

На правах рукописи



**Кривошеев**  
**Дмитрий Михайлович**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С**  
**ЛИГАНДАМИ ЦИТОКИНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ**  
**АРАБИДОПСИСА И КУКУРУЗЫ**

03.01.05-физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва-2012

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**

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

**Лось Дмитрий Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ внутриклеточной регуляции, заведующий лабораторией

**Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, группа геномики растений, руководитель группы

**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:**

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

Защита состоится 27 ноября 2012 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 «25» октября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

**Актуальность проблемы.** Исследования молекулярных механизмов действия фитогормонов, в том числе цитокининов, заметно активизировались в последнее десятилетие. В случае цитокининов это связано в первую очередь с обнаружением рецепторов этих фитогормонов и возможностью манипуляции генами рецепторов в различных модельных системах. Особый интерес к цитокининам связан с их участием как в росте и развитии растения, так и в адаптации к неблагоприятным факторам среды. Однако, несмотря на большой прогресс в исследованиях структуры и функционирования рецепторов цитокининов, в данной области остается еще много нерешенных проблем. В частности, неизвестны структурные особенности рецепторных белков, которые обуславливают их лигандную специфичность. Неясна роль липидного микроокружения в формировании лиганд-связывающих свойств рецепторов. Непонятны причины, по которым некоторые соединения, близкие по структуре к природным цитокининам и способные специфично связываться с рецептором, не вызывают трансдукции гормонального сигнала и подавляют действие цитокининов. В целом до конца не выяснены причины множественности цитокининов и их рецепторов в клетке, а также биологическая роль различий лигандной специфичности рецепторов. Ответы на эти вопросы важны для понимания молекулярных механизмов действия цитокининов, что обуславливает актуальность данного направления исследований.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы – охарактеризовать индивидуальные рецепторы цитокининов из арабидопсиса и кукурузы по их взаимодействию с разнообразными лигандами; выявить аминокислотные остатки – возможные детерминанты лигандной специфичности рецепторов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- провести скрининг различных синтетических соединений, близких по структуре к природным цитокининам, на способность связываться с индивидуальными рецепторами из арабидопсиса и кукурузы *in vitro*, а также на способность проявлять цитокининовую активность в модельных системах *in vivo*;
- исследовать лиганд-связывающие свойства индивидуальных рецепторов цитокининов в составе растительных мембран;

- выяснить роль отдельных аминокислотных остатков в пределах гормон-связывающего CHASE домена рецептора в формировании его лигандной специфичности.

**Научная новизна работы.** В цитокининовых тест-системах, в том числе, с использованием индивидуальных рецепторов цитокининов АНК3 и CRE1/АНК4 арабидопсиса и ZmHK1 и ZmHK2 кукурузы, исследован широкий спектр природных цитокининов и близких по структуре синтетических веществ. У ряда синтетических соединений впервые обнаружена цитокининовая активность.

Обнаружен новый конкурентный рецепторный антагонист цитокининов N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин (БОМА), который способен специфически связываться с рецептором CRE1/АНК4, конкурируя с цитокининами за сайт связывания, но не вызывая трансдукции гормонального сигнала.

Разработана новая гомологичная модельная система на основе мембран из листьев *Nicotiana benthamiana*, экспрессирующих трансгены индивидуальных рецепторов цитокининов, которая позволяет изучать лиганд-связывающие свойства рецепторов в составе растительных мембран.

Впервые проведено сравнение лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов в двух различных модельных системах: гетерологичной на основе сферопластов, полученных из трансгенных *E. coli*, и гомологичной на основе мембран, выделенных из растений *N. benthamiana*.

Впервые исследована роль отдельных аминокислотных остатков в гормон-связывающем CHASE-домене рецепторов цитокининов в формировании их лигандной специфичности. С помощью метода ПЦР получены различные варианты рецептора ZmHK1 с точечными мутациями, приводившими к изменению его лиганд-связывающих свойств.

**Практическая ценность.** Разработанная гомологичная модельная система на основе мембран *N. benthamiana* может быть использована для изучения свойств других рецепторов, связанных с мембранами, в микроокружении, близком к существующему *in vivo*.

Обнаруженные новые соединения с предпочтительным сродством к индивидуальным рецепторам цитокининов могут быть использованы для избирательного воздействия на те части растения, где преобладают указанные рецепторы.

Информация о структуре нового антагониста цитокининов N<sup>6</sup>- (бензилоксиметил)аденозина (БОМА) в сочетании с данными о структуре других известных конкурентных антагонистов цитокининов может быть использована при разработке новых более эффективных рецепторных антагонистов цитокининов. Эти соединения в перспективе могут быть использованы как для научных исследований, так и в агропроизводстве и биотехнологии.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на XXIII Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011); VII Съезде Общества физиологов растений России и Международной молодежной научной школе "Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий" (Нижний Новгород, 2011); Научно-практической конференции "Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения" (Новый Свет, Украина, 2011); 3-ем Международном симпозиуме "Клеточная сигнализация у растений" (Казань, 2011); VII Международной научной конференции "Регуляция роста, развития и продуктивности растений" (Минск, Беларусь, 2011); Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); 54<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conference (Портленд, США, 2012); 3<sup>rd</sup> International Symposium “Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design” (Львов, Украина, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, включая 3 статьи в зарубежном и отечественных 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 179 страницах машинописного текста, содержат 10 таблиц и 27 рисунков. Список литературы включает 215 источников, в т.ч. 203 в зарубежных изданиях.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Особенности экспериментальных моделей.** Для исследования свойств рецепторов цитокининов *in vitro* использовали трансгенные бактерии *E. coli*, экспрессирующие гены индивидуальных рецепторов цитокининов арабидопсиса или кукурузы, а также мембраны листьев табака *Nicotiana benthamiana*, транзистно трансформированных генами рецепторов цитокининов. Кроме того, для биотестов *in planta* использовали модельные системы на основе проростков арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, трансформированных геном  $P_{ARR5}:GUS$ , и проростков амаранта *Amaranthus caudatus*. Эти системы дают четкую, быструю и специфическую реакцию на воздействие цитокининов и основаны на индукции экспрессии цитокинин-зависимых генов или трансгенов.

**Модельные системы на основе трансгенной *E. coli*.** Для изучения взаимодействия индивидуальных рецепторов цитокининов с различными лигандами использовали модельную систему, содержащую один из клонированных цитокининовых рецепторов. Такой системой служили бактерии *E. coli*, штамм КМ1001, трансформированные плазмидами pIN-IIIА3-АНК4, pSTV28-АНК3, pIN-IIIА3-ZmHK1 или pIN-IIIА3-ZmHK2, экспрессирующими гены рецепторов цитокининов арабидопсиса *АНК4/CRE1*, *АНК3* (Suzuki et al., 2001) или кукурузы *ZmHK1*, *ZmHK2* (предоставлены Т. Mizuno и Н. Sakakibara, Япония, соответственно). У данного штамма *E. coli* рецепторы цитокининов замещают близкую по структуре сенсорную гистидинкиназу бактерии RcsC, инактивированную мутацией, и проявляют цитокинин-зависимую функциональную активность (Suzuki et al., 2001; Spichal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004).

**Гомологичная модельная система на основе мембран *N. benthamiana*.** Для исследования лиганд-связывающих свойств индивидуальных рецепторов цитокининов в составе растительных мембран была разработана модельная система на основе микросомальной фракции, выделенной из листьев *N. benthamiana*. В составе плазмиды pB7FGW2 гены рецептора АНК3 или ZmHK1 встраивали в бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Данные бактерии использовали для трансформации *N. benthamiana* путем инфильтрации бактериальной суспензии в листья. На пятые сутки после трансформации из листьев выделяли микросомальную фракцию мембран, которую использовали

для исследования лиганд-связывающих свойств рецепторов. Специфическое связывание меченого гормона мембранами, выделенными из растений, подвергнутых трансформации, было на порядок выше, чем мембранами растений, не подвергнутых трансформации. Это позволило пренебречь вкладом в связывание собственных рецепторов *N. benthamiana*.

**Анализ характеристик взаимодействия гормонов с рецепторами** проводили на основе разработанного варианта радиолигандного метода с использованием сферопластов трансгенных бактерий или микросомальной фракции мембран растений, трансформированных генами рецепторов цитокининов. В качестве меченого лиганда применяли [2-<sup>3</sup>H]-*транс*-зеатин (~600 ГБк/ммоль).

**Модельные системы на основе трансгенного арабидопсиса.** Проростки трансгенного  $P_{ARR5}:GUS$  арабидопсиса содержали репортерный ген *GUS* под контролем цитокинин-зависимого промотора гена *ARR5* (предоставлены J.J. Kieber, США). Эти проростки реагируют на цитокинин активацией экспрессии репортерного гена, что позволяет количественно оценивать гормональную индукцию генной экспрессии (D'Agostino et al., 2000; Romanov et al., 2002). Время инкубации проростков с гормоном составляло 5 часов.

Также в работе использовали двойные мутанты арабидопсиса, экспрессирующие один из трех рецепторов цитокининов и несущие конструкцию  $P_{ARR5}:GUS$  (предоставлены Т. Schmölling, Германия), что дало возможность изучать активность индивидуальных рецепторов *in planta*.

