

## КАК ЦИТОКИНИНЫ ДЕЙСТВУЮТ НА КЛЕТКУ\*

© 2009 г. Г. А. Романов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Поступила в редакцию 30.06.2008 г.

Лекция дает современные представления о механизмах рецепции цитокинина трансдукции его сигнала на гены первичного и вторичного ответов, а также показывает связь быстрых молекулярных, индуцированных цитокинином процессов с вызываемыми ими физиологическими эффектами. Обсуждаются характеристики цитокининовой регуляторной системы, ее место и роль для роста и развития растительного организма.

*Ключевые слова:* цитокинин – рецептор – трансдукция сигнала – гены первичного ответа – регуляция экспрессии генов – дальнедистанционная коммуникация

### ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ЦИТОКИНИНОВ

Цитокинины (названные вначале кининами\*\*) были обнаружены в лаборатории Ф. Скуга (США) уже более полвека назад [1]; однако только сейчас, в XXI веке, начали открываться основные закономерности их молекулярного действия. Первый искусственно полученный цитокинин (кинетин) проявил свою биологическую активность вначале в стерильной культуре тканей растений как вещество, стимулирующее деление клеток и рост каллусов. С учетом того, что предположение о существовании подобных регуляторов в растениях было выдвинуто Г. Хаберландтом (Германия) еще в начале XX в. [2, с. 125], цитокинины были быстро причислены к основным гормонам растений. Как мы сейчас понимаем, это было сделано несколько преждевременно, так как в то время не были строго доказаны ни присутствие кинетин-подобных соединений в растениях, ни их эндогенный биосинтез.

Первый природный цитокинин зеатин из зародышей кукурузы был выделен и описан Letham с соавт. (Австралия) [4, 5] лишь спустя почти десятилетие после получения Скугом с соавт. [1] синтетического ци-

токинина кинетина, а биосинтез цитокининов в растениях был доказан японскими исследователями лишь в 2001 г. [6, 7], т.е. уже в XXI в.

### СТРУКТУРА ЦИТОКИНИНОВ

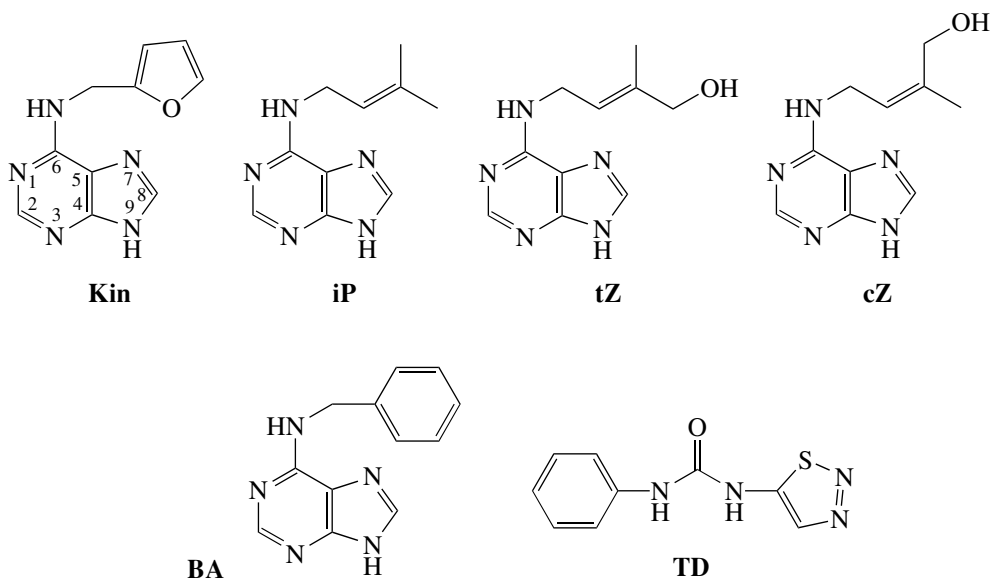
Структура главных природных цитокининов показана на рис. 1. Цитокинины представляют собой относительно простые производные аденина или аденозина, модифицированные по атому азота в 6-м положении шестичленного гетероцикла. У большинства цитокининов в этом положении к аденину присоединена короткая алифатическая цепь остатка изопентенила. Если эта цепь остается немодифицированной, цитокинины относят к группе изопентенильных (цитокинины iP-типа). Однако в растениях существуют ферменты, гидроксимирующие алифатическую цепь по концевому атому углерода [8]. Именно цитокинины с гидроксимирированной алифатической цепью получили название зеатинов (цитокинины Z-типа). Возможны два основных типа стереоизомеров зеатинов: *транс*- и *цис*-зеатин. В молекуле *транс*-зеатина гидроксил боковой цепи направлен в сторону от аденинового гетероцикла; *транс*-зеатин считается наиболее распространенным и активным цитокинином в растениях. У *цис*-зеатина концевой гидроксил, наоборот, сближен с адениновым ядром, причем возможно образование водородной связи между водородом ОН-группы и атомом азота в 1-м положении аденинового гетероцикла (рис. 1) [9]. Среди других природных цитокининов широко известны такие, как дигидрозеатин (DZ), у которого восстановлена двойная связь боковой цепи, БАП, а также тополиин, обнаруженный первоначально в растениях тополя ароматический цитокинин, у которого вместо алифатической цепи присутствует остаток 3-гидроксибензила [10].

