

*На правах рукописи*

Шевченко

**Шевченко**

**Галина Васильевна**

**Выделение и характеристика цитокинин-  
связывающих и АБК-связывающих белков  
*Synechocystis* sp. PCC 6803**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

**Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук

**Каравайко Наталья Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор

**Озерцовская Ольга Леонидовна**

Доктор биологических наук

**Клячко Нелла Леопольдовна**

**Ведущее учреждение:**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Защита состоится «19» апреля 2011 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.

Факс:(499)977-80-18; электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «18» марта 2011 года.

Ученый секретарь совета  
по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Хлоропласты являются одной из главных мишеней действия фитогормонов в клетке растения. Хорошо изучена активация цитокинином биогенеза хлоропластов, включая их структурную и биохимическую дифференциацию (Хохлова, 1977; Кулаева, 1973; Kusnetsov *et al.*, 1994; Caers, Vendrig, 2006), и ингибирование этих процессов абсцизовой кислотой (АБК) (Кравяж *и др.*, 1977; Хохлова *и др.*, 1978). В хлоропластах присутствует полный спектр физиологически активных цитокининов (Benkova *et al.*, 1999). Кроме того, показана активация цитокинином синтеза РНК в хлоропластах (Микулович *и др.*, 1977; Roussaux *et al.*, 1976; Зубо *и др.*, 2005, 2008), получены данные в пользу посттранскрипционного влияния цитокининов на экспрессию хлоропластных генов (Kusnetsov *et al.*, 1994). Показано, что цитокинин может активировать транскрипцию ряда хлоропластных генов (Зубо *и др.*, 2005; Ямбуренко *и др.*, 2008; Zubo *et al.*, 2008). Обнаружены хлоропластные цитокинин-связывающие белки, участвующие в гормон-зависимой регуляции транскрипции (Romanko *et al.*, 1986; Kulaeva *et al.*, 2000; Люкевич *и др.*, 2002) и АБК-связывающие белки (Shen *et al.*, 2006).

В литературе господствует представление о том, что хлоропласты произошли в результате эндоцитоза древних фотосинтезирующих цианобактерий в эукариотическую клетку (Margulis, 1970; Douglas, Tumer, 1991; Кулаев, 1998). В связи с этим, большой интерес представляет вопрос о том, могли ли в процессе эволюции цианобактерии привнести цитокинины и АБК в клетку и определить их участие в регуляторной системе хлоропластов.

Способность цианобактерий выделять активирующие рост растений вещества была отмечена давно (Metting *et al.*, 1988), позднее была показана цитокининовая активность их лизата на семядолях огурца и сои (Stirk, van Staden, 1997). В цианобактериях идентифицированы эндогенные изопентиниладенин, *транс*-зеатин, а затем и другие цитокинины (Stirk *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2010; Hussain, Hasnain, 2011). Кроме того, показано влияние *транс*-зеатина на синтез РНК в транскрипционной системе цианобактерий (Селиванкина *и др.*, 2006).

До настоящего времени не было работ, посвященных поиску цитокинин-связывающих (ЦСБ) и АБК-связывающих (АСБ) белков цианобактерий, которые могли бы быть молекулярными мишенями этих фитогормонов и участвовать в их влиянии на метаболизм клеток, хотя актуальность такой постановки вопроса очевидна с точки зрения анализа возможной роли цианобактерий в эволюции гормональной системы растений.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы являлось обнаружение и изучение цитокинин-связывающих (ЦСБ) и АБК-связывающих (АСБ) белков цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 для выяснения возможной роли цианобактерий в эволюции гормональной системы растений. В соответствии с поставленной целью задачами работы было:

- 1) Выделить цитокинин- и АБК-связывающие белки из *Synechocystis*;
- 2) Изучить свойства выделенных белков;

3) Изучить возможность участия выделенных белков в регуляции транскрипции *in vitro* в лизате цианобактерий.

**Научная новизна работы.** Впервые показано присутствие цитокинин-связывающего белка (ЦСБ 67) в клетках цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803. Охарактеризовано его взаимодействие с природным цитокинином *транс*-зеатином. Установлена активация в присутствии *транс*-зеатина и ЦСБ 67 тотальной транскрипции *in vitro* в лизате цианобактерий.

Впервые установлено присутствие в клетках цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 АБК-связывающих белков (23, 50, 60 и 67 кДа) и гомолога АБК-связывающего белка растений Cpr2.1, который кодируется АБК-регулируемым геном. Установлена активация в присутствии АБК-связывающего белка транскрипции *in vitro* в лизате цианобактерий.

Полученные результаты указывают на возможность присутствия у цианобактерий молекулярных мишеней действия гормонов растений цитокининов и АБК. Это представляет интерес с точки зрения фундаментальной проблемы – эволюции становления гормональной системы растений. Полученные результаты указывают на возможность привнесения в растительную клетку регуляторных систем цитокинина и АБК с древними цианобактериями – предшественниками хлоропластов.

Полученная информация вносит вклад в фундаментальную проблему физиологии и биохимии растений – происхождение гормональной системы растений в процессе эволюции. Полученные результаты могут быть использованы при подготовке лекционного материала по физиологии, биохимии и эволюции растений.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на конференции «Физиология растений - фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2006), Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), III Всероссийской конференции-школе «Высокоактивные интермедиаты химических реакций и биологических процессов» (Астрахань-Москва, 2007), Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009), XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2009» (Москва, 2009), XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2010» (Москва, 2010) и на Всероссийской (с международным участием) конференции молодых ученых, посвященной 90-летию Уральского государственного университета им. А.М. Горького «Биология будущего: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2010).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и их

обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 117 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы, 16 рисунков. Список литературы содержит 166 наименований, из которых 140 на иностранном языке.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектом исследования** являлся штамм цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 («Du Pont», США), полученный из Национального института общей биологии (Оказати, Япония), и предоставленный нам профессором Д.А. Лосем заведующим лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН.

Цианобактерии культивировали фотоавтотрофно в стерильных условиях на среде BG11, при температуре 34°C, при постоянном освещении 70 мкмоль/м<sup>2</sup>с<sup>-1</sup> М квантов света и барботировании газо-воздушной смесью, содержащей 2 % CO<sub>2</sub>, в течение трех дней.

**Выделение цитокинин-связывающих и АБК-связывающих белков.** Для исследований использовали водорастворимую фракцию лизата *Synechocystis*. Клетки разрушали механически с помощью стеклянных бус G4649 («Sigma») в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl и 4 мМ 2-меркаптоэтанола, затем центрифугировали при 160000 g в течение 2 часов при 4°C. Для выделения ЦСБ и АСБ на первом этапе использовали гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе. Фракцию белков в буфере выделения с добавлением NaCl до концентрации 2 М наносили на колонку (размер колонки 2.6x12 см) с фенил-сефарозой CL-4В («GE Healthcare»), уравновешенную буфером 50 мМ трис-НСl (рН 7.7), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ NaCl. Несвязавшиеся белки удаляли промывкой фенил-сефарозы тем же буфером. Элюцию белков, связавшихся с фенил-сефарозой, проводили последовательно: 1) нисходящим градиентом NaCl в концентрации от 2 до 0 М в 20 мМ трис-НСl (рН 7.7); 2) 20 мМ трис-НСl рН (7.7); 3) Н<sub>2</sub>О<sub>дист.</sub> Все элюируемые фракции тестировали на содержание цитокинин- и АБК-связывающих белков с помощью антиидиотипических антител (АТ<sub>а-и</sub>) к *транс*-зеатину и АБК.

Цитокинин-связывающие белки *Synechocystis* выделяли из очищенной на фенил-сефарозе фракции лизата двумя методами. При выделении методом аффинной хроматографии использовали зеатин-сефарозу, полученную иммобилизацией зеатинрибозиды на АН-сефарозе 4В («GE Healthcare») периодатным методом (Moore, 1979) (размер колонки 2.6x6 см). Матрикс предварительно уравновешивали 20 мМ трис-НСl (рН 7.7) с 0.2 М NaCl, после чего наносили фракцию белков. Несвязанные белки отмывали тем же буфером, затем 1 М NaCl в 50 мМ трис-НСl (рН 8.3). Элюцию проводили 0.2 М NaOH, либо *транс*-зеатином в концентрации 10<sup>-5</sup> М в буфере, содержащем 1 М NaCl в 50 мМ трис-НСl (рН 8.3). При выделении ЦСБ методом иммуноаффинной хроматографии использовали моноклональные АТ (мкАТ) к ЦСБ 70 кДа из этиолированных проростков кукурузы, предоставленные к.б.н. Ф.А Бровка

(филиал Института биоорганической химии им. академиков Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН, Пущино). мкАТ<sub>ЦСБ70</sub> иммобилизовали на CNBr-активированную сефарозу 4В («GE Healthcare») согласно методическим рекомендациям фирмы «GE Healthcare». Фракцию гидрофобных белков наносили на колонку (размер колонки 1.4x3 см) в буфере, содержащем 50 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ трис-HCl (pH 8.0). Элюцию проводили 0.2 N NH<sub>4</sub>OH.