**Активность репортерного фермента GUS** определяли количественно флуоресцентным методом (Зверева & Романов, 2000; Spichal et al., 2004).

**Сайт-специфический мутагенез.** Введение сайт-специфических мутаций, направленно заменяющих отдельные аминокислоты рецептора, осуществляли многостадийным методом на основе ПЦР. Детали метода показаны на рис. 8. Наличие мутаций было подтверждено с помощью секвенирования ДНК.

**Математические и статистические методы.** 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 программ Microsoft Excel и T-TEST. На графиках и гистограммах представлены средние арифметические значения  $\pm$  стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

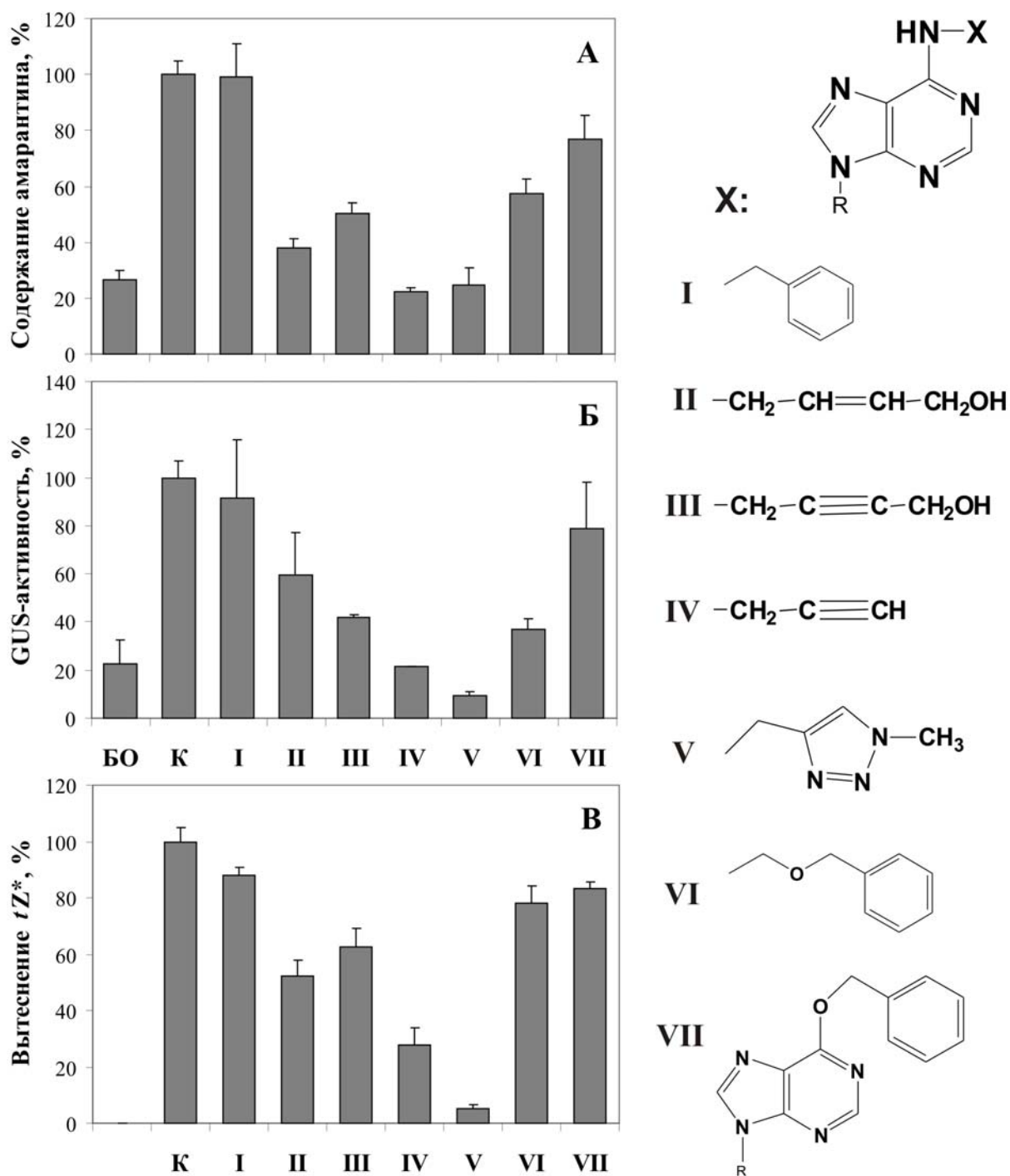
### *1. Исследование лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов с применением синтетических производных аденина*

Для исследования лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов из арабидопсиса и кукурузы было использовано более 30 лигандов – производных аденина, как природных цитокининов, так и близких к ним по структуре синтетических соединений (предоставлены С.Н. Михайловым, ИМБ РАН). В качестве модельной системы служили трансгенные бактерии *E. coli*, экспрессирующие индивидуальные рецепторы цитокининов. Для облегчения взаимодействия цитокининов с рецепторами у бактерий удаляли внешнюю оболочку, получая так называемые сферопласты. О сродстве лигандов к рецепторам судили по их способности вытеснять меченый гормон из комплекса с рецептором. Важным параметром лиганд-рецепторного взаимодействия является сродство рецептора к лиганду, которое характеризуется константой диссоциации комплекса лиганд-рецептор ( $K_D$ ). Для определения кажущихся  $K_D$  были получены концентрационные зависимости вытеснения исследуемыми лигандами меченого *транс*-зеатина из комплекса с рецептором. Чем сильнее рецептор связывает лиганд, тем меньше значение  $K_D$  комплекса.

**Таблица 1.** Кажущиеся константы диссоциации (нМ) комплексов лигандов-производных аденина с рецепторами цитокининов арабидопсиса и кукурузы, в составе сферопластов *E. coli*. Структурные формулы веществ приведены на рис. 1. (римскими цифрами обозначены номера соединений).

Лиганд	Рецептор			
	CRE1/ АНК4	АНК3	ZmНК1	ZmНК2
<i>транс</i> -зеатин ( <i>tZ</i> )	2,4	0,2	33,9	0,3
<i>цис</i> -зеатин ( <i>cZ</i> )	93,9	44,2	35	8,6
N <sup>6</sup> -бензиладенозин (I)	11,3	6,3	2,9	13,3
N <sup>6</sup> -(2-пропинил)аденозин (IV)	9234	2467	5391	31,1
N <sup>6</sup> -(бензилоксиметил)аденозин (VI)	243	3123	203,4	1706
O <sup>6</sup> -бензилинозин (VII)	206	17,8	18,6	70,4





**Рис. 1.** Цитокининовая активность синтетических производных аденина в амарантовом биотесте (А), биотесте по определению GUS-активности у  $P_{ARR5}:GUS$ -арабидопсиса (Б) и способность этих лигандов вытеснять меченый *транс*-зеатин ( $tZ^*$ ) из комплекса с рецептором CRE1/АНК4 (В). А, Б: концентрация веществ 5 мкМ, контролем служил  $N^6$ -бензиламинопурин (БАП). БО – вариант без обработки. В: концентрация веществ 9 мкМ, контролем служил *транс*-зеатин. Везде контроль принят за 100%. Названия I, IV, VI и VII см. табл. 1. II –  $N^6$ -(*цис*)-(4-окси-2-бутенил)аденозин; III –  $N^6$ -(4-окси-2-бутинил)аденозин; V –  $N^6$ -[(1-метил-1,2,3-триазол-4-ил)метил]аденозин. Структура VII приведена полностью. R – рибоза.

Полученные результаты (табл. 1) подтвердили различия в лигандной специфичности между рецепторами цитокининов. Было установлено, что между ортологами существует сходство в лигандной специфичности по отношению не только к природным, но и к отдельным синтетическим цитокининам. Так, ортологи АНК4 и ZmНК1 связывали N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин сильнее, чем ортологи АНК3 и ZmНК2. Было установлено, что соединение N<sup>6</sup>-(2-пропинил)аденозин обладает избирательным сродством по отношению к ZmНК2, в то время как с остальными исследованными рецепторами связывается крайне слабо.

Параллельно с опытами по связыванию многие из лигандов, особенно новых производных аденина, испытывали в биотестах на цитокининовую активность (рис. 1). Такими специфическими биотестами служили биотест по определению GUS-активности у P<sub>ARR5</sub>:GUS-арабидопсиса и амарантовый биотест. Результаты показали четкую положительную корреляцию между сродством лиганда к рецептору, т.е. его способностью вытеснять меченый *транс*-зеатин, и способностью этого же соединения вызывать цитокинин-специфичный ответ в экспериментах *in planta*. Однако наряду с такой общей корреляцией обнаружались и исключения. В частности, N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин (сокращенно названный БОМА), эффективно вытеснял зеатин из комплекса с рецептором CRE1/АНК4, но при этом не вызывал существенной активации репортерного гена *GUS* под промотором *ARR5*. Было сделано предположение, что в отношении данного рецептора БОМА может действовать как антицитокинин.