\* По материалам Чайлахяновского чтения 2006 г.

\*\* Правильнее было бы переименовать “кинины” не в “цитото-”, а в “фитокинины”, обозначая тем самым как их функцию, так и принадлежность к царству растений (предложено Köhler и Congrad в 1966 г. [3]).

*Сокращения:* ФлД – фосфолипаза Д; 2КС – двухкомпонентная система; DZ – дигидрозеатин; iP – изопентениладенин; Z – зеатин; ARR – белки-регуляторы ответа (арабидопсиса); GUS – глюкуронидаза.

*Адрес для корреспонденции:* Романов Георгий Александрович. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений РАН. Факс: 007 (495) 977-80-18; электронная почта: gar@ippras.ru



**Рис. 1.** Структуры типичных цитокининов. Kin – кинетин; BA – БАП; iP – изопентениладенин; cZ – *цис*-зеатин; tZ – *транс*-зеатин; TD – тидиазурон.

Цитокинины и их аналоги могут быть получены путем относительно несложного химического синтеза; поэтому известно множество разнообразных синтетических цитокининов с различной степенью активности. На практике чаще всего применяют сравнительно легко синтезируемые и устойчивые цитокинины, такие как кинетин, БАП и/или изопентениладенин.

Помимо цитокининов – производных аденина, цитокининовая активность была обнаружена у синтетических производных фенилмочевины [11]. Некоторые из производных фенилмочевины, такие, как N-фенил-N'-(1,2,3-тидiazол-5-ил)мочевина (тидiazурон) или N-фенил-N'-(2-хлоро-4-пиридил)мочевина (4PU-30), проявляли высокую физиологическую активность, сходную с таковой наиболее активных природных цитокининов [12, 13].

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЦИТОКИНИНОВ

Цитокинины распространены в биосфере повсеместно в буквальном смысле слова. Они обнаруживаются практически во всех живых организмах, в том числе в организме человека, а также в воде и почве. Биосинтез цитокининов происходит в высших растениях, мхах, водорослях, ряде бактерий грибов и даже некоторых насекомых-паразитах растений. Из этих объектов цитокинины попадают в почву и различные водные резервуары. У животных также обнаруживаются небольшие количества цитокининов, хотя эти соединения вряд ли имеют там гормональные функции. Дело в том, что отдельные изоформы тРНК содержат изопентенилированные по N6 остатки

аденина по соседству с антикодоном [14]. Эти модифицированные основания обычно представляют собой *цис*-зеатин или изопентениладенин, а также их метилтиопроизводные. При распаде тРНК цитокинины высвобождаются и в принципе могли бы влиять на метаболизм компетентных клеток. Однако у растений тРНК, по-видимому, не является основным и существенным источником цитокининов [15]. У цитокинин-продуцирующих бактерий также обнаружены ферменты прямого, не через тРНК, биосинтеза цитокининов. В отличие от свободных iP-цитокининов, которые гидроксилируются в растениях с образованием еще более активного *транс*-зеатина, iP в составе тРНК гидроксилируется, напротив, с образованием малоактивного *цис*-зеатина [14].

Содержание цитокининов во внутренних жидкостях (соках) растений обычно невелико, на уровне наномолей или десятка наномолей. Ксилемный сок содержит больше цитокининов Z-типа (обычно в форме рибозидов) и тем отличается от флоэмного сока, содержащего больше iP-цитокининов [16].

