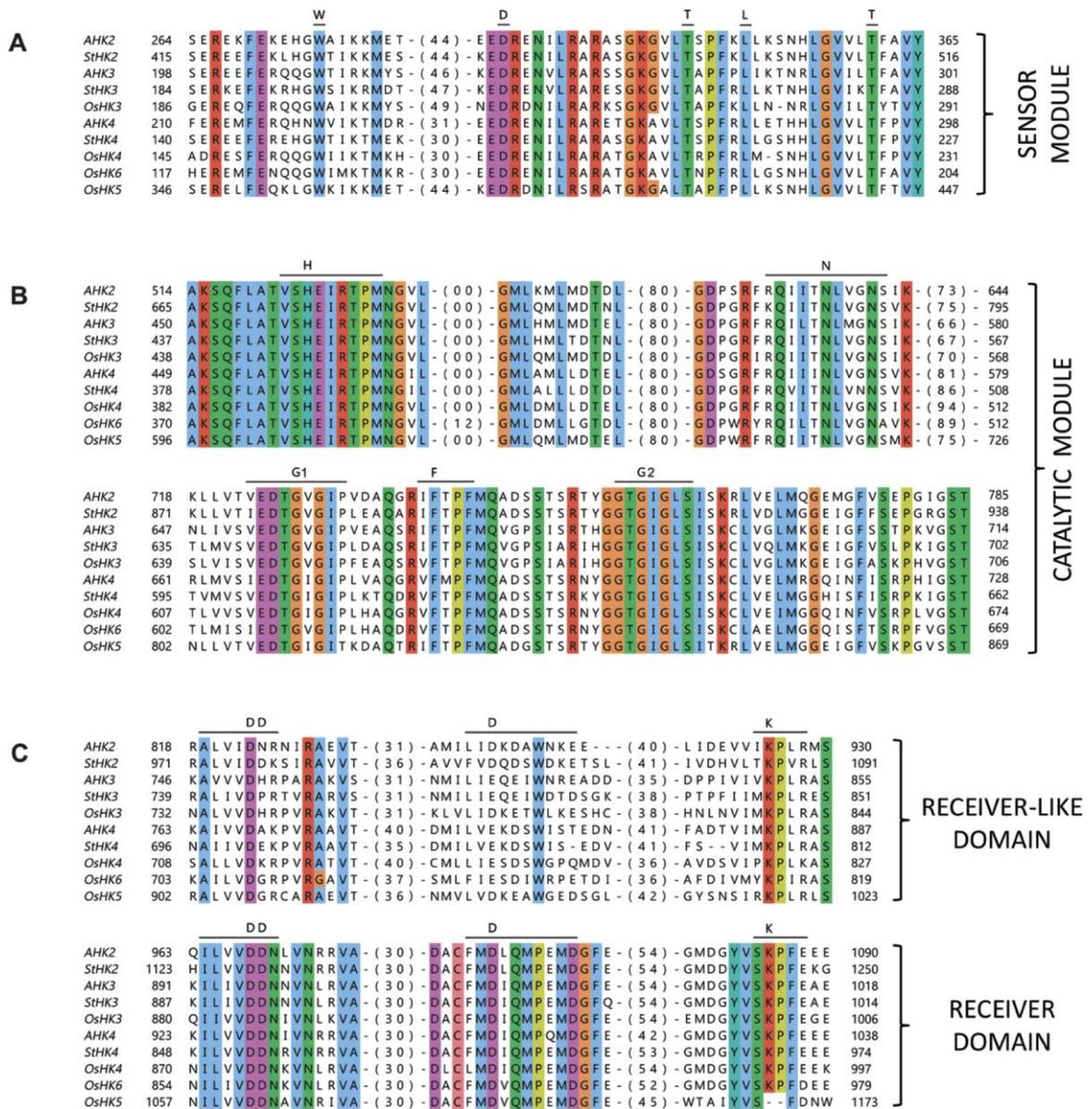


Рис. 25. Выравнивание последовательностей рецепторов цитокининов. Обозначены консенсусные мотивы и консервативные аминокислоты. АНК и OsHK соответствуют белкам арабидопсиса и риса, соответственно. В скобках указано количество непоказанных аминокислот.

Функциональные домены StHK принимают канонические 3D структуры Мы построили гомологические модели всех доменов StHK (рис. 26). Как и ожидалось, наблюдалось высокое структурное сходство предсказанных рецепторов картофеля с их ортологами из арабидопсиса. Ключевые функциональные регионы, такие как сайты связывания лигандов, сайты фосфорилирования, сайты связывания АТФ и интерфейсы димеризации, особенно консервативны. Сенсорные модули, состоящие из доменов димеризации, PAS и псевдо-PAS (последние два составляют домен

CHASE), очень похожи у арабидопсиса и картофеля. StHK2 и StHK3 отличаются от StHK4 вставкой 14 и 17 остатков, соответственно, в области, прилегающей к С-концу α 3-спирали (первая α -спираль домена PAS). Эта вставка, по-видимому, не участвует в сайте распознавания гормонов и вряд ли может непосредственно влиять на лиганд-связывающие свойства белка. Подобные инсерции также присутствуют в рецепторах ANK2 и ANK3 из арабидопсиса.

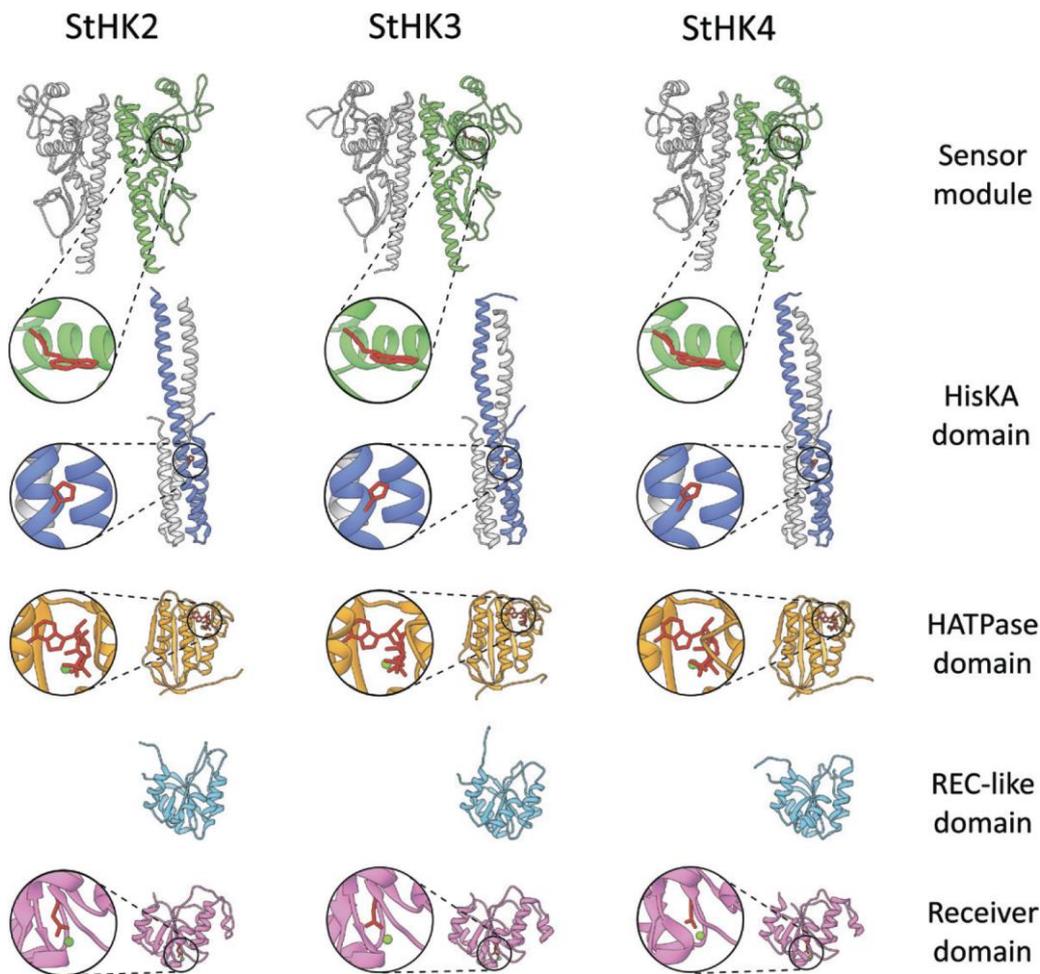


Рис. 26. Гомологичные модели для предсказанных доменов цитокининовых рецепторов картофеля. Сенсорные модули и HisKA домен представлены в виде димеров, где одна из субъединиц окрашена в серый цвет. Позиции гормона, АТФ и фосфоакцепторных остатков His/Asp выделены (красным). Зеленые сферы представляют ионы Mg^{2+} .

Каталитические модули включают домены HisKA и домены H-АТФазы. HisKA-домены образованы двумя α -спиралями и содержат интерфейс димеризации

и сайт фосфорилирования (консервативный гистидин). Домены Н-АТФазы, включая АТФ-связывающие сайты, имеют сложную структуру, основанную на параллельных/антипараллельных β -тяжей и α -спиралях. Большая вставка в $\beta 2$ - $\beta 3$ линкере (длиной более 50 остатков) отличает рецепторы цитокининов от бактериальных гистидинкиназ и Н-АТФазного домена рецептора этилена. Однако эта вставка расположена на противоположной стороне от сайта связывания АТФ. Эта структурная особенность отличает не только рецепторы картофеля, но и цитокининовые рецепторы других видов.

Ресиверный домен (RD) гистидинкиназы СК11, использованный в качестве шаблона для RD рецепторов цитокининов, имеет складку, типичную для белков суперсемейства REC (или CheY-подобных). Он образован пятью α -спиралями и β -листом, состоящим из пяти параллельных β -тяжей. Две α -спирали расположены на одной стороне β -листа, а остальные три - на другой. Такая же складка характерна для модели RD рецептора CRE1/АНК4 арабидопсиса. В отличие от нее в моделях RD рецепторов картофеля и других у арабидопсиса (АНК2 и АНК3), а также в кристаллической структуре RD СК12/АНК5 в области между $\alpha 3$ -спиралью и $\beta 4$ -тяжем присутствует дополнительная маленькая спираль. Консервативный остаток аспартата, служащий фосфат-акцептором в RD, расположен на N-конце $\beta 3$ -тяжа (рис. 26).

Отклонения от канонических мотивов CHASE в сенсорных модулях цитокининовых рецепторов картофеля, по-видимому, не изменяют 3D-структуры модулей. Необычный глутамин 90 находится вдали от лиганд-связывающего кармана StHK2, а боковая цепь направлена к димеризационному интерфейсу. Хотя необычный лейцин 177 из StHK3 локализован в лиганд-связывающем сайте, его боковая цепь ориентирована в противоположном направлении. Замены в StHK4 кажутся более функциональными, чем в других предсказанных рецепторах картофеля. Серин 83 и фенилаланин 172 локализованы на периферии лиганд-связывающего кармана, а их боковые цепи ориентированы внутрь. Следовательно,

эти последние замены могут каким-то образом влиять на лигандную специфичность рецептора.

3.2.7.2 Экспериментальные исследования на автотетраплоидном картофеле сорта Дезире

Картофель сорта *Désirée* обладает несколькими аллелями генов *StHK*. Гомозиготный удвоенный моноплоид Phureja DM1-3 516 R44 - искусственная форма картофеля, фенотипически отличающаяся от общеизвестных диплоидных/тетраплоидных сортов картофеля (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). Такие различия в фенотипе обусловлены значительными вариациями как в самих последовательностях геномов между гаплотипами картофеля, так и в их структурах. Поэтому результаты исследования генома моноплоидного картофеля Phureja не являются точным зеркальным отражением результатов исследования более сложных геномов обычных сортов картофеля.

Наше экспериментальное исследование рецепторов цитокининов было проведено на автотетраплоидном картофеле сорта Дезире, широко используемом в коммерческих и научных целях (Aksenova et al., 2000; Kolachevskaya et al., 2015). Мы клонировали предполагаемые гены рецепторов, используя праймеры, созданные в соответствии с данными о последовательности гена Phureja. В отличие от генома Phureja, по крайней мере шесть генов предполагаемых рецепторов цитокининов были клонированы из кДНК растений Дезире. Все эти гены имеют типичную модульно-доменную структуру, характерную для гибридных сенсорных гистидиновых киназ (рис. 24-26). Согласно своей последовательности, кодируемые белки попарно разделяются на три известных клады цитокининовых рецепторов (табл. 12; рис. 23). Таким образом, каждая форма цитокининового рецептора из картофеля сорта Дезире состоит как минимум из двух близких изоформ, кодируемых природными аллелями рецепторов. Секвенирование клонированных генов выявило черты как сходства, так и расхождения между растениями Phureja и Дезире. Нуклеотидные последовательности членов НК2-клады, *StHK2a* и *StHK2b*, отличаются от ортологичной последовательности из Phureja на пять и четыре нуклеотида (5 и 4 SNP), соответственно. На уровне белков StHK2a и StHK2b имеют

три и две аминокислотные замены, соответственно, относительно рецептора Phureja (Таблица 12).

Таблица 12. Гены рецепторов цитокининов картофеля и кодируемые ими белки

Receptor clade	Length of putative CK receptors of potato plants (aa)		SNP/SAP numbers in putative CK receptor genes/proteins of cv. Désirée vs var. Phureja		Numbers of Désirée cDNA clones
	Phureja ^a	Désirée ^b	DNA bases	Amino acids	
HK2 orthologs	StHK2: 1263	StHK2a: 1263	5 SNPs	3 SAPs	17
		StHK2b: 1263	4 SNPs	2 SAPs	17
HK3 orthologs	StHK3: 1032	StHK3a: 1032	No SNP	No SAP	6
		StHK3b: 1031	23 SNPs, 3 del	9 SAPs, 1 del	3
HK4 orthologs	StHK4: 992	StHK4a: 992	No SNP	No SAP	1
		StHK4b: 991	28 SNPs, 3 del	12 SAPs, 1 del	9

SNP - однонуклеотидный полиморфизм; SAP - полиморфизм в одной аминокислоте.

a - дублированный моноплоид, метод: тотальное секвенирование генома. b - автотетраплоид, метод: ПЦР с кДНК.

Из двух клонированных генов клады НК3, *StHK3a* идентичен своему аналогу в Phureja, тогда как *StHK3b* отличается на 23 SNP вместе с трехнуклеотидной делецией. Эти различия приводят к отсутствию одной аминокислоты и девяти аминокислотным заменам в *StHK3b* по сравнению с его ортологом из Phureja. Аналогичные данные были получены и для НК4-клады: *StHK4a* полностью идентичен ортологу Phureja, тогда как *StHK4b* отличается на 28 SNP и трехнуклеотидной делецией. Соответственно, *StHK4b* отличается от своего ортолога Phureja, а также от *StHK4a* делецией одной и заменой 12 аминокислот (Таблица 12). Анализ аминокислотных последовательностей белков показал, что все рецепторы картофеля Дезире сохраняют домены и консенсусные последовательности, характерные для рецепторов цитокининов, несмотря на аминокислотные замены. Это указывает на то, что все белки, кодируемые клонированными генами *StHK* тетраплоидных растений картофеля, могут успешно функционировать как полноценные цитокининовые рецепторы.

3.2.7.3 Лигандная специфичность рецепторов цитокинина картофеля

Для анализа лиганд-связывающих свойств рецепторов была использована система анализа на основе растительных мембран. Предсказанные гены рецепторов

цитокенинов картофеля были клонированы в векторы pB7FWG2 для транзientной экспрессии в листьях табака. В случае генов *StHK2* и *StHK4* были экспрессированы полноразмерные последовательности кДНК, но в случае *StHK3* экспрессия полноразмерного рецептора не удалась по неизвестным причинам. Вместо полноразмерного рецептора мы клонировали геномную последовательность сенсорного модуля *StHK3a*, фланкированного трансмембранными доменами. Из транзientно трансформированных листьев табака была получена микросомальная фракция, обогащенная отдельными рецепторами картофеля. Анализы связывания проводились с использованием этой фракции и меченого тритием цитокинина. В целом, мы протестировали четыре предполагаемых рецептора, принадлежащих ко всем трем кладам: *StHK2a*, *StHK3a* (сенсорный модуль, далее обозначенный как *StHK3a_{SM}*), *StHK4a* и *StHK4b*.

Сначала мы определили pH-зависимость связывания гормона с этими рецепторами в диапазоне pH 5-9 (рис. 27). Все *StHK* демонстрировали максимальное связывание *транс*-зеатина при нейтральном или слабощелочном pH: *StHK2a* при pH 7.5, *StHK3a_{SM}* при pH 7, *StHK4a* при pH 7.5-8 и *StHK4b* при pH 8-9. Все *StHK* показали снижение связывания лиганда при кислом pH: *StHK2a* и *StHK3a_{SM}* уменьшили связывание при pH 5 по сравнению с pH 7 в 2 и 5 раз, соответственно. Связывание лиганда *StHK4a* и *StHK4b* уменьшилось при pH 5 примерно в 3 раза по сравнению с максимальными значениями. Хотя *StHK3a* в данном исследовании был представлен только своим сенсорным модулем, контрольный эксперимент с полноразмерным *StHK2a* и его сенсорным модулем показал аналогичную pH-зависимость связывания гормонов (данные не показаны). Это означает, что изолированного сенсорного модуля достаточно для определения pH-зависимости связывания гормонов рецептором.

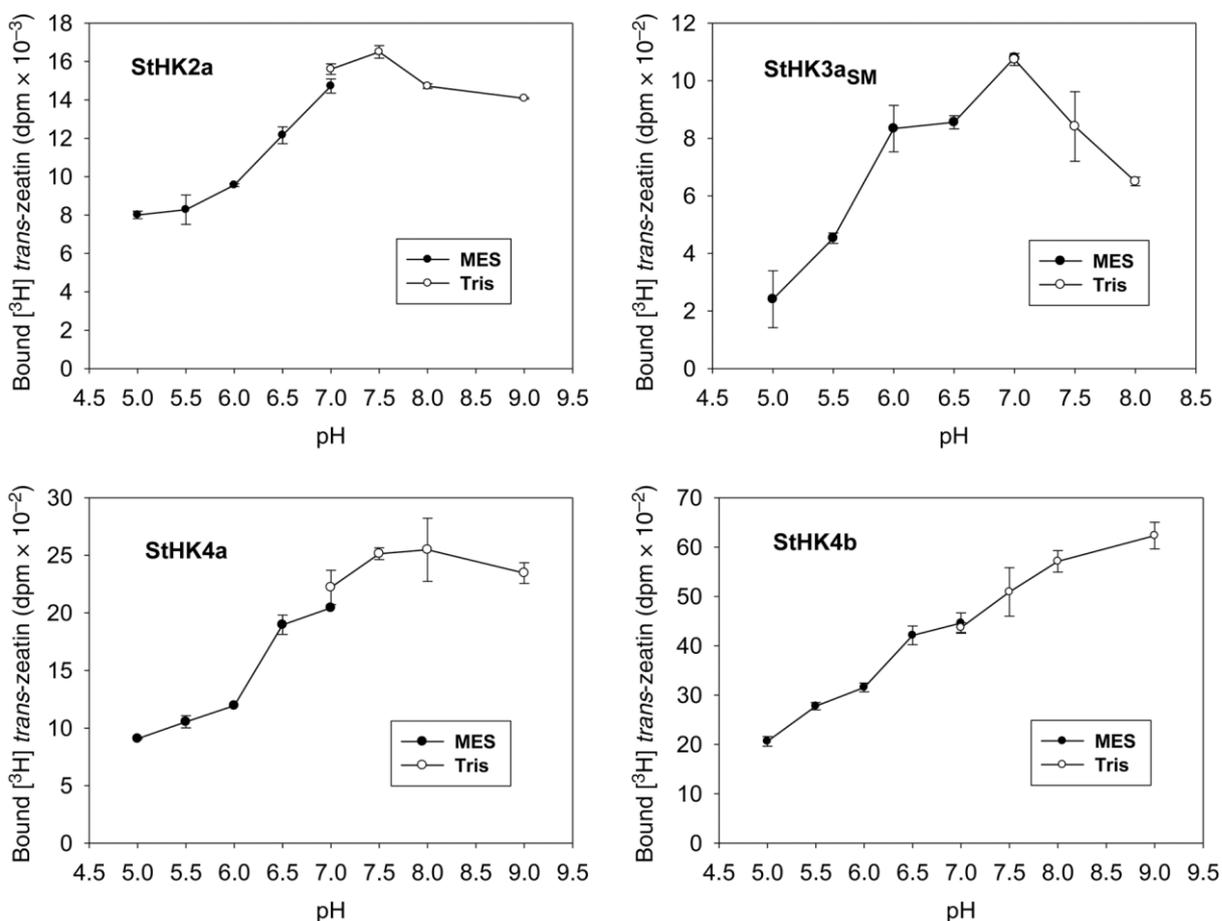


Рис. 27. Зависимость от pH связывания *транс*-зеатина с рецепторами цитокинина картофеля.

Взаимодействие гормона с рецептором характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D) комплекса лиганд-рецептор. Значения K_D определяли по дозозависимому связыванию меченого *транс*-зеатина с StHK и обрабатывали результаты методом Скэтчарда (рис. 28). Все StHK продемонстрировали высокое сродство к *транс*-зеатину, с аналогичными значениями K_D на наномолярном уровне (табл. 12). Определенные значения K_D были близки к значениям аналогичных констант для рецепторов цитокининов других видов (Kuderová et al., 2015) и хорошо коррелировали с концентрациями активных цитокининов *in planta* (Hirose et al., 2008).

В растениях обычно присутствуют различные цитокинины: *транс*- и *цис*-зеатины (*tZ* и *cZ*), изопентениладенин (*iP*) и дигидрозеатин (*DZ*). Помимо природных цитокининов, существует множество синтетических. Рецепторы проявляют различное сродство к этим соединениям. Мы изучили лигандную

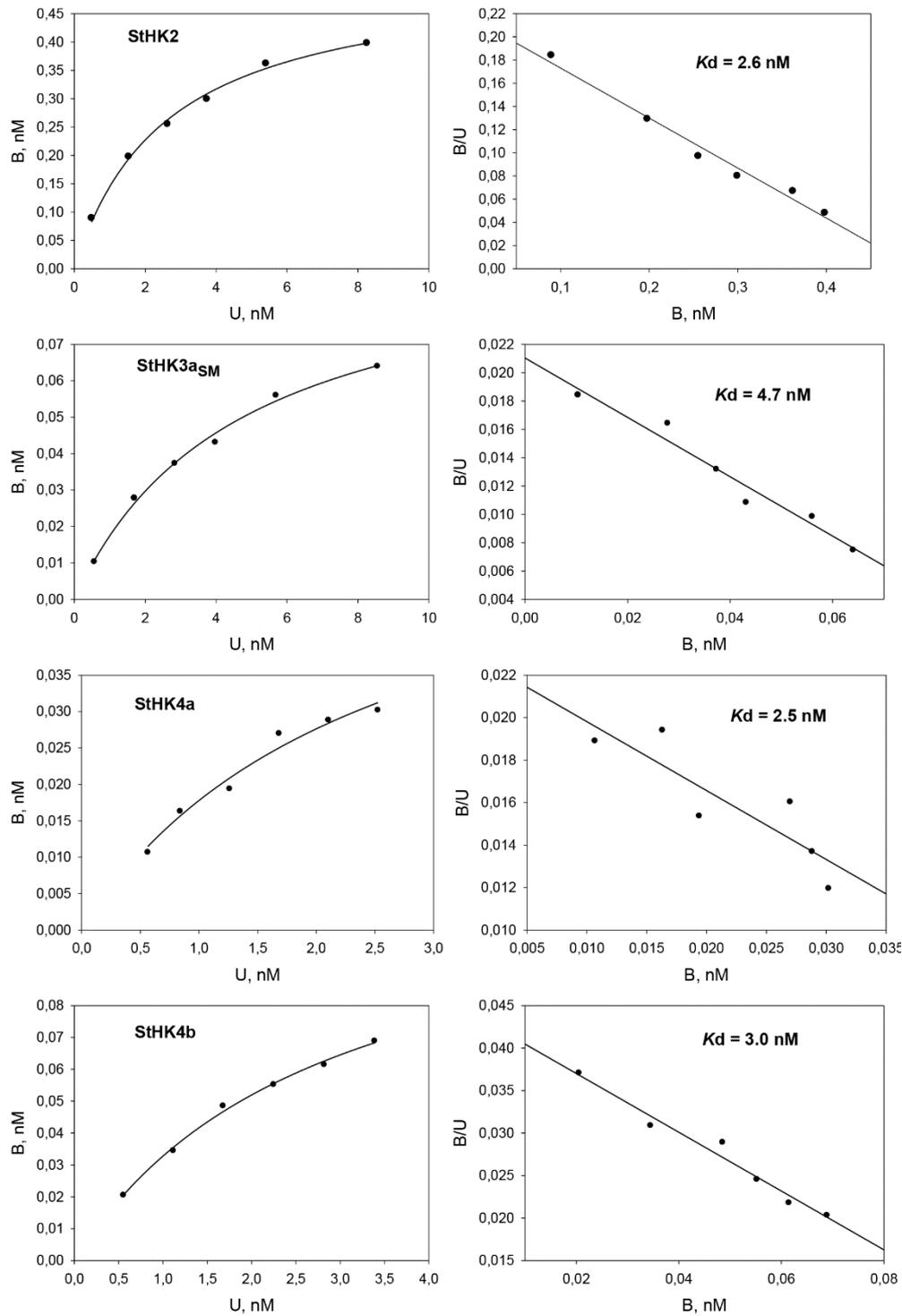


Рис. 28. Скатчард-анализ взаимодействия между [^3H] *транс*-зеатином и StHK. Слева - кривые насыщения цитокининовых-рецепторов; справа - трансформация кривых в координатах Скэтчарда. В и U - концентрация связанного и несвязанного гормона, соответственно.

Таблица 13. Сродство (K_D) различных цитокининов к рецепторам картофеля.

Cytokinin	Abbreviation	Apparent K_d (nM)			
		StHK2a	StHK3a _{SM}	StHK4a	StHK4b
<i>trans</i> -Zeatin	tZ	2.6 ± 0.3	4.7 ± 0.6	2.5 ± 0.7	3.0 ± 0.3
<i>cis</i> -Zeatin	cZ	102 ± 7	110 ± 39	106 ± 22	129 ± 19
N ⁶ -Isopentenyladenine	iP	2.4 ± 0.2	5.2 ± 0.8	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3
Dihydrozeatin	DZ	169 ± 18	21 ± 3	178 ± 37	227 ± 33
N ⁶ -Benzyladenine	BA	45 ± 3.5	49 ± 7	55 ± 7	63 ± 12
Thidiazuron	TD	1.40 ± 0.04	2.3 ± 0.5	12.6 ± 1.9	17.2 ± 2.5

специфичность предполагаемых рецепторов в конкурентных экспериментах, где связывание меченого цитокинина осуществлялось в присутствии различных концентраций определенных немеченых лигандов. На основании полученных кривых конкуренции (рис. 29) определяли кажущиеся значения K_D для каждого лиганда, как описано (Lomin & Romanov, 2008). Мы проанализировали взаимодействие StHK с шестью цитокининами, включая пять природных, а также синтетический цитокинин производное мочевины тидиазурон (табл. 13). Лигандная специфичность StHK показала много общего. Все анализируемые белки имели высокое и почти одинаковое сродство к *транс*-зеатину и изопентениладенину, кажущийся K_D варьировала от 2,1 до 5,2 нМ. Все StHK связывали *цис*-зеатин значительно слабее, с K_D более 100 нМ. N⁶-бензиладенин (BA) проявлял промежуточное сродство с K_D в диапазоне от 45 до 63 нМ. Что касается двух оставшихся цитокининов, белки StHK продемонстрировали значительные различия. StHK3a_{SM} связывал дигидрозеатин с $K_D \sim 21$ нМ, гораздо сильнее, чем другие предполагаемые рецепторы картофеля ($K_D \sim 170-230$ нМ). StHK2 и StHK3a_{SM} показали высокое сродство к тидиазурону ($K_D = 1,4$ и $2,3$ нМ, соответственно), тогда как сродство к StHK4a и StHK4b было гораздо ниже ($K_D = 12,6$ и $17,2$ нМ, соответственно). Рейтинг аффинности цитокининов для StHK был следующим: StHK2, TD > iP = tZ > BA > cZ > DZ; StHK3, TD > iP = tZ > DZ > BA > cZ; StHK4, iP = tZ > TD > BA > cZ > DZ. Профили предпочтения StHK2 и StHK3a_{SM} отличаются по положению DZ, а от (почти идентичных) изоформ StHK4 - по положению TD. Наибольшие различия (в позициях TD и DZ) были выявлены между StHK3 и StHK4.

Хотя в данном исследовании StHK3a был представлен только сенсорным модулем, предыдущие данные показали, что сенсорного модуля достаточно для характеристики лигандной специфичности полноразмерного рецептора (Stolz et al., 2011).

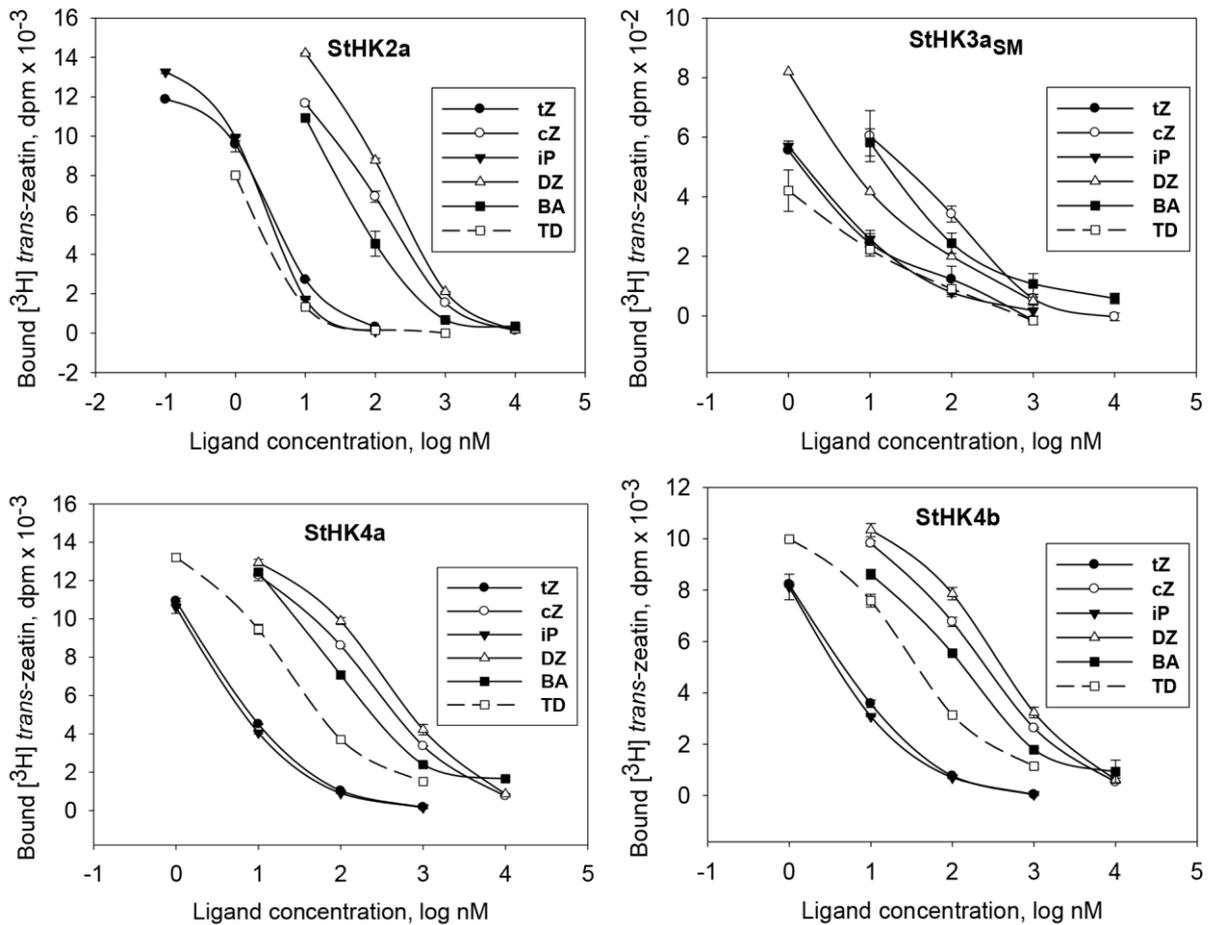


Рис. 29. Конкуренция различных цитокининов с [³H] *транс*-зеатином за связывание с StHK. Немеченые гормоны: *tZ* - *транс*-зеатин; *cZ* - *цис*-зеатин; *iP* - изопентениладенин; *DZ* - дигидрозеатин; *BA* - *N*⁶-бензиладенин; *TD* - тидиазурон.

StHK способны запускать сигналинг через MSP. Способность рецепторов картофеля запускать цитокининовый сигналинг была проверена на мутанте *E. coli* *ArcsC*, лишенном собственной гибридной гистидинкиназы RcsC и снабженном конструкцией *cps:LacZ* с репортерным геном *LacZ*, управляемым промотором *cps* (Suzuki et al., 2001; Takeda et al., 2001). Такая конструкция позволяет оценить способность гибридных гистидинкиназ инициировать передачу сигнала по пути MSP. Активация MSP-сигналинга в бактериях приводит к экспрессии репортерной

галактозидазы (*LacZ*), активность которой проявляется в посинении клонов, растущих на среде с добавлением X-Gal. Мы экспрессировали клонированные гены предполагаемых рецепторов цитокинина картофеля в *E. coli* *ArcsC*. В клонах, экспрессирующих *StHK*, но не в контрольном клоне, наблюдалось синее окрашивание (рис. 30). Степень посинения значительно увеличивалась в присутствии цитокинина. Это подтверждает способность клонированных картофельных белков передавать сигнал цитокинина генам первичного ответа по каноническому пути MSP.

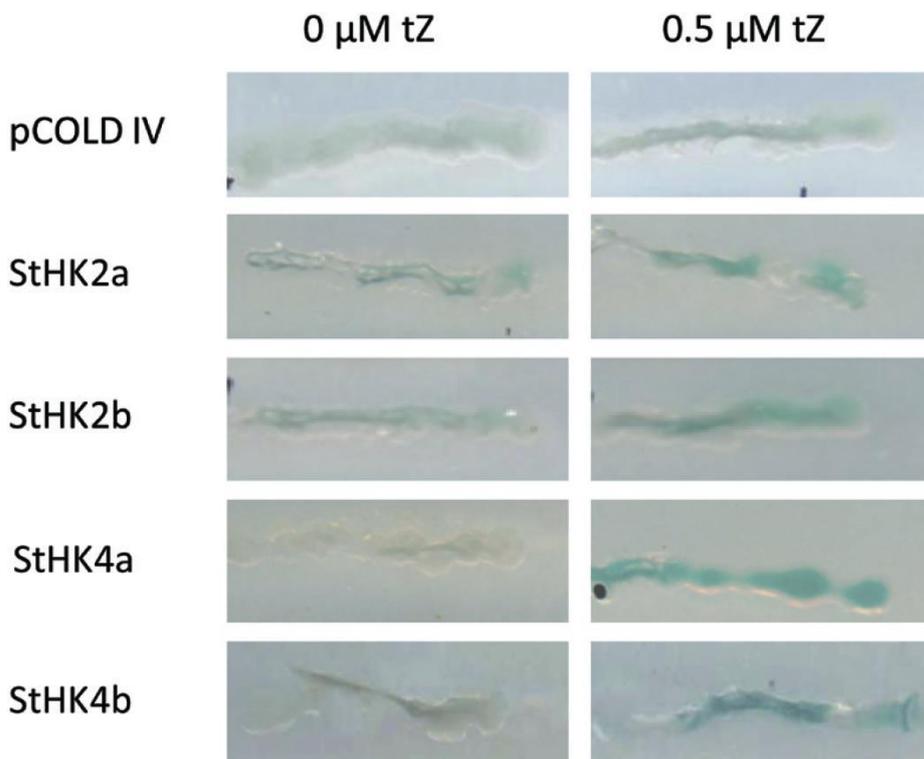


Рис. 30. Цитокининовые рецепторы картофеля запускают сигнальный путь MSP в клетках *ArcsC E. coli*.

3.2.7.4 Характер экспрессии *StHK in planta*

Для оценки функциональности гена *in vivo* важно знать уровень и паттерн его экспрессии в живом организме. Мы изучили экспрессию генов рецепторов цитокининов в органах растений картофеля, выращенных *in vitro* в условиях, благоприятных для вегетативного роста (1,5% сахарозы) или клубнеобразования (5% сахарозы). Содержание мРНК генов *StHK2*, *StHK3* и *StHK4* определяли методом количественного ОТ-ПЦР. Для количественного сравнения профилей экспрессии

для каждого исследуемого гена были выбраны внутриэкзонные праймеры. Эти праймеры были комплементарны обоим аллелям одного клада благодаря большому сходству последовательностей этих генов. Относительное количество предполагаемых рецепторов разных клатов в органах картофеля определяли путем сравнения уровней транскриптов генов домашнего хозяйства.

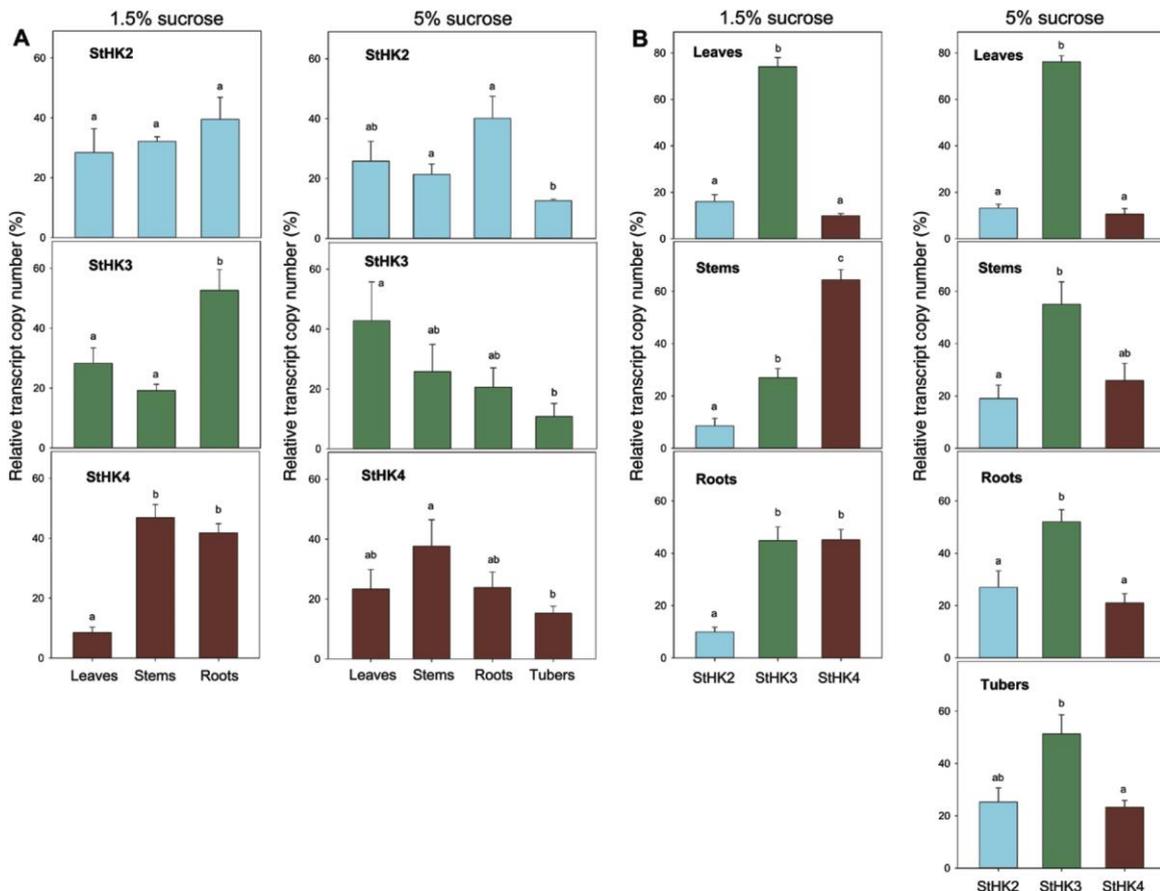


Рис. 31. Органозависимые (А) и кладозависимые (В) паттерны экспрессии рецепторов цитокининов в растениях картофеля, культивируемых на средах с различным процентным содержанием сахарозы. Относительное число копий транскриптов приведено в процентах от общего количества транскриптов в каждой деланке, принятого за 100%. Разные буквы (a, b, c) указывают на значительные различия при $P < 0,05$.

Уровни экспрессии значительно различались в зависимости от группы StHK, органа и условий роста (рис. 31). Характер экспрессии отличался у растений, выращенных на средах с низким (1,5%) или высоким (5%) содержанием сахарозы. В случае среды с 1,5% сахарозы наибольшая экспрессия гена *StHK3* наблюдалась в

корнях, в то время как в случае среды с 5% сахарозы максимальная экспрессия *StHK3*, очевидно, происходила в листьях. У растений, выращенных на среде с низким содержанием сахарозы, ген *StHK4* был гораздо слабее экспрессирован в листьях, чем в стеблях или корнях, тогда как при более высоком содержании сахарозы уровень экспрессии *StHK4* в различных органах был более одинаковым. В группе *StHK2* заметные органоспецифические различия были обнаружены при выращивании растений на 5%, но не на 1,5% сахарозе. Самый низкий уровень экспрессии всех групп StHK наблюдался, как правило, в клубнях по сравнению с другими органами (рис. 31 А).

В пределах каждого органа экспрессия *StHK3*, несомненно, доминировала в листьях, независимо от содержания сахарозы (рис. 31 В). Экспрессия генов *StHK2* и особенно *StHK4* в листьях была значительно слабее. В стеблях, выращенных на 1,5% сахарозы, преобладала экспрессия *StHK4*, а самая низкая экспрессия была характерна для генов *StHK2*. В корнях экспрессия генов *StHK2* была относительно слабой, тогда как гены кладов *StHK3* и *StHK4* экспрессировались активно и почти в равных пропорциях. Иной характер экспрессии наблюдался у растений, выращенных на 5% сахарозе. Здесь, помимо листьев, во всех других протестированных органах (стебли, корни, клубни) также преобладала экспрессия аллелей *StHK3*, хотя и в меньшей степени, чем в листьях. По сравнению со средой с низким содержанием сахарозы, 5% сахароза увеличивала относительную экспрессию генов *StHK2* (в стеблях и корнях), одновременно снижая уровень экспрессии *StHK4*. Таким образом, в отличие от арабидопсиса, у растений картофеля, очевидно, нет доминирования рецепторов *StHK4* в корнях; напротив, рецепторы *StHK3*, по-видимому, доминируют там при выращивании растений на клубнеиндуктивной 5% сахарозе. Общей чертой картофеля и арабидопсиса является очень низкая экспрессия ортологов НК4 в листьях.

Хотя праймеры, использованные для количественного ОТ-ПЦР, не различали близкородственные изоформы генов рецепторов цитокининов, все же можно приблизительно оценить относительную экспрессию этих аллелей. Для достижения

этой цели можно использовать данные о количестве клонов кДНК (табл. 11). В пределах одного клада относительное количество клонов кДНК, несущих ту или иную изоформу, должно отражать относительную встречаемость соответствующей мРНК. Согласно последней колонке таблицы 12, относящейся к побеговой части проростков картофеля, две изоформы мРНК клады НК2 находились в соотношении 1:1; среди изоформ мРНК клады НК3 *StHK3a* встречалась примерно в 2 раза чаще, чем *StHK3b*; в случае клады НК4 *StHK4b* экспрессировалась примерно на порядок интенсивнее, чем *StHK4a*.

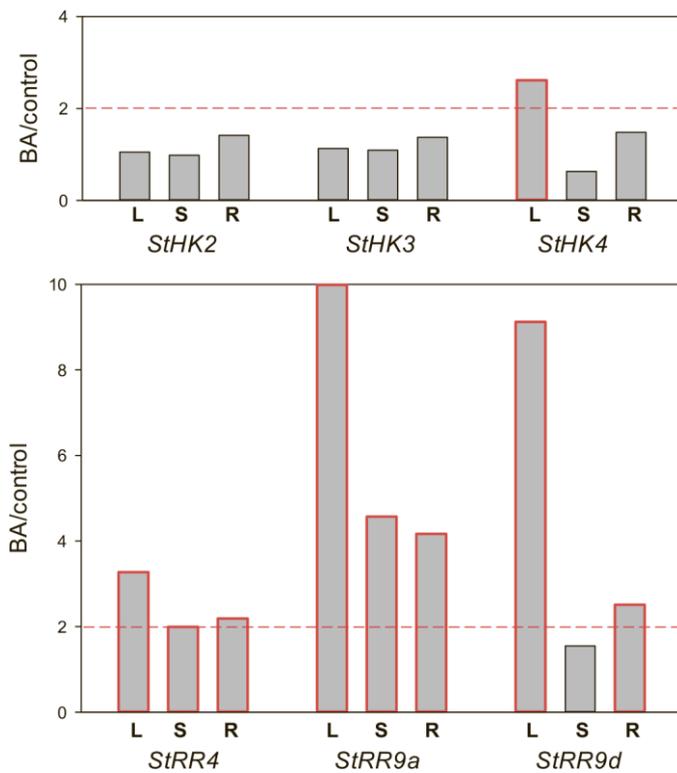


Рис. 32. Степень индукции транскрипции (БА/контроль) генов рецепторов цитокининов (вверху) и регуляторов ответа типа А (внизу) после 1 ч обработки растений картофеля 1 мкМ БА. Растения выращивали на среде MS с 1,5% сахарозы в течение 5-6 недель в стандартных условиях длинного дня. L, S и R означают листья, стебли и корни, соответственно. Значительной индукцией считается более чем 2-кратное увеличение транскриптов в обработанных БА растениях над контрольными. Полосы, соответствующие индуцированным генам, очерчены.

Промоторная активность *StHK* почти не подвержена влиянию цитокининов в связи с низким содержанием цитокин-чувствительного цис-элемента. Обработка

растений картофеля *N6*-бензиладенином оказывала незначительное влияние на экспрессию генов рецепторов цитокинина, а гормональное воздействие, когда оно имело место, было только локальным и не всегда воспроизводилось. При 1,5% сахарозы регулярно регистрировалась стимуляция (в среднем в 2,5 раза) экспрессии *StHK4*, но только в листьях (рис. 32). Можно утверждать, что влияние цитокининов на экспрессию генов рецепторов картофеля, если таковое имеется, в основном ограничивается *StHK4* и зависит как от типа органа/ткани, так и от условий выращивания растений.

Для подтверждения результатов экспериментов по обработке цитокининами было проанализировано влияние введения цитокинина на уровень транскриптов генов регуляторов ответа типа А (*RR-A*). Эти гены у других видов (арабидопсис, кукуруза) представляют собой гены первичного ответа на цитокинин, поэтому можно было бы ожидать, что и у картофеля они будут реагировать на цитокинины. Действительно, наши эксперименты показали быстрое и достоверное увеличение экспрессии генов *StRR-A*, в отличие от генов рецепторов, после обработки растений

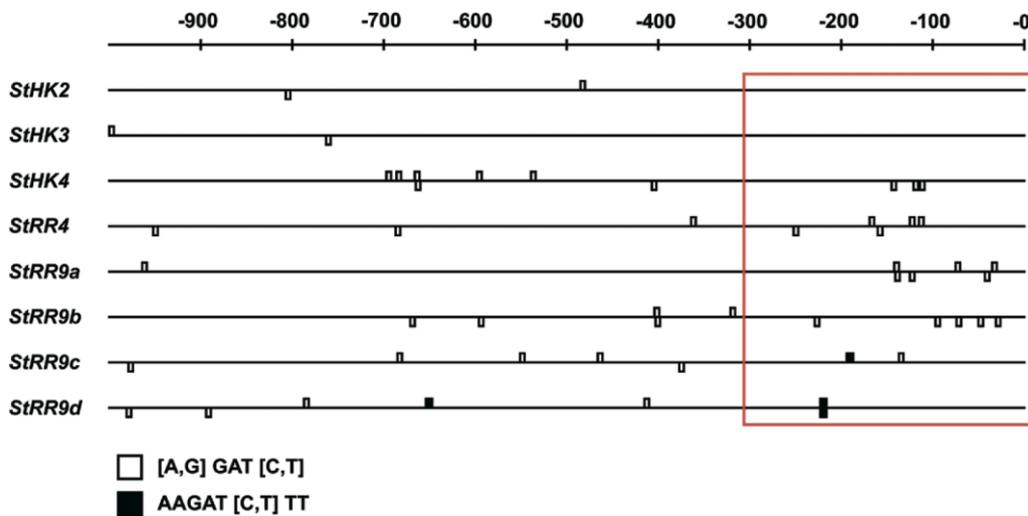


Рис. 33. Цитокинин чувствительные регуляторные элементы в промоторах генов цитокининовых рецепторов (верхняя часть) и генов регуляторов ответа типа А (нижняя часть) картофеля. Элементы показаны на обеих нитях ДНК. Область промотора, расположенная ближе к началу транскрипции, заключена в рамку.

БА (рис. 32). Эти результаты доказывают надежность дизайна и проведения экспериментов и, с другой стороны, подтверждают общий режим функционирования сигнальной системы ЦК у разных видов растений.

Анализ структуры промоторов исследованных генов (рис. 33) в основном соответствовал данным экспрессии генов. В промоторах почти всех генов *StRR-A*, но не *StHK*, были обнаружены длинные цитокинин-чувствительные цис-регуляторные элементы или блоки из четырех или более коротких элементов вблизи начала транскрипции (область ~300 п.н.). Среди рецепторных генов только *StHK4* имеет блок из трех коротких цитокинин-чувствительных цис-элементов вблизи начала транскрипции. Возможно, что этот блок определяет чувствительность *StHK4* к цитокининам в определенных условиях, как показано на рис. 33.

3.2.8 Обсуждение к части 3.2

3.2.8.1 Лиганд связывающие свойства рецепторов цитоткининов

Белки в клеточных мембранах взаимодействуют с молекулами липидов, с другими белками, а также друг с другом. Эти взаимодействия влияют на активность мембранных белков (Lee, 2003, 2004). Поэтому имеет смысл исследовать функционирование мембранных белков в среде, максимально приближенной к естественной. Цитокининовые рецепторы являются типичными трансмембранными ферментами, сенсорный и каталитический домены которых в обязательном порядке расположены на противоположных сторонах мембраны. Ранее для исследования лиганд-связывающих свойств цитокининовых рецепторов использовались в основном трансформированные *E. coli* (Yamada et al., 2001; Spichal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004; Romanov et al., 2005, 2006; Romanov & Lomin, 2009). Позже, чтобы улучшить доступность рецепторов для лигандов, были использованы бактериальные сферопласты (т.е. бактерии, лишённые внешней оболочки). Однако вопрос о том, насколько результаты, полученные в гетерологичных системах анализа, отражают реальность в растительной клетке, все еще оставался открытым.

Для преодоления этой проблемы была разработана система анализа растений на основе микросом, выделенных из листьев табака, транзистентно экспрессирующих

гены рецепторов цитокинина. Полученные данные показали, что цитокининовые рецепторы, сверхэкспрессированные в листьях табака, сохраняют способность связывать специфические лиганды с высокой аффинностью. Использование этой новой системы было несколько более трудоемким по сравнению с бактериальной системой, но она оказалась надежной и позволила детально изучить лиганд-связывающие свойства отдельных цитокининовых рецепторов. Полученные результаты убедительно доказали существование значительных различий между рецепторами в их сродстве к различным цитокининам, а также в профилях предпочтения лигандов. Как следствие, гормональная активность каждого цитокининового основания будет, по крайней мере, частично зависеть от типа рецептора (рецепторов), присутствующего в клетке. Например, *tZ* и *iP* в целом были наиболее предпочтительными лигандами для рецепторов, но в случае АНК3 *iP* был на порядок менее активен, чем *tZ*. Последнее соответствует гораздо более слабому действию *iP* по сравнению с *tZ* на мутант *Arabidopsis*, экспрессирующий АНК3 в качестве единственного рецептора. Некоторые другие цитокинины, а именно ВА и особенно *cZ*, довольно слабо связываются с рецепторами арабидопсиса, но в случае ZmНК1 они проявляют высокую активность, сходную с *iP* и *tZ*. Таким образом, ZmНК1 обладает уникальным свойством: в отличие от других рецепторов, он с одинаковым сродством связывает *транс*- и *цис*-изомер зеатина. Это хорошо согласуется с равной чувствительностью ZmНК1 к *транс*- и *цис*-зеатину и с другими данными гетерологичных функциональных биотестов (Mok et al., 2005; Yonekura-Sakakibara et al., 2004). Поскольку *cZ* и ВА были обнаружены в кукурузе в довольно высоких концентрациях (Veach et al., 2003; Alvarez et al., 2008; Vyroubalová et al., 2009; Stirk et al., 2012), настоящие данные подтверждают постулируемую функцию этих соединений как настоящих цитокининов в кукурузе.

При работе с растительной системой удалось уточнить абсолютные значения констант сродства природных цитокининов к различным рецепторам. При сравнении с гетерологичной системой анализа абсолютные значения были довольно близки в случае АНК2, но несколько отличались в случае двух других рецепторов

(до трех раз для ZmHK1 и до 10 раз для АНК3). Очевидно, мембранное микроокружение в какой-то мере влияет на лиганд-связывающие свойства рецепторов, и степень этого влияния зависит от структуры рецептора. Однако, несмотря на это, профили лигандной специфичности рецепторов к цитокининовым основаниям были очень сходны независимо от используемой системы анализа (Romanov et al., 2006), что свидетельствует о том, что каждый цитокининовый рецептор обладает достаточно стабильным профилем лигандной (citoкининовой) специфичности, который может быть воспроизведен в различных системах анализа.

Сравнение свойств восприятия цитокининов у кукурузы и арабидопсиса выявило некоторые общие черты. ZmHK2 отличался от ZmHK1 более высоким сродством к нескольким цитокининам, а именно *tZ*, *cZ* и *DZ*. Аналогичные различия между АНК3 (ортолог ZmHK2) и CRE1/АНК4 (ортолог ZmHK1) были зарегистрированы (Spíchal et al., 2004; Romanov et al., 2006). Очевидным различием между двумя видами является гораздо более высокое сродство рецепторов кукурузы к *cZ*. Фактически, значительные количества *cZ* и его производных (рибозиды, глюкозиды) присутствуют в кукурузе (Veitch et al., 2003; Vyroubalova et al., 2009), что предполагает важную роль *cZ* в цитокининовой сигнальной системе кукурузы. Интересно, что цитокинины *cZ*-типа также в избытке присутствуют в рисе (Kojima et al., 2009) и мхе *Physcomitrium patens* (von Schwanzenberg et al., 2007). Необходимо установить сродство к *cZ* цитокининовых рецепторов у риса и мхов, чтобы понять биологическое значение *cZ* в различных таксонах. С другой стороны, заметные различия в сродстве к *DZ* проявились в цитокининовых рецепторах кукурузы; сродство к *DZ* у ZmHK2 было более чем на два порядка выше, чем у других рецепторов.

