На правах рукописи

Ломин

Сергей Николаевич

ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА И СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦИТОКИНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

03.00.12-физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2008

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. академика М.Х. Чайлахяна Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор биологических наук,
профессор Романов Георгий Александрович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:
доктор биологических наук Клячко Нелла Леопольдовна
доктор биологических наук Патрушев Лев Иванович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:
Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 17 июня 2008 г. в 11-00 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977-80-18, e-mail ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «___» мая 2008 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук М.И. Азаркович

Актуальность проблемы. Анализ механизмов рецепции и трансдукции гормональных сигналов является важным и актуальным направлением исследований гормональной регуляции высших организмов, в том числе растений. Среди фитогормонов особое значение имеют цитокинины, которые регулируют метаболизм и деление клеток, а также рост, морфогенез и старение растений. Цитокинины представлены *in vivo* рядом соединений близкой структуры, но с разной биологической активностью. Для этого класса фитогормонов в последние годы идентифицированы мембранные рецепторы, гены первичного ответа, основные элементы сигнальной трансдукции и ферменты биосинтеза (обзоры см. Романов, 2002; Heyl & Schmülling, 2003; Sakakibara, 2006). Однако многие аспекты молекулярного механизма действия цитокининов еще малоизучены и продолжают активно исследоваться.

У всех изученных растений рецепторы цитокининов представляют собой семейство близкородственных белков – мембранных гистидинкиназ, подобных сенсорным гистидинкиназам одноклеточных организмов. Показано, что эти рецепторы могут иметь различное физиологическое значение *in planta* (Higuchi et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Riefler et al., 2006). Одной из важнейших характеристик рецептора является его лигандная специфичность, во многом определяющая режим функционирования рецептора в клетке. Также важным фактором реализации действия рецепторов в растении является их субклеточная локализация. Однако эти аспекты системы восприятия цитокининового сигнала клеткой оставались до последнего времени практически не изучены.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучить лиганд-связывающие свойства индивидуальных рецепторов цитокининов у разных видов растений и субклеточную локализацию рецепторных белков.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- изучить лиганд-связывающие свойства индивидуальных цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы, клонированных в *E. coli,* с помощью радиолигандного метода;

- выяснить, как установленные свойства рецепторов проявляются при передаче цитокининового сигнала на гены первичного ответа *in planta*;

- исследовать субклеточную локализацию рецепторов в органах растений.

Научная новизна работы. Впервые проведены количественные исследования лиганд-связывающих свойств ряда индивидуальных рецепторов цитокининов арабидопсиса и кукурузы. В ходе работы обнаружено, что рецепторы различаются по своей лигандной специфичности и другим параметрам. Эти различия могут быть связаны с физиологической функцией и характером экспрессии рецепторов в растении. Обнаружены черты сходства и различия свойств рецепторов цитокининов из разных видов растений.

Впервые приведены строгие доказательства того, что цитокинины-производные аденина и цитокинины-производные фенилмочевины связываются с рецепторным белком в одном и том же сайте.

Впервые проведён анализ субклеточной локализации рецепторов цитокинина в растении радиолигандным методом и обнаружены рецепторы не только в составе плазмалеммы, но и в составе эндомембран клетки.

Практическое значение работы. Полученные результаты в перспективе могут найти применение в генноинженерной биотехнологии при создании растений с определенными хозяйственно-ценными признаками. Предложенный подход для анализа лиганд-связывающих свойств индивидуальных цитокининовых рецепторов, клонированных в *E. coli*, может быть полезен в работе по изучению свойств других эукариотических мембранных рецепторов. Использованная модельная система на основе двойных мутантов арабидопсиса по рецепторам цитокининов является удобным инструментом для исследований функциональных свойств отдельных

цитокининовых рецепторов *in planta*. Данные фундаментального характера о лиганд-связывающих свойствах рецепторов цитокининов могут быть использованы для подготовки лекционного материала при чтении курсов физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений в высших учебных заведениях, а также послужить базой для дальнейших исследований в данном направлении.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2005» (Москва, 2005); Годичном собрании Общества физиологов растений России, Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005); VI Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пущино, 2005); 9-ой Международной школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2005); Международных конференциях «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2005, 2007); 2nd International symposium «Auxin, Cytokinin and Plant Development» (Прага, Чешская Республика, 2005); Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006); VI Съезде общества физиологов растений России, Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); 2nd International symposium «Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture» (Киев, Украина, 2007); V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, Беларусь, 2007) и других.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ (еще одна в печати), включая 4 статьи в отечественном и зарубежных рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения и пяти глав: обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на

190 страницах машинописного текста, содержат 1 таблицу и 47 рисунков. Список литературы включает 318 источников, из которых зарубежной литературы – 298.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Особенности экспериментальных моделей. Основные эксперименты проведены на следующих модельных системах: растительной на основе трансгенного арабидопсиса, и бактериальной, на основе трансформированной *E. coli*. Эти системы дают четкую, быструю и специфическую реакцию на воздействие цитокининов и основаны на индукции экспрессии цитокинин-зависимых генов и/или трансгенов. Для получения препаратов мембран использовали также корни и листья растений кукурузы.

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

Помимо удобства работы с репортерным ферментом тест-система трансгенного арабидопсиса позволяет оценивать эффект цитокининов и по содержанию транскриптов индивидуальных (транс)генов первичного ответа, таких, как *ARR5* или *GUS*. Время инкубации с гормоном в этом случае сокращается до 30-40 минут.

Также в работе использовали двойные мутанты арабидопсиса, экспрессирующие один из трех рецепторов цитокининов и несущие конструкцию P_{ARR5}*::GUS* (предоставлены T. Schmülling, ФРГ), что дало возможность оценивать работу индивидуальных рецепторов *in planta*. Эти мутанты по цитокининовым рецепторам были использованы и для анализа субклеточной локализации рецепторов.

Модельные системы на основе трансгенной *E. coli*. Для изучения взаимодействия рецепторов цитокининов с веществами, обладающими цитокининовой активностью, требовалась модель, содержащая не всю группу рецепторов, а отдельный тип цитокининового рецептора. Такой моделью послужили бактерии *E. coli*, штамм KMI001, трансформированные плазмидами pIN-III-AHK4, pSTV28-AHK3, pIN-III-ZmHK1, pIN-III-ZmHK2, pIN-III-ZmHK3a, экспрессирующими гены рецепторов цитокининов арабидопсиса *AHK4/CRE1*, *AHK3* (Suzuki et al., 2001) и кукурузы *ZmHK1*, *ZmHK2*, *ZmHK3a* (предоставлены T. Mizuno и H. Sakakibara, Япония), соответственно. У данного штамма *E. coli* рецепторы цитокининов замещают близкую по структуре сенсорную гистидинкиназу бактерии RcsC, инактивированную мутацией, и проявляют цитокинин-зависимую функциональную активность (Suzuki et al., 2001; Spichal et al., 2004; Yonekura-Sakakibara et al., 2004). Бактериальная хромосома содержала также репортерный ген *lacZ* (кодирующий *β*-галактозидазу) под cps-промотором, восприимчивый к сигналу от RcsC (Yamada et al., 2001).

Дополнительно в работе использовали бактерии штамма BL21DE3pLys, трансформированные плазмидами pDONR211, экспрессирующими CHASE-домены или мутантные по CHASE-домену рецепторы AHK4/CRE1 (Heyl et al., 2007).

Анализ характеристик взаимодействия гормонов с рецепторами проводили с использованием живых трансгенных бактерий, на основе разработанного варианта радиолигандного метода. На графиках cpm и dpm означают имп/мин и расп/мин, соответственно.

Мембранные фракции получали путем ультрацентрифугирования очищенных гомогенатов растительных тканей и разделяли в смеси (1:1, w/w) декстрана T500 и полиэтиленгликоля 3350 (Sigma), которые при концентрации 6.2% (w/w) образуют две фазы.

