

*На правах рукописи*



**Ломин Сергей Николаевич**

**СВОЙСТВА, ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И  
ЭВОЛЮЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ  
ЦИТОКИНИНОВ**

1.5.21. – физиология и биохимия растений

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

Москва – 2022

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

**Научный консультант:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Романов Георгий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Медведев Сергей Семенович,**

доктор биологических наук, профессор, кафедра физиологии и биохимии растений Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Вартапетян Андрей Борисович,**

доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ.

**Рубцов Петр Михайлович,**

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук».

**Ведущая организация:** Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Защита состоится «15» ноября 2022 г. в \_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва и на сайте ifr@ippras.ru

**Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2022 г.**

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины (ЦК) являются классическими фитогормонами широкого спектра действия. Они вовлечены в такие процессы, как стимуляция клеточного деления, клеточная пролиферация в апикальной меристеме побега, ингибирование роста корней, клубнеобразование, формирование клубеньков у бобовых; кроме того, ЦК участвуют в защите растений от биотических и абиотических неблагоприятных факторов и выполняют еще целый ряд функций в растительном организме (Romanov, 2009; Kieber & Schaller, 2014; Веселов и др., 2017). Сигналинг ЦК осуществляется по His-Asp пути, с использованием т.н. системы многоступенчатого фосфопереноса (MSP) – модифицированной прокариотической двухкомпонентной системы (TCS). Сигнальная система цитокининов состоит из трех основных типов белков: рецепторов ЦК – сенсорных гистидинкиназ (НК), фосфотрансмиттеров (HPt) и регуляторов ответа типа-B (RR-B).

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

Исследования лиганд-связывающих свойств рецепторов были выполнены при экспрессии индивидуальных рецепторов в гетерологичных системах (Romanov et al., 2005; 2006). Это не дает абсолютной гарантии сохранения выявленных особенностей при работе этих белков в растении. Соответственно, требовалось провести исследования в гомологичной системе, максимально приближенной к естественной. К тому же имелось некоторое противоречие в особенностях восприятия цитокининового сигнала. Так, в гетерологичных системах рецепторы активно реагировали на рибозиды цитокининов (Spichal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004; Romanov et al., 2006). Но при этом при исследовании синтеза цитокининов получены свидетельства в пользу ключевой роли цитокининовых оснований (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009).

Не было ясности в местоположении внутриклеточного сайта восприятия цитокининового сигнала. Ряд исследований указывал на локализацию рецепторов в плазматической мембране (Müller & Sheen, 2001; Kim et al., 2006). В то же время результаты анализа лиганд-связывающих свойств (рН-зависимость) указывали скорее на

внутриклеточную локализацию (Romanov et al., 2005; 2006). При этом рецепторы этилена, другие гистидинкиназные сенсорные белки локализованы в клетке в эндоплазматическом ретикулуме (Chen et al., 2001, 2003). Тем самым, для выяснения данного вопроса требовались специальные эксперименты. Рецепторы для своего функционирования должны образовывать димеры. В принципе могут образовываться как гомо- так и гетеродимеры. Знание об этом должно заметно дополнить картину восприятия сигнала.

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

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

#### **Цель и задачи исследования**

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

Задачи:

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

#### **Научная новизна работы**

Впервые исследована структура сенсорных модулей рецепторов цитокининов из различных групп. В частности, выявлен высококонсервативный участок, предшествующий CHASE-домену. Доказано, что рецепторы с высокой аффинностью взаимодействуют только с основаниями цитокининов. По лигандной специфичности рецепторы образуют группы, которые хорошо соответствуют их филогенетическому положению. Впервые были клонированы и изучены рецепторы картофеля. В работе установлено, что рецепторы в основном локализуются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и, в меньшей степени, в плазмалемме. Различными способами продемонстрирована

функциональность ЭР-пула рецепторов. Впервые охарактеризованы лиганд-связывающие свойства рецепторов из раннедивергировавших групп растений. При этом рецепторы из плауновидных (селагинеллы) и голосеменных (ели) были исследованы впервые. Установлено, что цитокинин-связывающими свойствами обладают только канонические рецепторы. С учетом этих данных была предложена обновленная версия эволюционного становления цитокининовой системы у наземных растений.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Объектом исследования являлись белки сигналинга цитокининов многих видов растений - *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Picea abies*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrium patens*. Цитокинины являются одними из важнейших регуляторов клубнеобразования у картофеля на разных стадиях и факторами урожайности у кукурузы. В частности, цитокинины являются прямыми позитивными регуляторами клубнеобразования на стадиях индукции, инициации образования клубней и их прорастания. Это делает изучение молекулярных механизмов цитокининового сигналинга не только важной задачей фундаментальной науки, но и открывает перспективы использования полученных знаний в прикладных областях биологии, таких как картофелеводство и выращивание злаковых культур.

### **Методология диссертационного исследования**

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

### **Положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- На основе комплексного анализа субклеточной локализации рецепторов цитокининов арабидопсиса, картофеля и кукурузы установлено, что рецепторы цитокининов преимущественно локализованы в мембранах эндоплазматического

ретикулума, а не плазмалеммы. Среди органелл митохондрии и хлоропласты цитокинины не связывают, что предполагает отсутствие в них рецепторов цитокининов.

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

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

- Филогенетический анализ рецепторов всех доступных отделов высших растений показал, что разделение на группы НК2/3 и НК4 существует только у семенных растений. У эволюционно более древних таксонов рецепторы образуют свои специфичные группы.

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

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

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

### **Личный вклад соискателя**

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

### **Степень достоверности работы**

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

### **Апробация результатов**

Результаты работы были представлены на целом ряде конференций:

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

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

International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology, Москва, 2014 г.

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

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

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

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

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

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

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

### **Связь с научными программами**

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

Исследования автора поддержаны грантами РФФИ: № 12-04-33282 «Регуляторная система цитокининов: исследование рецепции и инициации внутриклеточной трансдукции сигнала» (руководитель), № 14-04-01714 «Цитокининовая сигнальная система и ее участие в адаптивных реакциях растений» (исполнитель), № 16-04-01502



«Исследование эволюционного становления системы восприятия цитокининового сигнала у высших растений» (руководитель), № 16-34-01065 «Структурные особенности взаимодействующих белков системы трансдукции цитокининового сигнала» (исполнитель), 19-04-01106 «Цитокининовая система голосеменных растений» (руководитель), № 20-04-00797 «Исследование взаимозависимости сигналинга цитокининов и pH внутренней среды растительной клетки» (исполнитель), а также грантами РФФИ: № 14-14-01095 «Молекулярные основы гормональной регуляции морфогенеза, продуктивности и устойчивости растений картофеля» (исполнитель), № 17-74-20181 «Исследование эндогенных систем регуляции клубнеобразования с целью повышения продуктивности картофеля» (руководитель).

### **Публикации**

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

### **Структура диссертации**

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

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Экспериментальные методы**

#### **Молекулярно-генетические методы**

Кодирующую последовательность цитокининового рецептора *АНК4/CRE1* (*At2g01830.1*) амплифицировали методом ПЦР с использованием библиотеки кДНК *Arabidopsis thaliana* C24 и клонировали в GATEWAY Entry vector pDONR<sup>TM</sup>201 с помощью реакции рекомбинации BP (Invitrogen). Кодирующая последовательность *АНК3* (*At1g27320.1*) была амплифицирована с помощью ПЦР с обратной транскрипцией на общей кДНК из РНК, выделенной из листьев арабидопсиса экотипа Columbia, и клонирована в вектор pDONR<sup>TM</sup>222. *АНК2* (*At5g35750.1*) амплифицировали со стоп-кодоном из геномной ДНК бактериальной искусственной хромосомы клона МХН1 (Liu et al., 1995) и клонировали в pDONR<sup>TM</sup>221. Промоторы были клонированы в вектор

pDONR<sup>TM</sup>P4-P1R. *АНК2* и *АНК3* были соединены на 3'-конце с последовательностью, кодирующей 4× Мус-тэг, а сами гены были поставлены под контроль их собственных промоторов. Все три фрагмента (промотор, ген и тэг) были перенесены в целевой вектор pB7m34GW (Karimi et al., 2005) для получения *P<sub>АНК2</sub>:АНК2-Мус* и *P<sub>АНК3</sub>:АНК3-Мус*.

Для исследований транзиентной экспрессии GFP в табаке (*Nicotiana benthamiana*), *АНК3* и *CRE1/АНК4* были переклонированы в целевые векторы pB7FWG2 и pB7WGF2 (Karimi et al., 2002), где их целевые белковые последовательности слиты с GFP на С- и N-концах, соответственно, и находились под контролем конститутивного промотора 35S. Геномный фрагмент *АНК2* был также амплифицирован без стоп-кодона и затем клонирован в векторы pSPYNE-35S и pSPYCE-35S (Walter et al., 2004), где он был соединен с N- и С-концевыми фрагментами YFP, соответственно, на С-конце и использовался для BiFC анализа.

Для создания экспрессионного вектора pB7FWG2-ZmНК1 последовательность *АНК3* была удалена из pB7FWG2-АНК3 в сайтах *BcuI/EcoRI*. Кодированная область ZmНК1 была амплифицирована методом ПЦР из вектора pIN3A3(ΔЕН)-ZmНК1 и лигирована в вектор pB7FWG2.

*AHP1*, *AHP2*, *AHP3* были амплифицированы методом ПЦР из кДНК *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и pDEST<sup>TM</sup>15-AHP2 (Dortay et al. 2006) и лигированы в pSPYNE-35S и pSPYCE-35S. Для экспрессии *AHP* в *Escherichia coli* гены *AHP1* и *AHP3* были лигированы в pDEST<sup>TM</sup>15 (Invitrogen), заменив *AHP2* в pDEST<sup>TM</sup>15-AHP2. pDEST<sup>TM</sup>15-AHP1, pDEST<sup>TM</sup>15-AHP2 и pDEST<sup>TM</sup>15-AHP3 были использованы для трансформации *E. coli* (штамм *BL21(DE3)pLysE*).

Выделение РНК из растений ели *Picea abies* проводили в соответствии с методом (Kolosova et al., 2004) с некоторыми изменениями (Pashkovskiy et al., 2019).

кДНК мха *P. patens* PpCHK1-3 были любезно предоставлены (von Schwartzenberg et al., 2016; Gruhn et al., 2014). Последовательности ДНК, кодирующие сенсорные модули со смежными трансмембранными доменами (SM + TM) из генов *CHK PpCHK3*, *PaCHK1* и *PaCHK2*, были амплифицированы с использованием соответствующих пар праймеров. ДНК-последовательности SM + TM предполагаемых рецепторов *PpCHK4*, *SmCHK4a* и *SmCHK6* были синтезированы фирмой «Евроген» (Москва, Россия) и амплифицированы в двухстадийной ПЦР. Кодированные последовательности были перенесены путем рекомбинации *in vitro* в целевые векторы pK7WGF2 (PpCHK1 и 2) и pB7FWG2 (все остальные); в этих конструкциях репортерный ген *GFP* был слит с геном *CHK* на его 5'-или 3'-конце, соответственно.

### Экспрессия рецепторов

Выделение бактериальных сферопластов после индукции экспрессии генов проводили с применением лизоцима в концентрации 0.2 мг/мл лизоцима и в присутствии

4 мМ ЭДТА (рН 7.4). Осадок сферопластов повторно ресуспендировали в 35 мл 50 мМ MES-КОН (рН 7), 150 мМ NaCl, 32 мМ KCl и 27 мМ NH<sub>4</sub>Cl для использования в экспериментах по связыванию.

Транзиентную трансформацию листьев табака (*Nicotiana benthamiana*) проводили согласно Sparkes et al. (2006). Растения *N. benthamiana* выращивали в почве при температуре 25°C в условиях длинного дня (16 ч света/8 ч темноты). Использовали растения табака в возрасте 5-6 недель. Для инфильтрации листьев табака использовали следующий набор бактериальных суспензий: целевая конструкция (OD600 ~0,7) и p19 (OD600 ~1,0) для анализа фосфотранфера АНК-АНР; pSPYNE-35S-АНК/ АНР (OD600 ~0. 7), pSPYCE-35S-АНК/АНР (OD600 ~0.7) и штамм p19 (OD600 ~1.0) для бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC); и *P<sub>АНК3</sub>:АНК3-Мус* (OD600 ~0.3) и p19 (OD600 ~0.1) для эксперимента защиты от протеазы. В качестве контроля локализации в ЭР некоторые эксперименты BiFC проводили в сочетании с маркером ЭР CD3-959 (WAK2-mCherry-HDEL) (Nelson et al. 2007). Экспрессию генов и взаимодействие соответствующих белков в BiFC определяли через 3-5 дней после инфильтрации с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) или с помощью инвертированного флуоресцентного конфокального микроскопа Leica DMI 6000 CS, оснащенного блоком лазерного сканирования Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) и работающего с прикладным программным обеспечением Leica.

### Получение мембранных фракций

Выделение микросомальной фракции растительных мембран проводили дифференциальным центрифугированием при 10000 g для удаления органелл, а затем центрифугированием при 100000 g микросомальные мембраны осаждались из супернатанта.

Разделение микросомальных мембран на фракции плазмалеммы и эндомембран проводили с помощью водной полимерной двухфазной системы с применением декстрана 500000 и полиэтиленгликоля 3350. Концентрации реагента варьировали в зависимости от объекта в диапазоне 5.8%-6.2%.

Для более детального фракционирования применяли разделение в непрерывном градиенте плотности сахарозы 20%-50% в присутствии и в отсутствие ионов магния. При отсутствии магния рибосомы отделяются от эндоплазматического ретикулума, что приводит к смещению ЭР в область более низких плотностей в градиенте. Этот диагностический признак (ЭР shift) использовался для детализации локализации рецепторов при сопоставлении с локализацией мембранных маркеров.

Митохондриальные фракции получали из клеток кукурузы по методу Douce et al. (1972) и da Silva et al. (2001) при центрифугировании в ступенчатом градиенте сахарозы.

Фракция хлоропластов была получена из клеток кукурузы по методу Gualberto et al. (1995) при центрифугировании в градиенте перколла. Ядерная фракция была получена из клеток кукурузы по методу Saxena et al. (1985) при центрифугировании в градиенте перколла.

### Радиолигандный метод

Эксперименты по связыванию проводили при 0-4 °С и рН 7.4. Высокомеченый [2-<sup>3</sup>H]транс-зеатин ([<sup>3</sup>H]tZ, 851 ГБк ммоль<sup>-1</sup>, радиохимическая чистота >99%) был получен из Института экспериментальной ботаники (Прага, Чешская Республика). Немеченые цитокинины были произведены компанией Olchemim (Оломоуц, <http://www.olchemim.cz>). Для одной пробы использовали 2,6 пмоль [<sup>3</sup>H]tZ. Аликвоту 750 мкл суспензии сферопластов или мембран (не менее 25 мкг белка в PBS) смешивали с 2.5 мкл меченого tZ, с 500-кратным избытком немеченого tZ или без него для определения неспецифического (NS) и тотального (TB) связывания, соответственно (Romanov et al., 2005). Специфическое связывание (SB) рассчитывали по формуле SB = TB - NS. Кажущиеся значения  $K_D$  для связывания [<sup>3</sup>H]tZ с различными рецепторами были определены в экспериментах по насыщению связывания с последующим анализом данных в координатах Скэтчарда. Для изучения лигандной специфичности связывания различные немеченые цитокинины в разных концентрациях добавляли вместе с [<sup>3</sup>H]tZ. Пробы инкубировали на ледяной бане в течение 40 мин (сферопласты) или 60 мин (мембраны), затем центрифугировали при 16000 g при 4 °С в течение 3 мин (сферопласты) или 20 мин (мембраны). Митохондрии, хлоропласты и ядра центрифугировали при 16 000 g в течение 3 мин при 4 °С. Надосадочная жидкость полностью удалялась с помощью вакуумного насоса. К осадку добавляли 200 мкл 96% (v/v) этанола и экстрагировали в течение 16 ч при комнатной температуре в плотно закрытой пробирке. Радиоактивность спиртового экстракта измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика в течение 10 мин для каждой пробы в сцинтилляционном коктейле ACS-II (Amersham Bioscience). Исследования влияния рН на связывание гормонов проводили в среде, содержащей 150 mM NaCl, 32 mM KCl, 27 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM MgSO<sub>4</sub> и 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. рН корректировали с помощью 50 mM буферов Tris-HCl или MES-KOH, соответственно, приготовленных в той же среде.

### Анализ экспрессии генов

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественного ОТ-ПЦР.

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

### Иммуноблоттинг

Моноклональные антитела против рецептора кукурузы ZmHK1 получены против последовательности кДНК, кодирующей псевдоресиверный и ресиверный домены ZmHK1 (Ala651-Val974).