Выделение АБК-связывающих белков проводили методом аффинной хроматографии. Для этого АБК иммобилизовали на АН-сефарозу 4В («GE Healthcare») (Ковалев *и др.*, 1982). АБК-сефарозу (размер колонки 1.4x3.4 см) уравнивали 20 мМ трис-HCl (pH 7.7) с 0.2 М NaCl, после чего наносили фракцию гидрофобных белков. Несвязанные белки отмывали тем же буфером, затем 1 М NaCl в 50 мМ трис-HCl (pH 7.7). Элюцию проводили 0.2 М NaOH, либо АБК в концентрации 10<sup>-5</sup> М в буфере, содержащем 1 М NaCl в 50 мМ трис-HCl (pH 8.3).

**Детектирование цитокинин-связывающих и АБК-связывающих белков методом твердофазного иммуно-ферментного анализа (ИФА).** На всех этапах работы присутствие ЦСБ и АСБ определяли с помощью антиидиотипических антител к гормонам: АТ<sub>а-и</sub> к *транс*-зеатину, которые являются АТ к зеатин-связывающему сайту белка и АТ<sub>а-и</sub> к АБК, распознающих АБК-связывающие участки белка. АТ<sub>а-и</sub> были получены, как описано у Moog *et al.* (1985). Детектирование ЦСБ и АСБ проводили в тест-системе твердофазного ИФА. Для этого исследуемую белковую фракцию иммобилизовали при 4<sup>0</sup>С в лунках полистиролового планшета в течение ночи. Лунки промывали ТФС-буфером (20 мМ фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий 150 мМ NaCl и 0.2% Твин 20), после чего в них вносили АТ<sub>а-и</sub> в ТФС-буфере с добавлением 1% овальбумина и инкубировали в течение 1 ч при 37<sup>0</sup>С. После промывки ТФС-буфером и H<sub>2</sub>O<sub>дист.</sub> в систему в том же буфере, что и АТ<sub>а-и</sub> вносили ослиные противокрольчьи иммуноглобулины, меченые пероксидазой хрена («Медгамал», Россия). После инкубации в течение 1 ч при 37<sup>0</sup>С лунки промывали ТФС-буфером и H<sub>2</sub>O<sub>дист.</sub> Активность пероксидазы измеряли, используя в качестве хромогена ортофенилендиамин. Интенсивность хромофорного сигнала измеряли при 490 нм на 8-канальном спектрофотометре вертикального сканирования Titrec Multiscan MCC-340 («Flow Laboratories», Великобритания).

**Исследование свойств выделенных ЦСБ и АСБ.** Наличие глутатион-связывающих сайтов у гормон-связывающих белков определяли с помощью хроматографии на глутатион-сефарозе. Глутатион иммобилизовали на сефарозу 4В («GE Healthcare») (Аберкромби *и др.*, 1988). Белки на колонку (размер колонки 0.6x3 см) наносили в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 7.4), 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА. Элюция проводилась тем же буфером с добавлением 10 мМ дитиотриетолола (ДТТ).

Определение специфичности связывания ЦСБ с цитокинами и АСБ с АБК проводили в конкурентной системе твердофазного ИФА. В лунках полистиролового планшета гормон-связывающие белки иммобилизовали в течение ночи при 4<sup>0</sup>С, лунки отмывали ТФС-буфером. Затем вносили тестируемые на связывание с белками

гормоны в различных концентрациях (АБК, *цис*-, *транс*-зеатин, зеатинрибозид, ИУК, гиббериллин и, кроме того, аденин) вместе с АТ<sub>а-и</sub> к гормону для выяснения способности соединений вытеснять АТ<sub>а-и</sub> из комплекса с белком и инкубировали ночь при 4<sup>0</sup>С. После отмывания ТФС-буфером вносили противокроличьи АТ, меченные пероксидазой хрена («Медгамал», Россия), и измеряли хромофорный ответ при 490 нм на спектрофотометре Multiscan MS («Labsystem», Великобритания).

Электрофорез белков в денатурирующих условиях в 10% ПААГ проводили в системе Лэммли (Laemmli, 1970). Гели окрашивали Кумасси R-250.

Активность гормон-связывающих белков и гормонов в регуляции транскрипции изучались в системе синтеза РНК *in vitro*, представляющей собой водорастворимую фракцию лизата клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803, в котором присутствовали ДНК, РНК-полимераза, белковые факторы, необходимые для процесса транскрипции (Селиванкина и др., 2006). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике RIA GAMMA-1271 («ЛКВ», Швеция).

Изоэлектрическое фокусирование ЦСБ проводили на приборе MicroRotofor (Bio-Rad) с использованием амфолитов диапазона 3-10 рН по протоколу Bio-Rad.

**Электроперенос и иммуноблоттинг.** Белки для иммуноблоттинга с незафиксированного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C полусухим способом на приборе Multifor II Novablot («ЛКВ», Швеция) Перенос проводили, в 50 mM Na-боратном буфере (рН 9.0) с 20% метанолом (анод) и 5% метанолом (катод). Окраску белков на мембране проводили смесью 19 мл 0.1% КJ в 0.1 М HCl и 1 мл 1% хлорамина-Т в метаноле. Проявка окраски осуществлялась 0.1%-ным водным раствором крахмала. Иммуноблоттинг проводили с различными АТ, для идентификации взаимодействия использовались вторичные противокроличьи флуоресцирующие АТ (НИИЭМ, Россия). Сканирование мембраны проводили на многофункциональном сканере Typhoon («GE Healthcare», США).

**Для идентификации ЦСБ методом MALDI масс-спектрометрии**, проводили одномерный или двумерный электрофорез белков в ДДС-Na-ПААГ. Трипсинолиз белка в геле, получение MALDI масс-спектров проводили в лаборатории протеомики Института физико-химической медицины РАМН, Москва. Идентификация белков осуществлялась с использованием поисковой системы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (Perkins *et al.*, 1999) в доступной базе данных NCBI для *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Все эксперименты проводили не менее, чем в трех повторностях. В работе приводятся типичные данные, полученные методами хроматографии и электрофореза. Для данных ИФА и измерений транскрипционной активности представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки (Лакин, 1973).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение и характеристика ЦСБ *Synechocystis*.** Для выделения ЦСБ использовали фракцию лизата клеток *Synechocystis*, очищенную от мембран центрифугированием при 160000 g в течение 2 часов. Для очистки ЦСБ использовали подходы, которые применялись при выделении ЦСБ из разных растительных объектов (Каравайко и др., 1995).

Присутствие ЦСБ во фракциях, снимаемых с колонки, определяли с помощью антиидиотипических антител ( $AT_{a-n}$ ) к зеатину, которые можно рассматривать как АТ к гормон-связывающему сайту белков (Marx, 1985).

На первом этапе очистки белки лизата фракционировали методом гидрофобной хроматографии. При гидрофобном фракционировании белков *Synechocystis* водорастворимую фракцию лизата наносили на фенил-сефарозу в присутствии 2 М NaCl. Фракционирование связанных белков проводили нисходящим градиентом NaCl от 2 до 0 М. Присутствие ЦСБ в полученных фракциях определяли в условиях твердофазного ИФА по взаимодействию белков с  $AT_{a-n}$  к зеатину. Контролем служила неиммунная сыворотка.

