

На правах рукописи



**Стеклов
Михаил Юрьевич**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСНОВ
ЛИГАНДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ**

03.01.05-физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2013

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. академика М.Х. Чайлахяна Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор **Романов Георгий Александрович**

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

доктор химических наук, профессор **Михайлов Сергей Николаевич**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Новикова Галина Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ внутриклеточной регуляции, ведущий научный сотрудник

Тараканов Иван Германович, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, заведующий кафедрой

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, Биолого-почвенный факультет

Защита состоится 20 июня 2013 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, e-mail m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «18» мая 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

Актуальность проблемы. Открытие рецепторов цитокининов дало мощный импульс к изучению на новом методическом уровне действия данных фитогормонов. В результате был накоплен большой объем новых данных о системе передачи цитокининового сигнала в клетке и о конкретной роли белков-участников рецепции и сигнальной трансдукции в молекулярном механизме действия цитокининов. Также были раскрыты механизмы, с помощью которых данные фитогормоны участвуют в регуляции роста и развития растения, адаптации к различным неблагоприятным внешним воздействиям, взаимодействию с другими сигнальными процессами и т.д. Все последние годы проводилось активное изучение и самих рецепторов, были проанализированы их доменный состав, локализация в клетке, экспрессия в органах и тканях, взаимодействие с лигандами. Наиболее детально были исследованы рецепторы арабидопсиса, которых оказалось три: АНК 2, 3 и 4. Практически все рецепторы цитокининов других видов являются ортологами того или иного рецептора арабидопсиса. Был идентифицирован CHASE-домен у N-конца рецепторов цитокининов, включающий PAS-субдомен, в составе которого находится сайт связывания цитокининов. Но многие вопросы все еще остаются без ответов. Например, все еще неясны особенности строения цитокинин-связывающих сайтов рецепторов, ответственные за различия в их лигандной специфичности, а также биологическая роль этих различий. Неизвестны закономерности структуры сенсорного модуля, конкретная функциональная роль и способы взаимодействия составляющих его доменов, характер конформационных изменений рецептора, которые происходят при связывании цитокининов и, наоборот, не происходят при связывании рецепторных антагонистов.

Между тем взаимодействие гормона с рецептором является ключевым процессом гормонального сигналинга и включает всю последующую цепь событий, приводящую к ответной реакции клетки на гормон. Поэтому поиск ответов на вышеуказанные вопросы является важной и актуальной научной задачей и может помочь прояснить на молекулярном уровне механизм действия цитокининов и особенности их взаимодействия с рецепторами.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является изучение особенностей строения сенсорных модулей рецепторов цитокининов и идентификация структурных детерминант, определяющих лигандную специфичность этих модулей на примере рецепторов арабидопсиса и кукурузы.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) охарактеризовать аминокислотный состав лиганд-связывающих сайтов рецепторов цитокининов методами фотоаффинной и химической модификации отдельных аминокислотных остатков;
- 2) с помощью биоинформатических подходов изучить особенности строения сенсорного модуля рецепторов цитокининов и выделить консервативные участки, потенциально важные для функционирования рецептора;
- 3) экспрессировать полноразмерный рецептор АНК2 и провести анализ его лиганд-связывающих свойств;

4) с помощью компьютерного моделирования сенсорных модулей цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы определить аминокислотные остатки, потенциально важные для лигандной специфичности рецепторов;

5) провести направленный мутагенез рецептора ZmHK1 и экспериментально оценить роль конкретных аминокислотных остатков в детерминации лигандной специфичности изучаемых рецепторов.

Научная новизна работы. Разработан новый высокоэффективный метод синтеза 8-азидо- N^6 -бензиламинопурина. Методом модификации отдельных аминокислот было установлено, что остаток аспартата играет важную роль в связывании цитокининов рецепторами.

С помощью множественного выравнивания последовательностей аминокислот более чем 100 рецепторов цитокининов обнаружены ранее неизвестные консервативные мотивы сенсорных модулей в прилегающих к CHASE-доменам областях белка.

Впервые охарактеризована лигандная специфичность полноразмерного рецептора арабидопсиса АНК2.

Впервые построены пространственные модели сенсорных модулей пяти рецепторов цитокининов (АНК2, АНК3, ZmHK1, ZmHK2, ZmHK3a) на основе структуры модуля рецептора АНК4, взятого в качестве шаблона.

На основе выравнивания и моделирования отмечены 6 аминокислот - потенциальных детерминант лигандной специфичности рецепторов цитокининов из арабидопсиса и кукурузы.

Методом направленного мутагенеза получено более 30 новых форм рецептора кукурузы ZmHK1, имеющих от одной до семи аминокислотных замен в сенсорном модуле, и охарактеризована лигандная специфичность мутантных форм рецептора.

На примере рецептора ZmHK1 с помощью направленного мутагенеза удалось впервые существенно изменить профиль лигандной специфичности рецептора и идентифицировать аминокислоты-детерминанты этого профиля.

Практическая ценность. Разработанный подход к синтезу производных N^6 -бензиламинопурина открывает новые возможности для получения новых синтетических аналогов цитокининов, что может быть полезно для получения новых лигандов с цитокининовой или антицитокининовой активностью.

Данные по лигандной специфичности мутантных рецепторов ZmHK1 показывают возможность направленного изменения аффинности рецептора к различным природным цитокининам, что может быть использовано в научных исследованиях, биотехнологии и агропроизводстве.

Обнаруженные новые консервативные участки сенсорного модуля рецепторов цитокининов могут быть использованы в филогенетических и биоинформатических исследованиях. Эти сведения будут также полезны при изучении механизма функционирования рецепторов и передачи цитокининового сигнала.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на 3-ем Международном симпозиуме "Клеточная сигнализация у растений", Казань, 28 июня - 1 июля 2011; 7-ой Международной конференции "Рост, развитие и продуктивность растений", Минск, Беларусь, 26-28 октября 2011; III International Symposium "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design", Lviv, Ukraine, 17-23 September, 2012; IV Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, ИФР РАН, 19-23 ноября 2012; Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", г. Пущино, 27-30 мая 2013; Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13) Moscow, Russia, July 25–28, 2013.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, включая 3 статьи в зарубежных и отечественном рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения и пяти глав: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы, а также списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста, содержат 4 таблицы и 33 рисунка. Список литературы включает 185 источников, в т.ч. 181 в зарубежных изданиях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Синтез азидопроизводных цитокининов. Отдельные эксперименты в области органического синтеза были выполнены в лаборатории стереохимии ферментативных реакций Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (зав. лаб. д.х.н. С.Н. Михайлов). Для синтеза 8-азидо- N^6 -бензиламино-пурина был разработан простой и эффективный двухстадийный метод. 2-азидо- N^6 -бензиламинопурин был синтезирован по известной методике (Sakai et al., 2006).

Анализ цитокининовой активности в биотестах. При выполнении биотестов *in planta* использовали модельные системы на основе проростков арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, трансформированных геном *PARR5:GUS*, и проростков амаранта *Amaranthus caudatus*. Эти системы дают четкую, быструю и специфическую реакцию на воздействие цитокининов, так как основаны на индукции экспрессии цитокинин-зависимых генов (Romanov et al., 2000; 2002).

Модификация отдельных аминокислот в рецепторах цитокининов. В опытах по модификации отдельных аминокислот использовали аликвоты мембран трансгенных *E. coli*, содержащие экспрессированные рецепторы цитокининов АНК4 или ZmНК1. Мембраны (100000 g-осадок) обрабатывали

различными реактивами, селективно взаимодействующими с одной из 20-и белковых аминокислот. Обработку проводили согласно общепринятым методикам (Basle' et al., 2010). Далее обработанные и контрольные мембраны тестировали в опытах по связыванию меченого *транс*-зеатина (*tZ*) (Romanov et al., 2005; Lomin et al., 2011).

Компьютерное моделирование сайта связывания цитокининов.

Моделирование проводили с использованием программы Modeller 9.11 (Šali & Blundell, 1993). Молекулярный докинг был выполнен с помощью программы FRED 2.2.5 (OpenEye Scientific Software Inc.). Визуальный анализ пространственных структур был выполнен с помощью программ VIDA 4.2.1 (OpenEye Scientific Software Inc.) и SybylX 2.0 (Tripos). Техническая часть работы была выполнена к. х. н. Д. И. Осолодкиным (Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова).

Биоинформатический анализ последовательностей белка. Первичные белковые последовательности рецепторов цитокининов были взяты из базы данных Pubmed Protein. Домены были определены с помощью программы SWISS-MODEL Version 8.05 (Arnold et al., 2006; Kiefer et al., 2009). Множественные выравнивания были построены с использованием программы CLUSTAL X 2.0.11 (Larkin et al., 2007). Логосы были построены с помощью приложения WebLogo 3 (Crooks et al., 2004). Топологическая схема сенсорного модуля рецептора АНК4, основанная на кристаллической структуре (3T4L), была построена с помощью программы TopDraw (Bond C.S., 2003).