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТОКИНИНОВ

Цитокинины обладают многообразным физиологическим действием на растения [17–19], причем характер действия этих гормонов сильно зависит от их концентрации. Одним из важнейших эффектов цитокининов, благодаря которому эти фитогормоны и были обнаружены, является стимуляция деления клеток. Многие эффекты цитокининов на организменном уровне, напри-

мер, формирование сосудистых тканей в корнях, обусловлены именно их способностью стимулировать деление определенной группы клеток-предшественников.

Рост растений вдоль продольной оси, обусловленный функционированием апикальных меристем побега и корня, находится под контролем цитокининов совместно с ауксинами [2, 20, 21]. При этом цитокинины в физиологических концентрациях стимулируют апикальную меристему и рост побега, но подавляют меристему и рост корня [22, 23]. Помимо деления, цитокинины способствуют также растяжению клеток, особенно в листьях и семядолях. Наряду с ауксинами, цитокинины в значительной степени формируют фенотип растения, стимулируя рост боковых побегов, но подавляя рост боковых корней. Вместе с ауксинами и гиббереллинами цитокинины формируют донорно-акцепторные отношения в растении, усиливая аттрагирующую способность отдельных органов или их частей. В культуре растительных каллусов или тканей цитокинины вызывают формирование побегов. Цитокинины способствуют фотосинтезу, активируя формирование хлоропластов, часто даже в темноте. У многих растений цитокинины задерживают старение листьев, как отделенных, так и на интактных растениях. У растений, способных к симбиозу с азотфиксирующими бактериями, цитокинины и системы их рецепции необходимы для запуска процесса образования симбиотических клубеньков [24, 25]. Также у целого ряда растений цитокинины стимулируют прорастание семян и образование пигментов. У мхов типа *Funaria* обработка протонемы цитокининами индуцирует формирование почек, из которых образуется облиственный спорофит [26]. В высоких концентрациях цитокинины, наоборот, проявляют рост-ингибирующее и даже апоптическое действие [27, 28]; они могут подавлять рост корней, культур клеток и даже вызывать опадение листьев.

Установленные эффекты цитокининов послужили основой для создания ряда биотестов на эти фитогормоны [29].

Физиологическое действие цитокининов на клеточном уровне суммировано ниже.

- Стимуляция клеточного деления.
- Активация притока метаболитов (аттрагирующий эффект).
- Дифференциация пластид.
- Увеличение размера клеток.
- Биосинтез пигментов.
- Задержка старения (в низких концентрациях).
- Индукция апоптоза (в высоких концентрациях).
- Формирование побегов в культуре каллусов.

## ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНИНОВ

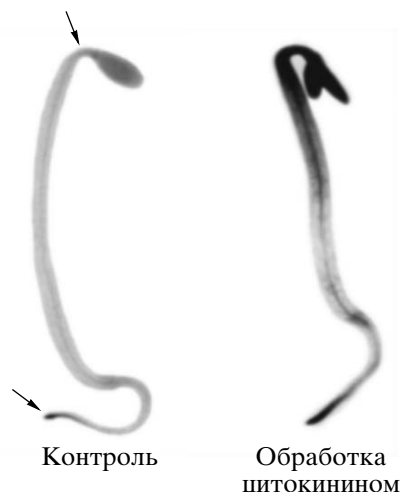
Производством и/или продажей цитокининов занимаются многие крупные фирмы. Среди них такие известные международные корпорации, как “Sigma”, “Dushefa”, “Fluka”, “Calbiochem” и др. В Чешской Республике фирма “OChemim” специализируется на производстве различных форм сверхчистых цитокининов. Цитокинины являются важнейшими гормональными компонентами культуральных сред для растений. Их широко применяют в работах с культурами тканей и клеток растений, при микроразмножении полезных растений, при получении трансгенных растений. Цитокинины и их аналоги используют для формирования крон саженцев, смещения пола овощных культур (огурцов) в женскую сторону, задержки старения срезанных цветов и овощей, прерывания покоя семян [30]. Апоптическое действие синтетических цитокининов (тидиазурон) нашло применение для дефолиации хлопчатника [31], что существенно облегчает сбор хлопка. Экспериментально доказана возможность использования цитокининов для повышения урожайности злаковых культур, в частности риса. Имеются положительные результаты испытаний цитокининов для повышения урожайности некоторых плодовых культур (яблонь). Доказано участие цитокининов в повышении устойчивости растений к различным абиотическим стрессам, в частности к засухе, что дает большие перспективы использования этих фитогормонов в указанном направлении.