Активность репортерных ферментов GUS и lacZ определяли количественно флуоресцентным методом (Зверева & Романов, 2000; Spichal et al., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ

I. Лиганд-связывающие свойства рецепторов цитокининов

Исследование взаимодействия мембранного рецептора с лигандами обычно проводится на препаратах очищенных мембран, содержащих данный рецептор. Чтобы избежать долгих и затратных процедур, необходимых для получения указанных мембранных препаратов, мы предложили модификацию радиолигандного метода, позволяющую изучать связывание прямо на интактных трансгенных бактериях, экспрессирующих эукариотический белок-рецептор. В качестве радиоактивного лиганда использовали [2-^{3}H]*транс*-зеатин (~600 ГБк/ммоль), высокомеченый аналог активного природного цитокинина. Клоны, экспрессирующие рецепторы цитокининов, были способны специфически связывать гормон, тогда как клоны, несущие пустую плазмиду, проявляли только неспецифическое связывание (рис. 1).

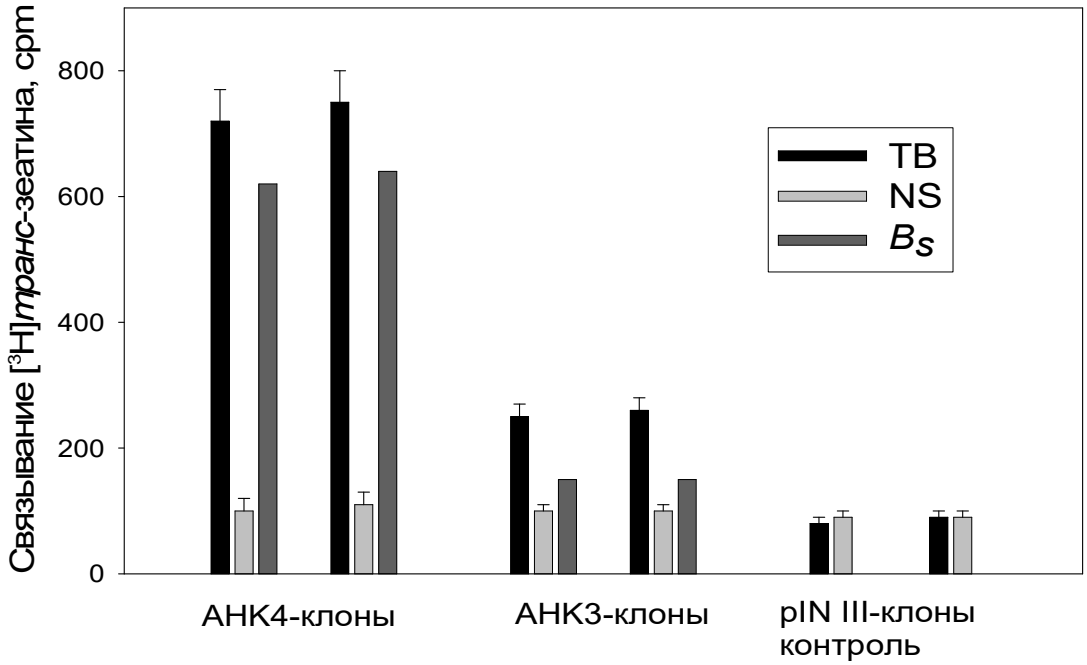


Рис. 1. **Связывание [^{3}H]*транс*-зеатина с трансгенной *E. coli*, экспрессирующей рецепторы цитокинина АНК4 или АНК3.** ТВ – тотальное связывание, NS – неспецифическое связывание, B_S – специфическое связывание

Мы провели конкурентные опыты с немечеными лигандами на бактериальных клонах, экспрессирующих рецепторы АНК4/CRE1 или АНК3. Среди широкого спектра различных регуляторов только цитокинин (*транс*-зеатин) вытеснял связанную метку (рис. 2). Следовательно, экспрессируемые в *E. coli* растительные рецепторы связывают цитокинин специфично.

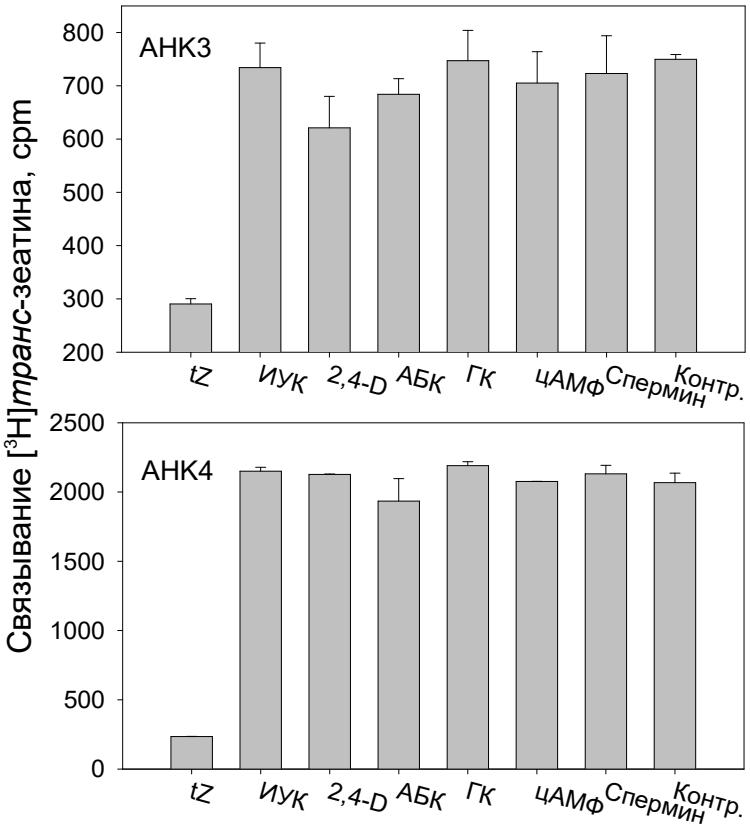


Рис. 2. Вытеснение меченого цитокинина из комплекса с рецептором различными немечеными веществами-регуляторами.
*t*Z – *транс*-зеатин, ИУК – индолилуксусная кислота, 2,4-D – 2,4-дихлорофенокси уксусная кислота, АБК – абсцизовая кислота, ГК – гиббереллины, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат. Концентрация спермина – 17.3 мкМ, всех остальных веществ – 8.6 мкМ.

Корректность метода была дополнительно проверена путем сравнения результатов конкурентных опытов, выполненных с мембранами традиционным способом и непосредственно с интактными бактериями. Картины вытеснения оказались сходными, что подтвердило адекватность предложенного подхода для поставленных задач.

Важным параметром гормон-рецепторного взаимодействия является сродство рецептора к гормону, которое характеризуется константой диссоциации комплекса. Для определения констант диссоциации получали концентрационные зависимости связывания меченого *транс*-зеатина, либо концентрационные зависимости

вытеснения меченого гормона немеченым. Результаты представляли в координатах Скэтчарда (рис. 3) и по тангенсу угла наклона получаемых прямых определяли константы диссоциации.