Сайт-направленный мутагенез. Введение сайт-специфических мутаций в гены рецепторов с использованием ПЦР осуществляли в три стадии по методике С.Н. Ломина (ИФР РАН). На первой стадии проводили ПЦР для создания 2-х фрагментов ДНК с комплементарными концами. В каждой реакции использовался один праймер на конец последовательности и другой – с замененными нуклеотидами в центральной части, причём так, чтобы в конечном продукте была проведена предусмотренная замена одной аминокислоты на другую. В качестве исходной матрицы была использована плазида с геном рецептора ZmНК1 (кДНК) дикого типа. После этого проводили отжиг и ПЦР-реакцию по объединению двух фрагментов в одной последовательности двутяжевой ДНК. При этом синтез ДНК проходил без праймеров, поскольку в данной реакции праймерами являются сами ПЦР-продукты из предыдущей стадии. На третьей стадии проводили амплификацию продукта, образовавшегося на второй стадии. После чего полученный ПЦР-продукт, содержащий необходимую замену, подвергали обработке рестриктазами и встраивали в плазмиду pB7FWG2. Наличие мутаций во всех случаях было подтверждено с помощью секвенирования ДНК.

Получение растительных мембран с рецепторами цитокининов.

Плазмиду pB7FWG2, содержащую ген рецептора (дикого типа или мутантный) под контролем конститутивного промотора 35S CaMV, встраивали в клетки

агробактерий (*A. tumefaciens*), с помощью которых трансформировали листья табака *Nicotiana benthamiana* для транзientной экспрессии рецептора. Об уровне экспрессии встроенного гена в листьях судили по наличию флуоресценции «пришитого» к рецептору репортерного белка GFP. Через пять дней после инокуляции агробактерий с плазмидами из листьев выделяли микросомальную фракцию мембран (100000 g-осадок). С ней проводили эксперименты по анализу аффинности рецепторов к различным цитокининам.

Оценка уровня сродства различных цитокининов к рецепторам. Эксперименты проводили на основе варианта радиолигандного метода с использованием сферопластов *E. coli* или фракции мембран растений *N. benthamiana*, трансформированных генами рецепторов цитокининов. Особенности лиганд-связывающих свойств рецепторов изучали в опытах по конкуренции меченого *tZ* с различными немечеными цитокининами: *tZ*, *цис*-зеатином (*cZ*), изопентениладенином (*iP*), *N*⁶-бензиладенином (*BA*), тидиазуроном (*TD*) и дигидрозеатином (*DZ*).

Математические и статистические методы анализа. Константы диссоциации комплексов гормон-рецептор рассчитывали по Cheng & Prusoff (1973) на основе данных, полученных в конкурентных опытах, с применением опции Pharmacology программы SigmaPlot 9.0. Статистический анализ экспериментальных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование аминокислотного состава лиганд-связывающего сайта рецепторов цитокининов методами химической модификации

В начале нашей работы пространственная структура лиганд-связывающего модуля рецептора не была определена, поэтому для исследования этого модуля мы применили методы химической модификации белка. Одним из таких методов является метод фотоаффинной модификации. Вполне подходящими соединениями для фотоаффинного мечения рецепторов представлялись азидопроизводные цитокинина по второму или восьмому положению аденинового гетероцикла, так как из литературы было известно (Sussman & Kende, 1977; Mornet et al., 1979), что, несмотря на наличие заместителя, они не теряли цитокининовой активности.

Нам удалось синтезировать 2-азидо-*N*⁶-бензиламинопурин по уже известной методике (Sakai et al., 2006), которая оказалась вполне воспроизводимой. Но в случае 8-азидо-*N*⁶-бензиламинопурина ранее применяемый метод включал 5 стадий и был трудоемок и малоэффективен. Причем азидогруппа в нем вводилась уже на второй стадии и поэтому могла подвергаться разрушению под действием света в ходе последующих этапов синтеза. Поэтому мы разработали альтернативный простой и эффективный

двухстадийный способ синтеза 8-азидо- N^6 -бензиламинопурина (3), представленный на рисунке 1.

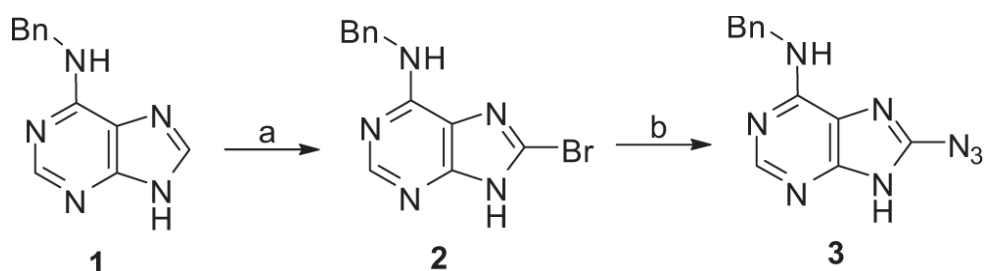


Рис. 1. Схема двухстадийного синтеза 8-азидо- N^6 -бензиламинопурина (3). Реактивы и условия: а) Br_2 , AcOH , AcONa , комн. температура, 24 часа, 59%; б) NaN_3 , DMCO , 75°C , 36 часов, 70%.

Суммарный выход азидопроизводного 3 по разработанной нами методике составил 41% против 6% в методе, описанном в литературе, что почти в 7 раз эффективнее. Таким образом, нами были синтезированы 2-азидо- N^6 -бензиламинопурин и, по разработанному методу, 8-азидо- N^6 -бензиламинопурин (3).

Полученные соединения были проверены на способность вытеснять меченый tZ из комплекса с рецептором и на наличие физиологической активности в известных количественных тест-системах на цитокинины. В обоих типах тестов оба азидопроизводных продемонстрировали активность, вполне сравнимую с классическим цитокинином ВА. Это дало основание приступить к опытам по фотоаффинной модификации рецепторов посредством УФ-облучения комплексов рецепторов с азидопроизводными ВА. Однако, несмотря на различные вариации экспериментов, добиться заметной пришивки азидопроизводных к рецепторам АНК4 или ZmНК1 не удалось. Это следовало из того, что рецепторы после облучения и отмывки связывали меченый tZ так же интенсивно, как и рецепторы без облучения. В дальнейшем, с помощью пространственного моделирования и докинга были выяснены вероятные причины, из-за которых азидопроизводные ВА не образовывали ковалентных сшивок и не блокировали сайты связывания гормона в рецепторах (см. рис. 6).

Другим методом определения аминокислотного состава активных центров рецепторов был метод модификации отдельных аминокислот. Суть данного метода состоит в том, что белок обрабатывается специальными химическими соединениями, которые вступают в реакцию селективно с одним из 20-и типов аминокислот. Можно ожидать, что при химической модификации какой-либо аминокислоты в составе лиганд-связывающего сайта рецептора будет нарушено гормон-рецепторное взаимодействие, что может быть выявлено в опытах по связыванию меченого лиганда.

В наших опытах с рецепторами АНК4 и ZmНК1 модификация остатков аргинина, лизина и цистеина не привела к каким либо изменениям в связывании лиганда, что свидетельствует об их отсутствии или незначительной роли во взаимодействии с гормоном в связывающем сайте рецептора. Зато

после проведения модификации остатка аспартата наблюдалось дозозависимое подавление связывания (рис. 2).

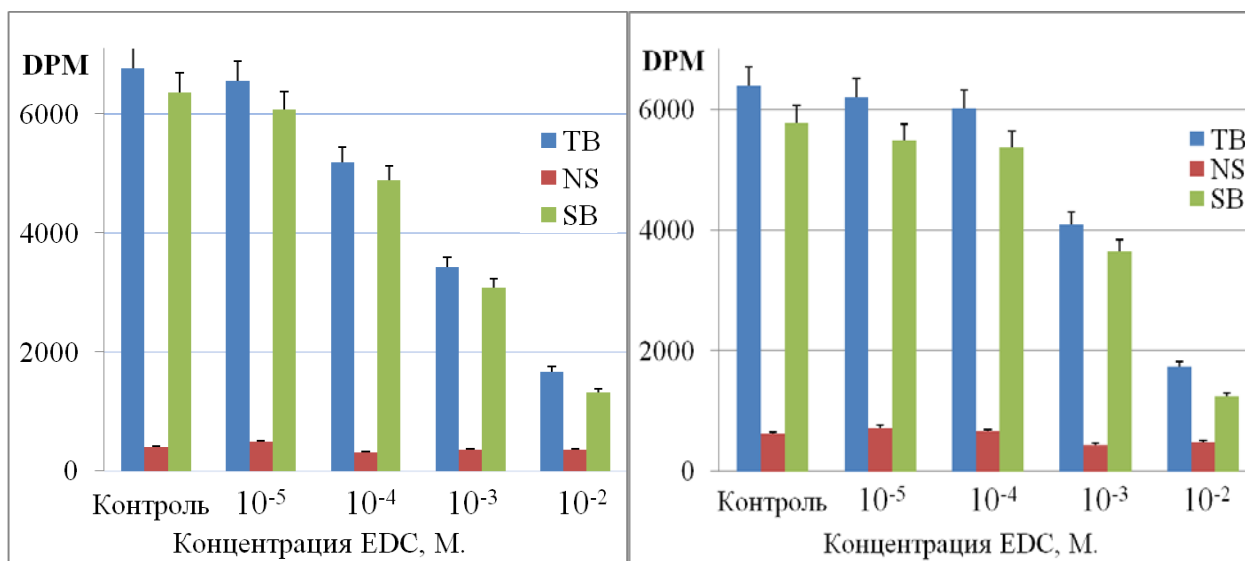


Рис. 2. Связывание меченого *транс*-зеатина (tZ^*) с мембранами *E. coli*, содержащими рецептор АНК4 (слева) и ZmHK1 (справа) после проведения модификации аспарагиновой кислоты карбодиимидом EDC. TB, NS и SB – тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно.