Одним из важных результатов этого исследования стала однозначная демонстрация того, что цитокининовые рецепторы, расположенные в растительной мембране, с высокой аффинностью связывают только свободные цитокининовые основания, но не соответствующие рибозиды. Многочисленные биотесты позволяли предполагать, что рибозиды цитокинина обладают собственной гормональной

активностью, но предыдущие эксперименты по связыванию рецепторами и структурные исследования дали противоречивые результаты. Действительно, во всех ранее использованных бактериальных системах анализа связывания или активации репортеров с различными рецепторами (из арабидопсиса или кукурузы) рибозиды цитокинина демонстрировали значительную цитокининовую активность и высокое сродство к рецепторам (Yamada et al., 2001; Spíchal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004; Romanov et al., 2005, 2006; Stolz et al., 2011; Kuderová et al., 2015). Эти результаты были воспроизведены в настоящем исследовании. Более того, изолированные мембраны *E. coli*, содержащие эти рецепторы, дали аналогичные результаты. Однако, когда использовались мембраны дрожжей, трансформированных рецептором АНК4, iPR (в отличие от iP) оказался неактивным (Yamada et al., 2001). Чтобы объяснить противоречивые результаты в двух системах анализа, авторы предположили, что клетки *E. coli* быстро превращают рибозиды в соответствующие основания, которые, в свою очередь, активируют рецепторы. Наконец, 3D-структура лиганд-связывающего сайта цитокининового рецептора подтвердила отсутствие гормональной активности у *tZ*, рибозилированного в положении N9, поскольку рибозидный мотив не заходит в связывающий карман (Hothorn et al., 2011). Эксперименты со всеми тремя рецепторами арабидопсиса и ZmHK1 кукурузы в системе растительного анализа показали, что рибозиды цитокининов не связываются или связываются очень слабо с рецепторами, что означает отсутствие у них значительной гормональной активности. По-видимому, гликозидазная активность, расщепляющая остаток рибозы от атома N9 цитокинина, слаба или отсутствует в мембранах эукариотических клеток (дрожжей и растений), хотя нельзя исключить, что слабая связывающая активность рибозидов, особенно iPR, в растительной системе анализа может быть обусловлена и следами гликозидазной активности.

То, что цитокининовые рецепторы не распознают производные рибозидов, имеет важные последствия для нашего понимания и интерпретации активности цитокининов в растительном мире. Кажется понятным, что рибозиды как основная

транспортная форма цитокининов (Sakakibara, 2006; Hirose et al., 2008) лишены присущей им гормональной активности. Следовательно, после достижения ткани-мишени цитокинины должны быть "активированы" путем преобразования в свободные формы оснований. Пока известно только образование свободных оснований цитокинина из его нуклеотидного предшественника под действием фосфогидролаз LONELY GUY (LOG), но не их прямое образование из рибозидов (Kudo et al., 2010). Это указывает на то, что фосфорилирование транспортной формы цитокинина может потребоваться до образования активного гормона. Это имеет значение, поскольку цитокининовые нуклеотиды являются отрицательно заряженными недиффундирующими молекулами, которые могут "задерживать" гормон в клетке (цитозоле) до его окончательной активации и действия в качестве диффундирующего свободного основания. Еще одним замечанием, имеющим практическое значение, является то, что эндогенные концентрации рибозидов часто значительно превышают концентрации соответствующих оснований и обычно интерпретируются как отражение цитокининового статуса анализируемой ткани. Обнаружение (почти) исключительного взаимодействия рецептора с основанием убедительно доказывает необходимость рассматривать концентрацию свободных оснований как наиболее важный параметр.

Еще одним преимуществом растительной системы анализа является возможность анализировать рецепторы, изучение которых в бактериях проблематично, что продемонстрировано в данном случае успешной характеристикой лигандных свойств полноразмерного АНК2, преодолев тем самым предыдущие трудности (Stolz et al., 2011). Профиль лигандной специфичности полноразмерного АНК2 оказался сходным с профилем его сенсорного модуля, экспрессированного в *E. coli*. Единственное очевидное различие касалось синтетического цитокинина TD: он был менее активен, чем *tZ*, в случае полноразмерного рецептора, но более активен в случае изолированного сенсорного модуля. Однако в обоих случаях сродство *tZ* и TD к обеим формам (полноразмерной и усеченной) АНК2 было довольно близким. Эти данные еще раз подчеркивают

стабильность профиля лигандной специфичности, который является отличительным свойством цитокининовых рецепторов, сохраняющимся независимо от системы анализа и даже целостности самого рецептора. Следовательно, лигандное предпочтение рецептора может служить индивидуальным паспортом, отличающим его от близких гомологов.

Особый интерес представляет рН-зависимость связывания гормон-рецепторов, поскольку рН-зависимый характер может свидетельствовать о субклеточной локализации рецептора. Действительно, рН-зависимость связывания цитокининовых рецепторов послужила первым намеком на внутриклеточную локализацию рецепторов в эндомембранной системе (Romanov et al., 2006). Эксперименты с растительной тест-системой подтвердили общую закономерность зависимости от рН для образования комплекса цитокинин-рецептор. В каждом случае связывание гормона снижалось с увеличением кислотности среды и минимальное связывание наблюдалось при самом низком из всех испытанных значений рН (рН 5). Инкубация рецептора (на примере АНК3) при рН 5 приводила к необратимой инактивации его лиганд-связывающей способности. Согласно последним измерениям, в просвете эндоплазматического ретикулула (ЭР) клеток арабидопсиса и табака значения рН находятся в диапазоне 7.1-7.5 (Martinière et al., 2013), тогда как апопласт обычно гораздо более кислый с рН 4.5-5.5 (Felle, 2005). Это указывает на то, что внутренние клеточные мембраны, расположенные в нейтральной или слабощелочной среде, представляют собой более благоприятную платформу для функционирования рецепторов, чем плазматическая мембрана, внешняя сторона которой контактирует с кислым апопластом. С другой стороны, было бы преждевременно исключать наличие функционирующих рецепторов на плазматической мембране, поскольку при рН 5.5 рецепторы проявляли вполне очевидную способность связывать цитокинин. Даже при рН 5 некоторые рецепторы (АНК4 и ZmНК1) сохраняли заметную способность связывать лиганд, что соответствовало 23,4% и 37,2% от связывания при рН 7, соответственно.

Зависимость связывания цитокининов ZmHK1 от pH показала неожиданный профиль. Специфическое связывание *tZ* этим рецептором возрастало почти линейно с увеличением pH в широком диапазоне от pH 5 до pH 9.5. Чтобы объяснить эту зависимость, можно выдвинуть гипотезу, что этот рецептор служит не только гормональным сенсором, но и сенсором pH. В бактериальном мире гистидинкиназы двухкомпонентных систем давно известны как сенсоры pH (Pflock et al., 2004; Perez & Groisman, 2007; Prost et al., 2007; Müller et al., 2009). Недавно была раскрыта структурная основа pH-чувствительности хеморецептора TrpV из *Helicobacter pylori* (PDB ID 3UB6; Sweeney et al., 2012). Было установлено, что лиганд-связывающий домен PAS этого хеморецептора отвечает за чувствительность к pH. Присутствие связанного лиганда (мочевины) в PAS-домене является необходимым условием для сенсорной функции. Протонирование остатка аспартата в лиганд-связывающем участке с образованием двойной водородной связи с молекулой мочевины играет ключевую роль для функции белка. Эти структурные особенности имеют прямую аналогию с цитокининовыми рецепторами. Хотя остатки аспартата, необходимые для связывания лиганда, расположены в разных положениях в PAS-доменах белков TrpV и ZmHK1, оба они могут образовывать тесные водородные связи с мочевиной (TrpV) или производными мочевины, такими как TD (ZmHK1).

Физиологическая функция высокой чувствительности ZmHK1 к pH пока не ясна. Когда рецептор расположен в ЭР, его сенсорный модуль предсказуемо обращен в люмен ЭР. Можно предположить, что чрезмерное подщелачивание люмена усиливает цитокининовую сигнализацию и приводит к экспрессии некоторых цитокинин-зависимых генов, участвующих в регуляции pH. Изменения цитоплазматического pH включают, например, подщелачивание в эпидермальных клетках корня в месте инициации волосков (Bibikova et al., 1998) и в защитных клетках листьев при обработке абсцизовой кислотой (Gonugunta et al., 2008). Следовательно, для контроля гомеостаза pH необходим особый механизм, частью которого могут быть определенные цитокининовые рецепторы. Примечательно, что среди генов, реагирующих на цитокинин, есть такие, которые регулируют

мембранный транспорт, включая транслокацию из ЭР в везикулы Гольджи (Bhargava et al., 2013). Индуцированное цитокинином изменение трансмембранного транспорта может повлиять на уровень pH в ЭР, обеспечивая тем самым механизм обратной связи для восстановления нормального гомеостаза. Не исключено также, что повышение уровня pH в просвете ЭР активирует цитокинин-зависимую MSP, выступая в качестве гормоноподобного сигнала. Необходимы дальнейшие исследования для изучения потенциальной роли и функционального значения некоторых цитокининовых рецепторов как сенсорных молекул pH.

3.2.8.2 Цитокининовые рецепторы картофеля

Морфогенез растений, в частности клубнеобразование, основан на пространственно-временной пролиферации и дифференциации клеток. Одним из основных биологических эффектов цитокининов является стимулирование деления клеток, и поэтому цитокинины являются важными участниками морфогенетических процессов. Действительно, в отношении развития картофеля сообщалось, что цитокинины ускоряют и увеличивают скорость образования клубней (Aksenova et al., 2000). У неклубненосных растений цитокинины сами по себе способны вызывать появление клубнеподобных структур (Guivarc'h et al., 2002; Eviatar-Ribak et al., 2013; Frugier et al., 2008; Miri et al., 2016). Помимо влияния на формирование клубней, цитокинины, как известно, регулируют общую архитектуру растений, распределение биомассы и устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам (Aksenova et al., 2000; Abelenda & Prat, 2013; Zwack & Rashotte, 2015; Brütting et al., 2017; Thu et al., 2017). Все это указывает на важность изучения сигнальной системы цитокининов в растениях, в частности в клубноносных культурах, таких как картофель.

В нашей работе мы представили первые результаты детального изучения цитокининовых рецепторов из растений картофеля. Были исследованы две различные формы картофеля: дублированный моноплоид Phureja и тетраплоидный картофель сорта Désirée. Растения Phureja, как и *Arabidopsis*, обладают тремя ортологами рецепторов цитокининов. Напротив, у растений сорта Désirée было

обнаружено по две аллельные формы каждого типа рецепторов (*StHK2a/b*, *StHK3a/b* и *StHK4a/b*), относящихся к трем известным филогенетическим кладам. Наши данные показали, что такое обилие рецепторов характерно для каждого отдельного растения сорта Дезире. Это означает, что наблюдаемые различия не являются результатом изменчивости одного локуса, а соответствуют настоящим паралограм, возникшим в результате полиплоидизации сорта *Désirée*. Не исключено, что реальное число рецепторных аллелей у картофеля несколько выше. Внутри каждой группы изомеры рецепторов различаются несколькими аминокислотными заменами, которые не затрагивают большинство консервативных мотивов. Однако некоторые консенсусные мотивы в сенсорном отличаются у рецепторов картофеля. Причина таких своеобразных свойств пока не ясна. В целом, рецепторы картофеля имеют сходную доменную структуру с кристаллизованными гибридными гистидинкиназами других видов.

Определены лиганд-связывающие свойства отдельных рецепторов картофеля: константы сродства к активным цитокининам, pH-зависимость связывания лиганда, специфичность лиганда. Два из изученных рецепторов (*StHK3a* и *StHK4a*) идентичны у картофеля сорта *Désirée* и у *Phureja*. Все рецепторы обладают высоким сродством к *tZ*, значительно более низким к *BA* и относительно низким к *cZ*. *StHK3* отличается от других рецепторов картофеля относительно высоким сродством к *DZ*. Лигандная специфичность *StHK2* и *StHK4* имеет много общего с таковой у ортологов арабидопсиса, тогда как *StHK3* связывает *iP* и *BA* гораздо сильнее, чем *АНК3*, а сродство *StHK3* к *iP* и *tZ* сходно. Таким образом, лиганд-связывающие свойства *StHK3* отличаются от свойств ортологов у арабидопсиса, кукурузы и рапса. Все рецепторы связывают цитокинины сильнее в основном (pH 7-9), чем в кислом (pH 5-7) диапазоне pH. Это свидетельствует в пользу внутриклеточного функционирования цитокининовых рецепторов картофеля. Функциональность клонированных рецепторов картофеля была подтверждена путем тестирования их способности передавать цитокининовый сигнал через *MSP* до целевого гена.

Преобладающая экспрессия генов *StHK3* была выявлена в листьях, а также в других органах растений, выращенных на 5% сахарозе, хотя степень доминирования *StHK3* была менее выражена в стеблях, корнях и клубнях. При выращивании растений на 1,5% сахарозе экспрессия *StHK4* преобладала в стеблях, а в корнях уровни экспрессии *StHK3* и *StHK4* были относительно высокими и почти одинаковыми. В отличие от других видов, преобладающей экспрессии ортологов НК4 в корнях обнаружено не было. Экзогенный цитокинин мало влиял на экспрессию рецепторов цитокининов в растениях картофеля, за исключением *StHK4*, который может быстро повышаться в листьях. Анализ промоторных структур показал корреляцию между наличием *cis*-регуляторных элементов и чувствительностью экспрессии генов к цитокининам.

Таким образом, совокупность наших результатов не оставила сомнений в том, что изученные белки StHK являются настоящими цитокининовыми рецепторами картофеля. Наблюдаемые уникальные структурные особенности уточняют и расширяют наши представления о свойствах цитокининовых рецепторов. Выявленные особенности аппарата восприятия цитокининов у картофеля могут быть связаны со способностью этой культуры производить клубни. Можно предположить, что инициация клубней может быть связана с локальным/временным увеличением цитокининовой сигнализации в кончиках столонов. Полученные результаты создают прочную основу для дальнейшего углубленного изучения роли сигнальной системы цитокининов в онтогенезе картофеля и предоставляют новые биотехнологические инструменты для оптимизации гормональной регуляции клубнеобразования

3.3 Установление субклеточной локализации рецепторов цитокининов

3.3.1 Анализ субклеточной локализации рецепторов цитокининов кукурузы

3.3.1.1 Анализ связывания лигандов с мембранными фракциями кукурузы

Была предпринята попытка определить клеточный компартмент(ы), в котором локализируются рецепторы цитокинина. Имея экспериментальные доказательства высокоаффинного восприятия [³H]tZ рецепторами бактериальной системе, анализ

связывания был проведен с субклеточными фракциями из различных органов проростков кукурузы. Несколько субклеточных фракций были приготовлены из корней или листьев кукурузы и проверены на наличие высокоаффинных сайтов связывания *tZ*. Как показано на рис. 34, очищенные митохондрии и хлоропласты не показали разницы между тотальным и неспецифическим связыванием, тогда как микросомные фракции из листьев и корней продемонстрировали значительное специфическое связывание. Ядра, выделенные из корней, также показали специфическое связывание, хотя примерно в 10 раз меньше, чем микросомы корней.

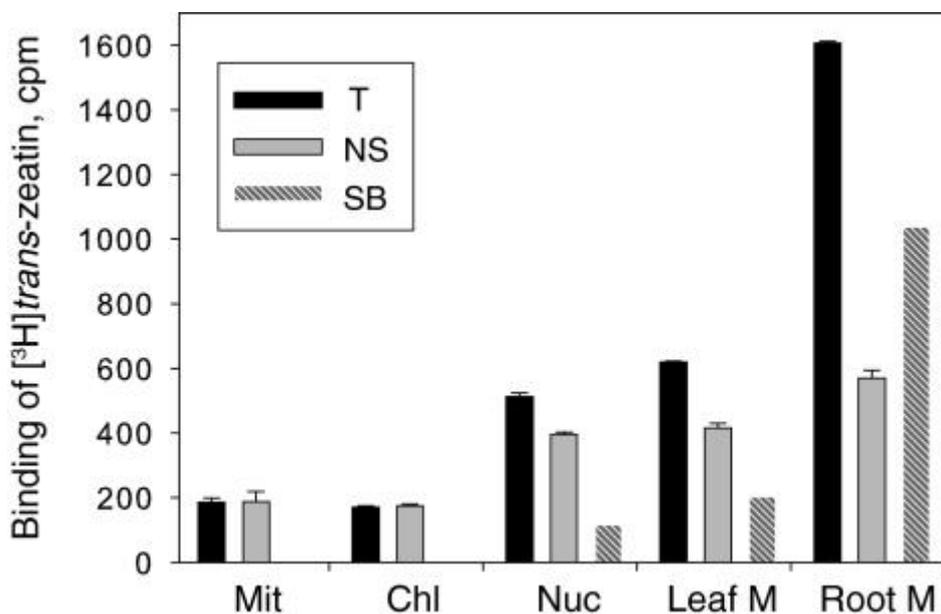


Рис. 34. Связывание $[^3\text{H}]tZ$ с субклеточными фракциями клеток проростков кукурузы. T - тотальное связывание; NS - неспецифическое связывание; SB - специфическое связывание ($SB=T-NS$); Mit - митохондрии; Chl - хлоропласты; Nuc - ядра; Leaf M - микросомная фракция из листьев; Root M - микросомная фракция из корней. Каждый вариант представлен в виде связанного $[^3\text{H}]tZ$ на 100 мкг общего белка во фракции. Планки ошибок указывают на стандартные ошибки в трех повторах.

Фракционирование микросомальных мембран провели с помощью водного двухфазного разделения. Иммуноблот-анализ показал, что ViP, маркерный белок ЭР, в избытке присутствовал в нижней фазе, в то время как H^+ -АТФаза, маркерный белок плазматической мембраны (ПМ), накапливался в верхней фазе (рис. 35 А).

Распределение маркеров ЭР и плазматической мембраны между двумя фазами было практически одинаковым для фракций мембран корней и листьев. Однако анализ

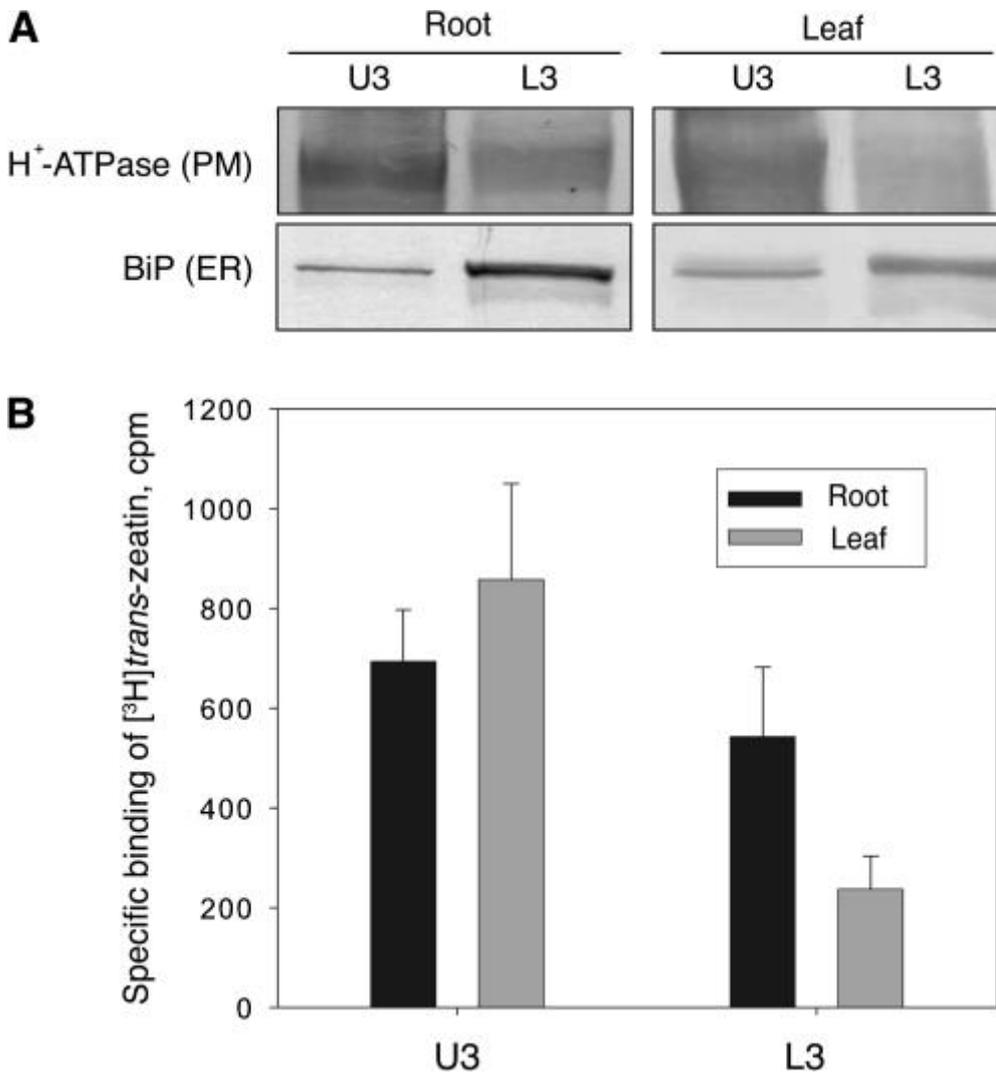


Рис. 35. Распределение высокоаффинных сайтов связывания *tZ* между фракциями проростков кукурузы, обогащенными плазматической мембраной и эндомембранами. (A) Анализ мембранных фракций методом иммуноблотинга. L3 - очищенная нижняя фракция; U3 - очищенная верхняя фракция. Верхний и нижний ряды показывают иммуноблоты для маркера плазматической мембраны (ПМ) ПМ H⁺-АТФазы и маркера эндоплазматического ретикулума (ЭР) BiP, соответственно. Количество белков, загруженных на гели, составляло 20 мкг и 5 мкг для анализа H⁺-АТФазы и BiP, соответственно. (B) Специфическое связывание [³H]*tZ* с мембранными фракциями из корней и листьев кукурузы. Данные представляют специфическое связывание [³H]*tZ* на 100 мкг общего белка во фракции. Планки ошибок указывают на стандартные ошибки трех повторов.

связывания выявил различия в распределении сайтов сродства к *tZ* в корнях и листьях (рис. 35 В). Связывающая способность [³H]*tZ* (на мг белка) существенно не отличалась между обогащенными плазматической мембраной (U3) и обогащенными ЭР (L3) фракциями корней. Учитывая, что количество эндомембран в клетке значительно превышает количество плазматической мембраны (Morré et al., 1987), можно предположить, что большинство высокоаффинных сайтов связывания цитокинина в клетках корня расположены в эндомембранах. В листьях обогащенная плазматической мембраной фракция (U3) связывала примерно в 3,5 раза больше [³H]*tZ*, чем обогащенная ЭР фракция (L3) (рис. 35 В), что говорит о том, что плотность сайтов связывания *tZ* в обогащенной плазматической мембраной фракции листьев была значительно выше, чем в обогащенной ЭР фракции.

3.3.1.2 Видимое сродство цитокининов к микросомам листьев и корней

Лигандная специфичность фракций микросом, полученных из корней и листьев, была охарактеризована с помощью конкурентных опытов по связыванию (рис. 36). Микросомы из обоих органов показали сходные свойства, т.е. *tZ* и *iP* были сильными конкурентами, *cZ* был менее конкурентным, а аденин практически не проявлял конкурентной активности. На основании конкурентных кривых (рис. 36) были определены значения K_D^* микросом (табл. 14). Значения K_D^* микросом корней

Таблица 14. Кажущиеся константы сродства K_D^* для взаимодействия различных цитокининов с мембранными фракциями кукурузы

Microsomes from	K_D^* for cytokinins (nM)			
	<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	Ade
Roots	2.8	17.6	1.2	>10000
Leaves	0.3	4	0.4	>10000

K_D^* рассчитывали, как указано в таблице 10. Сокращения как в подписи к рисунку 22.

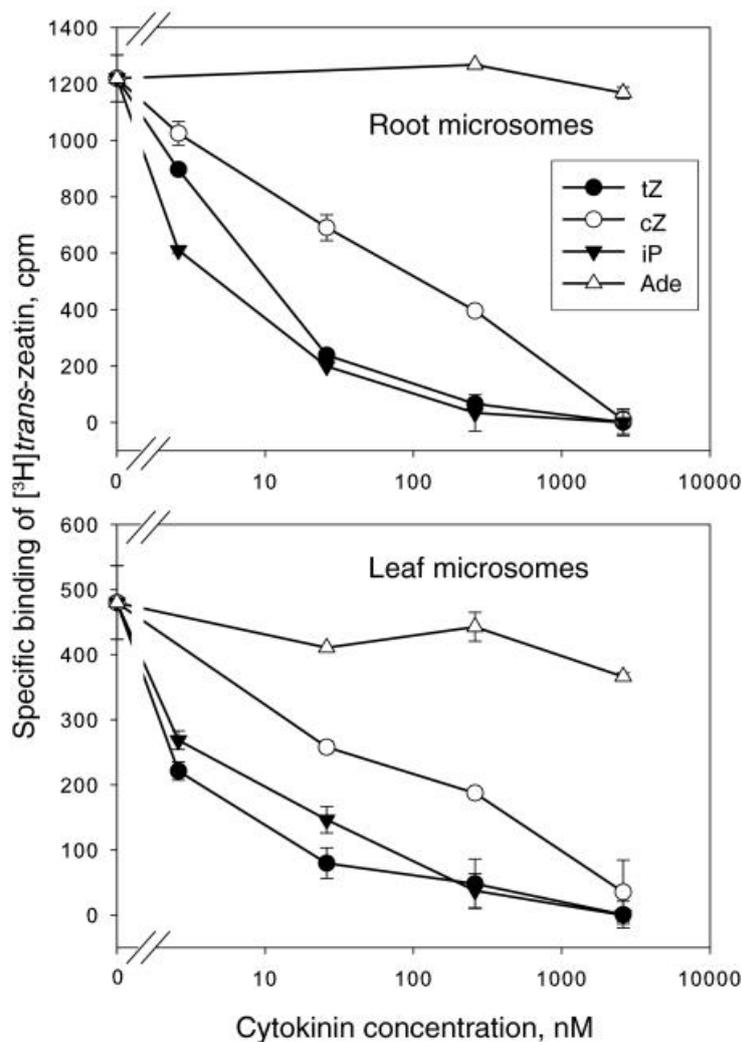


Рис. 36. Конкуренция различных цитокининов с $[^3\text{H}]tZ$ за связывание с фракциями микросом кукурузы из корней и листьев. Данные показывают специфическое связывание $[^3\text{H}]tZ$ на 100 мкг общего белка во фракции. Планки ошибок указывают на стандартные ошибки трех повторов. Сокращения как в подписи к рисунку 22..

показали более высокое сродство к iP и tZ , чем к cZ . Аналогичные тенденции были обнаружены в микросомах листьев, но все значения K_D^* из листьев были ниже, чем из корней.

3.3.1.3 Субклеточная локализация ZmHK1-GFP в протопластах кукурузы

Чтобы получить представление о субклеточной локализации ZmHK1, зеленый флуоресцентный белок (GFP), слитый с С-концом ZmHK1 (ZmHK1-GFP) или после С-концевого трансмембранного домена ZmHK1 (ZmHK1TM-GFP), был экспрессирован в клетках кукурузы. Протопласты были приготовлены из культивируемых клеток, и плазмидные конструкции были введены в протопласты

для транзientной экспрессии под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (рис. 36). В качестве контроля использовали сам GFP (рис. 36 А), а SP-GFP-HDEL (Takeuchi et al., 2000) и N34-GFP (Ueda et al., 2001) использовали как маркеры ЭР (рис. 36 С) и плазматической мембраны (рис. 36 Е), соответственно. Флуоресцентные сигналы ZmHK1-GFP, по-видимому, были со-локализованы с сетью ЭР и ядерной оболочкой (рис. 36 G). Примерно такая же картина наблюдалась для ZmHK1TM-GFP (рис. 36 I).

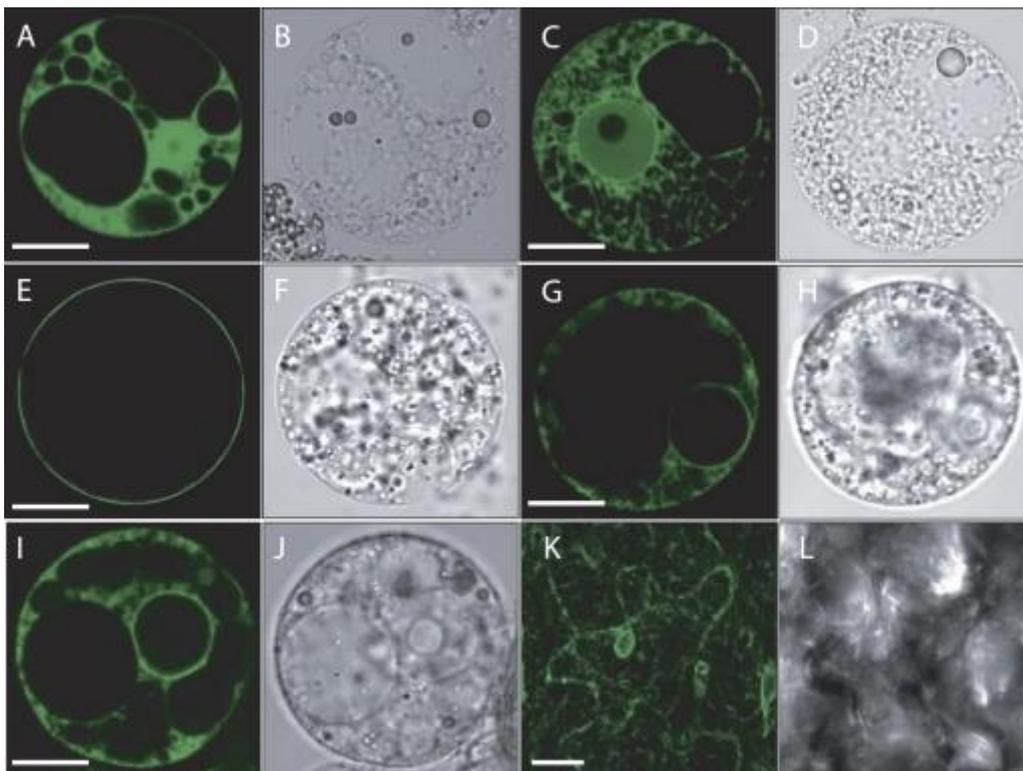


Рис. 36. Микрофотографии протопластов кукурузы, экспрессирующих GFP или различные химерные GF-белки. Только GFP (А, В), SP-GFP-HDEL (С, D), N34-GFP (Е, F), HK1-GFP (G, H) и HK1TM-GFP (I, J) были введены в культивируемые клетки кукурузы методом трансформации с полиэтиленгликолем. После ночной инкубации клетки исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Были получены стабильные трансформанты *A. thaliana*, экспрессирующие HK1TM-GFP (K, L), и наблюдали флуоресценцию GFP в эпидермальных клетках листа. (А, С, Е, G, I, К) флуоресценция GFP; (В, D, F, H, J, L) соответствующие изображения светлого поля. Штрих=10 мкм.

Также были получены стабильные трансформанты *A. thaliana*, экспрессирующие ZmHK1TM-GFP. В потомстве T2 флуоресценция GFP оказалась ко-локализованной с ЭР (рис. 36 К). В целом, наши результаты свидетельствуют о том, что ZmHK локализованы преимущественно в мембране ЭР.

3.3.1.4 Иммунологическая детекция ZmHK1 с помощью моноклональных антител

Чтобы более точно определить местоположение восприятия цитокинина в мембранах, было проведено иммунологическая детекция рецептора цитокинина. Сначала были приготовлены моноклональные антитела (mAB) против ZmHK1, используя в качестве антигена последовательность ресиверного домена (Ala651-Val974). Поскольку несколько генов гомологов рецепторов цитокинина кукурузы были недавно зарегистрированы в геномных базах данных, была проверена реактивность mAB. mAB реагировал с ZmHK1, но не с ZmHK2 и ZmHK3a (рис. 37 А). При иммуноблот-анализе фракции микросом из корней была обнаружена одна полоса с молекулярным размером около 110 кДа (рис. 37 В), что близко к рассчитанной молекулярной массе ZmHK1 (108,1 кДа). При водном двухфазном разделении мембран корней H⁺-АТФаза накапливалась во фракции, обогащенной плазматической мембраной (верхняя фаза, U), тогда как ZmHK1 преимущественно находился во фракции микросом (нижняя фаза, L) вместе со связывающим белком (ViP) и H⁺-пирофосфатазой (H⁺-PPase) (рис. 37 С).

3.3.1.5 Субклеточное фракционирование с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы

Микросомальная фракция мембран корней кукурузы была далее фракционирована центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, проводимым с Mg²⁺ или без него. Поскольку ассоциация ЭР с рибосомами является Mg²⁺-зависимой, истощение Mg²⁺ приводит к высвобождению рибосом и смещению ЭР к более низкой плотности в градиенте (Chen et al., 2002).

В присутствии Mg²⁺, что является условием стабильности комплексов ЭР-рибосома, полипептид ZmHK1 был обнаружен во фракциях более высокой

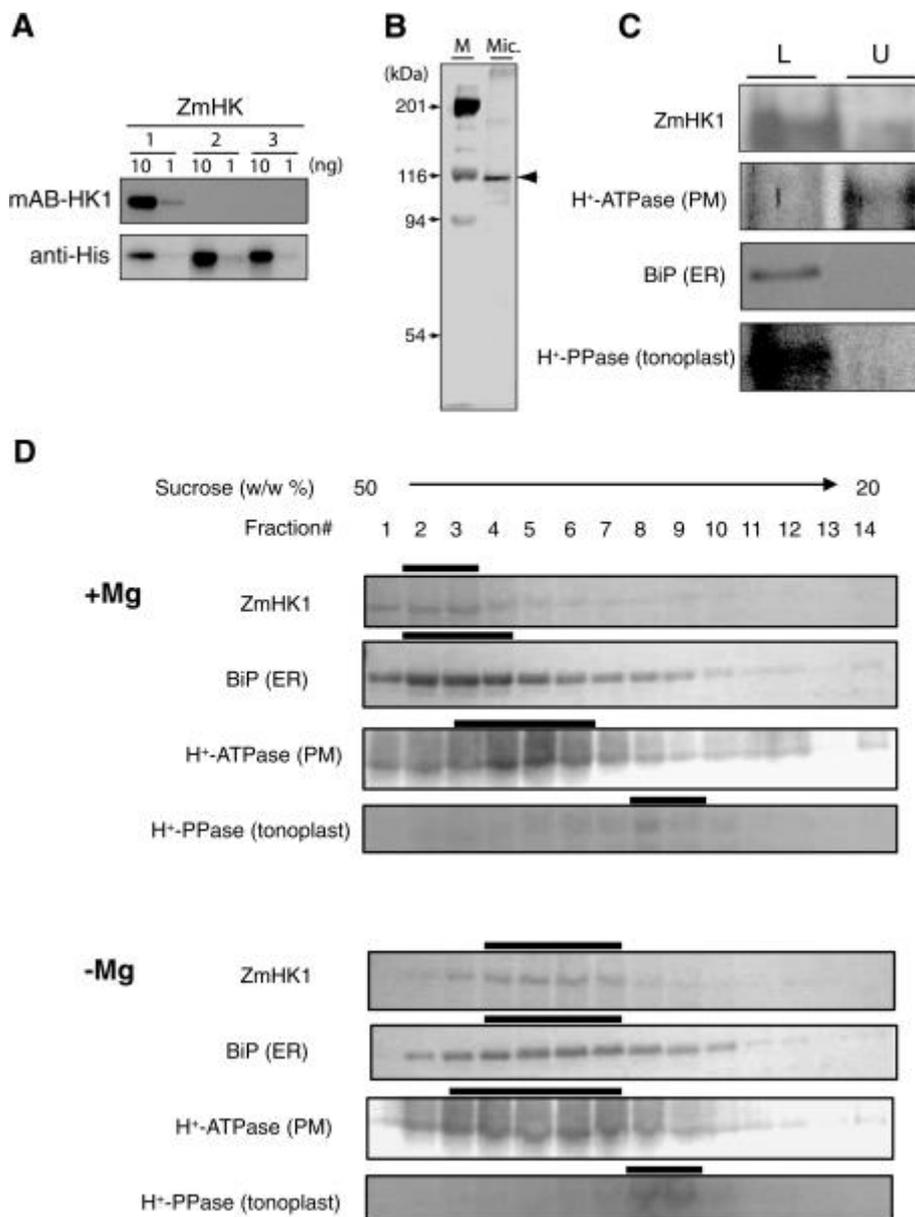


Рис. 37. Иммунологическая детекция ZmHK1. (A) Специфичность моноклонального антитела (mAb) против ZmHK1. Рекombинантные белки с His-меткой, представляющие псевдо-ресиверный и ресиверный домены ZmHK1, ZmHK2 и ZmHK3a, были получены, и указанные количества белков были загружены в SDS-PAGE. Полипептиды были детектированы с помощью mAb против ZmHK1 (mAB-HK1) или анти-полигистидинового антитела (анти-His). (B) Обнаружение ZmHK1 во фракции микросом корня. Фракция микросом была приготовлена из корней молодых проростков кукурузы. Анализу подвергались фракции микросомных мембран (Mic.), соответствующие 1 г свежего веса. Также загружались маркеры размера (M). (C) Фракционирование мембран корней кукурузы методом водного двухфазного разделения. Микросомальные мембраны, полученные из корней

кукурузы, фракционировали методом водного двухфазного разделения. Белки из верхней фазы (U) и нижней фазы (L) подвергали SDS-PAGE и иммуноблоттингу с использованием антител mAB-НК1, анти-Н⁺-АТФазы (маркер ПМ), анти-ViP (маркер ЭР) и анти-Н⁺-РРазы (маркер тонопласта). Количество белка, загруженного на полосы L и U, соответствует одинаковому свежему весу корней. (D) Биохимическое фракционирование мембран из 4-дневных корней кукурузы. Микросомы фракционировали в градиенте сахарозы 20-50% (w/w) в присутствии Mg²⁺ (+Mg) для стабилизации контакта рибосомы с ЭР или в отсутствие Mg²⁺ (-Mg) для диссоциации рибосом от ЭР. Аликвоты каждой фракции анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител mAB-НК1, анти-Н⁺-АТФазы (маркер ПМ), анти-ViP (маркер ЭР) и анти-Н⁺-РРазы (маркер тонопласта).

плотности вместе с ViP (рис. 37 D). Характер распределения Н⁺-АТФазы был аналогичен распределению ZmНК1 и ViP, но был немного смещен в сторону более низкой плотности (рис. 37 D). Н⁺-АТФаза распределялась во фракциях еще более низкой плотности. Распределение ZmНК1 было смещено в сторону фракций более низкой плотности, когда плотностно-градиентное центрифугирование с сахарозой проводилось в отсутствие Mg²⁺, при этом условии ЭР-рибосомные комплексы диссоциируют (рис. 37 D). ViP в основном следовал этому сдвигу. Распределение Н⁺-АТФазы и Н⁺-ПФазы оставалось неизменным. В независимых экспериментах с использованием градиентного фракционирования сахарозы по плотности были получены практически идентичные результаты (рис. 38). Эти результаты подтверждают идею о том, что ZmНК преимущественно локализуется в мембране ЭР. Что касается листьев, ZmНК1 не был обнаружен при фракционировании мембраны в градиентах сахарозы (не показано), вероятно, из-за низкого уровня его экспрессии в клетках листьев.

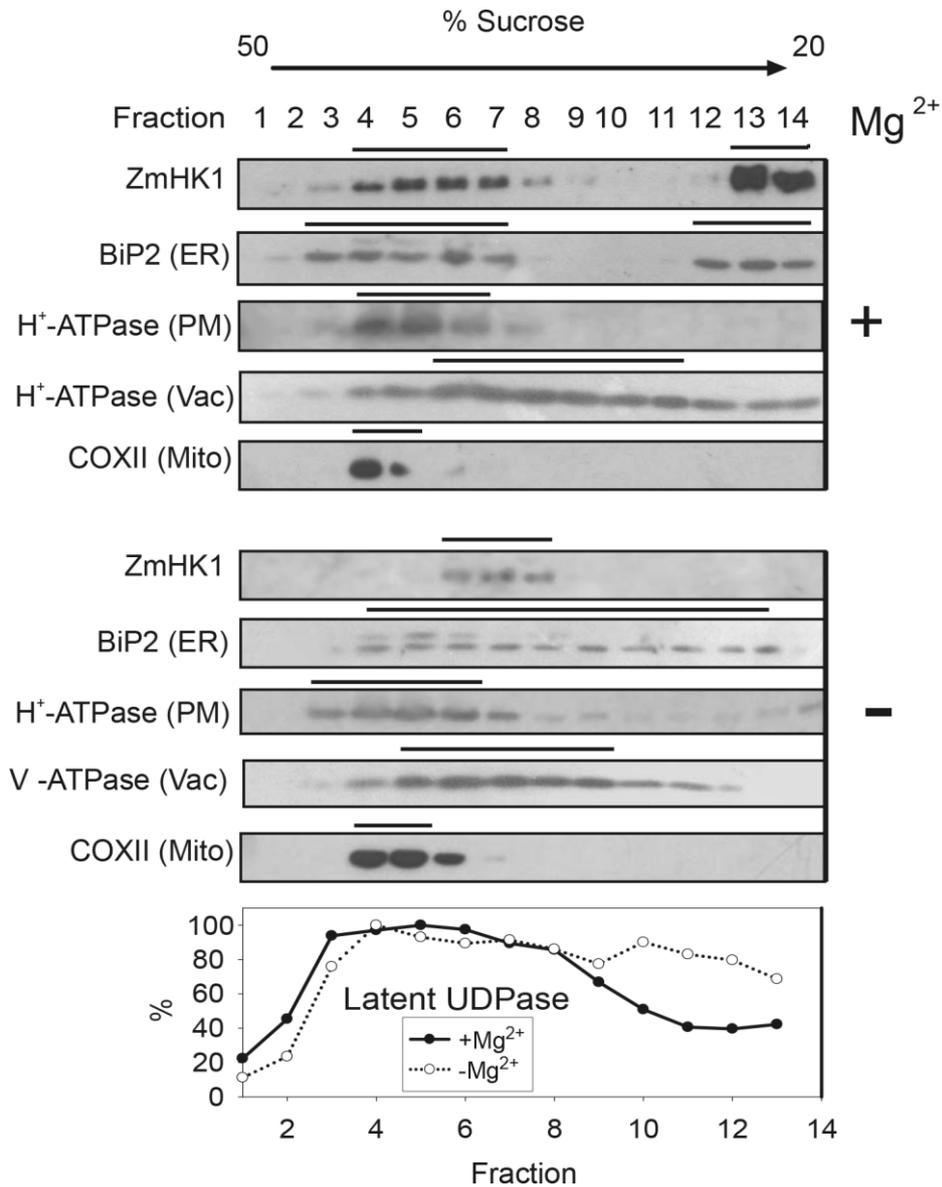


Рис. 38. Фракционирование мембран корней кукурузы с помощью плотностно-градиентного центрифугирования сахарозы. Микросомальные мембраны, полученные из корней кукурузы, были фракционированы 20-50% (w/w) градиентным центрифугированием сахарозы в присутствии (+) и отсутствии (-) 5 мМ MgCl₂. Фракции градиента подвергали SDS-PAGE и вестерн-блоттингу с использованием антител mAB-НК1, анти-H⁺-АТФазы (маркер РМ), анти-BiP2 (маркер ER), анти-V-АТФазы (маркер тонопласта) и антиСОХII (мембрана митохондрий). Латентная активность UDPase использовалась в качестве ферментативного маркера аппарата Гольджи.

3.3.2 Анализ субклеточной локализации рецепторов цитокининов арабидопсиса

3.3.2.1 Эндомембраны демонстрируют более высокое связывание цитокинина, чем ПМ

Чтобы получить представление о клеточном компартменте, содержащем рецепторы цитокинина у арабидопсиса, изолированные мембраны 6-дневных проростков арабидопсиса были разделены методом двухфазного разделения на фракцию ПМ и фракцию внутренних мембран (эндомембраны). Микросомы каждой фракции сохраняют интегральные белки, а также белки, ассоциированные с этими мембранами. Верхняя фракция (U3) была сильно обогащена маркером ПМ (H^+ -ATPase), в то время как нижняя фракция (L3) показала обогащение маркером ЭР Binding Protein 2 (BiP2; рис. 40 А). Анализ связывания цитокинина *in vitro* с микросомами показал специфическое связывание [3H]транс-зеатина (т.е. разницу между общим и неспецифическим связыванием) в обеих мембранных фракциях (рис. 40 В-Г). Количественный анализ этого связывания у растений дикого типа выявил высокоаффинное взаимодействие с равновесной константой диссоциации (K_D) в наномолярном диапазоне (рис. 40 В). Это сходно с K_D для транс-зеатин-рецепторных комплексов АНК3 и CRE1/АНК4 (Yamada et al., 2001; Romanov et al., 2005, 2006) и домена АНК2-CHASE-TM (Stolz et al., 2011), экспрессированного в бактериях. Лигандная специфичность связывания выделенных мембран (рис. 40 С) также хорошо соответствовала лигандной специфичности клонированных цитокининовых рецепторов арабидопсиса (Romanov et al., 2005, 2006; Stolz et al., 2011). Эти результаты подтверждают идею о том, что связывание цитокинина изолированными мембранами арабидопсиса обусловлено этими цитокининовыми рецепторами. Кроме того, листья табака (*Nicotiana benthamiana*), сверхэкспрессирующие слитый ген АНК3-GFP, показали сильное увеличение связывания цитокинина в их мембранных фракциях (рис. 39). В микросомах, выделенных из растений дикого типа, общее специфическое связывание цитокинина было примерно в четыре раза выше в эндомембранах, чем в ПМ (рис. 40 D).

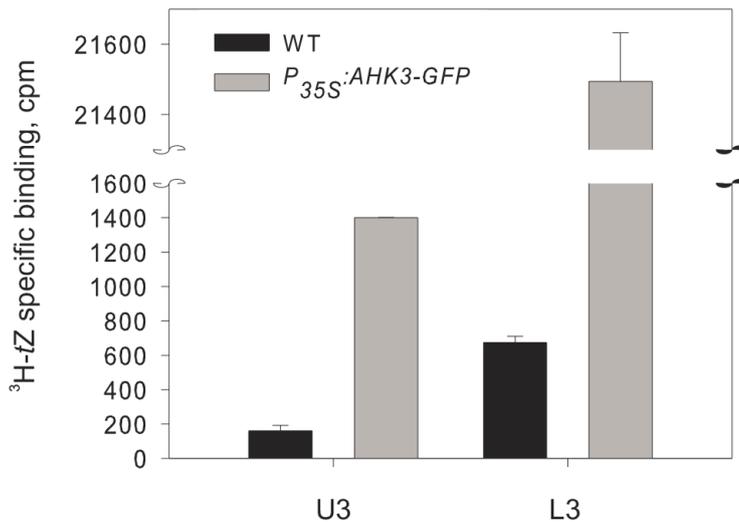


Рис. 39. Увеличение специфического связывания [³H]транс-зеатина микросомами, выделенными из листьев табака, трансформированных конструкцией *P*_{35S}:АНК3. Связывание [³H]транс-зеатина с различными фракциями мембран, полученными водным двухфазным разделением из *P*_{35S}:АНК3-GFP транзигентно трансформированных или нетрансформированных (WT) листьев *N. benthamiana*. Верхняя (U3) и нижняя (L3) фазы, полученные водным полимерным двухфазным разделением, обогащены плазматической мембраной и эндомембранами (ЭР и другими), соответственно.

Чтобы выяснить, характерно ли такое распределение активности связывания для отдельных цитокининовых рецепторов арабидопсиса, эксперимент был повторен со всеми тремя двойными рецепторными мутантами, каждый из которых сохранял только один цитокининовый рецептор (Riefler et al., 2006). Связывание цитокинина микросомами каждого из двойных мутантов было ниже, чем у дикого типа (рис. 40 D-G), что еще раз подтверждает решающую роль трех известных цитокининовых рецепторов в опосредовании этой связывающей активности. Мутанты, несущие только рецептор АНК3, сохранили самую высокую активность связывания (рис. 40 E) и показали явное преобладание связывания цитокинина с эндомембранами, аналогично дикому типу (рис. 40 D и E). Аналогичная картина

была выявлена и у мутанта *ahk3 cre1*, экспрессирующего АНК2 как единственный рецептор цитокинина (рис. 40 F). Напротив, мутантные растения *ahk2 ahk3*,

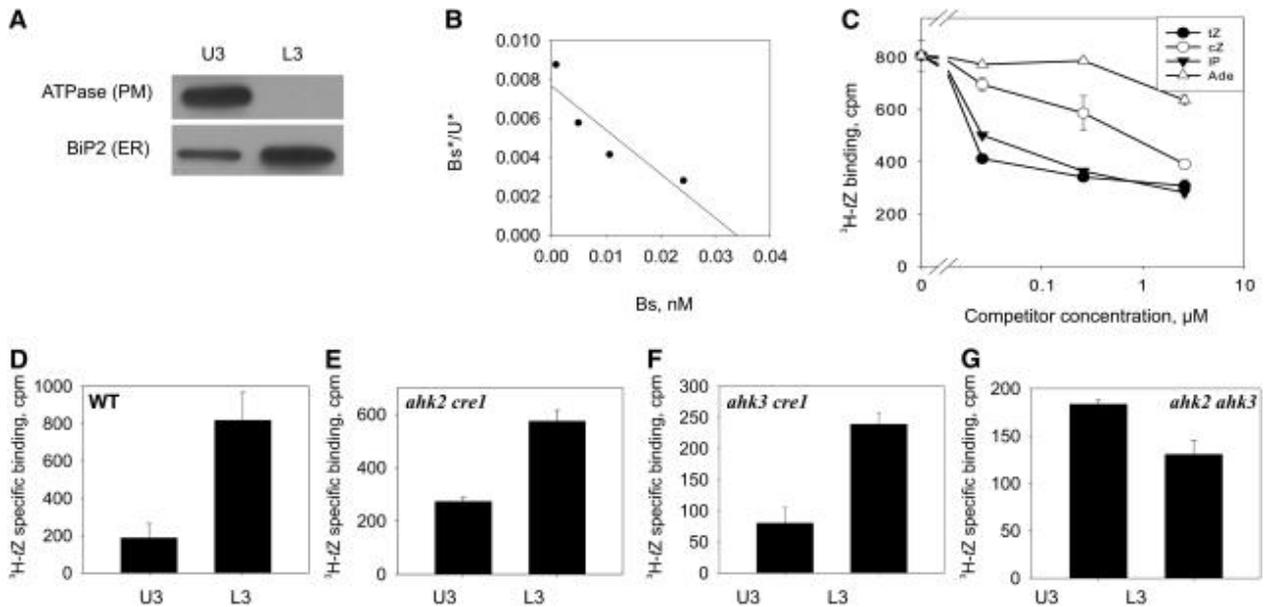


Рис. 40. Связывание цитокинина с различными мембранными фракциями, полученными методом водного двухфазного разделения. Для выделения мембран использовали шестидневные проростки арабидопсиса дикого типа и двойные мутанты по рецепторам цитокинина. А, детекция мембраноспецифических маркеров H^+ -АТФазы (PM) и BiP2 (ER) с помощью иммуноблот-анализа в верхней (U3) и нижней (L3) фазах. В, график в координатах Скэтчарда связывания [^3H]транс-зеатина с эндомембранами растений дикого типа. B_s^* - специфически связанный [^3H]транс-зеатин; U^* - несвязанный [^3H]транс-зеатин; B_s - общий связанный транс-зеатин (сумма меченого и немеченого). Вычисленная K_D составляет 4.7 нМ. С, Конкурентные эксперименты между [^3H]транс-зеатином и немечеными цитокининами за связывание с эндомембранами растений дикого типа. Данные представляют собой средние значения \pm SE ($n = 2$). *tZ* - транс-зеатин; *cZ* - цис-зеатин; *iP* - изопентениладенин; *Ade* - аденин. D - G, связывание [^3H]транс-зеатина с мембранными фракциями дикого типа (WT) и двойных рецепторных мутантов, как указано. U3 - верхняя фаза, обогащенная ПМ; L3 - нижняя фаза, обогащенная эндомембранами. Данные представляют собой средние значения \pm SE ($n = 2$) специфически связанного [^3H]транс-зеатина в срм на 100 мкг мембранного белка.

экспрессирующие *CRE1/АНК4*, демонстрировали несколько более высокое специфическое связывание во фракции РМ, чем во фракции, обогащенной эндомембранами (рис. 40 G). Однако, поскольку подавляющее большинство мембранных белков находится в эндомембранах (см. выше), в этом случае также более 90% цитокинин-связывающих сайтов находятся в эндомембранах. Тем не менее, этот результат следует воспринимать с осторожностью из-за общей очень низкой связывающей активности микросом, выделенных из этого двойного мутанта. Интересно, что сумма связывания цитокинина мембранами всех трех различных двойных рецепторных мутантов примерно соответствует активности связывания, измеренной у дикого типа (рис. 40 D-G). В целом, распределение цитокинин-связывающей активности у мутантов, сохранивших один рецептор, указывает на то, что все три цитокининовых рецептора арабидопсиса локализуются в основном на эндомембранах.