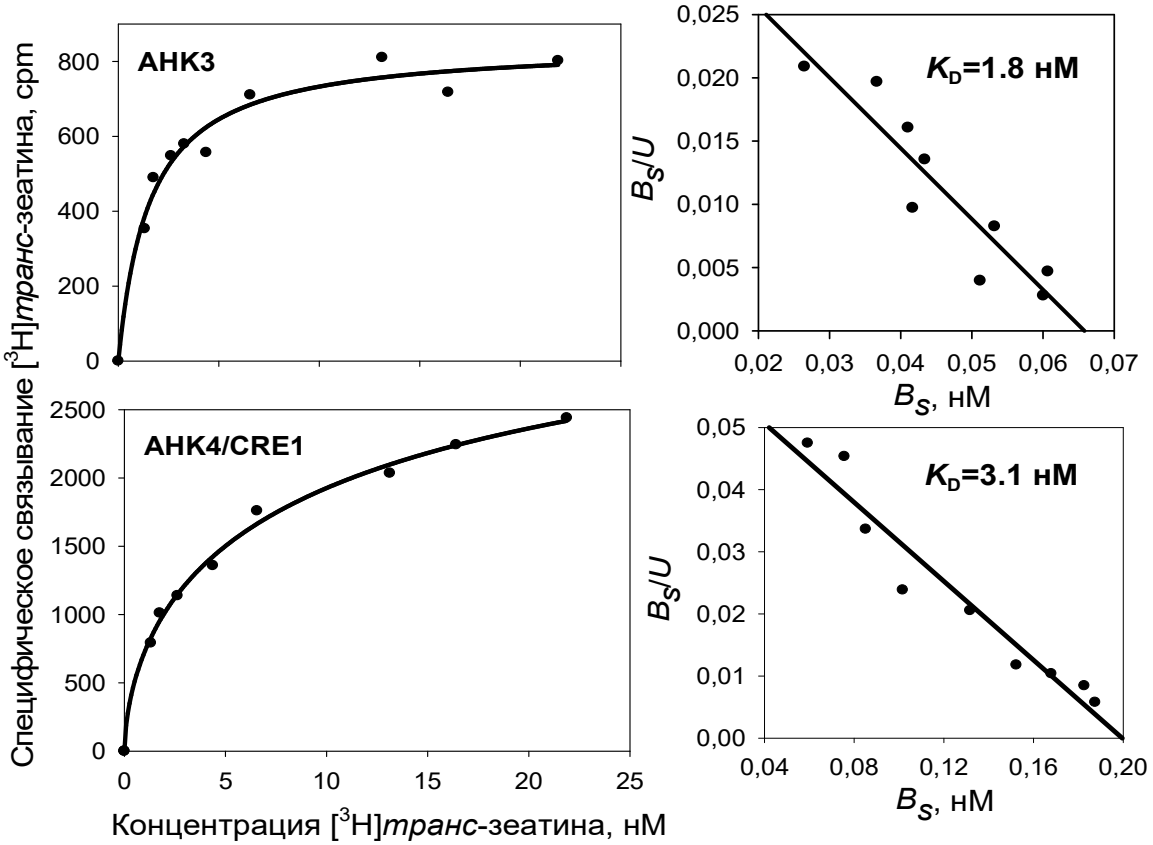


Рис. 3. Примеры определения констант диссоциации рецепторов цитокининов к *транс*-зеатину методом Скэтчарда. U – несвязанный гормон, B_S – специфично связанный гормон.

В целом, константы диссоциации находятся в пределах, характерных для гормон-рецепторного связывания (10^{-7}–10^{-12} М). Усреднённая K_D для AHK3 соответствовала 1.3 нМ, для AHK4/CRE1 – 3.9 нМ. Клонированные CHASE-домены рецептора, которым отводится роль узнавания и связывания гормона, были способны связывать *транс*-зеатин с высоким сродством, близким к таковому у полноразмерных рецепторов. Рецепторы кукурузы также проявили высокое сродство к *транс*-зеатину. Константа диссоциации для рецептора ZmHK2 составляла 1.2 нМ, для ZmHK3a – 7.0 нМ. Рецептор кукурузы ZmHK1 имел самое низкое сродство к *транс*-зеатину (83 нМ) среди всех

изученных рецепторов, однако и это значение находилось в пределах, соответствующих гормон-рецепторному взаимодействию.

Представление данных по связыванию в координатах Хилла и Бьёррума показало, что связывание происходит некооперативно по простому механизму, а сайты связывания каждого из рецепторов гомогенны.

Мы изучили лигандную специфичность цитокининовых рецепторов арабидопсиса и кукурузы. Для этого проводили эксперименты по вытеснению меченого *транс*-зеатина различными немечеными цитокининами и их производными. Конкурентная активность лиганда позволяет судить о его сродстве к рецептору. В целом, для рецепторов арабидопсиса лигандная специфичность оказалась сходной, ряды активности для AHK3 и AHK4/CRE1 выглядят как:

AHK3: ***t*Z**>TD>*t*ZR>**DZ**>**iP**>*c*Z>BA≥**iPR**≥AcZ>Ade≥*t*ZOG

AHK4/CRE1: ***t*Z**>**iP**>TD≈*t*ZR>**iPR**>BA>**DZ**>*c*Z>AcZ>Ade≥*t*ZOG

(*t*Z – *транс*-зеатин,TD – тидиазурон, *t*ZR – *транс*-зеатинрибозид, DZ – дигидрозеатин, iP – изопентениладенин, *c*Z – *цис*-зеатин, BA – бензиладенин, iPR – изопентениладенинрибозид, AcZ – *транс*-зеатин-*O*-ацетил, Ade – аденин, *t*ZOG – *транс*-зеатин-*O*-глюкозид)

Существенной разницы между полноразмерным рецептором AHK4/CRE1 и его изолированным CHASE-доменом не наблюдалось, что указывает на консервативность этой характеристики рецепторных белков. При этом для отдельных гормонов наблюдались существенные различия сродства к рецепторам. Так, изопентениладенин вытеснял метку гораздо более эффективно в случае рецептора AHK4/CRE1, чем в случае рецептора AHK3. Дигидрозеатин, наоборот, гораздо более эффективно связывался рецептором AHK3 (рис. 4). AHK2 (CHASE-домен), как и AHK4/CRE1, активно связывал изопентениладенин.

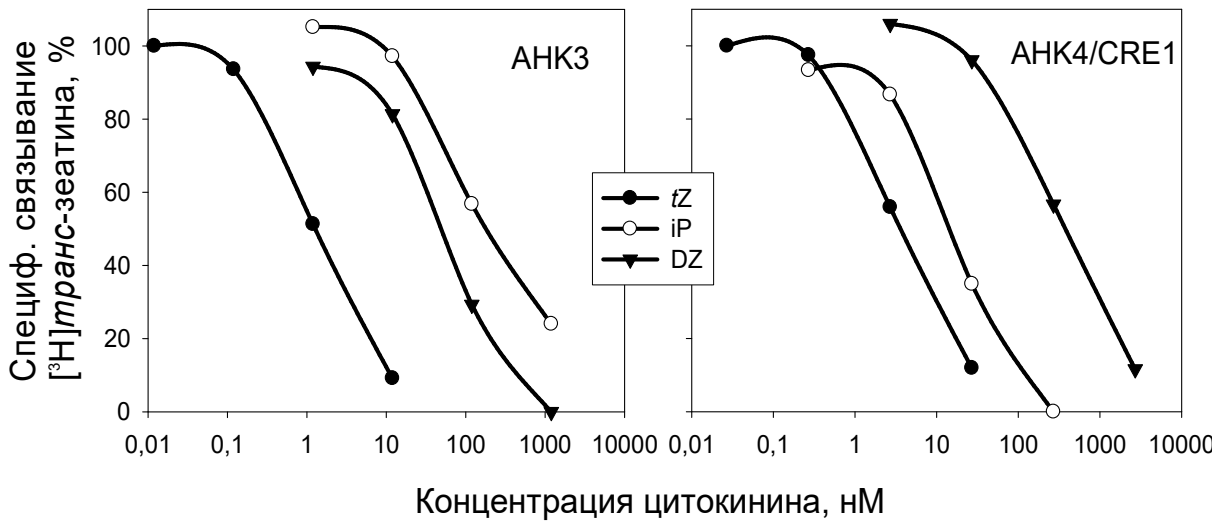


Рис. 4. Цитокининовые рецепторы арабидопсиса AHK3 и AHK4/CRE1 различаются по лигандной специфичности. *t*Z – *транс*-зеатин, iP – изопентениладенин, DZ – дигидрозеатин.