Таким образом, мы сделали вывод о том, что у рецепторов АНК4 и ZmHK1 остаток аспартата выполняет важную функцию в связывании цитокининов. Однако по ходу нашей работы появилась публикация с описанием кристаллической структуры сенсорного модуля рецептора АНК4 в комплексе с различными цитокининами (Hothorn et al., 2011). Это дало возможность визуально определить состав лиганд-связывающего сайта рецептора и характер взаимодействия его аминокислотных остатков (а.о.) с гормоном. Поэтому мы завершили работу по химической модификации рецепторов и переключились на изучение лиганд-связывающего модуля другими методами. Но здесь стоит отметить, что наши данные полностью подтвердились опубликованной кристаллической структурой сенсорного модуля рецептора. Asp262 является определяющей в связывании гормона, образуя две водородные связи с адениновой частью цитокинина, тогда как остатков аргинина, цистеина и лизина в составе лиганд-связывающего сайта рецептора АНК4 нет.

Биоинформатический анализ сенсорного модуля рецепторов цитокининов

В связи с активной работой по секвенированию полных геномов и расшифровкой в последние годы геномов целого ряда растений появилась возможность проводить методами биоинформатики сравнительный анализ структуры сенсорных модулей рецепторов цитокининов, на основе аннотированных генов рецепторов. Такой анализ дает возможность выделить основные, наиболее важные черты строения этого модуля рецептора, инвариантные у большинства гомологичных белков из разных видов растений.

Это, в свою очередь, позволяет приблизиться к пониманию основ функционирования сенсорного модуля в процессах восприятия и передачи цитокининового сигнала.

С помощью биоинформатических методов мы сравнили доменный состав сенсорных модулей более 100 рецепторов цитокининов из разных видов растений. Были определены число, размер и положение трансмембранных (ТМ) спиралей, а также средний размер и положение CHASE-домена и получены следующие результаты. Средняя длина восходящих и нисходящих ТМ-спиралей составляет 21 и 22 а.о., соответственно. Между ними находится сенсорный модуль, который включает в себя CHASE-домен и примыкающие к нему фрагменты белка до ТМ-спиралей (линкеры). Длина CHASE-домена составляет в среднем 220 а.о., а длина линкеров варьируется. Восходящий линкер имеет среднюю длину около 50 а.о., а нисходящий линкер – 10 а.о. (рис. 3).

Длина, а.о. Группы ортологов	Восходящая ТМ-спираль	Восходящий линкер	CHASE-домен	Нисходящий линкер	Нисходящая ТМ-спираль
АНК2	19 (19-23)	49 (32-50)	223 (213-227)	11 (7-15)	21 (20-24)
АНК3	21 (18-23)	48 (44-50)	225 (213-227)	8 (7-9)	23 (20-23)
АНК4	22 (18-23)	50 (48-52)	215 (204-245)	11 (8-16)	23 (19-24)
Все рец-ры	21 (18-23)	49 (32-52)	220 (204-245)	10 (7-16)	22 (20-24)

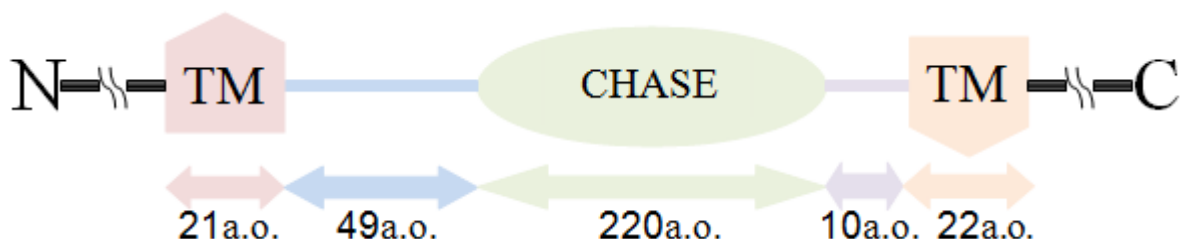


Рис. 3. Общее строение сенсорного модуля и прилегающих трансмембранных (ТМ) спиралей. Данные в таблице демонстрируют длину в аминокислотных остатках (а.о.) различных участков рецепторов цитокининов отдельно по группам ортологов и для всех рецепторов вместе. Средние значения выделены жирным шрифтом, а разброс значений указан в скобках. Внизу - схематическое изображение сенсорного модуля со средними длинами его участков.

Для идентификации консервативных участков, потенциально важных для функционирования рецептора, мы провели сравнение аминокислотных последовательностей CHASE-доменов, ТМ-спиралей и линкеров между ними по группам ортологов и для всех рецепторов вместе. У ТМ-спиралей были обнаружены консервативные а.о., при этом число и степень консервативности таких а.о. гораздо больше в нисходящих ТМ-спиралях (табл. 1). У отдельных групп ортологов от трети до половины а.о. этих ТМ-спиралей обладают высокой (80-100%) консервативностью. А для всех рецепторов четко прослеживается мотив - Axhx(S/A)x(G/L)x(L/F)VIx(L/F)LxG(Y/H)I.

Таблица 1. Логосы и консервативные мотивы восходящих и нисходящих трансмембранных (ТМ) доменов. Каждый логос состоит из множества символов, каждый символ соответствует одной позиции а.о. во множественном выравнивании. Высота символа пропорциональна частоте встречаемости данного а.о, а ширина характеризует наличие пропусков при выравнивании: чем их больше, тем символ уже. Последовательности наиболее консервативных а.о. изображены над логосами, а.о. обозначены стандартными однобуквенными символами.

Логосы и мотивы Группы ортологов	Восходящие ТМ-спирали	Нисходящие ТМ-спирали
АНК2	-LxxxxxxGxxxSxxxF- 	-AxxxSxxxxxITxLxGxIF
АНК3	-WxxxWxxxS- 	-PxxAIxTSxGxLVIALLxxxI
АНК4	--xxWxxx-- 	-AxxxxxxxFVIxxLVGYI
Все рецепторы	-(L)xx(W)xxxxxxx(S)- 	-AxxxxxxxVIxxLxGxI

Присутствие большого числа консервативных а.о. в нисходящем ТМ-домене подтверждает его важную роль не только в фиксации рецептора в мембране, но и в передаче гормонального сигнала.

Выравнивание аминокислотных последовательностей участков сенсорного модуля, примыкающих к CHASE-домену, продемонстрировало неожиданно высокий уровень консервативности (табл. 2). В коротком нисходящем линкере между CHASE-доменом и нисходящей ТМ-спиралью почти половина а.о. оказалась высококонсервативна. Мотивы для групп ортологов еще более консервативны, особенно для АНК3. Восходящий линкер между восходящей ТМ-спиралью и CHASE-доменом также оказался очень консервативным, особенно его правая часть, прилегающая к CHASE-домену. Данный линкер имеет в своем составе 13 полностью консервативных а.о. из общего числа 49. Это соотношение (26.5%) в 3 раза превосходит таковое для CHASE-домена (около 9%). Дополнительно наблюдается еще 15 строго превалирующих а.о. (табл. 2).

Таблица 2. Логосы линкеров, примыкающих к CHASE-домену. Положение стержневой спирали ($\alpha 1$) показано зеленой линией под мотивами. А.о. окрашены в зависимости от химических свойств: 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. Остальные пояснения даны в описании к таблице 1.