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

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

При работах по определению локализации рецепторов арабидопсиса тип мембраны был детектирован с помощью набора поликлональных кроличьих антител (Agrisera) против специфических маркеров: ViP2 люмена ЭР, маркера H<sup>+</sup>-АТФазы ПМ, маркера тонопласта  $\epsilon$ -субъединицы тонопластной H<sup>+</sup>-АТФазы, маркера митохондрий COXII и маркера аппарата Гольджи Arf1. Антитела использовали в разведениях 1:2000, 1:1000, 1:2000, 1:1000 и 1:1000, соответственно. Тилакоидные мембраны идентифицировали путем спектрофотометрического анализа содержания хлорофилла (Arnon, 1949). Идентификация мембран Гольджи была основана на измерении стимулированной Тритоном X-100 активности латентной УДФазы (Nagahashi & Nagahashi, 1982).

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

### **Эксперименты по фосфотрансферу АНК-АНР**

Эксперименты проводили согласно Mähönen et al. (2006) с изменениями. Гены *GST-AHP1*, *GST-AHP2*, *GST-AHP3* были экспрессированы в штамме *E. coli BL21(DE3) pLysE*. Когда плотность культуры бактерий достигала OD600 ~1, экспрессию трансгенов индуцировали добавлением 1 mM ИПТГ в течение 1 ч. Лизаты клеток получали соникацией, как в Verma et al. (2013), затем GST-АНР связывали с глутатион-агарозными бусами (аффинная хроматография) (Sigma-Aldrich) в течение 3 ч при встряхивании и 4°C. Бусы трижды промывали тем же буфером для лизиса. GST-АНР элюировали в 50 mM Трис-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 10% глицерина, 10 mM восстановленного L-глутатиона и 0.5 mM PMSF.

Цитокининовый рецептор АНК3 был транзистентно экспрессирован в листьях табака, трансформированных конструкцией pB7FWG2-АНК3-GFP. Через шесть дней листья растений проверяли на наличие флуоресценции GFP, и в положительном случае мембраны выделяли и фракционировали в ступенчатом градиенте сахарозы для получения фракций ЭР и ПМ. Гомогенат после фильтрации центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин при 4°C. На 1 мл 45% (w/v) наслаивали 1 мл 34% (w/v) сахарозы в экстракционном буфере. Супернатант (3 мл, 10% сахарозы) наслаивали на градиент, и мембраны разделяли ультрацентрифугированием при 100000 g в течение 30 мин при 4 °C. Фракции ЭР и ПМ были выделены из интерфаз 10%/34% и 34%/45%, соответственно. Чистоту мембранных фракций проверяли иммуноблоттингом с кроличьими поликлональными антителами (Agrisera) против маркера BiP2 (ЭР) и H<sup>+</sup>-АТФазы (ПМ), соответственно.

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

## Методы биоинформатики

### Поиск последовательностей рецепторов

Белковые последовательности цитокининовых рецепторов арабидопсиса были использованы для поиска соответствующих генов у других видов растений. Для этого

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

Для поиска функциональных доменов использовали ряд различных онлайн-сервисов: HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) PROSITE (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Программа ТМНММ2 на веб-сайте DTU Health Tech (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ТМНММ-2.0>) была использована для поиска трансмембранных доменов. Функциональные последовательности белков были проверены путем выравнивания с помощью алгоритма ClustalW в MEGA11 (Tamura et al., 2021; Tamura et al., 2006). Эволюционную историю определяли с помощью метода максимального правдоподобия (ML).

### **Структурное моделирование по гомологии**

Для поиска шаблонов при моделировании гомологии был использован веб-сервис SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014). Выравнивание последовательностей проводили с помощью NCBI BLAST (Altschul et al., 1990) и Clustal X 2.1 (Larkin et al., 2007). Моделирование белковых структур *A. thaliana* и *S. tuberosum* проводили в программе Modeller 9.20 (Sali & Blundell, 1993) с использованием класса automodel моделирования по гомологии.

### **Оптимизация, валидация и модификация структуры**

Фосфоакцепторные остатки были модифицированы в веб-сервере Vienna-PTM (Margreitter et al., 2013). Гистидины были фосфорилированы по атому N $\epsilon$ . Модификация проводилась на выбранных моделях до минимизации. Все лучшие модели были подвергнуты минимизации. Stereoхимическое качество моделей оценивали с помощью ProCheck (Laskowski et al., 1993), реализованного в веб-сервисах PDBsum (Laskowski et al., 2018), SA-web (Wiederstein & Sippl, 2007) и QMEAN server (Benkert et al., 2009).

### **Исследование свойств интерфейса**

Аланиновое сканирование проводили с помощью программы Rosetta, реализованной в Robetta (Kortemme et al., 2004) с настройками по умолчанию. Горячие точки (позиции, замена которых приводила к наибольшему изменению свободной энергии взаимодействия) были определены по значениям  $\Delta\Delta G$  образования комплекса после виртуальной замены одного аминокислотного остатка на аланин. Позиции с  $\Delta\Delta G > 2$

кДж/моль и более рассматривались как "горячие точки". Для изучения гидрофобности и электростатического потенциала интерфейсов были созданы 2D-карты с помощью сервиса MolSurfer (Gabdoulline et al., 2003).

### Белок-белковый докинг

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Структура сенсорной области рецепторов цитокининов

Сенсорный домен CHASE (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular (Anantharaman & Aravind 2001; Mougel & Zhulin 2001) служит для связывания цитокинина. После открытия рецепторов цитокининов была создана 3D модель сенсорного модуля (Pas et al., 2004). Модель оказалась в целом неверной, но в ней впервые прозвучало название PAS-домена. После этого роль CHASE домена была подтверждена экспериментально на примере рецептора CRE1/АНК4 с помощью мутаций и прямого связывания меченого цитокинина (Heyl et al., 2007). Кристаллическая структура АНК4 подтвердила эти выводы (Hothorn et al., 2011). Структурные данные показывают, что N-конец сенсорного модуля образует длинную  $\alpha$ -спираль ( $\alpha 1$ ), которая является каркасом для двух отдельных субдоменов, соединенных спиральным линкером (рис. 1). Hothorn et al. (2011) аннотировали эти субдомены как PAS (Per-Arnt-Sim)-подобные. N-концевая часть спирали  $\alpha 1$  ковалентно связана дисульфидным мостиком с цепью  $\beta 12$  проксимально к C-концу (рис. 1). Как и их бактериальные гомологи, сенсорные модули CRE1/АНК4 кристаллизуются в виде гомодимеров, причем спирали  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  образуют интерфейс димеризации.

Для распознавания цитокинина CRE1/АНК4 использует N-концевой PAS-субдомен, который находится дистальнее от мембраны. Этот субдомен является обязательной составной частью всего CHASE-домена (Pas et al. 2004). Лиганд-связывающая полость рецептора полностью охватывает лиганд, как показано для различных цитокининов: *транс*-зеатина (рис. 1), изопентениладенина, *N6*-бензиладенина и кинетина. Структуры сенсорного домена в комплексе с различными цитокининами очень похожи. Нижняя часть сайта связывания цитокинина образована центральным  $\beta$ -листом субдомена PAS (цепи  $\beta 7$  и  $\beta 8$ ) и выстлана небольшими гидрофобными аминокислотными остатками. Замена этих остатков на более объемные аминокислоты предотвращает связывание



цитокинина, тем самым инактивируя рецептор. Как раз это происходит в случае мутации *wol*, когда небольшой остаток треонина 278 заменен на изолейцин, имеющий более объемную боковую цепь. Гидрофобный "потолок" сайта связывания образован петлями  $\beta 3$ - $\beta 4$  и  $\beta 4$ - $\alpha 4$ .

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

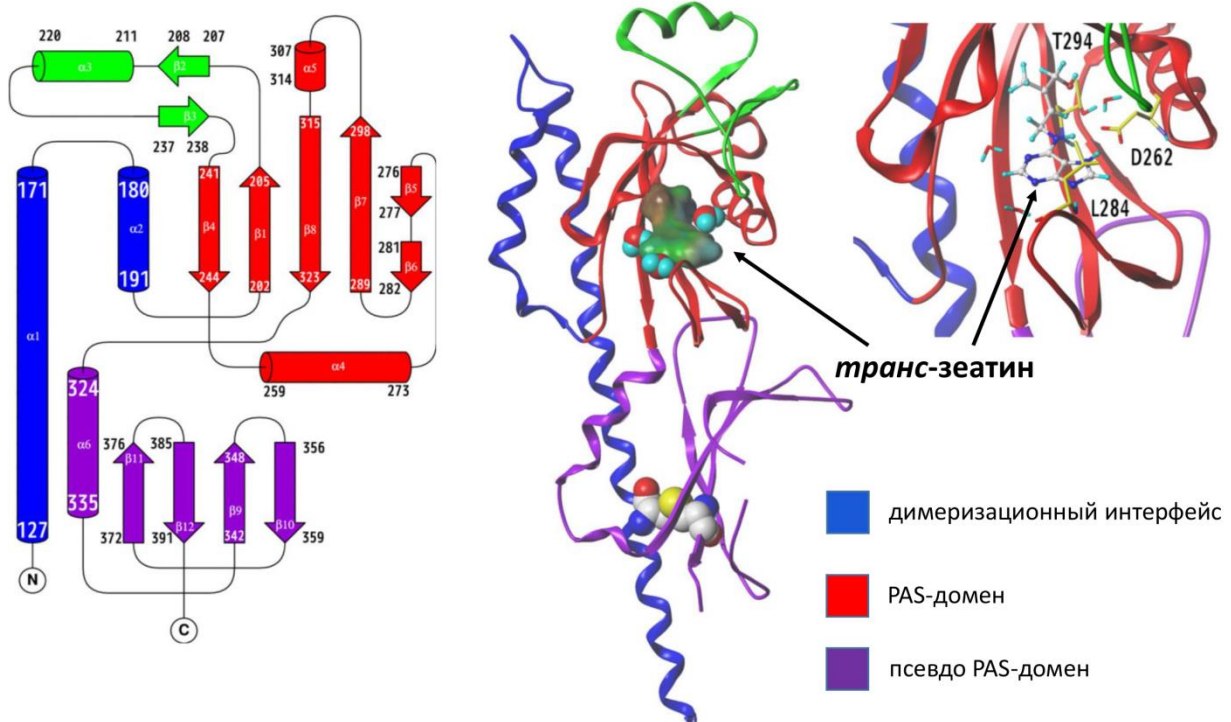


Рис. 1. Трехмерная структура сенсорной области рецептора арабидопсиса АНК4.

Однако эти работы были выполнены на рецепторах арабидопсиса, в основном на АНК4. Было неясно, каковы общие закономерности строения и расположения сенсорного модуля рецепторов, насколько полно рецепторы арабидопсиса, в частности АНК4, представляют это семейство белков. С целью прояснить этот вопрос мы предприняли изучение рецепторов методами биоинформатики на базе секвенированных геномов растений.

Было проанализировано более 100 рецепторов цитокининов. Филогенетический анализ с использованием доступных геномов растений показал, что растительные CHASE-содержащие гистидинкиназы имеют монофилетическое происхождение, а число этих рецепторов видоспецифично, увеличиваясь от 2-3 у плауновидных (*Selaginella*) и

мхов (*Physcomitrium*) до как минимум 7 (кукуруза) или 8 (соя) у покрытосеменных. CHASE-содержащие рецепторы цветковых растений разделяются на три отдельные ветви филогенетического древа, соответствующие цитокининовым рецепторам CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2 арабидопсиса (Pils and Heyl 2009; Lomin et al. 2012) (рис. 2). Увеличение количества рецепторов цитокининов, как считается сейчас, является следствием редупликаций генома, которые произошли в процессе формирования современных групп растений (Kaltenegger et al., 2018).

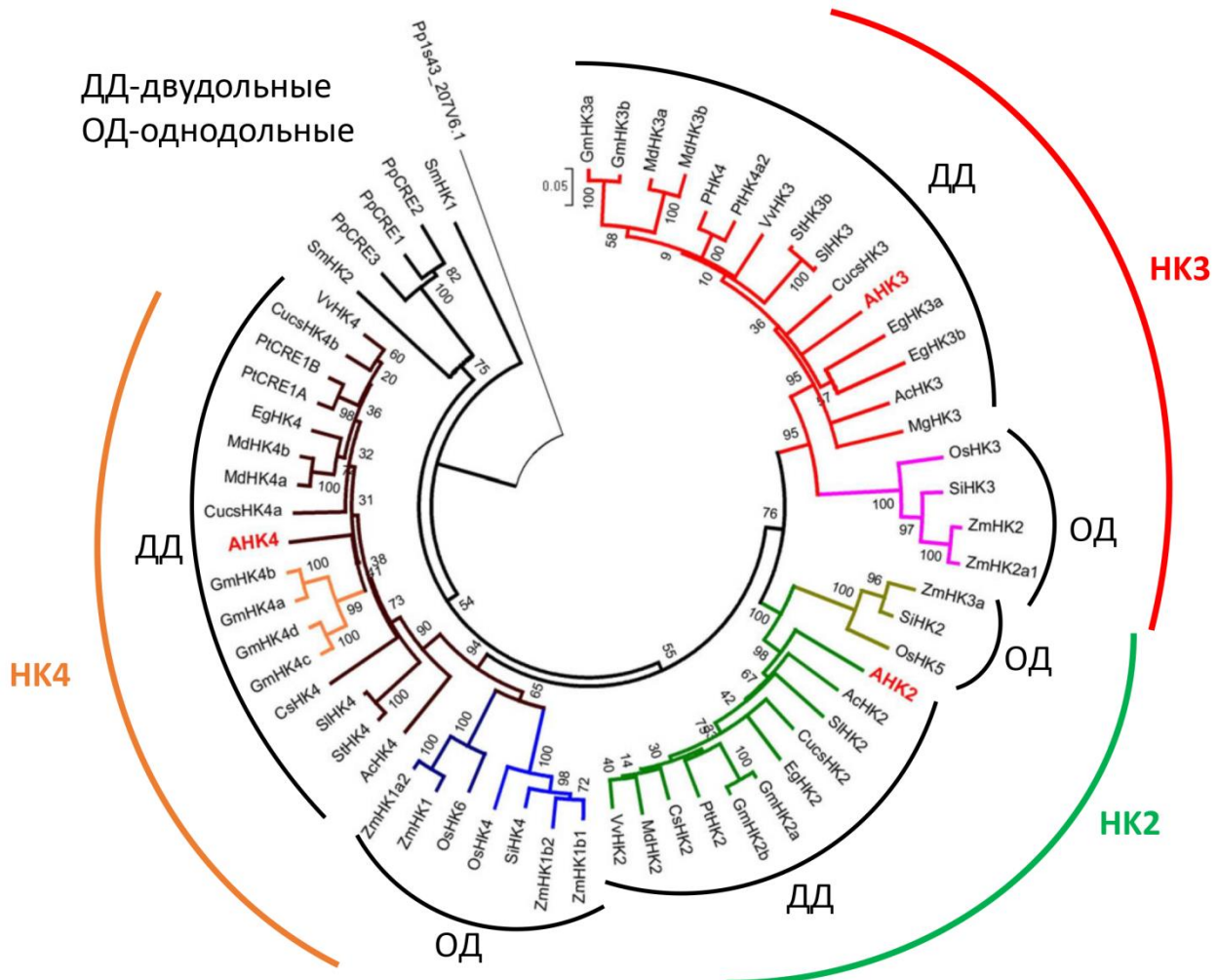


Рис.2. Разнообразие рецепторов цитокининов.

Как было установлено в нашей работе, в пределах одной ветви CHASE-домены довольно похожи; доля полностью консервативных аминокислот довольно высока: 34.2, 32.6 и 35.0% для АНК2-, АНК3- и CRE1/АНК4-ортологов, соответственно. Но если рассматривать весь набор цитокининовых рецепторов, то сходство резко снижается и составляет всего 8.9%.

Как уже упоминалось выше, растения довольно сильно различаются по количеству и свойствам CHASE-содержащих рецепторов. Ортолог CRE1/АНК4 дуплицирован в

*Fabaceae*; У сои идентифицировано четыре ортолога CRE1/АНК4 (по два в каждой группе дубликации). Остальные четыре рецептора принадлежат попарно к двум другим эволюционным ветвям. Однако у люцерны *Medicago truncatula* был идентифицирован только единственный ортолог CRE1/АНК4. У злаков группа АНК4 разделяется на две подгруппы, соответствующие рецепторам кукурузы ZmНК1a и ZmНК1b. В кукурузе по два рецептора принадлежат к каждой из этих подгрупп. При этом ортологов АНК3 – всего два (ZmНК2, 2a1), а АНК2 – один (ZmНК3a). Сорго (*Sorghum bicolor*) и *Brachypodium distachyon* имеют три рецептора, но, по всей видимости, не имеют ортологов АНК2 (такого как ZmНК3a у кукурузы). Таким образом, все известные геномы однодольных растений кодируют по крайней мере одного из представителей дублицированного ортолога CRE1/АНК4, которые присутствуют преимущественно в двух вариантах. Согласно эволюционному анализу, предполагаемая значимость ортологов рецепторов имеет следующий порядок: CRE1/АНК4>АНК3>АНК2.