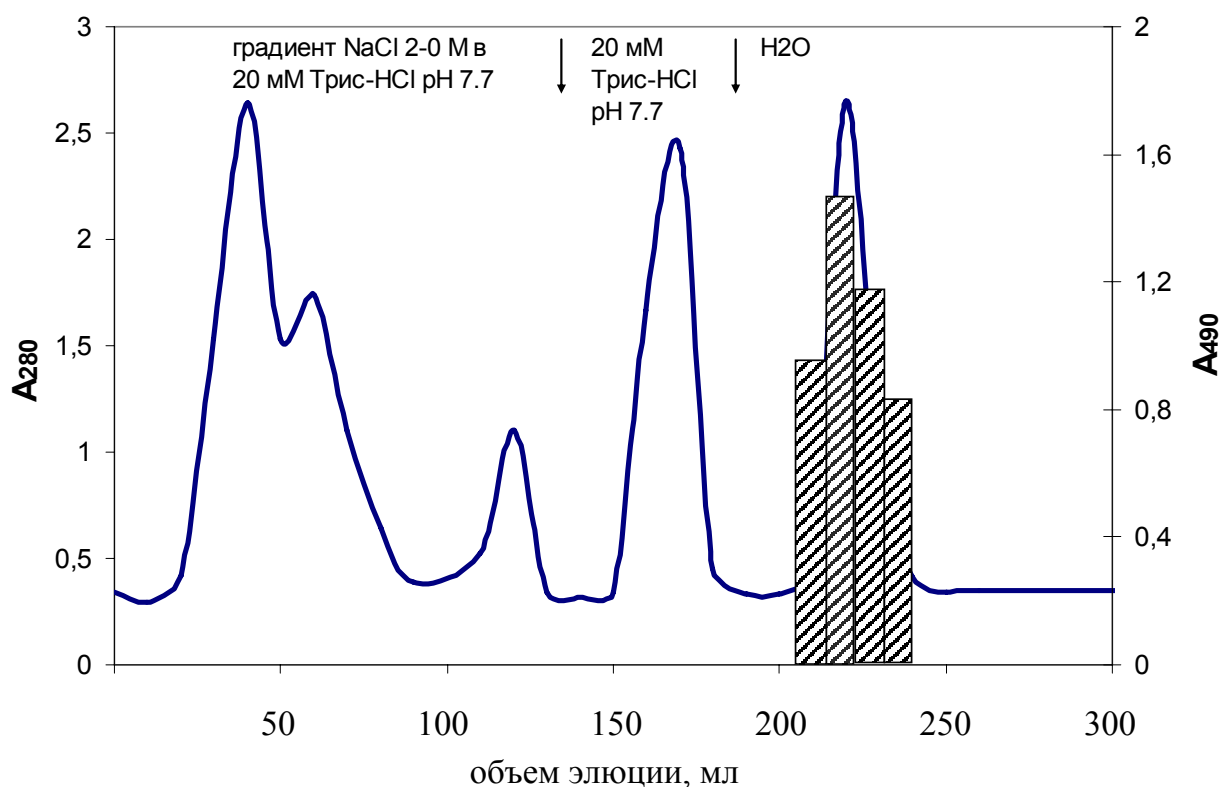
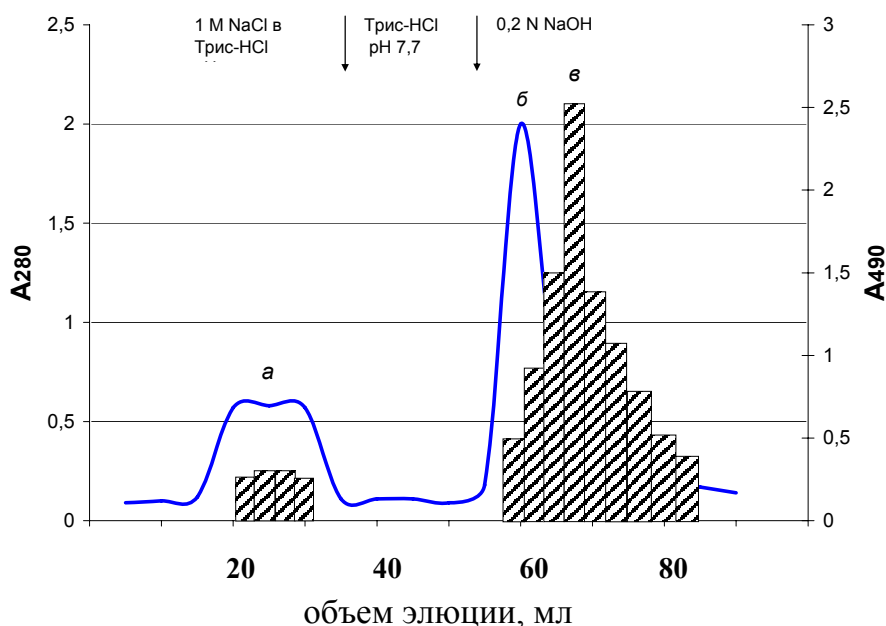


Рис. 1. Фракционирование водорастворимой белковой фракции лизата *Synechocystis* методом гидрофобной хроматографии. Профиль элюции белков с колонки (сплошная линия,  $A_{280}$ ); результаты ИФА с  $AT_{a-n}$  к зеатину (заштрихованные столбики,  $A_{490}$ ).

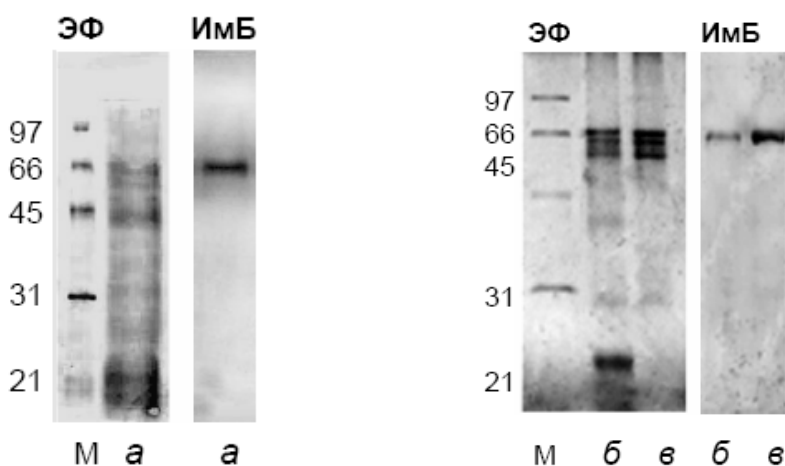
Как видно на рис. 1, взаимодействие белков с  $AT_{a-n}$  к зеатину наблюдалось только во фракциях, элюированных H<sub>2</sub>O<sub>дист.</sub> Эти данные хорошо согласуются с представлением о том, что цитокинин-связывающие сайты должны иметь определенную степень гидрофобности, ввиду гидрофобности самой структуры



цитокининов (Fox, 1992). С контрольной неиммунной сывороткой все белковые фракции, выделенные при фракционировании, не взаимодействовали.



**А**



**Б**

**В**

Рис. 2. Выделение и очистка ЦСБ *Synechocystis* методом аффинной хроматографии. **А:** Профиль элюции с зеатин-сефарозы (сплошная линия,  $A_{280}$ ); результаты ИФА с  $AT_{a-i}$  к зеатину (заштрихованные столбики,  $A_{490}$ ); **Б:** ЦСБ, элюируемые с зеатин-сефарозы 1 М NaCl (*а*); **В:** ЦСБ, элюируемые с зеатин-сефарозы 0.2 М NaOH: пик элюции белка с колонки (*б*), пик взаимодействия ЦСБ с  $AT_{a-i}$  к зеатину (*в*), М – белковые маркеры. ЭФ – электрофорез в ДДС-Na-ПААГ; ИмБ – иммуноблот с  $AT_{a-i}$  к зеатину.

Для дальнейшей работы по очистке и идентификации ЦСБ из растворимой фракции лизата *Synechocystis* мы использовали фракцию, элюируемую с фенол-сефарозы водой, где присутствовали цитокинин-связывающие белки.

На следующем этапе выделения ЦСБ использовали аффинную хроматографию на зеатин-сефарозе. Очищенный на фенол-сефарозе препарат белков наносился на зеатин-сефарозу, где зеатинрибозид был иммобилизован через рибозу в 9-м положении пуринового кольца и активная часть зеатина оставалась свободной для взаимодействия с белками.

На рис. 2.А приведены профиль элюции белков с

зеатин-сефарозы и данные проверки каждой фракции на взаимодействие белков с  $AT_{a-i}$  к зеатину. Для элюции белков, связавшихся с зеатин-сефарозой, были использованы 1 М NaCl в 20 мМ трис-НСl (рН 7.4) и 0.2 М NaOH.

Тестирование полученных фракций с помощью АТ<sub>а-и</sub> показало, что фракции, элюируемые NaCl, слабо взаимодействовали с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, а при элюции 0.2 М

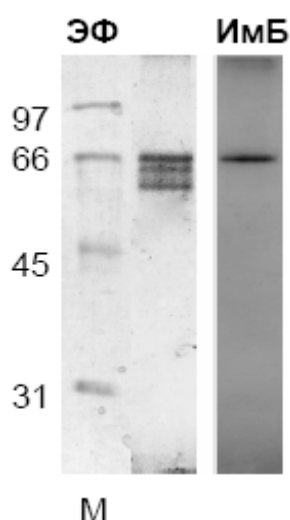


Рис. 3. Выделение ЦСБ 67 кДа методом аффинной хроматографии. ЭФ – электрофорез в ДДС-Na-ПААГ; М-белковые маркеры; ИмБ – иммуноблот с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину.