## **II. Антицитокининовая активность БОМА**

Обнаружение новых антицитокининов представляет большой интерес, так как до последнего времени в литературе было описано всего два антицитокинина (PI-55 и LGR-991), действующие конкурентно на уровне рецепторов (Spíchal et al., 2009; Nisler et al., 2010). Нами была исследована способность БОМА подавлять физиологическое действие типичного цитокина БАП (рис. 2). Положительным контролем служил известный антицитокинин PI-55 (предоставлен L. Spíchal, Чешская республика). В эксперименте использовали двойные мутанты P<sub>ARR5</sub>:GUS-арабидопсиса, которые экспрессировали лишь один из трех рецепторов цитокининов. БОМА

достоверно ингибировал действие БАП при совместном добавлении этих веществ к проросткам, экспрессирующим только CRE1/АНК4. При этом эффекты БОМА и антицитокинина PI-55 практически совпали, что служит прямым подтверждением антицитокининовых свойств БОМА. Антицитокининовый эффект БОМА, как и PI-55, отсутствовал на проростках, экспрессирующих АНК3 как единственный рецептор цитокининов, что было ожидаемо, исходя из низкого сродства БОМА к этому рецептору (табл. 1). Таким образом, антицитокининовая активность БОМА проявлялась в отношении рецептора CRE1/АНК4, но не АНК3, что еще раз подчеркивает выраженную лигандную специфичность рецепторов.

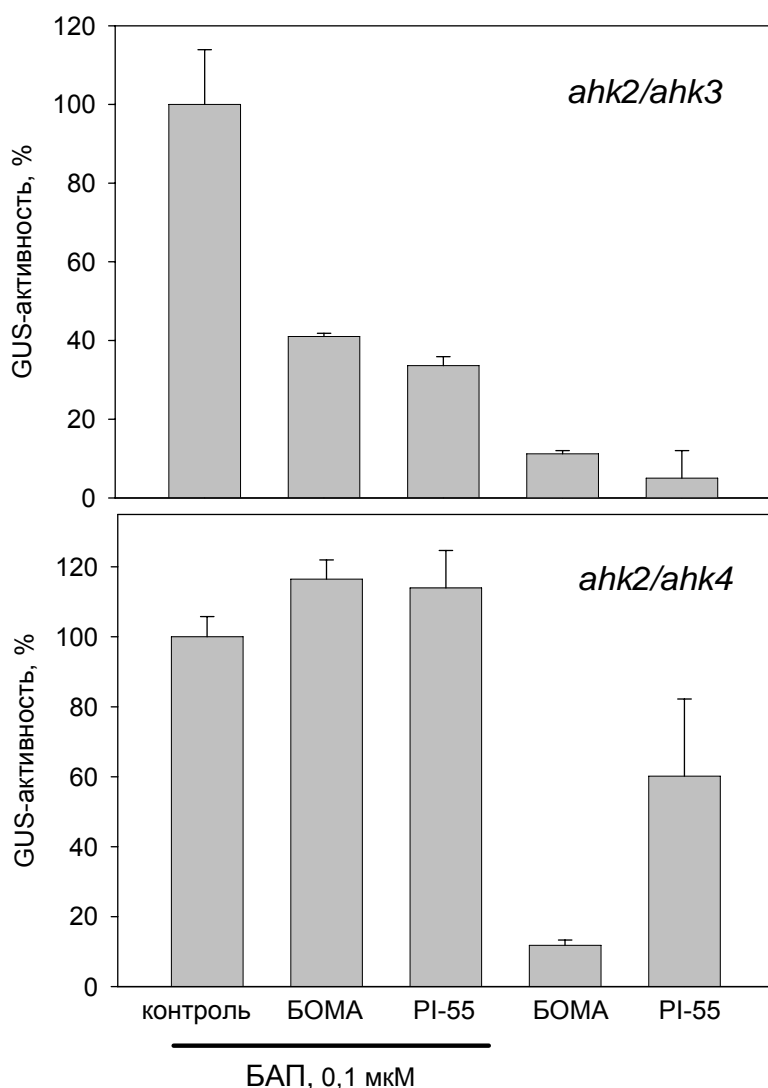
Антицитокининовый эффект БОМА зависел от дозы этого соединения, точнее, от соотношения между используемыми концентрациями БАП и БОМА (рис. 3,А). При концентрации 50 мкМ, превышающей концентрацию БАП в 500 раз, БОМА подавлял активацию рецептора CRE1/АНК4 цитокинином на 50-60%, тогда как при низких соотношениях эффект БОМА был выражен гораздо слабее.

Для того, чтобы проверить, конкурируют ли БОМА и природные цитокинины за один и тот же сайт связывания на рецепторе CRE1/АНК4, была изучена концентрационная зависимость связывания этим рецептором меченого *транс*-зеатина в отсутствие и в присутствии БОМА. Данные представлены в виде линейных зависимостей в двойных обратных координатах (рис. 3,Б). Расположение точки пересечения прямых в непосредственной близости от оси ординат свидетельствует о том, что БОМА и *транс*-зеатин действительно связываются с одним и тем же сайтом на рецепторе CRE1/АНК4. Таким образом, БОМА является конкурентным рецепторным антагонистом цитокининов.

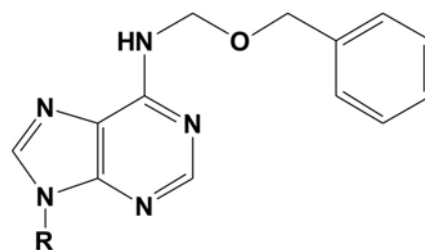
Компьютерное моделирование взаимодействия БОМА с гормон-связывающими сайтами рецепторов подтвердило возможность нахождения БОМА внутри сайта, несмотря на большой размер боковой цепи. Было проведено сравнение связывания БОМА и БАП с обоими рецепторами (рис. 4). В случае CRE1/АНК4 расположение адениновых частей БОМА и БАП было сходным, но взаимодействие атома N<sup>1</sup> с молекулой воды у БОМА ухудшено, кроме того, положение фенильных остатков этих лигандов было различным. В случае АНК3, у которого полость сайта меньше по объему, моделирование показало аналогичное расположение фенильных остатков БОМА и БАП в сайте

связывания. В связи с этим адениновый фрагмент БОМА слегка выталкивался из сайта, а водородная связь с изолейцином-287 реализовалась не через N<sup>9</sup>, а через N<sup>3</sup>. Кроме того, исчезала возможность образования водородной связи N<sup>1</sup> с молекулой воды. Все эти изменения взаимодействия с рецептором приводили к уменьшению сродства БОМА к белку, особенно в случае рецептора АНК3, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными о сродстве БОМА к этим рецепторам (табл. 1).

Таким образом, в результате данного исследования к двум недавно найденным антицитокининам (PI-55 и LGR-991) добавился третий антагонист цитокининового рецептора CRE1/АНК4. Он отличается по структуре от обнаруженных ранее наличием остатка кислорода в цепочке атомов, соединяющей ароматическое кольцо с N<sup>6</sup> аденина, а также отсутствием заместителей в бензольном кольце.

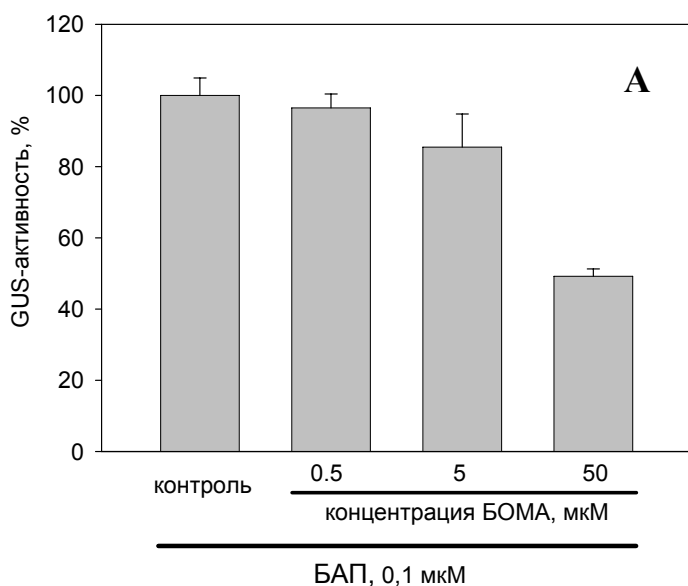


**Рис. 2.** Действие БОМА (50 мкМ) и PI-55 (50 мкМ) на активацию *GUS* цитокинином в двойных мутантах *ahk2/ahk3* (вверху) и *ahk2/ahk4* (внизу) арабидопсиса. Повышение *GUS*-активности под действием БАП (0,1 мкМ) служило контролем (принято за 100%).