Аналогично были протестированы рецепторы кукурузы. Ряды активности для рецепторов кукурузы выглядят как:

ZmHK1: **iP** > **BA** > ***t*Z** ≈ *c*Z > DZ > *t*ZR > *t*ZOG

ZmHK2: ***t*Z** > *t*ZR > **iP** > *c*Z > DZ > **BA** > *t*ZOG

ZmHK1, ортолог AHK4/CRE1, предпочитал изопентениладенин, в то время как ZmHK2, ортолог AHK3, наоборот, эффективно связывал *транс*-зеатин, но гораздо слабее другие цитокинины (рис. 5). Особенностью ZmHK1 было эффективное связывание бензиладенина, а также отсутствие заметной разницы по взаимодействию с *транс*- и *цис*-формами зеатина. Рецептор ZmHK3a, так же как и ZmHK1, предпочитал изопентениладенин. Таким образом, у филогенетически далеких видов растений проявляются определенные закономерности лигандной специфичности цитокининовых рецепторов. Рецепторы можно подразделить на две группы (таблица): предпочитающие (AHK4/CRE1 и ZmHK1) или слабо связывающие изопентениладенин (AHK3 и ZmHK2). По данным литературы, рецепторы первой группы экспрессируются преимущественно в корне, тогда как рецепторы второй группы – в листе.

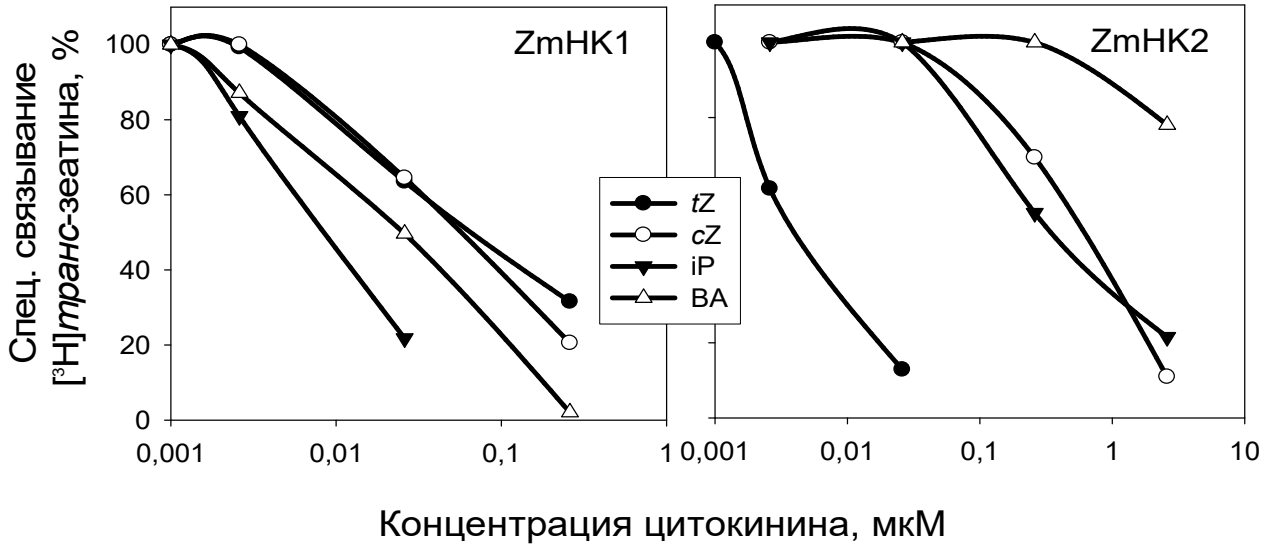


Рис. 5. Цитокининовые рецепторы кукурузы ZmHK1 и ZmHK2 различаются по лигандной специфичности. *t*Z – *транс*-зеатин, iP – изопентениладенин, *c*Z – *цис*-зеатин, BA – бензиладенин.

Важно было проверить, проявляется ли выявленная на бактериальной модели разница в лигандной специфичности в способности рецепторов избирательно реагировать на различные цитокинины *in planta*. Мы провели серию экспериментов на двойных

Таблица **Сродство рецепторов цитокининов арабидопсиса и кукурузы к *t*Z и iP**

Рецептор	***K*$_D$**	
	***t*Z**	**iP**
AHK3	**1.3 нМ**	**150 нМ**
AHK4/CRE1	**3.9 нМ**	**17 нМ**
ZmHK1	**83 нМ**	**5 нМ**
ZmHK2	**1.2 нМ**	**120 нМ**

мутантах арабидопсиса по рецепторам цитокининов. Так как у арабидопсиса имеется три рецептора цитокинина, то при инактивации двух из них в растении остается функционировать только один рецептор и появляется возможность изучать индивидуальные рецепторы *in planta*.

Для удобства эти мутанты названы здесь по тому рецептору, который в них экспрессируется. Дополнительно мутанты имели генетическую конструкцию репортерного гена *GUS* под промотором гена первичного ответа на цитокинин *ARR5*. В ответ на цитокинин промотор активируется, и по активности GUS можно судить о работе цитокининового рецептора. В этих экспериментах были испытаны два цитокинина: *транс*-зеатин и изопентениладенин. В случае клона AHK4/CRE1 оба цитокинина действовали одинаково эффективно, сходство активностей отмечено и для клона AHK2, но в случае клона AHK3 изопентениладенин активировал экспрессию гена P_{ARR5}*::GUS* гораздо менее эффективно, чем *транс*-зеатин (рис. 6). Таким образом, результаты экспериментов *in planta* качественно согласуются с данными по связыванию, полученными на бактериях.

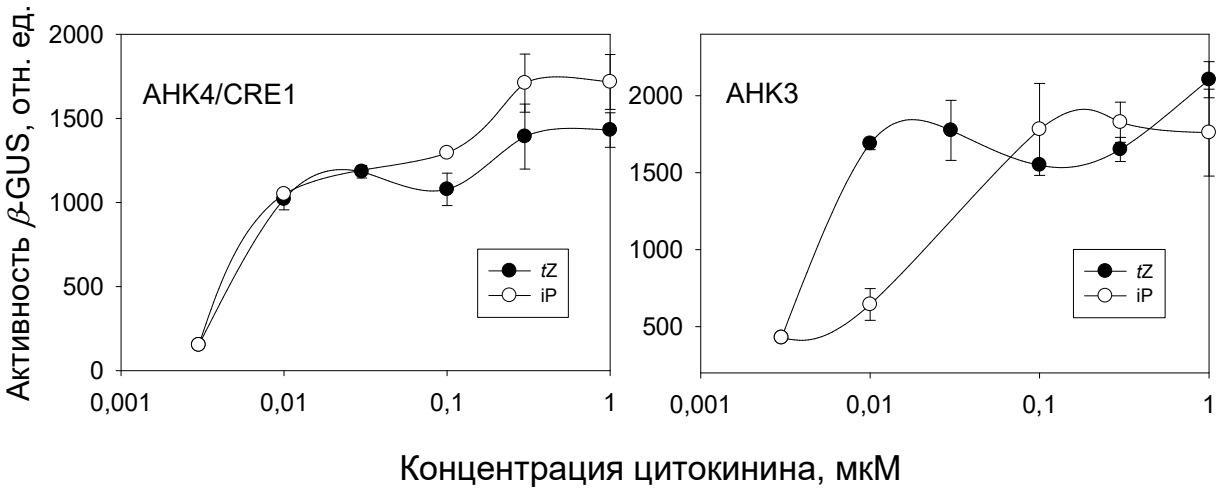
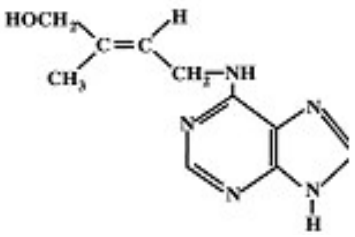


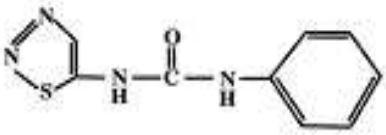
Рис. 6. Активация цитокинин-чувствительного трансгена P_{ARR5}***::GUS*** **в двойных мутантах арабидопсиса по рецепторам цитокининов под действием *транс*-зеатина и изопентениладенина.** *t*Z – *транс*-зеатин, iP – изопентениладенин.