3.3.2.2 Рецепторы цитокинина, меченые флуоресцентными белками, демонстрируют преимущественную локализацию в ЭР

Двухфазное разделение показало преимущественное нахождение цитокинин-связывающих сайтов в эндомембранах, но не показало, в каком типе внутриклеточных мембран находятся цитокининовые рецепторы. Чтобы уточнить анализ их субклеточного распределения, мы соединили все три цитокининовых рецептора с GFP (Mathur, 2007). Эти слитые белки транзистентно экспрессировались под контролем промотора 35S в эпидермальных клетках листьев табака и анализировались с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Картина субклеточной локализации АНК3-GFP (рис. 41 А и С) была сходна со стой, что известна для ЭР-локализованных белков (Boevink et al., 1996, 1998; Batoko et al., 2000; Nelson et al., 2007). Это также подтверждалось сильным перинуклеарным сигналом для АНК3-GFP, который является отличительным признаком ЭР-локализации (рис. 41 D и E). Анализ перекрытия сигнала АНК3-GFP с сигналом от красителя FM4-64, окрашивающего ПМ, показал лишь ограниченное

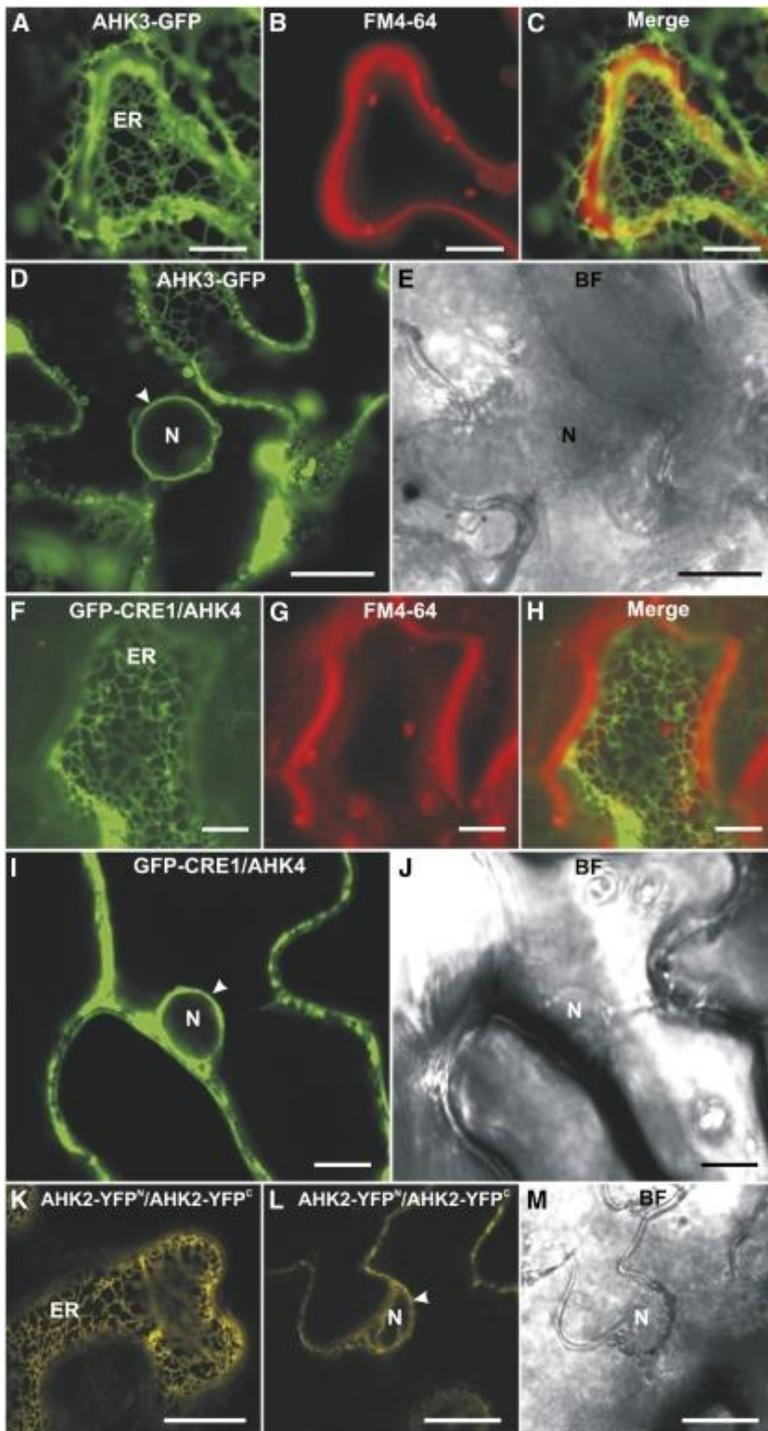


Рисунок 41. Локализация флуоресцентных белков, слитых с цитокининовыми рецепторами в эпидермальных клетках листьев табака. А, ЭР, меченный АНК3-GFP. В, Окрашивание ПМ с FM4-64 (50 мкМ). С, Объединенное изображение А и В. D, Локализация АНК3-GFP в перинуклеарном пространстве (конец стрелки). Е, Изображение в светлом поле (BF) D. F, ЭР, меченный GFP-CRE1/АНК4. G, Окрашивание ПМ с помощью FM4-64 (50 мкМ). H, Объединенное изображение F и G. I, Локализация GFP-CRE1/АНК4 в перинуклеарном пространстве (конец

стрелки). J, Изображение в светлом поле I. K, Анализ BiFC показывает образование гомодимеров АНК2-YFPN/АНК2-YFPC в ЭР. L, Гомодимеризация АНК2-YFPN и АНК2-YFPC в перинуклеарном пространстве (конец стрелки). M, изображение в светлом поле L. N, ядро. Бары = 7,5 мкм в F-H; 10 мкм в A-C, I и J; и 25 мкм в D, E, L и M.

совпадение сигналов, что указывает на то, что большая часть слитого белка АНК3-GFP локализуется не в ПМ, а в ЭР (рис. 41 A-C).

Белок GFP-CRE1/АНК4 показал такое же субклеточное распределение в клетках листьев табака, как и АНК3-GFP. GFP-CRE1/АНК4 образовывал ЭР-подобную сеть (рис. 41 F), также был обнаружен перинуклеарный сигнал (рис. 41 I и J). Окрашивание клеток маркером FM4-64 ПМ показало незначительное перекрытие с сигналом GFP-CRE1/АНК4 (рис. 41 G и H), что подтверждает его преимущественную локализацию в мембране ЭР.

В случае АНК2 ни N-, ни C-концевое слияние с GFP не привело к детектируемому сигналу *in planta*. Напротив, анализ бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) (Walter et al., 2004) для АНК2 привел к четкому сигналу, и эти данные могут быть использованы для анализа субклеточной локализации рецептора АНК2. Димер АНК2-Split-желтый флуоресцентный белок (YFP) образовывал ЭР-подобную внутриклеточную сеть (рис. 41 K), и для димера АНК2-Split-YFP также была обнаружена перинуклеарная локализация (рис. 41 L и M).

В целом, субклеточная локализация транзистентно экспрессированных флуоресцентных слитых белков подтверждает преимущественную локализацию в ЭР для всех трех цитокининовых рецепторов. Попытки создать трансгенные линии арабидопсиса, стабильно экспрессирующие гены рецепторов, слитые с GFP под контролем промотора 35S, не увенчались успехом. Ни одна из полученных трансгенных линий не показала детектируемого сигнала GFP, что указывает на отбор против высоких уровней экспрессии. Этот вывод согласуется с нашей неспособностью получить трансгенные линии, конститутивно экспрессирующие

гены рецепторов цитокинина, что, скорее всего, связано с клеточной токсичностью продуктов данных генов (данные не показаны).

3.3.2.3 Биохимическое фракционирование подтверждает ЭР-локализацию рецепторов цитокинина

Эксперименты по локализации на основе GFP не дают достаточных оснований для определения истинной субклеточной локализации данного белка, особенно эндомембранно-локализованных белков (Moore & Murphy, 2009). Для подтверждения результатов, полученных при слиянии флуоресцентных белков с целевыми, необходимо применять другие методы, поэтому была проведено изучение субклеточной локализаций Мус-меченых рецепторов цитокинина после фракционирования клеточных мембран (фракция микросом) центрифугированием в градиенте сахарозы. Функциональность слитых белков АНК2-Мус и АНК3-Мус была проверена путем трансформации мутантных растений *ahk2 ahk3*, которые демонстрируют выраженный фенотип, включая маленький размер розетки листьев, который наблюдается при одновременной мутации обоих генов рецепторов (Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Riefler et al., 2006). Трансформированные растения, экспрессирующие химерные $P_{АНК3}:АНК3-Мус$ или $P_{АНК2}:АНК2-Мус$, показали комплементарную фенотипа мутанта *ahk2 ahk3* (рис. 42), демонстрируя функциональность обоих слитых белков АНК-Мус. Далее были проанализированы две независимые трансгенные линии, экспрессирующие слитые гены. Экспрессия $P_{CRE1}:CRE1/АНК4-Мус$ не может быть проверена этим тестом на комплементарность. Кроме того, уровень экспрессии гена $P_{CRE1}:CRE1/АНК4-Мус$ был слишком низким для надежного обнаружения меченого рецепторного белка, что согласуется с низкой цитокинин-связывающей активностью микросом из мутанта *ahk2 ahk3* (рис. 40 G; данные не показаны). Поэтому трансгенные растения $P_{CRE1}:CRE1/АНК4-Мус$ не были включены в данное исследование.

Сначала были выделены мембраны 6- и 18-дневных растений $P_{АНК3}:АНК3-Мус$ и 6-дневных трансгенных растений $P_{АНК2}:АНК2-Мус$ и фракционированы методом двухфазного разделения. Иммуноблоты показали ожидаемое распределение связанной с ПМ H^+ -АТФазы и маркера ЭР ViP2 во фракциях U3 и L3, соответственно

(рис. 43 А, 44 А и 45 А). Большая часть обоих меченых рецепторов, АНК3-Мус и АНК2-Мус, была обнаружена во фракции L3 (рис. 43 А, 44А и 45А), что подтверждает эндомембранную локализацию этих двух цитокининовых рецепторов.

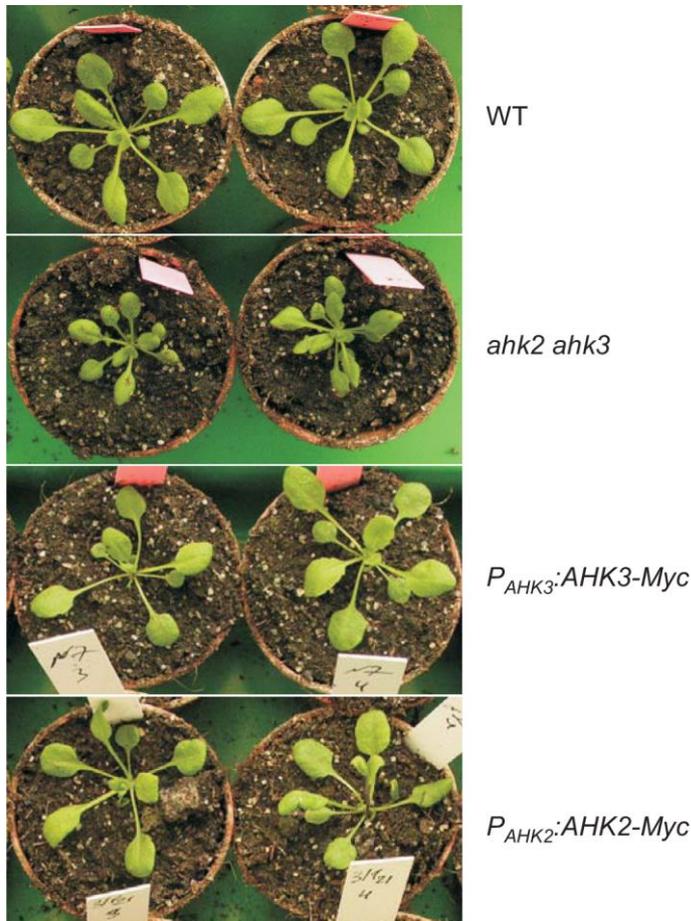


Рис. 42. Компенсация фенотипа розетки мелких листьев у мутантов *ahk2 ahk3* при трансформации генными конструкциями $P_{АНК3}:АНК3-Мус$ или $P_{АНК2}:АНК2-Мус$. Показаны два Т1 растения возрастом 23 дня.

Для более точного определения внутриклеточной мембранной фракции (фракций), в которой локализуются АНК3-Мус и АНК2-Мус, микросомальная фракция была дополнительно разделена в градиенте плотности сахарозы в присутствии или отсутствии ионов Mg^{2+} . Этот подход обоснован тем, что связывание рибосом с ЭР зависит от присутствия ионов Mg^{2+} (Lord, 1987). В отсутствие ионов Mg^{2+} (например, если в буфере присутствуют хелаторы, такие как ЭДТА), высвобождение рибосом из ЭР снижает плотность мембраны ЭР и, таким образом, приводит к сдвигу его положения в градиенте сахарозы. В отличие от этого, на плотность других органелл ионы Mg^{2+} существенно не влияют. Маркерные белки,

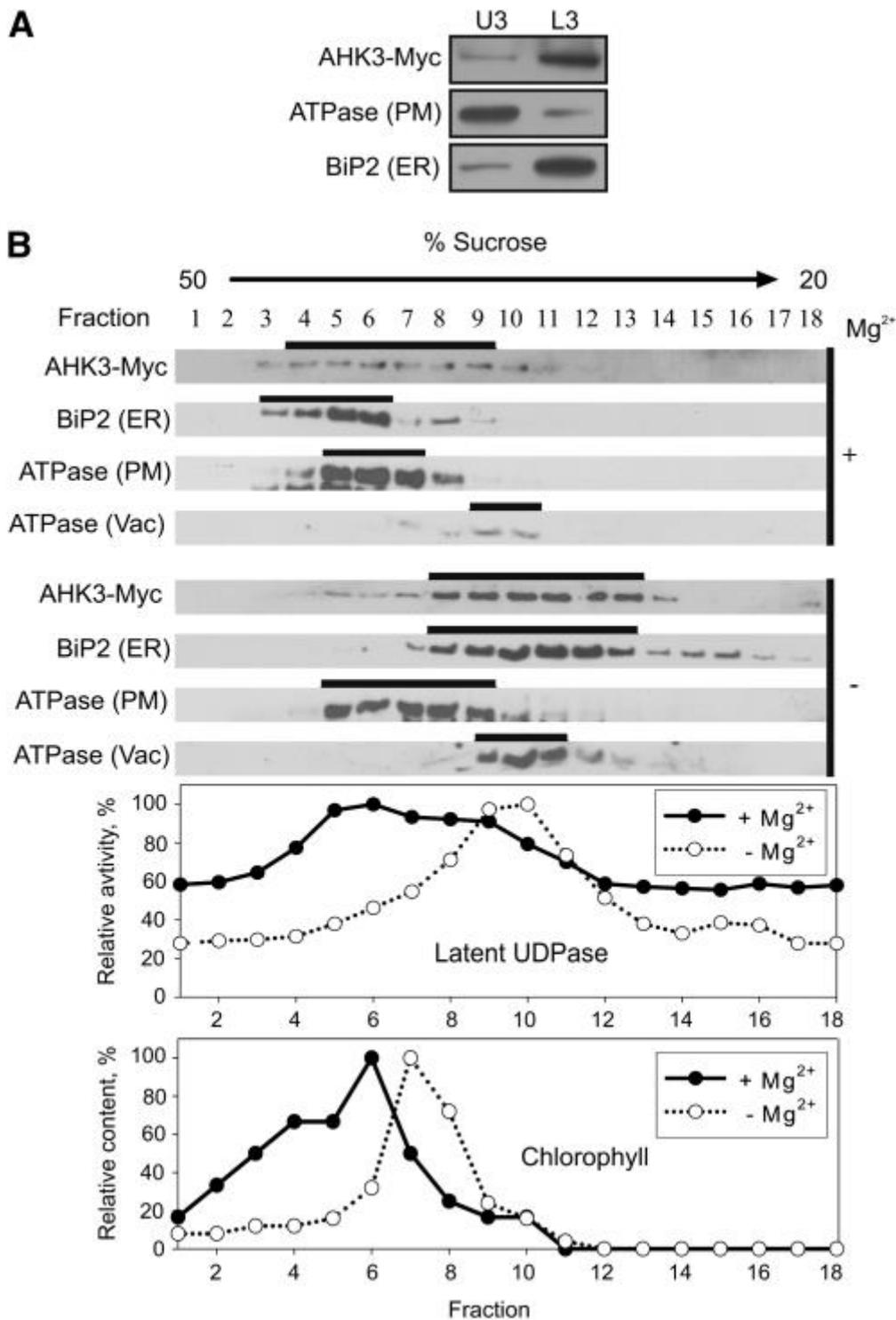


Рисунок 43. Локализация АНК3-Мус во фракционированных мембранах 6-дневных проростков арабидопсиса, экспрессирующих *P_{АНК3}:АНК3-Мус*. А, Водное двухфазное разделение микросом. Равные количества белка из верхней (U3) и нижней (L3) фаз разделяли с помощью SDS-PAGE и подвергали иммуноблот-анализу с использованием антител, специфичных для Мус, H⁺-АТФазы (PM) и BiP2 (ER). В. Микросомальные мембраны фракционировали на линейных градиентах сахарозы от 20% до 50% (w/w) в присутствии Mg²⁺ (+) для стабилизации рибосом в

ЭР или в отсутствие Mg^{2+} (-) для диссоциации рибосом из ЭР. Образцы (50-100 мкл) каждой фракции анализировали методом иммуноблота с использованием антител, специфичных для Мус, H^+ -АТФазы, $ViP2$ и V -АТФазы (V_{ac} - маркер мембраны вакуоли). Активность латентной $UDPase$ использовалась в качестве ферментативного маркера аппарата Гольджи, а хлорофилл - для локализации мембран тилакоидов. В обоих случаях наибольшая измеренная активность фермента (A650) и содержание хлорофилла (A652) были приняты за 100%.

принадлежащие к различным типам мембран, были обнаружены методом иммуноблотинга.

Для изучения внутриклеточного распределения АНК3-Мус в качестве исходного материала использовали 6-дневные проростки арабидопсиса и побеги 18-дневных растений (рис. 43 и 44). Положение мембраносвязанной фракции маркера ЭР $ViP2$ было четко смещено при убиении ионов Mg^{2+} из буфера для экстракции, в то время как картина, полученная для маркеров ПМ и вакуолярной мембраны, в значительной степени не зависела от присутствия ионов Mg^{2+} (рис. 43 В и 44 В). Поглощение хлорофилла, измеренное в качестве маркера тилакоидных мембран хлоропластов, также не показало характерного Mg^{2+} сдвига $ViP2$. Положение АНК3-Мус в градиенте было аналогично положению $ViP2$, поскольку он демонстрировал четкий сдвиг при удалении из буфера Mg^{2+} . Положение в градиенте латентной $UDPase$, фермента-маркера аппарата Гольджи, также зависело от Mg^{2+} , но ее положение и распределение пиков во фракциях менее хорошо коррелировали с положением АНК3-Мус и $ViP2$, что особенно заметно на 18-дневных побегах (рис. 44 В). Цитохром С оксидаза субъединица II (СОХII), маркер митохондрий, и ADP-рибозилирующий фактор1 (Arf1), маркер сети транс-Гольджи, также были протестированы в этом материале. Позиции этих маркеров лишь незначительно смещались в сторону фракций с более низкой концентрацией сахарозы в буфере без Mg^{2+} (рис. 44 В). В целом, поведение белков, выделенных из 6-дневных проростков и побегов 18-дневных растений, было качественно сходным,

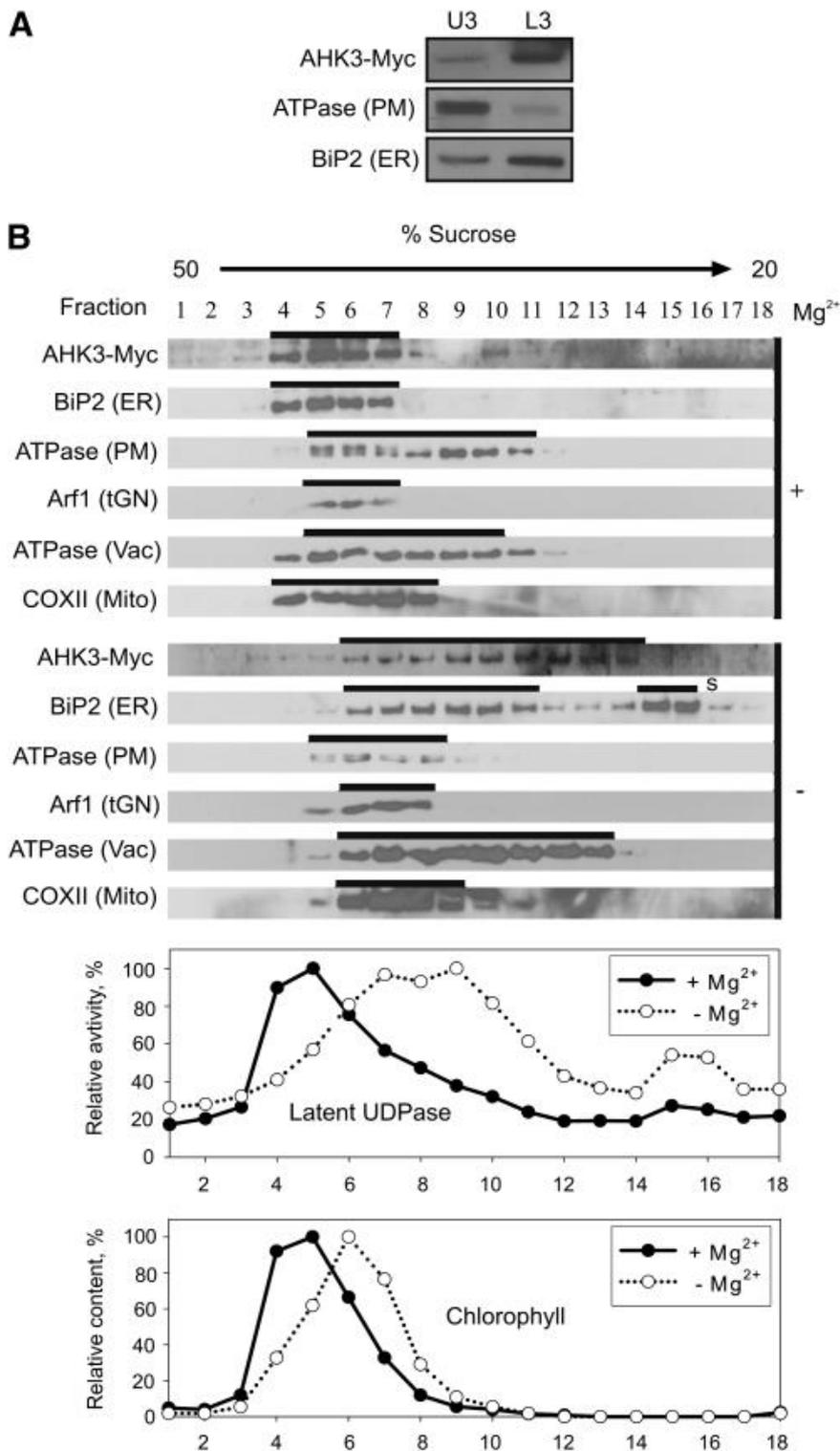


Рис. 44. Локализация АНК3-Мус во фракционированных мембранах из побегов 18-дневных растений арабидопсиса, экспрессирующих $P_{АНК3}:АНК3-Мус$. А, Водное двухфазное разделение микросом. Равные количества белка из верхней (U3) и нижней (L3) фаз разделяли с помощью SDS-PAGE и подвергали иммуноблот-анализу с использованием антител, специфичных для Мус, H^+ -АТФазы (PM) и BiP2 (ER). В. Микросомальные мембраны фракционировали на линейных градиентах

сахарозы от 20% до 50% (w/w) в присутствии Mg^{2+} (+) для стабилизации рибосом в ЭР или в отсутствие Mg^{2+} (-) для диссоциации рибосом из ЭР. Образцы (50-100 мкл) каждой фракции анализировали методом иммуноблота с использованием антител, специфичных для Мус, H^+ -АТФазы, $ViP2$, V -АТФазы (Vac - маркер мембраны вакуолей), $Arf1$ (tGN - маркер сети транс-Гольджи) и $COXII$ ($Mito$ - маркер митохондрий). Активность латентной $UDPase$ использовалась в качестве ферментативного маркера аппарата Гольджи, а хлорофилл использовался для локализации мембран тилакоидов. В обоих случаях наибольшая измеренная активность фермента (A650) и содержание хлорофилла (A652) были приняты за 100%. S - свободнорастворимый $ViP2$, который высвободился во время обработки и остался в верхней части градиента.

что указывает на то, что локализация АНК3-Мус в ЭР не зависит от возраста растений.

Исследование локализации АНК2-Мус дало аналогичные результаты. После фракционирования в градиенте сахарозы в присутствии или отсутствии ионов Mg^{2+} был обнаружен диагностический сдвиг положения АНК2-Мус, который напоминал таковой для мембранной фракции $ViP2$. Маркеры других мембран показали гораздо более слабый сдвиг в отсутствие ионов Mg^{2+} (рис. 45 В) и/или их положения в градиенте не коррелировали с положением АНК2-Мус.

3.3.3 Субклеточная локализация рецепторов картофеля

Мы идентифицировали шесть рецепторов цитокинина у тетраплоидного сорта картофеля *Désirée*: $StHK2a$, $StHK2b$, $StHK3a$, $StHK3b$, $StHK4a$ и $StHK4b$. Целью нашей работы было установить субклеточную локализацию цитокининовых рецепторов картофеля на примере $StHK2a$ и $StHK4b$. В каждой паре паралогов (а и б) рецепторы очень похожи друг на друга. Поэтому мы ограничились характеристикой одного представителя каждой из этих двух групп. Что касается рецепторов группы $StHK3$, то здесь возникли проблемы с обнаружением связывания лиганда при экспрессии в гетерологичных системах. Гены анализируемых рецепторов были соединены в векторе с геном флуоресцентного белка GFP, что

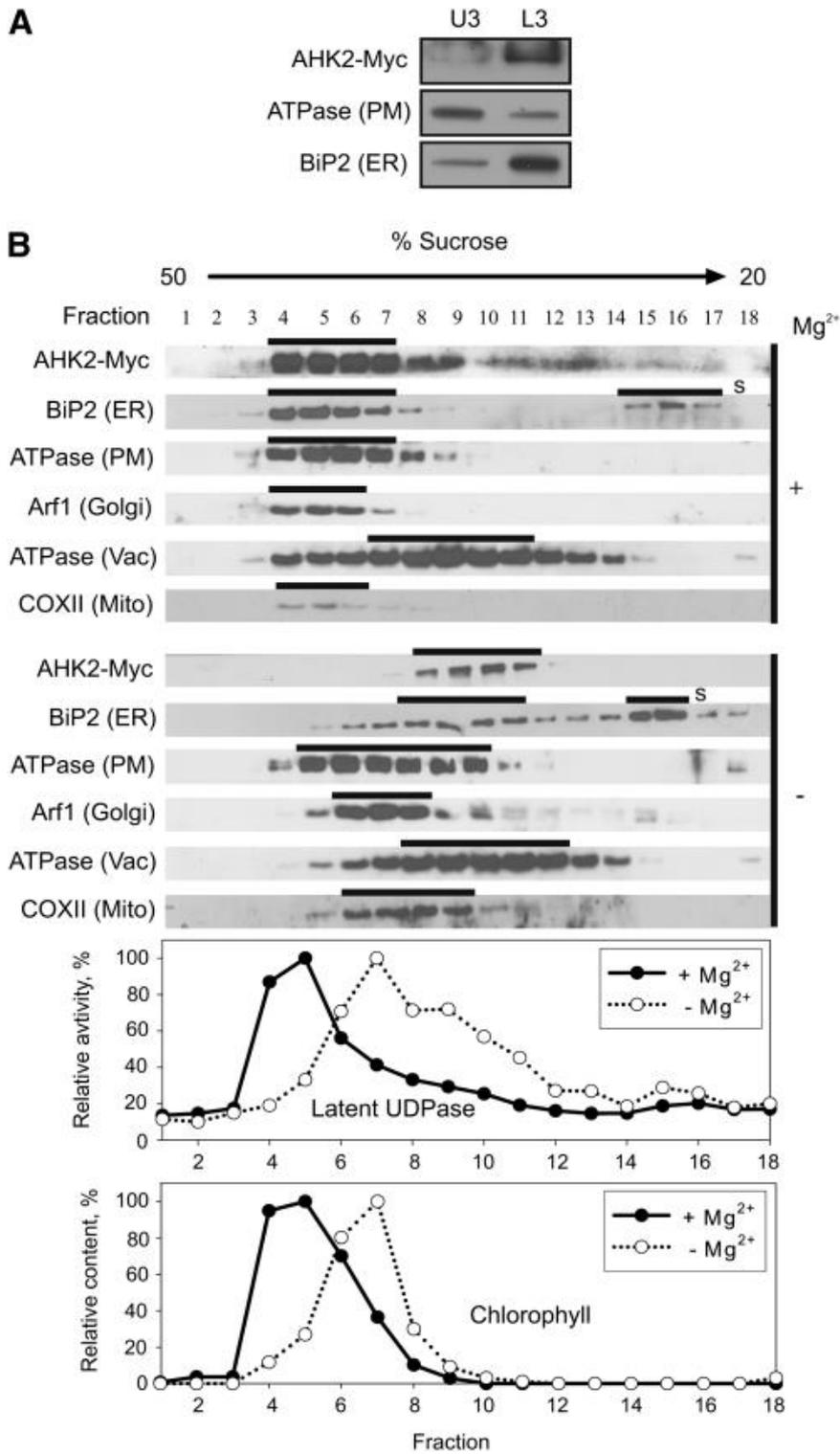


Рис. 45. Локализация АНК2-Мус во фракционированных мембранах проростков арабидопсиса, экспрессирующих Р_{АНК2}:АНК2-Мус. А, Водное двухфазное разделение микросом из 6-дневных проростков. Равные количества белка из верхней (U3) и нижней (L3) фаз были разделены SDS-PAGE и подвергнуты иммуноблот-анализу с использованием антител, специфичных для Мус, Н⁺-АТФазы (PM) и BiP2 (ER). Б, Микросомальные мембраны из побегов 18-дневных растений

фракционировали на линейных градиентах 20%-50% (w/w) сахарозы в присутствии Mg^{2+} (+) для стабилизации рибосом в ЭР или в отсутствие Mg^{2+} (-) для диссоциации рибосом из ЭР. Образцы (50-100 мкл) каждой фракции анализировали методом иммуноблота с использованием антител, специфичных для Muc, H^+ -АТФазы, BiP2, V-АТФазы (Vac, маркер мембраны вакуолей), Arf1 (Golgi, маркер сети транс-Гольджи) и COXII (Mito, маркер митохондрий). Активность латентной UDPase использовалась в качестве ферментативного маркера аппарата Гольджи, а хлорофилл использовался для локализации мембран тилакоидов. В обоих случаях наибольшая измеренная активность фермента (A650) и содержание хлорофилла (A652) были приняты за 100%. S - свободнорастворимый BiP2, который высвободился во время обработки и остался в верхней части градиента.

позволило оценивать экспрессию таких рекомбинантных рецепторов по уровню флуоресценции. Гены рецепторов были транзистентно экспрессированы в листьях табака *N. benthamiana*. На пятый день после инокуляции листьев соответствующим клоном *A. tumefaciens* уровень экспрессии оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Затем из экспрессирующих листьев выделяли общую мембранную фракцию путем дифференциального центрифугирования. Мембраны представляли собой осадок микросом, полученный центрифугированием при 100000 г. Выделенные микросомы разделяли на фракции, предположительно обогащенные ПМ или эндомембранами, используя двухфазную водную полимерную систему декстран-полиэтиленгликоль. Затем мембраны концентрировали путем повторного ультрацентрифугирования. По общему количеству в пересчете на общий белок фракция, соответствующая внутриклеточным мембранам, преобладала над фракцией ПМ в среднем в 10-15 раз. Степень фактического обогащения фракций мембран ПМ и ЭР определяли методом иммуноблотинга с использованием антител против плазмалеммы H^+ -АТФазы и резидентного шаперонного белка BiP. По данным иммуноблотинга, плазмалемма H^+ -АТФаза ожидаемо преобладала в верхней фракции, а BiP - в нижней (рис. 46).

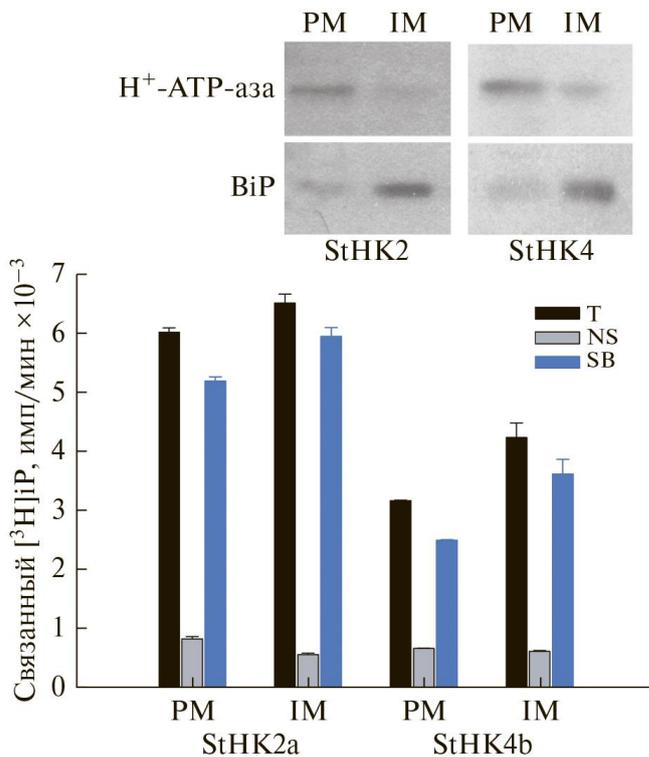


Рис. 46. Связывание меченого цитокинина [³H]iP фракциями мембран табака *N. benthamiana* в результате экспрессии рецепторов цитокининов картофеля StHK2a и StHK4b. T, NS и SB обозначают тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно; PM – плазматическая мембрана; IM –внутриклеточные мембраны. Вверху показано распределение специфических маркеров ПМ (H⁺-АТФ-аза) и ЭР (BiP) в полученных фракциях мембран

По нашим оценкам, во фракциях, обогащенных ПМ, содержание H⁺-АТФазы было в 3,1 и 2,4 раза выше, чем во фракции внутриклеточных мембран в экспериментах с рецепторами StHK2a и StHK4b соответственно, тогда как во фракциях, обогащенных внутриклеточными мембранами, преобладал маркер BiP (в 3,7 и 2,7 раза в экспериментах с рецепторами StHK2a и StHK4b соответственно). Наличие цитокининовых рецепторов в мембранных фракциях оценивали по уровню специфического связывания с меченым тритием изопентениладенином. Присутствием эндогенных рецепторов табака можно было пренебречь, поскольку их специфическое связывание не превышало 5% от общего уровня специфически связанной метки. Исследуемые рецепторы картофеля были обнаружены в обеих мембранных фракциях (рис. 46). В случае рецептора StHK2a его удельное

содержание (на 1 мкг белка) во фракциях было примерно одинаковым, тогда как содержание StHK4b было заметно выше в ЭР, чем в ПМ. Известно, что основная часть внутренних клеточных мембран относится к мембранам ЭР, поэтому естественно было ожидать присутствия рецепторов именно в ретикулуме. На это указывали и полученные ранее данные конфокальной микроскопии и градиента сахарозы для рецепторов в арабидопсисе, кукурузе, рисе (Ding et al., 2017) и яблоне (Daudu et al., 2017). Оба рецептора, по-видимому, присутствуют как в ЭР, так и в ПМ, причем специфичность StHK4b к ЭР несколько выше. Однако, поскольку в общем пуле микросом преобладают внутренние мембраны (т.е. ЭР), получается, что основная масса цитокининовых рецепторов картофеля находится на мембранах ЭР

Следует отметить, что эктопическая экспрессия рецептора под конститутивным промотором в принципе может привести к артефактной локализации рецепторов в ЭР. Чтобы проверить эту возможность, мы провели аналогичное двухфазное разделение нативных мембран, выделенных из нетрансгенных зрелых тетраплоидных растений картофеля (сорт Жуковский ранний). Содержание рецепторов в полученных фракциях оценивали количественно по связыванию [³H]iP-меченного цитокинина. Специфическое связывание метки, характеризующее наличие эндогенных цитокининовых рецепторов, было зарегистрировано в микросомах корней, но не листьев (рис. 47). Это качественно согласуется с низким уровнем специфического связывания цитокинина микросомами из листьев интактных растений табака и кукурузы, причем в последнем случае наблюдается высокое специфическое связывание меченого цитокинина мембранами корней, в отличие от листьев.

Результаты количественных определений связывания [³H]iP мембранами корней картофеля представлены на рис. 47. Из рисунка следует, что эндогенные рецепторы картофеля локализованы на мембранах обеих фракций, причем специфическое связывание гормона фракцией ПМ в 1,8 раза выше, чем фракцией ЭР. Однако расчеты, проведенные с учетом степени гомогенности (чистоты) полученных фракций и соотношения их количества, привели к выводу, что

большинство цитокининовых рецепторов в клетках корней картофеля все же находится в ЭР. Таким образом, данные, полученные на интактных корнях картофеля, качественно вполне согласуются с результатами, полученными при транзientной экспрессии рецепторов картофеля в листьях табака.

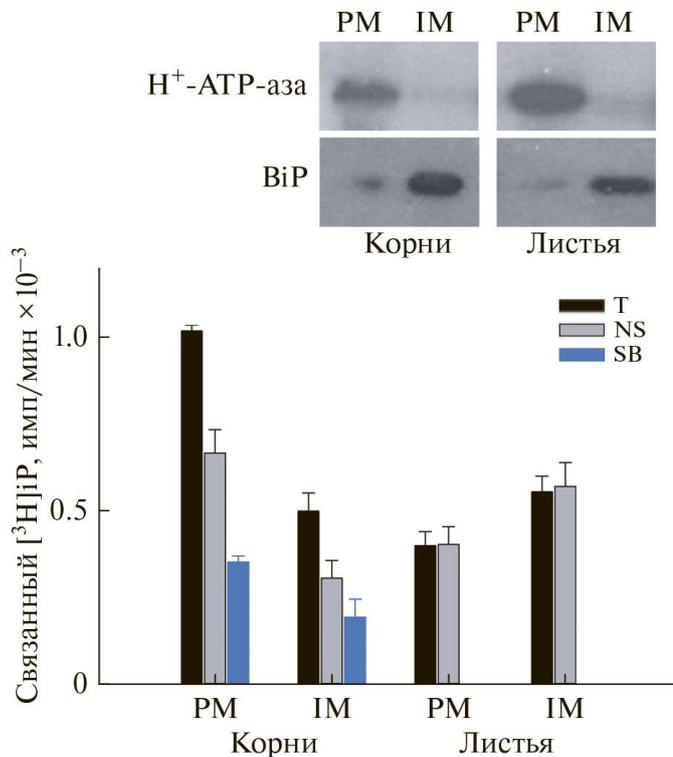


Рис. 47. Связывание меченого цитокинина [³H]iP фракциями мембран из корней и листьев зрелых растений картофеля. Обозначения те же, что на рис. Шв-1.

3.3.4 Новый подход для количественной оценки разделения мембранных белков между различными клеточными мембранами

Для подтверждения правильности разделения мембран в водной полимерной двухфазной системе (ATPS) обычно используется Вестерн-блоттинг с антителами против мембраноспецифических маркеров (для ПМ и любой ЭМ) (<https://www.agrisera.com/en/info/about-agrisera-.html>). Очевидная разница в рисунке полос между верхней и нижней фазами традиционно считается достаточной, хотя строгие критерии отсутствуют. Маркерные белки обладают практически абсолютной специфичностью к одному типу мембран, поэтому их распределение между фазами, полученными с помощью ATPS, точно соответствует распределению

мембран-мишеней. В отличие от этого, локализация некоторых других мембранных белков часто не ограничивается одной мембраной (Lewin et., 2007; Sadler et al., 2016), а распределяется между двумя типами мембран, обычно ПМ и эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). В таком случае точная оценка содержания целевого белка в соответствующих мембранах затруднена из-за неполного разделения фаз. Насколько нам известно, математика еще не использовалась для корректировки смещения в распределении интересующего белка (белков) между различными мембранами.

С целью разработки соответствующего метода мы создали математический инструмент для количественного анализа локализации белков, обитающих в двух различных клеточных мембранах. В связи с относительной простотой APTS, дающей только две фракции мембранных везикул, был разработан достаточно простой алгоритм. Этот алгоритм направлен на количественную оценку скорректированного на смещение разделения целевого белка между ПМ и любой из эндомембран.

3.3.4.1 Метод для пересчета

На рис. 48 схематично показаны типичные для APTS этапы получения исходных данных, необходимых для последующей обработки данных. Разделенные фазы содержат все типы мембран, но в разных пропорциях. Содержание конкретной мембраны в каждой фазе (фракции) отражается специфическими маркерными белками. Сравнительные уровни интенсивности полос маркерных белков при геле-электрофорезе могут быть оценены с помощью Вестерн-блот сканирования. Сканы затем могут быть оцифрованы с помощью программы ImageJ. Общее количество мембран в каждой из полученных фракций может быть определено путем измерения содержания белка (Walker, 2002). При изучении индивидуального рецепторного белка его содержание в обеих фракциях может быть определено количественно с помощью анализа связывания радиолиганда. Альтернативно, содержание целевого белка может быть количественно определено с помощью иммуноблоттинга или флуоресцентной метки. Эти исходные данные необходимы и достаточны для расчета

истинных значений относительного содержания исследуемого белка на единицу массы конкретных типов мембран.

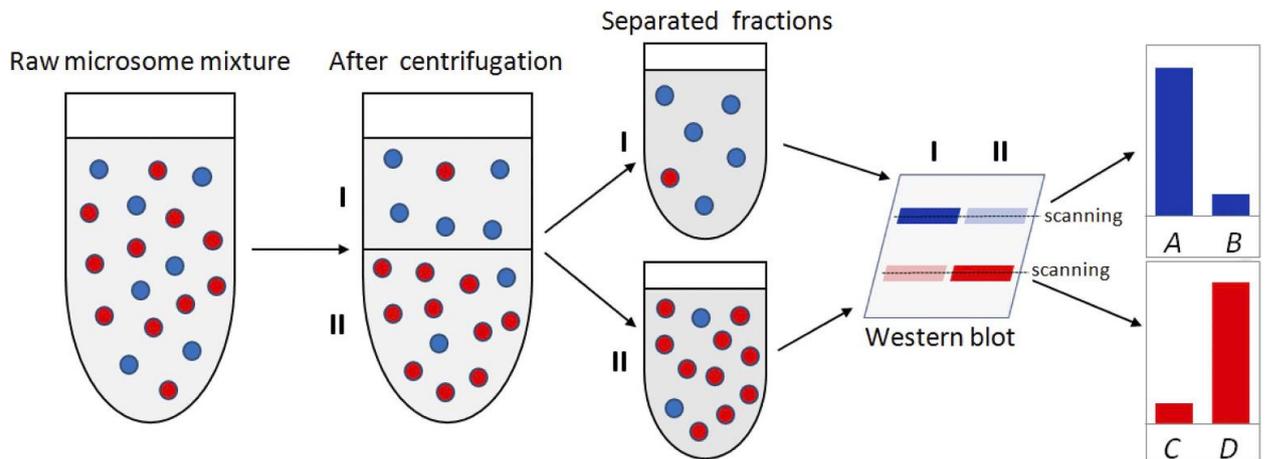


Рис. 48. Общая схема процедуры ATPS, начиная с начального этапа определения общего количества микросом до определения относительного содержания (параметры A, B, C и D в уравнении (1)) мембран 1 (синий) и 2 (красный) в выделенных фазах (фракциях) I и II. Мембраны 1 и 2 представляют ПМ и ЭМ, соответственно. Для Вестерн-блоттинга следует использовать равные количества микросомальных белков. В данном случае соотношение загрязнений было выбрано одинаковым (1:5) для обеих фракций.

Ниже приводится предлагаемый алгоритм определения удельного содержания (в условных единицах) интересующего белка в двух соответствующих мембранах, а также скорректированное на смещение отношение между содержаниями целевых белков в одной паре мембран. Рассмотрим изолированные мембраны, несущие выбранный белок (P). Для простоты мы ограничили вариабельность мембранных фракций только двумя преобладающими типами мембран, m_1 и m_2 . Микросомы m_1 имитируют ПМ и накапливаются в основном в верхней фазе (фракция I) при центрифугировании, предусмотренном в ATPS. Микросомы m_2 имитируют эндоплазматический ретикулум (ЭР) и накапливаются в основном в нижней фазе (фракция II) (рис. 48). Загрязняющие микросомы также представлены в обеих фазах. Таким образом, общее количество интересующего нас белка, P_{tot} , представляет собой сумму белков, содержащихся во всех фракциях I и II ($\Sigma P_{Fr1} + \Sigma P_{Fr2}$). В то же время P_{tot} - это сумма белков, вошедших во все мембраны

обоих типов ($\Sigma P_{m1} + \Sigma P_{m2}$). Предположим, что количество целевого белка, распределенного между мембранами $m1$ и $m2$ во фракции АТРС, было оценено, как указано выше, т.е. как сумма белков, зафиксированных в преобладающих мембранах плюс в загрязняющих. Для этих двух фракций содержание целевого белка на единицу массы мембраны может быть выражено в виде системы линейных уравнений:

$$\begin{cases} P_{Fr1} = AP_{m1} + CP_{m2} \\ P_{Fr2} = BP_{m1} + DP_{m2} \end{cases} \quad (1)$$

где P_{Fr1} , P_{Fr2} - содержание целевого белка на единицу массы фракции I или II, соответственно; P_{m1} , P_{m2} - содержание целевого белка на единицу массы микросом $m1$ или $m2$, соответственно. А - доля маркера $m1$ во фракции I [$m1/(m1 + m2)$], В - аналогичная доля маркера $m1$ во фракции II, С - доля маркера $m2$ во фракции I, D - доля маркера $m2$ во фракции II. Коэффициенты А, В, С и D определяются путем сканирования вестерн-блота, как показано на рис. 48.

Решение системы уравнений (1) приводит к формулам (2) и (3), направленным на расчет концентрации целевого белка в выбранных мембранах (т.е. количество целевого белка на единицу массы отдельной мембраны). формула (4) дает скорректированные значения отношения P_{m2}/P_{m1} .

$$P_{m1} = \frac{CP_{Fr2} - DP_{Fr1}}{BC - AD} \quad (2)$$

$$P_{m2} = \frac{AP_{Fr2} - BP_{Fr1}}{AD - BC} \quad (3)$$

$$P_{m2}/P_{m1} = \frac{AP_{Fr2} - BP_{Fr1}}{DP_{Fr1} - CP_{Fr2}} \quad (4)$$

3.3.4.2 Конкретные примеры применения алгоритма пересчета

На основе формул (2)-(4) мы провели расчеты, используя свои данные текущие и из некоторых опубликованные данные АТРС, где вестерн-блоты маркерных и целевых белков были четко отображены. Типичные результаты приведены в таблице 15.

Таблица 15. Сравнительная количественная оценка содержания целевых белков в клеточных мембранах m1 (P_{m1}) и m2 (P_{m2}), фракционированных в ATPS.

Target protein(s) ^a	Species (source) ^a	Detection ^a	P_{m1} (in PM) ^a	P_{m2} (mostly in ER) ^a	P_{m2}/P_{m1} ^a
АНК2	Arabid. (seedl.)	WB	15.9	ER 81.6	5.1 (2.4)
АНК3	Arabid. (seedl.)	WB	6.5	ER 70.2	10.9 (3.9)
АНК3	Arabid. (seedl.)	Lb	17.3	ER 830.6	49 (2.1)
АНК4	Arabid. (seedl.)	Lb	127.0	ER 187.3	1.5 (0.7)
StHK2	Potato, NBL	Lb	208.4	ER 240.6	1.2 (1.1)
StHK4	Potato, NBL	Lb	79.8	ER 169.3	2.1 (1.4)
CK receptors	Potato (root)	Lb	19.0	ER 7.7	0.4 (0.5)
ZmHK1	Maize (root)	WB	14.0	ER 46.9	3.4 (2.5)
ABCG14	Arabid. (seedl.)	WB	41.1	TP 0.3	0.006 (0.01)
ETR1	Arabid. (seedl.)	WB	- 2.8	ER 78.9	100% ER (6.4)
CmERS1	Melon (leaf)	WB	- 3.2	ER 42.7	100% ER (44.3)
BAK1	Arabid. (leaf)	WB	29.0	ER 71.8	2.5 (2.6)
BAK1	Same + BTH	WB	71.0	ER 28.2	0.4 (0.5)
FLS2	Arabid. (leaf)	WB	67.8	ER 83.7	1.24 (1.23)
FLS2	Same + BTH	WB	104.5	ER 55.7	0.53 (0.48)

а) Сокращения: ЦК - цитокинин, Arabid. - *Arabidopsis*, seedl. - проросток; BTH - бензотиадиазол, NBL - транзистентная экспрессия в листьях *Nicotiana benthamiana*, Lb - анализ связывания лиганда, WB - Вестерн-блоттинг, PM - плазматическая мембрана, ER - эндоплазматический ретикулум, TP - тонопласт. Содержание двух наиболее важных колонок выделено жирным шрифтом. В последнем столбце в круглых скобках приведены значения того же соотношения, но полученные без использования предложенной формулы.

В упомянутых работах, где использовалось разделение мембран на основе ATPS (Таблица 15), авторы смогли дать приблизительную оценку субклеточного распределения мембранного белка (белков). Однако возникает вопрос, является ли это распределение истинным или смещенным из-за неполного разделения мембран? Мы ответили на эти вопросы, используя разработанные формулы (2)-(4). В таблице 15 (последняя колонка) приведены значения коэффициентов распределения белков между двумя мембранами, рассчитанные с использованием (жирным шрифтом) или без использования (в скобках) предложенного инструмента. В частности, были количественно оценены межмембранные распределения цитокининовых рецепторов АНК2, 3 и 4, умеренно экспрессируемых в проростках арабидопсиса. Оказалось, что удельное содержание рецептора АНК4 в мембранах ЭР лишь в 1,5

раза выше, чем в ПМ. Рецепторы АНК2 и особенно АНК3 были связаны с ЭР гораздо сильнее: Значения P_{m2}/P_{m1} для этих рецепторов варьировали от 5,1 до 49, в зависимости также от метода, использованного для количественной оценки содержания рецепторов (табл. 15). В нетрансгенных проростках кукурузы концентрация рецептора ZmНК1 в ЭР была в 3,4 раза выше, чем в ПМ. Эксперименты с отдельными рецепторами картофеля StНК2 и StНК4 дали схожие результаты: при транзientной экспрессии в листьях табака под конститутивным промотором эти рецепторы показали картину, смещенную в сторону ЭР (табл. ПС-1). Однако, по данным общего связывания цитокинина нетрансгенными микросомами картофеля, содержание агрегированных цитокининовых рецепторов в ЭР составляло лишь 40% от их уровня в ПМ.

Некоторые из анализируемых белков характеризовались равномерной локализацией. Практически все (>99%) цитокининовые транспортеры ABCG14 обитают в ПМ (Zhang et al., 2014) против предполагаемых участков в тонопласте. Напротив, естественно экспрессированные этиленовые рецепторы арабидопсиса ETR1 (Chen et al., 2002) и дыни CmERS1 (Ma et al., 2006), как было показано, располагаются строго в ЭР (табл. 15). Более того, в некоторых случаях расчеты даже давали отрицательные значения для ПМ, что может быть связано с неточностями в экспериментах АТРС, когда фракционирование целевого белка было более эффективным, чем фракционирование мембранного маркера. Такие расхождения могут быть также вызваны различиями в методах обнаружения белков/маркеров. В любом случае, эти немаркерные белки с хорошо установленной субклеточной локализацией могут служить в качестве внутренних стандартов, подтверждающих результаты расчетов.

Особый интерес представляют случаи с изменением локализации белков-мишеней. Так, было математически показано, что арабидопсисовый FLS2, LRR-рецепторная протеинкиназа, воспринимающая флагеллин, и ее ко-рецептор ВАК1 изменяют свою локализацию при воздействии на проростки бензотиадиазола (ВТН), агониста салициловой кислоты (Zhang et al., 2014). Действительно, в отсутствие ВТН

плотность ВАК1 в ПМ была в 2,48 раза ниже, согласно вычислениям, чем в ЭР. Однако после воздействия ВТН она стала в $\approx 2,50$ раза выше. Аналогичным образом, белок FLS2 изначально был распределен более или менее равномерно между двумя фракциями, тогда как после воздействия ВТН его плотность в ПМ стала в $\approx 1,87$ раза выше, чем в ЭР (Таблица 15).

В целом, явные различия (более чем в 1,5 раза) между двумя режимами расчета (с применением нового инструмента и без него) наблюдались в 6 случаях из 13: в 5 случаях это соотношение было выше в среднем примерно в 3 раза, в другом случае - ниже в 1,7 раза. Таким образом, примерно в половине случаев предложенная формула оказалась полезной для определения истинного характера распределения белка между двумя различными мембранами. По крайней мере в одном случае (АНК4) этот расчет радикально изменил основной вывод: когда расчет был скорректирован с учетом загрязнений, был сделан вывод, что интересующий нас белок преобладает в эндоплазматическом ретикулуме, а не в плазматической мембране, в отличие от предыдущего обобщения.

Фактически, разработанный инструмент позволил нам количественно сравнить разделение различных мембранных белков в различных экспериментах АТРС, независимо от того, насколько эффективным было мембранное разделение.

Когда интересующий белок локализован на двух типах мембран, метод применим независимо от наличия в АТРС дополнительных типов мембран. Более тщательная реализация АТРС и блоттинга должна обеспечить более адекватные и точные расчеты. Этот подход особенно эффективен, когда разделение мембран в АТРС далеко не полное, а цель эксперимента - оценить истинное (с поправкой на смещение) разделение интересующего белка между ПМ и, как обычно, ЭР. В этом случае повторные процедуры АТРС могут быть заменены простым расчетом. Таким образом, мы хотели бы подчеркнуть, что предложенный математический инструмент делает разделение мембранных белков в АТРС настоящим аналитическим методом для белков, распределенных между ПМ и конкретной мембраной ЭР.

3.3.5 Определение функциональности рецепторов из различных мембран растительной клетки

Присутствие белка в определенном клеточном компартменте не означает, что он функционирует в этом же компартменте. Это особенно верно для ЭР, через который проходят почти все трансмембранные белки и затем направляются к различным клеточным мембранам. В связи с этим нельзя исключить, что цитокининовые рецепторы активны только в ПМ, тогда как в ЭР они представляют собой некий резервный пул инертных белков.