NaOH было обнаружено активное взаимодействие, причем пик поглощения A<sub>280</sub> и пик взаимодействия белков с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину не совпадали. Все элюируемые с зеатин-сефарозы фракции не взаимодействовали с неиммунной сывороткой. При дальнейшем анализе фракций ЦСБ при помощи электрофореза в ДДС-Na-ПААГ и иммуноблотинга с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину было показано, что в пике элюируемых 1 М NaCl в трис-HCl (pH 7.4) присутствует ряд ЦСБ, однако взаимодействует с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину только полипептид с молекулярной массой 67 кДа (рис. 2.Б).

При элюции белков 0.2 М NaOH мы проанализировали полипептидный состав фракции пика выхода белков с колонки (A<sub>280</sub>) и последующие за пиком фракции. В пике элюции присутствуют несколько полипептидов с молекулярными массами ниже 43 кДа (рис. 2.В). В последующих за пиком элюции фракциях, в основном присутствуют три полосы полипептидов в районе 67-60 кДа. С АТ<sub>а-и</sub> к зеатину в обоих случаях взаимодействуют полипептиды с молекулярными массами в районе 67 кДа. В связи с этим, в дальнейшей работе мы старались использовать

именно эти фракции ЦСБ.

Кроме того, специфичность белков, связавшихся с зеатин-сефарозой проверяли путем элюции их гормоном – зеатином в концентрации 10<sup>-5</sup> М в 1 М NaCl в трис-HCl (pH 8.4). В данном случае вытеснение ЦСБ с матрицы происходило конкурентным способом за счет его сродства к гормону. Так как присутствие зеатина в элюирующихся с колонки фракциях ЦСБ не позволяло визуализировать профиль элюции в A<sub>280</sub>, отбирали фракции, взаимодействующие с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину в системе ИФА.

Дальнейший анализ этих фракций при помощи электрофореза в ДДС-Na-ПААГ показал, что в них присутствуют три полосы полипептидов с молекулярной массой в районе 67-60 кДа (рис. 3). Иммуноблот с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину позволил выделить так же лишь одну полосу, с молекулярной массой в районе 67 кДа.

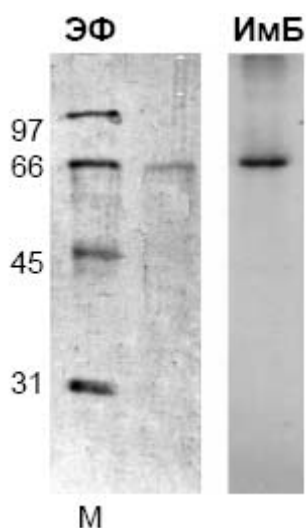


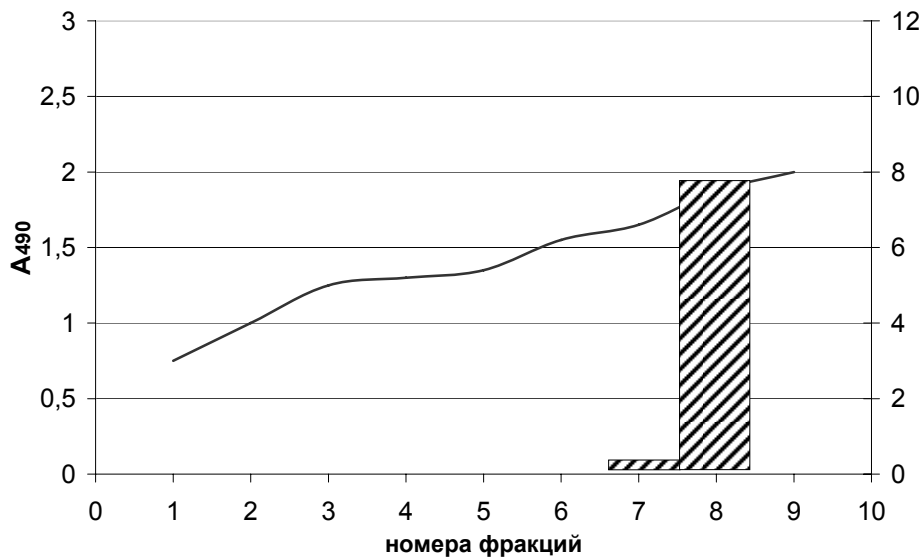
Рис. 4. Выделение ЦСБ 67 кДа методом иммуоаффинной хроматографии. ЭФ – электрофорез в ДДС- $\text{Na}$ -ПААГ; М-белковые маркеры; ИмБ – иммуоблот с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину.

Для выделения и очистки ЦСБ мы использовали также другой подход, где на сефарозу были иммобилизован не гормон – зеатин, а моноклональные АТ к ЦСБ 70 кДа (мкАТ<sub>ЦСБ 70</sub>) из этиолированных проростков кукурузы, предоставленные коллегами из филиала Института биоорганической химии им. академиков Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН, Пущино.

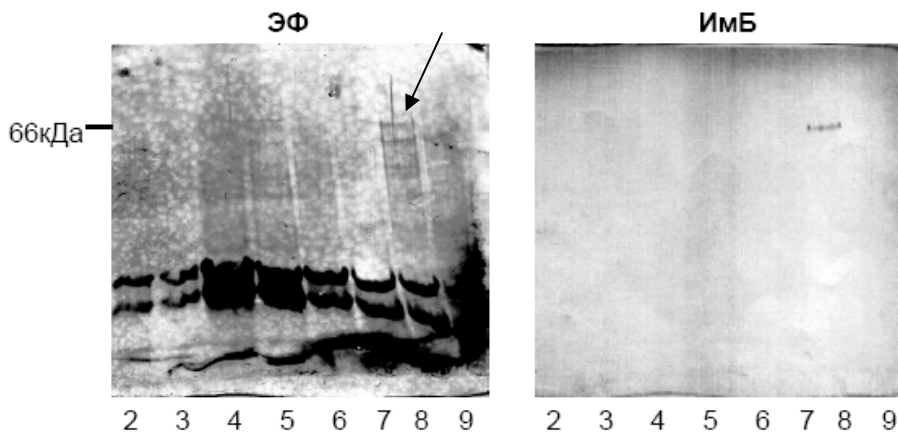
Для выделения ЦСБ из водорастворимой гидрофобной фракции лизата *Synechocystis* использовали иммобилизованные мкАТ на сефарозе 4В. Элюцию белков проводили 0.2 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Фракции, содержащие ЦСБ анализировали при помощи электрофореза в ДДС- $\text{Na}$ -ПААГ и иммуоблота. При данном методе, ЦСБ на колонке связываются за счет взаимодействия со специфическими иммуноглобулинами, полученными на структуру ЦСБ 70 кДа, а не за счет связывания с гормоном, как на зеатин-сефарозе.

На рис. 4 показано, что электрофорез и иммуоблот фракции белков, выделенной с помощью иммуоаффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованными мкАТ<sub>ЦСБ70</sub> позволили выделить единственный полипептид с массой ~ 67 кДа.

Таким образом, с помощью двух типов АТ, а именно – АТ, полученных к гомологичному ЦСБ 70 кДа из проростков кукурузы и АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, которые взаимодействуют с цитокинин-связывающим сайтом белка, был выявлен один и тот же полипептид с массой около 67 кДа. Кроме того, этот полипептид связывается с зеатином, иммобилизованным на сефарозе.



**А**



**Б**

Рис. 5. Изоэлектрическое фракционирование растворимой белковой фракции лизата *Synechocystis* в растворе в нативных условиях. **А:** взаимодействие фракций с АТ<sub>а-1</sub> к зеатину (столбики); рН (сплошная линия); **Б:** ЭФ – электрофорез в ДДС-Na-ПААГ; ИмБ – иммуноблот с АТ<sub>а-1</sub> к зеатину на нитроцеллюлозе; 2-9 – белковые фракции. 1 и 10 фракции с крайними значениями рН, не взаимодействующие с АТ<sub>а-1</sub> к зеатину при проведении твердофазного ИФА, не учитывались.

очищенной на фенил-сефарозе белковой фракции позволило сконцентрировать ЦСБ в одной фракции № 8 с рН 7.5, то есть сконцентрировать в 10 раз и очистить от белков, имеющих другие значения рI.

Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях позволил выявить 2 полипептида с молекулярной массой ~ 67 кДа во фракции № 8, большое количество фикоцианина во всех фракциях и, в особенности, во фракции № 5 и нескольких полипептидов с массами значительно меньшими, чем 67 кДа в других фракциях.

Для выделения и очистки ЦСБ мы использовали так же изоэлектрическое фокусирование (диапазон амфолитов 3-10 рН) в нативных условиях с помощью прибора MicroRotorfor (BioRad, США). Для разделения мы использовали сконцентрированную фракцию белков, связывавшуюся с фенил-сефарозой и элюированную водой и получили 10 белковых фракций. Для каждой из 10 полученных фракций, мы определяли рН, связывание с АТ<sub>а-1</sub> к зеатину, проводили электрофорез и иммуноблот.