В последние годы цитокинины стали использовать в составе кремов для кожи. Согласно приводимым фирмами данным, цитокинины при длительном применении улучшают структуру кожи и уменьшают признаки старения. Однако насколько серьезны и достоверны эти результаты, судить пока рано. Наряду с этим исследования последнего десятилетия показали четкое антипролиферативное действие ряда цитокининов и их аналогов на опухолевые клетки животных, что дало основания предложить эти соединения в качестве противораковых препаратов [32–34]. Некоторые из цитокинин-подобных соединений уже используют в медицинской практике.

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНИНОВ

### *Гены, чувствительные к цитокинину*

На протяжении многих десятилетий после открытия цитокининов оставалось неясным, что представляет собой внутриклеточная мишень их действия, влияют ли они напрямую на активность генов и если да, то каков механизм передачи цитокининового сигнала. Конечно, эти вопросы активно дебатировались в научных кругах, однако



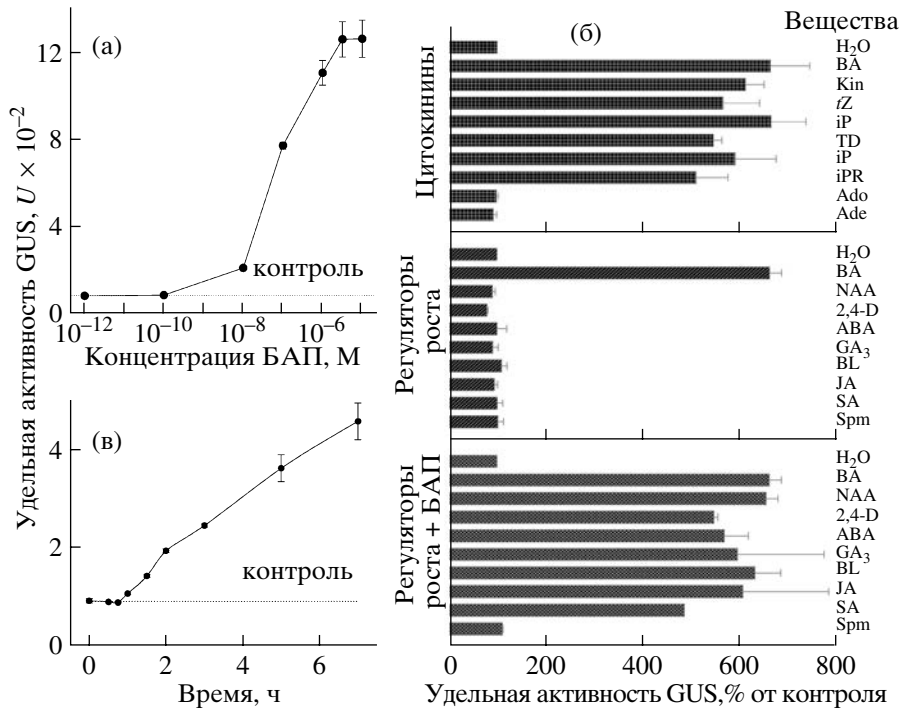
**Рис. 2.** Трехдневные этиолированные проростки трансгенного *ARR5::GUS* арабидопсиса, необработанные или обработанные цитокинином (5 мкМ БАП). Гистохимическое окрашивание на активность GUS [39]. Стрелки показывают зоны окрашивания необработанных цитокинином проростков.

убедительные данные о существовании генов первичного ответа на цитокинин и цитокининовых рецепторов появились сравнительно недавно. В 1998 г. в лабораториях Дж. Кибера (США) и Т. Сугиямы (Япония) у арабидопсиса и кукурузы были обнаружены гены, напрямую активирующиеся цитокинином [35, 36]. Одним из первых обнаруженных цитокинин-чувствительных генов был ген так называемого регулятора ответа, получивший название *ARR5* (от *Arabidopsis Response Regulator 5*). Транскрипция данного гена быстро активировалась цитокинином, причем ингибитор трансляции циклогексимид не препятствовал этой активации, т.е. для нее не требовалось биосинтеза какого-либо белка. Таким образом, ген *ARR5* – это первичная мишень для цитокинина, что предполагает чувствительность промотора данного гена к цитокинину. Действительно, изолированный *ARR5*-промотор, соединенный с репортерным геном *GUS*, придавал последнему цитокинин-зависимый характер экспрессии в растении [37].