3.3.5.1 Исследования взаимодействия цитокининовых рецепторов и фосфотрансмиттеров

Для изучения субклеточной локализации и предполагаемых взаимодействий между цитокининовыми рецепторами и фосфотрансмиттерами мы провели исследования бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) при транзientной экспрессии отдельных белков в листьях *N. benthamiana*. Для этих экспериментов гены рецепторов *Arabidopsis ANK2*, *ANK3* и *ANK4* и гены фосфотрансмиттеров *AHP1*, *AHP2* и *AHP3* были вставлены в векторы pSPYNE-35S и pSPYCE-35S для получения присоединенных С-терминально фрагментов флуоресцентных белков eYFP. Гены рецептора и фосфотрансмиттера были коэкспрессированы в листьях табака, и взаимодействие белков было проверено с помощью конфокальной микроскопии. Специфическая флуоресценция eYFP была обнаружена для всех комбинаций АНК-АНР без видимых количественных различий (рис. 49 а-р). В контрольных экспериментах, тестирующих взаимодействие векторов, лишенных генов цитокининовых рецепторов и/или фосфотрансмиттеров (pSPYCE-35S-empty pSPYNE-35S-ANK4, pSPYCE35S-empty pSPYNE-35S-AHP2 и pSPYNE-35S-empty pSPYCE-35S-empty), флуоресценции eYFP зарегистрировано не было (рис. 49 s-х). Субклеточная картина взаимодействия была сходна с картиной ЭР-ассоциированных белков и включала сильный перинуклеарный сигнал (рис. III d-1), который является отличительной чертой локализации в ЭР (Marinos 1960; Koizumi et al. 2001; Grefen et al. 2008; McLellan et al. 2013). Контрольное

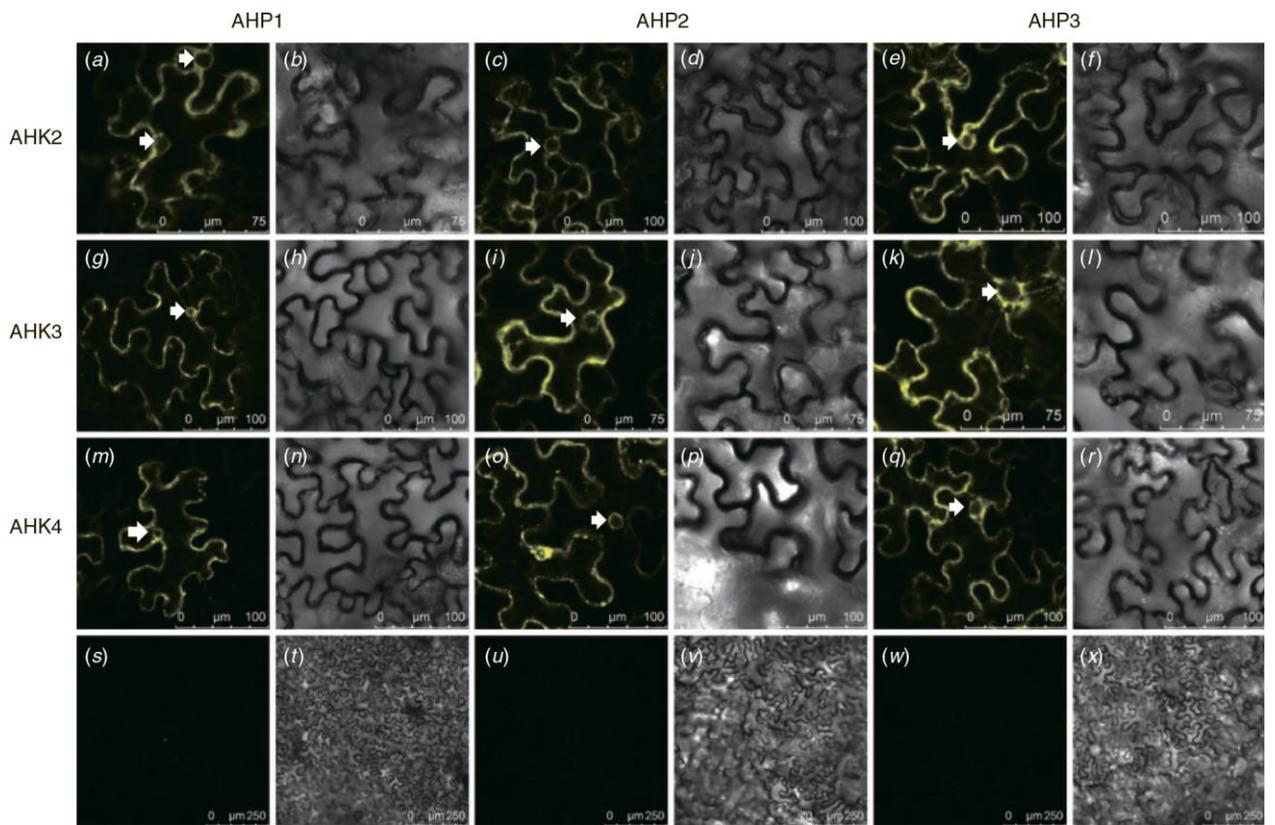


Рис. 49. Взаимодействие цитокининового рецептора и фосфотрансмиттера *in planta*, определенное методом BiFC. Векторы pSPYNE-35S-АНК2-4 и pSPYCE-35S-АНП1-3, содержащие гены цитокининовых рецепторов или фосфотрансмиттеров, были коэкспрессированы в листьях *N. benthamiana*, и флуоресценция клеток визуализировалась с помощью конфокальной микроскопии. Взаимодействующие пары: (a) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНП1; (c) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНП2; (e) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНП3; (g) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНП1; (i) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНП2; (k) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНП3; (m) pSPYNE-35S-АНК4 pSPYCE-35S-АНП1; (o) pSPYNE-35S-АНК4 pSPYCE-35S-АНП2; (q) pSPYNE-35S-АНК4 pSPYCE-35S-АНП3. Контроли: (s) pSPYNE-35S pSPYCE-35S; (u) pSPYNE-35S-АНК4 pSPYCE-35S; и (w) pSPYNE-35S-АНП2 pSPYCE-35S. (b, d, f, h, j, l, n, p, r, t, v, x - светло-полевые изображения, соответствующие флуоресцентным, слева. Белые стрелки указывают на ядра.

окрашивание ядер DAPI подтвердило перинуклеарное происхождение флуоресценции BiFC (рис. 50). При большем увеличении флуоресценция хорошо

видна не только вокруг ядер, но и непосредственно в сети ЭР (рис. 51, 52). Наложение нескольких срезов ткани показало, что меченая сеть ЭР заполняет весь объем клетки (рис. 51 g-i).

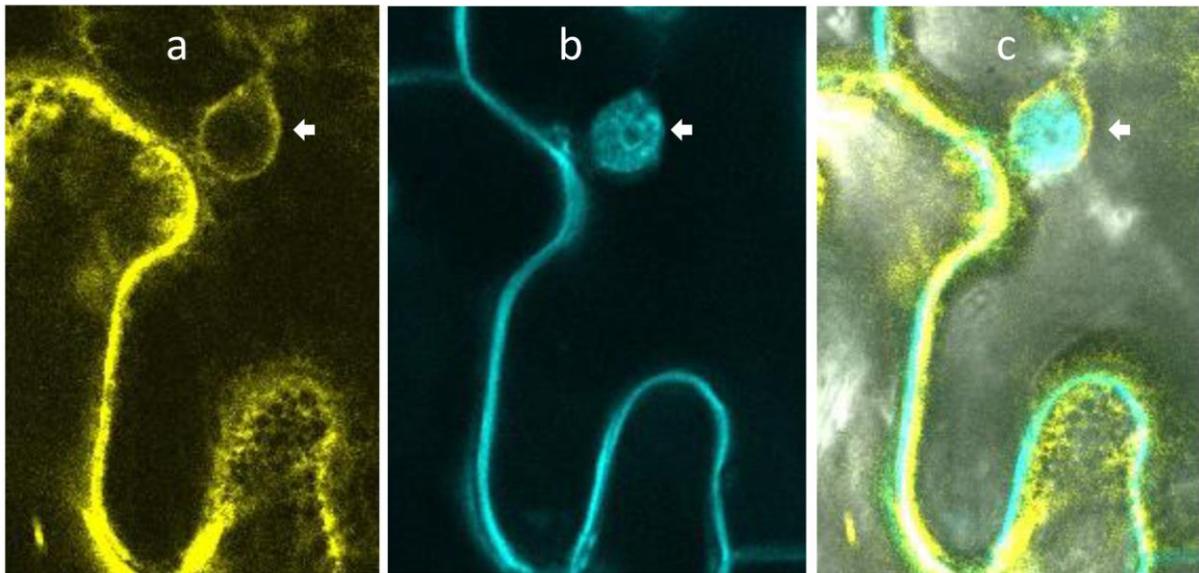


Рис. 50. Схема взаимодействия АНК3 и АНР2, показанная с помощью ViFC в листьях *N. benthamiana*. (a) Сигнал флуоресценции, указывающий на взаимодействие АНК3 х АНР2. (b) Окрашивание DAPI. (c) Объединенные изображения срезов, показанных в (a) и (b). Белые стрелки указывают на ядро. Ядрышко лучше видно на (b) и (c). Известно, что кроме ядер DAPI окрашивает и клеточные стенки (b) (Jordan C.V. et al., *Plant Mol. Biol.*, 2007, 65: 163-175; Juntawong P. et al., *The Plant J.*, 2013, 74: 1016-1028). Обращает внимание, что окрашивание ViFC и окрашивание DAPI не перекрываются.

Чтобы найти дальнейшее подтверждение взаимодействия цитокининовых рецепторов и фосфотрансмиттерных белков на мембране ЭР, была проверена совместная экспрессия взаимодействующих пар АНК-АНР ViFC с маркером ЭР WAK2-mCherry-HDEL (Nelson et al. 2007). В результате анализа были получены перекрывающиеся сигналы, соответствующие их совместной локализации (рис. 53 a-p, u, v). В отличие от этого, перекрытие сигналов было минимальным (если вообще было) с мембранами ПМ, которые были окрашены FM4-64 (рис. 53 q-t, w). В целом,

субклеточный паттерн взаимодействия АНК-АНР в плантации соответствует инициации цитокининовой сигнализации из ЭР.

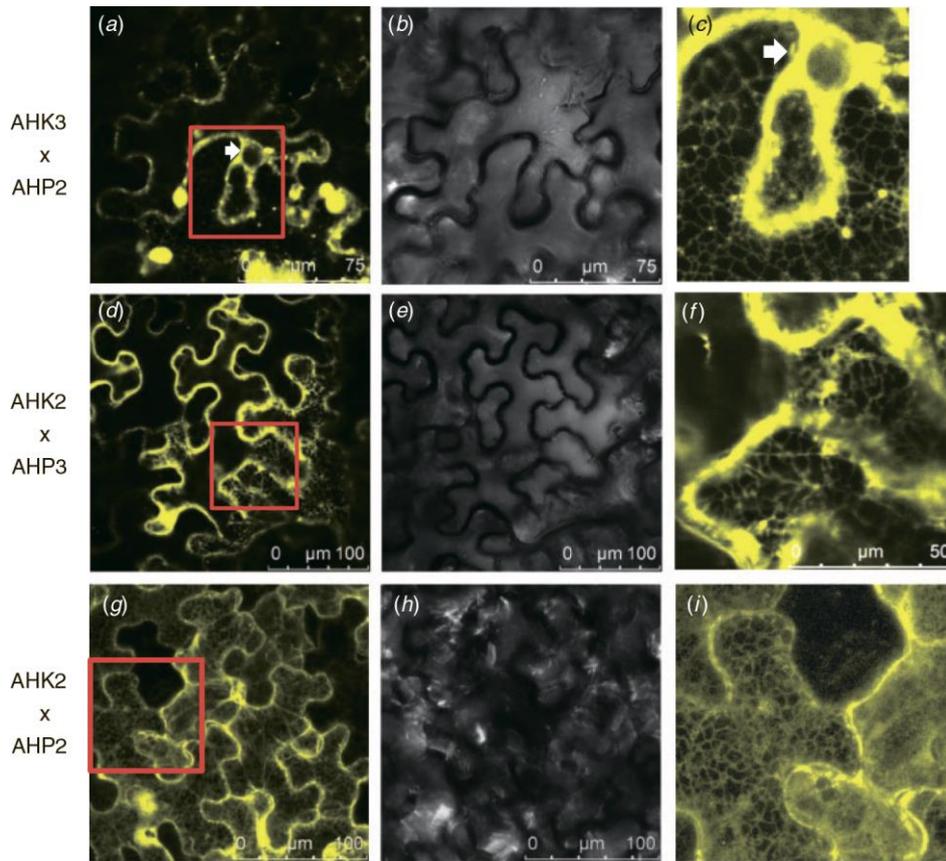


Рис. 51. Субклеточная локализация взаимодействия цитокининового рецептора и фосфотрансмиттера с высоким разрешением, выявленная методом ViFC. (a) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНР2; (b) светлопольное изображение (a); (c) увеличенный вид кадрированного участка (a); (d) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНР3; (e) светлопольное изображение (d); (f) увеличенный вид кадрированного участка (d). (g) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНР2; (h) светлопольное изображение (g); (i) увеличенный вид обрамленного участка (g). (g-i) соответствуют стопке изображений. В правой колонке хорошо видны ретикулярные структуры, характерные для сети ЭР. Белые стрелки указывают на ядра.

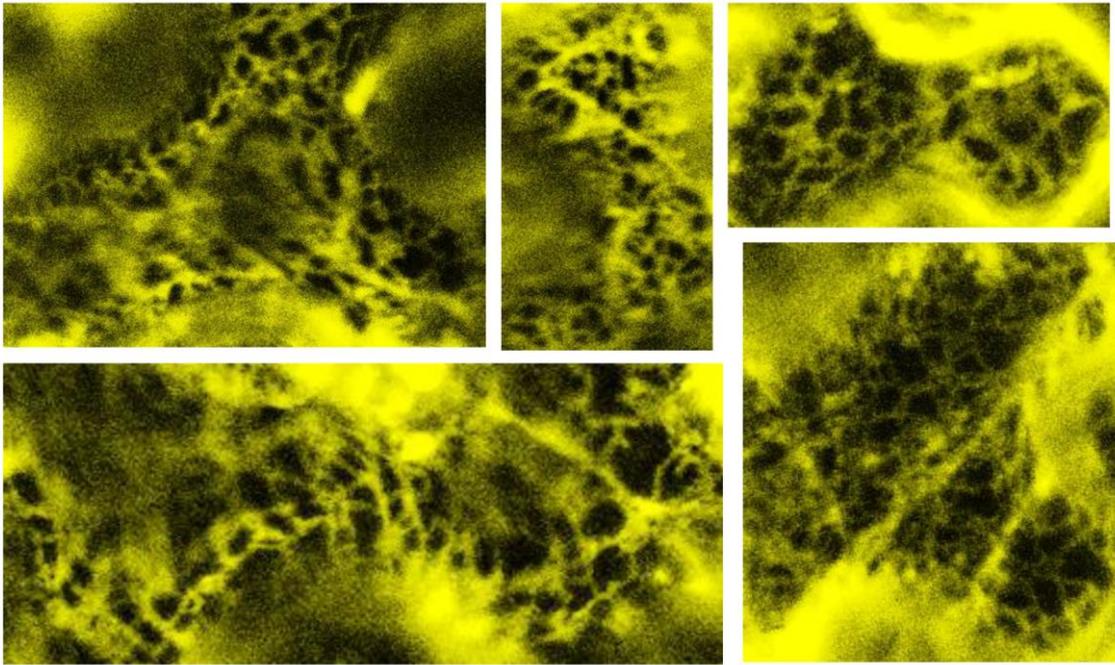


Рис. 52. Взаимодействие АНК4 x АНР3, показанное с помощью ViFC в листьях *N. benthamiana*. Флуоресцентные сигналы, указывающие на взаимодействие, маркируют сеть ЭР.

3.3.5.2 Цитокининовые рецепторы, расположенные в ЭР, образуют димеры

Долгое время считалось, что цитокининовые рецепторы функционируют в виде димеров, подобно сенсорным гистидинкиназам у бактерий (West & Stock 2001). Считается, что димерная форма является активной формой гистидинкиназ. Данные ViFC показали, что рецепторы АНК2 образуют гомодимеры в ЭР (Wulfetange et al. 2011). Также были представлены доказательства того, что АНК3 может образовывать гомо- или гетеро- (с АНК4) димеры в мембране ЭР (Caesar et al. 2011). Здесь мы проверили с помощью ViFC взаимодействие различных пар цитокининовых рецепторов арабидопсиса. В каждом случае был получен флуоресцентный сигнал, свидетельствующий о тесном взаимодействии экспрессированных белков (рис. 54 а, е, і). Некоторые особенности, в частности круговая флуоресценция вокруг ядра (рис. 54 m, n) и перекрытие с маркером ЭР

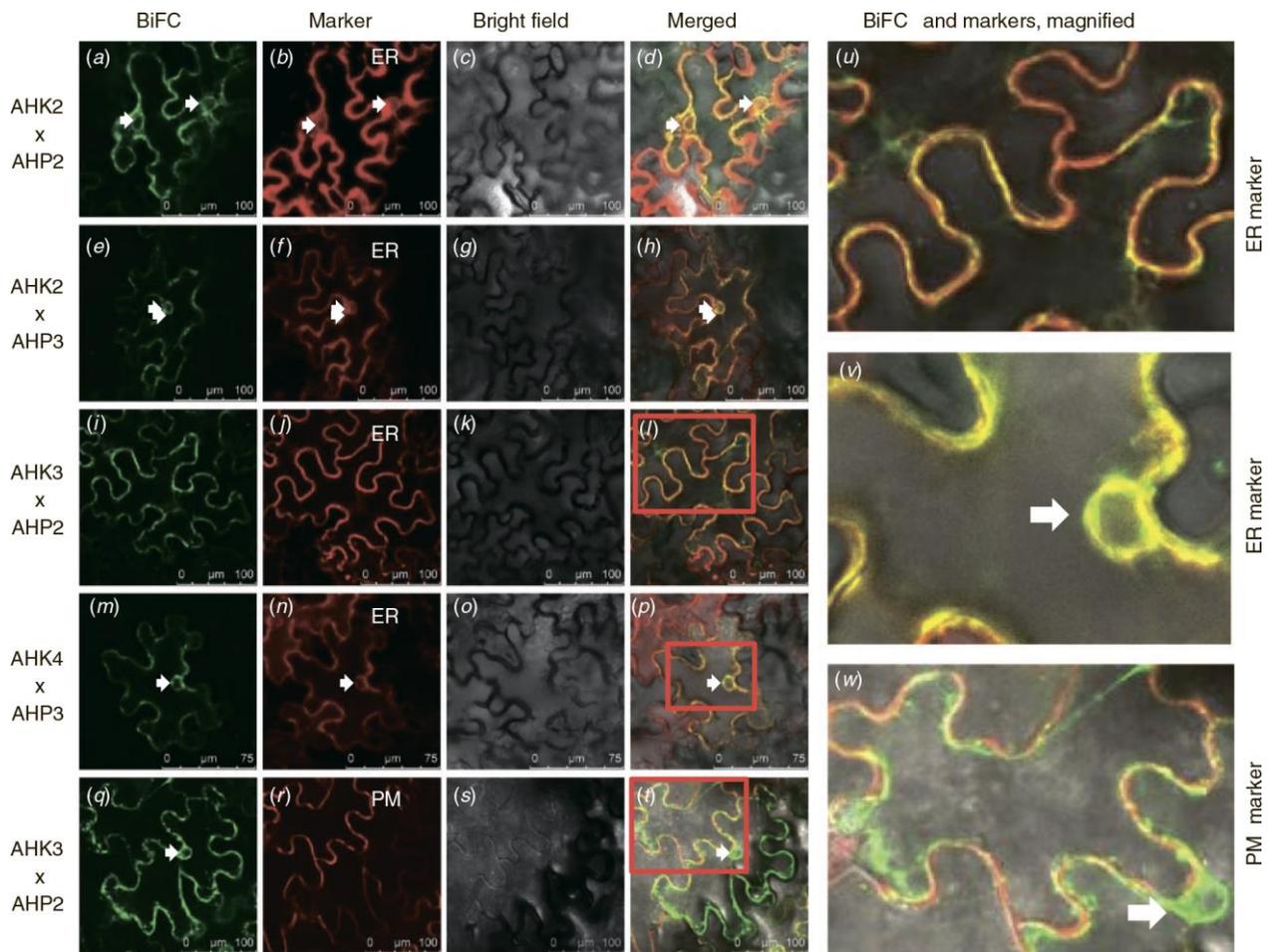


Рис. 53. Совместная локализация *in planta* цитокининовых рецептор-фосфотрансмиттерных комплексов (BiFC) с маркерным белком ЭР WAK2-mCherry-HDEL. (a-d) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНП2, коэкспрессированные с маркером ЭР; (e-h) pSPYNE-35S-АНК2 pSPYCE-35S-АНП3, коэкспрессированные с маркером ЭР; (i-l) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНП2, коэкспрессированные с маркером ЭР; (m-p) pSPYNE-35S-АНК4 pSPYCE-35S-АНП3, коэкспрессированные с маркером ЭР; (q-t) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНП2, ПМ окрашивали FM4-64. (a, e, i, m, q) BiFC; (b, f, j, n) маркер ЭР белок WAK2-mCherryHDEL; (r) окрашивание ПМ с FM4-64; (c, g, k, o, s) светлопольные изображения для левых рисунков в соответствующем ряду; (d, h, l, p, t) слитые изображения для соответствующего ряда. Белые стрелки указывают на ядра. Флуоресценция eYFP на микрофотографиях BiFC показана зеленым цветом, чтобы отличить ее от картины ко-локализации (желтый цвет на объединенных изображениях). Правая колонка - (u, v, w) обранные участки на слитых изображениях (l, p, t, соответственно). Белые стрелки указывают на ядра. Обращает внимание, что желтый цвет, указывающий на

истинную ко-локализацию, наблюдается преимущественно с маркером ЭР-, но не ПМ.

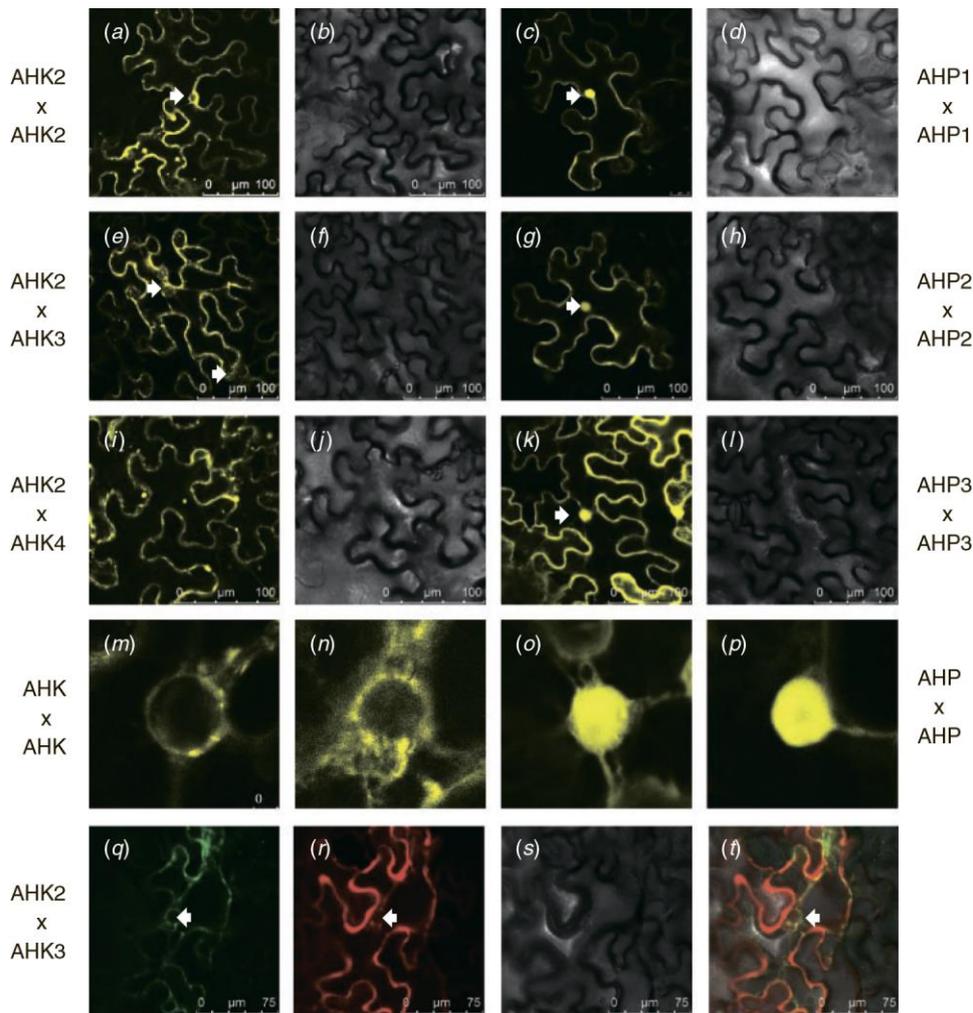


Рис. 54. Димеры рецепторов находятся в мембране ЭР. Векторы pSPYNE-35S-АНК2-4 и pSPYCE-35S-АНК2, несущие гены рецепторов цитокинина, были коэкспрессированы в листьях *N. benthamiana* для анализа ViFC, и флуоресценция клеток была обнаружена с помощью конфокальной микроскопии (a, e, i). (b, f, j, s) светлопольные изображения соответствуют флуоресцентным изображениям слева от них. Аналогичные векторы, несущие гены белков фосфотрансфера, использовались в качестве контроля (c, g, k), с соответствующими светлопольными изображениями (d, h, l). Сравниваются изображения ядерной флуоресценции экспрессированных рецепторов (m, n) и фосфотрансмиттеров (o, p). (q, t) pSPYNE-35S-АНК3 pSPYCE-35S-АНК2, коэкспрессированные с маркером ЭР (r). Белые стрелки указывают на ядра.

(рис. 54 q-t), указывали на то, что эта флуоресценция возникает в ЭР. Этот паттерн флуоресценции, ограниченный ЭР, контрастирует с паттерном, создаваемым взаимодействующими фосфотрансферными белками (рис. 54 с, g, k, o, p), которые, как известно, находятся в цитоплазме и внутри ядра (Punwani et al. 2010). Отметим, что комплексы фосфотрансмиттеров, окрашивающие нуклеоплазму, не окрашивали ядрышка (рис. 55).

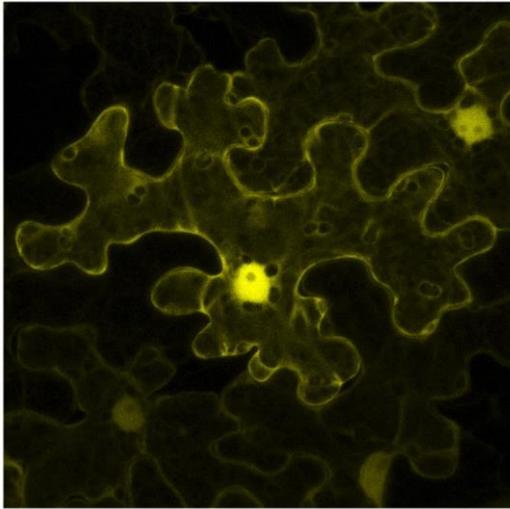


Рис. 55. Пример флуоресцирующего ядра (АНР2 x АНР2, BiFC), где четко видно ядрышко.

3.3.5.3 Топология рецептора в ЭР благоприятна для передачи сигнала

Твердо установлено, что фосфотрансферные белки, которые циркулируют в растительной клетке между цитоплазмой и ядром (Punwani et al. 2010), взаимодействуют с ресиверным доменом, расположенным на С-конце гибридных гистидинкиназ (Urao et al. 2000; Dortay et al. 2006; Pekárová et al. 2011; Bauer et al. 2013). Таким образом, взаимодействие *in vivo* между цитокининовыми рецепторами и фосфотрансмиттерами, показанное с помощью BiFC (см. выше), позволяет предположить, что по крайней мере значительная часть рецепторов принимает топологию, благоприятную для сигнализации, то есть С-концевая часть рецептора обращена к цитозолю. Прямые свидетельства этого были получены в результате эксперимента по защите от протеаз с микросомами, выделенные из листьев табака, транзистно экспрессирующих рецептор АНК3 с С-концевым Мус-тэгом. Свежеприготовленные микросомы ЭР топологически идентичны ЭР *in planta* (Ma et

al. 2006), т.е. внешняя часть микросом соответствует мембране ЭР, обращенной к цитоплазме. Инкубация таких микросом с протеиназой К привела к потере Мус-последовательности из АНКЗ, но маркер просвета ЭР ViP был частично сохранен, что указывает на защиту пептидов, локализованных в просвете, от протеазного переваривания. Когда микросомы пермеабелизировали детергентом Triton X-100, обе полосы исчезли после переваривания (рис. 56). Эти результаты согласуются с выводами, полученными из экспериментов ViFC, и показывают, что С-концевой участок большинства, если не всех цитокининовых рецепторов, находится в цитоплазме. Соответственно, модуль связывания гормона на N-конце рецептора должен быть ориентирован в сторону просвета ЭР.

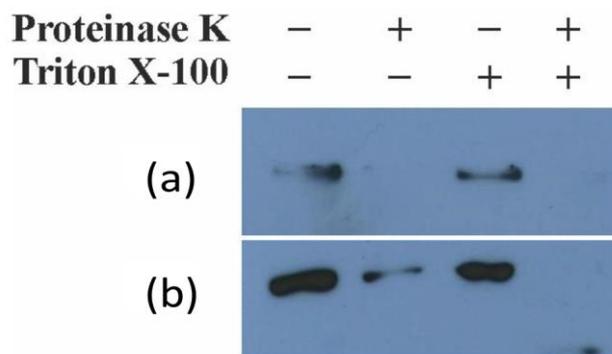


Рис. 56. Определение ориентации АНКЗ с помощью метода защиты от протеазы. Микросомы из листьев табака, экспрессирующие ген АНКЗ- Мус, обрабатывали протеиназой К в присутствии или в отсутствие Triton X-100. К С-концу АНКЗ был присоединен Мус-тэг. Микросомальные белки солибилизировали, растворяли в SDS-PAGE и подвергали иммуноблоттингу с использованием (а) моноклональных антител против Мус-tag или (б) кроличьих поликлональных антител против маркера люменна ЭР ViP. Исчезновение сигнала Мус-тэга, и сохранение сигнала ViP (вторая колонка) указывает на локализацию этих двух маркеров на противоположных сторонах мембраны. Снижение содержания ViP в (b) в отсутствие Triton X-100 может быть вызвано различными причинами, такая же тенденция наблюдалась в оригинальном протоколе (Ma et al. 2006).

3.3.5.4 Цитокининовые рецепторы, расположенные в ЭР, активны в фосфотрансфере АНК-АНР *in vitro*

Для изучения функциональности рецепторов были проведены эксперименты по фосфотрансферу меду АНК и АНР *in vitro* с цитокининовыми рецепторами, расположенными в мембранах растений. Рецептор АНК3 был сверхэкспрессирован под контролем промотора 35S CaMV в листьях табака. Различные мембранные фракции, обогащенные ЭР или ПМ, были получены путем центрифугирования общих мембран из листьев табака в ступенчатом градиенте сахарозы. Степень чистоты фракций оценивали с помощью иммуноблотинга со специфическими антителами против маркерных белков ЭР- и ПМ (рис. 57 а). Предполагаемое обогащение фракции было более чем 2-кратным для маркера ЭР и намного выше для маркера ПМ. Фосфотрансмиттеры АНР1, АНР2 и АНР3, все N-концевые слитые с GST, были получены в *E. coli* и очищены с помощью аффинной хроматографии. Цитокинин-зависимый фосфотрансфер проводили в смеси клеточных мембран с одним из трех очищенных АНР и в диапазоне концентраций *транс*-зеатина от 0 до 500 нМ. В присутствии меченого АТФ фосфорилирование белков фосфотрансмиттеров было четко обнаружено на мембранах из листьев, сверхэкспрессирующих ген АНК3 (рис. 57 с), но не обнаружено, когда использовались мембраны из нетрансформированных листьев (рис. 57 с). Фосфорилирование АНР увеличивалось цитокинин-зависимым образом с одинаковой эффективностью для всех трех АНР. Обе мембранные фракции, ЭР- или ПМ-обогащенные, были в принципе способны осуществлять эту цитокинин-зависимую реакцию фосфорилирования, но ЭР-обогащенные мембраны демонстрировали гораздо более высокую активность (рис.57 b). Количественная оценка интенсивности полос (рис. 57 d-f) показала, что удельная активность (т.е. радиоактивность, перенесенная на фосфотрансмиттеры равным количеством микросом) фракции, обогащенной ЭР, была более чем в 2 раза выше по сравнению с фракцией, обогащенной ПМ. Таким образом, этот подход демонстрирует, что цитокининовые рецепторы в ЭР способны фосфорилировать фосфотрансмиттерные белки при добавлении гормона, что означает, что они функционально активны.

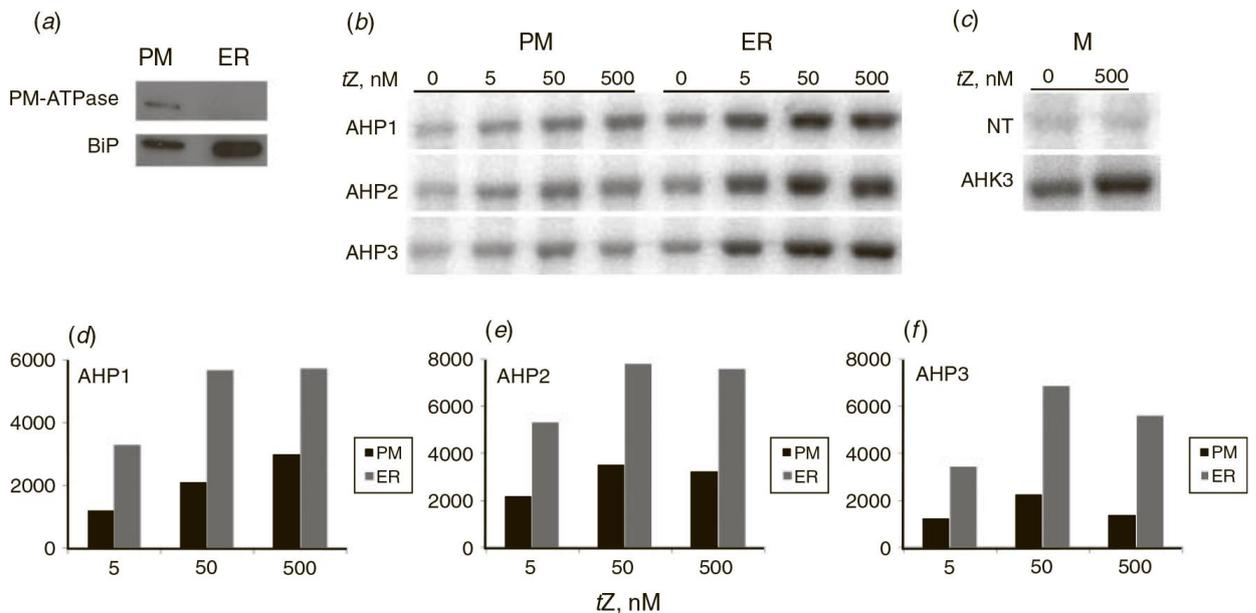


Рис. 57. Анализ фосфотрансфера АНК3-АНР с использованием мембранных фракций растений, обогащенных ЭР или ПМ (а) Чистота мембранных фракций, полученных из листьев, сверхэкспрессирующих АНК3, была проверена иммуноблоттингом с использованием антител против маркерных белков. H^+ -АТФаза использовалась в качестве маркера ПМ, а BiP - в качестве маркера ЭР. (b) Анализ фосфотрансфера АНК3-АНР. Анализ фосфотрансфера проводили в течение 10 мин при $25^{\circ}C$ с 0,8 мг мембранных белков, 2 мкг АНР, 50 мКи $[\lambda\text{-}^{32}P]ATP$ и трансзеатином (tZ) от 0 до 500 нМ. Затем белки солюбилизировали, растворяли в SDS-PAGE, наносили на мембраны PVDF и фосфорилированные АНР детектировали с помощью Storm 860 Molecular Imager (GMI). (c) Анализ фосфотрансферазы рецептора цитокинина-АНР3 с микросомальными фракциями (M), полученными из нетрансформированных (NT) или АНК3-экспрессирующих листьев в отсутствии или присутствии 500 нМ tZ. Реакцию проводили в течение 20 мин, как описано для (b). (d, e, f) Количественное определение радиоактивности (в условных единицах) полос АНР1, АНР2 и АНР3, показанных в (b), после вычитания фоновых значений, полученных при 0 нМ tZ. Отношение максимального фосфорилирования фосфотрансмиттера (при 50-500 нМ tZ) к соответствующему базальному уровню (при 0 нМ tZ) составило $2,66 \pm 0,15$ для фракции, обогащенной ЭР, и $2,32 \pm 0,12$ для фракции, обогащенной ПМ. Это базальное фосфорилирование может быть вызвано

другими гистидинкиназами (СК11, этиленовый рецептор ETR1), а также под действием следов эндогенных цитокининов.

3.3.6 Обсуждение к части 3.3

Субклеточная локализация является важной характеристикой белков, определяющей режим их функционирования в клетке. Это справедливо и для гормональных рецепторов, которые воспринимают сигнальные молекулы, поступающие из других мест, и преобразуют этот сигнал в конкретный биохимический процесс, влияющий на расположенную ниже первичную клеточную мишень (мишени). В зависимости от типа лиганда и клеточной мишени, рецепторы могут быть расположены на поверхности клетки в плазматической мембране (ПМ) или внутри клетки, либо в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в ядре или цитозоле. Гормоны растений воспринимаются в разных местах: brassinosteroids (Friedrichsen et al., 2000) и пептиды (Lee & Torii, 2012) воспринимаются на ПМ, этилен воспринимается в мембране ЭР (Chen et al., 2002), а некоторые другие гормоны (ауксин, абсцизовая кислота, гиббереллины) имеют растворимые белки-рецепторы в цитозоле и/или ядре (Guilfoyle et al., 2015).

Вопрос о субклеточной локализации цитокининовых рецепторов и инициации сигнализации имеет особое значение для понимания клеточной архитектуры цитокининовой системы. Этот вопрос был поднят сразу после открытия соответствующих генов (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001) и широко обсуждается до сих пор (Osugi & Sakakibara, 2015; Zürcher & Müller, 2016; Durán-Medina et al., 2017; Kang et al., 2017).

Когда рецепторы цитокининов были открыты (Ueguchi et al., 2001), авторы предположили, что кодируемые белки будут функционировать в плазматической мембране. Это предположение было основано на предсказании с помощью биоинформационной программы PSORT (Nakai & Horton, 1999), хотя уровень достоверности, 0,6 во всех случаях, был далек от максимального значения 1. Очевидно, принимая во внимание это скромное значение, авторы назвали сенсорные домены этих белков АНК скорее экстрацитоплазматическими, чем внеклеточными

(Ueguchi et al., 2001). Знаменательное открытие, что ген *CRE1/АНК4* кодирует рецептор цитокинина (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001), дало мощный импульс исследованиям восприятия цитокинина. Анализ SDS-PAGE показал, что после экспрессии в дрожжах белок АНК4 можно обнаружить в "определенной мембранной фракции" (Suzuki et al., 2001). Определенная мембранная фракция дрожжей с включенным *CRE1/АНК4* обладала способностью связывать цитокинины с высокой аффинностью (Yamada et al., 2001). На том этапе исследований цитокининовые рецепторы считались преимущественно белками, локализованными в ПМ, не только из-за биоинформационного прогноза, но и потому, что по структуре они были похожи на этиленовые рецепторы, которые, как тогда считалось, тоже находятся в ПМ (Theologis, 1998; Hirayama & Alonso, 2000). Это мнение было подтверждено в работе Kim et al. (2006), в которой, по словам авторов, впервые экспериментально доказано, что "АНК3-GFP в основном, если не исключительно, локализован в плазматической мембране протопластов арабидопсиса". Однако данные по флуоресценции зеленого флуоресцентного белка (GFP) были представлены только в виде дополнительного рисунка низкого разрешения, без контрольных микрофотографий с маркерами ПМ и/или ЭР (Kim et al., 2006). Тем не менее, локализация цитокининовых рецепторов в ПМ была принята в обзорах и разделах учебников, посвященных этой теме. Она предполагает, что цитокининовый сигнал генерируется апопластными цитокининами и воспринимается внеклеточным доменом рецептора.

Тем временем было начато комплексное биохимическое исследование рецепторов цитокининов. С помощью бактериальной системы анализа было обнаружено заметное снижение связывания гормона при кислом рН по сравнению с нейтрально-щелочным рН. Поскольку кислый рН характерен для апопласта, а нейтрально-слабощелочной рН - для цитоплазмы, эти результаты указывали на функцию рецептора внутри растительной клетки (Romanov et al., 2006). Эти и некоторые другие данные поставили под сомнение исключительное нахождение цитокининовых рецепторов в ПМ. Поэтому исследования субклеточной

локализации этих рецепторов были расширены, и через несколько лет появились три статьи, в которых разными методами было показано, что большинство цитокининовых рецепторов локализованы внутри клетки в мембранах ЭР (Caesar et al., 2011; Lomin et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Было обнаружено, что микросомы растений связывают меченый цитокинин (^3H -транс-зеатин) с высокой аффинностью. При двухфазном разделении в водной полимерной двухфазной системе микросом оказалось, что абсолютное большинство высокоаффинных цитокинин-связывающих сайтов были ограничены эндомембранной фракцией как в проростках кукурузы (Lomin et al., 2011), так и арабидопсиса (Wulfetange et al., 2011).

В соответствии с локализацией цитокинин-связывающей активности, при субклеточном фракционировании цитокининовые рецепторы были обнаружены в ЭР кукурузы и арабидопсиса. У кукурузы фракции клеточных мембран, полученные после разделения в градиенте сахарозы в отсутствие или в присутствии катионов магния, были проанализированы методом иммуноблотинга с использованием антител, направленных против рецептора ZmHK1 (Lomin et al., 2011). В отсутствие магния рибосомы диссоциируют от ЭР, что приводит к смещению зоны ЭР к вершине градиента. Этот сдвиг характерен для мембран ЭР, поскольку только они содержат рибосомы. Было показано, что белок ZmHK1 претерпевает Mg-сдвиг и локализован с маркерным белком ЭР (BiP) (Lomin et al., 2011). Аналогичным образом, на мембранах растений арабидопсиса, экспрессирующих Мус-тегированные гены рецепторов *АНК2* или *АНК3* под контролем собственных промоторов, также наблюдался типичный Mg-сдвиг и совпадение паттернов рецептора и маркера ЭР (Wulfetange et al., 2011).

В подтверждение этого, локализация рецепторов арабидопсиса, слитых с флуоресцентными белками, экспрессированных в листьях табака (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011), и рецептора кукурузы ZmHK1, экспрессированного в протопластах из листьев кукурузы (Lomin et al., 2011), соответствовала сети ЭР. Также для рецептора АНК3 картина флуоресценции совпадала с картиной маркера ЭР, но не маркера ПМ. Кроме того, белок АНК3 был *in vivo* гликозилирован в местах,

чувствительных к гликозидазе Endo H, что свидетельствует о его локализации в ЭР. Такое же гликозилирование было зарегистрировано в контрольных экспериментах для этиленового рецептора ERS1, интегрированного в ЭР (положительный контроль), тогда как потенциальные сайты Endo H в локализованной в ЭР гистидинкиназе АНК1 (отрицательный контроль) не были гликозилированы (Caesar et al., 2011).

На основании приведенных выше данных неоспоримым является тот факт, что подавляющее большинство цитокининовых рецепторов расположено в мембране ЭР, по крайней мере, в некоторых тканях арабидопсиса и кукурузы (Caesar et al., 2011; Lomin et al., 2011, 2018; Wulfetange et al., 2011). Недавние данные, полученные с цитокининовыми рецепторами из риса и яблони, подтвердили их ЭР-локализацию (Daudu et al., 2017; Ding et al., 2017). Однако однозначных доказательств того, что сигнализация происходит из этого участка, не было предоставлено, и возможное присутствие меньшей части рецепторов в ПМ не должно оставаться без внимания (Lomin et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Была предложена возможность, что ЭР является местом депонирования рецепторов, циклически перемещающихся между своим активным сайтом в ПМ и ЭР (Wulfetange et al., 2011), или что они являются интернализированными рецепторами для десенсибилизации ответа на цитокинин (Kang et al., 2017). Однако доказательства этих альтернативных возможностей не были представлены. Не исключено также, что цитокининовая сигнализация происходит более чем из одного места и что ЭР и ПМ задействованы в разных тканях или на разных стадиях развития и/или отвечают на сигнальные молекулы разного происхождения. Таким образом, для оценки функциональных свойств каждого пула цитокининовых рецепторов были необходимы дальнейшие исследования в системах *in vivo* или близких к *in vivo*.

Внутриклеточные компартменты и внеклеточное пространство растений отличаются типичными значениями pH (Pfanzen & Dietz, 1987; Bibikova et al., 1998; Yu et al., 2000; Felle, 2005; Martinière et al., 2013; Shen et al., 2013). Важно отметить, что апопластическое пространство (включая клеточную стенку) довольно кислое - pH

обычно колеблется между 4.5 и 6.0 (в основном 5.0-5.5) - в то время как рН в цитозоле, ядре и ЭР является нейтральным или слабощелочным при рН 7-8. Анализ рН-зависимости многочисленных растительных белков с известной субклеточной локализацией показал, что рН-максимумы активности белков в значительной степени соответствуют типичному рН их окружения (табл. 16). Это справедливо для всех без исключения белков, чья рН-зависимость активности известна: рецепторы фитогормонов, транспортеры и метаболические ферменты, причем все они работают с молекулами небольшого молекулярного веса. Например, максимум рН для высокоаффинного связывания митогенного пептида фитосульфокина- α (PSK- α), которое, как известно, происходит на внешней стороне ПМ, составляет около 4 (Matsubayashi & Sakagami, 1999) (рис. 58 а), в то время как максимум рН связывания этилена, который, как известно, происходит в мембране ЭР, составляет около 8 (Bengochea et al., 1980). Инвертазы являются вездесущими ферментами с изоформами, действующими в различных клеточных компартментах. Апопластная инвертаза клеточной стенки имеет оптимум рН около 4 (Nothorn et al., 2010), тогда как цитозольная инвертаза наиболее активна при рН 7.5, полностью теряя свою активность при рН 5 (Lou et al., 2007; Liu et al., 2015). В суспензии клеток табака активность цитокинин оксидазы/дегидрогеназы (СКХ) была обнаружена как внутри клеток, так и в среде. Секретируемая СКХ имела оптимум рН, близкий к 6, в то время как внутриклеточная СКХ имела оптимум рН около 8.5 (Motyka et al., 2003). Известно, что брассиностероиды связывают свой рецептор на внешней стороне ПМ. Соответственно, тройной комплекс из рецептор-связывающего домена (BRI1 LRR), гормона (BL) и ВАК1 (BRI1-ассоциированная киназа 1) формировался *in vitro* при (близком к апопластному) рН 4, но не при (близком к цитозольному) рН 8 (Sun et al., 2013). Исходя из этих и многочисленных дополнительных данных, представляется общим правилом, что рН-оптимум активности данного белка близок к рН компартмента, в котором этот белок функционирует. Другими словами, белки, функционирующие в цитозоле/ядре/ЭР, должны иметь оптимум вблизи рН 7-8, тогда как белки, функционирующие в апопласте, должны иметь оптимум ниже рН 7, в

основном в диапазоне рН 4.5-6. Это правило можно использовать для прогнозирования локализации активных белков в компартментах с контрастным рН. Важно отметить, что критерий рН не обязательно должен согласовываться с другими характеристиками белка, определяющими место его основной субклеточной локализации, но это свойство сильно указывает на то, где белок выполняет свою функцию.

Таблица 16. Корреляция значений рН в меж- и внутриклеточных компартментах растений с рН-оптимумами активности функционирующих в них белков

Compared entities	pH values	
	PM, apoplast, cell walls	ER, cytosol, nuclei
Typical pH range of liquid milieu	4.5–6	7–8
pH of maximal protein activity, mean values \pm SD	5.1 \pm 1.0 ($n = 23$)*	7.8 \pm 0.8 ($n = 32$)*
Range of pH tested	2.0–8.0	2.0–11.5

*Разница между двумя наборами данных чрезвычайно значительна, $P < 0,00001$, как рассчитано с помощью t-теста Стьюдента. Были включены только белки с достоверными данными об их субклеточной локализации и зависимости их активности от рН. Большинство данных было получено из базы данных UniProt (www.uniprot.org), дополненной некоторыми данными из PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). ПМ - плазматическая мембрана; ЭР - эндоплазматический ретикулум.

При применении к цитокининовым рецепторам рН-критерия не вызывает сомнений тот факт, что гормонсвязывающая активность всех рецепторов при рН 7-9 заметно преобладает над их активностью при рН 5-7 (рис. 58 b), что свидетельствует о внутриклеточном функционировании рецепторов. Их максимальная активность наблюдается в щелочной среде, близкой к рН 9. Два из трех цитокининовых рецепторов арабидопсиса (АНК2 и АНК3) практически лишены гормон-связывающей активности при рН 5, что характерно для внутриклеточных белков и запрещено для функционирования в апопласте. Более

того, после 1 ч инкубации при pH 5 АНК3 необратимо теряет способность связывать цитокинин (Lomin et al., 2015). Все это добавляет сильный функциональный аргумент к прежним структурным, подтверждая концепцию, что цитокининовые рецепторы не только находятся, но и действуют в ЭР. Однако некоторый скептицизм может сохраняться на основании того, что рецептор арабидопсиса CRE1/АНК4 и его

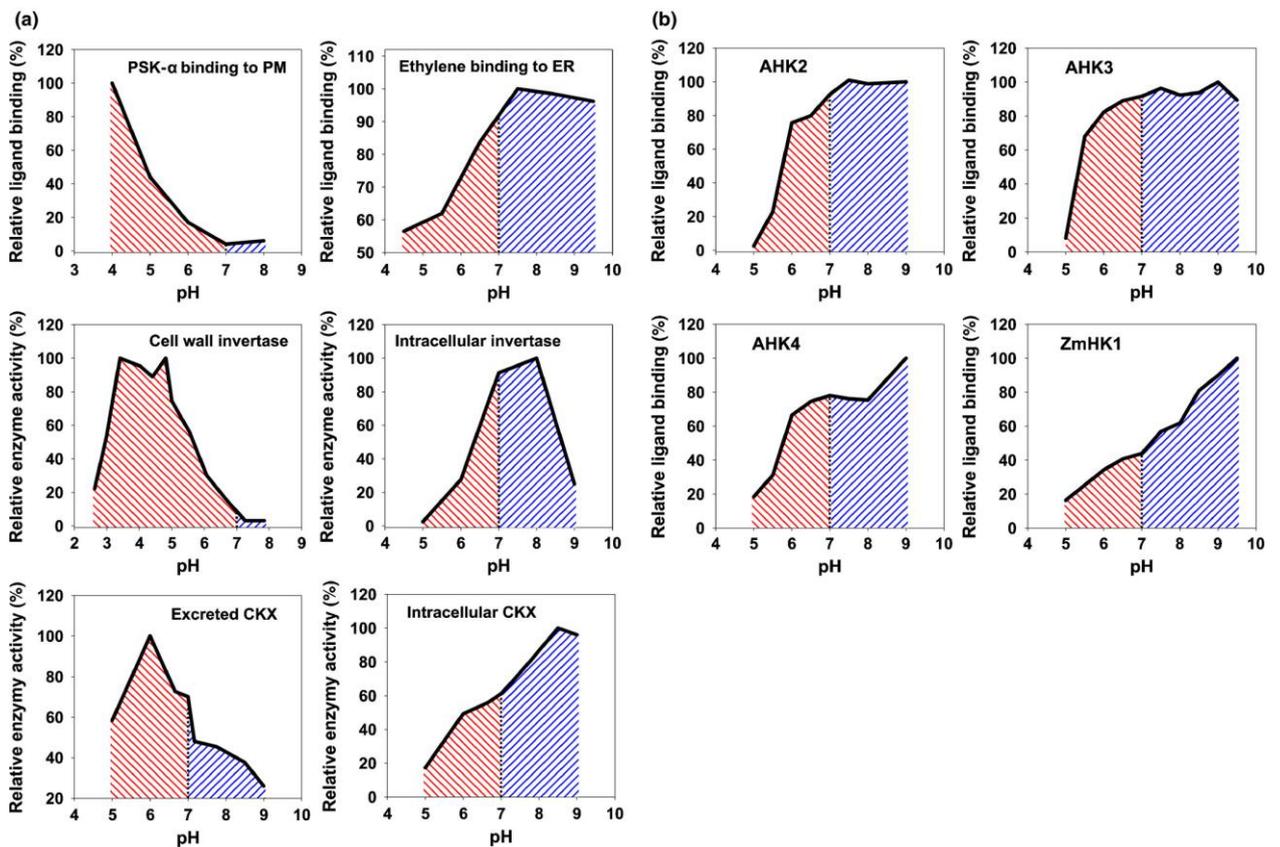


Рис. 58. Типичные примеры pH-зависимости активности белков, локализованных в различных клеточных компартментах. (a) Профили pH-зависимой активности белков, функционирующих внеклеточно в плазматической мембране (ПМ)/апопласте/клеточной стенке (левая колонка) или внутриклеточно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР)/цитозоле/ядре (правая колонка). (b) Зависимость связывания гормонов цитокининовыми рецепторами от pH. Левая (красная) и правая (синяя) штриховка обозначает кислотный и щелочной профили активности белка, соответственно. Подробнее см. текст и соответствующие ссылки. СКХ - цитокининовая оксидаза/дегидрогеназа.

кукурузный ортолог ZmHK1 сохраняли заметную лиганд-связывающую способность даже при pH 5, что соответствует 23,4% и 37,2% от связывания при pH 7, соответственно (Lomin et al., 2015). Также мутантные растения *ahk2 ahk3*, экспрессирующие только CRE1/АНК4, демонстрировали несколько более высокое специфическое связывание во фракции, обогащенной ПМ, чем во фракции, обогащенной эндомембранами (Wulfetange et al., 2011). Аналогичное преобладание наблюдалось в микросомах из листьев кукурузы: фракция, обогащенная ПМ, связывала больше ³H-меченного цитокинина, чем фракция, обогащенная ЭР, что свидетельствует о более высокой плотности сайтов связывания транс-зеатина (*tZ*) в ПМ по сравнению с ЭР (Lomin et al., 2011). Тем не менее, даже для этих двух рецепторов расчеты подтвердили их преимущественную локализацию в ЭР. Более того, методом протеомики LOPIT (localization of organelle proteins by isotope tagging) CRE1/АНК4 был обнаружен именно в ЭР (Nikolovski et al., 2012). Кроме того, следует отметить, что лиганд-связывающая активность рецепторов при низком pH не гарантирует, что эти рецепторы являются работающими. Высокая аффинность гормон-рецепторного взаимодействия служит для обеспечения свободной энергии, необходимой для конформационных изменений рецептора, которые приводят к его активации. При низком pH сродство, конечно, падает, и изменение свободной энергии может стать слишком малым и недостаточным для обеспечения необходимого изменения конформации рецептора.

Одним из самых ранних событий внутриклеточной цитокининовой сигнализации является вызванная цитокинином активация гистидинкиназной активности рецепторов, приводящая к автофосфорилированию рецепторного димера и последующему переносу фосфата на мобильные фосфотрансферные белки. Поэтому субклеточное место взаимодействия функционально активных рецепторов с фосфотрансферными белками указывает на место инициации цитокининовой сигнализации. Субклеточная локализация взаимодействия рецептор-фосфотрансмиттер *in planta* и фосфорилтрансмиттерной активности цитокининовых рецепторов, расположенных в мембранах растений (суммарных или

фракционированных по разным типам мембран), было представлено в нашей работе (Lomin et al., 2017). Этот анализ подтвердил функционирование рецепторов в ЭР. Гомо- и гетеродимеризацию рецепторов и связывание ими фосфотрансмиттеров визуализировали в живых растительных клетках с помощью бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC). Было показано, что пары рецептор-фосфотрансмиттер взаимодействуют во всех возможных комбинациях по схеме, отражающей ЭР. Димеры рецепторов, активная форма рецепторов, также были обнаружены в ЭР. Согласно данным BiFC и протеазной защиты, каталитическая часть АНКЗ располагалась в цитозоле, тогда как гормон-связывающий модуль был обращен к просвету ЭР. Такая топология соответствует рецепторному сигналу с мембраны ЭР. Функциональность рецепторов в различных мембранных фракциях была проверена с помощью киназного анализа *in vitro*, визуализирующего фосфорилирование фосфотрансферных белков. Обнаруженная цитокинин-зависимая фосфотрансферная активность была приурочена в основном к фракции, обогащенной ЭР, но не исключено присутствие меньшего пула активных рецепторов в ПМ.