Логосы Группы ортологов	Восходящий линкер	Нисходящий линкер
АНК2		
АНК3		
АНК4		
Все рец-ры		

Исходя из известной 3D-структуры рецептора АНК4, восходящий линкер почти полностью соответствует длинной α -спирали, предшествующей CHASE-домену (спираль 1, рис. 4). Из пространственной структуры сенсорного модуля очевидно, что данная спираль поддерживает два субдомена, входящих в состав CHASE-домена. Тем не менее, исключительно "поддерживающая" функция не требует такого высокого уровня консервативности, который, вероятнее всего, предполагает более важную роль этой α -спирали в функционировании рецептора. Например, эта спираль ($\alpha 1$) может фиксировать оптимальную конформацию лиганд-связывающего домена (рис. 4, красный цвет) и способствовать конформационным изменениям после его связывания с лигандом. Также спираль $\alpha 1$ вместе со спиралью $\alpha 2$ образует поверхность димеризации модулей, хотя в этом взаимодействии участвуют только С-концевые области $\alpha 1$ -спирали. Значительная часть консервативной области $\alpha 1$ -спирали рецептора не принимает участия в димеризации, что ставит вопрос о роли консервативных а.о. этой области.

После анализа примерно ста аминокислотных последовательностей различных рецепторов цитокининов мы можем заключить, что не только CHASE-домен, а весь сенсорный модуль обладает высокой консервативностью и соответственно очень важен для функционирования рецептора. Этот модуль состоит из ~280 а.о. и его можно разделить на несколько структурных участков. Центральным является CHASE-домен (~220 а.о.), в состав которого входят два

субдомена PAS-типа (Hothorn et al., 2011). Однако проведенный нами детальный анализ структуры сенсорного модуля подтвердил существование только одного канонического PAS-субдомена, дальнего по отношению к мембране (рис. 4, красный цвет).

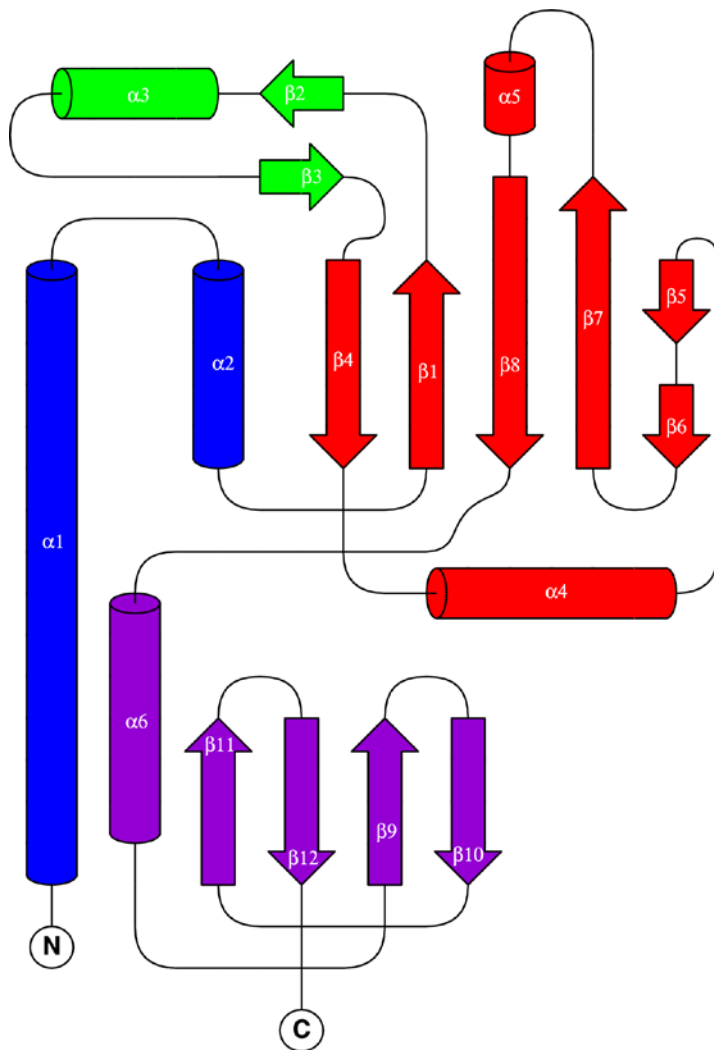


Рис. 4. Топологическая схема сенсорного модуля рецептора АНК4, основанная на его кристаллической структуре (PDB ID: 3T4L). Синим показаны α -спирали, формирующие поверхность димеризации. Красным показан лиганд-связывающий PAS-субдомен. Зеленым - верхний участок лиганд-связывающего PAS-субдомена (инсерции длиной ~15 а.о. в парах ортологов АНК2/ZmНК3 и АНК3/ZmНК2 находятся между $\alpha 3$ и $\beta 3$). Лиловым показан псевдо PAS-субдомен. α -спирали и β -листы изображены в виде стрелок и цилиндров, соответственно.

Этот субдомен имеет типичные для PAS-типа размер (~100 а.о.) и структуру: пять антипараллельных β -листов, из которых первый и последний соединены α -спиралью. А вот ближний к мембране субдомен (рис. 4, лиловый цвет) значительно короче (~70 а.о.), состоит только из четырех β -листов, а α -спирали в нем отсутствуют. Это ставит под сомнение его принадлежность к PAS-типу, поэтому мы дали ему название псевдо-PAS-субдомен. Со стороны N-конца к CHASE-домену прилегает восходящий линкер в виде стержневой α -спирали ($\alpha 1$, ~50 а.о.), а со стороны C-конца – короткий линкер (~10 а.о.) (рис. 4). Таким образом, нам удалось впервые обнаружить высококонсервативные участки сенсорного модуля, которые соседствуют с CHASE-доменом и ранее не привлекали внимания исследователей. Дальнейшее детальное изучение этих структур может прояснить механизм функционирования сенсорного модуля в ходе восприятия и передачи цитокининового сигнала.

Экспрессия полноразмерного рецептора АНК2 и исследование его лигандной специфичности

Лигандная специфичность – одна из важнейших характеристик рецепторных белков. Она изучается в функциональных тестах после экспрессии индивидуальных рецепторов в соответствующих модельных системах. На данный момент уже экспрессирован целый ряд индивидуальных рецепторов цитокининов и изучена лигандная специфичность рецепторов арабидопсиса и кукурузы. Но в случае рецептора арабидопсиса АНК2 пока удавалось экспрессировать (в бактериях) только его сенсорный модуль, но не целый рецептор, что, вероятнее всего, связано с высоким уровнем токсичности этого белка для *E. coli*. Однако для корректного и убедительного сравнения лигандной специфичности рецепторов желательнее их тестирование в одинаковых условиях, т.е. при экспрессии полноразмерных белков. Для определения профиля лигандной специфичности полноразмерного рецептора АНК2 была поставлена задача экспрессировать его в растительной тест-системе, ранее разработанной в нашей лаборатории. Рецептор нарабатывался в листьях табака *N. benthamiana* в условиях транзientной экспрессии гена АНК2 под конститутивным 35S-промотором. Далее из трансформированных листьев выделяли тотальную фракцию мембран, которую использовали в конкурентных опытах по вытеснению различными лигандами связанного рецептором меченого *tZ*. В результате этой работы нам впервые удалось определить лигандную специфичность полноразмерного рецептора АНК2 (рис. 7, АНК2 дикий тип). Согласно полученным кривым вытеснения, этот рецептор связывает с наиболее высоким сродством *iP* и *tZ*, причем сродство к *iP*, по-видимому, несколько выше, чем сродство к *tZ*. Далее по убывающей следует сродство к *TD*, *VA*, а наименьшим и примерно равным сродством к АНК2 обладают *cZ* и *DZ*. По сравнению с лигандной специфичностью сенсорного модуля отличие наблюдается только в случае синтетического цитокинина *TD*. Таким образом, мы уточнили профиль лигандной специфичности полноразмерного рецептора АНК2, который оказался очень сходен с аналогичным профилем его изолированного сенсорного модуля. Это подтверждает высокую стабильность лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов. В результате этой работы и литературных данных (Romanov et al., 2006; Lomin et al., 2011; Stolz et al., 2011) мы сейчас располагаем надежными данными о лигандной специфичности всех трех полноразмерных рецепторов цитокининов арабидопсиса (АНК 2, 3 и 4) и их ортологов из кукурузы (*ZmNK* 3a, 2 и 1).

Молекулярное моделирование рецепторов цитокининов из арабидопсиса и кукурузы: поиск аминокислот, потенциально определяющих лигандную специфичность данных рецепторов

Функциональные свойства рецептора, связанные с узнаванием гормонов и трансдукцией сигнала, определяются в первую очередь его структурой.