Помимо цитокининов-производных аденина, известны синтетические производные фенилмочевины, такие, как тидиазурон (рис. 7), действующие на растения подобно цитокининам. Тидиазурон был испытан ранее в бактериальных тестах на индукцию активности репортерного трансгена (Spichal et al., 2004) и в наших опытах по вытеснению меченого *транс*-зеатина. В обоих случаях тидиазурон проявил себя как сильный цитокинин.

В связи с тем, что тидиазурон имеет иное строение по сравнению с цитокининами-производными аденина, оставалось неясным, связываются ли оба типа гормонов с одним сайтом на рецепторе или эти сайты различны. Для ответа на этот вопрос мы получили концентрационную зависимость связывания меченого *транс*-зеатина рецептором (AHK3 или AHK4/CRE1) в отсутствие и в присутствии фиксированной концентрации тидиазурона. Данные представлены в виде линейных зависимостей в двойных обратных координатах (рис. 7). На графиках видно, что прямые пересекаются практически на оси ординат. Это означает, что гормоны связываются с рецептором в одном и том же сайте.



транс-зеатин



тидиазурон

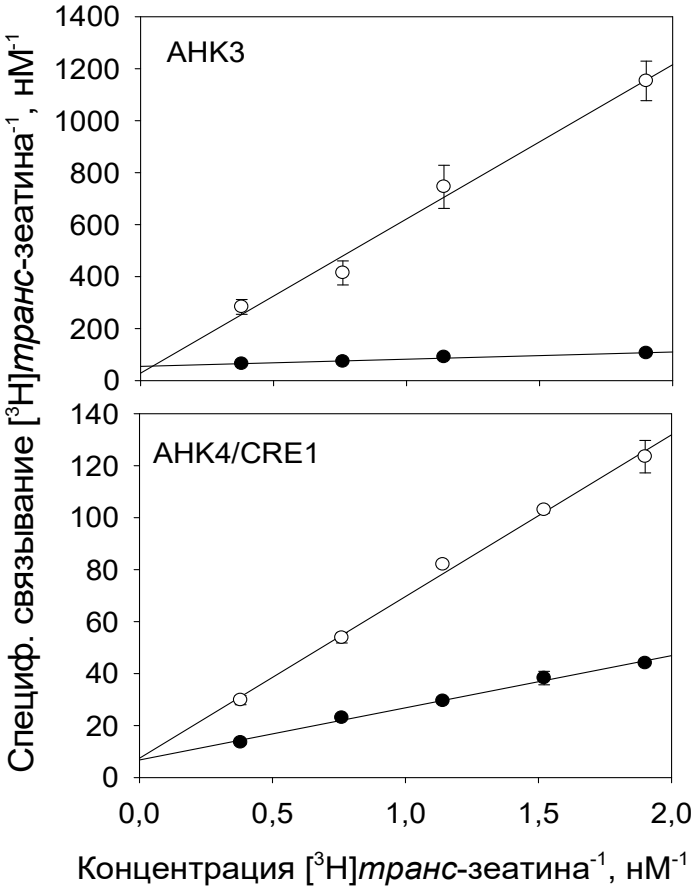


Рис. 7. Идентификация сайта связывания тидиазурона. Данные по связыванию представлены в двойных обратных координатах. Чёрные кружки – эксперимент без тидиазурона, белые кружки – эксперимент с 36 нМ тидиазурона

Мы исследовали влияние некоторых физико-химических факторов на связывание цитокинина рецепторами. Одним из важнейших факторов

клеточного метаболизма является pH среды. Выяснилось, что pH (в интервале 5-9) неодинаково влияет на взаимодействие разных рецепторов с гормоном (рис. 8). Можно разделить рецепторы на две условные группы: те, на которые изменение pH оказывает слабое влияние (AHK4/CRE1, его CHASE-домен и ZmHK2), и те, на которые изменение pH оказывает сильное влияние (AHK3, CHASE-домен AHK2 и ZmHK1). Интересно, что минимум связывания pH-зависимых рецепторов находился при pH 5. С учетом того, что кислый pH свойственен наружной стороне плазмалеммы, можно предположить, что некоторые цитокининовые рецепторы могут функционировать на внутренних мембранах клетки.

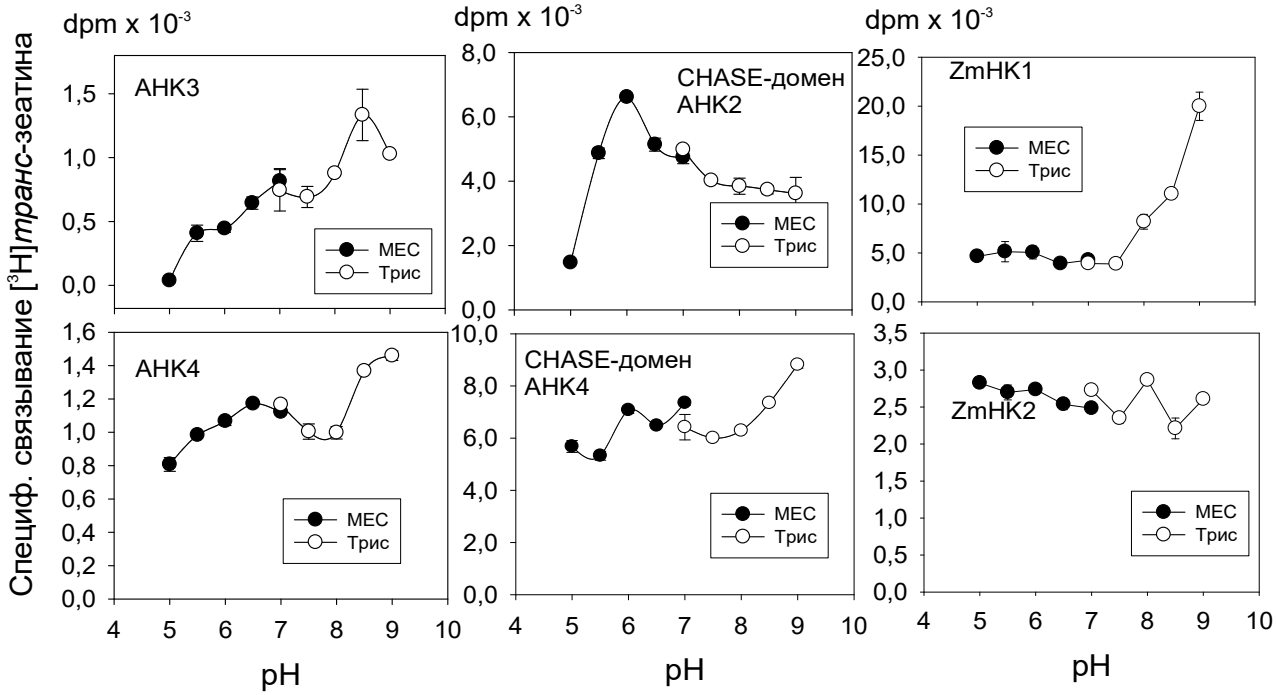


Рис. 8. pH-зависимости связывания *транс*-зеатина с различными рецепторами

II. Субклеточная локализация рецепторов цитокининов

Для выяснения субклеточной локализации рецепторов был проведен анализ их присутствия на плазматической и внутренних мембранах радиолигандным методом. Мембранные фракции разделяли с помощью водной полимерной двухфазной системы в смеси декстрана Т500 и полиэтиленгликоля 3350. После первого разделения мембраны ещё дважды очищали путем повторных разделений в такой же смеси. Микросомы плазматической мембраны накапливались в верхней

полиэтиленгликолевой фазе, а микросомы других мембран – в нижней декстрановой. Чистоту мембранных фракций тестировали различными методами: с помощью определения активности ферментов-маркеров мембран (рис. 9) и Вестерн-блотинга белков-маркеров мембранных фракций. Результаты тестирования подтвердили то, что верхняя фаза (U3) обогащена плазматической мембраной, а нижняя фаза (L3) – внутренними мембранами.