На рис. 5.А представлены результаты разделения фракций белка в системе Rotorfor. Как видно на рисунке, фракционирование растворимой и

Иммуноблотинг с помощью АТ<sub>а-и</sub> к зеатину выявил только один пептид массой ~ 67 кДа в 8-й фракции (рис. 5.Б). Таким образом, с помощью системы Rotofog нами в нативных условиях был с помощью АТ<sub>а-и</sub> к зеатину идентифицирован ЦСБ 67 кДа, который соответствовал белку, полученному с помощью аффинной хроматографии на зеатин-сефарозе и иммуноаффинного матрикса с мкАТ<sub>ЦСБ70</sub>.

#### Исследование свойств выделенного ЦСБ.

Для исследования специфичности взаимодействия полипептида 67 кДа с зеатином, мы использовали конкурентную систему твердофазного ИФА, в которой ЦСБ 67 сенсibilизировали в лунках полистиролового планшета, а различные концентрации гормонов (от 10<sup>-5</sup> до 10<sup>-9</sup> М) вводили в тест-систему одновременно с очищенными моноспецифическими АТ<sub>а-и</sub>, что приводило к конкуренции АТ<sub>а-и</sub> с гормоном за образование комплекса с белком.

A<sub>490</sub>, % от контроля

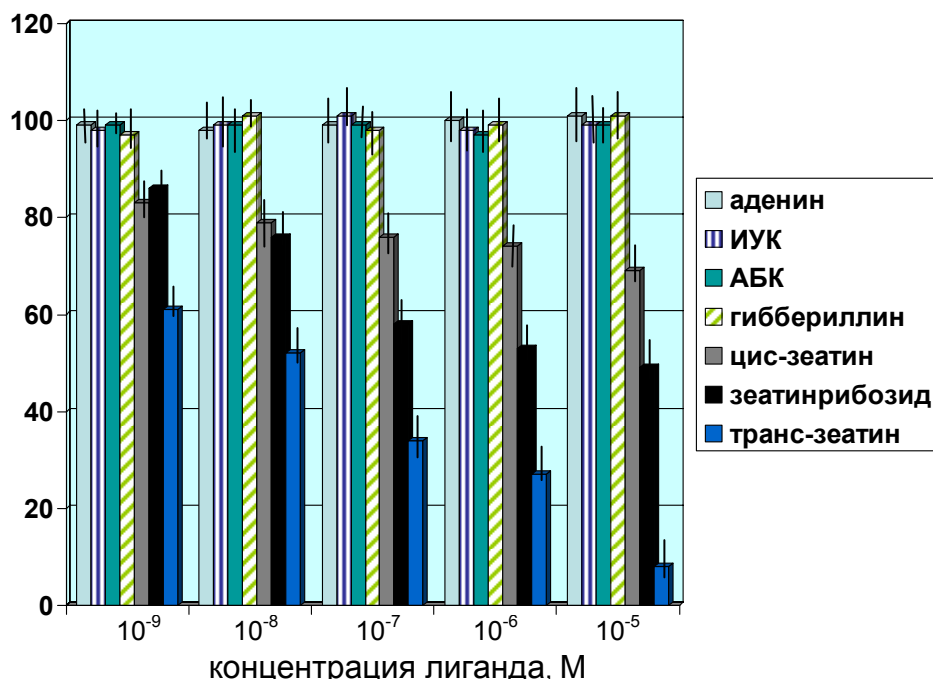


Рис.6. Действие различных фитогормонов на связывание ЦСБ *Synechocystis* с моноспецифическими АТ<sub>а-и</sub> к зеатину в системе твердофазного ИФА.

цитокенинов и физиологическая роль которого изучена недостаточно, в системе вытеснения показал наименьшее сродство к ЦСБ 67. Зеатинрибозид более активно взаимодействовал с ЦСБ, а физиологически активный *транс*-зеатин активнее всех вытеснял АТ<sub>а-и</sub> из комплекса с белком, причем 50% от максимального вытеснения происходило при концентрации *транс*-зеатина 10<sup>-7</sup> М. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными для ЦСБ 67 кДа из листьев ячменя (Земляченко *и др.*, 1997) и данными для ЦСБ 65 кДа хлоропластов листьев ячменя (Люкевич *и др.*, 2002).

Как видно на рис. 6, индолилуксусная кислота (ИУК), гиббериллин и абсцизовая кислота и не обладающий цитокининовой активностью аденин, не связывались с сайтом связывания зеатина ЦСБ и в силу этого не снижали взаимодействия ЦСБ с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину. *Цис*-зеатин, который обладает особым положением среди

Таким образом, выделенный из *Synechocystis* ЦСБ 67 проявляет способность специфически связываться с цитокининами и не связывается с другими гормонами (АБК, ИУК, гиббериллин) и неактивным предшественником цитокининов – аденином. Сродство ЦСБ 67 *Synechocystis* к различным формам цитокининов соответствуют физиологической активности этих форм в растениях.

Для характеристики выделенных нами ЦСБ *Synechocystis* мы исследовали их способность участвовать в регуляции транскрипции *in vitro*. Для этого в качестве транскрипционной системы использовали лизат *Synechocystis* и лизат хлоропластов из листьев ячменя. Все исследования транскрипционной активности проводились сотрудником лаборатории экспрессии генома растений Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН к.б.н. С.Ю. Селиванкиной по методу, описанному ранее (Селиванкина *и др.*, 1997, 2006).

Таб. 1. Действие *транс*-зеатина, ЦСБ, выделенных из растворимой фракции *Synechocystis*, по-отдельности, а также совместно на активность транскрипции *in vitro* *Synechocystis*. И действие ЦСБ *Synechocystis* в транскрипционной системе хлоропластов ячменя.

Транскрипционная система	Вариант опыта	Включение <sup>3</sup> H-АМФ в РНК имп./мин 10 мкг ДНК	Активация транскрипции, проценты от контроля
лизат <i>Synechocystis</i>	Контроль	22514±1090	100
лизат <i>Synechocystis</i>	аденин 10 <sup>-7</sup> М	22731±1101	102
лизат <i>Synechocystis</i>	<i>транс</i> -зеатин 10 <sup>-7</sup> М	63612±3140	283
лизат <i>Synechocystis</i>	ЦСБ, 10 мкг	45361±2530	202
лизат <i>Synechocystis</i>	ЦСБ, 10 мкг + <i>транс</i> -зеатин 10 <sup>-7</sup> М	83999±4106	373
лизат хлоропластов ячменя	ЦСБ, 10 мкг	51214±2810	215

Как видно из таб. 1, один *транс*-зеатин в подобранной в предварительных опытах концентрации значительно увеличивал активность транскрипции в транскрипционной системе *Synechocystis*, в то время как аденин не влиял на активность реакции, что позволяет предположить, что в ней присутствовала мишень для действия *транс*-зеатина. Один препарат ЦСБ в то же время активировал транскрипцию в два раза, следовательно, в транскрипционной системе *Synechocystis* присутствовали все необходимые для его действия компоненты. Добавление в транскрипционную среду *Synechocystis* ЦСБ совместно с *транс*-зеатином вызывало наибольшее повышение транскрипции. Кроме того, ЦСБ *Synechocystis* активировал транскрипцию в лизате хлоропластов листьев ячменя. Это говорит о том, что ЦСБ

*Synechocystis* может участвовать в гормон-зависимой регуляции транскрипции цианобактерий и хлоропластов.

Показано, что регуляция транскрипции может осуществляться с помощью факторов транскрипции, связывание которых с ДНК зависит от тиол-восстанавливающих агентов (Trou *et al.*, 2002). В связи с этим для дальнейшей характеристики ЦСБ 67 *Synechocystis* мы попытались выявить наличие у белка глутатион-связывающих сайтов. При хроматографии на глутатион-сефарозе очищенной на фенил-сефарозе белковой фракции *Synechocystis* 10 мМ ДТТ был выделен полипептид, который связывался с очищенными моноспецифическими АТ<sub>а-н</sub> к зеатину и имел молекулярную массу 67 кДа. Таким образом, ЦСБ 67 *Synechocystis* имеет еще и сайт связывания с глутатионом, что может быть важным для проявления его функциональной активности в клетке.