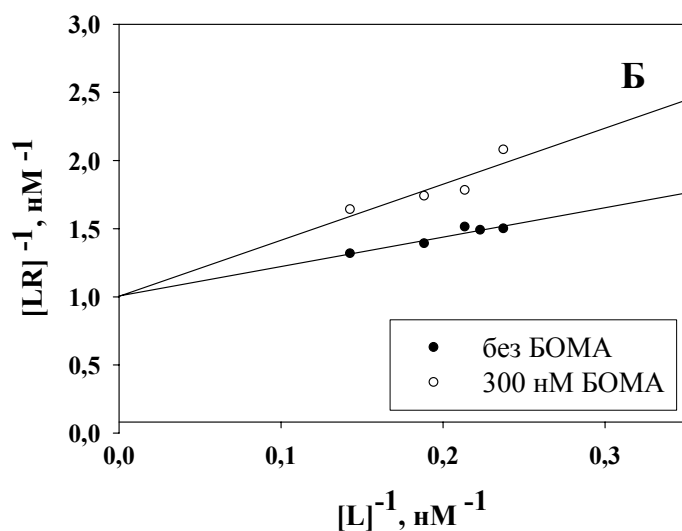
**N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин (БОМА)**

R - рибоза



**Рис. 3.**

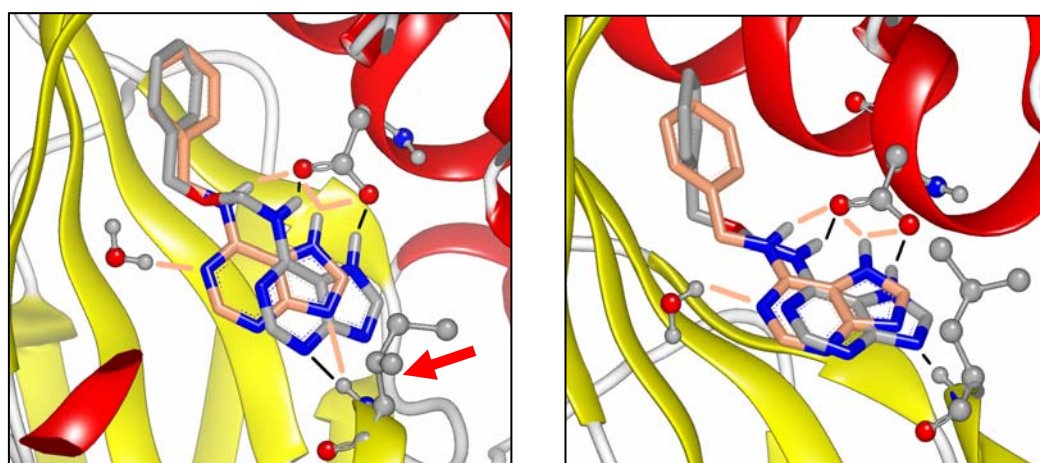
**А.** Действие БОМА в различных концентрациях на активацию *GUS* цитокинином в двойных мутантах *ahk2/ahk3* арабидопсиса. Повышение *GUS*-активности под действием БАП (0,1 мкМ) служило контролем (принято за 100%).



**Б.** Идентификация сайта связывания БОМА. Данные представлены в двойных обратных координатах.

[L] – концентрация свободного *транс*-зеатина;

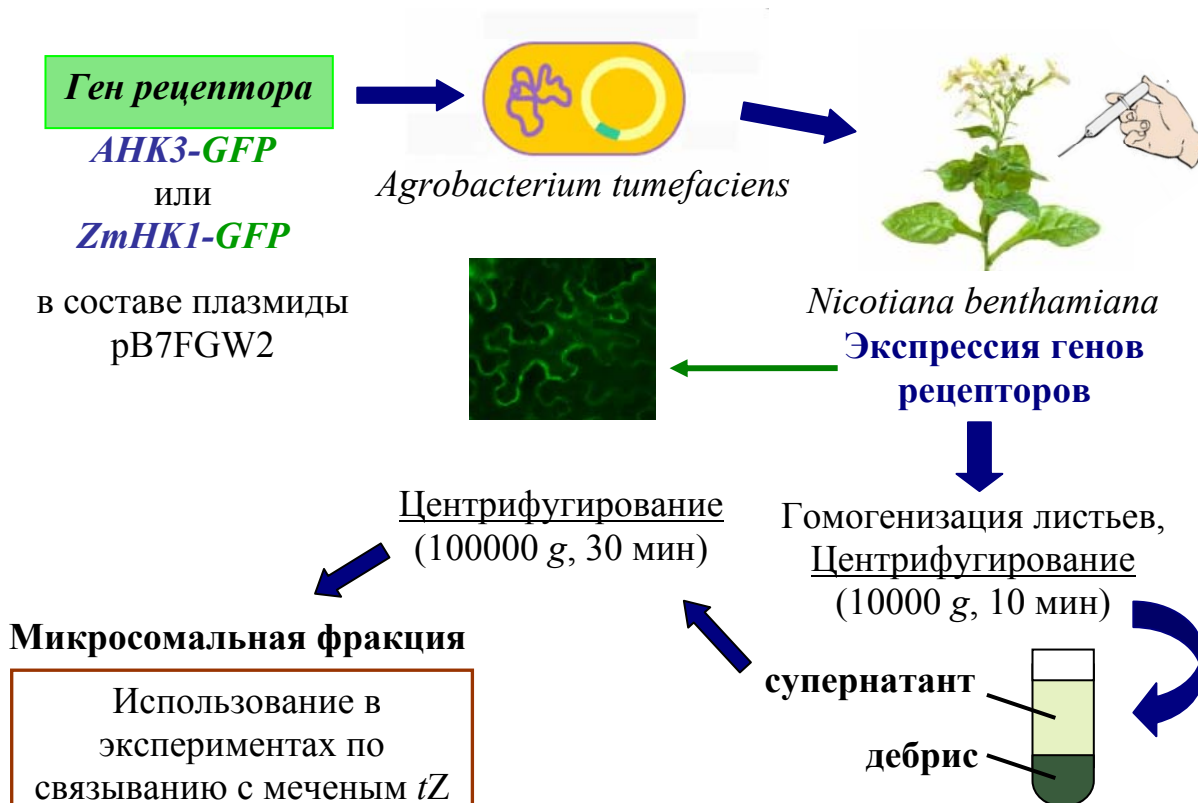
[LR] – концентрация *транс*-зеатина, связанного рецептором.



**Рис. 4.** Пространственные модели взаимодействия БОМА (серый цвет) и БАП (розовый цвет) с сайтом связывания рецепторов АНК3 (слева) и CRE1/АНК4 (справа). Красная стрелка указывает на изолейцин-287 рецептора АНК3. Молекулярный докинг выполнен при участии Д.И. Осолодкина (МГУ).

### III. Исследование лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов в составе растительных мембран

Поскольку ранее для исследования свойств рецепторов цитокининов использовали гетерологичные системы на основе дрожжей и бактерий, было важно проверить, сохраняются ли выявленные свойства рецепторов при их нахождении в составе мембран растений. Для ответа на этот вопрос нами была разработана гомологичная модельная система (рис. 5).



**Рис. 5.** Процедура получения мембран из растений *Nicotiana benthamiana*, транзистентно экспрессирующих гены цитокининовых рецепторов арабидопсиса или кукурузы.

Ген интересующего нас рецептора в составе плазмидного вектора встраивали в клетки агробактерий, которые затем использовались для трансформации растений *N. Benthamiana*. Поскольку к гену рецептора был «пришит» ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP), об экспрессии встроенного гена можно было судить по флуоресценции GFP. Из листьев трансформированных растений выделяли микросомальную фракцию мембран. Эти мембраны затем использовали для изучения лиганд-связывающих свойств индивидуальных рецепторов цитокининов.