Еще один аргумент в пользу функциональной значимости ЭР как места восприятия цитокининового сигнала следует из анализа мест деградации цитокинина ферментами СКХ и последствий усиления экспрессии соответствующих генов. Различная субклеточная локализация ферментов СКХ арабидопсиса указывает на то, что деградация цитокинина в различных субклеточных участках имеет значение и подразумевает существование различных субклеточных пулов цитокинина (Werner et al., 2003; Köllmer et al., 2014). Важно отметить, что усиленная деградация цитокинина в различных клеточных участках имеет частично различные качественные и/или количественные последствия для роста и развития растений, что предполагает различную функциональную значимость затронутых пулов гормонов.

Из семи ферментов СКХ арабидопсиса только один (СКХ7) расположен в цитозоле, все остальные (СКХ1 - СКХ6) содержат высокогидрофобный N-концевой

домен. Этот домен служит целевой последовательностью для импорта в ЭР и включает возможность того, что некоторые ферменты СКХ могут впоследствии транспортироваться по секреторному пути (Schmülling et al., 2003; Werner et al., 2003). Системная сверхэкспрессия гена СКХ7 влияет на развитие сосудистой сети, но почти не затрагивает другие аспекты роста и развития растений, что указывает на то, что фермент не оказывает грубого влияния на пул цитокининов, имеющих значение для сигнализации (Köllmer et al., 2014). Напротив, сверхэкспрессия других генов СКХ, в частности СКХ1 и СКХ3, вызывает плеiotропный синдром дефицита цитокинина, включая, в частности, резко сниженную активность апикальной меристемы побега (Werner et al., 2001, 2003). Анализ субклеточной локализации слитых белков СКХ1- и СКХ3-GFP показал, что местом их активности является ЭР и иногда вакуоль (Werner et al., 2003). Недавний детальный анализ локализации меченого белка СКХ1 показал, что большая его часть находится в ЭР (Niemann et al., 2018), что позволяет предположить, что этот компартмент является важным местом деградации цитокинина. Усиленная деградация этого пула цитокининов, очевидно, оказывает сильное влияние на цитокининовую сигнализацию. Другой член семейства СКХ, СКХ2, как сообщается, расположен в ЭР и, возможно, во внеклеточном пространстве (Werner et al., 2003). Последствия сверхэкспрессии СКХ2 для фенотипа побега растения значительно менее выражены, чем последствия сверхэкспрессии СКХ1 и СКХ3 как у табака, так и у арабидопсиса, что позволяет предположить, что пул цитокинина, на который влияет СКХ2, менее значим для сигнализации в побеге (Werner et al., 2001, 2003). Таким образом, деградация цитокинина в разных местах клетки по-разному влияет на сигнализацию цитокинином, и пул цитокинина в ЭР имеет особое значение для регуляции роста побега. Примечательно, что Galuszka et al. (2007) сообщили, что все ферменты СКХ арабидопсиса имеют оптимум рН в диапазоне от близкого к нейтральному до слабоосновного рН, что указывает на преимущественно внутриклеточные места их активности. Кроме того, мутация гена *REPRESSOR OF CYTOKININ DEFICIENCY1* (*ROCK1*), кодирующего ER-локализованный транспортер UDP-GlcNAc и UDP-

GalNAc, необходимых для гликозилирования белков, подавляет активность СКХ1, усиливая тем самым цитокининовый ответ (Niemann et al., 2015). В то же время существование внеклеточного пути деградации цитокининов подтверждается накоплением активности СКХ в культивируемых клетках табака и культуральной среде (Motyka et al., 2003). Оптимум pH активности СКХ в клетках (pH 8.5) значительно отличался от такового в культуральной среде (pH 6.0), что соответствует их функционированию в разных местах. Однако *in planta* доказательств двойной локализации специфических ферментов СКХ до сих пор не получено.

Недавнее исследование в протопластах кукурузы подтвердило различные субклеточные локализации ферментов СКХ (Zalabák et al., 2016). Один из восьми проанализированных ферментов СКХ из кукурузы, несущий С-концевое слияние GFP, оказался апопластным (ZmСКХ1), еще один (ZmСКХ10) располагался в цитозоле, один был постоянно связан с ЭР (ZmСКХ9), а пять других были идентифицированы в ЭР, но в итоге оказались в вакуоли. Локализация ZmСКХ9-GFP в ЭР была подтверждена в суспензионных клетках арабидопсиса, где его экспрессия вызывала резкое снижение содержания различных метаболитов цитокинина (Zalabák et al., 2016). Эти данные четко указывают на присутствие цитокининов внутри ЭР.

Наконец, существует несколько потенциальных преимуществ внутриклеточной локализации рецепторов цитокининов. Расположение рецепторов в ЭР включает перинуклеарное пространство, где они были обнаружены как в виде одиночного флуоресцентно меченного белка (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011), так и в составе комплекса с фосфотрансмиттерами и/или другими рецепторами (образуя гомо- и гетеродимеры) в анализах BiFC (Lomin et al., 2017). Из-за меньшего расстояния до ядра сигнализация от этих рецепторов увеличила бы скорость и надежность трансдукции цитокининового сигнала. В случае ЭР-локализованных этиленовых рецепторов утверждается, что локализация рецептора в ЭР энергетически более эффективна, поскольку рецептор не экспортируется через

всю секреторную систему в ПМ, и рецепторы быстрее доставляются к месту действия (Chen et al., 2002). Наконец, ER-локализация рецептора открывает возможность для регуляции цитокининовой сигнализации и перекрестного взаимодействия также на уровне внутриклеточного транспорта гормонов и метаболических преобразований (Lomin et al., 2017).

Однако недавняя статья о транспорте цитокининов позволила сделать выводы в пользу локализации активности рецепторов в ПМ (Zürcher et al., 2016). Эти авторы сообщили о поразительно комплементарном паттерне участков экспрессии гена транспортера *PURINE PERMEASE 14 (PUP14)* и низком сигнале от цитокинина, хотя исследуемые клетки (будущие семядоли у эмбрионов на стадии сердца) были в основном чувствительны к цитокинину. Этот дополнительный паттерн указывает на ингибирующую функцию PUP14 в цитокининовом ответе, что было подтверждено генетическими данными, поскольку снижение экспрессии *PUP14* увеличивало сигнал от цитокинина. Было показано, что слитый белок PUP14-GFP находится главным образом в ПМ, и был сделан вывод, что PUP14 истощает апопластный пул цитокининов, тем самым ингибируя восприятие гормона рецепторами, расположенными в ПМ. Транспортер, работающий в сигнальном пути перед рецептором для перемещения сигнального соединения, является новой парадигмой в биологии гормонов растений и может служить информатором о месте инициации сигнала (Zürcher et al., 2016). Однако часть PUP14, по-видимому, также находится в ЭР, что потенциально усложняет интерпретацию того, где выполняется его основная функциональная роль.

В сценарии, предложенном Zürcher et al. (2016), связывание внеклеточного цитокинина с чувствительным доменом рецепторов, локализованных в ЭР, важно для инициации сигнального ответа, тогда как цитоплазма представляет собой поглотитель биоактивных цитокининов. Чтобы проверить инициацию сигнала цитокининами в различных клеточных точках, протопласты мезофилла арабидопсиса были трансфицированы генами цитокининоксидазы/дегидрогеназы (*CKX2*, *CKX7*), направленными либо во внеклеточное пространство, либо в

цитоплазму. *СКХ2* был способен ослабить цитокининовый ответ, вызванный деградирующим *tZ*, но не ответ на устойчивый к деградации бензиладенин; *СКХ7* был неэффективен. Эти анализы подтвердили точку зрения, что апопластный цитокинин инициирует сигнализацию, тогда как цитоплазматические цитокинины неактивны. На основании этих результатов в недавнем обзоре было признано маловероятным, что ЭР-локализованные АНК действуют функционально как рецепторы цитокина (Kang et al., 2017). Однако мы должны понимать, что функциональная значимость ЭР-локализованных цитокининов вообще не была рассмотрена Zürcher et al. (2016), таким образом, оставляя этот вопрос без ответа. Возможно даже, что ЭР-локализованная часть *СКХ2* функционально важна в анализе, поскольку это основной сайт локализации *СКХ2* (Werner et al., 2003).

Концепция внеклеточного восприятия цитокининового сигнала вызывает ряд вопросов, поскольку она противоречит ряду хорошо установленных фактов, изложенных выше. Почему основная масса потенциально активных рецепторов локализуется в ЭР, а не в ПМ? Почему рН-зависимость связывания лигандов цитокининовыми рецепторами имеет ЭР-тип, а не ПМ-тип? Почему цитоплазматические ферменты LONELY GUY (LOG), генерирующие биологически активные свободные цитокининовые основания внутри клеток, так важны для нормального развития растений (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009; Tokunaga et al., 2012)? Как объяснить, что блокирование высвобождения цитокина из клеток у нокаутных мутантов гена-транспортера *ABCG14* сопровождается внутриклеточным накоплением цитокина, усиливающим активацию генов, реагирующих на цитокинин (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014)?

Возникли и более конкретные вопросы, непосредственно связанные с работой Zürcher et al. (2016). Один из очевидных вопросов, касающийся различий в сродстве к гормону между рецепторами и транспортерами, уже обсуждался в другом месте (Durán-Medina et al., 2017; Kang et al., 2017). Этот момент важен для правильной интерпретации результатов в отношении возможности инициации цитокининовой сигнализации из ПМ. Сродство рецепторных белков к их лигандам обычно на

несколько порядков выше, чем сродство каналов или метаболических ферментов. К сожалению, основные характеристики (K_m и рН-зависимость) PUP14 не были представлены, но, предположительно, транспортеры семейства PUP не являются исключением из общего правила. В оптимальных условиях K_m для цитокинина (tZ), переносимого другими членами семейства PUP (PUP1 и PUP2), находился в диапазоне 20-40 мкМ (Gillissen et al., 2000; Bürkle et al., 2003). K_m PUP14 неизвестен, но он может быть ниже *in planta*, если он является частью высокоаффинной системы переноса цитокинина, о которой сообщалось для *Arabidopsis* с K_m в диапазоне 200 нМ (Cedzich et al., 2008). Сродство tZ к рецепторам находится в диапазоне низких нМ (2-4 нМ) как в гетерологичной бактериальной системе (Romanov et al., 2006), так и *in planta*. Сообщалось, что концентрации цитокинина 0,1-1 нМ вызывают цитокининовый ответ в клетках арабидопсиса, что подтверждает высокую аффинность связывания лигандов рецепторами (Müller & Sheen, 2008; Stolz et al., 2011). Таким образом, для аналогичного связывания tZ с рецепторами и PUP в оптимальных условиях потребуется примерно 100-кратное увеличение количества последних. Транскриптомные данные указывают на более высокий уровень экспрессии *PUP14* по сравнению с генами цитокининовых рецепторов, хотя это трудно перевести в локальные различия в обилии белков. Более того, даже в условиях большой распространенности PUP, но постоянного поступления экзогенного цитокинина гормон будет связан рецептором, расположенным в ПМ, и инициирует сигнализацию, поскольку не весь экзогенный цитокинин может быть выкачан за один раз. Понижение рН может в конечном итоге сблизить сродство к цитокинину PUP14 и рецепторов за счет снижения сродства последних. Однако, как было замечено выше, при кислом рН способность рецепторов передавать цитокининовый сигнал резко падает, поэтому цитокининовая сигнализация может прекратиться по другой причине, а не из-за истощения цитокинина из апопласта.

Еще одним критическим моментом в экспериментах Zürcher et al. (2016) является использование экзогенно добавленного цитокинина в системе протопластов, поскольку это не позволяет определить, на каком участке действует

гормон. Он может действовать в ПМ или быть перенесен в клетку и действовать внутри ЭР. Все, что снижает уровень экзогенного цитокинина (например, активность СКХ), будет влиять на оба возможных места восприятия. Секретируемый или связанный с ПМ СКХ вряд ли окажет большое влияние на концентрацию внеклеточно применяемого цитокинина в протопластах. Это объясняется большим объемом внеклеточной среды по сравнению с объемом клеток, относительно низкой концентрацией секретируемого или связанного СКХ, а также относительно коротким временем (1 ч), в течение которого применялся цитокинин и измерялась активация люциферазного репортера. Напротив, субклеточный СКХ мог бы оказать значительное влияние на уровни цитокинина, поскольку в этом случае рассматривалась бы гораздо более высокая локальная концентрация СКХ и меньшие объемы. Таким образом, эффект СКХ в этих экспериментах, вероятно, обусловлен его субклеточным распределением, причем как нативный, так и связанный с ПМ СКХ, предположительно, все еще имеет значительную часть, локализованную в просвете ЭР.

Наконец, еще один вопрос касается экспериментов по поглощению *tZ* микросомами, полученными из *35S::PUP1*- и *35S::PUP14*-трансфицированных листьев табака. Эти анализы проводились с изолированными микросомами листьев, состоящими в основном из мембран ЭР, при рН 7.6, что далеко от кислого рН в апопласте, но близко соответствует внутриклеточным условиям. Таким образом, функционирование этого типа анализа, как оно было описано Zürcher et al. (2016), свидетельствует против предложенного способа действия PUP и согласуется с функционированием PUP14 в ЭР. Аргументом против такого функционирования может быть предположение о том, что PUP-опосредованный транспорт связан с протонами. Предыдущие исследования поглощения радиоактивных веществ, проведенные в дрожжевых клетках, экспрессирующих PUP1, показали, что поглощение аденина чувствительно к протонофорам и ингибиторам H^+ -АТФазы (Gillissen et al., 2000). Ко-транспортировка протонов возможна в ПМ, генерирующем градиент рН благодаря активности H^+ -АТФазы, но не в ЭР, где такой градиент

отсутствует. Однако для PUP14 данные о совместном транспорте протонов не были представлены; напротив, описание экспериментов по поглощению микросомами позволяет предположить, что PUP14 не нуждается в протонном градиенте для своей пермеазной активности. Это не уникальный случай, поскольку многие ЭР-конфигурированные транспортеры, такие как транспортер сахарозы ERD6, ксантин/урациловая пермеаза NAT6, транспортер белков семейства SecY (Nikolovski et al., 2012) и транспортеры флавоноидов MATE (Zhao, 2015), не нуждаются в протонном градиенте для своей активности.

В целом, изучение PUP14 показало важность транспорта цитокининов - малоизученной области исследований - и привело к появлению новой концепции в гормональной сигнализации. Однако инициация цитокининового сигнала в ПМ как часть этой концепции в настоящее время не подтверждается экспериментальными данными, поскольку не было проведено соответствующего сопутствующего исследования локализации рецепторов. Очевидно, что на данном этапе не все детали могут быть известны и что требуются дополнительные эксперименты, которые не только важны для лучшего понимания активности PUP14, но и имеют значение для интерпретации сайта действия цитокининового рецептора. В частности, это анализ биохимических характеристик PUP14, таких как pH-зависимость его активности, необходимость или отсутствие протонного градиента, а также более детальное изучение его внутриклеточной локализации.

По нашему мнению, имеющиеся данные не позволяют однозначно утверждать, что существует единственный клеточный сигнальный путь цитокинина, который присутствует во всех ситуациях. Вместо этого, возможно, существует более одного сигнального пути, начинающегося с восприятия цитокинина на поверхности клетки или внутри клетки. Чтобы примирить обе концепции, заманчиво предположить, что активные рецепторы цитокинина могут иметь различную субклеточную локализацию в зависимости от ткани, органа и/или стадии развития. В целом, из исследований на животных хорошо известно, что субклеточная локализация данного белка может варьировать в разных типах клеток/тканей одного

и того же организма (Zhang et al., 2005; Vischioni et al., 2006; Courtaut et al., 2015). Таким образом, можно предположить, что спецификация цитокининового сигнала частично достигается за счет различных пулов цитокининов с различной субклеточной локализацией. Различные пути также могут играть роль в различении дальнего, местного (паракринного) и аутокринного цитокининового сигналинга. Важно отметить, что частичное, но не полное совпадение экспрессии цитокинин-синтезирующего гена *IPT* (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004) и цитокинин-активирующего гена *LOG* (Kuroha et al., 2009) соответствует всем трем типам сигналинга.

Мы предпочитаем инициацию сигнала из ЭР в качестве преобладающего сайта по нескольким причинам. Подавляющее большинство рецепторов расположено именно там и отвечает ряду требований, необходимых для активной сигнализации. К ним относятся правильная топология, специфическое связывание цитокинина при рН, характерном для этого клеточного компартмента, взаимодействие с фосфотрансферными белками и перенос фосфорильной группы от АТФ к фосфотрансферным белкам цитокинин-зависимым образом (Lomin et al., 2011, 2015, 2017; Wulfetange et al., 2011). Наиболее подробно этот процесс был изучен в клетках листьев арабидопсиса, где АНКЗ играет доминирующую роль. Было установлено, что АНКЗ почти полностью находится в ЭР (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011) и необратимо теряет свою лиганд-связывающую активность при рН 5, характерном для апопласта. Кроме того, последствия деградации различных субклеточных пулов цитокинина ферментами СКХ для фенотипа растений и особенно сильные последствия сверхэкспрессии ферментов СКХ, расположенных в ЭР (Werner et al., 2003), убедительно свидетельствуют в пользу того, что ЭР является наиболее значимым местом инициации цитокининового сигнала, по крайней мере, в некоторых тканях. В настоящее время нет достаточного количества прямых экспериментальных доказательств того, что цитокининовый сигнал исходит из ПМ, но это согласуется с данными о том, что удаление

цитокинина из внеклеточного пространства снижает выход сигнала, по крайней мере, в некоторых тканях, таких как эмбрионы на стадии сердца (Zürcher et al., 2016).

Если взять в качестве примера регуляцию роста и развития верхушки побега, которая, вероятно, является одним из наиболее изученных видов деятельности цитокинина, то представляется возможным следующий сценарий, изображенный на рис. 59. Развитие верхушки побега частично, но не полностью зависит от цитокининов типа *tZ*, получаемых из корня (Kudo et al., 2010). Дополнительные цитокинины могут поступать в клетку из соседних клеток либо через плазмодесмы, либо путем высвобождения в апопластическое пространство, либо синтезируясь *de novo* в самой клетке (Sakakibara, 2006). Тем не менее, цитокинины, выделяемые корнями, важны для развития побега, а сок ксилемы преимущественно содержит цитокинины типа *tZ*, особенно *tZR* (около 80%), но также и *tZ* в меньшей пропорции (около 15%), которые, как было показано, активны в побеге (Hirose et al., 2008; Kuroha et al., 2009; Osugi et al., 2017). В принципе, мы можем выделить два различных сигнальных пути цитокинина для этих двух метаболитов, как описано ниже.

de novo внутриклеточно или поступать в цитоплазму через плазмодесмы (ПД) по цитоплазматическому рукаву от соседних клеток. В цитоплазме инактивация *tZ* происходит в основном под действием аденинфосфорибозилтрансферазы 1 (APT1) с образованием *tZRP* (Zhang et al., 2013). *tZ* и *tZR* могут гликозилироваться UDP-гликозилтрансферазами (UGTs) (Šmehilová et al., 2016) с образованием глюкозидов, которые накапливаются в вакуоли. Деградация под действием СКХ происходит в цитоплазме только в определенных тканях (Köllmer et al., 2014) и преобладает в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и вакуоли (Werner et al., 2003; Zalabák et al., 2016). Модель предсказывает буферную роль нуклеотидов цитокинина (*tZRP*) в цитоплазме, из которых ферменты LOG катализируют образование биологически активного *tZ* (Kuroha et al., *tZ* может также образовываться из *tZR* с помощью нуклеозидных рибогидролаз (NRH) (Chen & Kristopeit, 1981; Kopečná et al., 2013). *tZ* является биологически активным метаболитом, который проникает в просвет ER и активирует ER-локализованные рецепторы. Сигнал от активного рецептора достигает ядра и изменяет паттерн транскрипции. Для простоты процессы на основе ЭР показаны в одной клетке (что указывает на аутокринную сигнализацию), но часть цитокинина, активного в данной клетке, может поступать из соседних клеток (паракринная сигнализация), таким образом достигается пространственное разделение между источником сигнала и его восприятием. Модель предсказывает, что гомеостаз цитокинина в ЭР регулируется цитокинин-деградирующими ферментами СКХ и транспортерами PUP, которые откачивают цитокинины из просвета ЭР обратно в цитозоль.

Только полученный из корня *tZ*, транспортируемый через ксилему, может стать непосредственно активным на поверхности клеток побега. Он также может быть деградирован в апопласте ферментом СКХ, превращен в соответствующий рибозид внеклеточной фосфорилазой пуриновых нуклеозидов (PNP) (Bromley et al., 2014) или импортирован в цитоплазму транспортером PUP. Сигнал, генерируемый *tZ* в ПМ, достигает клеточного ядра через двухкомпонентную сигнальную систему. Принятый клеткой *tZ* может быть деградирован или превращен в инертный *tZRP*

аденинфосфорибозилтрансферазой 1 (APT1) (Zhang et al., 2013). Таким образом, он попадает во внутриклеточный пул цитокининов (рис. 59).

Активность другого корневого цитокинина, *tZR*, зависит строго от ферментов LOG (Osugi et al., 2017), что означает, что их биологическая активность требует метаболического преобразования цитокининов в цитоплазме и, следовательно, их поглощения в клетке. Для *tZR* существует еще одно семейство транспортеров, названное равновесными нуклеозидными транспортерами (ENT) (Wormit et al., 2004; Hirose et al., 2005). Ферменты LOG играют центральную роль в образовании из *tZRP* - который, по-видимому, является метаболическим буфером - биологически активного *tZ* в цитоплазме (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009; Tokunaga et al., 2012). Функциональная значимость альтернативы - прямого образования активных оснований из рибозидов нуклеозидными рибогидролазами - менее ясна (Chen & Kristopeit, 1981; Коресná et al., 2013).

Недавно три независимые исследовательские группы сообщили об открытии различных транспортеров цитокининов, что способствовало решению вопроса об импорте и экспорте цитокинина в ЭР. Шесть различных белков, принадлежащих к семействам AZA-GUANINE RESISTANT (AZG), ABC подсемейства I (ABCI) и PUP арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и риса (*Oryza sativa*), были описаны как ЭР-ассоциированные транспортеры цитокининов (Tessi et al., 2021; Kim et al., 2020; Xiao et al., 2019, 2020). Предполагается, что они функционируют как импортеры цитокининов, экспортеры цитокининов или как посредники двунаправленного транспорта цитокининов. Мутация или сверхэкспрессия генов транспортеров вызывала различные фенотипические изменения, такие как изменение ветвления корней и/или изменение чувствительности к цитокининам. Эти изменения свидетельствуют об изменении гомеостаза цитокининов и подтверждают функциональную связь транспортеров с цитокининами.

Tessi et al. описали новые пуриновые транспортеры арабидопсиса, AZA-GUANINE RESISTANT1 (AZG1) и AZG2. Было показано, что оба белка AZG функционируют как транспортеры цитокининов, на что указывает ингибирование

транспорта аденина различными цитокининами в дрожжах. Анализ белков AZG-GFP показал, что AZG1 локализуется исключительно в ПМ, в то время как AZG2 находится как в ПМ, так и в мембранах ЭР. На дрожжах было показано, что AZG2 способствует перемещению оснований цитокининов (iP, tZ, 6-бензиладенин (BA)] через мембрану в обоих направлениях. Таким образом, было предложено, что AZG2 облегчает диффузии цитокининов в мембранных ЭР, которая не зависит от источника энергии. Соответственно, направление транспорта должно зависеть от направления градиента концентрации цитокининов. Поэтому активность ферментов, деградирующих цитокинины в просвете ЭР, имеет значение для определения направления транспорта цитокининов. В любом случае, присутствие такого транспортера в ЭР поддерживает концепцию о том, что ЭР является важным клеточным компартментом для инициации цитокининового сигналинга рецепторами.

Экспрессия AZG2 была в основном ограничена клетками, окружающими примордии боковых корней, и сильно повышалась под действием ауксина в ARF7-зависимой манере. Мутанты *Azg2* имели больше боковых корней, что позволяет предположить, что AZG2 участвует в регуляции архитектуры корней под действием цитокинина. Более того, мутанты *azg2* были частично нечувствительны к экзогенному цитокину. Авторы предложили сценарий, в котором AZG2 переносит внеклеточный цитокинин через ПМ в ЭР, где генерирует сигнал, вызывающий ингибирование образования боковых корней.

Три белка семейства транспортеров ABCI арабидопсиса, а именно ABCI19, ABCI20 и ABCI21 (Kim et al., 2020), по-видимому, более широко экспрессируются в тканях растений. Было показано, что соответствующие гены экспрессируются во всех тканях проростков, но более сильно в корнях, особенно в кончиках корней, чем в побегах. Тройной и двойной нокаут-мутации *abci19,20,21* и *abci20,21* делали проростки гиперчувствительными к цитокинину, но не к любому другому фитогормону.

Повышенная экспрессия репортера цитокининов в мутантах *abci20,21* подтвердила измененный гомеостаз цитокининов. Эти транспортеры могут взаимодействовать, образуя большие периферические белковые комплексы, расположенные на мембране ЭР. Авторы предположили, белки ABCI способствуют выходу цитокинина из ЭР, удаляя гормон от места его действия. Однако для этих белков ABCI не была показана прямая транспортная активность. Поэтому молекулярные детали транспорта цитокининов белками ABCI19 - ABCI21 еще предстоит изучить.

OsPUP4 риса локализуется в ПМ, а OsPUP7 – в ЭР (Xiao et al., 2019). Интересно, что, несмотря на их различную субклеточную локализацию, сверхэкспрессия любого из этих двух генов транспортеров приводила к одинаковому фенотипу растений *bg3-D* (крупные зерна). Цитокинин влияет на размер зерна. Авторы предположили, что эти транспортеры СК могут способствовать как локальному, так и дальнему транспорту цитокининов, усиливая загрузку цитокининов в ЭР и последующее перемещение цитокининов через симпласт для доставки в клетки сосудистого пучка (Xiao et al., 2019). Совсем недавно стало известно, что OsPUP1 также локализован в мембране ЭР. Поскольку сверхэкспрессия OsPUP1 приводила к противоположным последствиям, авторы предположили, что OsPUP1 способствует транспорту цитокининов в обратном направлении; а именно, он загружает цитокинины в ЭР клеток сосудистой ткани, а затем эти цитокинины распространяются через симпласт среди соседних клеток (Xiao et al., 2020). Поскольку выводы о функциональности этих PUP основаны главным образом на локализации транспортеров и фенотипе растений с повышенной экспрессией, их следует рассматривать как предварительные. Тем не менее, они являются реальными кандидатами на роль в субклеточном распределении цитокининов.

В соответствии с моделью, предполагающей два различных клеточных сайта инициации цитокининовой сигнализации, функции корневого *tZ* и *tZR* в побеге различны (Osugi et al., 2017). Эксперименты с прививками показали, что корневой

tZR контролирует размер листьев, а также размер и активность (образование листьев) апикальной меристемы побега. В отличие от этого, корневой *tZ* вносит вклад только в регуляцию размера листьев. Таким образом, *tZ* регулирует размер листьев независимо от пути LOG, в то время как активность *tZR* полностью зависит от функционального пути LOG. Возможно, что *tZ* непосредственно воспринимается в ПМ развивающегося примордия листа для регуляции деления клеток, хотя это не было изучено в данной публикации. В целом, прямая активация цитокининовой сигнализации в ПМ может происходить в некоторых тканях или на некоторых стадиях развития.

Цитокинин, транспортируемый в обратном направлении от побега к корням, также функционально важен, поскольку он необходим для поддержания сосудистого рисунка в меристеме корня (Bishopp et al., 2011). Базипетальное перемещение цитокинина происходит во флоэме, при этом он переносится от клетки к клетке через симпластические связи, которые являются плазмодесмами. Перемещение цитокинина через плазмодесмы может осуществляться главным образом через десмотрубки, которые являются частями ЭР, достигающими плазмодесм, или через цитозольный рукав, который является продолжением цитозоля, окружающего десмотрубку. В любом случае, цитокинину, поступающему из удаленных мест, в случае дальнейшей передачи сигнала не нужно достигать внеклеточного пространства, он может действовать внутриклеточно на рецепторы, расположенные в ЭР (рис. 59).

Помимо дальнейшей сигнализации, существует множество важных для развития функций цитокинина в локальной (паракринной) сигнализации (Hwang et al., 2012). Например, во время формирования боковых корней цитокинин вырабатывается очень рано в клетках-основателях боковых корней. Затем он передается в соседние клетки пероцикла, чтобы предотвратить инициацию боковых корней в этих клетках (Chang et al., 2015). Это подавляющее действие цитокинина было доказано мутацией генов синтеза цитокинина, которые активны в клетках-основателях примордиев, поскольку это вызывает образование боковых корней из соседних клеток (Chang et

al., 2015). Другие известные примеры локально ограниченной сигнализации цитокинина - формирование сосудистой системы (De Rybel et al., 2016), регуляция размера и активности апикальной меристемы побега (Chickarmane et al., 2012; Bartrina et al., 2011), инициация придаточных меристем (Wang et al., 2014), органогенез симбиотических клубеньков (Reid et al., 2017) и формирование структуры во время эмбриогенеза (De Rybel et al., 2014; Zürcher et al., 2016). В этих условиях цитокинин может симпластически перемещаться между клетками через цитозольный рукав и/или десмотрубки плазмодесм. Для передачи сигнала он может в основном использовать ЭР-путь (рис. 59), но в принципе не исключается и передача сигнала через ПМ. В любом случае, таким образом достигается пространственное разделение между источником сигнала и его восприятием.

Недавние исследования показали, что цитокинины воспринимаются на поверхности клетки и на рецепторах, локализованных в ЭР (Antoniadi et al., 2020; Kubiasova et al., 2020). Судя по всему, оба участка восприятия важны для организации цитокининового сигналинга.

И последнее, но не менее важное: может существовать аутокринная цитокининовая сигнализация, действующая в той же клетке, которая производит гормон (рис. 59). Насколько нам известно, не существует хорошо документированного примера такого типа сигнализации, но она может играть роль в регуляции клеточного цикла, что является классической активностью гормона. Другая роль аутокринной сигнализации может заключаться в защитной реакции на абиотический стресс. В этом контексте передача сигнала цитокинина в другие органы или соседние клетки представляется менее значимой. Однако клеточный цитокининовый статус играет роль в ответе на различные абиотические стрессы, например, на засуху (Nishiyama et al., 2011; Macková et al., 2013), на сильный световой стресс (Cortleven et al., 2014) или на стресс, вызванный изменением фотопериода (Nitschke et al., 2016). В данном случае цитокинин, по-видимому, необходим для защиты самих клеток, реагирующих на стресс. Мы предполагаем, что этот тип сигнализации исходит из ЭР (рис. 59).

В дальнейшем более конкретные манипуляции с различными субклеточными пулами цитокининов будут полезны для выяснения их функциональной значимости. По нашему мнению, предложенная интегративная модель может служить руководством для дальнейших углубленных исследований молекулярного механизма и субклеточной топологии действия цитокининов.

3.4 Моделирование белок-белковых взаимодействий в сигнальной трансдукции цитокинина

3.4.1 Интерфейсы димеризации сенсорного модуля

Были построены гомологические модели димерных структур сенсорных модулей *A. thaliana* (АНК2-4) и *S. tuberosum* (StНК2-4) (рис. 60 А-D) и проанализированы интерфейсы димеризации гомо- и гетеродимеров сенсорных модулей *Arabidopsis* и гомодимеров сенсорных модулей картофеля (всего девять комплексов). Белки-мишени были идентичны не менее чем на 61%. Все модели имели приемлемую статистику графика Рамачандрана.

Только мембранно-дистальная часть субдомена димеризации сенсорных модулей участвовала в формировании белок-белкового интерфейса (PPI). Площадь интерфейса смоделированных комплексов варьировала между 946 Å² и 1044 Å² в зависимости от состава субъединиц димера. Большинство аминокислот интерфейса сенсорного модуля были высоко консервативными и идентичными у арабидопсиса и картофеля (Рисунок 60 В и Рисунок 61А), но есть несколько переменных остатков на периферии интерфейса. Интерфейсы сенсорного модуля включали гидрофобное ядро с по крайней мере двумя ароматическими остатками (фенилаланин и тирозин) в центре, в то время как периферия интерфейса была в основном гидрофильной (Рисунок 60 С и Рисунок 61 В). Такой тип распространения гидрофобности с гидрофобным ядром и гидрофильной периферией является обычным для белок-белковых интерфейсов (Laddach et al., 2018). Также было изучено распределение электростатических потенциалов по поверхностям интерфейсов. Это распределение имело как общие, так и некоторые специфические черты при сравнении с изученными белками (рис. 60 D). Например, АНК3 имел две

положительно заряженные аминокислоты, аргинин 303 и лизин 162, в дистальной части интерфейса; отрицательно заряженный глутамат 182 в проксимальной части; и группу положительно (аргинин 170 и аргинин 178) и

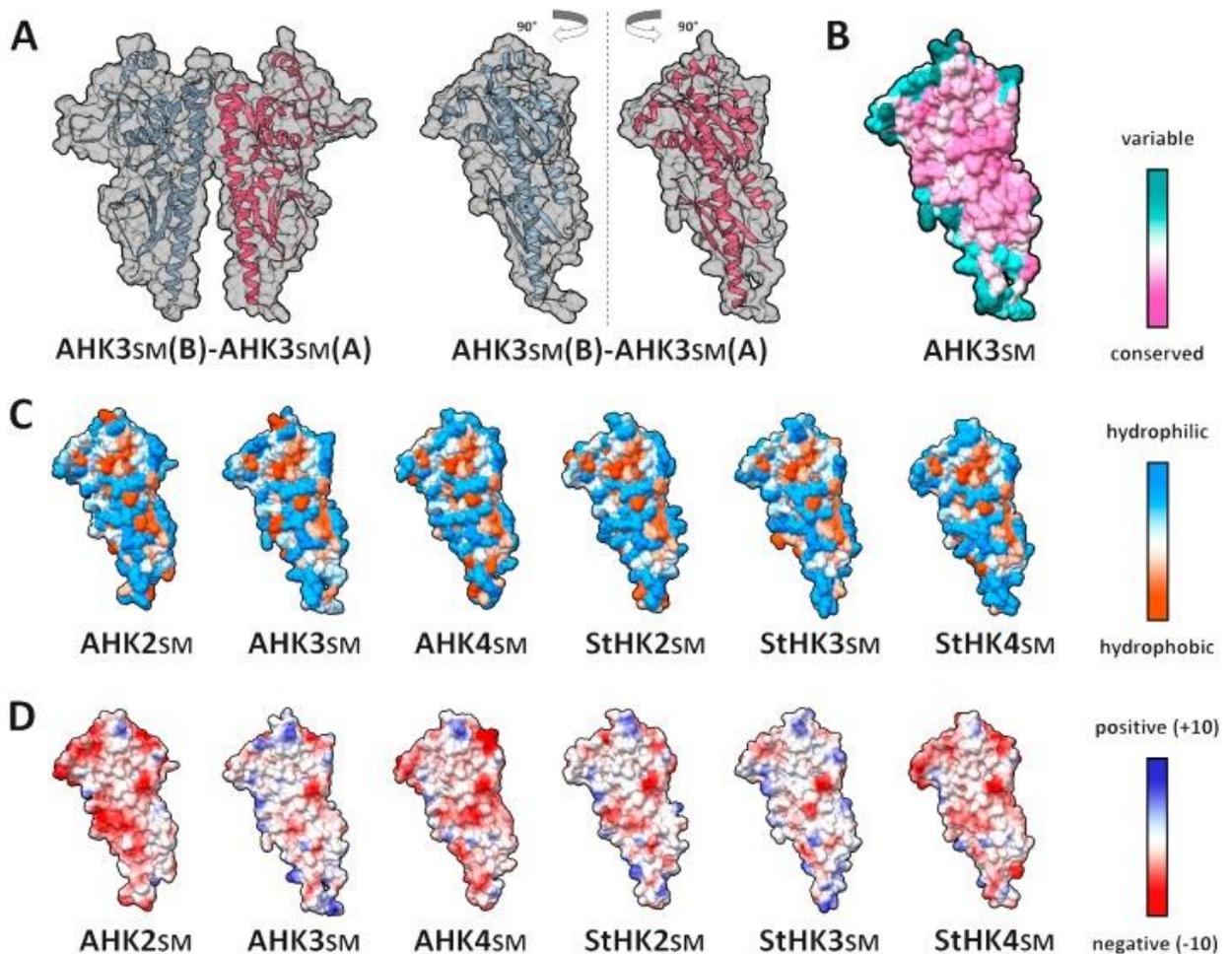


Рисунок 60. Свойства поверхностей сенсорного модуля рецептора цитокининов, образующих интерфейсы белок-белкового взаимодействия. (А) общий вид гомодимера ANK3_{sm} (слева) и его повернутых субъединиц, показывающих сторону интерфейса (справа); (В-Д) стороны интерфейса смоделированных поверхностей сенсорных, окрашенных по различным признакам: (В) консервативность; (С) гидрофобность; (Д) электростатический потенциал.

отрицательно (аспарат 168 и глутамат 174) заряженных остатков в латеральной области (Рисунок 61 С). Три из этих позиций (аргинин 303, аргинин 170 и глутамат 174) являются переменными, как и глицин 161, который может быть заменен на гистидин в паралогичных гистидинкиназах (рис. 61 А).

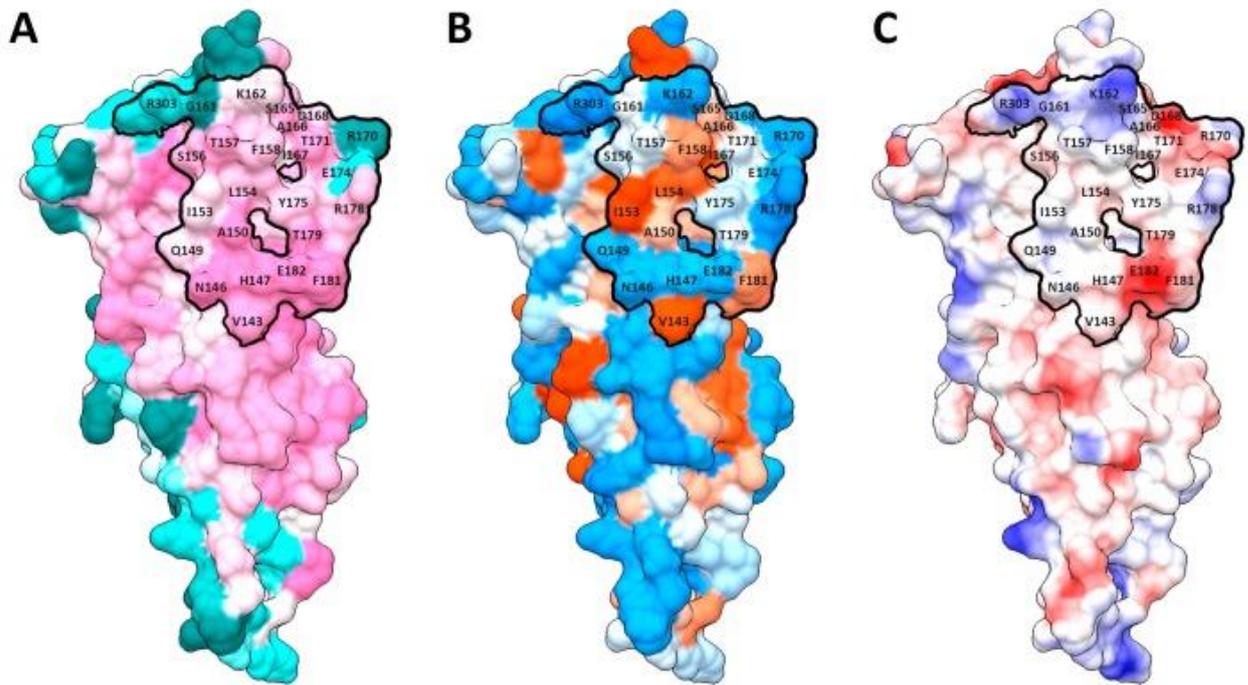


Рис. 61. Свойства стороны PPI интерфейса поверхности сенсорного модуля гомодимера АНКЗ, с выделенным интерфейсом димеризации. (А) сохранение; (В) гидрофобность; (С) электростатический потенциал. Интерфейсы димеризации имели 5-11 водородных связей и до пяти предполагаемых солевых мостиков, согласно программе PISA. Гидрофобные р-значения, мера степени гидрофобности, отличались для изученных димеров SM арабидопсиса (0.35-0.52) и картофеля (0.2-0.25).

Рассчитанные значения сродства связывания для димеров сенсорных модулей варьировали от -36 до -43 кДж/моль, согласно результатам сервера Prodigy. Расчеты Prodigy также показали, что общее число межмолекулярных контактов в пределах порогового расстояния 5.5 Å варьировало от 73 до 91, включая 5-14 заряженно-заряженных, 12-20 заряженно-полярных, 13-22 заряженно-аполярных, 1-4 полярно-полярных, 10-14 аполярно-полярных и 24-26 аполярно-аполярных контактов.

Для поиска критических аминокислот (горячих точек) и их взаимодействий в интерфейсах, определяющих силу и специфичность димеризации цитокининовых рецепторов, было проведено виртуальное аланиновое сканирование для сенсорных модулей арабидопсиса и картофеля. Остатки, которые изменяли свободную энергию ΔG димера более чем на 2 кДж/моль при переходе в аланин, рассматривались как

горячие точки. Сканирование с помощью Robetta для всех гомо- и гетеродимеров выявило две аминокислотные позиции, которые были горячими точками в обеих цепях всех комплексов: фенилаланин 158 и тирозин 175, в соответствии с нумерацией АНК3. Некоторые позиции были горячими точками в большинстве комплексов, по крайней мере, в одной цепи: гистидин 147, лизин 162, треонин 171, аргинин 178 и гутамат 182. Для гомодимера АНК3sm было проведено дополнительное исследование остатков в интерфейсе, включая предсказание горячих точек с помощью KFC2 и PPCheck и расчет процента площади недоступной поверхности (BSA) по отношению к площади доступной поверхности (ASA). Все вышеупомянутые позиции были консервативными (кроме лизина 162) и подтверждены (кроме лизина 162 и аргинина 178) как горячие точки по результатам расчета с помощью KFC2 для гомодимера АНК3. Более того, все эти остатки, за исключением лизина 162 и аргинина 178, имели высокий процент BSA (более 85%, согласно расчету с помощью PISA). Фенилаланин 158 может участвовать в π - π стэкинг-взаимодействии с соответствующим остатком димерного аналога. При рассмотрении гомодимера АНК3, тирозин 175:В ("В" после двоеточия означает субъединицу В) может образовывать водородные связи с кислородом основной цепи аланина 150: А ("А" после двоеточия означает субъединицу А); гистидин 147 образует стэкинг-контакты с гистидином 147 партнера по димеру; лизин 162 может взаимодействовать с аспаратом 168 другой субъединицы через солевые мостики, а также может образовывать водородные связи с треонином 171; аргинин 178 может образовывать водородную связь с серином 156 партнера; гутамат 182 может взаимодействовать с аспарагином 146 партнера (рис. 62). Горячие точки в сенсорных модулях димеров *S. tuberosum* были похожи на димеры *Arabidopsis*, особенно при сравнении ортологов. Это легко объясняется высоким процентом идентичности между ортологичными сенсорными модулями, 78-80%. В целом, это относится и к составу связей, образуемых горячими точками в димеризационных интерфейсах сенсорных модулей картофеля. Однако, согласно анализу PISA, гомодимер StHK2sm отличался отсутствием солевых мостиков в интерфейсе PPI.

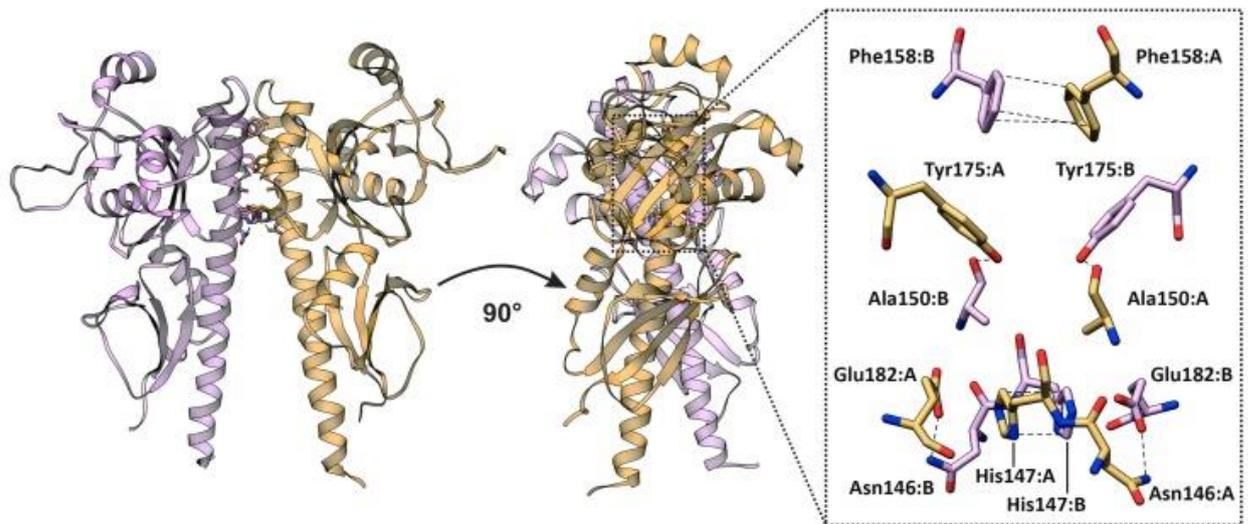


Рис. 62. Взаимодействия, образованные основными горячими точками в димеризационном интерфейсе гомодимера сенсорного модуля АНК3. Разные цвета обозначают две субъединицы гомодимера: цепи А и В окрашены в фиолетовый и коричнево-желтый цвета, соответственно.

2D-карты, полученные с помощью MolSurfer, позволили нам исследовать гидрофобность и электростатический потенциал интерфейсов в смоделированных комплексах MSP. Профили гидрофобности были очень похожи во всех димерах сенсорных модулей арабидопсиса и картофеля. Для определения электростатического потенциала для всех димеров при двух различных значениях рН были получены файлы PQR. Комплементарность электростатического потенциала при рН 5.5, типичном для среды апопласта, была меньше, чем при рН 7.1, который имитирует среду ЭР. Следовательно, нейтральный рН внутри клетки должен благоприятствовать димеризации сенсорных модулей по сравнению с кислым рН в апопласте. Эти результаты согласуются с экспериментальными данными, показывающими, что ЭР является основным компартментом для димеризации рецептора цитокинина. Некоторые различия в комплементарности поверхности субъединиц были замечены между гомодимерами и при рН 7.1. Гомодимеры *Arabidopsis* АНК2sm-АНК2sm и АНК3sm-АНК3sm были четко комплементарны, тогда как гомодимер АНК4sm-АНК4sm, все гетеродимеры и гомодимеры картофеля были комплементарны в меньшей степени. Однако при

любом сочетании паралогов области комплементарности, по-видимому, достаточно велики, чтобы обеспечить образование димеров.

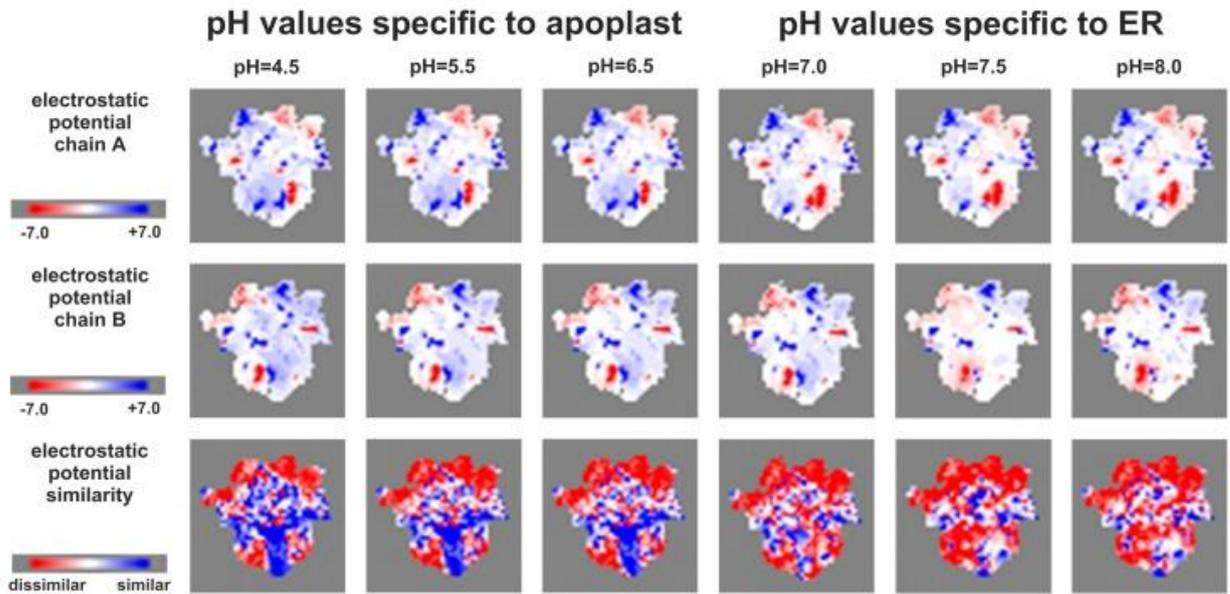


Рис. 63. 2D-карты (проекция) электростатических потенциалов интерфейса гомодимера сенсорного модуля АНК3, рассчитанные с помощью сервера MolSurfer, с использованием файлов PQR, полученных при различных значениях рН. Верхний ряд - проекция цепи А, средний ряд - цепи В, нижний ряд - сходство электростатических потенциалов обеих цепей. Для электростатических потенциалов синий цвет означает положительный заряд (+7), белый - нейтральный (0), красный - отрицательный (-7). Для сходства электростатических потенциалов: синие - наиболее схожие зоны, красные - наиболее несхожие зоны. Наибольшее несходство (красный цвет) означает наибольшую комплементарность электростатических потенциалов.

Чтобы проверить предположение о негативном влиянии снижения рН на комплементарность димеризационных интерфейсов сигнальных модулей, были проведены расчеты с более широким диапазоном значений рН для отдельного комплекса, гомодимера АНК3. Были проведены расчеты с файлами PQR, подготовленными при шести различных значениях рН, соответствующих дисперсии значений рН в апопласте (4.5, 5.5 и 6.5) и ЭР (7.0, 7.5 и 8.0). Результаты показали (рис. 63) высокую комплементарность при рН 7-8 и наличие больших

некомплементарных областей при значениях рН ниже 6.5 (особенно при рН 4.5), подтверждая тем самым наше предположение.

3.4.2 Взаимодействия рецептор-фосфотрансмиттер

Были построены гомологические модели для всех комбинаций комплексов фосфотрансмиттеров АНР1-3, связанных с ресиверными доменами цитокининовых рецепторов АНК2-4 арабидопсиса, а модель АНК5rd-АНР1 служила контролем (сравнение с кристаллической структурой АНК5rd-АНР1, PDB ID: 4EUK). Всего было смоделировано 10 комплексов *A. thaliana* (Рисунок 64). Домены рецепторов StНК2-4 *S. tuberosum* были смоделированы как комплексы с фосфотрансферным белком StНР1а, всего три комплекса (Рисунок 64).

Структуры ресиверных доменов рецепторов цитокининов включают пятицепочечный параллельный β -лист, окруженный пятью основными (и часто одной дополнительной) α -спиралями. Фосфотрансферные белки арабидопсиса состоят из шести α -спиралей и не имеют β -листов. В комплексе α 1-спираль ресиверного домена была наиболее близка к домену фосфотрансмиттера, образуя преобладающую часть интерфейса рецептор-фосфотрансмиттер. Фосфорилированный остаток аспартата (аспартат 941 в АНК3rd) находился в другой области молекулы АНКrd, а именно на краю β 3-листа, прилегающей к петле L5. Этот участок был доступен для фосфоакцепторного остатка гистидина (гистидин 82 в АНР2) фосфотрансмиттера. В последнем случае три α -спирали (α 2, α 3 и α 4) из шести были вовлечены в формирование интерфейса взаимодействия.

Согласно оценке PISA, смоделированные комплексы MSP различались по свойствам интерфейса взаимодействия. Большинство комплексов имели гидрофобные р-значения в диапазоне от 0.27 до 0.81, при этом комплекс АНК3rd-АНР1 отличался низким р-значением. Площадь интерфейса различных комплексов варьировалась между 777 и 942 Å². Количество водородных связей в интерфейсах взаимодействия смоделированных комплексов варьировало от 5 до 13, а количество солевых мостиков - от 1 до 9. Предсказанная аффинность связывания, согласно расчетам в Prodigy, варьировала между -40 и -50 кДж/моль.

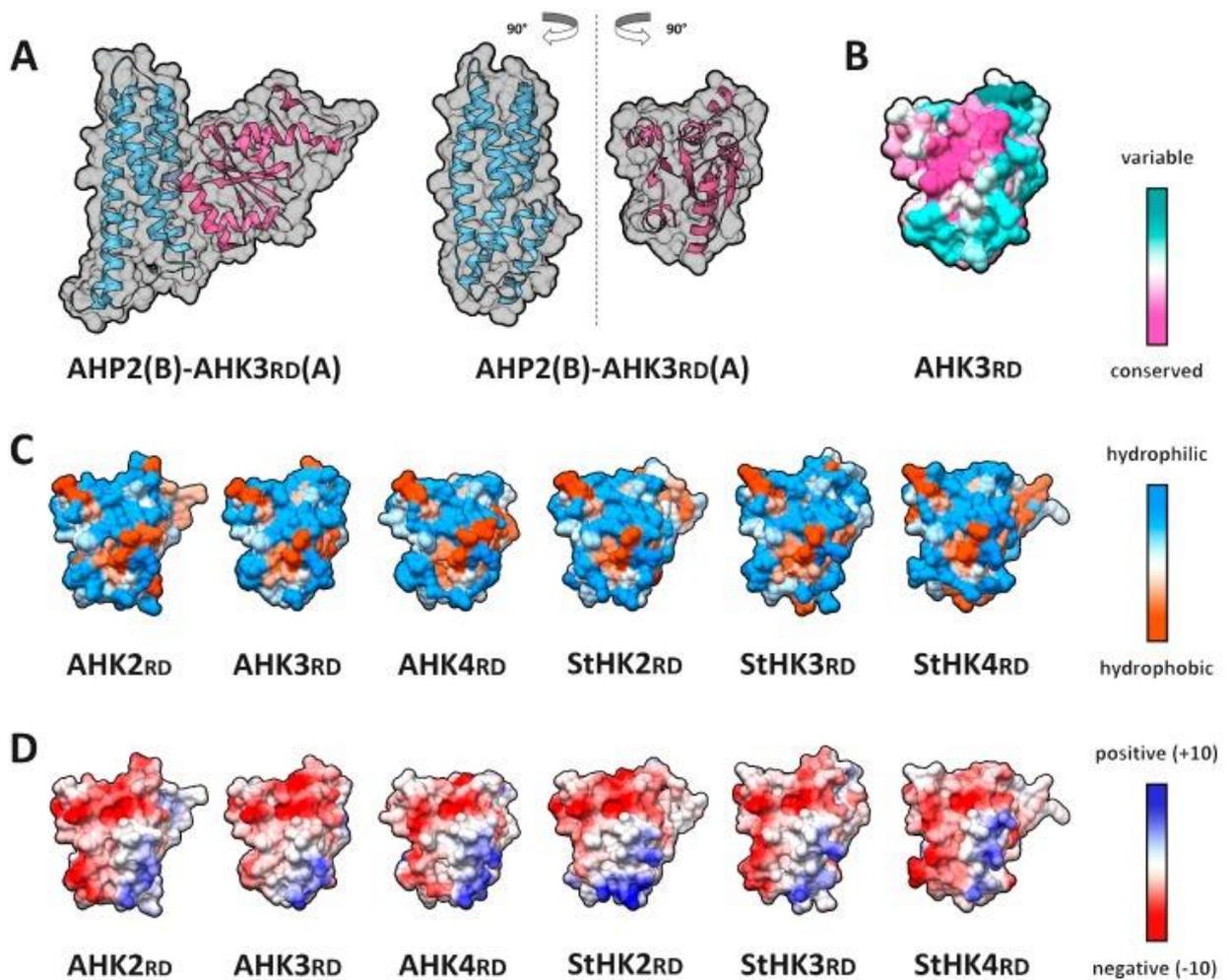


Рис. 64. Свойства интерфейсов взаимодействия ресиверных доменов рецепторов цитокининов. (А) общий вид комплекса АНК3rd-АНР2 (слева) и его повернутые субъединицы, показывающие сторону интерфейса (справа); (В-Д) поверхности интерфейсов смоделированных доменов рецепторов, окрашенные по различным признакам: (В) консервативность; (С) гидрофобность; (Д) электростатический потенциал.