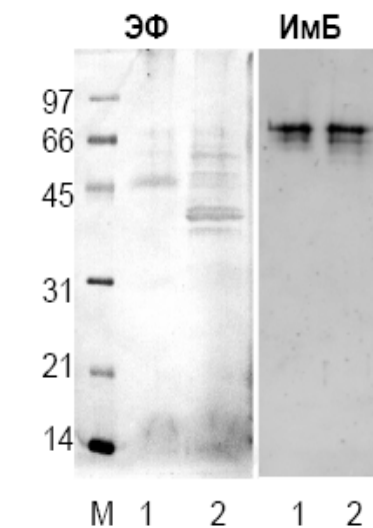
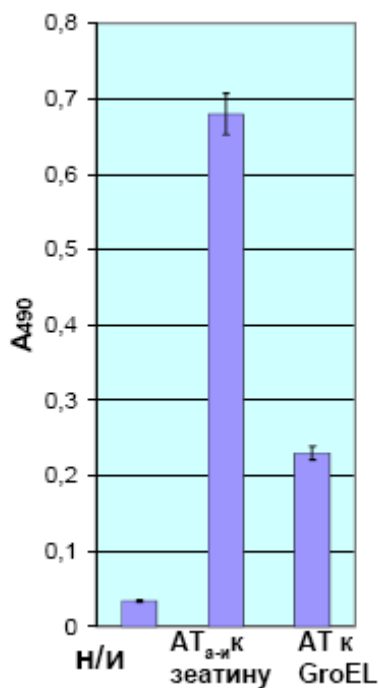
**Идентификация белков в препаратах ЦСБ.** После очистки и концентрации ЦСБ методами, описанными выше, проводили одномерный электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях. Полипептиды, связывающиеся с АТ<sub>а-н</sub> к зеатину, передавались для MALDI-TOF масс-спектрометрии в лабораторию протеомики ИФХМ РАН (Москва). Кроме того, альтернативно белковые фракции передавали в лабораторию протеомики ИФХМ РАН, где они подвергались дополнительной очистке (Rotofor) и двумерному электрофорезу на стрипах BioRad (pH 3-10) по методике производителя. В этом случае так же белки исследовались методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные спектры анализировались с помощью доступной поисковой системы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (Perkins *et al.*, 1999) в базе данных NCBI nr для *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Как показал анализ результатов, в исследуемом материале с высокой степенью покрытия был определен белок шаперонин 60 кДа (Hsp60, GroEL) *Synechocystis*.

Для подтверждения данных масс-спектрометрии, мы использовали поликлональные АТ к GroEL *Escherichia coli*, предоставленные нам профессором Д.А. Лосем (лаборатория молекулярных основ внутриклеточной регуляции Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им К. А. Тимирязева РАН).

Препарат ЦСБ, выделенный из клеток *Synechocystis* с помощью аффинной хроматографии на зеатин-сефарозе, исследовали на способность связывания с АТ к GroEL в системе твердофазного ИФА и с помощью иммуноблотинга после ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях.

Как видно на рис. 7.А, АТ к GroEL в системе твердофазного ИФА выявляли присутствие в препарате ЦСБ *Synechocystis* шаперонина 60.



**А**

**Б**

Рис. 7. Взаимодействие препарата ЦСБ *Synechocystis* с АТ к GroEL *E. coli*. **А:** В системе твердофазного ИФА (A<sub>490</sub>). **Б:** Методом иммуноблота. ЭФ – электрофорез в ДДС-Na-ПААГ; М-белковые маркеры; ИмБ – иммуноблот с АТ к GroEL. 1- ЦСБ, элюированные зеатином 10<sup>-5</sup>М; 2- ЦСБ, элюированные щелочью.

Как видно на рис. 7.Б., в препарате ЦСБ *Synechocystis* элюированном как *транс*-зеатином, так и щелочью, обнаруживался полипептид, взаимодействующий с АТ к GroEL с молекулярной массой ~ 67 кДа.

Полученные данные говорят о том, что в препарате ЦСБ 67 кДа *Synechocystis*, который связывается с зеатином и с АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, присутствуют белки-шаперонины с высокой гомологией к GroEL, позволяющей детектировать их с помощью АТ к GroEL.

Для понимания полученных результатов необходимо было выяснить способен ли сам GroEL взаимодействовать с цитокинами и АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, то есть имеет ли он сайт связывания с гормоном.

Для проверки этого, мы исследовали очищенный белок GroEL, из *Escherichia coli*, который был предоставлен нам коллегами из Института биоорганической химии им. академиков Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН, Пущино. Для этого препарат GroEL *E. coli*, разделяли с помощью ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях и проводили иммуноблотинг с полиспецифической сывороткой, содержащей АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, с очищенными моноспецифическими АТ<sub>а-и</sub> к зеатину, с АТ к зеатину и с неиммунной сывороткой. Ни одни из исследуемых АТ не взаимодействовали с полосой GroEL. Это указывает на то, что GroEL не имеет ни сайта связывания цитокина, ни эпитопов взаимодействия с исследуемыми АТ.

Добавление GroEL в конкурентную систему определения зеатина показало отсутствие его взаимодействия с зеатином, сенсibilизированном на планшете.

Таким образом, ЦСБ 67 методом MALDI-TOF масс-спектрометрии достоверно определен не был, по-видимому, вследствие его малого количества в пробах. Однако, при всех использованных методах выделения и очистки ЦСБ 67 в полученных препаратах присутствовал шаперонин 60, который не обладает цитокинин-связывающими свойствами. Показано, что функции шаперонинов в клетке



разнообразны, от фолдинга белков (Hemmingsen, 1988; Cheng, 1989; Vochkareva et al., 1992; Vochkareva, Girshovich, 1992;) до участия в регуляции гормон-рецепторного взаимодействия (Scherrer et al., 1992). Возможное влияние шаперонина 60 на функции ЦСБ 67 должно быть исследовано в дальнейшем.

**Выделение и определение биохимических и функциональных характеристик АСБ *Synechocystis*.** Для выделения АСБ использовали водорастворимую фракцию лизата *Synechocystis*. Проведение гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и анализ фракций с АТ<sub>а-и</sub> к АБК проводились

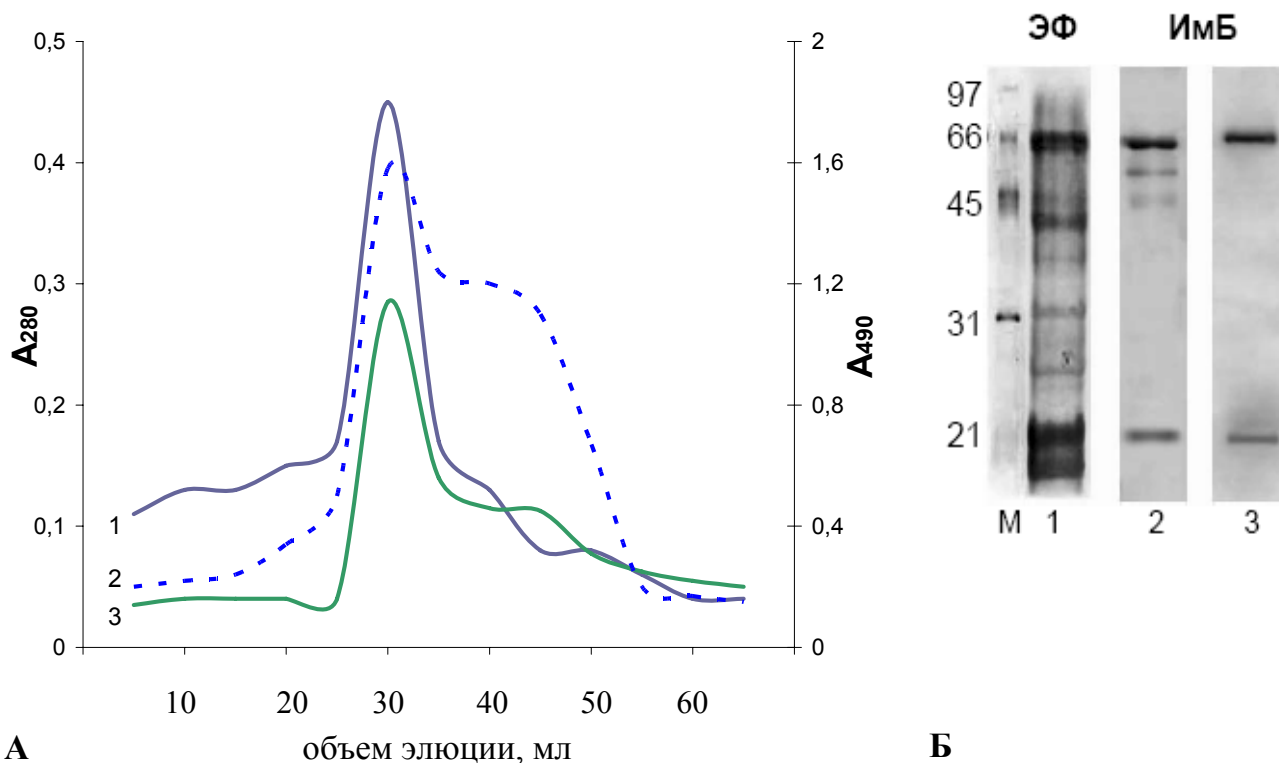


Рис. 8. Выделение и очистка АСБ *Synechocystis* методом аффинной хроматографии на АБК-сефарозе. **А:** Элюция АСБ с АБК-сефарозы 0.2 N NaOH и ИФА белковых фракций: **1**-профиль элюции (A<sub>280</sub>); **2**-взаимодействие с АТ к CIP2.1; **3**-взаимодействие с АТ<sub>а-и</sub> к АБК. **Б:** ЭФ - электрофорез в ДДС-Na-ПААГ. М-белковые маркеры; фракция АСБ, элюированная 0.2 М NaOH (1); ИмБ – иммуноблот с АТ<sub>а-и</sub> к АБК(2) и АТ к CIP 2.1 (3).