Недавно опубликованная кристаллическая структура сенсорного модуля рецептора АНК4 (Hothorn et al., 2011) дает возможность моделирования 3D-структур других цитокининовых рецепторов с использованием АНК4 в качестве шаблона. У арабидопсиса имеются три изоформы рецепторов цитокининов: АНК 2, 3 и 4, которые различаются между собой по лигандной специфичности. Рецепторы цитокининов кукурузы ZmНК 1, 2 и 3а являются ортологами рецепторов арабидопсиса АНК 4, 3 и 2. Лигандная специфичность каждой пары рецепторов-ортологов из арабидопсиса и кукурузы имеет много общего (Lomin et al., 2011). До настоящего времени обоснования причин различий лигандной специфичности рецепторов цитокининов на структурном уровне не существовало. Для решения этой задачи мы построили модели 3D-структуры сенсорных модулей пяти рецепторов арабидопсиса и кукурузы (АНК2, АНК3, ZmНК1, ZmНК2, ZmНК3а) и провели молекулярный докинг шести различных цитокининов (*tZ*, *cZ*, *iP*, *BA*, *TD*, *DZ*). Это позволило нам сравнить характер взаимодействия этих лигандов с шестью изучаемыми рецепторами для того, чтобы определить а.о. в каждом из CHASE-доменов, участвующие в связывании цитокининов и формировании лигандной специфичности. На полученных моделях хорошо видно большое сходство общей структуры (каркаса) сенсорных модулей изучаемых рецепторов (рис. 5).

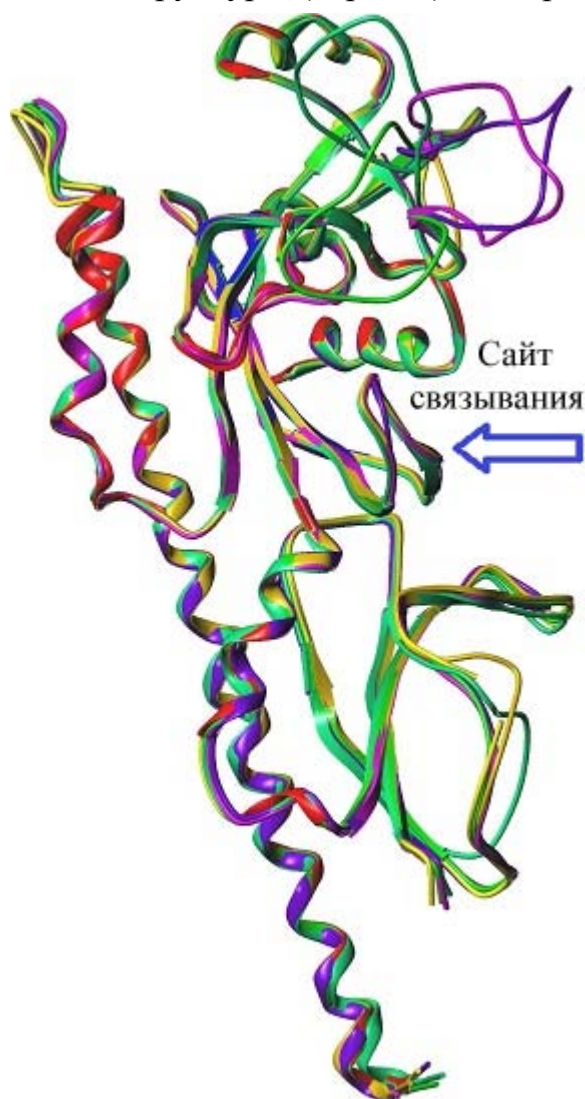


Рис. 5. Общий вид моделей сенсорных модулей рецепторов цитокининов. Цветовое обозначение: АНК4 (рентгеновская структура 3Т4L, цепь А) окрашен по типу вторичной структуры (красный цвет - α -спирали, голубой - β -листы, желтый - петли), ZmНК1 окрашен в желтый, АНК2 - зеленый, ZmНК3а - зелено-голубой, АНК3 - пурпурный, ZmНК2 – фиолетовый цвета.

Особенно близки оказались ортологи в парах ZmHK1/АНК4 и АНК2/ZmHK3a, где в каждой паре гормон-связывающие сайты образованы одинаковыми а.о. (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение лиганд-связывающих сайтов цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы.

АНК4	К/ В ¹	²	Положение аминокислотных остатков в рецепторах:					4.5 Å ³	Влияние на лиганд. специфи- чность ⁴
			АНК3	АНК2	ZmHK1	ZmHK2	ZmHK3a		
Gly200	К	Аде						-	
Ala202	К	Хво						+	
Ala204	В	Хво	Ala192	Ala331	Ala115	Gly166	Ala340	+	+
Met226	К	Аде						+	
Val241	К	Хво						+	
Val248	В	Аде	Val251	Val388	Val158	Tyr225	Val397	+	
Tyr250	В	Аде	His253	His390	Tyr160	His227	His399	+	+
Leu251	В	Аде	Val254	Ile391	Leu161	Val228	Ile400	+	+
Met256	В	Хво	Met259	Met396	Met166	Leu233	Met405	+	
Asp262	К	Аде						+	
Asn265	К	косвенно						+	
Ile266	В	Хво	Val269	Ile406	Ile176	Val243	Ile415	+	+
Phe281	К	Аде						+	
Arg282	В	Аде	Pro285	Lys422	Arg192	Lys259	Lys431	-	
Leu283	К	Аде						+	
Leu284	В	Аде	Ile287	Leu424	Leu194	Leu261	Leu433	+	
Thr286	В	Аде/ H ₂ O	Thr289	Ser426	Ser196	---	Ser435	-	
Val292	В	Аде	Ile295	Val432	Val202	Ile268	Val441	+	+
Thr294	К	Хво						+	
Tyr318	К	Хво						+	
Leu319	К	Хво						+	
Gly320	К	Хво						+	
Gly321	В	Хво	Gly324	Ala461	Gly231	Gly297	Ala470	+	
Ala322	В	Аде	Val325	Ser462	Ala232	Ile298	Ser471	+	+

¹В - означает вариабельный, К - консервативный, ²Аде - означает адениновую часть, Хво - хвостовую, ³+ и - означают, что остаток входит или не входит в сферу радиусом 4.5Å вокруг молекулы *tZ*, ⁴+ означает, что данный остаток может теоретически влиять на лигандную специфичность.

В паре ZmHK1/АНК4 наиболее серьезным различием можно считать пропуск на месте Gly229 в последовательности ZmHK1, а вызванное этим изменение конформации аминокислотного каркаса может приводить к описанным различиям профилей лигандной специфичности этих рецепторов (Ломин и др., 2012). Вторая наблюдаемая замена – Thr286Ser – выглядит несущественной. Другое различие между рецепторами - это наличие инсерций длиной около 15 а.о. (между позициями 229 и 230 рецептора АНК4) в парах

ортологов АНК2/ZmНК3а и АНК3/ZmНК2 (Yonekura-Sakakibara et al., 2004). В наших моделях эти инсерции выглядят как петли, но не исключено, что они могут формировать структуру типа β -шпильки. Однако, несмотря на то, что они находятся вблизи лиганд-связывающего сайта, они не влияют на его конформацию и не могут образовывать контактов с гормоном (рис. 5). Профили лигандной специфичности пары рецепторов АНК2/ZmНК3а и рецептора АНК4 очень сходны. При этом состав связывающих сайтов пары АНК2/ZmНК3а отличается от АНК4 четырьмя а.о.: Tyr250His, Leu251Ile, Gly321Ala и Ala322Ser (табл. 3).

Наиболее существенной представляется замена Gly321Ala, т.к. конформационная подвижность основной цепи глицина ограничивается при введении бокового заместителя (метила в случае аланина). Однако и остальные три замены тоже заслуживают внимания, и скорее всего лигандная специфичность определяется суммарным вкладом от нескольких, возможно, даже всех 4-х отличающихся а.о. Ортологи АНК3 и ZmНК2 менее сходны и петля, закрывающая гормон-связывающий сайт в ZmНК2 (которая содержит Leu284 в АНК4), на один а.о. меньше, чем в других рецепторах. У этой пары ортологов наблюдается самое большое число замен а.о. относительно рецептора АНК4 (6 и 8 замен у АНК3 и ZmНК2, соответственно) и это единственная пара, члены которой сильно отличаются друг от друга (4 замены) (табл. 3). В рецепторе ZmНК2 имеются две уникальные особенности: а.о. Ala204, Val248 и Met256, которые консервативны в остальных пяти рецепторах, в ZmНК2 заменены на Gly, Tyr и Leu соответственно, а в петле, закрывающей гормон-связывающий сайт, отсутствует Thr286 (табл. 3). Из-за этого форма лиганд-связывающей полости в рецепторе ZmНК2 отличается от соответствующих полостей других обсуждаемых в этой части работы рецепторов тем, что часть лиганд-связывающего кармана удлинилась, что предполагает возможность связывания цитокининов, обладающих более объемными заместителями в N⁶-позиции.