Почти половина аминокислотных-остатков НКrd и большинство аминокислотных-остатков интерфейса НРt были высоко консервативными (оценка ConSurf 7 и выше) (Рисунок 64 В и Рисунок 65 А). Примечательно, что область интерфейса является наиболее консервативной частью обоих взаимодействующих белков. Распределение гидрофобных и гидрофильных областей на интерфейсах всех исследованных комплексов НК-НРt было очень похожим. В интерфейсах НКrd и НРt имелось гидрофобное ядро, окруженное гидрофильными остатками с

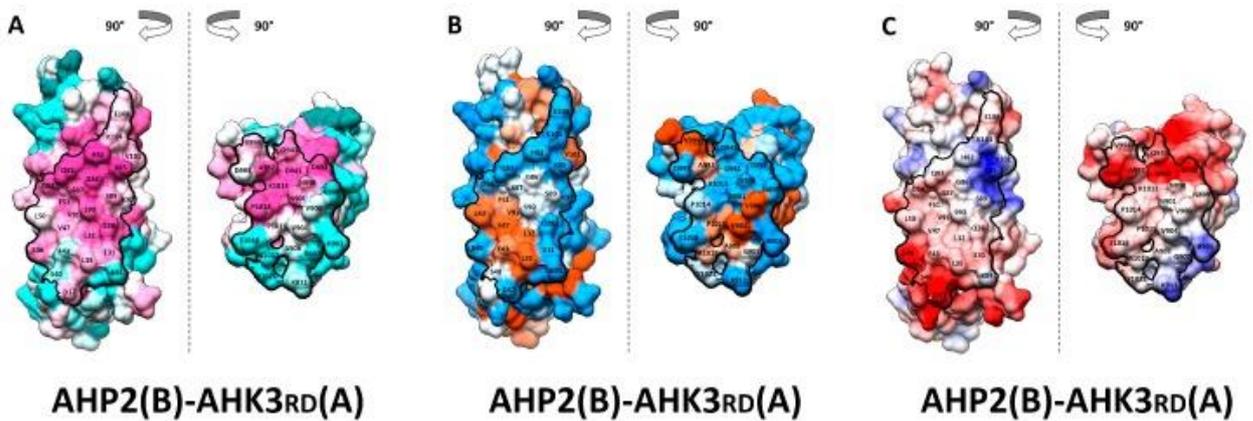


Рис. 65. Свойства интерфейса АНК3rd-АНР2. (А) консервативность; (В) гидрофобность; (С) электростатический потенциал. Обозначения цветов такие же, как на рисунке 64.

дополнительной небольшой гидрофобной областью на периферии (Рисунок 65 С и Рисунок 65 В). Исследования распределения по поверхности электростатического потенциала показали комплементарность интерфейсов взаимодействия НКrd и НРt. Центральная область была нейтральной или почти нейтральной у обоих белков с явно отрицательным сектором на одном краю интерфейса НРt, который соответствовал положительной области интерфейса НКrd, и положительным сектором на другом краю, который соответствовал отрицательной части интерфейса НКrd (Рисунок 64 D и Рисунок 65 С). Согласно результатам MolSurfer, РРI интерфейсы всех комплексов арабидопсиса и картофеля имели очень похожие и комплементарные паттерны гидрофобности. Электростатическая комплементарность потенциалов при рН 7,3 (цитозольный рН) была четко видна во всех комбинациях димерных аналогов, причем комплексы StНК2rd-StНР1a и StНК3rd-StНР1a отличались идеальным соответствием. Эта высокая электростатическая комплементарность, а также высокий уровень консервативности остатков в интерфейсе (особенно в НРt аналоге) могут объяснить отсутствие избирательности во взаимодействия НК-НРt.

Для выявления критических аминокислот и их взаимодействий в интерфейсах, определяющих связывание между рецепторами цитокининов и фосфотрансферными белками, было проведено виртуальное аланиновое

сканирование. Все 13 комплексов были исследованы не только для характеристики отдельных пар белков, но и для выделения общих тенденций. Для аналога НКrd три "горячие точки" лизин 1013, аспарагин 898 и аспарагин 901 (нумерация АНКЗ) были четко выявлены во всех исследованных комплексах, а две дополнительные предполагаемые "горячие точки", валин 900 и аргинин 903, были обнаружены более чем в двух, но не во всех комплексах. Для НРt были выявлены две сильно консервативные горячие точки, глутамин 83 и серин 87, а также две менее консервативные, аспартат 54 и серин 90 (нумерация АНР2).

Для комплекса АНК3rd-АНР2 было проведено дополнительное исследование остатков интерфейса, включая предсказание горячих точек с помощью KFC2 и PPCheck, а также расчет процента BSA по отношению к ASA. Статус горячей точки был подтвержден для позиций аспарагин 898, аспарагин 901, валин 900 и аргинин 903 в аналогах АНКrd, но не для лизина 1013. Позиции аспарагина 898, аспарагина 901 и лизина 1013 были высоко консервативными (оценки ConSurf 7, 8 и 9 баллов, соответственно); аспарагин 898, аспарагин 901 и валин 900 характеризовались более чем 90% содержанием BSA, тогда как лизин 1013 имел всего около 40%. Все предсказанные горячие точки интерфейса НРt были высококонсервативны (оценки ConSurf от 8 до 9), но только позиция серина 90 была подтверждена как горячая точка с помощью KFC2 и PPCheck. Для серина 90 BSA составил почти 100%, для глутамина 83 и серина 87 - более 80%, а для аспартата 54 – только около 60%.

Лизин 1013 не образовывал межмолекулярных водородных связей или солевых мостиков, но хорошо известно, что его внутримолекулярный солевой мостик с аспартатом 941 стабилизирует активную конформацию и обеспечивает связывание с Mg^{2+} , необходимого для фосфорилирования (Pekárová et al., 2011). Аспарагин 898 и аспарагин 901 из АНКЗ образовали по крайней мере три водородные связи с боковыми цепями остатков АНР. Аспарагин 898 взаимодействовал с глутамином 83 и серином 87 из НРt, аспарагин 901 образовал водородную связь с серином 90 (рисунок 66). Эти остатки аспарагинов расположены в пределах участка спирали L1- α 1 в ресиверном домене. В аналогах НРt остатки

серина и глутамата, образующие водородные связи с остатками аспарагинов в НКrd, расположены в спирали $\alpha 4$.

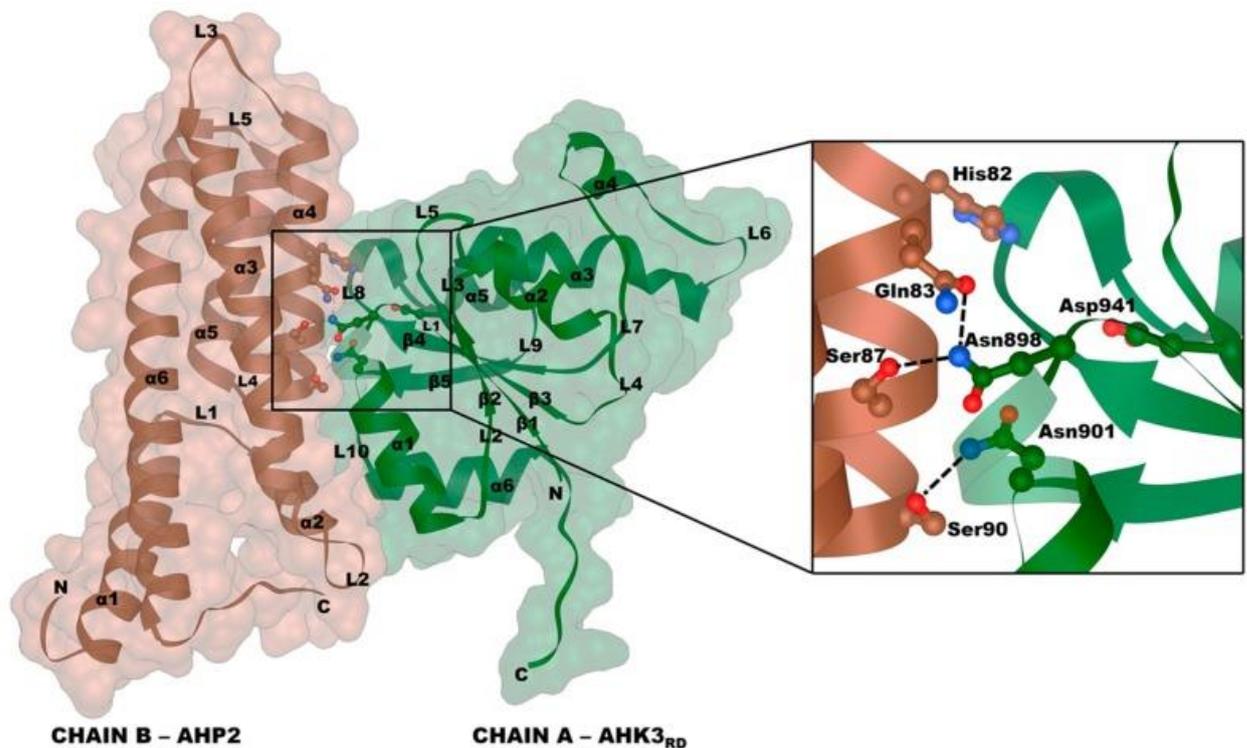


Рис. 66. Взаимодействия, образованные горячими точками в интерфейсе комплекса АНК3rd-АНР2.

Большинство результатов аланинового сканирования были сходными между арабидопсисом и картофелем, за исключением незначительных особенностей. Например, лизин 1142 (соответствующий лизину 910 в АНК3) был обнаружен в качестве горячей точки только в ресиверном домене-аналоге комплекса StНК2rd-StНР1а, в то время как другие комплексы не имели горячей точки в этом положении.

В работе Rekárová et al. 2011 изучали взаимодействие между СК11 (который является гистидинкиназой, но не рецептором цитокининов) и белками АНР1-6. Результаты их исследования ViFC указывают на тесное взаимодействие СК11 с АНР2, АНР3 и АНР5, более слабое взаимодействие с АНР1 и отсутствие взаимодействия с АНР4 и АНР6. Эксперименты по дрожжевому двугибридному анализу подтвердили эти результаты, за исключением отсутствия взаимодействия между СК11rd и АНР1, а взаимодействие СК11rd-АНР5 было слабее, чем взаимодействие с АНР2 и АНР3. Эксперименты ELISA также показали сильное

взаимодействие SKI1rd с ANP2 и ANP3, в то время как взаимодействие SKI1rd с ANP5 было слабее. В случае ANP2 и ANP3 эти данные согласуются с нашими результатами. Разница в случае с ANP1 может быть объяснена как различной локализацией, так и структурными особенностями SKI1 и цитокининовых рецепторов. SKI1 расположен в плазматической мембране (Pekárová et al., 2011), в то время как рецепторы цитокининов локализованы в основном в ЭР. Основным структурным отличием цитозольных частей этих белков является отсутствие у SKI1, как и у всех гистидиновых киназ, кроме цитокининовых рецепторов, ресиверного домена. Гипотетически, этот домен может играть косвенную роль во взаимодействии с NPt. При сравнении рецепторов SKI1 и цитокининов также обнаружено различие в интерфейсе взаимодействия RD-NPt. Аспарагин 901 (нумерация ANK3), который был горячей точкой в наших расчетах, в SKI1 был заменен на серин (серин 997, нумерация SKI1). Это может привести к более слабым взаимодействиям с некоторыми NPts.

В работе Bauer et al. 2013 исследовали взаимодействие между SKI2 (ANK5) и белками ANP1-6. В экспериментах ViFC было показано, что SKI2 взаимодействует со всеми NPts, кроме ANP4. Взаимодействие с ANP2 и ANP5 было несколько более выраженным, чем с другими. Аффинность связывания SKI2 с ANP1-3 была очень похожей, согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, с небольшим уменьшением константы диссоциации для взаимодействия с ANP2. Это коррелирует с нашими данными о беспорядочном взаимодействии ANK2-4 с ANP1-3. Примечательно также, что аспарагин 901 (нумерация ANK3) не был замещен в SKI2 (аспарагин 789, нумерация SKI2), в отличие от SKI1. Это может указывать на влияние данного положения аминокислот на специфичность взаимодействия RD-NPt.

3.4.3 Влияние фосфорилирования на взаимодействие NKrd-NPt

Для изучения влияния специфического фосфорилирования на взаимодействие NKrd-NPt были построены модели димеров ANK3rd-ANP2 с использованием вариантов фосфорилирования остатков и присутствия ионов Mg^{2+} .

Фосфоакцепторные остатки были модифицированы в сервисе Vienna-PTM. Гистидин был практически фосфорилирован по атому Nε, с зарядом -2 (без протонирования), и такой же заряд использовался для фосфоаспартата. Были проанализированы пять вариантов комплекса, один без Mg²⁺ дикого типа и четыре со связанным Mg²⁺: дикий тип, димер с фосфорилированным апартатом 941 в АНК3rd, димер с фосфорилированным гистидином 82 в АНР2 и димер с обоими фосфорилированными фосфоакцепторными остатками. Кроме того, были смоделированы два димера с фосфорилированием, имитирующим мутации в АНК3rd (D941E) и в АНР2 (H82E), также в присутствии Mg²⁺ (Таблица 17).

Таблица 17. Влияние фосфорилирования и Mg²⁺ на взаимодействие рецептора цитокининов (rd)-HRt согласно расчетам сервера Prodigy.

Protein-Protein Complex	ΔG (kcal/mol)	ΔG (kJ/mol)	K _d (μM) at 25 °C
АНК3rd-АНР2_Apo	-8	-33.47	1.3
АНК3rd-АНР2_Mg ²⁺	-8.5	-35.56	0.6
АНК3rd(P)-АНР2_Mg ²⁺	-8.8	-36.82	0.35
АНК3rd-АНР2(P)_Mg ²⁺	-7.9	-33.05	1.5
АНК3rd(P)-АНР2(P)_Mg ²⁺	-8.1	-33.89	1.1
АНК3rd(D941E)-АНР2_Mg ²⁺	-8.5	-35.56	0.54
АНК3rd-АНР2(H82E)_Mg ²⁺	-8.4	-35.15	0.72

Жирным выделено фосфорилированное (P) состояние белка или имитация (D941E, H82E) такого состояния.

В работе Pekárová et al. 2011 экспериментально было показано, что добавление Mg²⁺ к комплексу SKI1rd-АНР2 увеличивало сродство связывания, но добавление Mg²⁺ вместе с BeF3- снижало его до уровня ниже, чем у апоформ. В случае комплекса SKI1rd-АНР3 добавление Mg²⁺ привело к небольшому снижению сродства, тогда как добавление Mg²⁺ вместе с BeF3- увеличило сродство до уровня выше, чем у апоформ.

Наш анализ моделей димеров АНК3rd-АНР2 в различных состояниях фосфорилирования (табл. 17) показал, что Mg²⁺-связанные партнеры MSP заметно увеличивали их взаимное сродство по сравнению с апоформой. Дальнейшее увеличение сродства было получено, когда аспартат 941 АНК3rd был переведен в

фосфорилированное состояние в присутствии ионов магния. В противоположном случае, когда фосфорилировался только АНР2 (гистидин 82 переводился в фосфогистидин, также в присутствии Mg^{2+}), аффинность связывания RD-НРt падала до уровня даже ниже, чем у апоформы. Фосфорилирование обоих фосфоакцепторных остатков привело к снижению сродства по сравнению с Mg^{2+} -связанной нефосфорилированной формой, хотя сродство оставалось немного выше, чем у апоформы.

Мутанты АНК3rd (D941E) и АНР2 (H82E), имитирующие фосфорилирование, в присутствии Mg^{2+} показали сродство выше, чем форма дикого типа без Mg^{2+} . Однако при сравнении с Mg^{2+} -связанным диким типом результаты качественно соответствовали (хотя и были менее выражены) данным для фосфорилированных белков MSP: Мутация D941E несколько увеличивала сродство, а мутация H82E уменьшала его.

Влияние фосфорилирования на аффинность связывания можно объяснить изменением поверхностного электростатического потенциала. Фосфорилирование аспарата 941 в АНК3 увеличило отрицательно заряженную зону ресиверного домена, тогда как фосфорилирование гистидина 82 в АНР2 изменило заряд соответствующей области интерфейса с положительного на отрицательный, что привело к уменьшению электростатической комплементарности и снижению аффинности. Эти изменения аффинности имеют четкий биологический смысл: НРt должен диссоциировать от рецептора после фосфорилирования гистидина 82, чтобы начать перемещение в ядро.

3.6 Эволюционное становление рецепторного аппарата цитокининов

За пределами цветковых растений цитокининовый-сигналинг изучен очень мало. Все наземные растения, в принципе, имеют полный набор белков для восприятия и передачи сигнала цитокиина (Kaltenegger et al., 2018; Gruhn et al., 2014; Wang et al., 2015). Однако существует лишь несколько исследований, описывающих свойства рецепторов цитокининов у мохообразных, *Physcomitrium patens* (PrCHK1-4) и *Marchantia polymorpha* (MpCHK1) (von Schwartzenberg et al., 2016; Gruhn et al.,

2014). Все известные цитокинины (iP, tZ, cZ, DZ), их предшественники и производные были обнаружены у мха *P. patens* (von Schwartzenberg et al., 2007; von Schwartzenberg et al., 2016; Lindner et al., 2014). Кроме того, были обнаружены ароматические цитокинины типа 6-бензиладенина (BA). Кроме того, iP был обнаружен как снаружи, так и внутри клеток, в то время как tZ в основном внутри; iP, расположенный снаружи, проявлял высокую физиологическую активность в увеличении числа почек (von Schwartzenberg et al., 2007).

У печеночника *Marchantia* наиболее распространенным цитокинином оказался cZ. Второе и третье места занимают tZ (в два раза меньше) и iP (еще в три раза меньше), соответственно (Aki et al., 2019).

О цитокининах в плауновидном *Selaginella moellendorffii* ничего не известно, но у близкородственного вида *Selaginella kraussiana* они подавляли дихотомическое ветвление корней, вызванное ауксином (Sanders & Langdale, 2013), что может быть прототипом для регуляции образования боковых корней. У папоротника *Azolla filiculoides* цитокинины стимулировали рост апикальной меристемы корня, тогда как ауксины подавляли его (de Vries et al., 2016), что не характерно для этой пары гормонов по сравнению с другими группами растений.

Что касается голосеменных растений, то основная часть исследований их гормональных систем была проведена на хвойных, где были обнаружены цитокинины как iP-, так и Z-типа (Valdés et al., 2003; Zhang et al., 2001). В почках *Pinus radiata* были обнаружены активные цитокинины основания, относящиеся к группе изопреноидных цитокининов. Высокоактивные (tZ и iP) и низкоактивные (DZ и cZ) цитокинины присутствовали в сопоставимых количествах. Об ароматических цитокининах не сообщалось (Montalbán et al., 2011). Производные этих цитокининов в виде рибозидов, риботидов и глюкозидов также не были идентифицированы. При экзогенном применении BA способен гидроксिलироваться до мета-, орто- и пара-тополинов. Такие нативные ароматические цитокинины были ранее обнаружены у тополей (Strnad, 1997; Nieminen et al., 2008).

Цитокинины необходимы для роста и размножения хвойных деревьев, они используются для регенерации этих растений в культуре *in vitro* (De Diego et al., 2010; Pullman & Bucalo, 2011). Функция цитокининов во вторичном утолщении побегов хвойных представляет большой интерес. Хотя у хвойных ауксин считается ведущим гормоном вторичного роста побегов (Uggla et al., 1998; Uggla et al., 2001), цитокинины также играют важную роль, усиливая действие ауксина (Hejnowicz & Tomaszewski, 1969); Carvalho et al., 2013). цитокинины были обнаружены в древесине и особенно в коре *Pinus sylvestris*. Недавно было показано, что перекрестное взаимодействие ауксин-цитокинин определяет динамику формирования древесины, где ауксин контролирует скорость укрупнения клеток, а цитокинины управляют делением клеток и полярным транспортом ауксина (Hartmann et al., 2021).

Насколько нам известно, до сих пор не было данных о биохимических свойствах рецепторов СНК у плауновидных и голосеменных. В нашей работе мы попытались восполнить пробел в наших знаниях об аппарате восприятия цитокинина у наземных растений, уделяя особое внимание раннедивергентным видам (мохообразным, плауновидным и голосеменным).

3.5.1 Древние СНК-рецепторы в сравнительном и эволюционном аспектах

СНК-рецепторы обычно состоят из трех основных модулей. N-концевой экстрацитозольный сенсорный модуль расположен на одной стороне мембраны, а каталитический и ресиверный модули находятся в цитозоле, на противоположной стороне той же мембраны (Kieber & Schaller, 2014). Сенсорный модуль содержит хорошо известный домен CHASE (PF03924) (Anantharaman & Aravind, 2001; Mougél & Zhulin, 2001), который состоит из PAS и PAS-подобных субдоменов. Субдомен PAS имеет особое значение, поскольку он специфически связывает лиганд, запускающий MSP. Адекватное функционирование субдомена PAS обеспечивается высококонсервативными длинной поворотной α -спиралью и короткой α -спиралью, расположенными выше и ниже домена CHASE, соответственно. Кристаллическая структура сенсорного модуля АНК4 стала доступна с 2011 года (Hothorn et al., 2011).

В настоящее время домен CHASE считается отличительной чертой рецепторов СНК среди различных сенсорных гистидинкиназ растений (Heyl et al., 2013). Наш анализ геномов нецветковых наземных растений: мха *Physcomitrium patens*, плауновидного *Selaginella moellendorffii* и ели *Picea abies*, выявил три, две и две типичных CHASE-содержащих гистидинкиназы, соответственно (Рисунок 67), что согласуется с предыдущими данными (Kaltenegger et al., 2018; Pils & Heyl, 2009). Следует отметить, что остается неопределенность с числом рецепторов у *Selaginella moellendorffii*, у которого в GenBank были аннотированы четыре СНК-кодирующих гена, но они настолько похожи попарно (обозначенные здесь как варианты "a" и "b") (Рисунок 68), что, похоже, представляют собой секвенированные повторы двух настоящих генов СНК-рецепторов.

Филогенетически рецепторы СНК были разделены на ряд отдельных клад (групп) (рис. 67 А). Рецепторы *P. patens* образуют отдельную кладу (Bryo, Bryophyta), остальные СНК образуют общую кладу сосудистых растений (VP) (Pils, & Heyl, 2009). Эта общая клада, в свою очередь, подразделяется на группу *Lycopodiophyta* (Лусо) с рецепторами *S. moellendorffii* и группу семенных растений (SP). Последняя группа может быть далее разделена на подгруппы НК4 и НК2/3. Рецепторы хвойных PaСНК1 и PaСНК2 относятся как раз к этим двум подгруппам, соответственно.

В отношении структуры рецепторных генов можно проследить некоторые закономерности (рис. 67 В). У сосудистых растений CDS рецепторов обычно состоят из 11 экзонов. Однако у некоторых видов наблюдаются отклонения от этого общего правила. Рецепторы ели имеют два дополнительных маленьких экзона на 3'-конце, тогда как в рецепторе SmСНК6а *S. moellendorffii* 2-й и 3-й экзоны слиты. У мха *P. patens* все три гена рецепторов СНК имеют 14-экзонную структуру. Наложение экзонных структур генов на структуры кодируемых белков показывает достаточно большое сходство первичных структур генов всех СНК-рецепторов. Следовательно, все растительные СНК-рецепторы имеют сходную доменную структуру, а их сенсорные модули фланкированы с обеих сторон ТМ-доменами (рис.

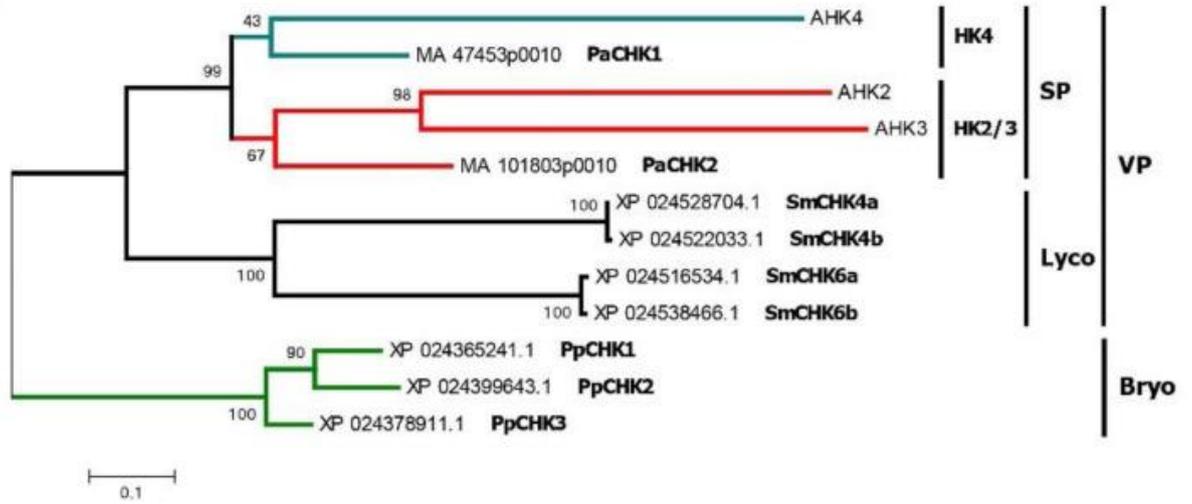
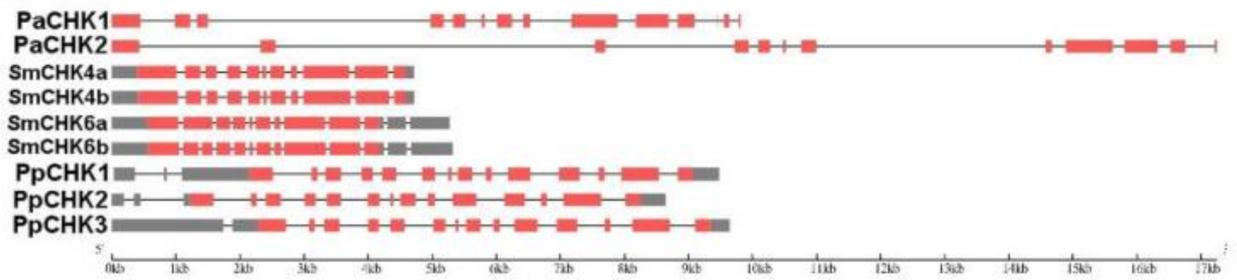
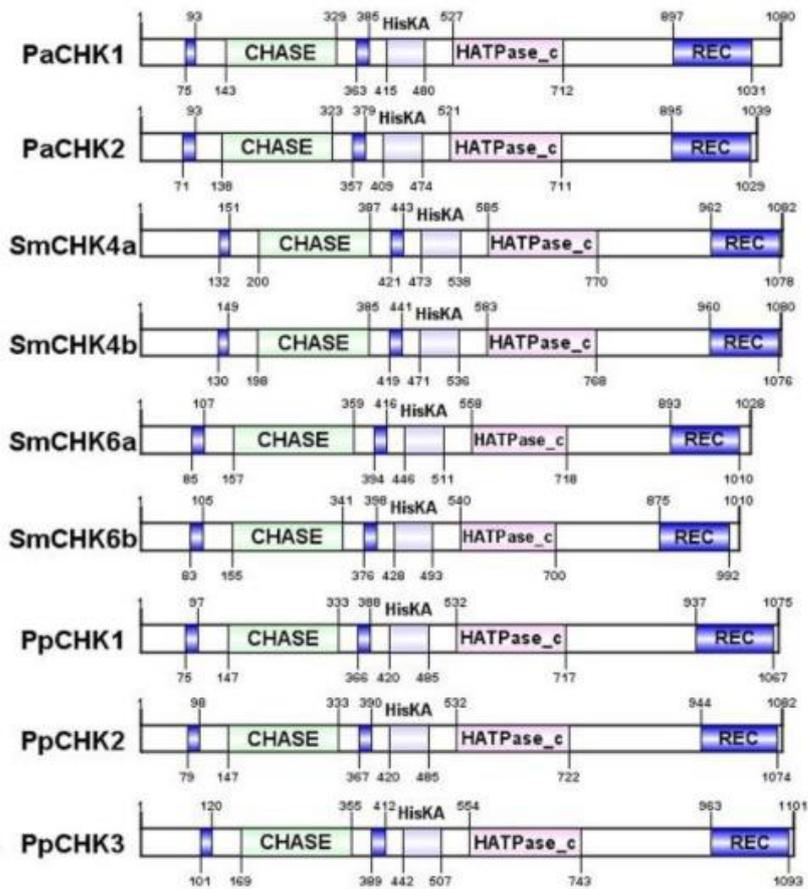
A**B****C**

Рис. 67. Биоинформатический анализ CHK, использованных в данном исследовании.

(A) Молекулярно-филогенетический анализ методом максимального правдоподобия. VP - сосудистые растения, Bryo-Bryophyta, Lycop-Lycophyta, SP-Spermatophyta, НК4 - клада НК4 Арабидопсиса, НК2/3 - клада НК2 и НК3 арабидопсиса. (B) Структуры генов CHK. UTR обозначены серым цветом, ORF - розовым, нижняя шкала показывает длину гена в килобазах. (C) Структуры белков CHK. Домены CHASE фланкированы трансмембранными доменами, окрашенными в синий цвет. Расположение концов доменов и длина белка указаны в номерах аминокислот (aa).

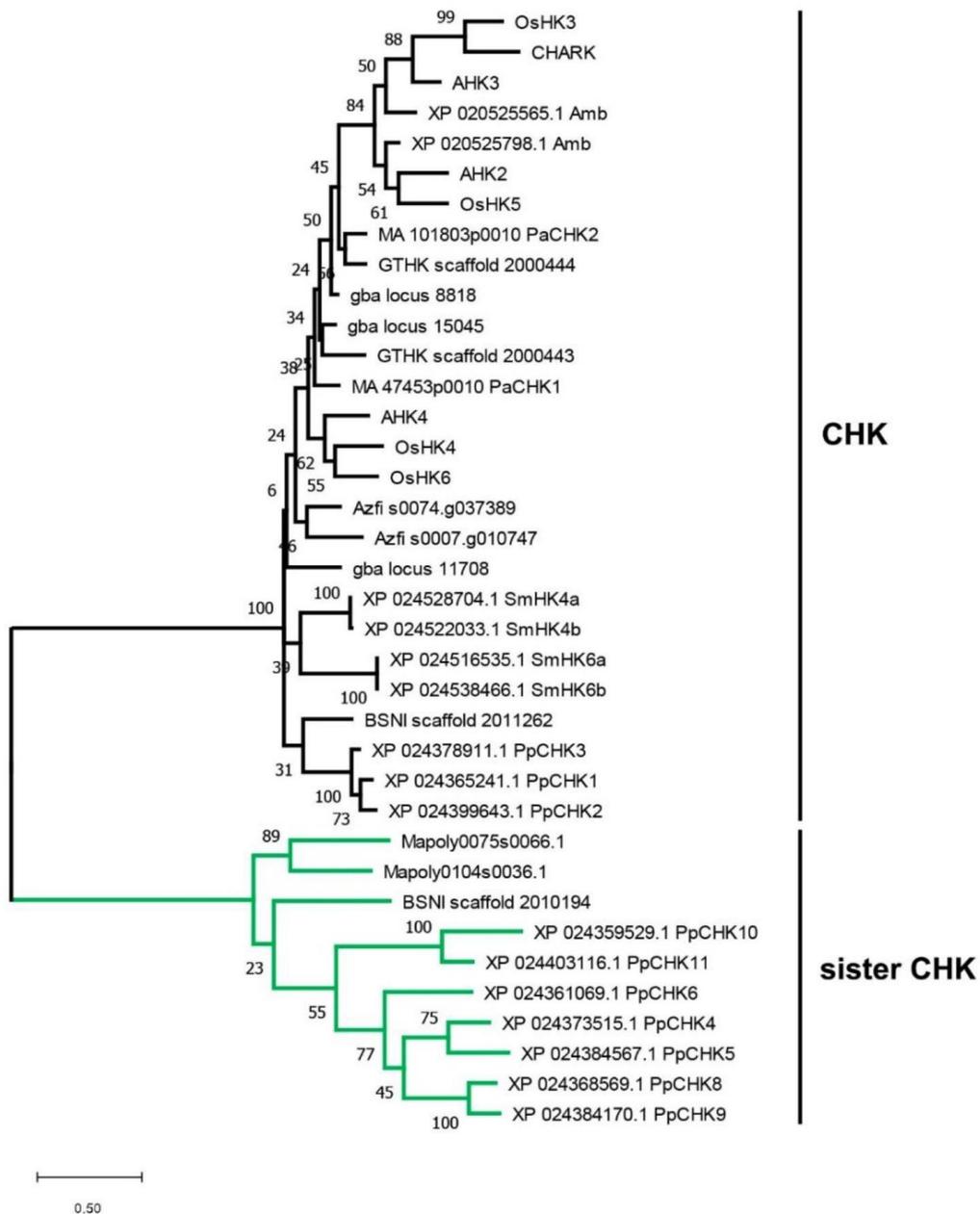


Рис. 68. Дерево СНК. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели коррекции Пуассона (Zuckerkandl & Pauling, 1965). Показано дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (-9637,20). Процент деревьев, в которых соответствующие таксоны кластеризуются вместе, показан рядом с ветвями. Исходное(ые) дерево(а) для эвристического поиска было(и) получено(ы) автоматически путем применения метода максимальной парсимонии. Для моделирования различий в скорости эволюции между участками использовалось дискретное гамма-распределение (5 категорий (+G, параметр = 1,2933)). Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В этом анализе участвовали 37 аминокислотных последовательностей. Всего в окончательном наборе данных было 274 позиции. Эволюционный анализ проводился в программе MEGA11 (Tamura et al., 2021). Сокращения на дереве соответствуют гистидиновым киназам из: АНК, *Arabidopsis thaliana* (двудольные); ОsНК/CHARK, *Oryza sativa* (однодольные); Amb, *Amborella trichopoda* (базальное покрытосеменное); gba, *Ginkgo biloba*; GTHK, *Gnetum montanum*; PaСНК, *Picea abies*; Azfi, *Azolla filiculoides*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; PpСНК, *Physcomitrium patens*; Mapoly, *Marchantia polymorpha*; BSNI, *Anthoceros agrestis*. За исключением последних трех видов, все остальные виды относятся к сосудистым растениям, включая представителей Spermatophyta: отделы Magnoliophyta (*A. thaliana*, *O. sativa*, *A. trichopoda*), Ginkgophyta (*G. biloba*), Gnetophyta (*G. montanum*), Pinophyta (*P. abies*); и Polypodiophyta (*A. filiculoides*); также включен представитель Lycopodiophyta (*S. moellendorffii*). Несосудистые мохообразные представлены отделами Bryophyta (*P. patens*), Marchantiophyta (*M. polymorpha*) и Anthocerotophyta (*A. agrestis*).

67 С). Эти сходные черты свидетельствуют об общем происхождении СНК-рецепторов.

Мох *P. patens* был уникальным видом, у которого было семь белков, связанных с рецепторами СНК, которые мы назвали сестринской группой СНК

(Рисунок 68). Это подсемейство было впервые обнаружено в ходе филогенетических исследований мхов *P. patens* и *M. polymorpha* (Gruhn et al., 2014). Сестринские СНК имеют серьезные аномалии в структуре сенсорного модуля (Gruhn et al., 2015) (Рисунок 69). Согласно кристаллической структуре сенсорного модуля АНК4 (Nothorn et al., 2011), этот модуль содержит ряд аминокислотных (aa) остатков, критически важных для связывания цитокинина. Длинная поворотная α -спираль занимает позиции 283-327 аминокислот в общем выравнивании. Правая (дистальная) сторона этой α -спирали обычно очень консервативна в канонических рецепторах цитокининов, но в сестринской группе многие такие позиции заменены неконсервированными остатками. Более того, в начале (аминокислотные позиции 329-334) домена CHASE имеется делеция. Особого внимания заслуживают три замены: аланин, аспартат и глицин в позициях 360, 434 и 493, соответственно. Замена консервативного аспартата 434 на различные аминокислоты (фенилаланин, тирозин, лейцин) заслуживает особого внимания, поскольку водородная-связь между аспартатом 434 и адениновым остатком цитокинина имеет решающее значение для специфического связывания гормона. Во всех родственных СНК отсутствует консервативный треонин в положении 450. В PpСНК6 этот участок занят триптофаном, в других СНК - серином. Таким образом, эти СНК можно рассматривать как варианты классической мутации wol (деревянная нога) арабидопсиса, при которой связывание цитокининов блокируется. В совокупности все вышесказанное позволяет предположить, что сестринские СНК связывают цитокинины очень слабо, если вообще связывают. Следовательно, маловероятно, что эти белки могут оказывать существенное влияние на восприятие цитокинина.

С другой стороны, для функционирования в качестве гибридных каталитических гистидинкиназ сестринские СНК имеют все необходимое, прежде всего NtkA-, НАTPase-с- и REC-домены. Первый домен (PF00512) содержит N-боксы с фосфорилируемым His, последовательность НАTPase-с-домена (PF02518) включает N-, G1-, F, G2 и G3-боксы. Домен REC (PF00072) имеет DD-боксы, D1-боксы

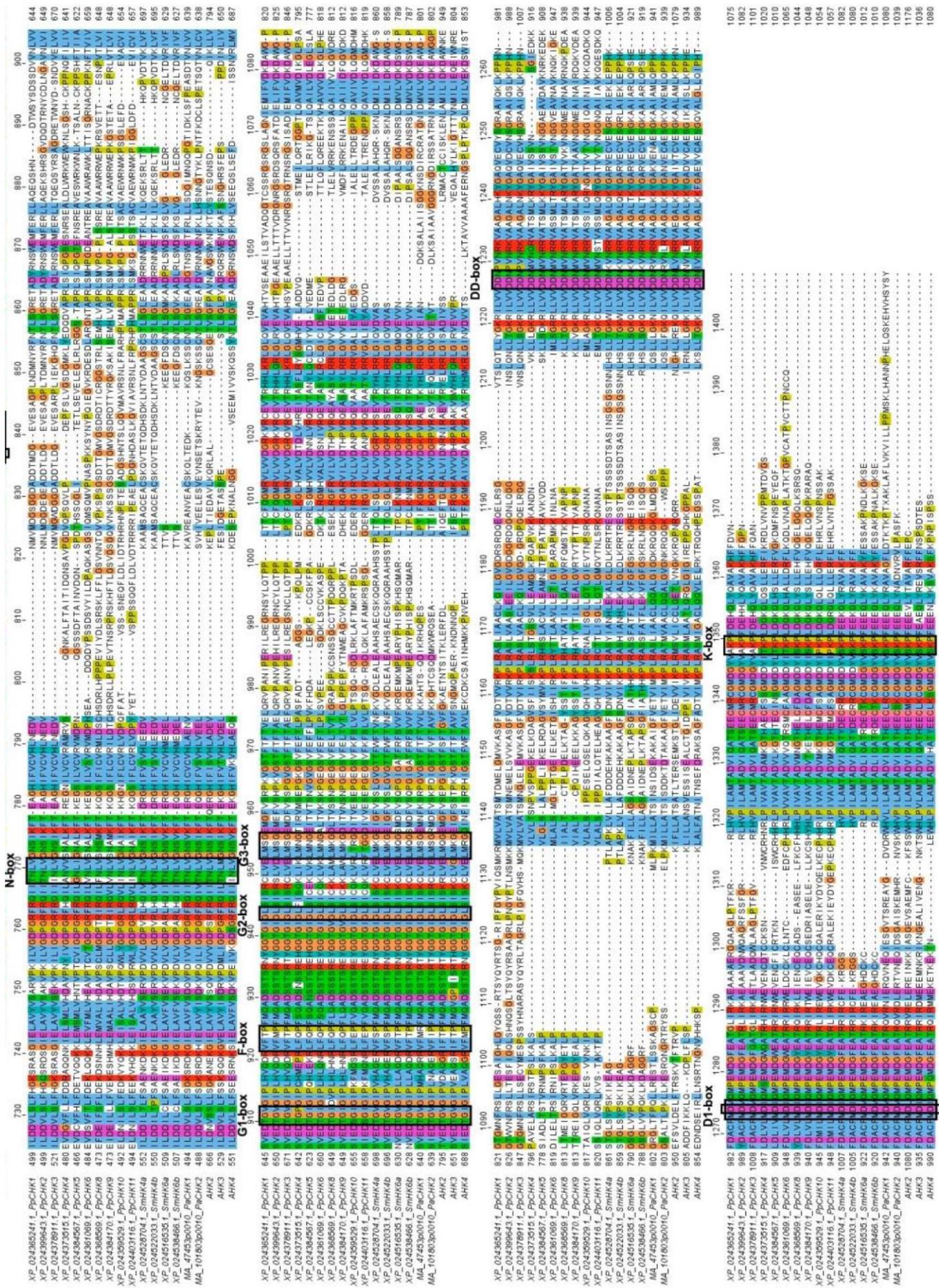


Рисунок 69. Выравнивание последовательностей белков цитокининовых

рецепторов. Ключевые аминокислоты и аминокислотные блоки, необходимые для связывания лиганда, гистидинкиназной активности и фосфотрансфера, выделены.

с фосфорилируемым аспаратом и К-бок. Все эти консенсусные области имеют типичную консервативную структуру во всех рассматриваемых белках (рис. 69). Таким образом, все они, по-видимому, являются функциональными гибридными гистидинкиназами, и их активность может быть аддитивной и/или поддерживающей для сигнал-передающей активности рецепторов СНК.

3.5.2 Лигандсвязывающие свойства СНК-рецепторов из раннодивергировавших растений

Мы экспериментально проанализировали лигандсвязывающие свойства СНК-рецепторов из *P. patens*, *S. moellendorffii* и *P. abies*, используя метод радиоактивно меченых лигандов и микросомы из листьев табака, где эти рецепторы были транзистентно экспрессированы. В качестве меченого ЦК выступал меченый тритием изопентениладенин. Белки РрСНК1 и 2 из *P. patens* были протестированы в полноразмерной версии, в остальном использовались сенсорные модули, фланкированные ТМ-доменами. РрСНК1-3 представляли каноническую группу рецепторов СНК, а РрСНК4 был представителем родственной сестринской группы. Из каждой пары рецепторов *S. moellendorffii*, вероятно, состоящей из двух секвенированных повторов, для дальнейших исследований был взят один представитель (СНК4а-SM и СНК6-SM, в последнем случае СНК6-SM а и б идентичны, поэтому их буквенное обозначение не требуется). Пара сенсорных гистидинкиназ РаСНК1 и РаСНК2 представляет собой, согласно современным знаниям, весь набор рецепторов СНК из *P. abies*.

Из восьми клонированных рецепторов мы не обнаружили связывания цитокининов для РрСНК3 и РрСНК4, хотя экспрессия этих белков была подтверждена иммуноблотингом против слитого с целевым белком GFP (рис. 70). Сенсорный модуль белка РрСНК3 (KJ697770) из *P. patens*, по сравнению с другими каноническими рецепторами, рассмотренными в данной работе, в целом имеет довольно консервативную структуру. Единственной заметной аминокислотной-

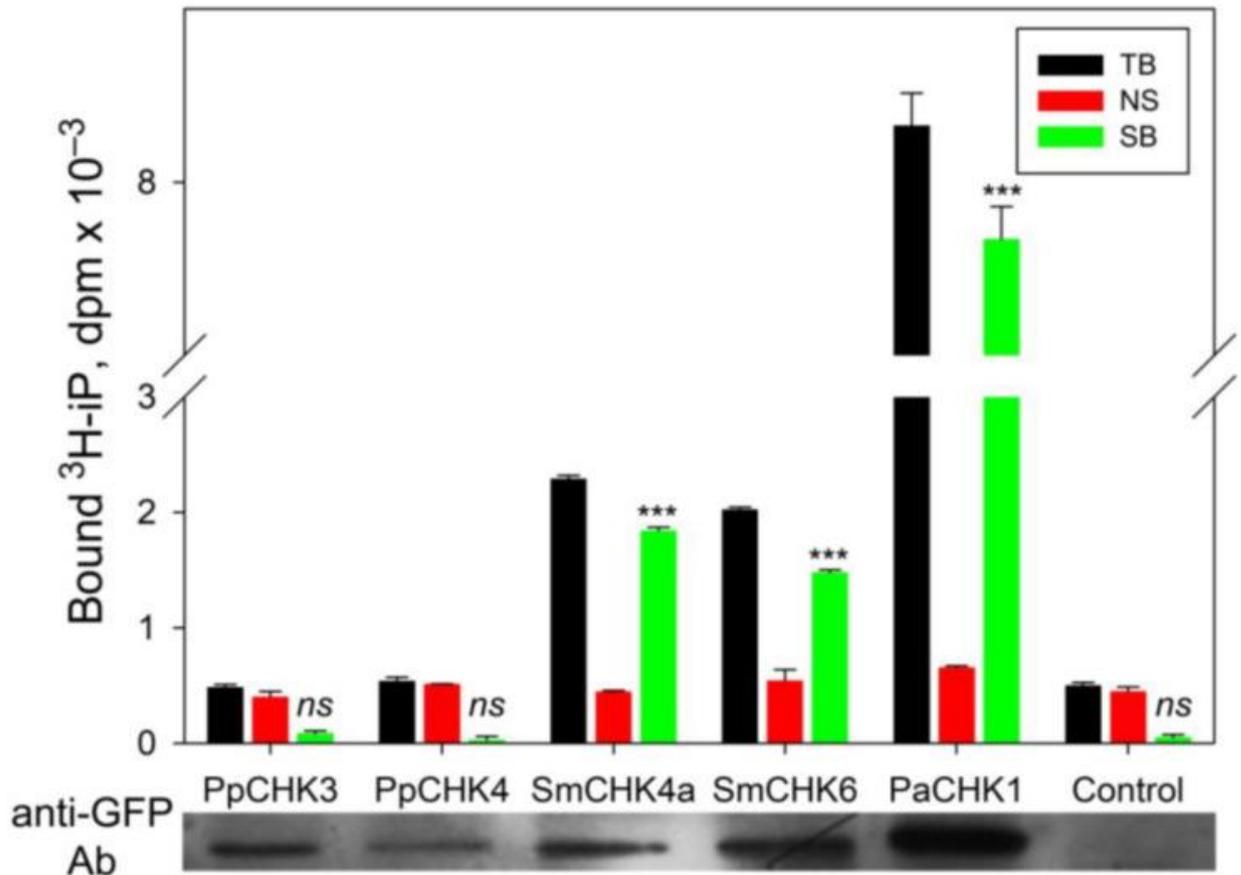


Рис. 70. Высокая аффинность или отсутствие связывания меченого iP с CHKs мха *Physcomitrium patens*, плауновидного *Selaginella moellendorffii* и ели *Picea abies*. Для каждого случая определяли тотальное (TB), неспецифическое (NS) и специфическое (SB) связывание ³H-iP. Контрольный вариант показывает уровень связывания ³H-iP эндогенными цитокининовыми рецепторами в листьях табака. Значения для каждого рецептора были проверены с помощью одностороннего ANOVA. Статистическая значимость различий между TB и NS отмечена звездочками (***) означает достоверное различие $p \leq 0,001$, ns – показатель не имеет значения). Внизу показан Вестерн-блот с антителами (Ab) против белка GFP, слитого с молекулой рецептора, что служит доказательством транзientной экспрессии рецептора в листьях табака.

заменой является фенилаланин 420 вместо консервативного серина. Эта замена сама по себе или в сочетании с другими может быть ответственна за связывание. Текущие (рис. 70) и предыдущие (von Schwartzenberg et al., 2016) данные, показывают, что PpCHK3 не способен связывать меченые iP или *tZ*, соответственно. Таким образом, из первоначально отобранных восьми CHK две (PpCHK3 и PpCHK4) оказались

нефункциональными в качестве рецепторов, поскольку они не распознавали молекулы iP. Остальные шесть СНК прочно связывали iP и обладали типичной структурой своих сенсорных модулей (Рисунок 71), что указывает на их принадлежность к настоящим рецепторам цитокининов.

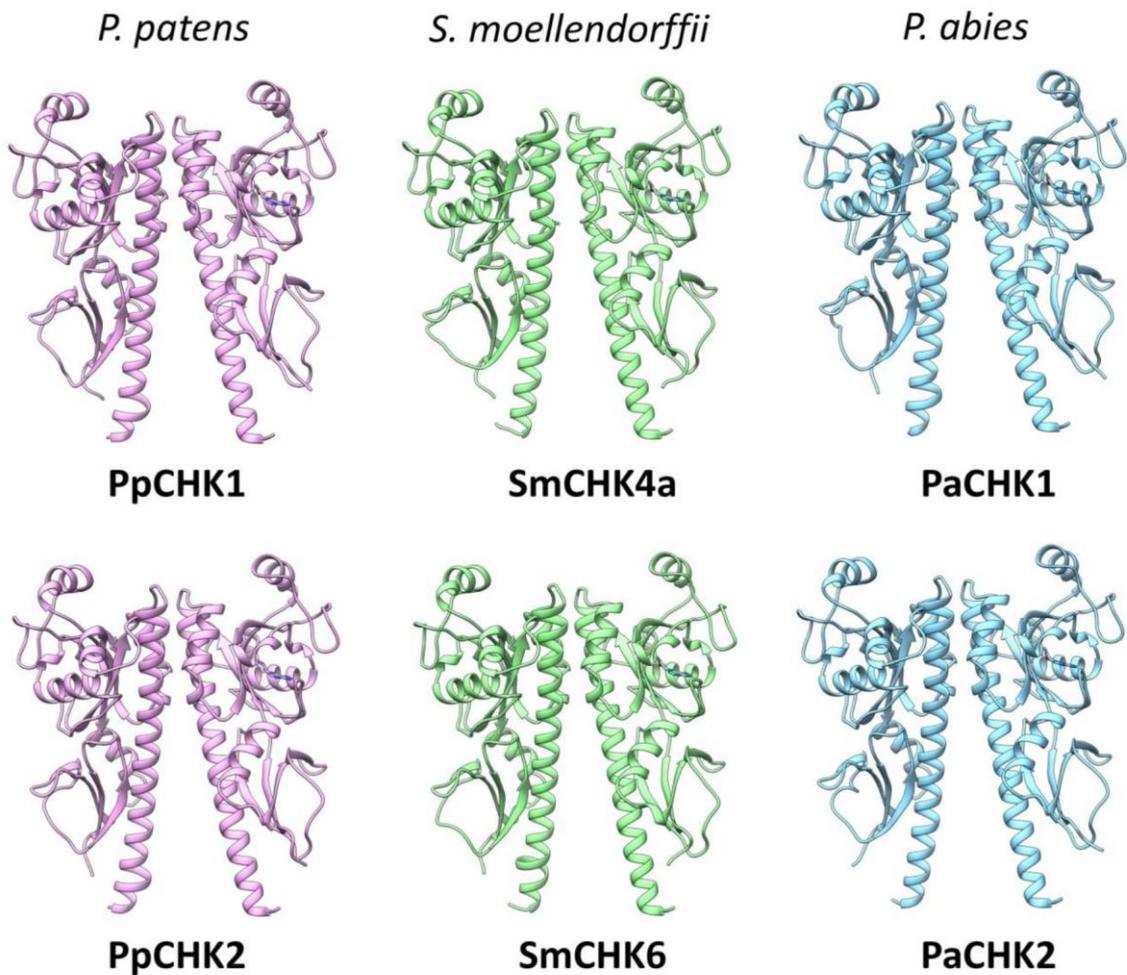


Рис. 71. Гомологичные модели для лигандсвязывающих сенсорных модулей (в виде гомодимеров) настоящих ЦК-рецепторов из *P. patens* (PpCHK1 и PpCHK2), *S. moellendorffii* (SmCHK4a и SmCHK6) и *P. abies* (PaCHK1 и PaCHK2). Каждая пара рецепторов цитокининов представляет аппарат восприятия цитокининов соответствующего вида растений.