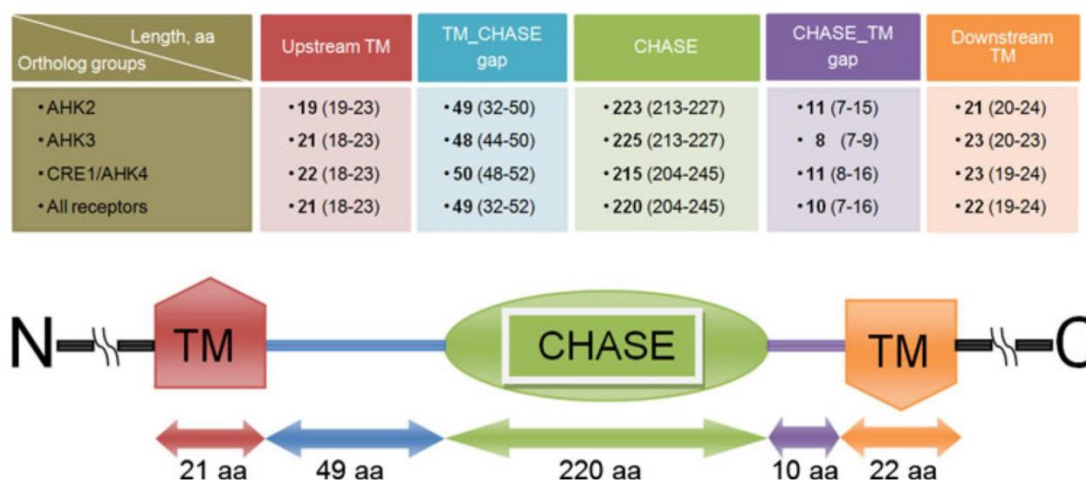


Рис. 3. Общая схема организации сенсорной части рецепторов цитокининов.

В нашей работе мы впервые провели анализ областей рецепторов цитокинина, окружающих CHASE-домен, включая фланкирующие трансмембранные домены. При этом были выявлены следующие закономерности (рис. 3). Размер N-концевых ТМ-доменов и С-концевых ТМ-доменов был оценен как 18-23 (среднее значение 21) и 19-24 (среднее значение 22) аминокислот, соответственно. Выравнивание трансмембранных последовательностей ортологов рецепторов по отдельности и в целом позволило выявить некоторые новые мотивы последовательностей. На рисунке 4 приведены логи последовательностей U-TM и D-TM спиралей, фланкирующих домен CHASE. Трансмембранные домены каждой группы ортологов имеют консервативные остатки, причем С-концевые ТМ-домены гораздо более консервативны, чем N-концевые. Хотя N-

концевые ТМ-домены из групп ортологов, особенно из ортологов АНК2- и АНК3, демонстрируют некоторые консервативные мотивы [(L/I)Lxx(F/G)xxxGxxxSxxxF в группе АНК2 и (L/V)(L/V)xxW(V/I)xxWxxx(S/A) xxx(F/L) в группе АНК3], мотив для всех рецепторов кажется в основном случайным – (L/V)xx(W/F)(V/I)xxxxxxxx(F/Y). В отличие от D-ТМ спирали, присутствующей в рецепторе всегда в единственном числе, количество U-ТМ варьировало от 1 до 4, причём не случайным образом, а зависело от группы рецепторов.

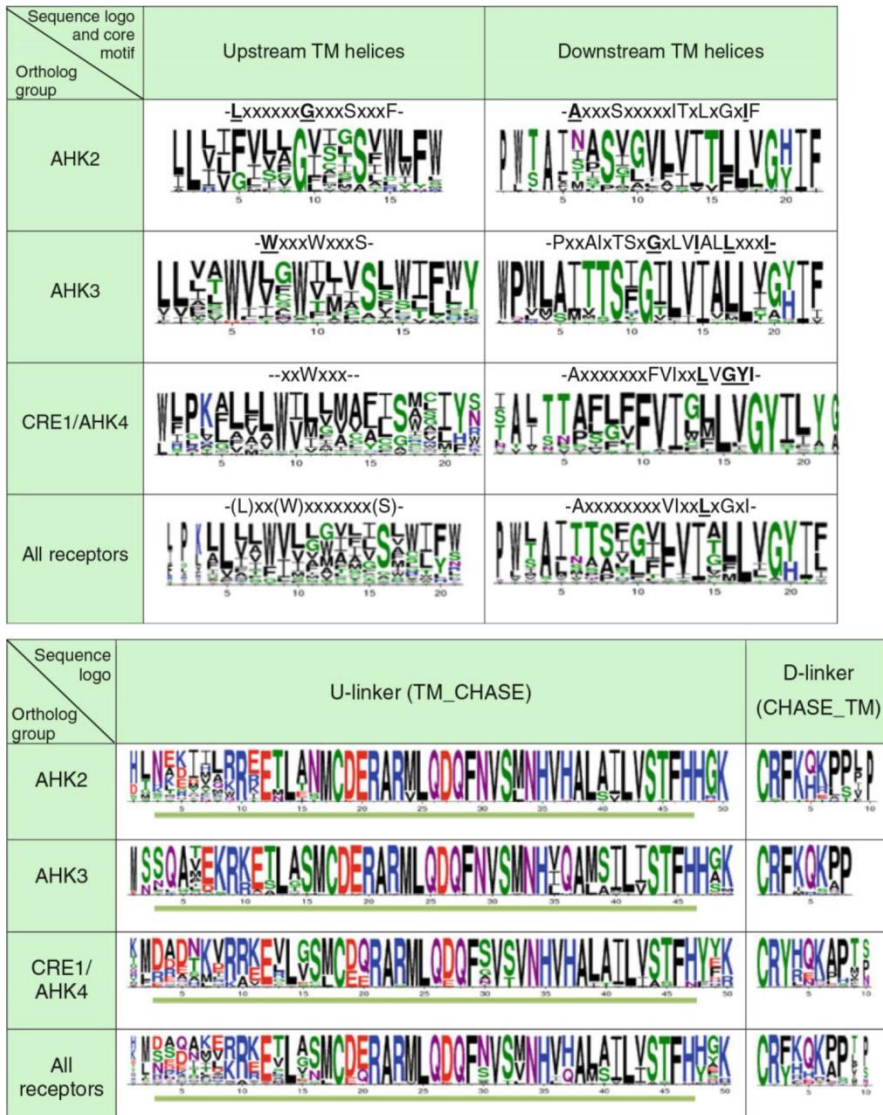


Рис. 4. Структура окрестностей CHASE-домена.

Почти во всех цитокининовых рецепторах CHASE-домены фланкированы с обеих сторон трансмембранными доменами. Эти гидрофобные области, по-видимому, важны для правильной субклеточной локализации, а также для внутримолекулярной передачи сигнала. Особенно важен трансмембранный домен с С-конца от домена CHASE, который, очевидно, является обязательным для цитокининовых рецепторов. Выявлен ряд мутаций

в этих нисходящих трансмембранных областях (D-TM), влияющих на трансдукцию сигнала. Некоторые мутации в D-TM-спирали CRE1/АНК4 были получены с помощью ПЦР: Gly435Cys, Phe436Ser и Met447Thr1 (Miwa et al. 2007). Эти мутации привели к появлению конститутивной гистидинкиназной активности в CRE1/АНК4, т.е. этот рецептор приобрел способность посылать сигнал независимо от того, присутствовали цитокинины в среде или нет. D-TM демонстрируют высокую степень консервативности последовательности. В отдельных группах ортологов 32-48 % остатков высоко (80-100 %) консервативны и представляют собой четкие мотивы, приводящие для всех рецепторов к основной консенсусной последовательности: Axhx(S/A)x(G/L)x(L/F)VIx(L/F)LxG(Y/H)I. Наличие консервативного мотива последовательности в домене D-TM подчеркивает его важную роль не только в закреплении на мембране, но и в передаче сигнала.

Расстояние между доменом CHASE и ближайшим трансмембранным доменом различно в зависимости от положения с N- или С-конца от CHASE-домана (рис. 3). Расстояние между CHASE и U-TM доменом соответствует (за очень редким исключением) примерно 50 аминокислотным остаткам. Очевидно, точная длина этой линкерной области важна для функции рецептора. Домены D-TM, как правило, расположены ближе к доменам CHASE, в большинстве случаев их разделяют всего 7-16 (среднее значение 10) аминокислот. В то время как все идентифицированные CHASE-содержащие гистидинкиназы растений обладают D-TM-доменами, рецепторов, лишенных U-TM-доменов, немного. Это касается ортологов АНК4 у могоара *Setaria italica* (SiНК4) и винограда *Vitis vinifera* (VvНК4), ортологов АНК2 у клещевины *Ricinus communis* (RcНК2) и маниока *M. esculenta* (MeНК2b). Отсутствие U-TM домена ставит под сомнение способность таких гистидинкиназ служить рецепторами цитокининов. Особенно сомнительно это для MeНК2b, где консервативные аминокислоты (Gly200, Ala202 и Ala204), ответственные за связывание гормона, отсутствуют в CHASE-домене. Для прояснения этой проблемы необходимы дальнейшие исследования отдельных цитокининовых рецепторов.

Выравнивание последовательностей, прилегающих к домену CHASE, выявило неожиданно высокий уровень консервативности последовательностей (рис. 4). В коротком (10 остатков) линкере (D-линкер) между доменом CHASE и доменом D-TM почти половина остатков высоко консервативна, что приводит к мотиву CR(F/Y)x(Q/H)K(P/A)P. Мотивы групп ортологов, особенно НК3 [(CRFKQK(P/A))], еще более консервативны. Консервативность левой части D-линкера можно объяснить тем, что она принадлежит к проксимальному PAS-подобному субдомену в связывающем модуле. Правая часть D-линкера, очевидно, участвует вместе с D-TM доменом в междоменной передаче сигнала. Последовательность левого линкера (U-линкер) между спиралью U-TM и доменом CHASE представляется чрезвычайно консервативной,

особенно ее правая часть, прилегающая к CHASE-домену (Рис. 4). Этот U-линкер содержит 13 полностью консервативных остатков из 50; их доля (26 %) значительно превышает аналогичную долю в домене CHASE (около 9 %). Еще 15 остатков сильно консервативны, и в целом эти консервативные остатки составляют основной мотив этой рецепторной области: x(R/K)RxExLx(S/N)MCD(E/Q)RARMLQDQF(N/S)VS(M/V)NHV(H/Q)A(L/M)(A/S)IL(V/I)STFH(H/Y)xK.

По данной части результатов можно сделать несколько выводов:

- В ходе проведенного биоинформатического анализа более сотни рецепторов цитокининов покрытосеменных для групп НК2, НК3, НК4 и всех СНК были определены среднестатистические размеры структурных компонентов типичного сенсорного модуля рецептора и установлены консенсусные последовательности его CHASE домена.
- В ходе анализа прилегающих к CHASE-домену последовательностей выявлена высококонсервативная область длиной около 40 аминокислот в форме  $\alpha$ -спирали, непосредственно предшествующей CHASE-домену и входящей в димеризационный интерфейс. Также обнаружена короткая (около 10 аминокислот) консервативная последовательность между С-концом CHASE домена и замыкающим сенсорный модуль "правым" (downstream) трансмембранным доменом.
- Число предшествующих CHASE-домену "левых" (upstream) трансмембранных доменов у рецепторов различается и зависит от группы. В группе НК2 их, как правило, 3-4, в группе НК4 – обычно 1, у ортологов НК3 однодольных – также 1, тогда как у ортологов двудольных – 2.

## 2. Лиганд-связывающие свойства рецепторов цитокининов

Цитокининовые рецепторы расположены в мембранах и вызывают специфическое связывание цитокининов (Romanov et al., 2005; 2006). Мы решили использовать эту способность для систематического изучения свойств цитокининовых рецепторов в растительной системе анализа.

Для этого сравнивали цитокинин-связывающую активность мембран, выделенных из листьев растений табака (*N. benthamiana*), которые были инфицированы или не инфицированы штаммом *Agrobacterium tumefaciens*, несущим кассету экспрессии рецептора в своей Т-ДНК. Экспрессию рецепторов контролировали по флуоресценции GFP. Мембраны, выделенные из листьев контрольных растений *N. benthamiana*, обладали лишь низкой активностью связывания цитокинина ( $[^3\text{H}]tZ$ ), которая увеличивалась примерно в 20 раз при транзientной экспрессии генов цитокининового рецептора АНК3 из арабидопсиса или ZmНК1 из кукурузы (рис. 5). Этот рост активности в основном соответствовал специфическому связыванию, что свидетельствует о высокой аффинности взаимодействия. Более 95%  $[^3\text{H}]tZ$ -специфического связывания было обусловлено чужеродными рецепторами. Такое значительное увеличение активности

связывания микросом по сравнению с фоновым значением позволило изучить свойства каждого отдельного рецептора при его транзientной экспрессии.

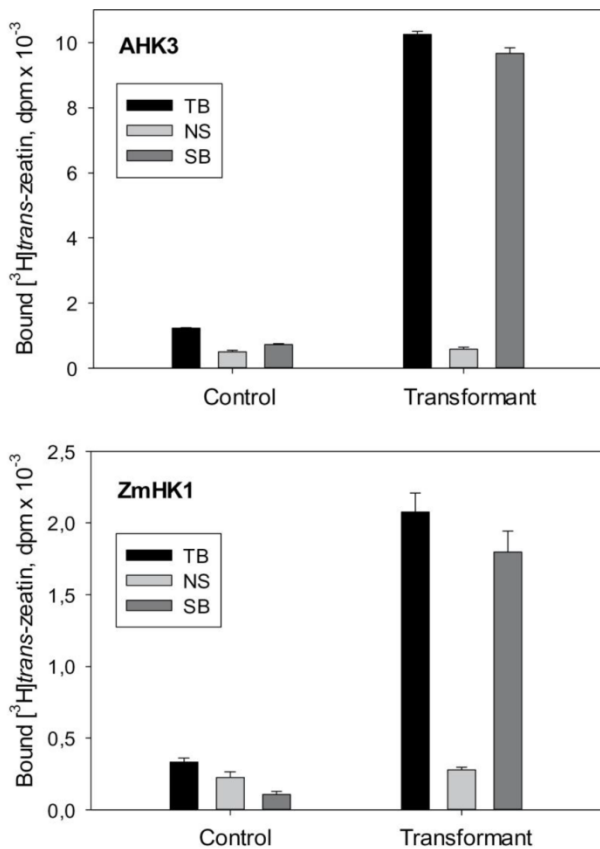


Рис. 5. Связывание цитокининов рецепторами в микросомальных мембранах из растений *Nicotiana benthamiana*, транзientно экспрессирующих гены цитокининовых рецепторов.

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

Кажущиеся константы сродства ( $K_A$ , константа ассоциации= $1/K_D$ , константа диссоциации) гормон-рецепторных комплексов были определены на основе экспериментов по насыщению с [<sup>3</sup>H]*tZ* и в конкурентных опытах с различными дозами немеченых цитокининов. Сравнение ANK3 и ZmHK1 показало (рис. 6, таблица 1), что рецепторы сильно различаются по абсолютному и относительному сродству к цитокининам, что соответствует ранее опубликованным данным (Spichal et al., 2004; Romanov et al., 2006; Lomin et al., 2011). Среди природных цитокининовых оснований наибольшим сродством к ANK3 обладал *tZ* ( $K_A=0.23$  нМ<sup>-1</sup>), за ним следовали

дигидрозеатин (DZ) и iP, тогда как BA и особенно cZ проявляли наименьшее сродство. Сродство АНК3 к tZ было в 375 раз сильнее по сравнению со сродством к cZ. Аденин практически не конкурировал с tZ за связывание с рецептором (рис. 6).