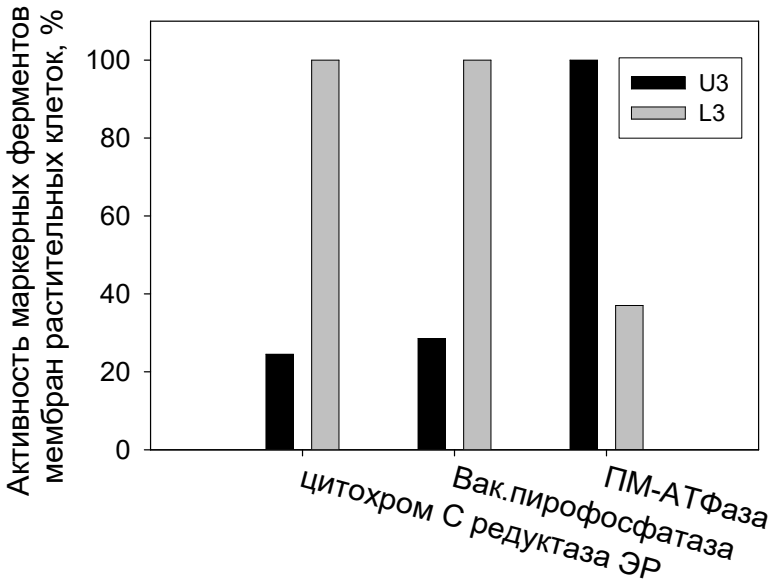


Рис. 9. Тестирование качества разделения мембранных фракций из побегов мутанта арабидопсиса *ahk2-5/cre1-2* с помощью определения активности маркерных ферментов

В опытах по связыванию меченого *транс*-зеатина было установлено, что очищенные мембранные фракции способны специфически связывать цитокинин. Хотя высокоаффинное связывание гормона мембранами было существенно ниже высокоаффинного связывания гормона трансформированными бактериями, это мембранное связывание было достаточным для количественных определений.

Мы проанализировали связывание *транс*-зеатина с мембранными фракциями из двойного мутанта арабидопсиса, экспрессирующего только рецептор АНК3. Специфическое связывание присутствовало в обеих мембранных фракциях с некоторым преимуществом внутренних мембран (рис. 10). С учетом того, что внутренних мембран в клетке, по крайней мере, в 20 раз больше, чем плазмалеммы, большая часть рецепторов АНК3 должна находиться на внутренних мембранах.

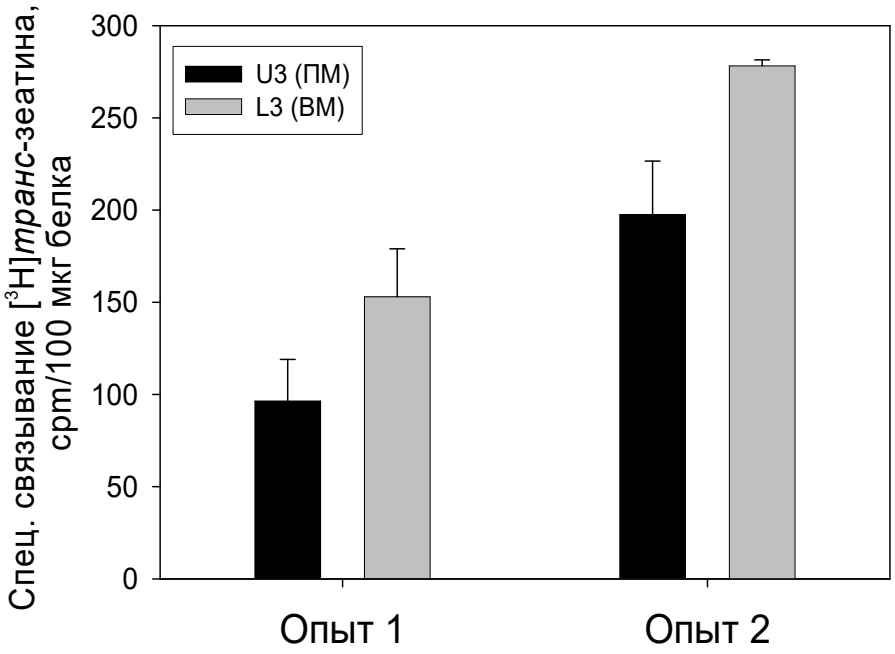


Рис. 10. Анализ субклеточной локализации рецептора AHK3 по связыванию [^{3}H]*транс*-зеатина мембранными фракциями.
ПМ –плазматическая мембрана,
ВМ – внутренние мембраны.

Аналогичные опыты с мембранами кукурузы указывают на присутствие цитокининовых рецепторов как на плазмалемме, так и на внутренних мембранах. При этом в листьях содержание рецептора (предположительно ZmHK2, см. далее) существенно выше на плазматической мембране (рис. 11). Не исключено, что в этом случае рецепторы цитокининов находятся в основном на плазмалемме.

Мутантов кукурузы по цитокининовым рецепторам пока не получено, поэтому мембраны из растений кукурузы могли содержать цитокининовые рецепторы разных типов. Однако важно было оценить, какие именно рецепторы превалируют на тех или иных фракциях мембран. Поэтому мы решили проанализировать те лиганд-связывающие свойства мембранных препаратов, по которым индивидуальные рецепторы кукурузы проявляли наибольшие различия. Попытка использовать различия в pH-зависимости связывания не дала положительных результатов, т.к. зависимости связывания гормона мембранами от pH сильно отличались от аналогичных зависимостей, полученных на бактериях. Видимо, этот признак достаточно лабилен и во многом зависит от липидного окружения рецептора.

Цитокининовые рецепторы кукурузы существенно различаются по лигандной специфичности связывания, причем этот признак

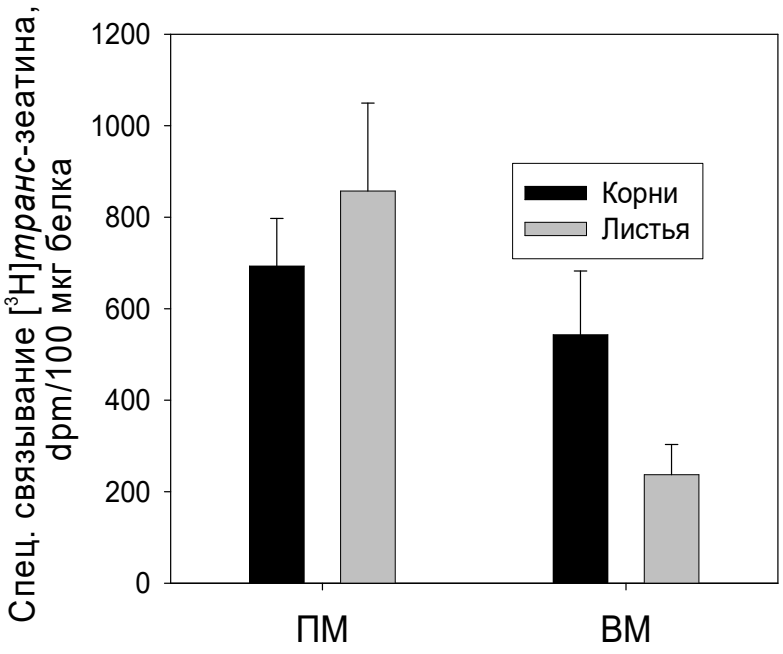


Рис. 11. Уровень связывания цитокинина с мембранными фракциями из корней и листьев кукурузы.
ПМ – плазматическая мембрана,
ВМ – внутренние мембраны.

представляется достаточно стабильным. В частности, сильные различия отмечены для бензиладенина. Он активно связывается с рецептором ZmHK1, но слабо – с рецептором ZmHK2. Мы протестировали (конкурентным методом) интенсивность связывания бензиладенина и *транс*-зеатина с мембранными фракциями из листьев и корней кукурузы. Оказалось, что мембранные фракции из листьев связывают бензиладенин относительно слабее, чем мембранные фракции из корней (рис. 12). Особенности лигандной специфичности мембранных фракций из листьев могут объясняться доминированием рецептора ZmHK2, тогда как фракции из корней, по всей видимости, включают смесь рецепторов в сравнимых пропорциях. Из литературы известно (Yonekura-Sakakibara et al., 2004), что в корне уровень экспрессии генов *ZmHK1* и *ZmHK2* примерно одинаковый, в то время как в листе уровень экспрессии *ZmHK2* по крайней мере в 2 раза выше уровня экспрессии *ZmHK1*. Эти данные хорошо согласуются с нашими результатами по связыванию (рис. 12).