Затем мы провели детальное исследование pH-зависимости связывания iP с рецепторами в широком диапазоне pH (от pH 5 до pH 9). Все рецепторы показали

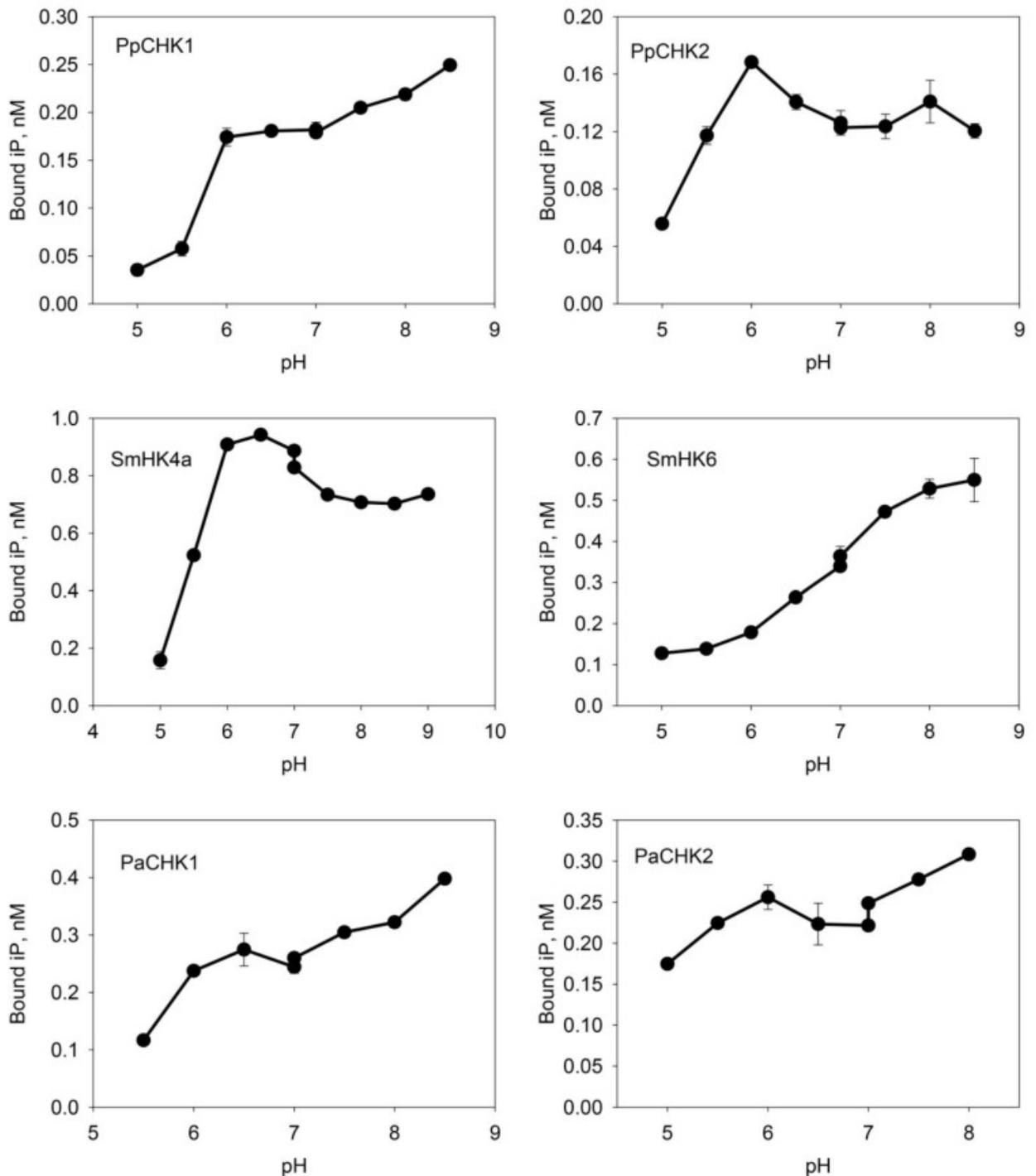


Рис. 72. pH-зависимость связывания ^3H -iP рецепторами CHK: мха *Physcomitrium patens*, плауновидного *Selaginella moellendorffii* и ели *Picea abies*. Графики показывают специфическое связывание (SB). Каждая кривая демонстрирует снижение связывания СК при низком pH.

снижение связывания СК при pH ниже 6. Между тем, рецепторы PpCHK1, SmCHK6 и PaCHK1 продемонстрировали увеличение связывания от кислых до самых высоких щелочных значений. В случае SmCHK6 это увеличение было почти

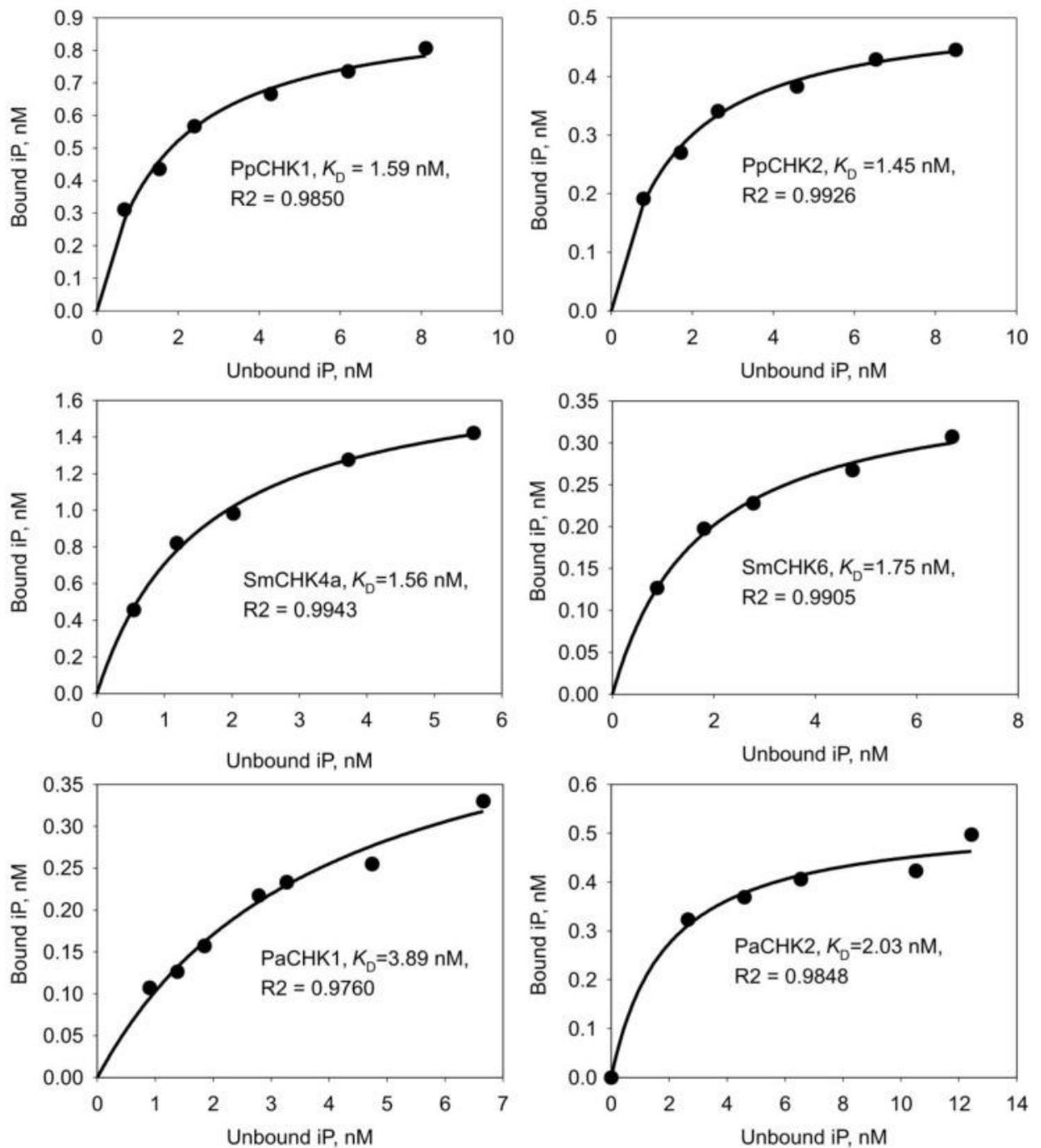


Рис. 73. Кривые насыщения связывания ^3H -iP с CHK-рецепторами: мха *Physcomitrium patens*, плауновидного *Selaginella moellendorffii* и ели *Picea abies*. Графики показывают специфическое связывание (SB). Соответствие нелинейной регрессионной модели оценивалось с помощью параметра R^2 . Определенные значения K_D очень близки и попадают в узкий диапазон 1-4 нМ, типичный для высокоаффинного связывания гормон-рецептор.

линейным. РаСНК2 показал аналогичную, хотя и менее прямую, тенденцию роста. Напротив, РрСНК2 и SmСНК4а имели четкие максимумы связывания при рН 6-6,5 (рис. 72). В экспериментах по насыщению равновесные константы равновесной (K_D) для iP определяли с помощью алгоритма в программе SigmaPlot. Значения K_D варьировали от 1.5 до 4.0 нМ, что свидетельствовало о высоком сродстве этого лиганда к исследованным рецепторам СНК (рис. 73).

Специфичность рецепторов для шести немеченых гормонов: *транс*-зеатина (*tZ*), *цис*-зеатина (*cZ*), изопентениладенина (iP), дигидрозеатина (DZ), бензиладенина (BA) и тидиазурона (TD)- была определена в экспериментах по конкуренции. Кривые доза-ответ конкурентного связывания цитокинов показаны на рисунке 74. Расчет равновесной K_D проводился стандартным методом по формуле Ченга-Прусова. Предложенный альтернативный алгоритм расчета дал аналогичные результаты (см. далее и таблицу 19).

Данные о сродстве различных цитокининов к рецепторам представлены в таблице 18. Рецепторы *P. patens* демонстрировали самое высокое сродство ($K_D < 10$ нМ) к iP. Согласно расчету K_D , сродство к *tZ* было значительно ниже, а *cZ* и DZ завершали список. Напротив, рецепторы сосудистых растений, кроме iP, прочно связывали также *tZ* и BA, но не *cZ* и DZ. Рецепторы селлагинеллы отличались относительно высоким сродством к BA. Кроме того, SmСНК4а и РаСНК1 прочно связывали тидиазурон (TD), синтетическое производное фенилмочевины. SmСНК6 связывал iP и *tZ* с близким сродством, SmСНК4а и РаСНК1 предпочитали iP, а РаСНК2 - *tZ*. Самые большие различия между двумя рецепторами СНК одного вида были характерны для рецепторов ели. Например, коэффициенты сродства РаСНК1/СНК2 (K_{D1}/K_{D2}) для *tZ*, *cZ*, DZ и TD составляли 7.21, 23.4, 16,8 и 0.1, соответственно. Для сравнения, соответствующие значения коэффициентов сродства РрСНК1/СНК2 для тех же цитокининов: 2.04, 3.01, 1.37 и 1.83, соответственно, указывают на гораздо меньшие вариации у мха. Отношение максимального и минимального сродства для рецепторов ели было равно коэффициенту $23.4/0.1 = 234$; аналогичное значение для рецепторов мха составляло

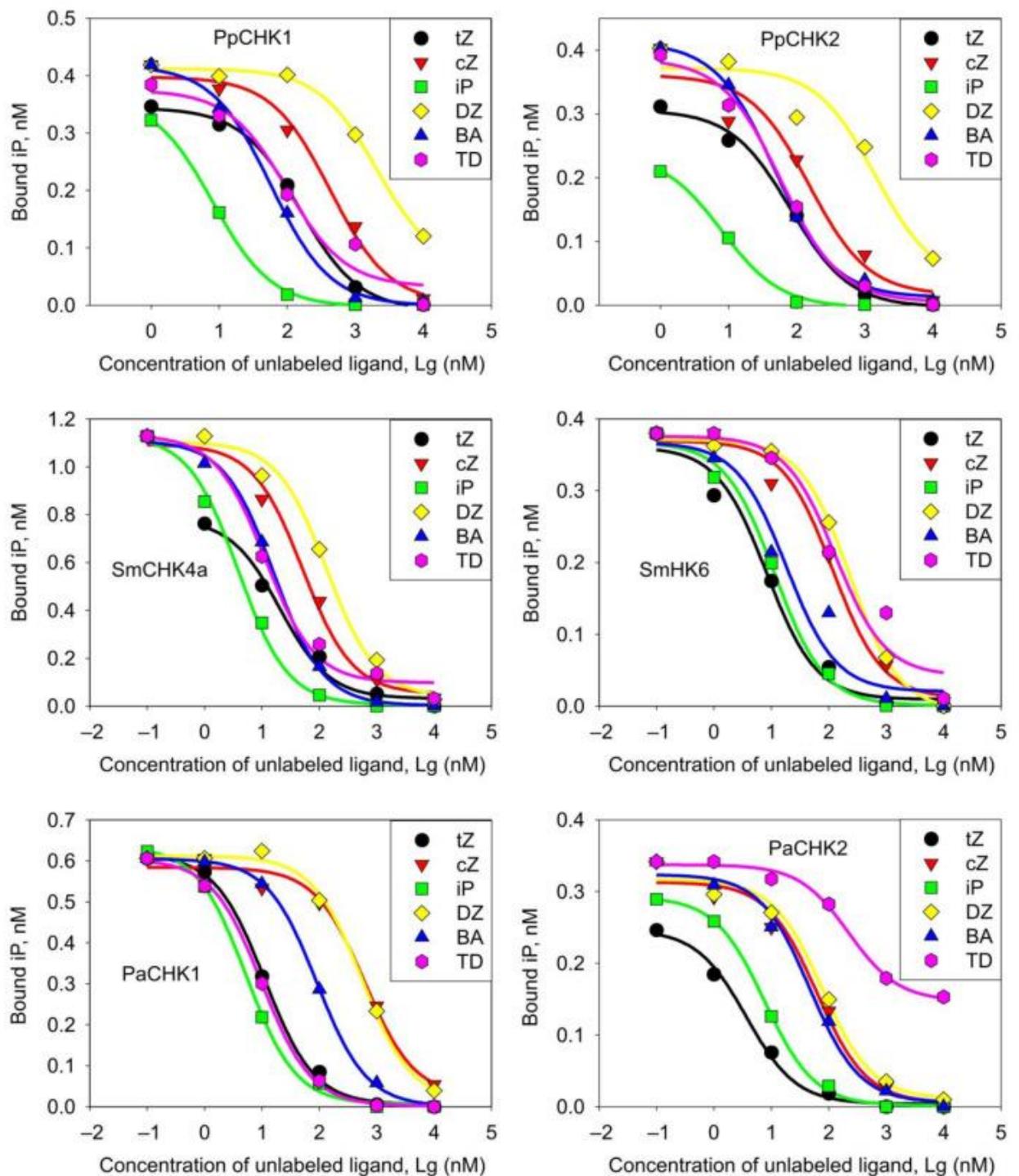


Рис. 74. Кривые конкуренции вытеснения ^3H -iP немечеными цитокининов из сайтов связывания в рецепторах СНК. *tZ*, транс-зеатин; *cZ*, цис-зеатин; *iP*, изопентениладенин; *DZ*, дигидрозеатин; *BA*, 6-бензиладенин; *TD*, тидиазурон.

только $3.01/1.08 = 2.8$. Цитокининовые рецепторы плауновидного, филогенетически расположенного где-то между мхом и елью, имеют промежуточное значение этого параметра: 25.7, что почти на порядок выше, чем у *P. patens*, но почти на порядок ниже, чем у *P. abies*. Оба цитокининовых рецептора из мха почти не различают *цис*-

и *транс*-зеатины, K_D этих двух цитокининов для PpCHK1 и PpCHK2 были очень близки (табл. 18), с коэффициентами cZ/tZ K_D 2.79 и 1.89, соответственно. У плауновидного по крайней мере один цитокининовый рецептор уже стал гораздо более специфичным. Хотя SmCHK4a все еще имел довольно близкое сродство к cZ и tZ (отношение K_D 2.58), SmCHK6 распознавал tZ гораздо лучше, чем cZ (отношение K_D 10.09). Дальнейшее повышение специфичности было обнаружено в CHK-рецепторах ели: отношение K_D cZ/tZ для PaCHK1 и PaCHK2 составило 55.4 и 17.0, соответственно. Таким образом, при переходе от мохообразных к семенным растениям происходило четкое развитие предпочтения рецепторов к различным вариантам цитокининов.

Таблица 18. Количественная оценка сродства рецепторов CHK из раннедивергентных линий для всех основных вариантов цитокининов (метод расчета Cheng-Prusoff).

CK Version	K_D of CK-Receptor Complexes (nM \pm SE) for:					
	PpCHK1	PpCHK2	SmCHK4a	SmCHK6	PaCHK1	PaCHK2
tZ	36.9 \pm 2	18.1 \pm 1.5	7.99 \pm 1.34	1.15 \pm 0.20	7.57 \pm 0.37	1.05 \pm 0.09
cZ	103 \pm 15	34.2 \pm 9.3	20.6 \pm 2.6	16.6 \pm 2.4	419 \pm 56	17.9 \pm 2.9
iP	1.92 \pm 0.06	1.78 \pm 0.14	1.60 \pm 0.13	1.70 \pm 0.16	3.60 \pm 0.17	2.20 \pm 0.08
DZ	507 \pm 42	323 \pm 97	54.8 \pm 6.2	36.0 \pm 1.6	377 \pm 27	22.4 \pm 2.9
BA	13.9 \pm 0.1	10.7 \pm 0.5	6.91 \pm 0.34	2.28 \pm 0.70	61.9 \pm 1.3	13.5 \pm 1.6
TD	23.8 \pm 5.4	13.02 \pm 0.2	4.52 \pm 0.62	16.6 \pm 4.7	6.70 \pm 0.21	64.5 \pm 6.4

Значения менее 10 нМ (свидетельствующие о высокой аффинности) выделены жирным шрифтом. Сокращения: Pp - *Physcomitrium patens*; Sm - *Selaginella moellendorffii*; Pa - *Picea abies*.

3.5.3 Новый подход к определению K_D в экспериментах по конкуренции

В экспериментах по конкуренции при связывании лигандов с рецепторами строится кривая связывания меченого лиганда в присутствии возрастающих концентраций немеченых лигандов. В стандартном подходе кажущиеся константы диссоциации рецептора и немеченых лигандов рассчитываются с помощью уравнения Ченга-Прусова. Эта формула выводится из выражения для кривой связывания гормона с насыщением. Важно, что это выражение справедливо только при условии большого превосходства концентрации лиганда над рецептором. В этом

случае исходные уравнения упрощаются до конечного выражения. Это приводит к определенным ограничениям в дизайне эксперимента, часто делая методику дорогостоящей и неудобной в использовании. В отличие от этого, методы расчета, основанные на уравнении для равновесной константы диссоциации, свободны от подобных ограничений.

Таблица 19. Количественная оценка сродства рецепторов СНК из ранне-дивергирующих линий для всех основных вариантов цитокининов (альтернативный метод расчета)

СК version	K_D of СК-receptor complexes (nM±SE) for:					
	PpCHK1	PpCHK2	SmCHK4a	SmCHK6	PaCHK1	PaCHK2
tZ	24.8±2.9	12.4±1.5	8.0±2.9	3.1±0.8	5.9±1.0	1.3±0.4
cZ	94.4±26.3	48.6±9.7	20±4.9	39.0±5.1	285.6±69.4	22.7±3.2
iP	1.2±0.3	0.9±0.0	0.8±0.2	2.5±0.8	3.0±0.7	2.2±0.5
DZ	676±14.4	500.9±74.7	32.3±11.6	48.4±7.1	244.2±25.9	29.1±5.4
BA	12.8±3.0	14.9±1.2	3.2±0.8	2.9±0.4	38.4±2.6	12.3±3.9
TD	17.1±6.6.4	11.9±2.8	4.9±2.0	29.8±3.4	3.8±0.6	243.5±94.8

Значения менее 10 нМ (свидетельствующие о высокой аффинности) были выделены красным цветом. Сокращения: Pp, *Physcomitrium patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Pa, *Picea abies*.

Формулы для константы диссоциации меченых и немеченых гормонов в экспериментах по конкуренции выглядят следующим образом:

$$K_{DM} = \frac{L_M * R}{LR_M}; K_D = \frac{L * R}{LR} \quad (A1)$$

Здесь L_M - концентрация несвязанного меченого лиганда, LR_M - концентрация связанного меченого лиганда, L - концентрация несвязанного немеченого лиганда, LR - концентрация связанного немеченого лиганда, R - концентрация свободного рецептора. В свою очередь, R , L_M и L могут быть выражены следующим образом:

$$R = R_T - LR_M - LR; L_M = L_{TM} - LR_M; L = L_T - LR \quad (A2)$$

Здесь R_T , L_{TM} , L_T - общие концентрации рецептора, меченого и немеченого лигандов до начала процесса связывания. В эксперименте по конкуренции три величины являются константами: K_{DM} , L_{TM} и R_T . Первое значение рассчитывается в отдельном анализе связывания при насыщении. Второе значение изначально устанавливается исследователем. Третья величина, зная две предыдущие, может быть рассчитана по связыванию меченого лиганда в отсутствие немеченого лиганда с помощью следующего уравнения, полученного из уравнений (A1) и (A2):

$$R_T(\text{constant}) = \frac{K_{DM} * LR_M^{L_T=0}}{L_{TM} - LR_M^{L_T=0}} + LR_M^{L_T=0} \quad (A3)$$

В присутствии немеченого лиганда, принимая во внимание уравнения (A1) и (A2), получаем следующее уравнение для K_{DM} :

$$K_{DM} = \frac{(L_{TM} - LR_M) * (R_T - LR_M - LR)}{LR_M} \quad (A4)$$

Следовательно, концентрация связанного немеченого лиганда может быть выражена как:

$$LR = \frac{K_{DM} * LR_M}{LR_M - L_{TM}} - LR_M + R_T \quad (A5)$$

Соответственно, принимая во внимание уравнения (A1) и (A2), K_D для немеченого лиганда может быть рассчитан с помощью уравнения:

$$K_D = \frac{(L_T - LR) * (R_T - LR_M - LR)}{LR} \quad (A6)$$

R_T и LR определены в уравнениях (A3) и (A5), соответственно. Для большей точности мы рассчитали K_D на нескольких L_T и определили его среднее значение. Результаты представлены в таблице 19. Сравнение значений K_D , определенных двумя различными алгоритмами расчета и представленных в табл. 18 и табл. 19, демонстрирует разумную согласованность между этими двумя наборами данных.

3.5.4 Обсуждение к части 3.5

Мы изучили основные биохимические особенности СНК-рецепторов растений с секвенированными геномами, принадлежащих к трем ключевым группам эволюции наземных растений. Это представители мохообразных *Physcomitrium patens*, плауновидных *Selaginella moellendorffii* и голосеменных *Picea abies*. Самое раннее время их появления в эволюции оценивается как 506.4, 432.5 и 302.8 млн лет, соответственно (по сравнению со временем появления *Angiospermae* – 246.6 млн лет) (Morris et al., 2018). Таким образом, выбранные виды являются важными вехами в эволюции наземных растений.

Мы исследовали гормон-связывающие свойства восьми предполагаемых СНК-рецепторов из трех раннедивергентных видов растений. Рецепторы плауновидных и голосеменных были впервые изучены на белковом уровне. Среди сенсорных гистидинкиназ, PpСНК1 и PpСНК2 из *P. patens* проявили типичные свойства рецепторов СНК, тогда как PpСНК3 из основной группы рецепторов и PpСНК4 из отдельной клады СНК, названного сестринской группой, не связывали цитокинины с подходящим для рецепторов сродством. Ранее было отмечено, что PpСНК3 не связывает меченый *tZ* и что растения с нокаутированными генами PpСНК1-3 перестают реагировать на цитокинин, несмотря на наличие интактных генов из сестринской группы (von Schwartzenberg et al., 2016). Наш биоинформатический анализ показал некоторые предполагаемые структурные причины неспособности PpСНК3 и PpСНК4 связывать цитокинины. Все эти данные вызывают сильные сомнения в реальном участии PpСНК3 и сестринских СНК в восприятии сигнала СК. Эти две гистидинкиназы *P. patens*, не способные специфически связывать цитокинины, были исключены из дальнейших исследований. У *S. moellendorffii* имеющиеся четыре рецепторных гена очень похожи друг на друга, вероятно, являясь секвенированными повторами двух настоящих рецепторных генов, поэтому мы исследовали свойства одного рецептора из каждой пары. Лиганд-связывающие свойства обоих еловых рецепторов, которые мы назвали PaСНК1 и PaСНК2, также были подробно изучены. Таким образом,

впервые были экспериментально исследованы уникальные с эволюционной точки зрения лиганд-связывающие свойства аппарата восприятия СК нескольких раннедивергентных видов растений.

Согласно представленным данным, большинство рецепторов древних растений имеют типичную рН-зависимость связывания СК, со снижением в кислой области, что указывает на предпочтительную внутриклеточную локализацию. Исключение составляют рецептор мха PpCHK2 и рецептор ели PaCHK2, которые сохраняют достаточно высокую лиганд-связывающую активность при рН 5.5 и даже рН 5.0 (PaCHK2). Это свидетельствует о способности этих рецепторов функционировать также внутри плазматической мембраны в апопластической среде, для которой характерен диапазон рН 4.5-5.5 (Felle, 2005). Поскольку основной ЦК во мхе, iP, действует внеклеточно (von Schwartzenberg et al., 2007), весьма вероятно, что он действует главным образом на рецептор PpCHK2, который предположительно находится в плазматической мембране. Таким образом, можно предположить, что компетентные клетки протонемы - предшественники формирования почек - активно экспрессируют ген PpCHK2, чтобы быть готовыми распознать появление внеклеточного iP, индуктора дифференцировки почек.

В свою очередь, потенциальная локализация большинства рецепторов CHK внутри клетки открывает для них возможность выполнять некоторые основные функции, направленные на сохранение внутриклеточного гомеостаза. В частности, среди предполагаемых функций одной из наиболее правдоподобных по некоторым причинам представляется функция рН-сенсинга. Это особенно верно для тех рецепторов, которые характеризуются монотонным увеличением связывания ЦК с ростом рН. Такая квазилинейная зависимость от рН наблюдалась для рецепторов ликопита SmCHK6, гимноспермов PaCHK1, а также цветковых растений: кукурузы ZmHK1 и картофеля StHK4b. Другая причина заключается в близком структурном сходстве CHK-рецепторов с бактериальными рН-сенсорами. Например, такой классический рН сенсор бактерий, как хеморецептор TrpV из *Helicobacter pylori*, является типичным TCS НК, который воспринимает сигнал, т.е. уровень

внутриклеточного рН, в процессе связывания лиганда (мочевины) в PAS домене своего сенсорного модуля (Sweeney et al., 2012). Это прямая аналогия с рецепторами НК-СНК, которые связывают свои лиганды, включая производные мочевины, также в PAS (суб)домене сенсорного модуля, и в обоих случаях консервативный Asp в сайте связывания играет ключевую роль в распознавании лиганда.

У мха *P. patens* рецептор PrСНК1 демонстрирует зависимость от рН, которая также напоминает квазилинейную с увеличением связывания лиганда при самых высоких значениях рН (9); эта зависимость сильно отличается от зависимости от рН другого рецептора мха, PrСНК2. Поэтому можно предположить, что рецептор PrСНК1, который, по-видимому, расположен внутри клетки, действует также как рН сенсор, поддерживая устойчивое состояние (нейтральный-слабоосновной рН) внутренней среды в клетках. Скорее всего, рецепторы СНК не являются единственными или даже основными сенсорами рН, контролирующими этот параметр растительных клеток, а действуют как часть сложной системы рН-контроля.

В экспериментах по связыванию K_D комплексов iP-рецепторов находились в диапазоне 1.5-4.0 нМ, что характерно для гормональных рецепторов в целом и рецепторов цитокининов в частности. Лигандная специфичность рецепторов была определена в экспериментах по конкуренции. Из всех протестированных цитокининовые рецепторы *P. patens* отдавали явное предпочтение iP. Рецепторы более поздно дивергировавших (или современных) наземных растений увеличивают свое сродство к tZ, но сохраняют высокое сродство связывания iP. В то время как одна из двух пар рецепторов (SmСНК6) у ликопита имеет высокое и близкое сродство к iP и tZ, один из двух рецепторов ели PaСНК2 связывает tZ значительно сильнее, чем iP. Также были выявлены четкие изменения в сродстве рецепторов к другим лигандам. Например, рецепторы из селлагинеллы (SmСНКs) показали высокое сродство к ВА, а рецепторы из ели (PaСНК1) и опять же селлагинеллы SmСНК4a- высокое сродство к TD. Особенно показательно увеличение специфичности рецепторов по отношению к структурно сходным cZ и tZ в ходе

эволюции растений. Хотя оба рецептора у мха предпочитают *tZ*, а не *cZ*, разница в сродстве к *цис*- и *транс*-зеатину была довольно мала. У ликопита один из двух рецепторов (SmCHK6) резко увеличил сродство к *tZ*, в то время как сродство к *cZ* оставалось низким. Что касается рецепторов ели, то дифференциация между *цис*- и *транс*-зеатином была еще более усилена, в основном за счет снижения сродства к *cZ* у PaCHK1. Стоит отметить, что специализация рецепторов в отношении *цис*- и *транс*-зеатина на этом не остановилась, а продолжилась у цветковых растений в том же направлении, хотя и специфическим для рецепторов образом. Примером среди цитокининовых рецепторов *Angiospermae* является АНКЗ из *A. thaliana*, сродство которого к *tZ* превышает сродство к *cZ* (отношение $cZ/tZ K_D$) в 376 раз. В то же время существуют цитокининовые рецепторы, например, ZmHK1 из кукурузы, который сохраняет архаичные черты, в частности, почти одинаковое сродство к *цис*- и *транс*-зеатину. Такая резкая дифференциация цитокининовых рецепторов по лигандной специфичности указывает на дальнейшую специализацию их функций у растений.

Несмотря на общее происхождение СНК-рецепторов мхов и СНК родственной группы, клеточная функция последних остается неясной. Неспособность этих белков связывать цитокинины с высокой аффинностью, по-видимому, исключает их участие в цитокининовой сигнализации. Однако это блокирование относится к восприятию цитокинина, но не к этапу трансдукции сигнала. Причиной этого является экспериментально доказанная способность рецепторов цитокининов образовывать гетеродимеры *in vitro* (Dortay et al., 2006) и *in planta*. В таких гетеродимерах одного цитокинин-чувствительного белка может быть достаточно для распознавания гормона и запуска сигнального процесса. Кроме того, помимо восприятия цитокинина, PpCHK сестринской группы, очевидно, имеют все функциональные домены, а некоторые из них, как было показано, обладают всеми активностями, необходимыми для передачи сигнала цитокининового до фосфотрансферных белков (Gruhn et al., 2014). Таким образом, PpCHKs сестринской группы в *P. patens* могут играть некоторую вспомогательную роль как фактор, дополняющий и усиливающий трансдукцию сигнала цитокинина.

Такое же рациональное объяснение может быть справедливо и для белка PpСНКЗ, который, очевидно, утратил способность связывать цитокинины, но, тем не менее, может участвовать в цитокининовом сигналинге *in planta* (von Schwartzberg et al., 2016). В целом, активность различных функциональных гистидинкиназ может дополнять и/или имитировать активность рецепторов СНК независимо от присутствия цитокининов. Поэтому для рассмотрения соответствующей цитокининовой триггерной нисходящей MSP (Multistep Phosphorelay) сигнализации необходимо учитывать возможное участие в процессе не только канонических СНК-рецепторов, но и других гибридных гистидинкиназ.

Можно предположить, что основные функции цитокининов в ранних дивергентных линиях были ограничены контролем некоторых основных клеточных параметров, таких как внутриклеточный рН и/или (у мхов) индукция формирования почек на протонеме. В отличие от подавляющего большинства других видов растений, у *P. patens* нет ни гомологов генов IPT для прямого синтеза цитокинина, ни гомологов генов цитохрома P450 CYP735A (таблица 20), которые кодируют ферменты, производящие *tZ*-тип цитокининов из *iP*-типа. Поэтому кажется естественным, что *iP*, высвобождающегося при распаде пренилированной тРНК, достаточно во мхе для этих простых физиологических целей. Соответственно, рецепторы мха сильно предпочитают *iP* другим широко распространенным цитокининам. Примечательно, что два функциональных цитокининовых рецептора мха различаются не столько по специфичности лиганда, сколько по зависимости связывания лиганда от рН. Возможно, что последнее различие связано с их различной субклеточной локализацией: один из рецепторов, вероятно, расположен на плазматической мембране и стимулирует формирование почек, а другой, предположительно, находится в эндоплазматическом ретикулуме и каким-то образом поддерживает физиологический статус клетки (например, контролируя внутриклеточный рН). Очевидно, что в ходе эволюции наземных растений число функций цитокининов постоянно увеличивалось, поэтому у сосудистых растений их роль стала гораздо более многогранной и важной (Heyl & Schmölling, 2003).

Интересно, что у мохообразных нет не только АТФ/АДР-ИРТ. У них и у плауновидных нет и tRNA-ИРТ второго класса, которые появляются только у группы Euphyllophyta, базовой группой которых являются папоротникообразные (таблица 20 и рисунок 75). При этом филогенетики именно из этой группы появляются канонические цитокининовые ИРТ (Nishii et al., 2018). Что касается синтеза *транс*-зеатина, то мы обнаружили вероятный ортолог этих ферментов только у антоцеротовых мхов, но у сосудистых растений эти ферменты есть у всех групп

Таблица 20. Наличие отдельных компонентов цитокининовой системы у представителей различных групп наземных растений.

растений. Соответственно, эта группа цитокининов начала производиться каноническим способом с возникновением сосудистых растений, либо у их вероятных предков среди мохообразных. Это привело и к увеличению аффинности к этой группе цитокининов у рецепторов всех групп сосудистых растений. Только у семенных имеются псевдофосфотрансмиттеры. Таким образом, появляется дополнительный негативно действующий элемент. Но данная группы не консервативна и у различных групп семенных растений псевдофосфотрансмиттеры не являются родственниками. Следует отметить, что в полной мере ингибирующая роль доказана, только для АНР6. А эта группа характерна только для двудольных растений (Vaughan-Hirsch et al., 2021). При этом только у всех семенных растений

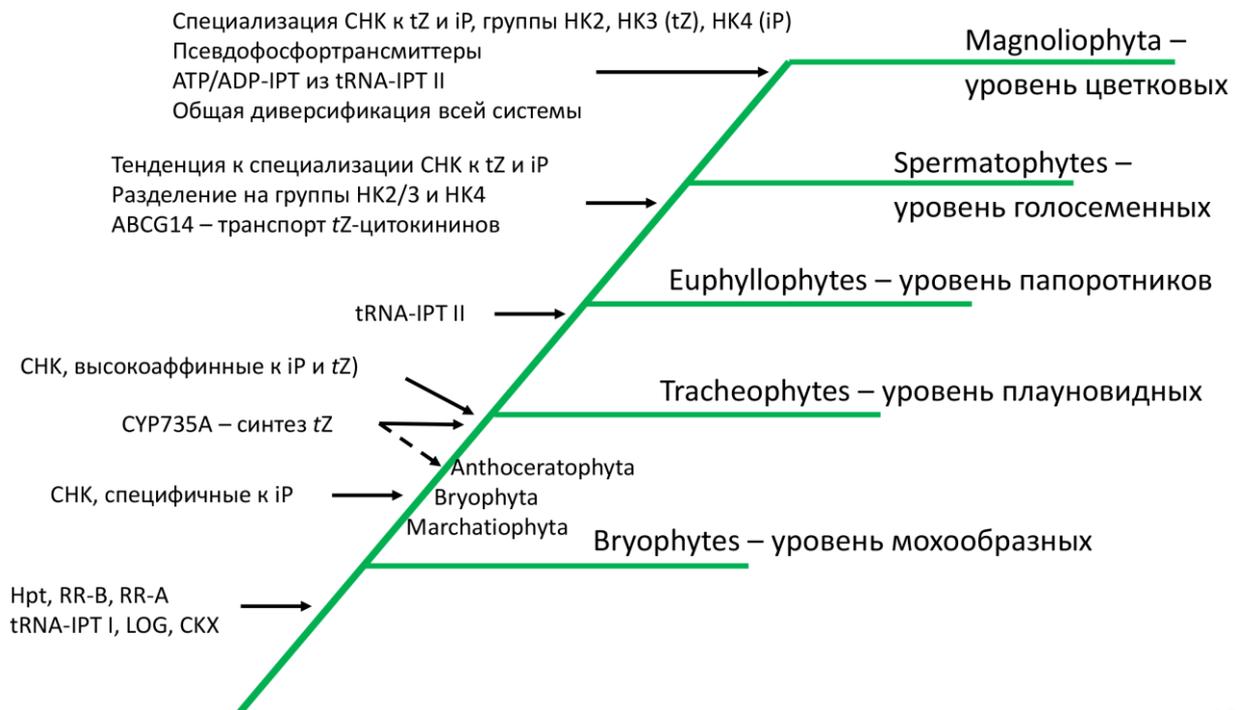


Схема эволюции цитокининовой системы рецепторы делятся на группы, свойственные арабидопсису. У голосеменных они делятся на HK2/3 и HK4, а у покрытосеменных – на HK2, HK3, HK4. Наблюдалась четкая тенденция к нарастанию лигандной специфичности рецепторов или к iP или tZ. Апогея это достигает у покровосеменных. Канонический дальний транспорт tZ цитокининов через ABCG14 имеется только у семенных растений. При этом у покровосеменных вся система сильно разрастается. У риса даже появляется новый тип рецепторов с серин/треониновой киназой в качестве эффекторной чати (Halawa et al., 2021). Это, судя по всему, связано с необходимостью обслуживать более сложный морфогенез цветковых и очень широкую адаптацию к условиям среды, выраженные в большом разнообразии форм и местообитаний, что является причиной доминирования этой группы растений в современной флоре.

Таким образом, в ходе эволюции сигнальная система цитокининов приобрела большое значение и многофункциональность, что обусловило ее совершенствование и быстрое развитие в направлении фактической монополизации MSP; прямого, а не через тРНК, синтеза ЦК, а также расширение специфичности рецепторов с их последующей специализацией к определенным ЦК у цветковых растений. При этом система ЦК приобрела большую надежность, стабильность и пластичность, о чем

свидетельствует, в частности, ее устойчивость к блокированию (нокауту) тех или иных ее основных элементов (Romanov, 2009; Gordon et al., 2009), а также тонкая настройка координации системы цитокининов с другими гормональными системами, прежде всего ауксиновой и этиленовой (Zdarska et al., 2019), для обеспечения оптимального развития растительного организма.

ВЫВОДЫ

1. В результате сравнительного анализа *in silico* более сотни СНК рецепторов цитокининов покрытосеменных и отдельно для групп НК2, НК3 и НК4:

а) определены среднестатистические размеры структурных компонентов типичного сенсорного модуля рецептора и установлены консенсусные последовательности его CHASE домена;

б) выявлены высококонсервативная область длиной около 40 аминокислот в форме α -спирали, непосредственно предшествующая CHASE-домену и входящая в димеризационный интерфейс, а также короткая (около 10 аминокислот) консервативная последовательность между С-концом CHASE домена и замыкающим сенсорный модуль "правым" (downstream) трансмембранным доменом;

в) установлено число предшествующих CHASE-домену "левых" (upstream) трансмембранных доменов в зависимости от группы рецепторов. В группе НК2 их, как правило, 3-4, в группе НК4 – обычно 1, у ортологов НК3 однодольных – также 1, тогда как у ортологов двудольных – почти всегда 2.

2. Разработан метод для анализа лиганд-связывающих свойств рецепторов на основе микросомальной фракции мембран из листьев табака *Nicotiana benthamiana*, в которых гены индивидуальных рецепторов были транзистентно экспрессированы. Анализ в подобной гомологичной системе, максимально приближенной к естественной, позволил получить следующие результаты:

а) установлено, что рецепторы различных видов растений связывают природные цитокинины (*транс*-зеатин, изопентениладенин) высокоаффинно с константами диссоциации, лежащими в наномолярном диапазоне. Сродство рецепторов к цис-зеатину и дигидрозеатину, как правило, существенно слабее;

б) высокоаффинное связывание при этом наблюдается только для оснований цитокининов, но не для их рибозидов. Тем самым, впервые напрямую показано, что именно основания являются активными цитокининами;

в) рецепторы цитокининов обладают выраженной лигандной специфичностью, в том числе к природным цитокининам. Анализ свойств рецепторов растений из

разных групп цветковых растений показал, что представители групп НК2 и НК4 имеют, как правило, сходную аффинность к транс-зеатину и изопентениладенину, тогда как представители группы НК3 явно предпочитают транс-зеатин. Особняком стоит рецептор кукурузы ZmНК1 (группа НК4), который является выраженным изопентениладениновым рецептором и при этом связывает цис-зеатин с тем же сродством, что и транс-зеатин;

г) рН-зависимость рецепторов характеризуется заметным уменьшением связывания лиганда при значениях рН ниже 7, что предполагает ослабление связывания цитокининов в кислом содержимом апопласта клеток.

3. Биоинформатический анализ показал, что:

а) способность рецепторов к димеризации на уровне сенсорных модулей также уменьшается при кислых значениях рН;

б) фосфорилирование соответствующих аминокислот (His, Asp) играет важную роль при взаимодействии ресиверного домена рецептора с фосфотрансмиттером. Количественные оценки подтвердили, что термодинамически выгодно передавать фосфат в системе именно в прямом направлении, от рецептора к фосфотрансмиттеру

4. На основе комплексного анализа субклеточной локализации рецепторов цитокининов арабидопсиса, картофеля и кукурузы установлено:

а) рецепторы цитокининов преимущественно локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулума, а не плазмалеммы. Среди органелл митохондрии и хлоропласты цитокинины специфически не связывают, что предполагает отсутствие в них рецепторов цитокининов;

б) с применением различных методов доказана функциональность рецепторов в эндоплазматическом ретикулуле. Соответственно, эндоплазматический ретикулум может быть основным местом инициации цитокининового сигнала в клетке.

5. Филогенетический анализ рецепторов всех доступных таксонов высших растений в сочетании с экспериментами по лигандной специфичности позволил заключить:

а) разделение на группы НК2/3 и НК4 существует только у семенных растений, а у эволюционно более древних таксонов рецепторы образуют свои специфичные группы;

б) впервые клонированы и охарактеризованы цитокининовые рецепторы эволюционно и/или хозяйственно значимых видов растений – мха *Physcomitrium patens*, плауна *Selaginella moellendorffii*, ели *Picea abies*, картофеля *Solanum tuberosum*;

в) высокоаффинное связывание цитокининов характерно только для канонических рецепторов и не наблюдается у представителей сестринской группы PrСНК, сохранившейся у мохообразных. Вероятно, белки группы PrСНК способны генерировать цитокинин-подобный сигнал в отсутствие гормона;

г) канонические рецепторы мохообразного *Physcomitrium patens* специфичны к изопентениладенину. Транс-зеатин связывается с рецептором активнее других природных цитокининов только у сосудистых растений. Это согласуется с эволюцией пути биосинтеза этого гормона. При этом специализация рецепторов к отдельным цитокининам нарастает по мере движения в направлении покрытосеменных растений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Abelenda, J. A., & Prat, S. (2013). Cytokinins: determinants of sink storage ability. *Current Biology*, 23(13), R561-R563.

- D'Agostino, I., Deruere, J. and Kieber, J. (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124, 1706–1717.
- Aki, S. S., Mikami, T., Naramoto, S., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Kyojuka, J., Kohchi, T., & Umeda, M. (2019). Cytokinin Signaling Is Essential for Organ Formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant & cell physiology*, 60(8), 1842–1854.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Alvarez, S., Marsh, E. L., Schroeder, S. G., & Schachtman, D. P. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell & Environment*, 31(3), 325-340.
- Anantharaman V, Aravind L (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* 26:579–582.
- Antoniadi, I., Novák, O., Gelová, Z., Johnson, A., Plíhal, O., Simerský, R., Mik, V., Vain, T., Mateo-Bonmatí, E., Karady, M., Pernisová, M., Plačková, L., Opassathian, K., Hejátko, J., Robert, S., Friml, J., Doležal, K., Ljung, K., & Turnbull, C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature communications*, 11(1), 4284.
- Aoki, M. M., Kisiala, A. B., Li, S., Stock, N. L., Brunetti, C. R., Huber, R. J., & Emery, R. J. (2019). Cytokinin detection during the *Dictyostelium discoideum* life cycle: profiles are dynamic and affect cell growth and spore germination. *Biomolecules*, 9(11), 702.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, cell & environment*, 32(9), 1147-1160.

- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., Epple, P., To, J. P., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., Dangl, J. L., & Kieber, J. J. (2012). Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS genetics*, 8(1), e1002448.
- Argyros, R., Mathews, D., Chiang, Y.-H., Palmer, C., Thibault, D., Etheridge, N., Argyros, A., Mason, M., Kieber, J. and Schaller, E. (2008) Type-B response regulators in Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and development. *Plant Cell* 20, 2102–2116.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic acids research*, 44(W1), W344-W350.
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P., & Chriqui, D. (2009). Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 57(4), 626–644.
- Aksenova, N. P., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Kossmann, J., Willmitzer, L., & Romanov, G. A. (2000). Transformed potato plants as a model for studying the hormonal and carbohydrate regulation of tuberization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47(3), 370-379.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., & Schmülling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 23(1), 69-80.
- Batoko, H., Zheng, H. Q., Hawes, C., & Moore, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *The Plant Cell*, 12(11), 2201-2217.

- Bauer, J., Reiss, K., Veerabagu, M., Heunemann, M., Harter, K., & Stehle, T. (2013). Structure–function analysis of *Arabidopsis thaliana* histidine kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. *Molecular Plant*, *6*(3), 959-970.
- Bencivenga, S., Simonini, S., Benková, E., & Colombo, L. (2012). The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(7), 2886-2897.
- Bengochea T, Dodds JH, Evans DE, Jerie PH, Niepel B, Shaari AR, Hall MA. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*. 1980 Apr;148(4):397-406.
- Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic acids research*, *37*(suppl_2), W510-W514.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, *115*(5), 591-602.
- Besnard, F., Vernoux, T., & Hamant, O. (2011). Organogenesis from stem cells in planta: multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(17), 2885-2906.
- Besnard, F., Rozier, F., & Vernoux, T. (2014). The AHP6 cytokinin signaling inhibitor mediates an auxin-cytokinin crosstalk that regulates the timing of organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant signaling & behavior*, *9*(6), e28788.
- Bhargava, A., Clabaugh, I., To, J. P., Maxwell, B. B., Chiang, Y. H., Schaller, G. E., Loraine, A., & Kieber, J. J. (2013). Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *162*(1), 272–294.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL:

modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), W252–W258.

Bibikova, T. N., Jacob, T., Dahse, I., & Gilroy, S. (1998). Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125(15), 2925-2934.

Bishopp A, Help H, Helariutta Y (2009) Cytokinin signaling during root development. *Int Rev Cell Mol Biol* 276:1–48.

Bishopp, A., Lehesranta, S., Vatén, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A. P., Sakakibara, H., & Helariutta, Y. (2011). Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Current biology : CB*, 21(11), 927–932.

Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, A. P., & Helariutta, Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current biology : CB*, 21(11), 917–926.

Bisswanger, H. (2019). *Practical enzymology*. John Wiley & Sons.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, 433(7021), 39–44.

Boevink, P., Santa Cruz, S., Hawes, C., Harris, N., & Oparka, K. J. (1996). Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *The Plant Journal*, 10(5), 935-941.

Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal*, 15(3), 441-447.

Bond CS (2003) TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics* 19:311–312. doi:10.1093/bioinformatics/ 19.2.311

- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 4:1077–1092
- Brandstatter, I. and Kieber, J. (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1009–1019.
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L., & Schmülling, T. (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44(2), 314-333.
- Brenner WG, Ramireddy E, Heyl A, Schmülling T (2012) Gene regulation by cytokinin in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 3:8.
- Brütting, C., Schäfer, M., Vanková, R., Gase, K., Baldwin, I. T., & Meldau, S. (2017). Changes in cytokinins are sufficient to alter developmental patterns of defense metabolites in Nicotiana attenuata. *The Plant Journal*, 89(1), 15-30.
- Bromley JR, Warnes BJ, Newell CA, Thomson JC, James CM, Turnbull CG, Hanke DE. A purine nucleoside phosphorylase in Solanum tuberosum L.(potato) with specificity for cytokinins contributes to the duration of tuber endodormancy. *Biochemical Journal*. 2014 Mar 1;458(2):225-37.
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136), 1051-1054.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., & Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 34(1), 13–26.

- Busch, W., Miotk, A., Ariel, F. D., Zhao, Z., Forner, J., Daum, G., ... & Lohmann, J. U. (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Developmental cell*, 18(5), 841-853.
- Caesar K, Thamm AM, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen C, Horak J, Harter K (2011) Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* 62:5571–5580.
- Carvalho, A., Paiva, J., Louzada, J., & Lima-Brito, J. (2013). The transcriptomics of secondary growth and wood formation in conifers. *Molecular Biology International*, 2013.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., & Bennett, M. J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in plant science*, 8(4), 165–171.
- Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., & Frommer, W. B. (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in Arabidopsis cell cultures. *Plant Physiology*, 148(4), 1857-1867.
- Chang, L., Ramireddy, E., & Schmülling, T. (2013). Lateral root formation and growth of Arabidopsis is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *Journal of experimental botany*, 64(16), 5021-5032.
- Chang, L., Ramireddy, E., & Schmülling, T. (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 66(15), 4759–4768.
- Chatfield, S. P., Capron, R., Severino, A., Penttila, P. A., Alfred, S., Nahal, H., & Provart, N. J. (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *The Plant Journal*, 73(5), 798-813.
- Chen, C. M., & Kristopeit, S. M. (1981). Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology*, 68(5), 1020-1023.

- Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L., & Schaller, G. E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19861-19866.
- Chen, M. K., Wilson, R. L., Palme, K., Ditengou, F. A., & Shpak, E. D. (2013). ERECTA family genes regulate auxin transport in the shoot apical meristem and forming leaf primordia. *Plant physiology*, 162(4), 1978-1991.
- Cheng, Y. C., & Prusoff, W. H. (1973). The concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol*, 22, 3099-3108.
- Cheng, C. Y., Mathews, D. E., Eric Schaller, G., & Kieber, J. J. (2013). Cytokinin-dependent specification of the functional megaspore in the Arabidopsis female gametophyte. *The Plant Journal*, 73(6), 929-940.
- Cheng, Z. J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y. H., Li, W., Sun, T. T., Zhao, X. Y., Li, X. G., Cheng, Y., Zhao, Y., Xie, Q., & Zhang, X. S. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant physiology*, 161(1), 240–251.
- Cheung J, Hendrickson WA (2009) Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* 17:190–201
- Chickarmane, V. S., Gordon, S. P., Tarr, P. T., Heisler, M. G., & Meyerowitz, E. M. (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical–basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(10), 4002-4007.
- Chiu, W. L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., & Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 6(3), 325-330.
- Choi, J., Huh, S. U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K. H., & Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental cell*, 19(2), 284-295.

- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C. M., & Hwang, I. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends?. *Trends in plant science*, *16*(7), 388-394.
- Christianson, M., & Warnick, D. A. (1983). Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental biology*, *95*(2), 288-293.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., & Barton, G. J. (2004). The jalview java alignment editor. *Bioinformatics*, *20*(3), 426-427.
- Clement, N. R., & Gould, J. M. (1981). Pyranine (8-hydroxy-1, 3, 6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry*, *20*(6), 1534-1538.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, *16*(6), 735-743.
- Cong, Q., & Grishin, N. V. (2012). MESSA: MEta-server for protein sequence analysis. *BMC biology*, *10*(1), 1-12.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Périlleux, C., & Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of experimental botany*, *54*(392), 2511-2517.
- Cortleven, A., Nitschke, S., Klaumünzer, M., Abdelgawad, H., Asard, H., Grimm, B., Riefler, M., & Schmülling, T. (2014). A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *Arabidopsis* histidine kinase2 and *Arabidopsis* histidine kinase3 receptors. *Plant physiology*, *164*(3), 1470–1483.
- Courtaut, F., Derangère, V., Chevriaux, A., Ladoire, S., Cotte, A. K., Arnould, L., Boidot, R., Riolland, M., Ghiringhelli, F., & Rébé, C. (2015). Liver X receptor ligand cytotoxicity in colon cancer cells and not in normal colon epithelial cells depends on LXR β subcellular localization. *Oncotarget*, *6*(29), 26651–26662.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *139*(1), 5-17.
- da-Silva, W. S., Rezende, G. L., & Galina, A. (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, *52*(359), 1191-1201.
- Darnell, S. J., Page, D., & Mitchell, J. C. (2007). An automated decision-tree approach to predicting protein interaction hot spots. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *68*(4), 813-823.
- Daudu, D., Allion, E., Liesecke, F., Papon, N., Courdavault, V., Dugé de Bernonville, T., Mélin, C., Oudin, A., Clastre, M., Lanoue, A., Courtois, M., Pichon, O., Giron, D., Carpin, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Crèche, J., Besseau, S., & Glévarec, G. (2017). CHASE-Containing Histidine Kinase Receptors in Apple Tree: From a Common Receptor Structure to Divergent Cytokinin Binding Properties and Specific Functions. *Frontiers in plant science*, *8*, 1614.
- Davière, J. M., & Achard, P. (2017). Organ communication: Cytokinins on the move. *Nature plants*, *3*(8), 1-2.
- De Diego, N., Montalbán, I. A., & Moncaleán, P. (2010). In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. *South African Journal of Botany*, *76*(1), 158-162.
- De Rybel, B., Adibi, M., Breda, A. S., Wendrich, J. R., Smit, M. E., Novák, O., Yamaguchi, N., Yoshida, S., Van Isterdael, G., Palovaara, J., Nijssse, B., Boekschoten, M. V., Hooiveld, G., Beeckman, T., Wagner, D., Ljung, K., Fleck, C., & Weijers, D. (2014). Plant development. Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6197), 1255215.
- De Rybel, B., Mähönen, A. P., Helariutta, Y., & Weijers, D. (2016). Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology*, *17*(1), 30-40.

- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W. C., Liang, Y., & Zuo, J. (2010). Arabidopsis histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *The Plant cell*, 22(4), 1232–1248.
- Dervinis, C., Frost, C. J., Lawrence, S. D., Novak, N. G., & Davis, J. M. (2010). Cytokinin primes plant responses to wounding and reduces insect performance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(3), 289-296.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A. A., Maughan, S. C., Menges, M., Braun, N., Collins, C., Nieuwland, J., Prinsen, E., Sundaresan, V., & Murray, J. A. (2007). Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(36), 14537–14542.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Jones, A. M., & Estelle, M. (2003). Auxin action in a cell-free system. *Current Biology*, 13(16), 1418-1422.
- Ding, W., Tong, H., Zheng, W., Ye, J., Pan, Z., Zhang, B., & Zhu, S. (2017). Isolation, Characterization and Transcriptome Analysis of a Cytokinin Receptor Mutant *Osc1* in Rice. *Frontiers in plant science*, 8, 88.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W665-W667.
- Dortay, H., Mehnert, N., Burkle, L., Schmulling, T. and Heyl, A. (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin signaling pathway of Arabidopsis thaliana. *FEBS J.* 273, 4631–4644.
- Douce, R., Christensen, E. L., & Bonner Jr, W. D. (1972). Preparation of intact plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 275(2), 148-160.
- Duan, Z., Homma, A., Kobayashi, M., Nagata, N., Kaneko, Y., Fujiki, Y., & Nishida, I. (2014). Photoassimilation, assimilate translocation and plasmodesmal biogenesis in the

- source leaves of *Arabidopsis thaliana* grown under an increased atmospheric CO₂ concentration. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 358-369.
- Dubrovsky, J. G., Napsucialy-Mendivil, S., Duclercq, J., Cheng, Y., Shishkova, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Murphy, A. S., & Benková, E. (2011). Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation. *The New phytologist*, 191(4), 970–983.
- Dunbrack Jr, R. L. (2002). Rotamer libraries in the 21st century. *Current opinion in structural biology*, 12(4), 431-440.
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., & Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the move. *Frontiers in Plant Science*, 8, 146.
- El-Showk, S., Ruonala, R., & Helariutta, Y. (2013). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, 140(7), 1373-1383.
- Erb, M., Meldau, S., & Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in plant science*, 17(5), 250-259.
- Eviatar-Ribak, T., Shalit-Kaneh, A., Chappell-Maor, L., Amsellem, Z., Eshed, Y., & Lifschitz, E. (2013). A cytokinin-activating enzyme promotes tuber formation in tomato. *Current Biology*, 23(12), 1057-1064.
- Falke JJ, Erbse AH (2009) The piston rises again. *Structure* 17:1149–1151.
- Fan, M., Xu, C., Xu, K., & Hu, Y. (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell research*, 22(7), 1169-1180.
- Felle, H. H. (2005). pH regulation in anoxic plants. *Annals of botany*, 96(4), 519-532.
- Flores-Sandoval, E., Dierschke, T., Fisher, T. J., & Bowman, J. L. (2016). Efficient and inducible use of artificial microRNAs in *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology*, 57(2), 281-290.