аналогично описанным для ЦСБ. Было показано наличие АБК-связывающих белков в гидрофобной фракции, элюируемой водой. Эта фракция использовалась в дальнейшей работе. Белки этой фракции наносили на колонку с сефарозой с иммобилизованной АБК. Несвязавшиеся белки отмывали буфером. АСБ с колонки элюировались 0.2 N NaOH (рис. 8) и АБК (10<sup>-5</sup>М) (рис. 9), аналогично методикам, применяемым для выделения ЦСБ. При проведении элюции 0.2 N NaOH, элюцию белков с колонки контролировали с помощью проточного спектрофотометра A<sub>280</sub> (рис. 8.А, линия 1). Присутствие АСБ в пробах определяли с помощью АТ<sub>а-и</sub> к АБК (рис. 8.А, линия 2). В качестве контроля использовали неиммунную сыворотку. Далее фракции АСБ исследовали с помощью ЭФ и иммуноблотинга.

Кроме того, для анализа полученных фракций АСБ нами были использованы поликлональные АТ к N-концевому фрагменту АБК-связывающего белка *Cip2.1 Lupinus luteus* (люпина желтого) (Демиденко, 2010). *Cip2.1* является продуктом гена, экспрессия которого в значительной степени положительно регулируется абсцизовой кислотой и незначительно подавляется цитокинином.

На рис. 8.А (линия 3) показано взаимодействие белковых фракций с АТ к *Cip2.1*. В качестве контроля использовали неиммунную сыворотку, взаимодействие которой с белками не проявлялось, что говорит о специфическом взаимодействии использованных нами иммунных сывороток с белками препарата.

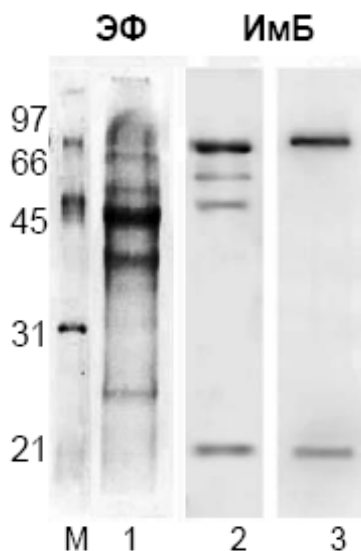


Рис. 9. Выделение АСБ методом аффинной хроматографии. АСБ, элюированные АБК (1); ЭФ – электрофорез в ДДС-Na-ПААГ; М-белковые маркеры; ИмБ – иммуноблот с АТ<sub>а-и</sub> к АБК (2) и АТ к *Cip2.1* (3).

На рис. 8.Б показано, что АТ<sub>а-и</sub> к АБК взаимодействовали с полипептидами, имеющими молекулярные массы 23, 50, 60 и 67 кДа, что указывает на АБК-связывающие свойства этих полипептидов.

Среди белков, элюированных с АБК-сефарозы, идентифицируются два полипептида, связывающиеся с поликлональными АТ к *CIP2.1*. Это говорит о том, что в *Synechocystis* присутствуют полипептиды, имеющие сходные иммунодетерминанты с *CIP2.1*, кроме того, молекулярная масса белка 73 кДа соответствует молекулярной массе полноразмерного *CIP2.1* белка *Lupinus luteus*, а 23 кДа соответствует массе фрагмента *CIP2.1*, на который были получены АТ. Можно предположить, что присутствующий в *Synechocystis* гомолог белка *CIP2.1* частично разрушился в процессе проведения электрофореза, но пептид 23 кДа не утратил способности связываться с АТ к *CIP2.1*.

На рис. 9 представлены электрофореграмма и иммуноблоты АСБ, связавшихся с АБК-сефарозой и элюированных с матрикса АБК ( $10^{-5}$ М). Как видно, с помощью АТ<sub>а-и</sub> к АБК и АТ к *CIP2.1* были выявлены полипептиды с такими же молекулярными массами, что и при элюции щелочью.

Для определения специфичности связывания АСБ *Synechocystis* с АБК провели тест на вытеснение гормоном АТ<sub>а-и</sub> из комплекса с АСБ в твердофазном ИФА. Для этого в лунки полистироловых планшетов были иммобилизованы АСБ, выделенные с помощью аффинной хроматографии на АБК-сефарозе. Далее в лунки добавляли АТ<sub>а-и</sub> к АБК совместно с гормонами в различной концентрации. Гормон, связываясь с иммобилизованным АСБ, вытесняет из комплекса с ними АТ<sub>а-и</sub> к АБК. Как видно на рис. 10, АСБ *Synechocystis* специфично связывались с АТ<sub>а-и</sub> к АБК, присутствие в системе *транс*-зеатина и ИУК не влияло на интенсивность этого взаимодействия. АБК вытесняла АТ<sub>а-и</sub> к АБК из комплекса с АСБ, а увеличение концентрации гормона уменьшало взаимодействие АТ<sub>а-и</sub> к АБК с АСБ, пропорционально ее концентрации.

A<sub>490</sub>, % от контроля

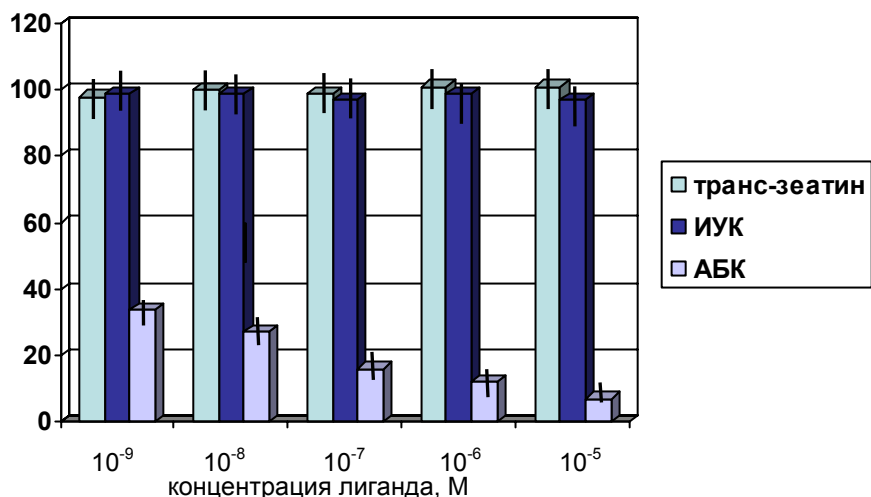


Рис. 10. Действие различных фитогормонов на связывание АСБ *Synechocystis* с моноспецифическими АТ<sub>а-и</sub> к АБК в системе твердофазного ИФА.

Функциональная активность АСБ была исследована по методу, применяемому ранее для характеристики транскрипционной активности ЦСБ *Synechocystis*. При проведении опыта использовали в качестве транскрипционной системы лизат цианобактерий. Непосредственное добавление абсцизовой кислоты в

концентрации 10<sup>-6</sup> М, подобранной в предварительных опытах, в реакционную среду существенно активировало тотальную транскрипцию. АСБ, выделенные с помощью АБК-сефарозы, также повышали активность синтеза РНК (таб. 2). При совместном действии АСБ и абсцизовой кислоты эффект был несколько большим, чем в присутствии только АСБ.

Таб. 2. Действие АБК и АСБ, выделенных из растворимой фракции *Synechocystis*, на активность транскрипции *in vitro* при использовании в качестве транскрипционной системы лизата *Synechocystis*.

Вариант опыта	Включение <sup>3</sup> Н-АМФ в РНК имп./мин 10 мкг ДНК	Активация транскрипции, проценты от контроля
Контроль	13624±6500	100
АБК 10 <sup>-6</sup> М	38383±2100	282
АСБ, 10 мкг	50060±3009	368
АБК 10 <sup>-6</sup> М + АСБ, 10 мкг	57115±3500	420

Полученные результаты позволяют заключить, что в лизате *Synechocystis* присутствовала как мишень для действия одной АБК, так и для АСБ, который активировал транскрипцию почти в три раза.