Известно (Sakakibara, 2006), что *транс*-зеатин и его рибозид синтезируются в главным образом в корне и затем по ксилеме транспортируются в побег, тогда как в побеге синтезируются в основном

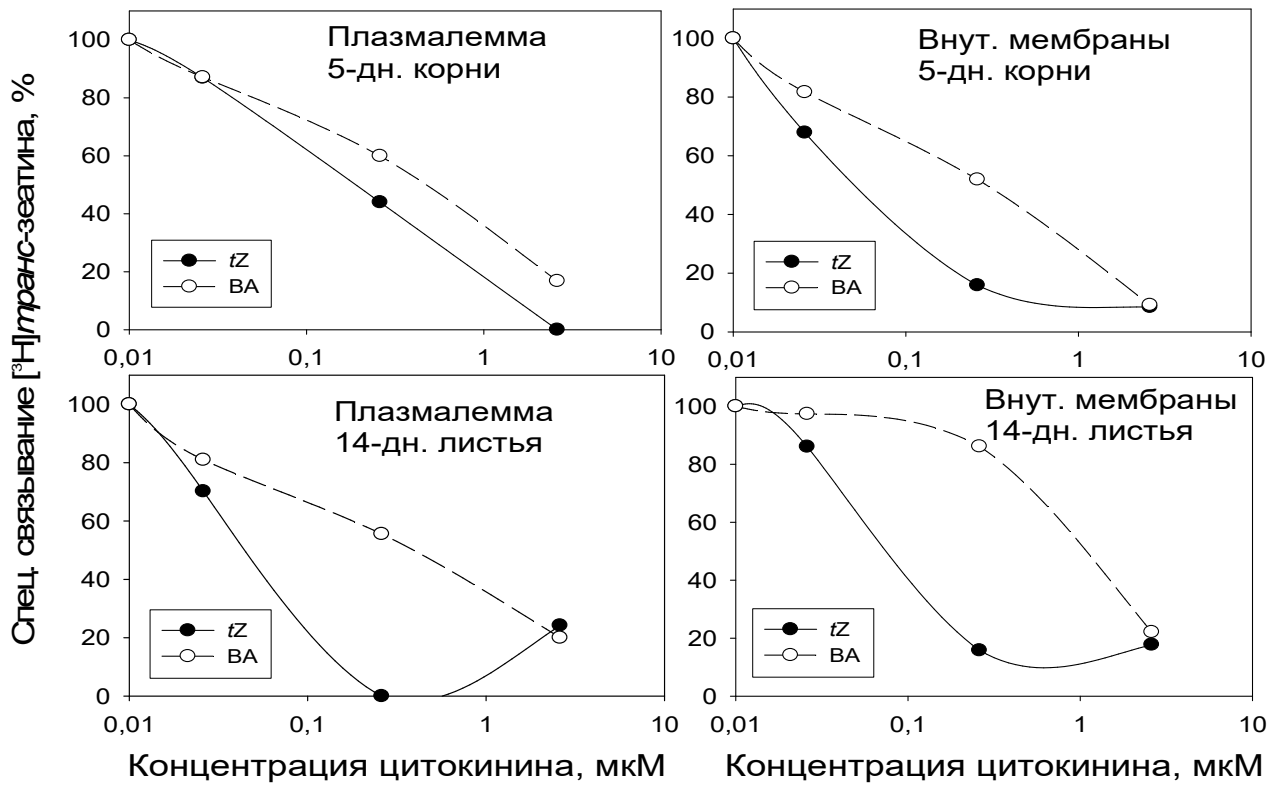


Рис. 12. Лигандная специфичность мембранных фракций из корней и листьев кукурузы. *t*Z – *транс*-зеатин, BA – бензиладенин.

изопентениладенин и его рибозид, которые по флоэме распространяются по всему растению. В последнее время было установлено, что рецепторы цитокининов экспрессируются по-разному и выполняют разные физиологические функции в растении. У арабидопсиса, к примеру, рецептор AHK3 в большей степени экспрессируется в побеге и отвечает за «листовые» эффекты цитокининов (рост и старение листьев, формирование хлоропластов и др.), тогда как рецептор AHK4/CRE1 превалирует в корне и отвечает за действие цитокининов на корень (ингибирование скорости его роста и образования боковых корней). Наши данные о присутствии специфических цитокинин-связывающих сайтов на препаратах мембран подтвердили представления о различиях в составе рецепторного аппарата из разных органов (корни, листья) растений. Так, у кукурузы лиганд-связывающие свойства мембран свидетельствуют о доминировании рецептора ZmHK2 (ортолога AHK3) в листьях, но не в корнях растений. Важным фактом является

обнаружение в наших исследованиях различий в лигандной специфичности связывания между индивидуальными рецепторами цитокининов, в первую очередь по взаимодействию с зеатиновыми и изопентенильными формами цитокининов. Анализ индивидуальных рецепторов арабидопсиса и кукурузы выявил определенные общие закономерности, в частности относительно низкое сродство изопентенильных форм цитокининов к «листовым» рецепторам и достаточно высокое – к «корневым» рецепторам. Особенно ярко эти различия проявились для рецепторов кукурузы ZmHK1 («корневого») и ZmHK2 («листового») (рис. 5, табл.).

На основе вышеприведённых фактов и данных литературы можно предложить следующую модель участия цитокининов в межорганном информационном обмене. *Транс*-зеатин и его рибозид синтезируются в корне, затем по ксилеме транспортируются в побег и здесь взаимодействуют с «листовыми» рецепторами (AHK3 арабидопсиса или ZmHK2 кукурузы), «настроенными» на восприятие именно *транс*-зеатина. В побеге, в свою очередь, синтезируются изопентениладенин и его рибозид, они транспортируются далее по флоэме по всему растению. На побег (листья) изопентенильные цитокинины действуют слабо, т.к. «листовые» рецепторы малочувствительны к этим формам цитокининов. Зато в корне изопентенильные цитокинины активно взаимодействуют с «корневыми» рецепторами (AHK4/CRE1 арабидопсиса и ZmHK1 кукурузы), высокочувствительными к изопентениладенину. Так может осуществляться обмен сигналами между корнем и побегом с участием разных форм цитокининов. Корни, в частности, могут таким способом сигнализировать побегу о благоприятных условиях произрастания и наличии необходимых питательных элементов. Поступающие наверх по ксилеме «корневые» цитокинины зеатинового типа передают сигнал для активации роста и жизнедеятельности побега. То, что рецепторы могут находиться как на плазматической, так и на внутренних мембранах, может являться механизмом, предотвращающим взаимодействие с гормонами, синтезируемыми в той же самой клетке, или связанным с особенностями межклеточного транспорта цитокининов.

ВЫВОДЫ

1. Предложен и прошел успешные испытания количественный метод исследования гормон-связывающих свойств цитокининовых рецепторов с использованием интактных трансгенных бактерий, экспрессирующих функционально активный рецепторный белок или его гормон-связывающий домен.

2. Экспрессируемые в бактериях цитокининовые рецепторы связывают *транс*-зеатин и другие активные цитокинины высокоаффинно, специфично и некооперативно. Рассчитаны константы связывания цитокининов с рецепторами, значения K_D для *транс*-зеатина находятся в наномолярном диапазоне. Цитокинины-производные фенилмочевины связываются с рецептором в том же сайте, что и природные цитокинины-производные аденина.

3. Цитокининовые рецепторы арабидопсиса и кукурузы проявляют черты сходства в лигандной специфичности, при этом рецептор кукурузы ZmHK1 отличается сравнительно низким сродством к *транс*-зеатину и относительно высоким – к *цис*-зеатину.