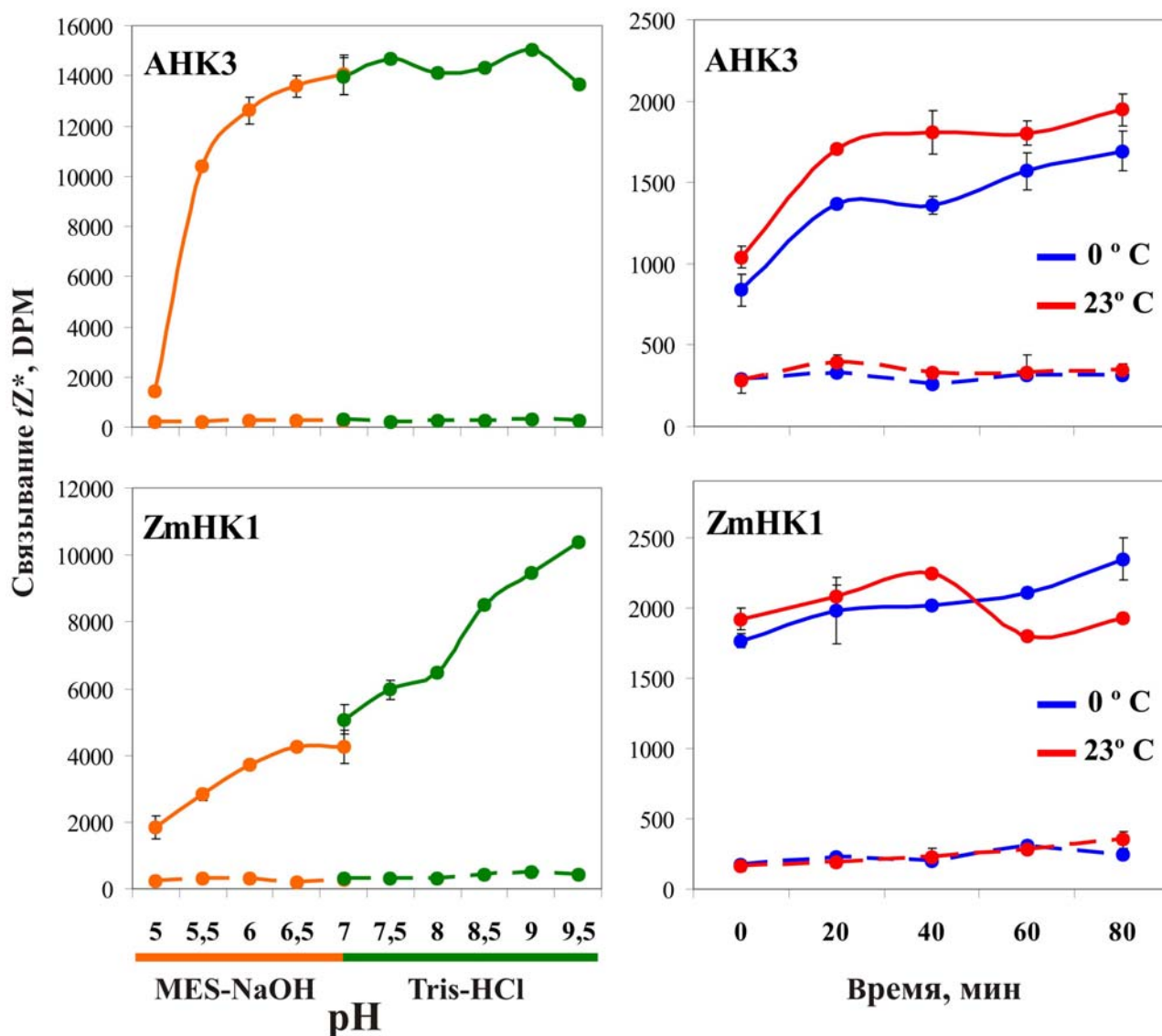
Результаты сравнения гетерологичной и гомологичной тест-систем показали наличие как черт сходства, так и определенных различий между системами. Для рецептора АНКЗ было установлено, что при рН 5 связывание практически отсутствует, оптимум рН наблюдался в диапазоне от 6,5 до 9,5 (рис. 6). Эти данные согласуются с данными, полученными ранее в бактериальной системе (Romanov et al., 2006). При комнатной температуре (23°C) наблюдалось более высокое связывание, чем при температуре 0°C. Ранее на бактериях были получены противоположные данные. Было также показано, что состояние равновесия наступает после 20 мин инкубации.

Для рецептора ZmHK1 было установлено, что с увеличением рН связывание практически линейно увеличивается, что согласуется с данными, полученными ранее в бактериальной системе. Существенных различий в связывании меченого гормона при комнатной температуре (23°C) и при 0°C не наблюдалось. Состояние равновесия наступало уже в течение первых 20 мин инкубации. Следует отметить, что все вариации температуры и рН оказывали влияние на тотальное, но не на неспецифическое связывание.

**Таблица 2.** Кажущиеся константы диссоциации (нМ) комплексов гормон-рецептор для рецепторов АНКЗ и ZmHK1 в гомологичной (на основе мембран *N. benthamiana*) и в гетерологичной (на основе сферопластов *E. coli*) модельных системах.

Модельная система	Рецептор	Лиганд (цитокинин)					
		<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	БАП	<b>DZ</b>	<b>Ade</b>
Гомологичная	АНКЗ	3,1	849	22,1	154	27,6	37290
	ZmHK1	2,7	1,9	0,1	0,3	37,9	46070
Гетерологичная	АНКЗ	0,2	44,2	1,6	19,8	0,9	3560
	ZmHK1	33,9	35	2,5	3,4	519	24850

Здесь и далее используются следующие обозначения цитокининов: *tZ* – транс-зеатин; *cZ* – цис-зеатин; *iP* – изопентениладенин; **DZ** – дигидрозеатин; **TD** – тидиазурон; **Ade** – аденин.



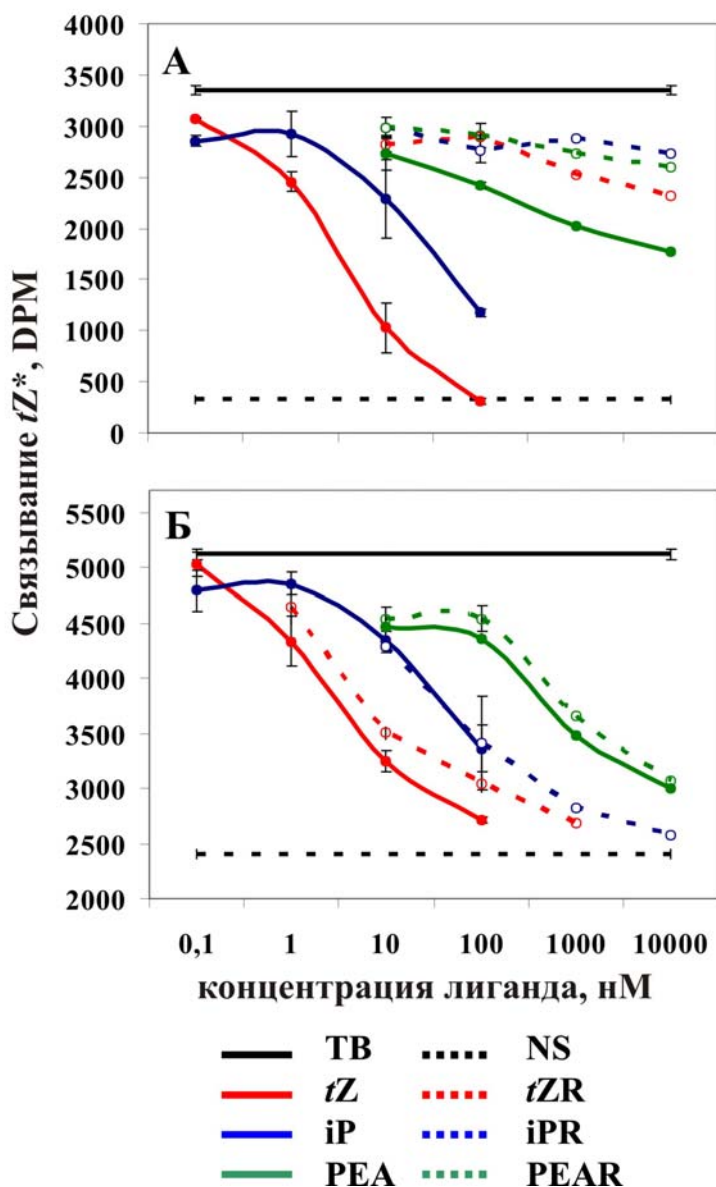
**Рис. 6.** Влияние pH (слева) и температуры (справа) на связывание меченого *транс*-зеатина ( $tZ^*$ ) рецепторами АНК3 и ZmHK1 в составе растительных мембран. Тотальное связывание обозначено сплошными линиями, неспецифическое – пунктирными. DPM (здесь и далее) - распад/мин.

Большой интерес представляло изучение в условиях разных модельных систем лигандной специфичности рецепторов цитокининов. Это исследование было проведено с применением ряда известных цитокининов-оснований и их рибозидов. В отношении оснований закономерности, полученные ранее в системе на основе сферопластов *E. coli*, воспроизвелись и на растительных мембранах как с рецептором АНК3, так и с ZmHK1 (табл. 2). Таким образом, ряды аффинности, полученные для цитокининов-оснований в разных модельных системах, полностью совпали:



АНК3 (в мембранах *N. benthamiana*):  
 АНК3 (в сферопластах *E. coli*):  
 ZmHK1 (в мембранах *N. benthamiana*):  
 ZmHK1 (в сферопластах *E. coli*):

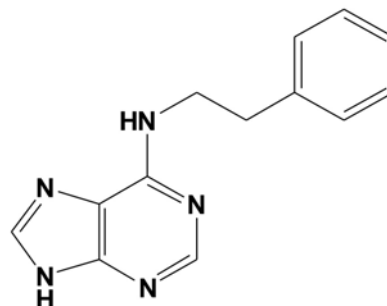
$tZ > iP \approx DZ > \text{БАП} > cZ > \text{Аде}$   
 $tZ > iP \approx DZ > \text{БАП} > cZ > \text{Аде}$   
 $iP > \text{БАП} > tZ \approx cZ > DZ > \text{Аде}$   
 $iP > \text{БАП} > tZ \approx cZ > DZ > \text{Аде}$



**Рис. 7.** Кривые концентрационной зависимости вытеснения меченого *транс*-зеатина ( $tZ^*$ ) из комплекса с рецептором АНК3 цитокининами-основаниями и соответствующими рибозидами (R) в условиях гомологичной (А) и гетерологичной (Б) модельных систем.

ТВ – тотальное связывание;  
 NS – неспецифическое связывание.

PEA -  $N^6$ -(2-фенилэтил)аденин:



PEAR -  $N^6$ -(2-фенилэтил)аденозин  
 (соответствующий PEA рибозид)

Однако в отношении рибозидов проявились существенные различия между модельными системами: в опытах со сферопластами *E. coli* рибозиды активно вытесняли меченый зеатин из комплексов с рецепторами, тогда как в случае растительных мембран были практически неактивны (рис. 7). Одним из объяснений наблюдаемого эффекта может быть наличие в клетках бактерий неспецифической гликозидазы, которая отщепляет рибозу и превращает цитокинины в основания.