Поскольку фракция АСБ участвует в активации транскрипции, мы, как и для ЦСБ попытались охарактеризовать их по наличию глутатион-связывающего сайта. Было показано, что фракция АСБ, полученная на АБК-сефарозе и

взаимодействующая с АТ<sub>а-и</sub> к АБК, связывается с глутатион-сефарозой и на электрофореграмме имеет тот же полипептидный состав. Эти данные позволяют заключить, что АСБ *Synechocystis* имеют сайт связывания глутатиона и сайт взаимодействия с АБК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые выделены и охарактеризованы цитокинин-связывающие и АБК-связывающие белки из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, древние предки которой, как предполагают, обеспечили появление хлоропластов в растительной клетке. Для выделения гормон-связывающих белков из цианобактерий были использованы методы, применяемые ранее для растений. Идентификация наличия и характеристики ЦСБ и АСБ проводились с помощью АТ<sub>а-и</sub>, которые, как известно, являются АТ против лиганд-связывающих сайтов белков и широко используются для изучения взаимодействия гормонов с их рецепторами.

В работе проводили выделение ЦСБ с использованием аффинных матриц двух типов. Один матрикс был получен путем иммобилизации зеатина на сефарозу 4В. Второй матрикс был получен путем иммобилизации на сефарозу 4В моноклональных АТ, полученных к ЦСБ кукурузы. Полученные результаты показывают, что с помощью аффинной и иммуноаффинной хроматографии, то есть двумя принципиально различными способами, был выделен ЦСБ 67 *Synechocystis*. Было показано, что цитокинин-связывающий белок не способен образовывать комплекс с другими фитогормонами и неактивным предшественником цитокининов – аденином. Это указывает на высокую специфичность взаимодействия его специфического сайта связывания с *транс*-зеатином. Как показали дальнейшие исследования, этот белок активировал тотальную транскрипцию *in vitro* в лизате *Synechocystis* sp. PCC 6803 и хлоропластов листьев ячменя, и у него было показано наличие глутатион-связывающих сайтов, что может быть важным для проявления его функциональных свойств. Выделенные ранее ЦСБ хлоропластов ряда растений (ячмень, рис, кукуруза, арабидопсис) имели сходные свойства. Молекулярная масса их варьирует в диапазоне 57-70 кДа, выделены они были из растворимой фракции и активировали транскрипцию *in vitro*, а ЦСБ хлоропластов ячменя участвовал в цитокинин-зависимой транскрипции в лизате клеток *Synechocystis*. Кроме того, ЦСБ 67 *Synechocystis* взаимодействовал с мкАТ к ЦСБ 70, которые выявляют ЦСБ хлоропластов кукурузы. Это позволяет думать, что ЦСБ 67 *Synechocystis* и ЦСБ хлоропластов растений принадлежат к древнему консервативному семейству белков, участвующих в регуляторных системах и способных узнавать гормон для проявления активации транскрипции.

При всех использованных методах выделения и очистки, наряду с ЦСБ 67 в полученных препаратах присутствовал шаперонин 60, который, как было показано, не обладает цитокинин-связывающими свойствами. Его возможное влияние на функции ЦСБ 67 должно быть исследовано в дальнейшем.

С помощью метода аффинной хроматографии на АБК-сефарозе нами был выделен ряд АБК-связывающих белков. Фракция этих АСБ была специфична к

абсцизовой кислоте и не взаимодействовала с другими фитогормонами и, как и ЦСБ *Synechocystis* sp. PCC 6803, активировала тотальную транскрипцию *in vitro* в лизате *Synechocystis* sp. PCC 6803. Белки АБК-связывающей фракции имели сайты связывания с глутатионом. В этой фракции с помощью АТ<sub>а-и</sub> к АБК были выявлены несколько полипептидов, а с помощью АТ к растительному АБК-связывающему белку С1Р2.1 детектированы два полипептида. Изучение этих полипептидов требует дальнейших исследований.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что в цианобактериях имеются гормон-связывающие белки. Это важно для понимания эволюции гормональной системы хлоропластов растений.

## ВЫВОДЫ

1. Из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 выделен двумя независимыми методами (аффинная хроматография на зеатин-сефарозе и иммуноаффинная хроматография с использованием моноклональных АТ к ЦСБ 70 кукурузы) цитокинин-связывающий белок 67 кДа (ЦСБ 67).

2. *Транс*-зеатин конкурировал с антиидиотипическими антителами к *транс*-зеатину за связывание с ЦСБ 67 что указывает на присутствие в белке сайта связывания *транс*-зеатина. Другие гормоны растений не конкурировали с антиидиотипическими антителами к *транс*-зеатину за связывание с белком. Это указывает на высокое сродство ЦСБ к *транс*-зеатину и отсутствие связывания с другими фитогормонами.

3. ЦСБ и *транс*-зеатин активировали тотальную транскрипцию *in vitro* в лизате *Synechocystis* sp. PCC 6803, что указывает на возможное участие ЦСБ и *транс*-зеатина в регуляторных системах цианобактерий.

4. При всех использованных методах выделения и очистки ЦСБ 67 в полученных препаратах присутствовал шаперонин 60, который не обладает цитокинин-связывающими свойствами.

5. Показано присутствие в *Synechocystis* sp. PCC 6803 АБК-связывающих белков 23, 50, 60 и 67 кДа и гомолога АБК-связывающего белка растений С1р2.1, участвующего в антистрессовых реакциях растений.

6. Установлена активация АБК-связывающими белками и АБК тотальной транскрипции *in vitro* в лизате *Synechocystis* sp. PCC 6803.

7. Совокупность полученных результатов указывает на возможность присутствия у цианобактерий молекулярных мишеней действия цитокининов и АБК, что представляет интерес с эволюционной точки зрения.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Зубкова Н.К., Куприянова Е.В., Селиванкина С.Ю., Кузнецов В.В., Лось Д.А., Кулаева О.Н. В цианобактериях есть цитокинин-связывающие белки. Конференция «Физиология растений - фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» с. 99, Ростов-на-Дону, 2006.
2. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Кудрякова Н.В., Селиванкина С.Ю.,

- Куприянова Е.В., Зубкова Н.К., Кузнецов В.В., Лось Д.А., Кулаева О. Н. Участвуют ли цитокинины в регуляции метаболизма цианобактерий? Сборник тезисов «Международная конференция Современная физиология растений: от молекул до экосистем» с. 188-190, Сыктывкар, 2007.
3. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Кулаева О.Н. В цианобактериях обнаружены цитокинин-связывающие белки. III Всероссийская конференция - школа «Высокоактивные интермедиаты химических реакций и биологических процессов» с. 24, Астрахань-Москва, 2007.
  4. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Демиденко А.В., Кудрякова Н.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. АБК- связывающие свойства белка CIP 2.1 из люпина желтого. Годичное собрание ОФР России Международная конференция «Физико-химические основы организации растений» с.155, Екатеринбург, 2008.
  5. **Шевченко Г.В.**, Демиденко А.В., Каравайко Н.Н., Кудрякова Н.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Измененные физиологические свойства мутантов *ARADIDOPSIS THALIANA* с инактивированными генами гомологов белка CIP2.1 люпина желтого. Годичное собрание ОФР России Международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» с.201, Екатеринбург, 2008.
  6. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Куприянова Е.В., Лось Д.А., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Цитокинин-связывающий белок *Synechocystis* sp. PCC 6803. Тезисы докладов «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера» с. 150-152, Апатиты, 2009.
  7. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К. Цитокинин-связывающий белок *Synechocystis* sp. PCC 6803. «Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2009», с.241, Москва, 2009
  8. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К. АБК-связывающий белок *Synechocystis* sp. PCC 6803. «Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2010» с.223, Москва, 2010.
  9. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Демиденко А.В., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Куприянова Е.В., Лось Д.А., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Обнаружение АБК-связывающих белков в цианобактериях (*Synechocystis* sp. PCC 6803). «Вестник Российского университета дружбы народов». Серия-агронимия и животноводство. № 1, с. 13-19, Москва, 2010.
  10. **Шевченко Г.В.**, Каравайко Н.Н., Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Куприянова Е.В., Лось Д.А., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Цитокинин-связывающий белок *Synechocystis* sp. PCC 6803. Всероссийская, с международным участием, конференция молодых ученых, посвященной 90-летию Уральского государственного университета им. А.М. Горького «Биология будущего: Традиции и Инновации» с. 133, Екатеринбург, 2010.