4. Цитокининовые рецепторы различаются по лигандной специфичности. В частности, «листовые» рецепторы AHK3 и ZmHK2 имеют низкое сродство к изопентенильным формам цитокининов, а «корневые» рецепторы AHK4/CRE1 и ZmHK1 – высокое. Соответствующие различия проявляются также *in planta* у двойных мутантов арабидопсиса, экспрессирующих один из трех рецепторов цитокининов.

5. В модельной системе установлено различие цитокининовых рецепторов по pH-зависимости связывания цитокинина. У pH-зависимых рецепторов (AHK3, AHK2-CHASE-домен и ZmHK1) максимальное связывание гормона происходит в щелочной области pH, а минимальное – в кислой (pH 5).

6. В очищенных мембранных препаратах из арабидопсиса и кукурузы выявлены сайты специфического связывания *транс*-зеатина с помощью радиолигандного метода. Это связывание высокоаффинно и характеризуется pH-зависимостью и лигандной специфичностью.

7. Высокоаффинные сайты находятся как на плазмалемме, так и на внутренних мембранах клеток. Гормон-связывающие свойства мембран различаются в зависимости от источника их получения.

8. Полученные данные позволили обосновать гипотезу о роли функциональных различий цитокининовых рецепторов при дальнедистанционной гормональной коммуникации между корнем и побегом растений. В результате стал более понятным биологический смысл существования разных форм цитокининов и их рецепторов в растении.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Romanov G.A., Spichal L., Lomin S.N., Strnad M., Schmülling T. A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. Analytical Biochemistry, 2005, V. 347, pp. 129-134.

2. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. Journal of Experimental Botany, 2006, V. 57, pp. 4051- 4058.

3. Ломин С.Н., Романов Г.А. Анализ гормон-рецепторного взаимодействия. Теоретические и практические аспекты. Физиология растений, 2008, Т. 55, № 2, стр. 283-299.

4. Romanov G.A., Lomin S.N., Rakova N.Y., Heyl A., Schmülling T. Does NO play a role in cytokinin signal transduction? FEBS Lett., 2008, V. 582, pp. 874-80.

5. Ломин С.Н., Романов Г.А. Изучение молекулярных аспектов синтеза амарантина // VI Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», 13-16 июня 2005 г. Пущино // Москва, 2005, материалы симпозиума, Т. II, стр. 122-125.

6. Ломин С.Н., Ракова Н.Ю., Романов Г.А. Трансгенный арабидопсис как модель для изучения ранних эффектов цитокинина // Международный симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности», Москва, 29 ноября – 3 декабря 2004, тезисы докладов, стр. 50.

7. Ломин С.Н., Шмюллинг Т., Романов Г.А. Изучение физико-химических свойств рецепторов цитокининов АНК3, АНК4 на модели трансгенной *E. coli* // XII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2005», Москва, 12-15 апреля 2005 г., секция биология, тезисы докладов, стр. 136-137.

8. Романов Г.А., Ломин С.Н. Фосфолипаза Д – возможный участник трансдукции цитокининового и светового сигналов у растений // Годичное собрание Общества физиологов растений России, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия», Вологда, 19-23 сентября 2005 г., тезисы докладов, стр. 149.

9. Ломин С.Н., Романов Г.А. Изучение регуляции экспрессии гена первичного ответа на цитокинин *ARR5* с помощью кинетико-ингибиторного анализа // 9-я Международная школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», Пущино, 18-22 апреля 2005 г., сборник тезисов, стр. 38.

10. Романов Г.А., Ломин С.Н., Шмюллинг Т. Гормон-связывающие характеристики цитокининовых рецепторов арабидопсиса // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 6-9 июня 2005 г., материалы конференции, стр. 380-381.

11. Ломин С.Н., Романов Г.А. Кинетико-ингибиторный анализ в исследовании гормонально-индуцированной экспрессии генов // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 6-9 июня 2005 г., материалы конференции, стр. 408-411.

12. Romanov G.A., Spichal L., Lomin S.N., Strnad M., Schmülling T. Ligand specificity of cytokinin receptors from *Arabidopsis*, Biologia Plantarum, 2005, V. 49 Suppl., «2-nd International symposium «Auxin, Cytokinin and Plant Development», Prague, Czech Republic, July 7-12, 2005, Abstracts, pp. S19.

13. Ломин С.Н., Болякина Ю.П., Гетман И.А., Ракова Н.Ю., Мартинец Я., Романов Г.А. Анализ участия «не-канонических» интермедиатов в цитокининовом сигналинге // 2-ой Международный симпозиум «Сигнальные системы растений: роль в адаптации и иммунитете», Казань, 27-30 июня 2006 г., тезисы докладов, стр. 193-194.

14. Ломин С.Н., Куликова В.В., Карпова Г.М., Рифлер М., Романов Г.А. Первичный ответ цитокининов усиливается диметилсульфоксидом // Международный симпозиум «Рецепция и внутриклеточная

сигнализация», Пущино, 5-7 июня 2007 г., материалы конференции, стр. 322-324.

15. Kulikova V.V., Bolyakina Yu.P., Lomin S.N. Dimethylsulfoxide selectively strengthens the cytokinin action in *Arabidopsis* // Second international symposium «Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture», Kiev, Ukraine, 8-12 October, 2007, Abstracts, pp. 51.

16. Lomin S.N., Sakakibara H., Romanov G.A. Two maize cytokinin receptors, ZmHK1 and ZmHK2, have different ligand-binding properties // Second international symposium «Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture», Kiev, Ukraine, 8-12 October, 2007, Abstracts, pp. 52.

17. Болякина Ю.П., Куликова В.В., Ломин С.Н., Романов Г.А. Влияние диметилсульфоксида на первичные эффекты цитокинина на трансгенных линиях арабидопсиса, дефектных по двум из трёх рецепторов цитокининов // V Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, Беларусь, 28-30 ноября 2007 г., материалы конференции, стр. 26.

18. Болякина Ю.П., Куликова В.В., Ломин С.Н., Романов Г.А. Специфичность влияния диметилсульфоксида на первичные эффекты цитокинина у трансгенных линий арабидопсиса, дефектных по двум из трёх рецепторов цитокининов // 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности», Москва, 22-25 декабря 2007 г., тезисы докладов, стр. 21.

19. Карпова Г.М., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А. Изучение роли фосфолипаз в передаче сигнала цитокининов при использовании трансгенных растений арабидопсиса // 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности», Москва, 22-25 декабря 2007 г., тезисы докладов, стр. 45.

20. Юдина А.В., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А. Использование трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* для определения влияния компонентов среды выращивания на чувствительность к цитокининам // 2-й Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности», Москва, 22-25 декабря 2007 г., тезисы докладов, стр. 91.

21. Карпова Г.М., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А. Фосфолипазы С и Д - возможные участники трансдукции сигнала цитокининов // VI Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до

экосистем», Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г., материалы Съезда, стр. 291-292.

22. Ломин С.Н., Куликова В.В., Карпова Г.М., Рифлер М., Романов Г.А. Диметилсульфоксид избирательно усиливает эффект цитокининов *in planta* // VI Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г., материалы Съезда, стр. 316-317.

23. Юдина А.В., Ломин С.Н., Рифлер М., Романов Г.А. Влияние условий выращивания двойных мутантов *Arabidopsis thaliana* по цитокининовым рецепторам на цитокининовую чувствительность растений // VI Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г., материалы Съезда, стр. 398-399.

24. Ломин С.Н. Цитокинины - производные фенилмочевины - связываются с одним и тем же сайтом рецепторного белка // VI Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г., материалы Съезда, стр. 318-319.

25. Ломин С.Н., Йонекура-Сакакибара К., Сакакибара Х., Романов Г.А. Кукурузные рецепторы цитокининов имеют различные лиганд-связывающие свойства // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11 - 15 мая 2008 г., материалы Съезда, стр. 174.

26. Romanov G.A., Lomin S.N. Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors, Methods in Molecular Biology, Plant Hormone Protocols (2nd Ed.), Humana Press, Totowa, USA, 2008 (принято в печать).