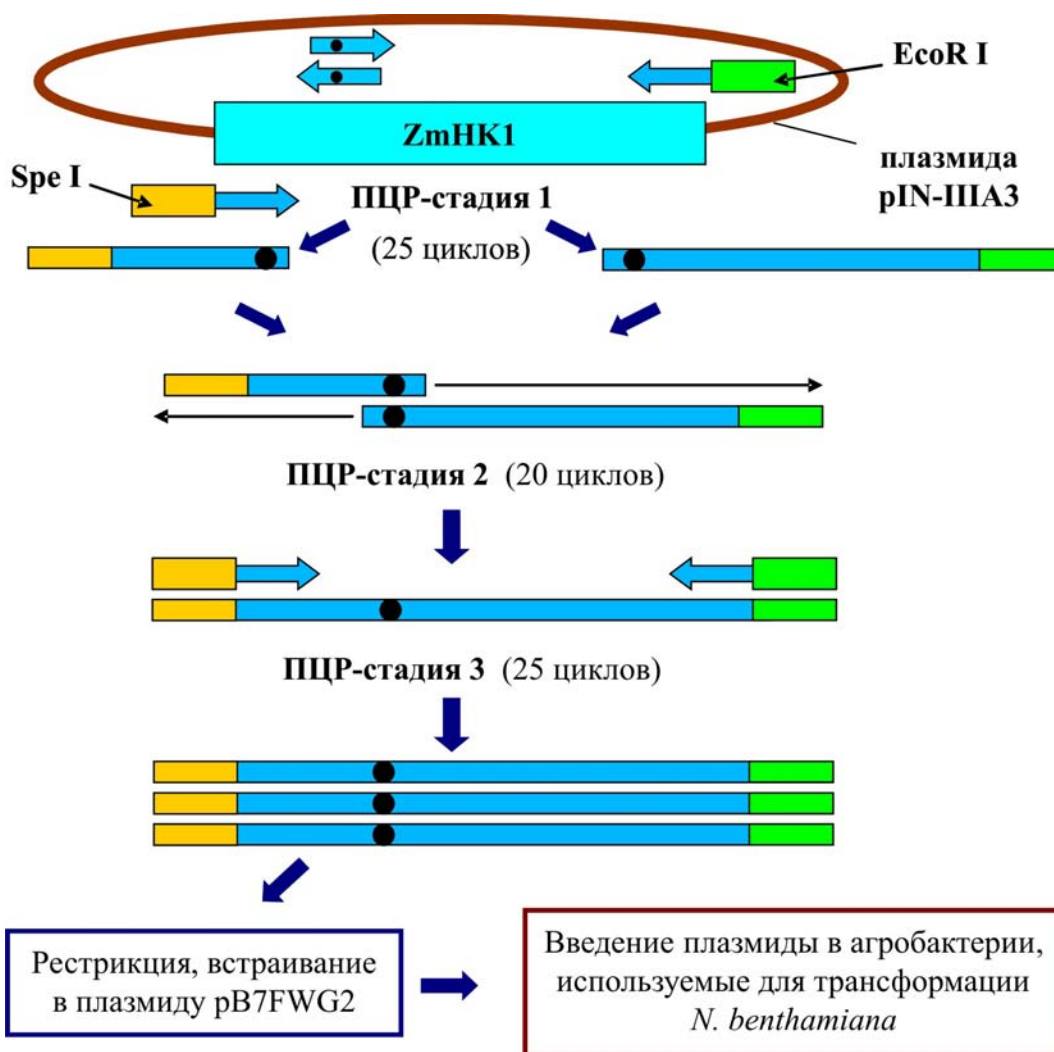
### ***III. Влияние точечных мутаций в гормон-связывающем CHASE домене рецептора ZmHK1 на его лигандную специфичность***

Известно, что рецепторы цитокининов заметно отличаются друг от друга по лигандной специфичности (Romanov et al., 2006; Lomin et al., 2011). В частности, ZmHK1 примерно с одинаковым сродством связывает *цис*- и *транс*-зеатины (табл. 1), в отличие от других исследованных рецепторов (в т.ч. ZmHK2), для которых константы сродства к этим гормонам различаются на порядок. Чтобы приблизиться к пониманию того, почему те или иные рецепторы имеют различные предпочтения к разным формам цитокининов, были проведены замены отдельных аминокислот в лиганд-связывающем CHASE-доме рецептора ZmHK1. Для выбора заменяемых аминокислот было проведено предварительное сравнение аминокислотных последовательностей CHASE-домена рецепторов арабидопсиса и кукурузы с использованием биоинформатической программы Clustal W2. Было сделано предположение, что в гормон-связывающем сайте рецептора ZmHK1 должны находиться либо уникальные аминокислоты, либо отсутствующие у рецептора ZmHK2; именно они и обуславливают лигандную специфичность ZmHK1. После того, как такие аминокислоты были найдены, из них были выбраны те, которые предположительно взаимодействуют с молекулой цитокинина (с использованием структурных данных Hothorn et al., 2011).

Далее выбранные аминокислоты заменяли следующим образом: аспарагин-110 на серин (N110S), глутамин -116 на валин (Q116V), изолейцин-176 на валин (I176V). Замену производили на те аминокислоты, которые в соответствующих позициях присутствуют в рецепторе ZmHK2. Схема получения мутаций представлена на рисунке 8. Гены рецепторов с точечными мутациями, встроенные в плазмидные векторы, вводили в агробактерии, которые затем использовали для трансформации растений *N. benthamiana* (рис. 5). Мембраны, выделенные из этих растений, использовали в экспериментах по связыванию с меченым *транс*-зеатином. Результаты этих экспериментов демонстрируют, что введение точечных мутаций в CHASE-домен рецептора ZmHK1 действительно меняет его лигандную специфичность (рис. 9). Было показано, что замены аспарагина-110 на серин (N110S) и изолейцина-176 на валин (I176V) приводят к снижению аффинности рецептора к *цис*-зеатину, замена глутамина-116 на валин (Q116V) – к увеличению аффинности к тидиазурону. Кроме того, было установлено, что замена аргинина-163 на серин (R163S) не приводит к

изменению лигандной специфичности рецептора. Различия в лигандной специфичности между мутантными рецепторами и рецепторами дикого отражены в соответствующих рядах аффинности:

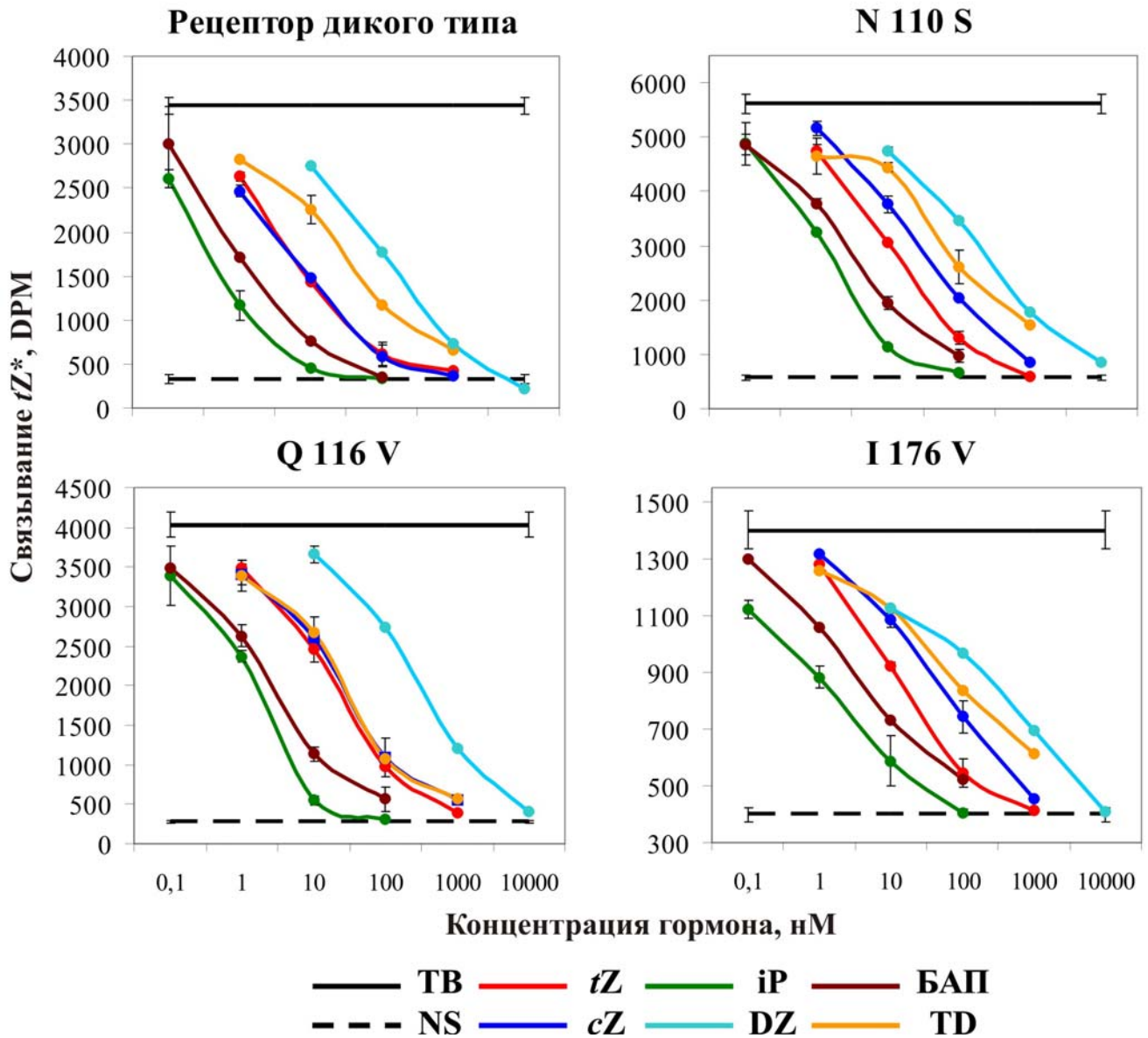
ZmHK1 (дикий тип):  $iP > \text{БАП} > tZ \approx cZ > \text{TD} > \text{DZ}$   
 N 110 S:  $iP > \text{БАП} > tZ > cZ > \text{TD} > \text{DZ}$   
 Q 116 V:  $iP > \text{БАП} > tZ \approx cZ \approx \text{TD} > \text{DZ}$   
 R 163 S:  $iP > \text{БАП} > tZ \approx cZ > \text{TD} > \text{DZ}$   
 I 176 V:  $iP > \text{БАП} > tZ > cZ > \text{TD} > \text{DZ}$