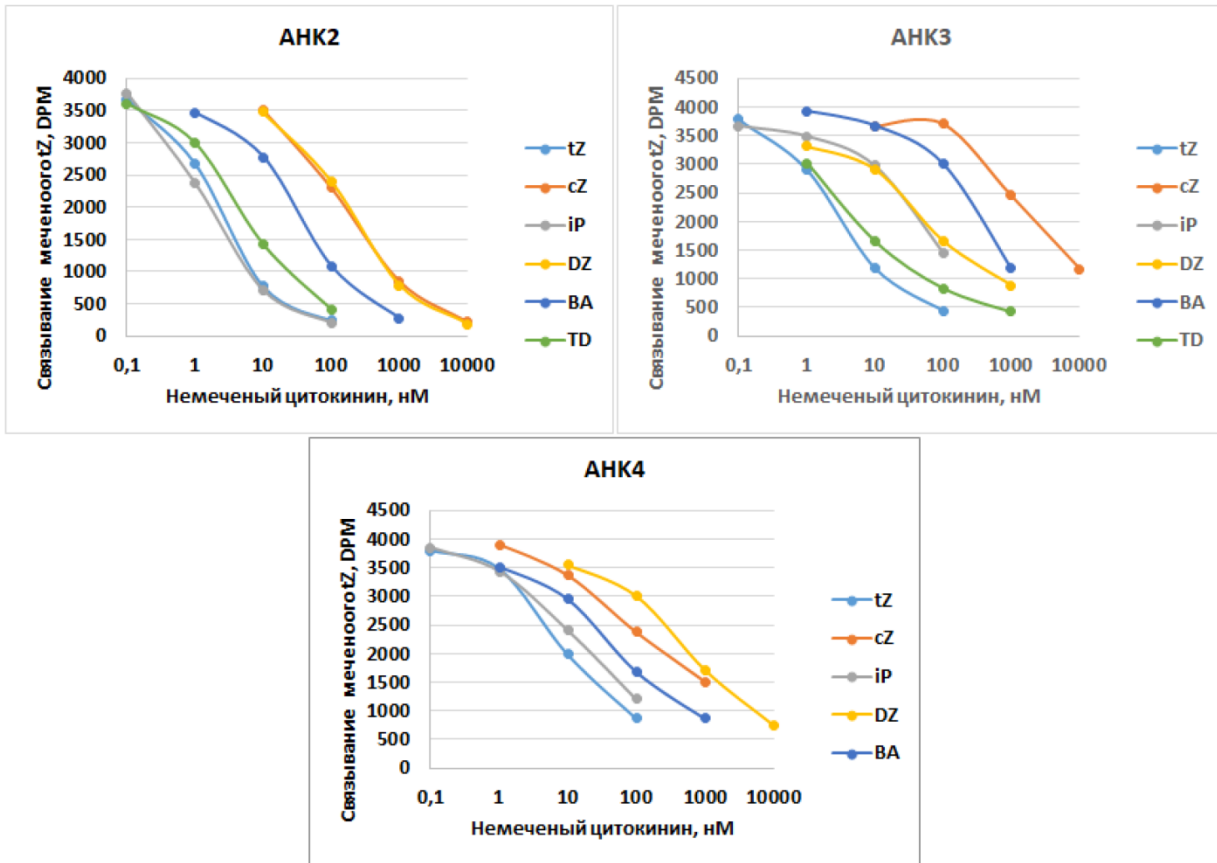


Рис.6. Лигандная специфичность цитокининовых рецепторов *Arabidopsis thaliana*. Эксперименты по вытеснению немечеными лигандами меченого тритием *транс*-зеатина

Что касается ZmHK1, то он обладает высоким сродством ко многим цитокининовым основаниям, кроме TD и DZ. iP ( $K_A=1.64 \text{ нМ}^{-1}$ ) и BA ( $K_A=0.82 \text{ нМ}^{-1}$ ) показали самое высокое сродство к этому рецептору в растительной системе, за ними следуют tZ и cZ со значениями  $K_A$ , близкими друг к другу, тогда как TD и DZ имели самое слабое сродство (таблица 1). Как и в случае с АНК3, аденин практически не взаимодействовал с рецептором ZmHK1.

Лигандная специфичность цитокининовых рецепторов оценивалась параллельно в системе гетерологичного анализа с использованием сферопластов *E. coli*. Сравнение свойств отдельных рецепторов в двух различных системах анализа показало, что каждый рецептор сохраняет типичный профиль лигандной специфичности по отношению к цитокининовым основаниям (рис. 6, таблица 1). Хотя абсолютные значения констант сродства варьировали, их общая картина была очень похожа в обеих тест-системах,



поэтому профили лигандной специфичности отдельных рецепторов стабильно воспроизводились независимо от используемой тест-системы.

Таблица 1. Константы диссоциации рецепторов цитокининов к различным лигандам

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

ND - не определялось.

Особый интерес представляет взаимодействие рецепторов с рибозидами цитокининов, поскольку имеющиеся в литературе данные противоречивы (Heul et al., 2012). Сродство двух повсеместно распространенных природных рибозидов, *транс*-зеатин рибозида (*tZR*) и изопентениладенозина (*iPR*), к рецепторам было проверено и сравнено со сродством соответствующих оснований (рис. 7). Конкурентные эксперименты со сферопластами *E. coli* подтвердили предыдущие данные (Romanov et al., 2005; 2006): рибозиды способны вытеснять меченый *tZ* из гормон-рецепторного комплекса достаточно эффективно и аналогично соответствующим цитокининовым основаниям. Однако в системе анализа растений рибозиды вели себя по-другому (рис. 7): в большинстве случаев рибозиды почти не конкурировали с меченым *tZ* за связывание с рецепторами. Единственным исключением было взаимодействие ZmHK1 с *iPR*, хотя сродство рецептора к лиганду было по крайней мере на два порядка ниже, чем в случае взаимодействия ZmHK1 с *iP*. Дополнительные эксперименты с АНК4 подтвердили неспособность цитокининовых рецепторов связывать *N*<sup>9</sup>-рибозилированные цитокинины с высокой аффинностью. Таким образом, в случае рибозидов цитокинина результаты экспериментов по связыванию сильно зависят от тест-системы.

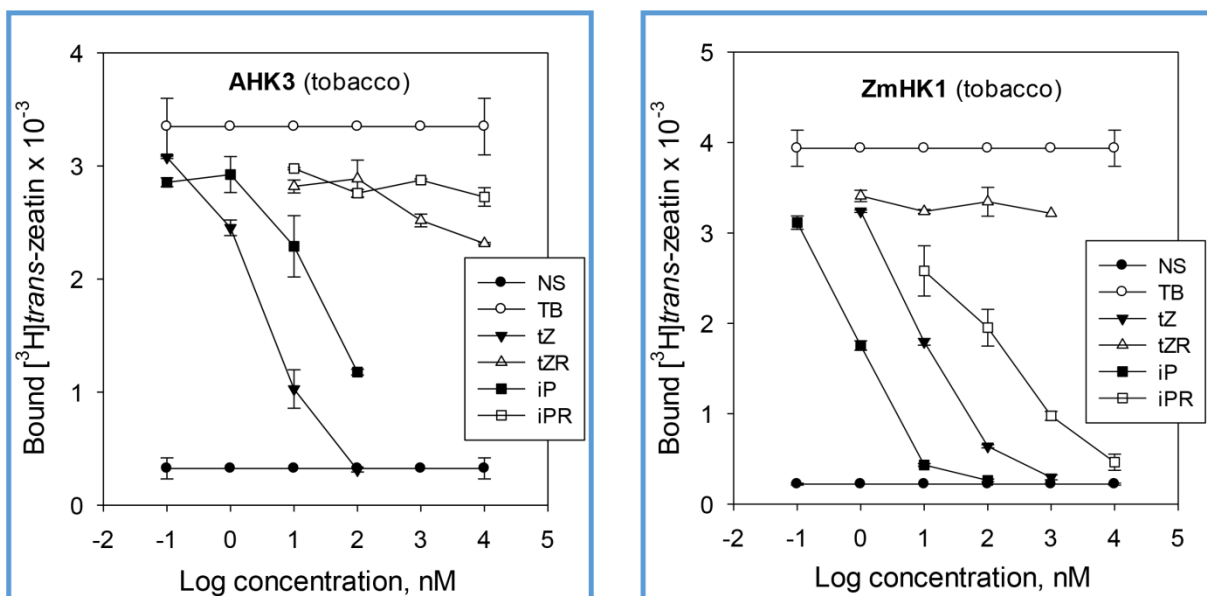


Рис.7. Рецепторы цитокининов специфичны к цитокининам-основаниям

Картофель является важнейшей сельскохозяйственной культурой. Интенсивность клубнеобразования у этого растения определяет его продуктивность. А цитокинины являются позитивными факторами клубнеобразования. В своей работе мы впервые клонировали и исследовали свойства рецепторов цитокининов этого растения. Оказалось, что по свойствам рецепторы картофеля довольно хорошо соотносятся с рецепторами модельного растения арабидопсиса, что говорит о достаточной консервативности в пределах класса двудольных растений. Некоторые отличия в лиганд-связывающих свойствах имелись только у рецептора StHK3, что свидетельствует все же и о некоторых вариациях между разными семействами.

Чтобы проверить, действительно ли особенности связывания гормонов будут также проявляться при работе рецепторов *in planta*, мы изучили активность каждого из трех рецепторов арабидопсиса по отдельности *in planta*, сосредоточившись на сравнении *tZ* и *iP* и используя два различных подхода. Мы анализировали активацию чувствительного к цитокинину репортерного гена *pARR5:GUS* (D'Agostino et al., 2000; Romanov et al., 2002). Все эксперименты были проведены на трех различных двойных мутантах по рецепторам, каждый из которых сохранял один рецептор, и в диком типе. Рисунок 8 показывает, что репортерный ген активировался у дикого типа как *iP*, так и *tZ*, с более низкой активностью *iP* в диапазоне низких концентраций. Растения, сохранившие только ANK2 или CRE1/ANK4, демонстрировали сравнимую активацию как с помощью *iP*, так и *tZ* (рис. 8).

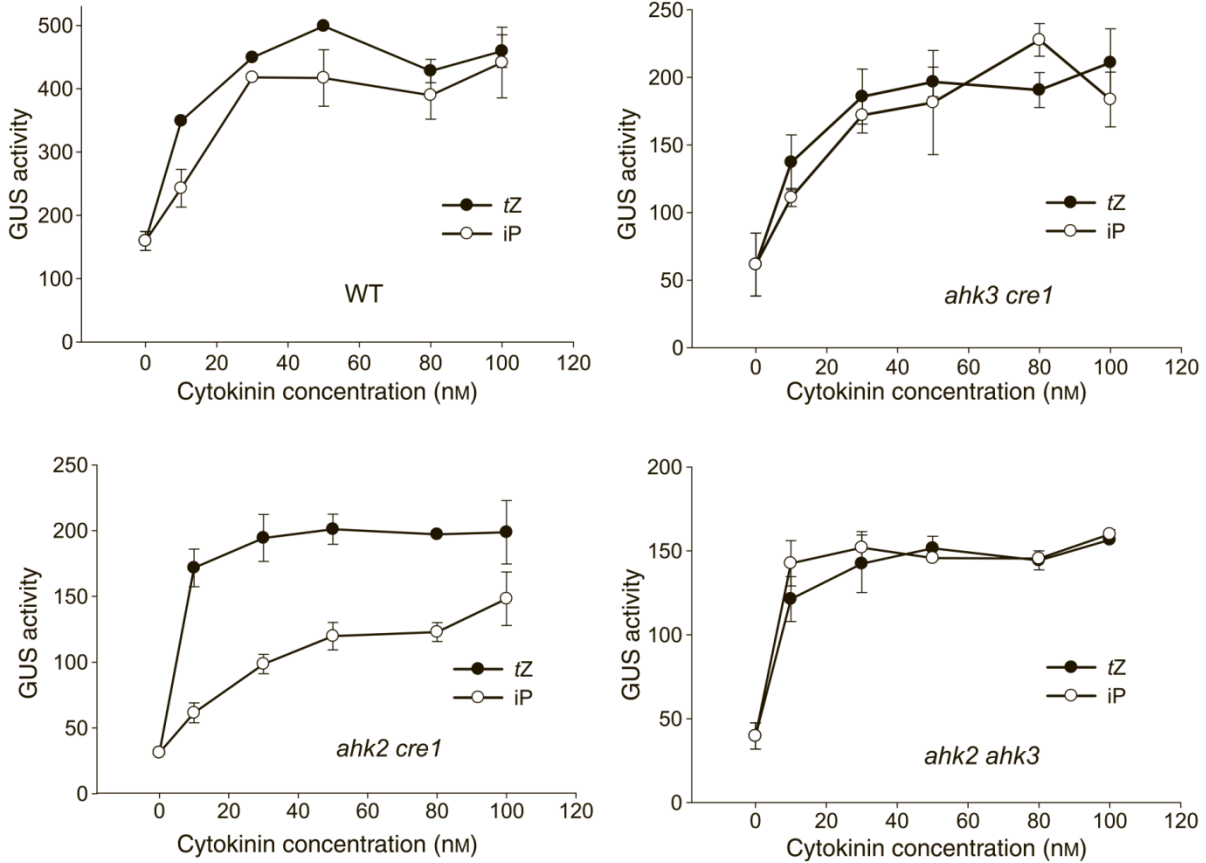


Рис.8. Активация рецепторов *in vivo*: рецептор АНК3 предпочитает *транс*-зеатин

Полная активация достигалась уже при 10 нМ для любого цитокинина в случае CRE1/АНК4, в то время как для АНК2 требовалось 40 нМ. АНК3 реагировал на *tZ* с такой же чувствительностью, как и CRE1/АНК4, однако для такого же ответа требовалась в несколько раз более высокая концентрация *iP* (рис. 8). Интересно отметить, что рецепторы обладают довольно сходной максимальной активностью (т.е. в диапазоне 150-200 нмоль 4-метилумбеллиферона (4-MU) на мг белка в час) и что сумма активностей отдельных рецепторов соответствует активности, измеренной для дикого типа. В целом, АНК2 показывает более низкую чувствительность *in planta* в этих экспериментах, чем два других рецептора, в то время как АНК3 показывает более низкую чувствительность к *iP* по сравнению с *tZ*.

Влияние pH на способность рецепторов АНК3, АНК4 и ZmНК1 связывать меченый *tZ* исследовали в интервале от pH 5 до pH 9.5. pH-зависимость связывания [<sup>3</sup>H]*tZ* с рецепторами показана на рис. 9. При pH 5 гормон-специфическое связывание АНК3 было незначительным (рис. 9), в то время как АНК4 и ZmНК1 демонстрировали слабое, но заметное связывание (рис. 9).

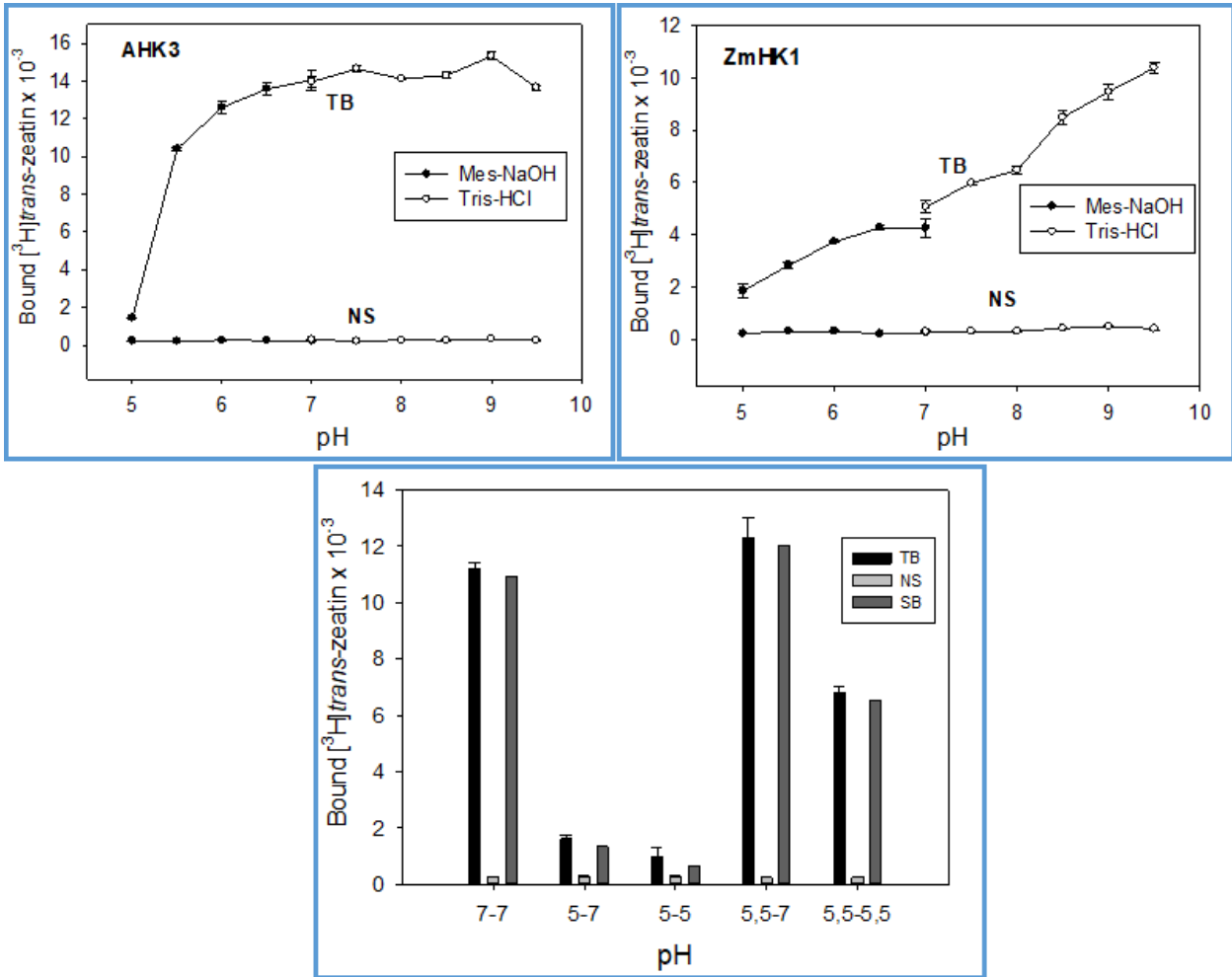


Рис.9. pH-зависимость связывания рецепторами меченого *транс*-зеатина

С увеличением pH наблюдался рост связывания гормона всеми рецепторами АНК, обычно достигающий плато при pH около 6.5-7. Было проверено, является ли влияние pH на гормон-рецепторное взаимодействие обратимым. Для этого часть образцов микросом после инкубации при низком pH переносили в среду с pH 7 и определяли уровень гормон-специфического связывания. Полученные данные показали, что снижение связывания при pH 5.5 было полностью обратимым, когда мембраны, содержащие АНК3, снова переносили в буфер pH 7 (рис. 9). Однако после инкубации при pH 5 гормон-связывающая способность не восстанавливалась при переносе в оптимальные условия pH (рис. 9). Это указывает на необратимую перестройку в лиганд-связывающем домене АНК3, вызванную инкубацией при pH 5.