Таким образом, на основании молекулярного моделирования можно заключить, что различия в лигандной специфичности шести изучаемых рецепторов цитокининов можно отнести к различиям в аминокислотном составе сайтов связывания. В таблице 3 приведены эти различия: ZmНК1 отличается от АНК4 одним а.о. (+ отсутствие аналога Gly229), пара ортологов АНК2/ZmНК3а – четырьмя а.о., а ортологи АНК3 и ZmНК2 имеют по 6 и 8 замен, соответственно. Среди всех 12 переменных а.о. были выделены 6 как наиболее вероятные кандидаты на роль детерминант лигандной специфичности рецепторов (табл. 3, правый столбец). Эти предположения были далее проверены в экспериментах по направленному мутагенезу.

Анализ построенных моделей позволил нам объяснить на молекулярном уровне ряд экспериментальных данных, полученных при исследовании цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы. В их числе получили объяснение причины отсутствия пришивки азидопроизводных цитокининов к рецепторам. Молекулярный докинг показал (рис. 6), что азидо-цитокинины

ориентируются в сайте связывания таким образом, что их азидогруппы во 2-м и 8-м положениях аденинового гетероцикла выходят за границы сайта связывания и рядом с ними нет ни одной X-H связи, с которой могут взаимодействовать нитрены, образующиеся при УФ-облучении азидов.

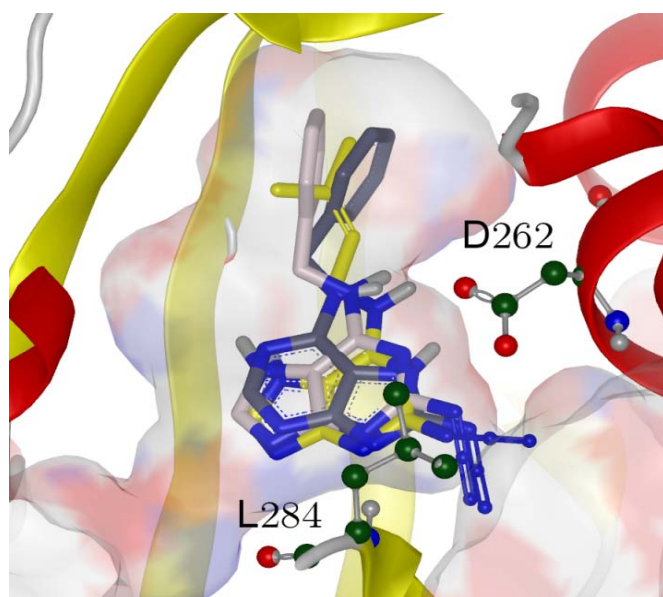


Рис. 6. Комплекс рецептора АНК4 с азидопроизводными N^6 -бензиламинопурина. Молекула iP показана желтым; молекулы 2- и 8-азидо- N^6 -бензиламинопуринов – соответственно бежевым и темно-серым.

Следовательно, для успешного проведения экспериментов по фотоаффинному мечению необходимо синтезировать производные цитокининов с азидогруппой в хвостовой, а не в адениновой части лиганда.

Влияние замен переменных аминокислот гормон-связывающего сайта на лигандную специфичность рецептора

На основе молекулярного моделирования мы сделали предположение о том, что лигандная специфичность рецепторов определяется композицией переменных а.о. в сайте связывания гормона. Для 6 рецепторов арабидопсиса и кукурузы, составляющих 3 пары ортологов, были определены конкретные а.о. лиганд-связывающего сайта, которые могли быть ответственны за их лигандную специфичность. В дальнейшей работе мы решили провести анализ функции этих а.о. путем замены их в отдельно взятом рецепторе на а.о. представителей других групп ортологов, отличающихся по лиганд-связывающим свойствам от изучаемого белка. Главной задачей этой части работы было изменить профиль лигандной специфичности одного рецептора на профиль другого с помощью сайт-направленного мутагенеза. В качестве исходного рецептора был выбран белок кукурузы ZmHK1, гомолог рецептора АНК4 арабидопсиса, но отличающийся от последнего, в частности, более низким сродством к *tZ* и более высоким сродством к ВА. Таким образом, по своей лигандной специфичности ZmHK1 оригинален и не похож ни на один из 5-и остальных рецепторов. Мутагенез был направлен на замену переменных аминокислот на соответствующие, т.е. находящиеся в том же месте у АНК4 и в парах АНК3/ZmHK2 или АНК2/ZmHK3а. Для экспрессии полученных генов мутантных рецепторов мы воспользовались ранее разработанной в нашей

лаборатории модельной системой на основе растений табака *N. benthamiana*. Рецептор нарабатывался в листьях табака в условиях транзientной экспрессии соответствующего гена под конститутивным 35S-промотором в течение пяти суток после агробактериальной трансформации. Далее выделяли мембраны и лиганд-связывающие свойства рецептора изучали в опытах по конкуренции различных немеченых лигандов с меченым гормоном за сайты связывания (специфическое связывание). В общей сложности было получено 33 мутантных рецептора, из них 15 одиночных, 4 двойных, 6 тройных, 3 четверных, 4 пятерных и 1 семирной.

Для того, чтобы превратить рецептор ZmHK1 в пару ортологов АНК2/ZmHK3а, мы получили 17 различных мутантов (табл. 4).

Таблица 4. Мутации, направленные на изменение профиля лигандной специфичности рецептора ZmHK1 на профиль пары ортологов АНК2/ZmHK3а.

Мутации	Кд рецептор-цитокинин (нМ):					
	<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	BA	TD	DZ
ZmHK1 (дикий тип)	5,62	4,97	0,39	0,77	29,6	67,2
ZmHK1→АНК2/ZmHK3а						
Y160H (M6')	5,63	15,2	0,50	1,68	12,6	103
R192K (M15)	Связывание отсутствует					
L161I (M5)	6,44	19,6	0,97	2,85	17,4	89,6
A232S (M3)	20,7	98,1	2,08	10,0	78,0	675
G231A (M16)	Связывание отсутствует					
Y160H+H198R (M6)	16,8	37,1	1,36	2,62	16,8	337
G231A+A232S (M20)	Связывание отсутствует					
Y160H+L161I (M19)	5,97	34,4	0,76	3,75	6,44	67,8
Y160H+L161I+ A232S (M21)	3,28	42,6	0,64	7,63	8,68	97,9
L161I+G231A+A232S (M22)	Связывание отсутствует					
Y160H+G231A+A232S (M32)	Связывание отсутствует					
Y160H+L161I+G231A (M23)	Связывание отсутствует					
Y160H+A162V+G231A+A232S (M24)	Связывание отсутствует					
Y160H+L161I+G231A+A232S (M27)	Связывание отсутствует					
F114Y+Y160H+L161I+G231A+A232S (M35)	Связывание отсутствует					
V146D+Y160H+L161I+G231A+A232S (M36)	Связывание отсутствует					
V146D+Y160H+L161I+R163S+N189S+G231A+A232S (M48)	Связывание отсутствует					

На рисунке 7 представлены кривые конкуренции рецепторов ZmHK1 и АНК2 дикого типа и мутантной изоформы M21. Результаты показывают, что тройной мутант M21, содержащий замены Tyr160His+Leu161Val+ Ala232Ser, существенно отличается по профилю лигандной специфичности от исходного рецептора ZmHK1 и близок по этой характеристике к рецептору АНК2. У полученного мутанта по сравнению с рецептором дикого типа существенно уменьшилось сродство к *cZ* и BA, а к TD аффинность слегка увеличилась. И ряд аффинности изменился с $iP > BA > tZ = cZ > TD > DZ$ у нормального рецептора на $iP > tZ > BA \geq TD > cZ > DZ$, что соответствует паре ортологов АНК2/ZmHK3а.

Интересно отметить, что мутация Gly231Ala всегда приводила к блокированию связывания гормона, независимо от дополнительных мутаций (табл. 4).