**Рис. 8.** Схема получения точечных мутаций (показаны черными точками) в рецепторе ZmHK1. EcoR I и Spe I – сайты рестрикции в составе праймеров.

Наиболее распространенным способом получения мутаций в растениях *in vivo* является обработка последних химическими мутагенами. Ученые из SALK Института (США) получили данным методом мутанты кукурузы с весьма

характерным фенотипом (рис. 10). У этих растений наблюдались атипичные разрастания по краям листовых пластинок, а также избыточное количество волосков по краям листьев и листовых влагалищ (Chudalayandi et al., in preparation). Данная мутация получила название *Hairy Sheath Frayed 1 (Hsf1)*.

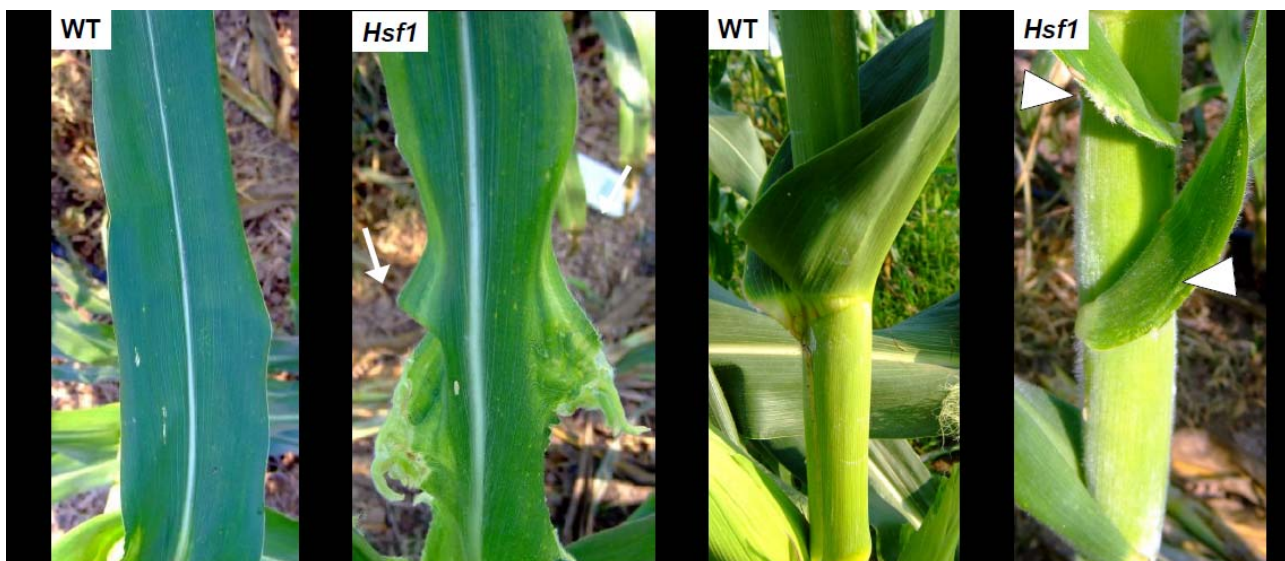


**Рис. 9.** Влияние точечных мутаций в CHASE-домене рецептора ZmHK1 на его лигандную специфичность. **TB** - тотальное связывание; **NS** - неспецифическое связывание.

Было установлено, что фенотип *Hsf1* вызван изменениями рецептора цитокининов ZmHK1. Были выявлены три отдельные точечные мутации в лиганд-связывающем (CHASE) домене рецептора, каждая из которых

приводила к описанному фенотипу: замены пролина-190 на лейцин (P190L), глутамата-236 на лизин (E236K) и лейцина-238 на фенилаланин (L238F) (рис. 10). Нами были получены отдельные бактериальные клоны *E. coli*, каждый из которых экспрессировал один из мутантных рецепторов. На этих клонах провели опыты по оценке лиганд-связывающих свойств мутантных рецепторов. Мутации E236K и L238F приводили к значительному усилению аффинности рецепторов ко всем лигандам, кроме тидиазурона (TD), который по своей химической структуре далек от других испытанных соединений и не содержит адениновой части (табл. 3). Это привело к тому, что тидиазурон в случае мутантных рецепторов смещался в конец рядов аффинности:

ZmHK1 (дикий тип): iP > БАП > tZ ≈ cZ > **TD** > DZ  
 E 236 K: iP > БАП > tZ ≈ cZ > DZ > **TD**  
 L 238 F: iP > БАП > tZ ≈ cZ > DZ > **TD**  
 P 190 L: iP > БАП > tZ ≈ cZ > DZ > **TD**

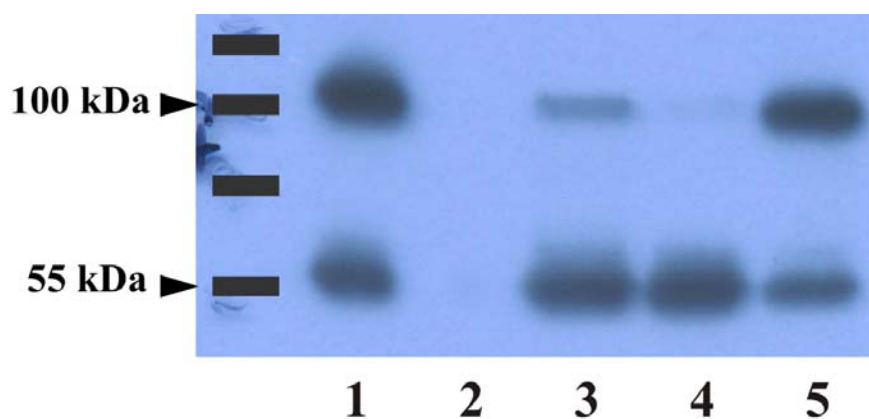


86 SPPAI DQDTFAKYTA RTSFERPLLN GVAFAQRVFH  
 121 HEREMFESQQ GWVMTMQRE PAPPQVEYAP VIFSQDTVSY LARIDMMSGE EDRENIFRAR  
 181 TTGKAVLTN**P** FRLLSNHLG VVLTFAYYRP DLPADASVEQ RVEATIGYLG GAFDV**ESL**VE  
 241 NLLSKLAGNQ DIVVNVYDVT NASDAMVLYG

**Рис. 10.** Фенотип растений кукурузы дикого типа (WT) и растений с мутацией *Hsf1* (вверху), а также аминокислоты в CHASE-домене рецептора ZmHK1, отдельные точечные мутации по которым приводят к этому фенотипу (выделены красным цветом) (внизу). Белыми стрелками показаны характерные разрастания по краям листовой пластинки, белыми треугольниками – волоски на краях листьев и листовых влагалищ.

**Таблица 3.** Влияние мутаций в CHASE-домене на лиганд-связывающие свойства рецептора ZmHK1 в составе сферопластов *E. coli* (А) или мембран *N. benthamiana* (Б)

Мутация	Кажущиеся $K_D$ комплексов гормон-рецептор, нМ					
	<i>tZ</i>	<i>cZ</i>	<i>iP</i>	БАП	TD	DZ
<b>А</b>						
дикий тип	33,9	35	2,5	3,4	62,3	519
<b>E 236 K</b>	2	2,3	0,2	0,3	43,5	30,1
<b>L 238 F</b>	4,5	2,6	0,2	0,3	40,9	28,5
<b>Б</b>						
дикий тип	2,7	1,9	0,1	0,3	8,9	37,9
<b>P 190 L</b>	0,2	0,3	0,02	0,03	8,4	1,6



**Рис. 11.** Проверка наличия рецепторов ZmHK1, с точечными мутациями L238F (3), P190L (4) и E236K (5), в мембранах трансгенных бактерий *E. coli* с помощью вестерн-блоттинга. Мембраны бактерий, экспрессировавших ген рецептора ZmHK1 дикого типа (1), служили положительным контролем, а ZmHK2 (2) - отрицательным. Верхние бэнды соответствуют по мол. массе рецепторам ZmHK1, нижние – продуктам их деградации.