- Frébortová, J., Plíhal, O., Florová, V., Kokáš, F., Kubiasová, K., Greplová, M., Šimura, J., Novák, O., & Frébort, I. (2017). Light influences cytokinin biosynthesis and sensing in *Nostoc* (cyanobacteria). *Journal of phycology*, *53*(3), 703–714.
- Friedrichsen, D. M., Joazeiro, C. A., Li, J., Hunter, T., & Chory, J. (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant physiology*, *123*(4), 1247-1256.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J. D., Crespi, M., & Szczyglowski, K. (2008). Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in plant science*, *13*(3), 115-120.
- Gabdoulline, R. R., Wade, R. C., & Walther, D. (2003). MolSurfer: a macromolecular interface navigator. *Nucleic acids research*, *31*(13), 3349-3351.
- Gajdosová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Zizková, E., Hanus, J., Dancák, M., Trávníček, B., Pesek, B., Krupicka, M., Vanková, R., Strnad, M., & Motyka, V. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of experimental botany*, *62*(8), 2827–2840.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmölling, T., & Frébort, I. (2007). Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, *26*, 255-267.
- Gattolin, S., Alandete-Saez, M., Elliot, K., Gonzalez-Carranza, Z., Naomab, E., Powell, C. and Roberts, J. (2006) Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* *57*, 4225–4233.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., Lutts, S., & Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of experimental botany*, *59*(11), 3039–3050.

- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., & Ben-Tal, N. (2003). ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, *19*(1), 163-164.
- Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B., & Frommer, W. B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *12*(2), 291-300.
- Gonugunta, V. K., Srivastava, N., Puli, M. R., & Raghavendra, A. S. (2008). Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalinization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, *31*(11), 1717-1724.
- Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16529-16534.
- Grefen C, Harter K (2004) Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* 219:733–742.
- Grefen, C., Städele, K., Růžička, K., Obrdlik, P., Harter, K., & Horák, J. (2008). Subcellular localization and in vivo interactions of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor family members. *Molecular plant*, *1*(2), 308-320.
- Gruel, J., Landrein, B., Tarr, P., Schuster, C., Refahi, Y., Sampathkumar, A., Hamant, O., Meyerowitz, E. M., & Jönsson, H. (2016). An epidermis-driven mechanism positions and scales stem cell niches in plants. *Science advances*, *2*(1), e1500989.
- Gruhn, N., Halawa, M., Snel, B., Seidl, M. F., & Heyl, A. (2014). A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiology*, *165*(1), 227-237.

- Gruhn, N., Seidl, M. F., Halawa, M., & Heyl, A. (2015). Members of a recently discovered subfamily of cytokinin receptors display differences and similarities to their classical counterparts. *Plant signaling & behavior*, *10*(2), e984512.
- Gualberto, J. M., Handa, H., & Grienenberger, J. M. (1995). Isolation and fractionation of plant mitochondria and chloroplasts: specific examples. In *Methods in cell biology* (Vol. 50, pp. 161-175). Academic Press.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Larrieu, A., & Vernoux, T. (2015). Comparison of plant hormone signalling systems. *Essays in biochemistry*, *58*, 165-181.
- Guivarc'h, A., Rembur, J., Goetz, M., Roitsch, T., Noin, M., Schmülling, T., & Chriqui, D. (2002). Local expression of the ipt gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *Journal of experimental botany*, *53*(369), 621-629.
- Gupta S, Rashotte AM (2012) Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Rep* 31:801–812.
- Halawa, M., Cortleven, A., Schmülling, T., & Heyl, A. (2021). Characterization of CHARK, an unusual cytokinin receptor of rice. *Scientific reports*, *11*(1), 1-10.
- Han Q, Jiang H, Qi X, Yu J, Wu P (2004) A CHASE domain containing protein kinase OsCRL4 represents a new AtCRE1- like gene family in rice. *J Zhejiang Univ Sci* 5:629–633.
- Hansen, H., & Dörffling, K. (2003). Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: interaction in the control of leaf diffusive resistance?. *Functional Plant Biology*, *30*(4), 365-375.
- Hartmann, F. P., Rathgeber, C. B., Badel, E., Fournier, M., & Moulia, B. (2021). Modelling the spatial crosstalk between two biochemical signals explains wood formation dynamics and tree-ring structure. *Journal of Experimental Botany*, *72*(5), 1727-1737.
- Hatano, K., Shimada, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (1997). A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and

- degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant and cell physiology*, 38(3), 344-351.
- Haus, M. J., Li, M., Chitwood, D. H., & Jacobs, T. W. (2018). Long-distance and trans-generational stomatal patterning by CO₂ across *Arabidopsis* organs. *Frontiers in plant science*, 1714.
- Hawkins, C., & Liu, Z. (2014). A model for an early role of auxin in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Frontiers in plant science*, 5, 327.
- Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K., & Brzobohatý, B. (2003). The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Molecular genetics and genomics*, 269(4), 443-453.
- Hejnowicz, A., & Tomaszewski, M. (1969). Growth regulators and wood formation in *Pinus silvestris*. *Physiologia Plantarum*, 22(5), 984-992.
- Hérivaux, A., Dugé de Bernonville, T., Roux, C., Clastre, M., Courdavault, V., Gastebois, A., Bouchara, J. P., James, T. Y., Latgé, J. P., Martin, F., & Papon, N. (2017). The Identification of Phytohormone Receptor Homologs in Early Diverging Fungi Suggests a Role for Plant Sensing in Land Colonization by Fungi. *mBio*, 8(1), e01739-16.
- Heyl A, Schmülling T (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr Opin Plant Biol* 6:480–488.
- Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmülling T (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* 7:62.
- Heyl A, Riefler M, Romanov GA, Schmülling T (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *Eur J Cell Biol* 91:246–256.
- Heyl A, Brault M, Frugier F, Kuderová A, Lindner AC, Motyka V, Rashotte AM, von Schwartzberg K, Vankova R, Schaller E (2013) Nomenclature for members of the two-component signaling pathway of plants. *Plant Physiol* 161:1063–1065.

- Higuchi, M., Pischke, M., Mahonen, A., Miawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S. et al. (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8821–8826.
- Hill, K., Mathews, D., Kim, H.-K., Street, I., Wildes, S., Chiang, Y.-H., Mason, M., Alonso, J., Ecker, J., Kieber, J. and Schaller, E. (2013) Functional characterization of type-B response regulators in the Arabidopsis cytokinin response. *Plant Physiol.* 162, 212–224.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D., & Beeckman, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell*, 14(10), 2339-2351.
- Hirayama, T., & Alonso, J. M. (2000). Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant and cell physiology*, 41(5), 548-555.
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2005). Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology*, 138(1), 196-206.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* 59:75–83.
- Hodges, T. K., & Mills, D. (1986). Isolation of the plasma membrane. In *Methods in Enzymology* (Vol. 118, pp. 41-54). Academic Press.
- Horak, J., Grefen, C., Berendzen, K., Hahn, A., Stierhof, Y., Stadelhofer, B., Stahl, M., Koncz, C. and Harter, K. (2008) The Arabidopsis thaliana response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biol.* 8, 1–18.
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., Ikeuchi, M., Watanabe, M., Wada, H., Kobayashi, K., Saito, M., Masuda, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Mashiguchi, K., Awai, K., ...

- Ohta, H. (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature communications*, 5, 3978.
- Hothorn M, Van den Ende W, Lammens W, Rybin V, Scheffzek K. Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Oct 5;107(40):17427-32.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol* 7:766–768.
- Hubick, K. T., Taylor, J. S., & Reid, D. M. (1986). The effect of drought on levels of abscisic acid, cytokinins, gibberellins and ethylene in aeroponically-grown sunflower plants. *Plant Growth Regulation*, 4(2), 139-151.
- Hutchison, C., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M., Maxwell, B., Perdue, T., Schaller, E., Alonso, J. et al. (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 18, 3073–3087.
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T. and Yamazaki, T. (2002) Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* 14, 2015–2029.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hwang I, Chen H, Sheen J (2002) Two-component signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:500–515.
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual review of plant biology*, 63, 353-380.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q. W., Howell, S. H., & Chua, N. H. (2006). The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant and cell physiology*, 47(11), 1443-1456.

- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, *409*(6823), 1060–1063.
- Ioio, R. D., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current biology*, *17*(8), 678-682.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P., & Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5906), 1380–1384.
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., & Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *49*(1), 47-57.
- Itai, C., & Vaadia, Y. (1965). Kinetin-like Activity in Root Exudate of. *Physiologia plantarum*, *18*, 941.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, *6*(13), 3901-3907.
- Jeon, J., Kim, N. Y., Kim, S., Kang, N. Y., Novák, O., Ku, S. J., Cho, C., Lee, D. J., Lee, E. J., Strnad, M., & Kim, J. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry*, *285*(30), 23371–23386.
- Jeon, J., & Kim, J. (2013). Cold stress signaling networks in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, *56*(2), 69-76.

- Jiang, C. J., Shimono, M., Sugano, S., Kojima, M., Liu, X., Inoue, H., Sakakibara, H., & Takatsuji, H. (2013). Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 26(3), 287–296.
- Jordan, C. V., Shen, W., Hanley-Bowdoin, L. K., & Robertson, D. N. (2007). Geminivirus-induced gene silencing of the tobacco retinoblastoma-related gene results in cell death and altered development. *Plant molecular biology*, 65(1), 163-175.
- Juntawong, P., Sorenson, R., & Bailey-Serres, J. (2013). Cold shock protein 1 chaperones mRNA s during translation in *A rabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 74(6), 1016-1028.
- Kabbara, S., Schmülling, T., & Papon, N. (2018). CHASEing cytokinin receptors in plants, bacteria, fungi, and beyond. *Trends in plant science*, 23(3), 179-181.
- Kabbara, S., Bidon, B., Kilani, J., Dugé de Bernonville, T., Clastre, M., Courdavault, V., Cock, J. M., & Papon, N. (2019). Megaviruses: An involvement in phytohormone receptor gene transfer in brown algae?. *Gene*, 704, 149–151.
- Kakimoto, T. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274, 982–985
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42(7), 677-685.
- Kakimoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* 54:605–627.
- Kaltenegger, E., Leng, S., & Heyl, A. (2018). The effects of repeated whole genome duplication events on the evolution of cytokinin signaling pathway. *BMC evolutionary biology*, 18(1), 1-19.
- Kamada-Nobusada, T., & Sakakibara, H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(4), 444-449.

- Kamada-Nobusada, T., Makita, N., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2013). Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant and Cell Physiology*, *54*(11), 1881-1893.
- Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., & Martinoia, E. (2017). Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends in Plant Science*, *22*(6), 455-461.
- Kang, N. Y., Cho, C., Kim, N. Y., & Kim, J. (2012). Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, *169*(14), 1382-1391.
- Kang, N. Y., Cho, C., & Kim, J. (2013). Inducible expression of *Arabidopsis* response regulator 22 (ARR22), a type-C ARR, in transgenic *Arabidopsis* enhances drought and freezing tolerance. *PLoS One*, *8*(11), e79248.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, *7*(5), 193-195.
- Karimi, M., De Meyer, B., & Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in plant science*, *10*(3), 103-105.
- Karimi, M., Depicker, A., & Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant physiology*, *145*(4), 1144-1154.
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., ... & Sakakibara, H. (2004). Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 14049-14054.
- Kawaguchi, M., Kobayashi, M., Sakurai, A., & Syōno, K. (1991). The presence of an enzyme that converts indole-3-acetamide into IAA in wild and cultivated rice. *Plant and cell physiology*, *32*(2), 143-149.
- Kemper, E., Grevelding, C., Schell, J., & Masterson, R. (1992). Improved method for the transformation of *Arabidopsis thaliana* with chimeric dihydrofolate reductase constructs which confer methotrexate resistance. *Plant cell reports*, *11*(3), 118-121.

- Kerstetter, R. A., Laudencia-Chingcuanco, D., Smith, L. G., & Hake, S. (1997). Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development*, *124*(16), 3045-3054.
- Kiba, T., Aoki, K., Sahakibara, H. and Mizuno, T. (2004) Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokininreceptor mutant. *Plant Cell Physiol.* *45*, 1063–1077.
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of experimental botany*, *62*(4), 1399-1409.
- Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2013). Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in Arabidopsis. *Developmental cell*, *27*(4), 452-461.
- Kiba, T., Inaba, J., Kudo, T., Ueda, N., Konishi, M., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Ohme-Takagi, M., Matsui, M., Yano, K., Yanagisawa, S., & Sakakibara, H. (2018). Repression of Nitrogen Starvation Responses by Members of the Arabidopsis GARP-Type Transcription Factor NIGT1/HRS1 Subfamily. *The Plant cell*, *30*(4), 925–945.
- Kiba, T., Takebayashi, Y., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2019). Sugar-induced de novo cytokinin biosynthesis contributes to Arabidopsis growth under elevated CO₂. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-15.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, *12*.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, *145*(4), dev149344.
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., Sheen, J., Nam, H. G., & Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(3), 814–819.

- Kim, K., Ryu, H., Cho, Y. H., Scacchi, E., Sabatini, S., & Hwang, I. (2012). Cytokinin-facilitated proteolysis of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *The Plant Journal*, *69*(6), 934-945.
- Kim, A., Chen, J., Khare, D., Jin, J. Y., Yamaoka, Y., Maeshima, M., Zhao, Y., Martinoia, E., Hwang, J. U., & Lee, Y. (2020). Non-intrinsic ATP-binding cassette proteins ABCI19, ABCI20 and ABCI21 modulate cytokinin response at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*, *39*(4), 473–487.
- Kinoshita-Tsujimura, K., & Kakimoto, T. (2011). Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, *6*(1), 66-71.
- Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K. Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W. Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., & Lee, Y. (2014). Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(19), 7150–7155.
- Koizumi, N., Martinez, I. M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., & Chrispeels, M. J. (2001). Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant physiology*, *127*(3), 949-962.
- Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K., & Sakakibara, H. (2009). Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant & cell physiology*, *50*(7), 1201–1214.
- Kolachevskaya, O. O., Alekseeva, V. V., Sergeeva, L. I., Rukavtsova, E. B., Getman, I. A., Vreugdenhil, D., Buryanov, Y. I., & Romanov, G. A. (2015). Expression of auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization in vitro. *Journal of integrative plant biology*, *57*(9), 734–744.
- Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Schmölling, T., & Werner, T. (2014). Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX 7) from *Arabidopsis* causes

specific changes in root growth and xylem differentiation. *The Plant Journal*, 78(3), 359-371.

Kolosova, N., Miller, B., Ralph, S., Ellis, B. E., Douglas, C., Ritland, K., & Bohlmann, J. (2004). Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *Biotechniques*, 36(5), 821-824.

Konishi, M., & Yanagisawa, S. (2013). Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature communications*, 4(1), 1-9.

Kopečná, M., Blaschke, H., Kopečný, D., Vigouroux, A., Koncítíková, R., Novák, O., Kotland, O., Strnad, M., Moréra, S., & von Schwartzberg, K. (2013). Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant physiology*, 163(4), 1568–1583.

Kortemme, T., Kim, D. E., & Baker, D. (2004). Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Science's STKE*, 2004(219), pl2-pl2.

Kowalska, M., Galuszka, P., Frébortová, J., Šebela, M., Béres, T., Hluska, T., Šmehilová, M., Bilyeu, K. D., & Frébort, I. (2010). Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*, 71(17-18), 1970–1978.

Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255–278.

Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology*, 372(3), 774-797.

Kubiasová, K., Montesinos, J. C., Šamajová, O., Nisler, J., Mik, V., Semerádová, H., Plíhalová, L., Novák, O., Marhavý, P., Cavallari, N., Zalabák, D., Berka, K., Doležal, K., Galuszka, P., Šamaj, J., Strnad, M., Benková, E., Plíhal, O., & Spíchal, L. (2020).

Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature communications*, 11(1), 4285.

Kuderová, A., Gallová, L., Kuricová, K., Nejedlá, E., Čurdová, A., Micenková, L., Plíhal, O., Šmajš, D., Spíchal, L., & Hejátko, J. (2015). Identification of AHK2- and AHK3-like cytokinin receptors in *Brassica napus* reveals two subfamilies of AHK2 orthologues. *Journal of experimental botany*, 66(1), 339–353.

Kudo, T., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 53-60.

Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H. and Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-zeatin-Oglucosyltransferase in rice. *Plant Physiol.* 160, 319–331.

Kudoyarova, G. R., Vysotskaya, L. B., Cherkozyanova, A., & Dodd, I. C. (2007). Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 161-168.

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652–655.

Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., & Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21(10), 3152–3169.

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.

Laddach, A., Chung, S. S., & Fraternali, F. (2018). Prediction of protein-protein interactions: Looking through the kaleidoscope. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (pp. 834-848). Elsevier.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landrein, B., Formosa-Jordan, P., Malivert, A., Schuster, C., Melnyk, C. W., Yang, W., Turnbull, C., Meyerowitz, E. M., Locke, J., & Jönsson, H. (2018). Nitrate modulates stem cell dynamics in *Arabidopsis* shoot meristems through cytokinins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), 1382–1387.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B., Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., & Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant cell*, 19(12), 3889–3900.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–2948.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein science*, 27(1), 129-134.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., & Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172–1175.
- Lee, A. G. (2003). Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1612(1), 1-40.
- Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2), 62-87.

- Lee, J. S., & Torii, K. U. (2012, January). A tale of two systems: peptide ligand–receptor pairs in plant development. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 77, pp. 83-89). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Letham, D. S., & Miller, C. O. (1965). Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant and Cell Physiology*, 6(2), 355-359.
- B. Lewin, L. Cassimeris, V.R. Lingappa, G. Plopper, Cells, Jones & Bartlett Publ., Boston et al, 2007.
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A. B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F., & Krapp, A. (2014). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 80(2), 230–241.
- Li, F. W., Nishiyama, T., Waller, M., Frangedakis, E., Keller, J., Li, Z., Fernandez-Pozo, N., Barker, M. S., Bennett, T., Blázquez, M. A., Cheng, S., Cuming, A. C., de Vries, J., de Vries, S., Delaux, P. M., Diop, I. S., Harrison, C. J., Hauser, D., Hernández-García, J., Kirbis, A., ... Szövényi, P. (2020). Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nature plants*, 6(3), 259–272.
- Lindner, A. C., Lang, D., Seifert, M., Podlešáková, K., Novák, O., Strnad, M., Reski, R., & von Schwartzberg, K. (2014). Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of experimental botany*, 65(9), 2533–2543.
- Lituiev, D. S., Krohn, N. G., Müller, B., Jackson, D., Hellriegel, B., Dresselhaus, T., & Grossniklaus, U. (2013). Theoretical and experimental evidence indicates that there is no detectable auxin gradient in the angiosperm female gametophyte. *Development*, 140(22), 4544-4553.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Vazquez-Tello, A., & Whittier, R. F. (1995). Generation of a high-quality P1 library of Arabidopsis suitable for chromosome walking. *The Plant Journal*, 7(2), 351-358.

- Liu, W. Z., Kong, D. D., Gu, X. X., Gao, H. B., Wang, J. Z., Xia, M., Gao, Q., Tian, L. L., Xu, Z. H., Bao, F., Hu, Y., Ye, N. S., Pei, Z. M., & He, Y. K. (2013). Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(4), 1548–1553.
- Liu, S., Lan, J., Zhou, B., Qin, Y., Zhou, Y., Xiao, X., ... & Tang, C. (2015). H b NIN 2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *New Phytologist*, *206*(2), 709–725.
- Lomin, S. N., & Romanov, G. A. (2008). The analysis of hormone-receptor interaction. Theoretical and practical aspects. *Russian Journal of Plant Physiology*, *55*(2), 259–273.
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot* *62*:5149–5159
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MYu, Osolodkin DI, Romanov GA (2012) Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae* *4*(3):31–45.
- Lomin, S. N., Myakushina, Y. A., Arkhipov, D. V., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Schmülling, T., & Romanov, G. A. (2017). Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Functional Plant Biology*, *45*(2), 192–202.
- Lord, J. M. (1987). [54] Isolation of endoplasmic reticulum: General principles, enzymatic markers, and endoplasmic reticulum-bound polysomes. In *Methods in Enzymology* (Vol. 148, pp. 576–584). Academic Press.
- Lou Y, Gou JY, Xue HW. PIP5K9, an Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *The Plant Cell*. 2007 Jan;19(1):163–81.
- Lyznik, L. A., & Hodges, T. K. (1994). Polyethylene glycol-mediated DNA uptake into maize protoplasts. In *The maize handbook* (pp. 603–609). Springer, New York, NY.

- Ma, B., Cui, M. L., Sun, H. J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H., & Ezura, H. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant physiology*, *141*(2), 587–597.
- Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hájek, T., Prášil, I. T., Gaudinová, A., Štorchová, H., Ge, E., Werner, T., Schmölling, T., & Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of experimental botany*, *64*(10), 2805–2815.
- Maeda, Y., Konishi, M., Kiba, T., Sakuraba, Y., Sawaki, N., Kurai, T., Ueda, Y., Sakakibara, H., & Yanagisawa, S. (2018). A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*. *Nature communications*, *9*(1), 1376.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D., & Bögre, L. (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *The Plant Cell*, *17*(9), 2527–2541.
- Mahonen, A., Bishop, A., Higuchi, M., Nieminen, K., Kinoshita, K., Tormakangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T. and Helariutta, Y. (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* *311*, 94–98.
- Mähönen, A. P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M. S., Sussman, M. R., Helariutta, Y., & Kakimoto, T. (2006). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current biology : CB*, *16*(11), 1116–1122.
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of chemical theory and computation*, *11*(8), 3696–3713.
- Makino, S., Kibo, T., Imamura, A., Tomomi, S., Taniguchi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T. (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *41*, 791–803.

- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., & Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell*, *14*(3), 589-597.
- Margreitter, C., Petrov, D., & Zagrovic, B. (2013). Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications. *Nucleic acids research*, *41*(W1), W422-W426.
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., & Benková, E. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental cell*, *21*(4), 796–804.
- Marinos, N. G. (1960). The nuclear envelope of plant cells. *Journal of ultrastructure research*, *3*(3), 328-333.
- Marsch-Martínez, N., Ramos-Cruz, D., Irepan Reyes-Olalde, J., Lozano-Sotomayor, P., Zúñiga-Mayo, V. M., & De Folter, S. (2012). The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *The Plant Journal*, *72*(2), 222-234.
- Marsch-Martínez, N., Reyes-Olalde, J. I., Ramos-Cruz, D., Lozano-Sotomayor, P., Zúñiga-Mayo, V. M., & de Folter, S. (2012). Hormones talking: does hormonal cross-talk shape the *Arabidopsis* gynoecium?. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(12), 1698-1701.
- Martinière, A., Bassil, E., Jublanc, E., Alcon, C., Reguera, M., Sentenac, H., Blumwald, E., & Paris, N. (2013). In vivo intracellular pH measurements in tobacco and *Arabidopsis* reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *The Plant cell*, *25*(10), 4028–4043.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2004). A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant Journal*, *38*(5), 779-789.

- Mason, M., Mathews, D., Argyros, D., Maxwell, B., Kieber, J., Alonso, J., Ecker, J. and Schaller, E. (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 3007–3018.
- Mason, M. G., Jha, D., Salt, D. E., Tester, M., Hill, K., Kieber, J. J., & Eric Schaller, G. (2010). Type-B response regulators ARR1 and ARR12 regulate expression of AtHKT1; 1 and accumulation of sodium in Arabidopsis shoots. *The Plant Journal*, 64(5), 753-763.
- Masuta, C., Tanaka, H., Uehara, K., Kuwata, S., Koiwai, A., & Noma, M. (1995). Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 6117-6121.
- Mathur, J. (2007). The illuminated plant cell. *Trends in plant science*, 12(11), 506-513.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., & Kakimoto, T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 20027-20031.
- Matsubayashi Y, Sakagami Y. Characterization of specific binding sites for a mitogenic sulfated peptide, phytosulfokine- α , in the plasma-membrane fraction derived from *Oryza sativa* L. *European Journal of Biochemistry*. 1999 Jun;262(3):666-71.
- Motyka, V., Vaňková, R., Čapková, V., Petrášek, J., Kamínek, M., & Schmölling, T. (2003). Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia plantarum*, 117(1), 11-21.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., & Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.
- Mayerhofer, H., Panneerselvam, S., Kaljunen, H., Tuukkanen, A., Mertens, H. D., & Mueller-Dieckmann, J. (2015). Structural model of the cytosolic domain of the plant ethylene receptor 1 (ETR1). *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), 2644-2658.

- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., & Birch, P. R. (2013). An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003670.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid¹. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division¹, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375-1380.
- Miri, M., Janakirama, P., Held, M., Ross, L., & Szczyglowski, K. (2016). Into the root: how cytokinin controls rhizobial infection. *Trends in plant science*, 21(3), 178-186.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., & Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The plant journal*, 37(1), 128-138.
- Miyawaki, K., Tabata, R., & Sawa, S. (2013). Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. *Current opinion in plant biology*, 16(5), 598-606.
- Miwa K, Ishikawa K, Terada K, Yamada H, Suzuki T, Yamashino T, Mizuno T (2007) Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant Cell Physiol* 48:1809–1814.
- Möglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17:1282–1294
- Mok, D. W. S. and Mok, M. C. (1994). *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mok, D.W.S. and Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89–118.

- Mok, M. C., Martin, R. C., Dobrev, P. I., Vanková, R., Ho, P. S., Yonekura-Sakakibara, K., Sakakibara, H., & Mok, D. W. (2005). Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant physiology*, *137*(3), 1057–1066.
- Montalbán, I. A., De Diego, N., & Moncaleán, P. (2011). Testing novel cytokinins for improved in vitro adventitious shoots formation and subsequent ex vitro performance in *Pinus radiata*. *Forestry*, *84*(4), 363-373.
- Moore, I., & Murphy, A. (2009). Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system. *The Plant Cell*, *21*(6), 1632-1636.
- Moore JO, Hendrickson WA (2009) Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure* *17*:1195–1204.
- Moreira, S., Bishopp, A., Carvalho, H., & Campilho, A. (2013). AHP6 inhibits cytokinin signaling to regulate the orientation of pericycle cell division during lateral root initiation. *PLoS One*, *8*(2), e56370.
- Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(10), E2274–E2283.
- Morre' DJ, Brightman AO, Sandelius AS. (1987). Membrane fractions from plant cells. In: Findlay JBC, Evans WH, eds. *Biological membranes: a practical approach*. Washington, DC: IRL Press, 37–68.
- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., & Werbrouck, S. (2014). The molecular path to in vitro shoot regeneration. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 107-121.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Ioio, R. D., Di Mambro, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology*, *20*(12), 1138-1143.

- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sozzani, R., Pacifici, E., Salvi, E., Terpstra, I., Bao, D., van Dijken, A., Dello Ioio, R., Perilli, S., Ljung, K., Benfey, P. N., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Developmental cell*, *26*(4), 405–415.
- Mougel C, Zhulin IB (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* *26*:582–584
- Müller B, Sheen J (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science* *318*:68–69.
- Müller, B., & Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, *453*(7198), 1094-1097.
- Müller, S., Götz, M., & Beier, D. (2009). Histidine residue 94 is involved in pH sensing by histidine kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. *PLoS One*, *4*(9), e6930.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.
- Nagahashi, J., & Nagahashi, S. L. (1982). Triton-stimulated nucleoside diphosphatase: characterization. *Protoplasma*, *112*(3), 174-180.
- Nagao, T., Sasakawa, H., & Sugiyama, T. (1987). Purification of H⁺-ATPase from the plasma membrane of maize roots and preparation of its antibody. *Plant and cell physiology*, *28*(7), 1181-1186.
- Nagatoshi, Y., & Fujita, Y. (2019). Accelerating soybean breeding in a CO₂-supplemented growth chamber. *Plant and Cell Physiology*, *60*(1), 77-84.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., & Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering*, *104*(1), 34–41.
- Nakai, K., & Horton, P. (2007). Computational prediction of subcellular localization. In *Protein targeting protocols* (pp. 429-466). Humana Press.

- Naseem, M., & Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathogens*, *8*(11), e1003026.
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, *51*(6), 1126-1136.
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, *51*(6), 1126-1136.
- Nemhauser, J. L., Feldman, L. J., & Zambryski, P. C. (2000). Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development*, *127*(18), 3877-3888.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, *56*(421), 2907-2914.
- Niemann MC, Bartrina I, Ashikov A, Weber H, Novák O, Spíchal L, Strnad M, Strasser R, Bakker H, Schmülling T, Werner T. Arabidopsis ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Jan 6;112(1):291-6.
- Niemann, M., Weber, H., Hluska, T., Leonte, G., Anderson, S. M., Novák, O., Senes, A., & Werner, T. (2018). The Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase CKX1 Is a Membrane-Bound Protein Requiring Homooligomerization in the Endoplasmic Reticulum for Its Cellular Activity. *Plant physiology*, *176*(3), 2024–2039.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tähtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., Bhalerao, R., Keinonen, K., Albert, V. A., & Helariutta, Y. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 20032–20037.
- Nikolovski, N., Rubtsov, D., Segura, M. P., Miles, G. P., Stevens, T. J., Dunkley, T. P., Munro, S., Lilley, K. S., & Dupree, P. (2012). Putative glycosyltransferases and other plant

- Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics. *Plant physiology*, *160*(2), 1037–1051.
- Nishii, K., Wright, F., Chen, Y. Y., & Möller, M. (2018). Tangled history of a multigene family: The evolution of ISOPENTENYLTRANSFERASE genes. *PLoS one*, *13*(8), e0201198.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G. J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., & Kawaguchi, M. (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, *420*(6914), 426–429.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(6), 1365-1377.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., & Tran, L. S. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant cell*, *23*(6), 2169–2183.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M. A., Ha, C. V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., & Tran, L. S. (2013). Arabidopsis AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(12), 4840–4845.
- Nishiyama, T., Sakayama, H., de Vries, J., Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., Ullrich, K. K., Haas, F. B., Vanderstraeten, L., Becker, D., Lang, D., Vosolsobě, S., Rombauts, S., Wilhelmsson, P., Janitza, P., Kern, R., Heyl, A., Rümpler, F., Villalobos, L., Clay, J. M., Skokan, R., ... Rensing, S. A. (2018). The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*, *174*(2), 448–464.e24.

- Nitschke, S., Cortleven, A., Iven, T., Feussner, I., Havaux, M., Riefler, M., & Schmölling, T. (2016). Circadian stress regimes affect the circadian clock and cause jasmonic acid-dependent cell death in cytokinin-deficient *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell*, *28*(7), 1616-1639.
- Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M., & Kobayashi, H. (1999). Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *The Plant Journal*, *18*(4), 455-463.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., & Kawaguchi, M. (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant and Cell Physiology*, *50*(1), 67-77.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nature communications*, *4*(1), 1-7.
- Okazaki, K., Kabeya, Y., Suzuki, K., Mori, T., Ichikawa, T., Matsui, M., Nakanishi, H. and Miyagishima, S. (2009) The PLASTID DIVISION1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell* *21*, 1769–1780
- Osugi, A., & Sakakibara, H. (2015). Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BMC biology*, *13*(1), 1-10.
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2017). Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nature Plants*, *3*(8), 1-6.
- Pas J, von Grotthuss M, Wyrwicz LS, Rychlewski L, Barciszewski J (2004) Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Lett* *576*:287–290.
- Pashkovskiy, P. P., Vankova, R., Zlobin, I. E., Dobrev, P., Ivanov, Y. V., Kartashov, A. V., & Kuznetsov, V. V. (2019). Comparative analysis of abscisic acid levels and expression

of abscisic acid-related genes in Scots pine and Norway spruce seedlings under water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 140, 105-112.

Pekárová, B., Szmitkowska, A., Dopitová, R., Degtjarik, O., Židek, L., & Hejátko, J. (2016). Structural aspects of multistep phosphorelay-mediated signaling in plants. *Molecular plant*, 9(1), 71-85.

Perez, J. C., & Groisman, E. A. (2007). Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, 63(1), 283-293.

Perilli, S., Perez-Perez, J. M., Di Mambro, R., Peris, C. L., Díaz-Triviño, S., Del Bianco, M., Pierdonati, E., Moubayidin, L., Cruz-Ramírez, A., Costantino, P., Scheres, B., & Sabatini, S. (2013). RETINOBLASTOMA-RELATED protein stimulates cell differentiation in the Arabidopsis root meristem by interacting with cytokinin signaling. *The Plant cell*, 25(11), 4469–4478.

Peris, C. I. L., Rademacher, E. H., & Weijers, D. (2010). Green beginnings—pattern formation in the early plant embryo. *Current topics in developmental biology*, 91, 1-27.

Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Soucek, P., Reichman, P., Hoyerová, K., Dubová, J., Friml, J., Zazimalová, E., & Hejátko, J. (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3609–3614.

Persson, B. C., Esberg, B., Olafsson, O., & Björk, G. R. (1994). Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie*, 76(12), 1152-1160.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.

- Pfanz, H., & Dietz, K. J. (1987). A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues. *Journal of Plant Physiology*, 129(1-2), 41-48.
- Pflock, M., Dietz, P., Schär, J., & Beier, D. (2004). Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*. *FEMS microbiology letters*, 234(1), 51-61.
- Pieterse, C. M., van der Does, A., Zamioudis, C., Leon Reyes, H. A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 489-521.
- Pils B, Heyl A (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiol* 151:782–791.
- Pischke, M. S., Jones, L. G., Otsuga, D., Fernandez, D. E., Drews, G. N., & Sussman, M. R. (2002). An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15800-15805.
- Poitout, A., Crabos, A., Petřík, I., Novák, O., Krouk, G., Lacombe, B., & Ruffel, S. (2018). Responses to systemic nitrogen signaling in *Arabidopsis* roots involve trans-zeatin in shoots. *The Plant Cell*, 30(6), 1243-1257.
- Pospisilova, J., Vagner, M., Malbeck, J., Travnickova, A., & Batkova, P. (2005). Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biologia Plantarum*, 49(4), 533-540.
- Potato Genome Sequencing Consortium, Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., ... Visser, R. G. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195.

- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., & Miller, S. I. (2007). Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular cell*, 26(2), 165-174.
- Pullman, G. S., & Bucalo, K. (2011). Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. In *Plant Embryo Culture* (pp. 267-291). Humana Press.
- Punwani, J. and Kieber, J. (2010) Localization of the Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. *Plant Signal. Behav.* 5, 896–898.
- Ramireddy, E., Chang, L., & Schmölling, T. (2014). Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant signaling & behavior*, 9(1), 5021-32.
- Rashotte, A., Carson, S., To, J. and Kieber, J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132, 1998–2001
- Rashotte, A., Mason, M., Hutchison, C., Ferreira, F., Schaller, E. and Kieber, J. (2006) A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11081–11085.
- Rashotte, A. M. (2021, January). The evolution of cytokinin signaling and its role in development before Angiosperms. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 109, pp. 31-38). Academic Press.
- Reid, D., Nadzieja, M., Novák, O., Heckmann, A. B., Sandal, N., & Stougaard, J. (2017). Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiology*, 175(1), 361-375.
- Reusche, M., Klásková, J., Thole, K., Truskina, J., Novák, O., Janz, D., Strnad, M., Spíchal, L., Lipka, V., & Teichmann, T. (2013). Stabilization of cytokinin levels enhances Arabidopsis resistance against *Verticillium longisporum*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 26(8), 850–860.

- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, *18*(1), 40-54.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmar, A., & Murray, J. A. (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*, *283*(5407), 1541-1544.
- Rivero, R. M., Shulaev, V., & Blumwald, E. (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, *150*(3), 1530-1540.
- Romanov, G. A., Kieber, J. J., & Schmülling, T. (2002). A rapid cytokinin response assay in Arabidopsis indicates a role for phospholipase D in cytokinin signalling. *FEBS letters*, *515*(1-3), 39-43.
- Romanov, G. A., Spíchal, L., Lomin, S. N., Strnad, M., & Schmülling, T. (2005). A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical biochemistry*, *347*(1), 129-134.
- Romanov G.A., Lomin S.N., Schmulling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Experimental Botany*, *57*, 4051-4058.
- Romanov GA (2009) How do cytokinins affect the cell? *Russ J Plant Physiol* *56*:268–290.
- Rowland, M. and Deeds, E. (2014) Crosstalk and the evolution of specificity in twocomponent signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 5550–5555.
- Ruzicka, K., Simásková, M., Duclercq, J., Petrásek, J., Zazimalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. C., & Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4284–4289.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K. D., & Coruzzi, G. M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate–cytokinin relay and

distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18524-18529.

Sadler, J. B., Lamb, C. A., Gould, G. W., & Bryant, N. J. (2016). Complete membrane fractionation of 3T3-L1 adipocytes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(2), pdb-prot083691.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 294(5546), 1519-1521.

Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M., & Sugiyama, T. (1998). A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *The Plant Journal*, 14(3), 337-344.

Sakakibara, H., Hayakawa, A., Deji, A., Gawronski, S. W., & Sugiyama, T. (1999). His-Asp phosphotransfer possibly involved in the nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize: molecular cloning of cDNAs for two-component regulatory factors and demonstration of phosphotransfer activity in vitro. *Plant Molecular Biology*, 41(4), 563-573.

Sakakibara, H. (2005). Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins & Hormones*, 72, 271-287.

Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57:431–449.

Sali, A., & Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.(1993). *J. Mol. Biol*, 234, 779.

Samuelson, M. E., & Larsson, C. M. (1993). Nitrate regulation of zeation riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science*, 93(1-2), 77-84.

- Sanders, H. L., & Langdale, J. A. (2013). Conserved transport mechanisms but distinct auxin responses govern shoot patterning in *Selaginella kraussiana*. *New Phytologist*, *198*(2), 419-428.
- Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., & Ohashi, Y. (1996). Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and cell physiology*, *37*(6), 762-769.
- Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B., Quelhas, P., De Jager, S., Titmus, C., Campilho, A., Ren, H., Estelle, M., Wang, H., & Murray, J. A. (2011). The Arabidopsis D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *The Plant cell*, *23*(2), 641–660.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature communications*, *5*(1), 1-9.
- Saxena, P. K., Fowke, L. C., & King, J. (1985). An efficient procedure for isolation of nuclei from plant protoplasts. *Protoplasma*, *128*(2), 184-189.
- Schäfer, M., Meza-Canales, I. D., Navarro-Quezada, A., Brütting, C., Vanková, R., Baldwin, I. T., & Meldau, S. (2015). Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *Journal of integrative plant biology*, *57*(2), 198-212.
- Schägger, H. (2006). Tricine–sds-page. *Nature protocols*, *1*(1), 16-22.
- Schaller GE, Shiu S-H, Armitage JP (2011) Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr Biol* *21*:R320–R330.
- Schmülling, T., Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., & Bartrina y Manns, I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of plant research*, *116*(3), 241-252.

- Schnablová, R., Synková, H., Vičánková, A., Burketová, L., Eder, J., & Cvikrová, M. (2006). Transgenic ipt tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during in vitro growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*(10), 526-534.
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research*, *33*(suppl_2), W363-W367.
- Schuster, C., Gaillochet, C., Medzihradzky, A., Busch, W., Daum, G., Krebs, M., Kehle, A., & Lohmann, J. U. (2014). A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Developmental cell*, *28*(4), 438-449.
- von Schwartzenberg, K., Nunez, M. F., Blaschke, H., Dobrev, P. I., Novák, O., Motyka, V., & Strnad, M. (2007). Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology*, *145*(3), 786-800.
- von Schwartzenberg, K., Lindner, A. C., Gruhn, N., Šimura, J., Novák, O., Strnad, M., Gonneau, M., Nogué, F., & Heyl, A. (2016). CHASE domain-containing receptors play an essential role in the cytokinin response of the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany*, *67*(3), 667-679.
- Scofield, S., Dewitte, W., Nieuwland, J., & Murray, J. A. (2013). The A rabidopsis homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *The Plant Journal*, *75*(1), 53-66.
- Séguéla, M., Briat, J. F., Vert, G., & Curie, C. (2008). Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal*, *55*(2), 289-300.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., & Galbraith, D. W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *The plant journal*, *8*(5), 777-784.

- Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science*, *15*(11), 2507-2524.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., & Jiang, L. (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Molecular plant*, *6*(5), 1419-1437.
- Shi X, Rashotte AM (2012) Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Rep* 31:789–799
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *22*(11), 3560-3573.
- Siddique, S., Radakovic, Z. S., De La Torre, C. M., Chronis, D., Novák, O., Ramireddy, E., Holbein, J., Matera, C., Hütten, M., Gutbrod, P., Anjam, M. S., Rozanska, E., Habash, S., Elashry, A., Sobczak, M., Kakimoto, T., Strnad, M., Schmölling, T., Mitchum, M. G., & Grundler, F. M. (2015). A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(41), 12669–12674.
- Singh, S., Letham, D. S., & Palni, L. M. S. (1992). Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum*, *86*(3), 388-397.
- Slavny P, Little R, Salinas P, Clarke TA, Dixon R (2010) Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Mol Microbiol* 75:61–75.
- Šmehilová, M., Dobrušková, J., Novák, O., Takáč, T., & Galuszka, P. (2016). Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1264.

- Smigocki, A., Neal, J. W., McCanna, I., & Douglass, L. (1993). Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Molecular Biology*, *23*(2), 325-335.
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, *1*(4), 2019-2025.
- Sparkes, I., Tolley, N., Aller, I., Svozil, J., Osterrieder, A., Botchway, S., Mueller, C., Frigerio, L., & Hawes, C. (2010). Five *Arabidopsis* reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. *The Plant cell*, *22*(4), 1333–1343.
- Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., & Schmülling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, *45*(9), 1299-1305.
- Stirk, W.A., Václavíková, K., Novák, O., Gajdošová, S., Kotland, O., Motyka, V., Strnad, M., & Staden, J.V. (2011). Involvement of cis-Zeatin, Dihydrozeatin, and Aromatic Cytokinins in Germination and Seedling Establishment of Maize, Oats, and Lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation*, *31*, 392-405.
- Stivala A, Wybrow M, Wirth A, Whisstock J, Stuckey P (2011) Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami. *Bioinformatics* *27*:3315–3316. doi:10.1093/bioinformatics/btr575
- Stock, A., Robinson, V. and Goudreau, R. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 183–215
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmülling T (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J* *67*:157–168.
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia plantarum*, *101*(4), 674-688.

- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616-625.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental cell*, 18(3), 463-471.
- Sukhwai, A., & Sowdhamini, R. (2013). Oligomerisation status and evolutionary conservation of interfaces of protein structural domain superfamilies. *Molecular Biosystems*, 9(7), 1652-1661.
- Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B., & Chai, J. (2013). Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell research*, 23(11), 1326-1329.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, 42(2), 107-113.
- Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y., & Granot, D. (2008). Botrytis cinerea induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology*, 120(3), 289-297.
- Goers Sweeney, E., Henderson, J. N., Goers, J., Wreden, C., Hicks, K. G., Foster, J. K., Parthasarathy, R., Remington, S. J., & Guillemin, K. (2012). Structure and proposed mechanism for the pH-sensing Helicobacter pylori chemoreceptor TlpB. *Structure (London, England : 1993)*, 20(7), 1177–1188.
- Tajima, F., & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*, 1(3), 269-285.
- Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2004) Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-toAsp phosphorelay signal transduction of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 45, 28–39.

- Takasu, A., Nakanishi, Y., Yamauchi, T., & Maeshima, M. (1997). Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *The Journal of Biochemistry*, 122(4), 883-889.
- Takeda, S. I., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC→YojN→RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Molecular microbiology*, 40(2), 440-450.
- Takei, K., Sakakibara, H., & Sugiyama, T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26405-26410.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., & Sugiyama, T. (2001). Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*, 42(1), 85-93.
- Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2002). Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 971-977.
- Takei, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41866-41872.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology*, 45(8), 1053-1062.
- Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, T., & Nakano, A. (2000). A dominant negative mutant of sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *The Plant Journal*, 23(4), 517-525.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T. and Okay, A. (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol.* 48, 263–272.
- Taylor BL, Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479–506.
- Tessi, T. M., Brumm, S., Winklbauer, E., Schumacher, B., Pettinari, G., Lescano, I., González, C. A., Wanke, D., Maurino, V. G., Harter, K., & Desimone, M. (2021). Arabidopsis AZG2 transports cytokinins in vivo and regulates lateral root emergence. *The New phytologist*, 229(2), 979–993.
- Theologis, A. (1998). Ethylene signalling: redundant receptors all have their say. *Current Biology*, 8(24), R875-R878.
- Thu, N. B. A., Hoang, X. L. T., Truc, M. T., Sulieman, S., Thao, N. P., & Tran, L. P. (2017). Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress.
- Tian, Q., Uhlir, N. J., & Reed, J. W. (2002). Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *The Plant Cell*, 14(2), 301-319.
- To, J. P., Haberer, G., Ferreira, F. J., Deruère, J., Mason, M. G., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Kieber, J. J. (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant cell*, 16(3), 658–671.
- To, J., Deruere, J., Maxwell, B., Morris, V., Hutchison, C., Schaller, E. and Kieber, J. (2007) Cytokinin regulates type-A Arabidopsis response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 19, 3901–3914.

- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2012). Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal*, *69*(2), 355-365.
- Tran, L. S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(51), 20623-20628.
- Uchida, N., Shimada, M., & Tasaka, M. (2013). ERECTA-family receptor kinases regulate stem cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. *Plant and Cell Physiology*, *54*(3), 343-351.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., & Nakano, A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *The EMBO Journal*, *20*(17), 4730-4741.
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., & Tabata, S. (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *42*(7), 751-755.
- Uggla, C., Mellerowicz, E. J., & Sundberg, B. (1998). Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. *Plant Physiology*, *117*(1), 113-121.
- Uggla, C., Magel, E., Moritz, T., & Sundberg, B. (2001). Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant physiology*, *125*(4), 2029-2039.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in plant science*, *5*(2), 67-74.
- Valdés, A. E., Fernández, B., & Centeno, M. L. (2003). Alterations in endogenous levels of cytokinins following grafting of Pinus radiata support ratio of cytokinins as an index of ageing and vigour. *Journal of Plant Physiology*, *160*(11), 1407-1410.

- Vaughan-Hirsch, J., Tallerday, E. J., Burr, C. A., Hodgens, C., Boeshore, S. L., Beaver, K., Melling, A., Sari, K., Kerr, I. D., Šimura, J., Ljung, K., Xu, D., Liang, W., Bhosale, R., Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2021). Function of the pseudo phosphotransfer proteins has diverged between rice and Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *106*(1), 159–173.
- Veach, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W.S., Malbec, J., Vankova, R. and Mok, M.C. (2003) O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol.* *131*, 1374–1380.
- Verma, V., Sivaraman, J., Srivastava, A. K., Sadanandom, A., & Kumar, P. P. (2015). Destabilization of interaction between cytokinin signaling intermediates AHP 1 and ARR 4 modulates Arabidopsis development. *New Phytologist*, *206*(2), 726-737.
- Vischioni, B., van der Valk, P., Span, S. W., Kruyt, F. A., Rodriguez, J. A., & Giaccone, G. (2006). Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Human pathology*, *37*(1), 78-86.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal*, *33*(5), 949-956.
- Vreede J, van der Horst MA, Hellingwerf KJ, Wim Crielaard W, van Aalten DMF (2003) PAS domains. Common structure and common flexibility. *J Biol Chem* *278*:18434–18439.
- de Vries, J., Fischer, A. M., Roettger, M., Rommel, S., Schluepmann, H., Bräutigam, A., Carlsbecker, A., & Gould, S. B. (2016). Cytokinin-induced promotion of root meristem size in the fern *Azolla* supports a shoot-like origin of euphyllophyte roots. *The New Phytologist*, *209*(2), 705–720.
- Vyroubalová, S., Václavíková, K., Turecková, V., Novák, O., Smehilová, M., Hluska, T., Ohnoutková, L., Frébort, I., & Galuszka, P. (2009). Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant physiology*, *151*(1), 433–447.

- Wagner, B. M., & Beck, E. (1993). Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta*, *190*(4), 511-518.
- M. Walker (Ed.), *The Protein Protocol Handbook*, second ed., Humana Press, Toronto, New Jersey, 2002.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., & Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *40*(3), 428–438.
- Wang N, Söderbom F, Anjard C, Shaulsky G, Loomis WF (1999) SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. *Mol Cell Biol* *19*:4750–4756.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y. Q., & Wu, Y. (2011). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating *ABI5* expression. *The Plant Journal*, *68*(2), 249-261.
- Wang, Y., Wang, J., Shi, B., Yu, T., Qi, J., Meyerowitz, E. M., & Jiao, Y. (2014). The stem cell niche in leaf axils is established by auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *26*(5), 2055-2067.
- Wang, C., Liu, Y., Li, S. S., & Han, G. Z. (2015). Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant physiology*, *167*(3), 872-886.
- Wang, F. F., Cheng, S. T., Wu, Y., Ren, B. Z., & Qian, W. (2017). A bacterial receptor PcrK senses the plant hormone cytokinin to promote adaptation to oxidative stress. *Cell reports*, *21*(10), 2940-2951.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(18), 10487-10492.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental

alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15(11), 2532-2550.

Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., & Schmölling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant biology*, 8(03), 371-381.

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., & Schmölling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell*, 22(12), 3905-3920.

West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences*, 26(6), 369-376.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.

Wormit, A., Traub, M., Flörchinger, M., Neuhaus, H. E., & Möhlmann, T. (2004). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal*, 383(1), 19-26.

Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmölling T (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 156:1808–1818.

Xiao, Y., Liu, D., Zhang, G., Gao, S., Liu, L., Xu, F., Che, R., Wang, Y., Tong, H., & Chu, C. (2019). Big Grain3, encoding a purine permease, regulates grain size via modulating cytokinin transport in rice. *Journal of integrative plant biology*, 61(5), 581–597.

Xiao, Y., Zhang, J., Yu, G., Lu, X., Mei, W., Deng, H., Zhang, G., Chen, G., Chu, C., Tong, H., & Tang, W. (2020). Endoplasmic Reticulum-Localized PURINE PERMEASE1 Regulates Plant Height and Grain Weight by Modulating Cytokinin Distribution in Rice. *Frontiers in plant science*, 11, 618560.

- Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, *32*(23), 3676-3678.
- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., & Reddy, G. V. (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4941-4946.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Ohno, C., Heisler, M., Girke, T., Jönsson, H., & Reddy, G. V. (2013). Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Molecular systems biology*, *9*, 654.
- Yadav, R. K., Tavakkoli, M., Xie, M., Girke, T., & Reddy, G. V. (2014). A high-resolution gene expression map of the Arabidopsis shoot meristem stem cell niche. *Development*, *141*(13), 2735-2744.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant & cell physiology*, *42*(9), 1017–1023.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Mizuno, T. (2003). A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *44*(6), 619-629.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., & Ori, N. (2005). Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current biology : CB*, *15*(17), 1566–1571.
- Yang, C., Liu, J., Dong, X., Cai, Z., Tian, W., & Wang, X. (2014). Short-term and continuing stresses differentially interplay with multiple hormones to regulate plant survival and growth. *Molecular Plant*, *7*(5), 841-855.
- Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y. I., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2007). Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated

in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 48(1), 84-96.

Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant physiology*, 134(4), 1654-1661.

Yoshida, S., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2011). Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes & Development*, 25(13), 1439-1450.

Yu, Q., Tang, C., & Kuo, J. (2000). A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. *Plant and Soil*, 219(1), 29-40.

Zalabák, D., Galuszka, P., Mrízová, K., Podlešáková, K., Gu, R., & Frébortová, J. (2014). Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 283-293.

Zalabák, D., Johnová, P., Plíhal, O., Šenková, K., Šamajová, O., Jiskrová, E., Novák, O., Jackson, D., Mohanty, A., & Galuszka, P. (2016). Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 104, 114–124.

Zdarska, M., Cuyacot, A. R., Tarr, P. T., Yamoune, A., Szmitkowska, A., Hrdinová, V., Gelová, Z., Meyerowitz, E. M., & Hejátko, J. (2019). ETR1 Integrates Response to Ethylene and Cytokinins into a Single Multistep Phosphorelay Pathway to Control Root Growth. *Molecular plant*, 12(10), 1338–1352.

Zhang, H., Horgan, K. J., Stewart Reynolds, P. H., Norris, G. E., & Jameson, P. E. (2001). Novel cytokinins: The predominant forms in mature buds of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 112(1), 127-134.

Zhang, Q., Li, J., Deavers, M., Abbruzzese, J. L., & Ho, L. (2005). The subcellular localization of syntaxin 17 varies among different cell types and is altered in some malignant cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(11), 1371-1382.

- Zhang Z, Hendrickson WA (2010) Structural characterization of the predominant family of histidine kinase sensor domains. *J Mol Biol* 400:335–353.
- Zhang, W., To, J. P., Cheng, C. Y., Eric Schaller, G., & Kieber, J. J. (2011). Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *The Plant Journal*, 68(1), 1-10.
- Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G. E., & Kieber, J. J. (2013). Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. *Current Biology*, 23(20), 1979-1989.
- Zhang, X., Chen, Y., Lin, X., Hong, X., Zhu, Y., Li, W., ... & Guo, H. (2013). Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in Arabidopsis. *Molecular plant*, 6(5), 1661-1672.
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., & Liu, C. J. (2014). Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature communications*, 5, 3274.
- Zhang, Z., Shrestha, J., Tateda, C., & Greenberg, J. T. (2014). Salicylic acid signaling controls the maturation and localization of the Arabidopsis defense protein ACCELERATED CELL DEATH6. *Molecular plant*, 7(8), 1365-1383.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J., & Lohmann, J. U. (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, 465(7301), 1089-1092.
- Zhao, J., Yu, N., Ju, M., Fan, B., Zhang, Y., Zhu, E., Zhang, M., & Zhang, K. (2019). ABC transporter OsABCG18 controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice. *Journal of experimental botany*, 70(21), 6277–6291.
- Zuckermandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving genes and proteins* (pp. 97-166). Academic Press.

- Zúñiga-Mayo, V. M., Reyes-Olalde, J. I., Marsch-Martinez, N., & de Folter, S. (2014). Cytokinin treatments affect the apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium and resemble the effects of polar auxin transport inhibition. *Frontiers in plant science*, 5, 191.
- Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P. T., & Müller, B. (2013). A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta. *Plant physiology*, 161(3), 1066-1075.
- Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., & Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, 353(6303), 1027-1030.
- Zürcher, E., & Müller, B. (2016). Cytokinin synthesis, signaling, and function—advances and new insights. *International review of cell and molecular biology*, 324, 1-38.
- Zwack, P., Shi, X., Robinson, B., Gupta, S., Compton, M., Gerken, D., Goertzen, L. and Rashotte, A. (2012) Vascular expression and C-terminal sequence divergence of cytokinin response factors in flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 53, 1683–1695.
- Zwack, P., Robinson, B., Risley, M. and Rashotte, A. (2013) Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses. *Plant Cell Physiol.* 54, 971–981.
- Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of experimental botany*, 66(16), 4863-4871.