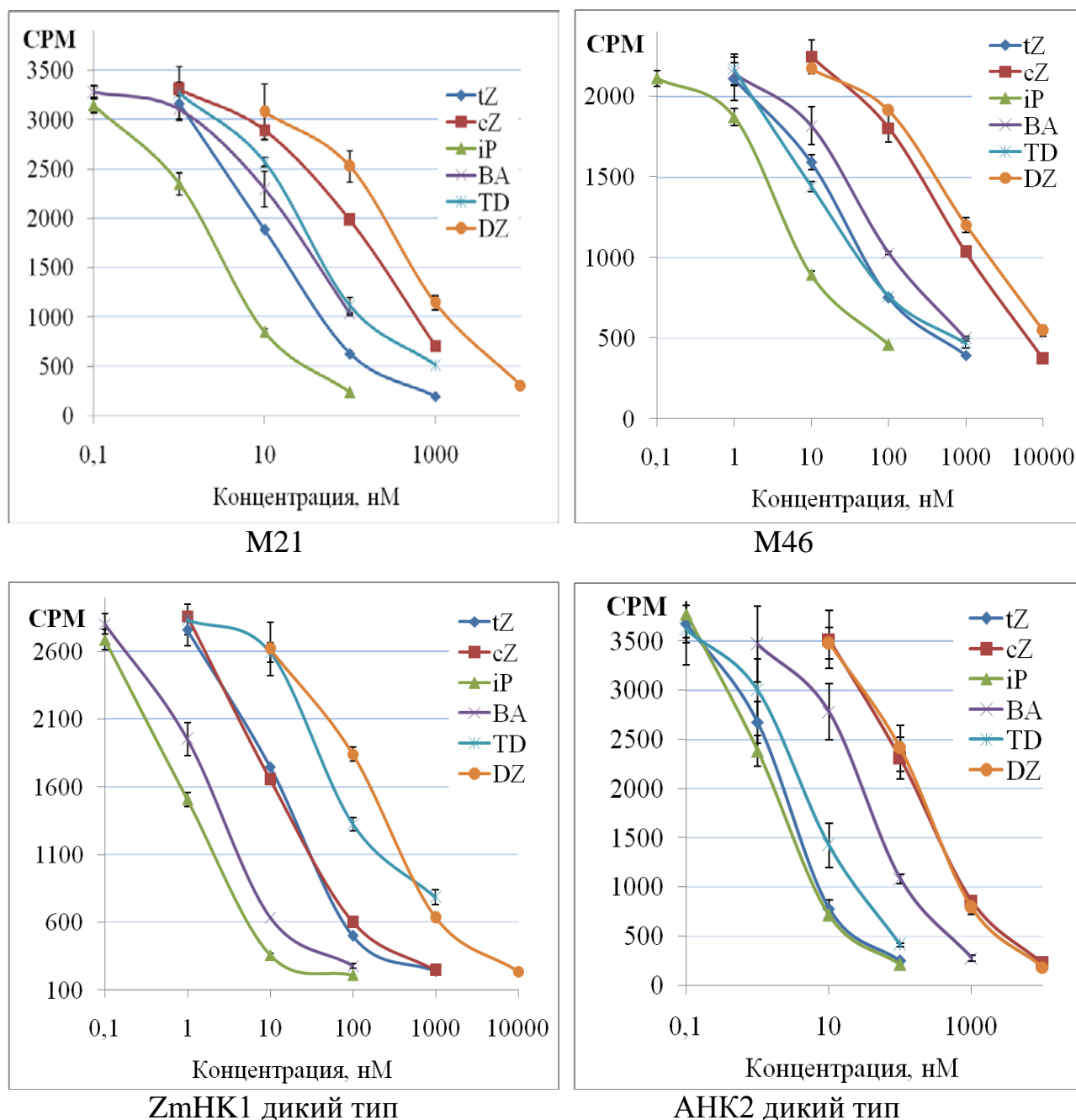


Рис. 7. Кривые вытеснения различными цитокининами меченого *транс*-зеатина из комплекса с мутантными рецепторами ZmHK1 (изоформы M21 и M46) и рецепторами ZmHK1 и АНК2 дикого типа.

Замена профиля лигандной специфичности рецептора ZmHK1 на профиль АНК4 представлялась относительно простой задачей, так как эти рецепторы различаются всего одним а.о. в лиганд-связывающем сайте: вместо ожидаемого Gly140 в рецепторе ZmHK1 стоит пропуск (табл. 5). Однако введение глицина после Arg139 в рецепторе ZmHK1 (M12b) не привело к какому-либо эффекту. Введение замены Ser196Thr к уже имеющейся (M18) также не повлияло на

лигандную специфичность, как и введение других дополнительных замен (M31).

Поэтому, скорее всего, различия лигандной специфичности рецептора АНК4 и ZmНК1 определяются вкладами не столько вариabельными а.о. собственно лиганд-связывающего сайта, сколько соседствующими с ними а.о.

Таблица 5. Мутации, направленные на изменение профиля лигандной специфичности рецептора ZmНК1 на профиль лигандной специфичности рецептора АНК4 и пары ортологов АНК3/ZmНК2.

Мутации	Кд рецептор-цитокинин (нМ):					
	<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	BA	TD	DZ
ZmНК1 (дикий тип)	5,62	4,97	0,39	0,77	29,6	67,2
ZmНК1→АНК4						
N189S (M26)	0,31	0,26	0,06	0,07	3,75	4,33
Gap140G (M12b)	4,55	6,64	0,53	0,81	25,6	69,4
Gap 140G + S196T (M18)	10,1	13,2	0,86	1,78	81,1	210
Gap140G+V146D+N189S (M31)	1,86	2,12	0,14	0,41	14,5	24,3
ZmНК1→АНК3/ZmНК2						
L161V (M1)	14,5	34,1	1,48	5,70	20,5	136
V158Y (M7)	Связывание отсутствует					
A232V (M10)	3,88	5,84	0,34	0,43	4,73	56,3
S196T (M17)	0,94	1,01	0,20	0,31	5,63	14,1
A232I (M4)	11,7	38,3	1,44	3,33	11,2	503
V202I (M2)	11,1	8,34	1,31	2,84	41,3	298
Gap140S (M8)	8,63	15,2	0,77	2,42	95,1	177
Ser196Gap (M9)	5,28	10,8	0,36	0,75	29,1	97,3
Y160H+L161V+A232V (M28)	Связывание отсутствует					
Y160H+L161V+I176V+A232V (M40)	Связывание отсутствует					
Y160H+L161V+I176V+V202I+A232V (M38)	13,5	297	2,43	49,2	10,4	892
Y160H+L161V+I176V+V202I+A232I (M46)	24,2	556	4,59	56,2	15,7	872

Пара ортологов АНК3 и ZmНК2 отличается от других рецепторов: в ней наблюдается самое высокое количество замен относительно АНК4 и это единственная пара, члены которой сильно отличаются друг относительно друга (табл. 3). Из-за таких различий эти рецепторы рассмотрены по отдельности, а не как единая группа. Введение одиночных замен вариabельных а.о. слабо повлияло на профиль лигандной специфичности (табл. 5), поэтому было решено перейти к получению множественных мутантов, как в случае сдвига в направлении АНК2/ZmНК3а (табл. 4). Однако полученный мутантный рецептор ZmНК1 (M28, табл. 5), содержащий три аминокислотных замены Tyr160His+Leu161Val+Ala232Val, был лишен способности связывать меченый *tZ*. После введения четвертой мутации Ile176Val (M40) связывание также отсутствовало, но добавление пятой замены Val202Ile (M38) привело к восстановлению способности рецептора связывать меченый гормон. Это показывает, что (негативный) вклад от одних мутаций может быть компенсирован (позитивным) вкладом от других. Полученный мутантный рецептор (M38), содержащий пять замененных а.о. (Tyr160His+Leu161Val+

Ile176Val+Val202Ile+Ala232Val), обладал существенно измененным профилем лигандной специфичности. По сравнению с исходным ZmHK1 у него уменьшилось примерно на 2 порядка сродство к cZ, BA и iP, и на порядок – к DZ, а к TD аффинность немного увеличилась (табл. 5). При этом профиль лигандной специфичности изоформы M38 больше соответствовал профилю пары ANK2/ZmHK3a, а не ANK3/ZmHK2, как предполагалось. Второй пятерной мутант (M46, рис. 7), полученный для сдвига профиля лигандной специфичности от ZmHK1 к ANK3/ZmHK2 и содержащий замены Tyr160His+Leu161Val+Ile176Val+Val202Ile+Ala232Ile, показал аналогичные результаты: уменьшенная аффинность к cZ и BA примерно на 2 порядка и на порядок – к DZ, несколько увеличенное сродство к TD, при этом профиль лигандной специфичности изменен и соответствует профилю ANK2/ZmHK3a (табл. 5). По всей видимости, для преобразования лиганд-связывающих характеристик рецептора ZmHK1 в направлении ANK3 или ZmHK2 следует вводить дополнительные аминокислотные замены из числа оставшихся переменных а.о. (табл. 3).

Основываясь на данных, полученных в экспериментах по сайт-направленному мутагенезу, можно заключить, что одиночные и двойные мутации переменных аминокислот сайта связывания гормона могут приводить к заметным изменениям в аффинности отдельных лигандов, но, как правило, не приводят к изменению профиля лигандной специфичности.