Аналогичные данные были получены для рецептора с мутацией P190L (табл. 5), но только в модельной системе на основе мембран табака, поскольку бактериальная система оказалась неэффективна: бактерии, содержавшие ген рецептора ZmHK1 с данной мутацией, не были способны связывать меченый *транс*-зеатин. Кроме того, они отличались задержкой роста, что могло свидетельствовать о токсичности продукта этого трансгена для бактерий. Вестерн-блоттинг с использованием антител против ZmHK1 показал, что в бактериях, содержащих ген рецептора ZmHK1 с заменой пролина-190 на

лейцин, этот белок не накапливался в необходимых количествах (рис. 11). В целом эта серия данных говорит о том, что мутации, ведущие к изменению лиганд-связывающих свойств рецепторов цитокининов, могут приводить *in vivo* к характерным изменениям фенотипа растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лиганд-связывающие свойства рецепторов играют важную роль в механизме восприятия гормонального сигнала клеткой. С целью изучения лигандной специфичности индивидуальных рецепторов цитокининов мы применили несколько подходов. В цитокининовых тест-системах, в том числе с использованием индивидуальных рецепторов арабидопсиса и кукурузы, был исследован большой набор природных цитокининов и близких по структуре синтетических веществ. У ряда синтетических соединений впервые обнаружена цитокининовая активность; выявлены также соединения с избирательным сродством к отдельным рецепторам. Обнаружен новый антицитокинин – N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин (БОМА), который проявил свойства конкурентного антагониста цитокининов на уровне взаимодействия с рецептором CRE1/АНК4. Разработанная модельная система на основе микросом из листьев табака, активно экспрессирующего трансгены цитокининовых рецепторов арабидопсиса или кукурузы, позволила изучить лиганд-связывающие свойства индивидуальных рецепторов в составе растительных мембран, т.е. в условиях, близких к естественным. Впервые проведено исследование роли отдельных аминокислот в пределах гормон-связывающего CHASE-домена рецептора в формировании его лигандной специфичности. С помощью метода ПЦР получен ряд новых вариантов рецептора ZmHK1 с точечными мутациями, приводившими к изменению его лиганд-связывающих свойств, в том числе лигандной специфичности.

Полученные результаты дают основу для понимания молекулярных основ высокоспецифичного взаимодействия цитокининов с рецепторами и показывают возможность направленного воздействия на свойства и активность рецепторов.

## ВЫВОДЫ

1. В ходе скрининга синтетических производных аденина, близких по структуре к природным цитокининам, выявлены новые соединения, которые обладают цитокининовой активностью, а также соединения с избирательным сродством к отдельным рецепторам цитокининов.

2. При сравнении лиганд-связывающих свойств 4-х рецепторов цитокининов: CRE1/АНК4, АНК3 арабидопсиса и ZmНК1, ZmНК2 кукурузы выявлены существенные различия между рецепторами по сродству к ряду природных и синтетических лигандов.

3. Установлено, что синтетическое соединение N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил) аденозин (БОМА) проявляет антицитокининовую активность, поскольку способно подавлять действие цитокининов, конкурируя с ними за сайт связывания на рецепторе CRE1/АНК4, но не вызывая трансдукции гормонального сигнала.

4. Разработана растительная модельная система для тестирования свойств индивидуальных рецепторов цитокининов с использованием мембран листьев растений табака, транзистентно экспрессирующих трансгены рецепторов.

5. Охарактеризована кинетика связывания цитокинина рецепторами АНК3 и ZmНК1 в составе растительных мембран; установлено, что оптимальное связывание цитокинина рецептором АНК3 происходит при рН 6,5-9,5 (23°C), тогда как ZmНК1 отличается квазилинейным увеличением связывания цитокинина с повышением рН от 5 до 9,5.

6. Установлено, что в случае цитокининов-оснований лигандная специфичность рецепторов АНК3 и ZmНК1 в растительной (гомологичной) модельной системе не отличается от лигандной специфичности в бактериальных (гетерологичных) модельных системах. Показано, что рибозиды цитокининов значительно хуже связываются рецепторами в гомологичной модельной системе, чем в гетерологичных системах.

7. Методом ПЦР получены варианты рецепторов кукурузы ZmНК1 с точечными мутациями в CHASE-домене. Установлено, что точечные мутации отдельных аминокислот влияют на лиганд-связывающие свойства рецептора, повышая его сродство к лигандам (P190L, E236K, L238F), а также изменяя лигандную специфичность рецептора.



8. Результаты работы показывают возможность избирательного воздействия на индивидуальные рецепторы цитокининов *in planta* путем подбора соответствующих лигандов, а также изменения лиганд-связывающих свойств рецепторов путем точечных мутаций CHASE-домена.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kolyachkina S.V., Tararov V.I., Alexeev C.S., **Krivosheev D.M.**, Romanov G.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Inshakov A.N., Mikhailov S.N. N<sup>6</sup>-substituted adenosines. Cytokinin and antitumor activities // Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 2011, V. 76, N. 11, pp. 1361-1378.
2. **Кривошеев Д.М.**, Колячкина С.В., Михайлов С.Н., Ванюшин Б.Ф., Романов Г.А. N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин – новый антицитокинин, антагонист для рецептора CRE1/АНК4 арабидопсиса // Доклады Академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология, 2012, Т. 444, № 6, стр. 687-690.
3. 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), стр. 34-48.
4. Романов Г.А., Ломин С.Н., **Кривошеев Д.М.**, Гетман И.А. Использование рецепторов цитокининов для поиска новых соединений с цитокининовой и антицитокининовой активностью // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 24-26 мая 2011 г., сборник статей, стр. 809-814.
5. Колячкина С.В., Алексеев К.С., **Кривошеев Д.М.** Получение N<sup>6</sup>-замещенных аденозинов и их цитокининовая активность // XXIII Международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 7-10 февраля 2011 г., тезисы докладов и стендовых сообщений, стр. 125.
6. **Кривошеев Д.М.**, Колячкина С.В., Алексеев К.С., Ломин С.Н., Гетман И.А. Тараров В.И., Михайлов С.Н., Романов Г.А. Поиск новых соединений с цитокининовой активностью на основе синтетических N<sup>6</sup>-производных аденозина // Научно-практическая конференция "Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения", Новый Свет, Украина, 23-28 мая 2011 г., тезисы докладов, стр. 99.
7. 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 // 3-ий Международный симпозиум "Клеточная сигнализация у растений", Казань, 28 июня - 1 июля 2011 г., тезисы докладов, стр. 154-155.

8. **Кривошеев Д.М.**, Колячкина С.В., Алексеев К.С., Ломин С.Н., Гетман И.А., Тараров В.И., Михайлов С.Н., Романов Г.А. Анализ цитокининовой активности синтетических N<sup>6</sup>-производных аденозина // VII Съезд Общества физиологов растений России "Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий", Нижний Новгород, 4-10 июля 2011 г., материалы докладов, часть 1, стр. 383.
9. **Кривошеев Д.М.**, Колячкина С.В., Алексеев К.С., Гетман И.А., Ломин С.Н., Тараров В.И., Михайлов С.Н., Романов Г.А. (2011) Новые синтетические N<sup>6</sup>-производные аденозина с цитокининовой активностью // VII-я Международная научная конференция "Регуляция роста, развития и продуктивности растений", Минск, Беларусь, 26-28 октября 2011 г., материалы конференции, стр. 114.
10. Chudalayandi S., Moss-Taylor, L., Cahill J., Petefish A., **Krivosheev D.**, Lomin S., Romanov G., Muszynski M. Genetic and Biochemical analysis of *Hairy Sheath Frayed* mutation // 54<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conference, Portland, USA, 15-18 March, 2012, Program and Abstracts, p. 64.
11. **Кривошеев Д.М.**, Колячкина С.В., Михайлов С.Н., Тараров В.И., Романов Г.А. N<sup>6</sup>-(бензилоксиметил)аденозин – новое соединение с антицитокининовой активностью // Международная конференция «Биология – наука XXI века», Москва, 24 мая 2012 г., материалы конференции, стр. 428-430.
12. **Krivosheev D.M.**, Getman I.A., Romanov G.A. N6-(benzyloxymethyl)adenosine is an antagonist of cytokinin receptor CRE1/AHK4 of Arabidopsis // 3<sup>rd</sup> International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, Lviv, Ukraine 17-23 September, 2012, Abstracts, p. 26.
13. 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 maize based on structural peculiarities of their CHASE domains // 3<sup>rd</sup> International Symposium Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design, Lviv, Ukraine, 17-23 September, 2012, Abstracts, p. 54.
14. **Кривошеев Д.М.**, Ломин С.Н., Романов Г.А. Разработка модельной системы для изучения лиганд-связывающих свойств индивидуальных рецепторов цитокининов в составе растительных мембран на основе трансгенных растений табака // IV Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, 19-23 ноября 2012 г. (принято в печать)
15. 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, 19-23 ноября 2012 г. (принято в печать)