Представляется общим правилом, что pH-оптимум активности белка близок к pH компартмента, в котором этот белок функционирует. Другими словами, белки, функционирующие в цитозоле/ядре/ЭР, должны иметь оптимум вблизи pH 7-8, тогда как белки, функционирующие в апопласте, должны иметь оптимум ниже pH 7, в основном в диапазоне pH 4.5-6. Это правило можно использовать для прогнозирования локализации активных белков в компартментах с разным pH. Важно отметить, что pH-критерий не

обязательно должен согласовываться с другими характеристиками белка, определяющими место его основной субклеточной локализации, но это свойство указывает на то, где белок выполняет свою функцию.

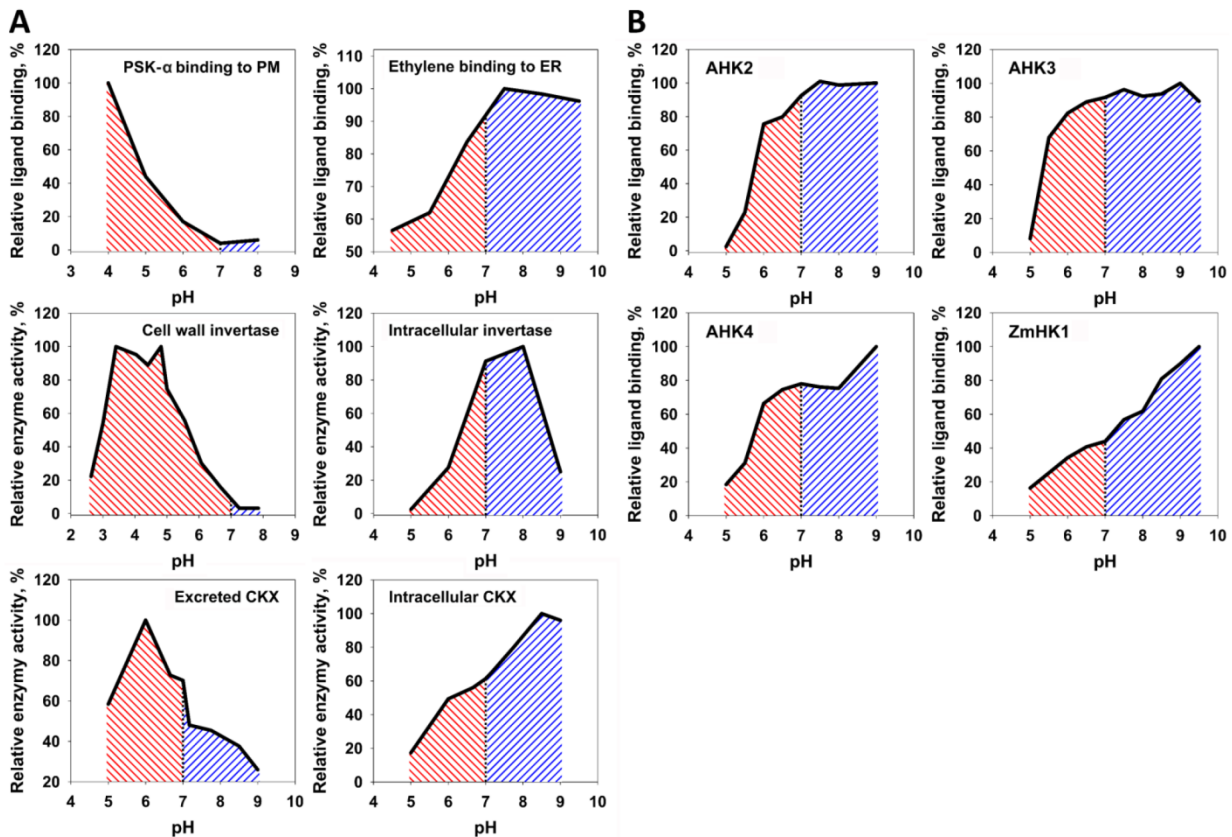


Рис.10. Типичные примеры pH-зависимости активности белков, локализованных в разных клеточных компартментах.

При применении к цитокининовым рецепторам pH-критерия не вызывает сомнений тот факт, что гормонсвязывающая активность всех рецепторов при pH 7-9 заметно преобладает над их активностью при pH 5-7 (рис. 10), что свидетельствует о внутриклеточном функционировании рецепторов. Их максимальная активность наблюдается в щелочной среде, близкой к pH 9. Два из трех цитокининовых рецепторов арабидопсиса (АНК2 и АНК3) практически полностью лишены гормон-связывающей активности при pH 5, что характерно для внутриклеточных белков и, очевидно, не позволяет работать в апопласте. Более того, после 1 ч инкубации при pH 5 АНК3 необратимо теряет способность связывать цитокинин. Однако некоторые рецепторы, например, CRE1/АНК4 арабидопсиса и его кукурузный ортолог ZmHK1 сохраняли заметную лиганд-связывающую способность даже при pH 5 на уровне 23.4% и 37.2% от связывания при pH 7, соответственно (Lomin et al., 2015).

2D-карты, полученные биоинформатически с помощью программы MolSurfer, позволили нам исследовать гидрофобность и электростатический потенциал интерфейсов

в смоделированных белковых комплексах Профили гидрофобности были очень похожи во всех димерах сенсорных модулей (sm) арабидопсиса и картофеля. Для определения электростатического потенциала для всех димеров при двух различных значениях pH были получены файлы с расширением PQR с помощью сервера PDB2PQR версии 2.1.1. Комплементарность электростатического потенциала при pH 5.5, типичном для среды апопласта, была меньше, чем при pH 7.1, который имитирует среду ЭР. Следовательно, нейтральный pH внутри клетки должен благоприятствовать димеризации сенсорных модулей по сравнению с кислым pH в апопласте. Некоторые различия в комплементарности поверхности субъединиц были замечены между гомодимерами и при pH 7.1. Гомодимеры *Arabidopsis* АНК2sm-АНК2sm и АНК3sm-АНК3sm были четко комплементарны, тогда как гомодимер АНК4sm-АНК4sm, все гетеродимеры и гомодимеры рецепторов картофеля были комплементарны в меньшей степени. Однако при любом сочетании паралогов области комплементарности, по-видимому, достаточно велики, чтобы обеспечить образование димеров.

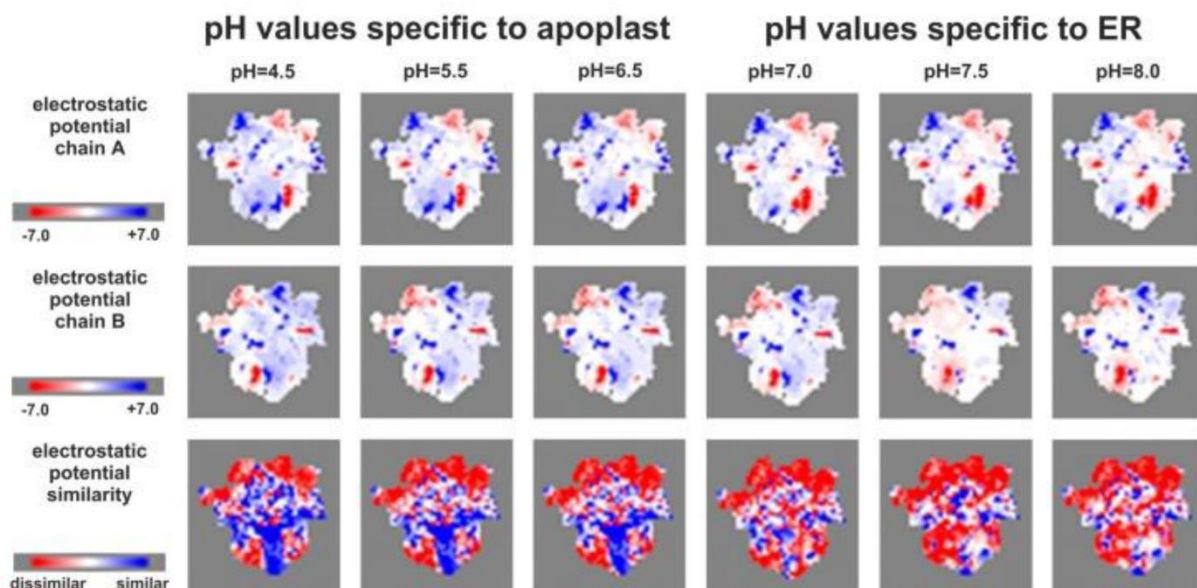


Рис.11. 2D-карты (проекция) электростатических потенциалов интерфейса гомодимера сенсорного модуля АНК3

Чтобы проверить предположение о негативном влиянии снижения pH на комплементарность димеризационных интерфейсов сигнальных модулей, были проведены расчеты с более широким диапазоном значений pH для отдельного комплекса, гомодимера АНК3. Были проведены расчеты с файлами PQR, подготовленными при шести различных значениях pH, соответствующих дисперсии значений pH в апопласте (4.5, 5.5 и 6.5) и ЭР (7.0, 7.5 и 8.0). Результаты показали (рис. 11) высокую комплементарность при pH 7-8 и наличие больших некомплементарных областей при

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

Таким образом, по этой части представленных результатов можно сделать ряд выводов:

- Разработан метод для анализа лиганд-связывающих свойств рецепторов на основе микросомальной фракции мембран из листьев табака *Nicotiana benthamiana*, в которых гены индивидуальных рецепторов были транзигентно экспрессированы. Анализ в подобной растительной системе наиболее близок к естественному среди всех ранее использованных тест-систем.
- Установлено, что рецепторы различных видов растений связывают природные цитокинины (*транс*-зеатин, изопентениладенин) высокоаффинно с константами диссоциации, лежащими в наномолярном диапазоне. Сродство рецепторов к *цис*-зеатину и дигидрозеатину, как правило, существенно ниже.
- Высокоаффинное связывание при этом наблюдается только для оснований цитокининов, но не для их рибозидов. Тем самым, впервые напрямую убедительно показано, что именно основания являются активными цитокининами.
- Впервые были клонированы и детально охарактеризованы рецепторы цитокининов картофеля.
- Рецепторы цитокининов обладают выраженной лигандной специфичностью, в том числе к природным цитокининам. Анализ свойств рецепторов из разных групп цветковых растений показал, что представители групп НК2 и НК4 имеют, как правило, сходную аффинность к *транс*-зеатину и изопентениладенину, тогда как представители группы НК3 явно предпочитают *транс*-зеатин. Особняком стоит рецептор кукурузы ZmНК1 (группа НК4), который является выраженным изопентениладениновым рецептором и при этом связывает *цис*-зеатин с тем же сродством, что и *транс*-зеатин.
- рН-зависимость рецепторов характеризуется заметным уменьшением связывания при значениях рН ниже 7, что предполагает ослабление связывания цитокининов в кислом содержимом апопласта клеток.
- Биоинформатический анализ показал, что способность рецепторов к димеризации на уровне сенсорных модулей также уменьшается при кислых значениях рН.

### **3. Установление субклеточной локализации рецепторов цитокининов**

Мы попытались более точно определить клеточный компартмент(ы), в котором локализуются рецепторы цитокинина. Имея экспериментальные доказательства высокоаффинного восприятия [<sup>3</sup>H]*tZ* рецепторами бактериальной системе, анализ связывания был проведен с субклеточными фракциями из различных органов проростков кукурузы. Несколько субклеточных фракций были получены из корней или листьев кукурузы и проверены на наличие высокоаффинных сайтов связывания *tZ*. Как показано

на рис. 12, очищенные митохондрии и хлоропласты не показали разницы между тотальным и неспецифическим связыванием, тогда как микросомные фракции из листьев и корней продемонстрировали значительное специфическое связывание. Ядра, выделенные из корней, также показали специфическое связывание, хотя примерно в 10 раз меньше, чем микросомы из корней.

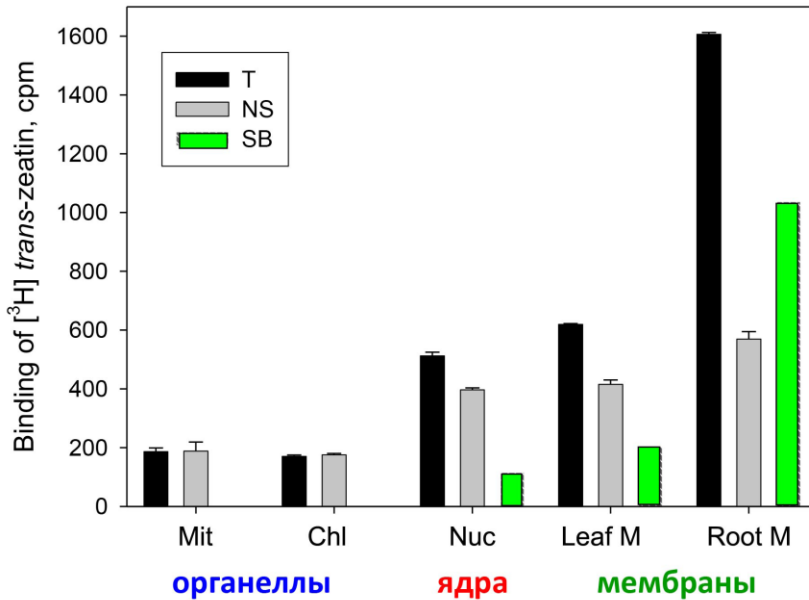


Рис. 12. Связывание меченого *транс*-зеатина с субклеточными фракциями клеток проростков кукурузы

Чтобы получить представление о клеточном компартменте, содержащем рецепторы цитокинина у арабидопсиса, изолированные мембраны 6-дневных проростков арабидопсиса были разделены методом двухфазного разделения на фракцию ПМ и фракцию внутренних мембран (эндомембраны). Микросомы каждой фракции сохраняют интегральные белки, а также белки, ассоциированные с этими мембранами. Верхняя фракция (U3) была сильно обогащена маркером ПМ ( $H^+$ -АТФаза), в то время как нижняя фракция (L3) показала обогащение маркером ЭР Binding Protein 2 (BiP2; рис. 13). Анализ связывания цитокинина *in vitro* с микросомами показал специфическое связывание [ $^3H$ ] *транс*-зеатина (т.е. разницу между общим и неспецифическим связыванием) в обеих мембранных фракциях (рис. 13). Количественный анализ этого связывания у растений дикого типа выявил высокоаффинное взаимодействие с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) в наномолярном диапазоне (рис. 13). В микросомах, выделенных из растений дикого типа, общее специфическое связывание цитокинина было примерно в четыре раза выше в эндомембранах, чем в ПМ (рис. 13).