Наибольший интерес вызвали три мутантных рецептора, содержащие три (M21) и пять (M38, M46) замен а.о., они обладали профилем лигандной специфичности, сильно приближенным к профилю пары ANK2/ZmHK3a. С учетом того, что введение одиночных замен (Ile176Val и Val202Ile) не влияло на лигандную специфичность, можно сделать вывод, что определяющие а.о. для перемены профиля лигандной специфичности от рецептора ZmHK1 к паре ANK2/ZmHK3a находятся в ZmHK1 на позициях 160, 161 и 232.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецепторы являются ключевыми белками, определяющими чувствительность клетки к гормонам, поэтому установление структурно-функциональных характеристик рецепторов имеет первостепенное значение в исследовании гормонального сигналинга. В работе были использованы различные подходы для изучения особенностей строения сенсорных модулей рецепторов цитокининов. Наибольший успех принесли методы биоинформатики, которые позволили выявить ряд новых черт строения этих модулей. На основе анализа последовательностей более 100 рецепторов цитокининов разных видов растений предложена общая схема строения сенсорного модуля с прилегающими трансмембранными спиралями. Обнаружены новые консенсусные мотивы, которые могут иметь важное значение для функционирования рецепторов. В частности, установлена высокая консервативность стержневой α -спирали на N-конце сенсорного модуля, которая участвует как в процессе димеризации модулей, так и, видимо, в

передаче сигнала от сенсорного к каталитическому модулю рецептора. Другие выявленные консервативные мотивы на С-конце модуля, по всей видимости, также необходимы для внутрибелковой трансдукции цитокининового сигнала. Важной функциональной характеристикой рецепторов является их лигандная специфичность, выражающаяся в высоком сродстве к определенным природным лигандам, которые благодаря этому выполняют функцию гормонов. Различные изоформы рецепторов цитокининов даже одного растения различаются по лигандной специфичности, что, очевидно, имеет определенный биологический смысл. Мы попытались идентифицировать структурные детерминанты лигандной специфичности на примере цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы. Предварительно был экспрессирован и охарактеризован полноразмерный рецептор АНК2, что позволило завершить исследование лигандной специфичности полного набора рецепторов цитокининов арабидопсиса. На первом этапе исследования было проведено моделирование пространственной структуры пяти рецепторов цитокининов арабидопсиса и кукурузы, с использованием известной структуры рецептора АНК4 как шаблона. В сочетании с биоинформатическими данными это дало возможность определить в лиганд-связывающих сайтах рецепторов 12 переменных а.о. – потенциальных детерминант лигандной специфичности. Среди этих 12 а.о. были отобраны 6 наиболее вероятных кандидатов, роль которых была исследована экспериментально. Для этого в рецепторе ZmНК1 проводили точечные замены переменных а.о. на а.о. других рецепторов, отличающихся по лиганд-связывающим свойствам. Всего с помощью направленного мутагенеза было получено 33 новые изоформы рецептора, из них 15 одиночных мутантов, 4 двойных, 6 тройных, 3 четверных, 4 пятерных и 1 семерной. У многих мутантных изоформ изменилось сродство к отдельным цитокининам, а у одного тройного и двух пятерных мутантов удалось впервые существенно изменить профиль лигандной специфичности, приблизив его к профилю рецепторов АНК2/ZmНК3. Таким образом, была экспериментально подтверждена важная роль отобранных путем моделирования переменных а.о. (№№ 160, 161 и 232 белка ZmНК1) в придании рецептору необходимых свойств лигандной специфичности. Работа показала, что профиль лигандной специфичности является стабильной характеристикой рецепторов цитокининов, он сохраняется у ортологов из эволюционно далеких видов и устойчив к большинству одиночных замен переменных а.о. лиганд-связывающего сайта. А для перемены профиля лигандной специфичности рецептора цитокининов необходимы множественные замены определенных переменных а.о. в связывающем сайте одного рецептора на соответствующие а.о. другого.

ВЫВОДЫ

1) Разработан новый метод синтеза 8-азидо-*N*⁶-бензиламинопурина, физиологически активного цитокинина. Выяснена вероятная причина отсутствия пришивки 2- и 8-азидопроизводных цитокининов к лиганд-связывающему сайту цитокининового рецептора.

2) Методом модификации отдельных аминокислот установлено, что остаток аспартата, в отличие от остатков аргинина, цистеина и лизина, играет важную роль в связывании цитокининов рецептором.

3) Впервые охарактеризована лигандная специфичность полноразмерного цитокининового рецептора АНК2 из арабидопсиса.

4) С помощью сравнения первичных структур сенсорных модулей более 100 рецепторов цитокининов разных видов растений обнаружены новые консервативные структурные мотивы. Наиболее консервативной частью сенсорного модуля рецептора оказалась стержневая α -спираль, примыкающая к N-концу CHASE-домена.

5) Построены пространственные модели сенсорного модуля пяти рецепторов цитокининов арабидопсиса и кукурузы (АНК2, АНК3, ZmНК1, ZmНК2 и ZmНК3а) на основе структуры рецептора АНК4 как шаблона. Пептидный остов домена рецептора, формирующий сайт связывания цитокинина, оказался сходен у всех шести изученных рецепторов.

6) С помощью анализа структур лиганд-связывающих сайтов цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы идентифицированы переменные аминокислоты, которые могут играть определяющую роль в лигандной специфичности изучаемых рецепторов.

7) С помощью направленного мутагенеза получены новые изоформы рецептора ZmНК1 с одиночными или множественными заменами аминокислот. Среди них тройные (Y160H+L161V+A232S) или пятерные (Y160H+L161V+I176V+V202I+A232V; Y160H+L161V+I176V+V202I+A232I) мутанты обладали профилем лигандной специфичности, приближенным к профилю рецепторов АНК2/ZmНК3.

8) На основе анализа свойств мутантных рецепторов установлено, что аминокислотные остатки, важные для сдвига профиля лигандной специфичности рецептора ZmНК1 к профилю пары АНК2/ZmНК3, находятся в сенсорном модуле на позициях 160, 161 и 232.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

- 1) Steklov M.Yu., Tararov V.I., Romanov G.A., Mikhailov S.N. Facile synthesis of 8-azido-6-benzylaminopurine. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2011, V. 30, N 7-8, p. 503-511.
- 2) Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов. *Acta Naturae*, 2012, Т. 4, № 3 (14), с. 34-48.
- 3) Steklov M.Yu., Lomin S.N., Osolodkin D. I., Romanov G.A. Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Reports*, 2013, DOI 10.1007/s00299-013-1408-3. Published online 23 March 2013.
- 4) Стеклов М.Ю., Ломин С.Н., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Новые структурные мотивы лиганд-связывающего модуля рецепторов цитокининов. *Материалы Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация"*, г. Пущино, 27-30 мая 2013 (принято в печать).
- 5) Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Ломин С.Н., Романов Г.А. Исследование лиганд-связывающих свойств индивидуальных цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы, локализованных в растительных мембранах. *Материалы Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация"*, г. Пущино, 27-30 мая 2013 (принято в печать).

Тезисы

- 6) Романов Г.А., Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Гетман И.А., Болякина Ю.П. Аппарат рецепции цитокининов арабидопсиса: основные свойства и следствия. Тезисы 3-го Международного симпозиума "Клеточная сигнализация у растений", Казань, 28 июня - 1 июля 2011, с. 154-155.
- 7) Стеклов М.Ю., Тараров В.И., Романов Г.А., Михайлов С.Н. Упрощенный синтез реакционно-способного производного цитокинина – 8-азидо- N^6 -бензиладенина. Тезисы 7-ой Международной конференции «Рост, развитие и продуктивность растений», Минск, Беларусь, 26-28 октября 2011, с. 193.
- 8) Стеклов М.Ю., Тараров В.И., Романов Г.А., Михайлов С.Н. Синтез азидопроизводных аденина, как потенциальных реагентов для фотоафинной модификации. *Материалы Международной конференции "Биология - наука XXI века"*, Москва, 24 мая 2012, с. 896-897.

9) Steklov M.Yu., Osolodkin D.I., Krivosheev D.M., Lomin S.N., Mikhailov S.N., Palyulin V.A., Zefirov N.S., Romanov G.A. Explanation of the ligand-binding preferences of six different cytokinin receptors from arabidopsis and maize based on structural peculiarities of their CHASE domains. *Abstracts 3rd International Symposium "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design"*, Lviv, Ukraine, 17-23 September, 2012, p. 54.

10) Ломин С.Н., Стеклов М.Ю., Кривошеев Д.М., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Использование направленного точечного мутагенеза для выявления аминокислот, обуславливающих лигандную специфичность рецепторов цитокининов. *IV Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»*, Москва, ИФР РАН, 19-23 ноября 2012, с. 68.

11) Steklov M.Yu., Lomin S.N., Osolodkin D.I., Romanov G.A. "Computational prediction of amino acid residues essential for ligand-binding selectivity of cytokinin receptors". *Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13)* Moscow, Russia, July 25–28, 2013 (accepted).

12) Steklov M.Yu., Lomin S.N., Osolodkin D.I., Romanov G.A. "New structural motifs in the ligand-binding module of cytokinin receptors". *Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13)* Moscow, Russia, July 25–28, 2013 (accepted).