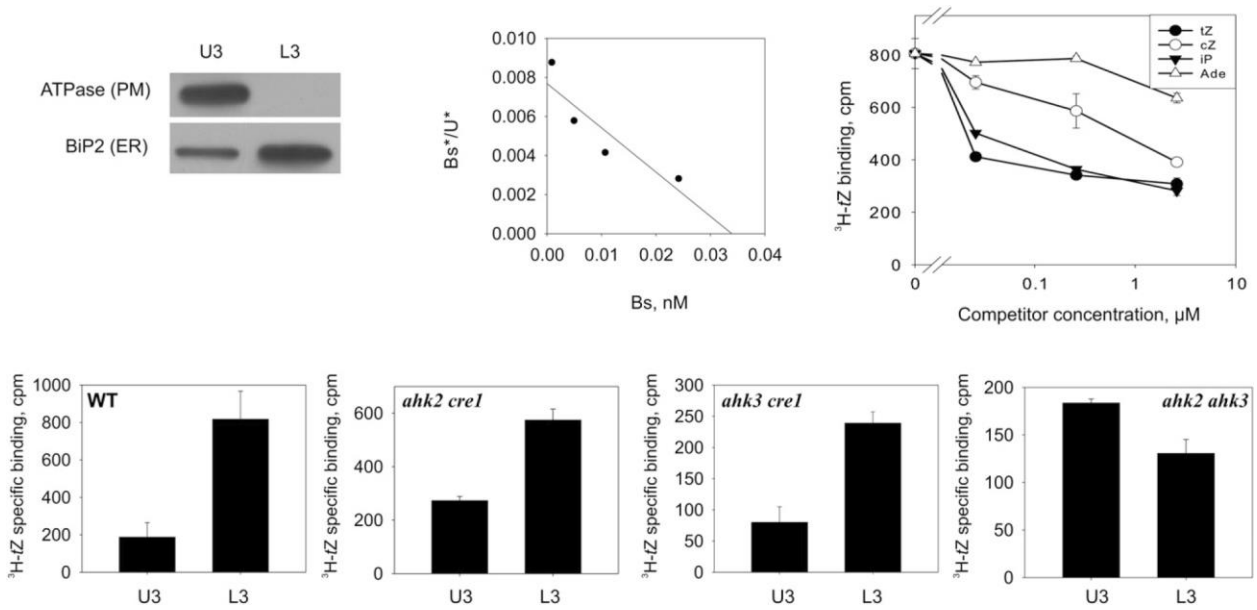


Рис.13. Эндомембраны клеток арабидопсиса более эффективно специфически связывают меченый *транс*-зеатин, чем плазмалемма

Чтобы выяснить, характерно ли такое распределение активности связывания для отдельных цитокининовых рецепторов арабидопсиса, эксперимент был повторен со всеми тремя двойными рецепторными мутантами, каждый из которых сохранял только один цитокининовый рецептор (Riefler et al., 2006). В целом, распределение цитокинин-связывающей активности у мутантов, сохранивших один рецептор, указывает на то, что все три цитокининовых рецептора арабидопсиса локализуются в основном на эндомембранах. Хотя мутантные растения *ahk2 ahk3*, экспрессирующие *CRE1/AHK4*, демонстрировали несколько более высокое специфическое связывание во фракции РМ, чем во фракции, обогащенной эндомембранами (рис. 13). Однако, подавляющее большинство мембранных белков находится в эндомембранах, и в этом случае также более цитокинин-связывающие сайты находятся в основном в эндомембранах.

Чтобы уточнить данные по субклеточному распределению рецепторов, мы соединили все три цитокининовых рецептора с GFP (Mathur, 2007). Эти слитые белки транзientно экспрессировались под контролем промотора 35S в эпидермальных клетках листьев табака и анализировались с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Картина субклеточной локализации АНК3-GFP (рис. 14) была сходна с той, что известна для ЭР-локализованных белков (Boevink et al., 1996, 1998; Batoko et al., 2000; Nelson et al., 2007). Это также подтверждалось сильным перинуклеарным сигналом для АНК3-GFP, который является отличительным признаком ЭР-локализации (рис. 14). Анализ перекрытия сигнала АНК3-GFP с сигналом от красителя FM4-64, окрашивающего

ПМ, показал лишь небольшое совпадение сигналов, что указывает на то, что большая часть слитого белка АНК3-GFP локализуется не в ПМ, а внутри клетки (рис. 14).

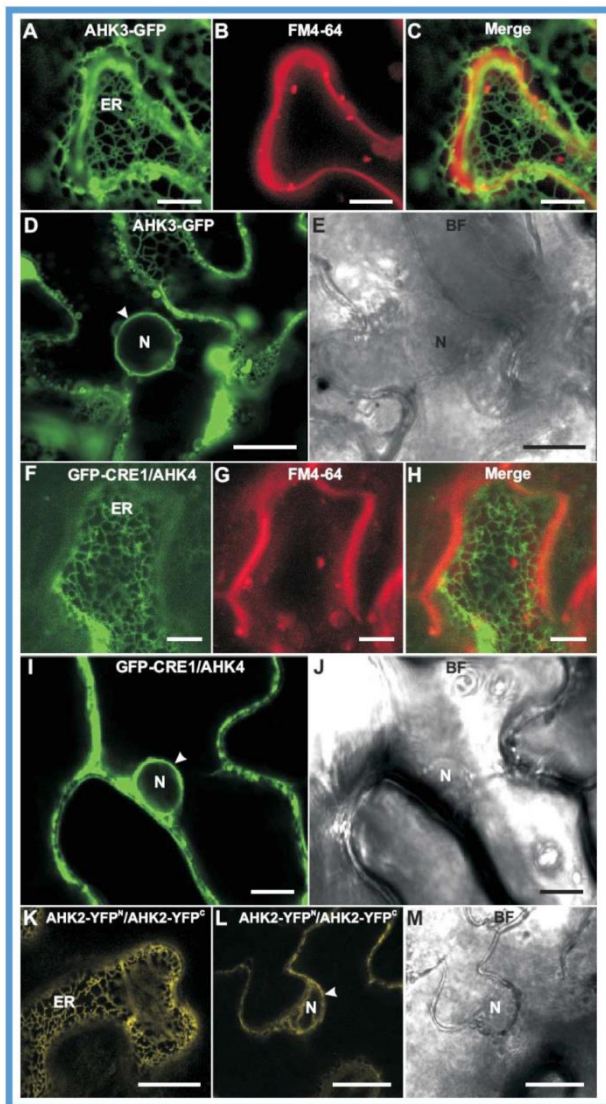


Рис.14. Субклеточная локализация рецепторов цитокининов арабидопсиса в составе ЭР.

Белок GFP-CRE1/АНК4 показал такое же субклеточное распределение в клетках листьев табака, как и АНК3-GFP. GFP-CRE1/АНК4 образовывал ЭР-подобную сеть (рис. 14), также был обнаружен перинуклеарный сигнал (рис. 14). Окрашивание клеток маркером FM4-64 ПМ показало незначительное перекрытие с сигналом GFP-CRE1/АНК4 (рис. 14), что подтверждает его преимущественную локализацию в мембране ЭР. В случае АНК2 ни N-, ни С-концевое соединение с GFP не привело к детектируемому сигналу *in planta*. Напротив, анализ бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) (Walter et al., 2004) для АНК2 привел к четкому сигналу, и эти данные могут быть использованы для анализа субклеточной локализации рецептора АНК2. Димер АНК2-Split-желтый флуоресцентный белок (YFP) образовывал ЭР-подобную внутриклеточную

сеть (рис. 14), и для димера АНК2-Split-YFP также была обнаружена перинуклеарная локализация (рис. 14).

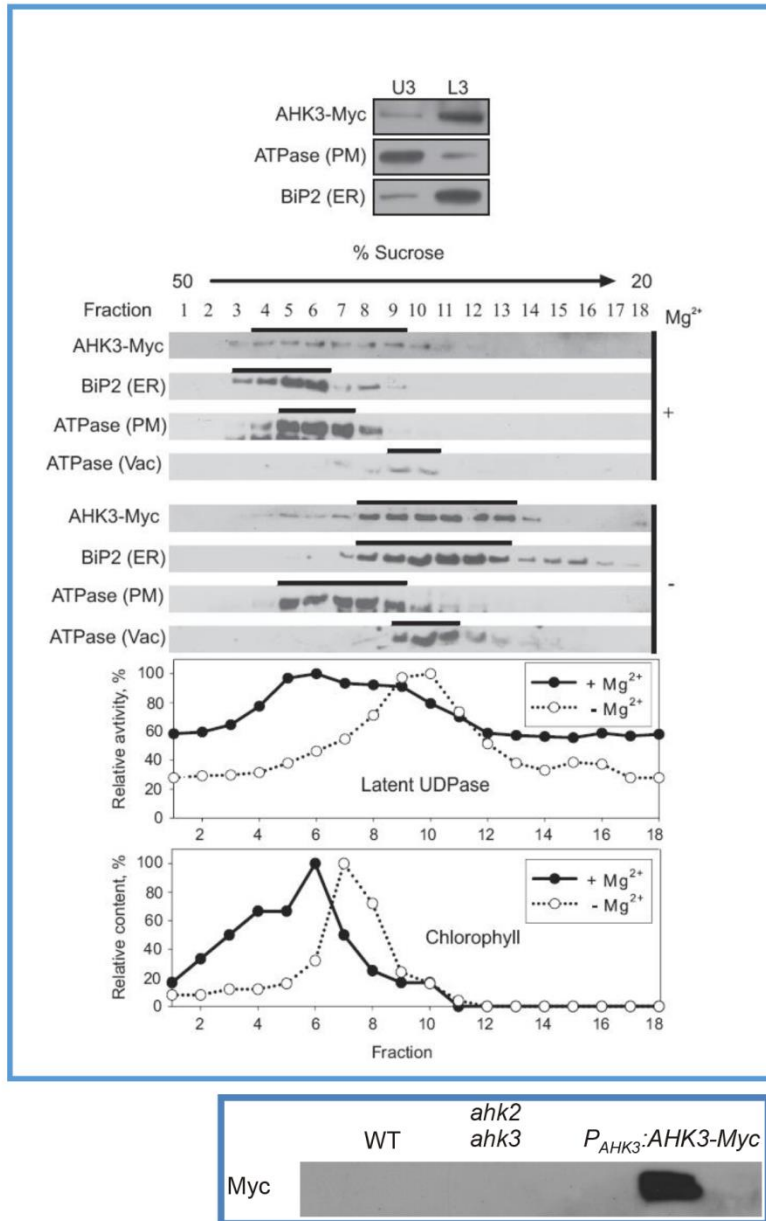


Рис. 15. Иммуноблоттинг после фракционирования микросом 6-дневных проростков арабидопсиса в градиенте плотности сахаразы.

Для подтверждения результатов, полученных при слиянии флуоресцентных белков с целевыми, необходимо применять другие методы, поэтому было проведено изучение субклеточной локализации Мус-меченых рецепторов цитокинина после фракционирования клеточных мембран (фракция микросом) центрифугированием в градиенте сахаразы. Трансформированные растения, экспрессирующие химерные *P<sub>ANK3</sub>:АНК3-Мус* или *P<sub>АНК2</sub>:АНК2-Мус*, показали комплементацию фенотипа мутанта *ahk2 ahk3*, демонстрируя функциональность обоих слитых белков АНК-Мус.

Сначала были выделены мембраны 6- и 18-дневных растений  $P_{АНК3}:АНК3-Мус$  и 6-дневных трансгенных растений  $P_{АНК2}:АНК2-Мус$  и фракционированы методом двухфазного разделения. Иммуноблоты показали ожидаемое распределение связанной с ПМ  $H^+$ -АТФазы и маркера ЭР  $ВіР2$  во фракциях U3 и L3, соответственно (рис. 15). Большая часть обоих меченых рецепторов, АНК3-Мус и АНК2-Мус, была обнаружена во фракции L3 (рис. 15), что подтверждает эндомембранную локализацию цитокининовых рецепторов. Для более точного определения внутриклеточной мембранной фракции (фракций), в которой локализуются АНК3-Мус и АНК2-Мус, микросомы были дополнительно фракционированы в градиенте плотности сахарозы в присутствии или в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$ .

Этот подход обоснован тем, что связывание рибосом с ЭР зависит от присутствия ионов  $Mg^{2+}$  (Lord, 1987). В отсутствие ионов  $Mg^{2+}$  (например, если в буфере присутствуют хелаторы, такие как ЭДТА), высвобождение рибосом из ЭР снижает плотность мембраны ЭР и, таким образом, приводит к сдвигу его положения в градиенте сахарозы. В отличие от этого, на плотность других органелл ионы  $Mg^{2+}$  существенно не влияют. Маркерные белки, принадлежащие к различным типам мембран, были обнаружены методом иммуноблоттинга. Положение АНК3-Мус в градиенте было аналогично положению  $ВіР2$ , поскольку он демонстрировал четкий сдвиг при удалении из буфера  $Mg^{2+}$ . Исследование локализации АНК2-Мус дало аналогичные результаты.

Чтобы получить представление о субклеточной локализации рецептора кукурузы  $ZmHK1$ , зеленый флуоресцентный белок (GFP), слитый с С-концом  $ZmHK1$  ( $ZmHK1-GFP$ ) или после С-концевого трансмембранного домена  $ZmHK1$  ( $ZmHK1TM-GFP$ ), был экспрессирован в клетках кукурузы. Протопласты были приготовлены из культивируемых клеток, и плазмидные конструкции были введены в протопласты для транзientной экспрессии под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (рис. 16). В качестве контроля использовали сам GFP (рис. 15), а SP-GFP-HDEL (Takeuchi et al., 2000) и N34-GFP (Ueda et al., 2001) использовали как маркеры ЭР (рис. 16 С) и плазматической мембраны (рис. 16 Е), соответственно. Флуоресцентные сигналы  $ZmHK1-GFP$ , очевидно, были ко-локализованы с сетью ЭР и ядерной оболочкой (рис. 16 G). Примерно такая же картина наблюдалась для  $ZmHK1TM-GFP$  (рис. 16 I).

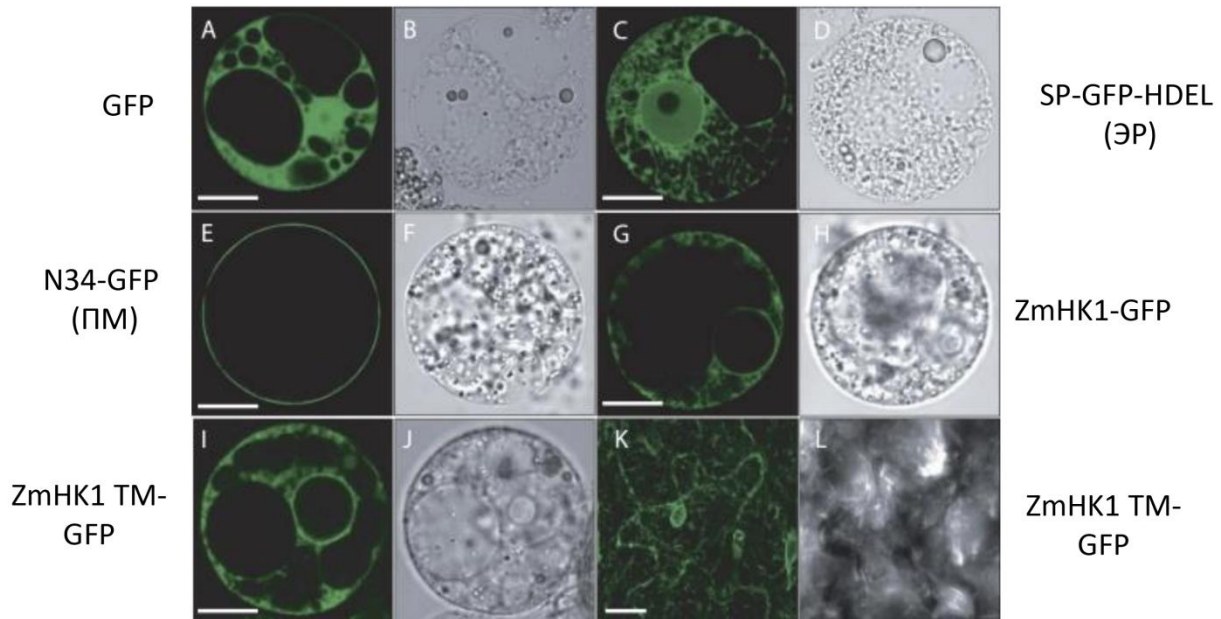


Рис.16. Микрофотографии протопластов кукурузы, экспрессирующих ZmHK1-GFP.

Также были получены стабильные трансформанты *A. thaliana*, экспрессирующие ZmHK1TM-GFP. В потомстве T2 флуоресценция GFP оказалась ко-локализованной с ЭР (рис. 16 К, L). В целом, наши результаты свидетельствуют о том, что ZmHK локализованы преимущественно в мембране ЭР.

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

Для изучения функциональности рецепторов были проведены эксперименты по фосфотранферу между АНК и АНР *in vitro* с цитокининовыми рецепторами, расположенными в мембранах растений. Рецептор АНК3 был сверхэкспрессирован под контролем промотора 35S CaMV в листьях табака. Различные мембранные фракции, обогащенные ЭР или ПМ, были получены путем центрифугирования суммарных мембран из листьев табака в ступенчатом градиенте сахарозы. Степень чистоты фракций оценивали с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами против маркерных белков ЭР и ПМ (рис. 17). Предполагаемое обогащение фракции было более чем 2-кратным для маркера ЭР и намного выше для маркера ПМ. Фосфотрансмиттеры АНР1, АНР2 и АНР3, все N-концевые слитые с GST, были получены в *E. coli* и очищены с помощью аффинной хроматографии. Цитокинин-зависимый фосфотрансфер проводили в смеси клеточных мембран с одним из трех очищенных АНР и в диапазоне концентраций

транс-зеатина от 0 до 500 нМ. В присутствии меченого АТФ фосфорилирование белков фосфотрансмиттеров было четко обнаружено с мембранами из листьев, сверхэкспрессирующих ген АНК3 (рис. 17), но отсутствовало, когда использовались мембраны из нетрансформированных листьев (рис. 17).

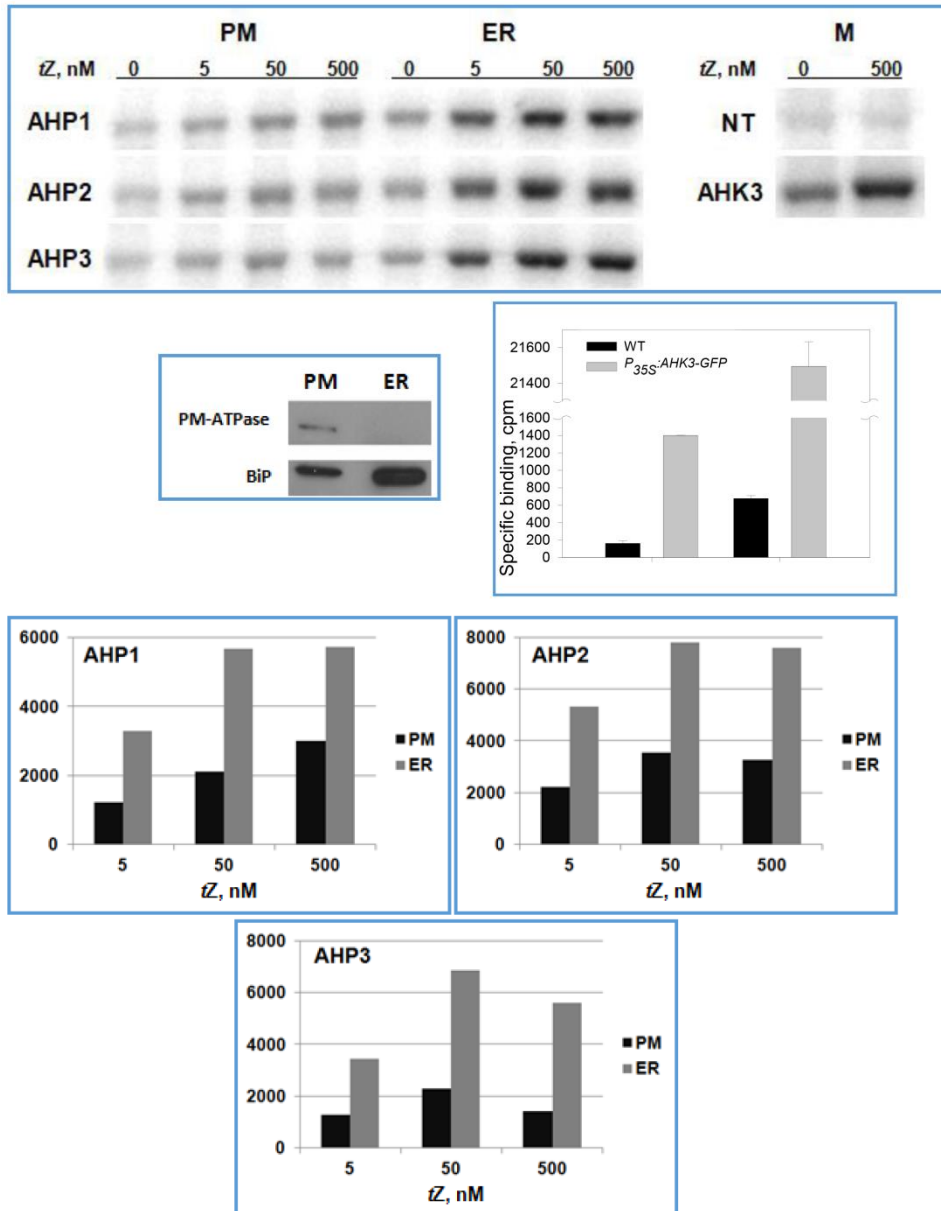


Рис.17. АНК3-АНР цитокинин-зависимый фосфотрансфер на мембранных фракциях, обогащенных плазмалеммой или эндоплазматическим ретикуломом.

Фосфорилирование АНР увеличивалось цитокинин-зависимым образом с одинаковой эффективностью для всех трех АНР. Обе мембранные фракции, ЭР- или ПМ-обогащенные, были в принципе способны осуществлять эту цитокинин-зависимую реакцию фосфорилирования, но ЭР-обогащенные мембраны демонстрировали гораздо более высокую активность (рис. 17). Количественная оценка интенсивности полос показала, что удельная активность (т.е. радиоактивность, перенесенная на

фосфотрансмиттеры равным количеством микросом) фракции, обогащенной ЭР, была более чем в 2 раза выше по сравнению с фракцией, обогащенной ПМ. Таким образом, этот подход демонстрирует, что цитокининовые рецепторы в ЭР способны фосфорилировать фосфотрансмиттерные белки при добавлении гормона, что означает, что они функционально активны.

Таким образом, по этой части представленных результатов можно сделать ряд выводов:

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

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

#### **4. Влияние фосфорилирования на взаимодействие НКrd-НРt**

Для изучения влияния специфического фосфорилирования на взаимодействие НКrd-НРt (rd – ресиверный домен) были построены модели димеров АНК3rd-АНР2 с использованием вариантов фосфорилирования остатков и присутствия ионов  $Mg^{2+}$ . Фосфоакцепторные остатки были модифицированы в сервисе Vienna-PTM. Гистидин был фосфорилирован по атому Nε, с зарядом -2 (без протонирования), и такой же заряд использовался для фосфоаспартата. Наш анализ моделей димеров АНК3rd-АНР2 в различных состояниях фосфорилирования (рис. 18) показал, что  $Mg^{2+}$ -связанные партнеры MSP заметно увеличивали их взаимное сродство по сравнению с апоформой. Дальнейшее увеличение сродства было получено, когда аспартат 941 АНК3rd был переведен в фосфорилированное состояние в присутствии ионов магния. В противоположном случае, когда фосфорилировался только АНР2 (гистидин 82 переводился в фосфогистидин, также в присутствии  $Mg^{2+}$ ), аффинность связывания RD-НРt падала до уровня даже ниже, чем у апоформы. Фосфорилирование обоих фосфоакцепторных остатков привело к снижению сродства по сравнению с  $Mg^{2+}$ -связанной нефосфорилированной формой, хотя сродство оставалось немного выше, чем у апоформы.

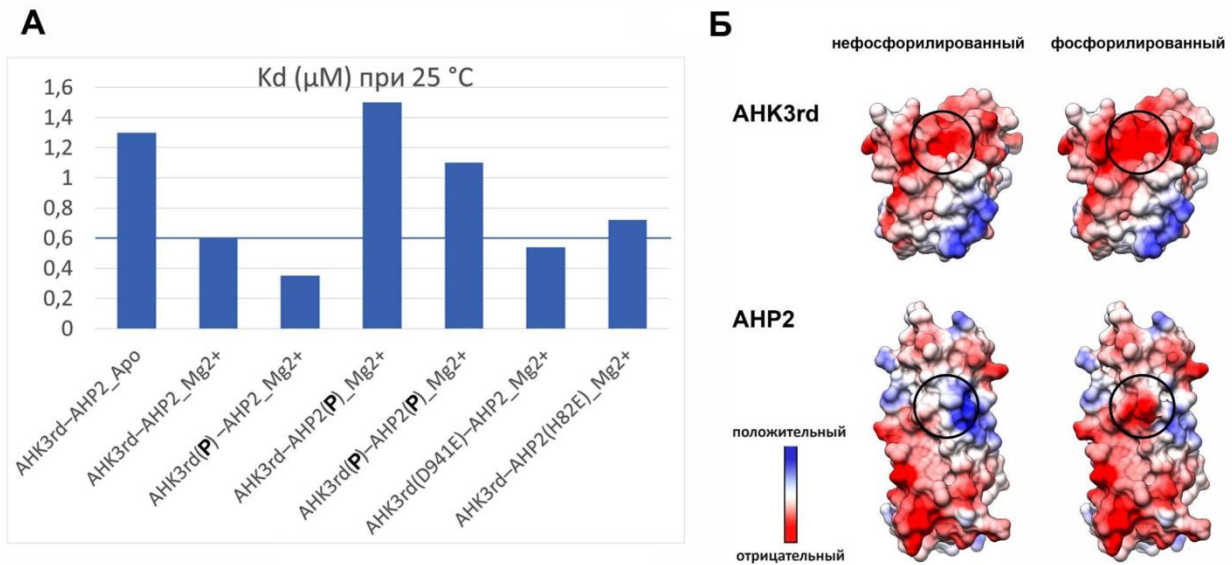


Рис.18. Влияние фосфорилирования и  $Mg^{2+}$  на взаимодействие НК(rd)-HPt в соответствии с расчетами сервера Prodigy.

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

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

### 5. Эволюционное становление рецепторного аппарата цитокининов

За пределами цветковых растений цитокининовый-сигналинг изучен очень мало. Все наземные растения, в принципе, имеют полный набор белков для восприятия и передачи сигнала цитокинина (Kaltenegger et al., 2018; Gruhn et al., 2014; Wang et al., 2015). Однако существует лишь несколько исследований, описывающих свойства рецепторов цитокининов у мохообразных, *Physcomitrium patens* (PpCHK1-4) и *Marchantia polymorpha* (MpCHK1) (von Schwartzenberg et al., 2016; Gruhn et al., 2014). Насколько нам известно, до сих пор не было данных о биохимических свойствах рецепторов ЦК у плауновидных и голосеменных. В нашей работе мы попытались восполнить пробел в наших знаниях об



аппарате восприятия цитокинина у наземных растений, уделяя особое внимание раннедивергентным видам (мохообразным, плауновидным и голосеменным).

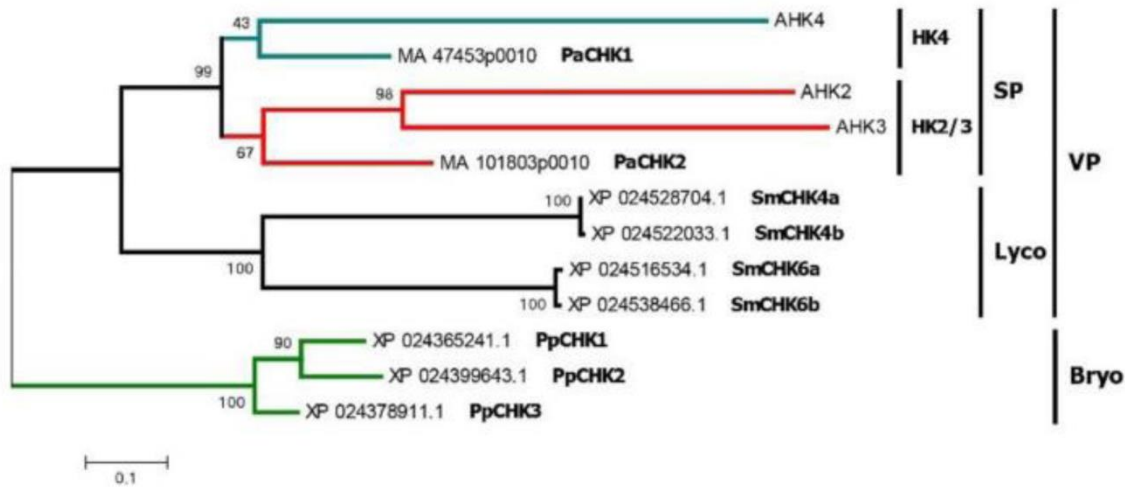


Рис.19. Канонические рецепторы цитокининов за пределами покрытосеменных.

Филогенетически рецепторы СНК (CHASE-domain containing Histidine Kinase) были разделены на ряд отдельных групп (рис. 19). Рецепторы *P. patens* образуют отдельную ветвь (Bryo, *Bryophyta*), остальные СНК образуют общую ветвь сосудистых растений (VP) (Pils, & Neyl, 2009). Эта общая ветвь, в свою очередь, подразделяется на группу *Lycopodiophyta* (Lyco) с рецепторами *S. moellendorffii* и группу семенных растений (SP). Последняя группа может быть далее разделена на подгруппы НК4 и НК2/3. Рецепторы хвойных PaCHK1 и PaCHK2 относятся как раз к этим двум подгруппам, соответственно.

В отношении структуры рецепторных генов можно проследить некоторые закономерности (рис. 19). Мох *P. patens* был уникальным видом, у которого было семь белков, связанных с рецепторами СНК, которые мы назвали сестринской группой СНК. Это подсемейство было впервые обнаружено в ходе филогенетических исследований мхов *P. patens* и *M. polymorpha* (Gruhn et al., 2014). Сестринские СНК имеют серьезные аномалии в структуре сенсорного модуля (Gruhn et al., 2015) Замена консервативного аспартата 434 на различные аминокислоты (фенилаланин, тирозин, лейцин) заслуживает особого внимания, поскольку водородная связь между аспартатом 434 и адениновым остатком цитокинина имеет решающее значение для специфического связывания гормона. Во всех сестринских СНК отсутствует консервативный треонин в положении 450. Таким образом, эти СНК можно рассматривать как варианты классической мутации *wol* (деревянная нога) арабидопсиса, при которой связывание цитокининов блокируется. В совокупности все вышесказанное позволяло предположить, что сестринские СНК связывают цитокинины очень слабо, если вообще связывают.

Мы экспериментально проанализировали лигандсвязывающие свойства СНК-рецепторов из *P. patens*, *S. moellendorffii* и *P. abies*, используя метод радиоактивно меченых лигандов и микросомы из листьев табака, где эти рецепторы были транзientно экспрессированы. В качестве меченого ЦК выступал меченый тритием изопентениладенин. Белки PpCHK1 и 2 из *P. patens* были протестированы в полноразмерной версии, в остальном использовались сенсорные модули, фланкированные ТМ-доменами. PpCHK1-3 представляли каноническую группу рецепторов СНК, а PpCHK4 был представителем родственной сестринской группы. Из каждой пары рецепторов *S. moellendorffii*, вероятно, состоящей из двух секвенированных повторов, для дальнейших исследований был взят один представитель (СНК4a-sm и СНК6-sm, в последнем случае СНК6-sm а и b идентичны, поэтому их буквенное обозначение не требуется). Пара сенсорных гистидинкиназ PaCHK1 и PaCHK2 представляет собой, согласно современным знаниям, весь набор рецепторов СНК из *P. abies*.

Из восьми клонированных рецепторов мы не обнаружили связывания цитокининов у PpCHK3 и PpCHK4, хотя экспрессия генов этих белков была подтверждена иммуноблоттингом против слитого с целевым белком GFP (рис. 20).

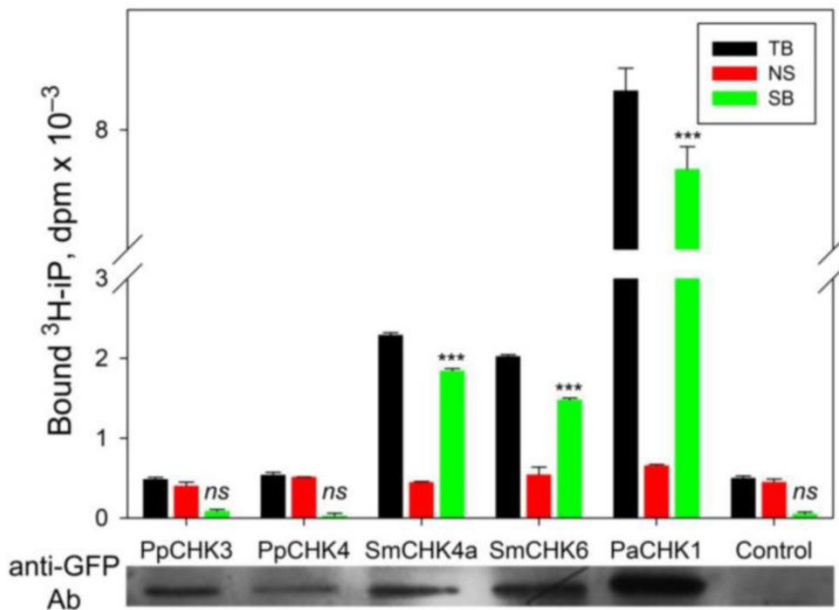


Рис. 20. Цитокинины связываются только каноническими рецепторами.

Сенсорный модуль белка PpCHK3 (KJ697770) из *P. patens*, по сравнению с другими каноническими рецепторами, рассмотренными в данной работе, в целом имеет довольно консервативную структуру. Единственной заметной аминокислотной заменой является фенилаланин 420 вместо консервативного серина. Эта замена сама по себе или в сочетании с другими может быть ответственна за связывание. Эти (рис. 20) и предыдущие (von Schwartzenberg et al., 2016) данные, показывают, что PpCHK3 не способен связывать

меченые iP или tZ, соответственно. Таким образом, из первоначально отобранных восьми СНК две (PpСНК3 и PpСНК4) оказались нефункциональными в качестве рецепторов, поскольку они не распознавали молекулы iP. Следовательно, маловероятно, что эти белки могут оказывать существенное влияние на восприятие цитокинина.

Специфичность рецепторов для шести немеченых гормонов: *транс*-зеатина (tZ), *цис*-зеатина (cZ), изопентениладенина (iP), дигидрозеатина (DZ), бензиладенина (BA) и тидиазурона (TD)- была определена в экспериментах по конкуренции. Расчет равновесной  $K_D$  проводился стандартным методом по формуле Ченга-Прусова.

Данные о сродстве различных цитокининов к рецепторам представлены в таблице 3. Рецепторы *P. patens* демонстрировали самое высокое сродство ( $K_D < 10$  нМ) к iP. Согласно расчету  $K_D$ , сродство к tZ было значительно ниже, а cZ и DZ завершали список. Напротив, рецепторы сосудистых растений, кроме iP, прочно связывали также tZ и BA, но не cZ и DZ. Рецепторы селлагинеллы отличались относительно высоким сродством к BA. Кроме того, SmСНК4a и PaСНК1 прочно связывали тидиазурон (TD), синтетическое производное фенилмочевины. SmСНК6 связывал iP и tZ с близким сродством, SmСНК4a и PaСНК1 предпочитали iP, а PaСНК2 - tZ. Самые большие различия между двумя рецепторами СНК одного вида были характерны для рецепторов ели.

Таблица 2. Сродство к различным цитокининам рецепторов эволюционно далеких наземных растений.

	PpСНК1	PpСНК2	SmСНК4a	SmСНК6	PaСНК1	PaСНК2
	$K_d, \text{ nM}$					
<b>tZ</b>	36,9±2	18,1±1,5	<b>7,99±1,34</b>	<b>1,15±0,20</b>	<b>7,57±0,37</b>	<b>1,05±0,09</b>
<b>cZ</b>	103±15	34,2±9,3	20,6±2,6	16,6±2,4	419±56	17,9±2,9
<b>iP</b>	<b>1,92±0,06</b>	<b>1,78±0,14</b>	<b>1,60±0,13</b>	<b>1,70±0,16</b>	<b>3,60±0,17</b>	<b>2,20±0,08</b>
<b>DZ</b>	507±42	323±97	54,8±6,2	36,0±1,6	377±27	22,4±2,9
<b>BA</b>	13,9±0,1	10,7±0,5	<b>6,91±0,34</b>	<b>2,28±0,70</b>	61,9±1,3	13,5±1,6
<b>TD</b>	23,8±5,4	13,02±0,2	<b>4,52±0,62</b>	16,6±4,7	<b>6,70±0,21</b>	64,5±6,4

Что касается синтеза цитокининов, то интересно, что у мохообразных нет не только АТР/АТР-ИРТ, изопентенилтрансфераз, ферментов первой стадии синтеза цитокининов. У них и у плауновидных нет и tRNA-ИРТ второго класса (модифицируют аденин в tPHK), которые появляются только у группы *Euphylophyta*, базовой группой которых являются папоротникообразные, а есть только tRNA-ИРТ первого класса (рис. 21). При этом филогенетически именно в этой группе впервые появляются канонические цитокининовые ИРТ (Nishii et al., 2018). Что касается синтеза *транс*-зеатина, то мы

обнаружили вероятный ортолог этих ферментов только у антоцеротовых мхов, но у сосудистых растений эти ферменты есть у всех групп растений. Соответственно, эта группа цитокининов начала производиться каноническим способом у общего предка сосудистых растений, либо у их вероятных предков среди мохообразных (рис. 21). Это привело и к увеличению аффинности к этой группе цитокининов у рецепторов всех групп сосудистых растений. Только у семенных имеются псевдофосфотрансмиттеры. Таким образом, появляется дополнительный негативно действующий элемент. Но данная группа не консервативна и у различных групп семенных растений псевдофосфотрансмиттеры не являются родственниками. Следует отметить, что в полной мере ингибирующая роль доказана только для АНР6. А эта группа характерна только для двудольных растений (Vaughan-Hirsch et al., 2021). При этом только у всех семенных растений рецепторы делятся на группы, свойственные арабидопсису.

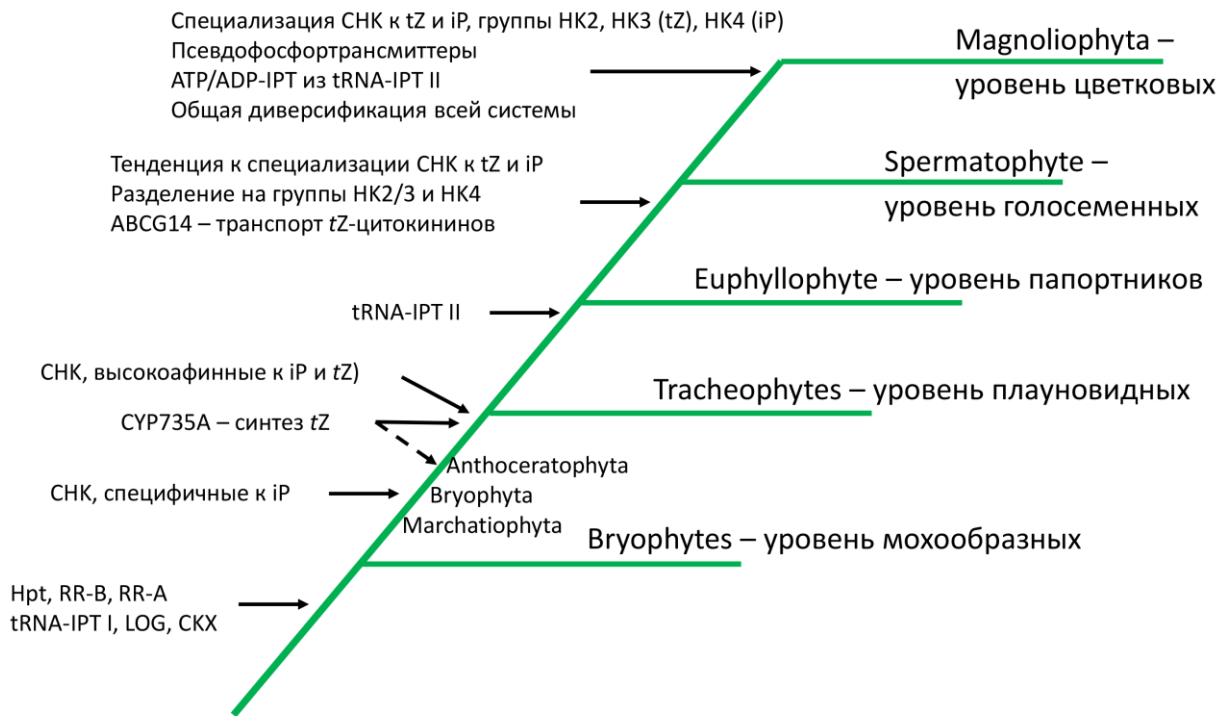


Рис.21. Схема эволюции цитокининовой системы.

У голосеменных они делятся на НК2/3 и НК4, а у покрытосеменных – на НК2, НК3, НК4. Наблюдается четкая тенденция к нарастанию лигандной специфичности рецепторов или к iP, или tZ. Апогея это достигает у покрытосеменных. Канонический дальний транспорт tZ цитокининов через ABCG14 имеется только у семенных растений. При этом у покрытосеменных вся система сильно разрастается. У риса даже появляется новый тип рецепторов с серин/треониновой киназой в качестве эффекторной части (Halawa et al., 2021). Это, судя по всему, связано с необходимостью обслуживать более сложный

морфогенез цветковых и очень широкую адаптацию к условиям среды, выраженные в большом разнообразии форм и местообитаний, что является причиной доминирования этой группы растений в современной флоре.

Таким образом, в ходе эволюции сигнальная система цитокининов приобрела большое значение и многофункциональность, что обусловило ее совершенствование и быстрое развитие в направлении фактической монополизации MSP; прямого, а не через тРНК, синтеза ЦК, а также расширение специфичности рецепторов с их последующей специализацией к определенным ЦК у цветковых растений. При этом система ЦК приобрела большую надежность, стабильность и пластичность, о чем свидетельствует, в частности, ее устойчивость к блокированию (нокауту) тех или иных ее основных элементов (Romanov, 2009; Gordon et al., 2009), а также тонкая настройка координации системы цитокининов с другими гормональными системами, прежде всего ауксиновой и этиленовой (Zdarska et al., 2019), для обеспечения оптимального развития растительного организма.

Таким образом, по этой части представленных результатов можно сделать ряд выводов:

- Филогенетический анализ рецепторов всех доступных отделов высших растений показал, что разделение на группы НК2/3 и НК4 существует только у семенных растений. У эволюционно более древних таксонов рецепторы образуют свои специфичные группы.

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

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

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

## ВЫВОДЫ

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

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

б) выявлены высококонсервативная область длиной около 40 аминокислот в форме  $\alpha$ -спирали, непосредственно предшествующая CHASE-домену и входящая в

димеризационный интерфейс, а также короткая (около 10 аминокислот) консервативная последовательность между С-концом CHASE домена и замыкающим сенсорный модуль "правым" (downstream) трансмембранным доменом;

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

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

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

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

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

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

3. Биоинформатический анализ показал, что:

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

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

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

- а) рецепторы цитокининов преимущественно локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулума, а не плазмалеммы. Среди органелл митохондрии и хлоропласты цитокинины специфически не связывают, что предполагает отсутствие в них рецепторов цитокининов;
- б) с применением различных методов доказана функциональность рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме. Соответственно, эндоплазматический ретикулум может быть основным местом инициации цитокининового сигнала в клетке.

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

- а) разделение на группы НК2/3 и НК4 существует только у семенных растений, а у эволюционно более древних таксонов рецепторы образуют свои специфичные группы;
- б) впервые клонированы и охарактеризованы цитокининовые рецепторы эволюционно и/или хозяйственно значимых видов растений – плауна *Selaginella moellendorffii*, ели *Picea abies*, мха *Physcomitrium patens* (частично), картофеля *Solanum tuberosum*;
- в) высокоаффинное связывание цитокининов характерно только для канонических рецепторов и не наблюдается у представителей сестринской группы РрСНК, сохранившейся у мохообразных.
- г) канонические рецепторы мохообразного *Physcomitrium patens* специфичны к изопентениладенину. *Транс*-зеатин связывается с рецептором активнее других природных цитокининов только у сосудистых растений. Это согласуется с эволюцией пути биосинтеза этого гормона. При этом специализация рецепторов к отдельным цитокининам нарастает по мере движения в направлении покрытосеменных растений.

#### ПУБЛИКАЦИИ ИЗ СПИСКА ВАК

1. Stolz A.\*, Riefler M.\*, **Lomin S. N.\***, Achazi K., Romanov G. A., & Schmölling T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, **67**(1), pp.157–168. IF= 6.417, Q1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04584.x>
2. Wulfetange K.\*, **Lomin S. N.\***, Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., & Schmölling, T. (2011). The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, **156**(4), pp. 1808–1818. IF=8.34, Q1. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180539>
3. **Lomin S. N.\***, Yonekura-Sakakibara K.\*, Romanov G. A., & Sakakibara H. (2011). Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors.

- Journal of Experimental Botany*, **62**(14), pp. 5149–5159. IF=6.64, Q1. <https://doi.org/10.1093/jxb/err220>
4. **Lomin S. N.**, Krivosheev D. M., Steklov M. Y., Osolodkin D. I., & Romanov G. A. (2012). Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*, **4**(3), pp. 31–45. IF=2.07, Q3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491891/>
  5. Steklov M. Y.\*, **Lomin S. N.\***, Osolodkin D. I., & Romanov G. A. (2013). Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Reports*, **32**(6), pp. 781–793. IF=4.88, Q1. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1408-3>
  6. **Lomin S. N.\***, Krivosheev, D. M.\*, Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V., Osolodkin, D. I., Schmülling, T., & Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, **66**(7), pp. 1851–1863. IF=6.64, Q1. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru522>
  7. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф., **Ломин С.Н.**, & Романов Г.А. (2015) Синтез меченного тритием и дейтерием изопентениладенина. *Радиохимия*, **57**(1), с. 94-96. [Sidorov G.V., Myasoedov N.F., **Lomin S.N.**, & Romanov G.A. Synthesis of tritium- and deuterium-labeled isopentenyladenine. *Radiochemistry*, **57**(1), pp/ 108-110]. IF=0.658, Q3. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1066362215010178>
  8. Kolachevskaya O.O., Sergeeva L.I., Floková K., Getman I.A., **Lomin S.N.**, Alekseeva V.V., Rukavtsova E.B., Buryanov Y.I., & Romanov G.A.. (2017) Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones. *Plant Cell Reports*, **36**(3), pp. 419–435. IF=4.88, Q1. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2091-y>
  9. **Lomin S.N.**, Myakushina Y.A., Arkhipov D.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Schmulling T., & Romanov G.A. (2017). Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Functional Plant Biology*, **45**(2), pp. 192-202. IF=2.96, Q1. <https://doi.org/10.1071/FP16292>
  10. Romanov G.A., **Lomin S.N.**, Schmülling T. (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question!. *New Phytologist*, **218**(1), pp. 41-53. IF=9.23, Q1. <https://doi.org/10.1111/nph.14991>
  11. Savelieva E.M., Oslovsky V.E., Karlov D.S., Kurochkin N.N., Getman I.A., **Lomin S.N.**, Sidorov G.V., Mikhailov S.N., Osolodkin D.I., & Romanov G.A. (2018) Cytokinin activity of *N6*-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors *in planta*, *in vitro*, and *in silico*. *Phytochemistry*, **149**, pp. 161-177. IF=3.99, Q1. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.008>



12. **Lomin S. N.**, Myakushina Y. A., Kolachevskaya O. O., Getman I. A., Arkhipov D. V., Savelieva E. M., Osolodkin D. I. & Romanov, G. A. (2018) Cytokinin perception in potato: new features of canonical players. *Journal of Experimental Botany*, **69**(16), 3839–3853. IF=6.64, Q1. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery199>
13. Kolachevskaya O. O., Sergeeva L. I., Getman I. A., **Lomin S. N.**, Savelieva E. M., & Romanov G. A. (2018) Core features of the hormonal status in in vitro grown potato plants. *Plant Signaling & Behavior*, **13**(5), e1467697. IF=2.56, Q1. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1467697>.
14. Arkhipov D. V., **Lomin S. N.**, Myakushina Y. A., Savelieva E. M., Osolodkin D. I., & Romanov, G. A. (2019) Modeling of protein-protein interactions in cytokinin signal transduction. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(9), 2096. IF=5.542, Q1. <https://doi.org/10.3390/ijms20092096>.
15. **Ломин С. Н.**, Савельева Е. М., Архипов Д. В., & Романов Г. А. (2020) Свидетельства в пользу преимущественной локализации рецепторов цитокининов картофеля в эндоплазматическом ретикулуме. *Биологические мембраны*, **37**(2), с. 110-119. IF=0.141, Q4. <https://sciencejournals.ru/cgi/getPDF.pl?jid=biomem&year=2020&vol=37&iss=2&file=BioMem2001007Lomin.pdf>
16. Muszynski M. G., Moss-Taylor L., Chudalayandi S., Cahill J., Del Valle-Echevarria A. R., Alvarez-Castro I., Petefish A., Sakakibara H., Krivosheev D. M., **Lomin S. N.**, Romanov G. A., Thamotharan S., Dam T., Li B., & Brugière N. (2020) The Maize Hairy Sheath Frayed1 (Hsf1) Mutation alters leaf patterning through increased cytokinin signaling. *The Plant Cell*, **32**(5), pp. 1501–1518. IF=7.02, Q1. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00677>.
17. **Lomin S. N.** & Romanov G. A. (2020) A new tool for quantification of membrane protein partitioning between different cell membranes. *Analytical Biochemistry*, **599**, 113734. IF=3.365, Q2. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113734>.
18. **Lomin S. N.**, Myakushina Y. A., Kolachevskaya O. O., Getman I. A., Savelieva E. M., Arkhipov D. V., Deigraf S. V. & Romanov G. A. (2020) Global view on the cytokinin regulatory system in potato. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 613624. IF=4.407, Q1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.613624>
19. Kolachevskaya O. O., Myakushina Y. A., Getman I. A., **Lomin S. N.**, Deyneko I. V., Deigraf S. V. & Romanov G. A. (2021) Hormonal regulation and crosstalk of auxin/cytokinin signaling pathways in potatoes *in vitro* and in relation to vegetation or tuberization stages. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(15), 8207. IF=5.542, Q1. <https://doi.org/10.3390/ijms22158207>.
20. **Lomin S. N.**, Savelieva E. M., Arkhipov D. V., Pashkovskiy P. P., Myakushina Y. A., Heyl A., & Romanov G. A. (2021) Cytokinin perception in ancient plants beyond

Angiospermae. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(23), 13077. IF=5.542,  
Q1. <https://doi.org/10.3390/ijms222313077>

\* - указание на равный вклад соавторов статьи.