Для количественного тестирования экспрессии индивидуальных генов нами была адаптирована модельная система на основе водной культуры проростков арабидопсиса [38]. В опытах был использован трансгенный арабидопсис, у которого промотор цитокинин-чувствительного гена *ARR5* соединен с репортерным геном *GUS* [37]. Эта конструкция позволяет количественно следить за экспрессией промотора и определять локализацию этой экспрессии в тканях и органах растения. В отсутствие экзогенных цитокининов экспрессию *ARR5*-промотора наблюдали в основ-

ном в районах, известных как сайты активного биосинтеза цитокининов (рис. 2): в кончике корня (основная область), а также в районе апикальной меристемы стебля. Заметное окрашивание наблюдали также по ходу проводящих путей корня, что, очевидно, отражает путь ксилемного транспорта цитокининов из корня в стебель. Однако большая часть тканей проростка оставалась неокрашенной.

При воздействии экзогенного цитокинина происходила повсеместная активация репортерного гена, что хорошо заметно при гистохимическом GUS-окрашивании (рис. 2). Количественные данные о временной и дозовой зависимости активации GUS при действии цитокининов, а также о специфичности этой активации представлены на рис. 3. Эти данные показывают, что активация *ARR5*-промотора достигает максимума при концентрации БАП 5 мкМ (рис. 3а); активацию вызывают только цитокинины, но не аденин или другие фитогормоны и регуляторы роста (рис. 3б). Кинетика индукции активности GUS обнаружила наличие определенного лаг-периода (рис. 3в). В течение этого периода можно, очевидно, ожидать изменений на уровне транскрипции. Действительно, прямые измерения содержания мРНК гена *ARR5* методом нозерн-блоттинга показали, что в ходе лаг-периода происходило быстрое накопление мРНК этого гена. В наших опытах максимум такого повышения приходился примерно на 45 мин после воздействия цитокинина; однако уже через 15 мин уровень индукции составлял примерно 80% от максимального (рис. 4а). Данные наших опытов в целом хорошо соответствуют результатам аналогичных исследований на проростках арабидопсиса, выращенных и обработанных гормоном в иных условиях [35, 37]. Все эти результаты позволили предположить, что и другие гены первичного ответа будут столь же быстро отвечать на воздействие цитокинина в данной модельной системе. Действительно, анализ изменений уровня транскриптов выявил и другие гены арабидопсиса со сходным изменением профиля экспрессии под действием цитокинина (рис. 4б, [37]). При сравнении содержания транскриптов собственного гена *ARR5* и трансгена *GUS* под контролем *ARR5*-промотора оказалось, что цитокинин индуцировал их накопление в сходной степени (рис. 4в, [40]). Влияние других активных соединений на накопление этих транскриптов также было практически одинаковым. Так как транскрипты чужеродного гена *GUS* вряд ли подвержены каким-либо специфическим воздействиям в растительной клетке, это указывает на то, что содержание мРНК гена *ARR5* регулируется цитокининами исключительно на уровне транскрипции (точнее, активации транскрипции). В противном случае какие-либо цитокинин-зависимые посттранскрипционные воздействия на транскрипты *ARR5*-гена изменили бы



**Рис. 3.** Количественные характеристики индукции активности *ARR5*-промотора у проростков *ARR5::GUS* арабидопсиса при воздействии цитокинина (5 мкМ БАП). Активность GUS определена флуориметрическим методом [39]. а – дозовая зависимость; б – гормональная специфичность; в – кинетика активации *ARR5*-промотора. ABA – АБК; Ade – аденин; Ado – аденозин; BA – БАП; BL – эпибрассинолид; 2,4-D – 2,4-дихлорофеноксиуксусная кислота; GA<sub>3</sub> – гибберелловая кислота; iP – изопентениладенин; iPR – изопентениладенозин; JA – жасмоновая кислота; Kin – кинетин; NAA – нафтилуксусная кислота; SA – салициловая кислота; Spm – спермин; TD – тидиазурон; iZ – *транс*-зеатин. Концентрация соединений 5 мкМ, за исключением SA и Spm (50 мкМ).

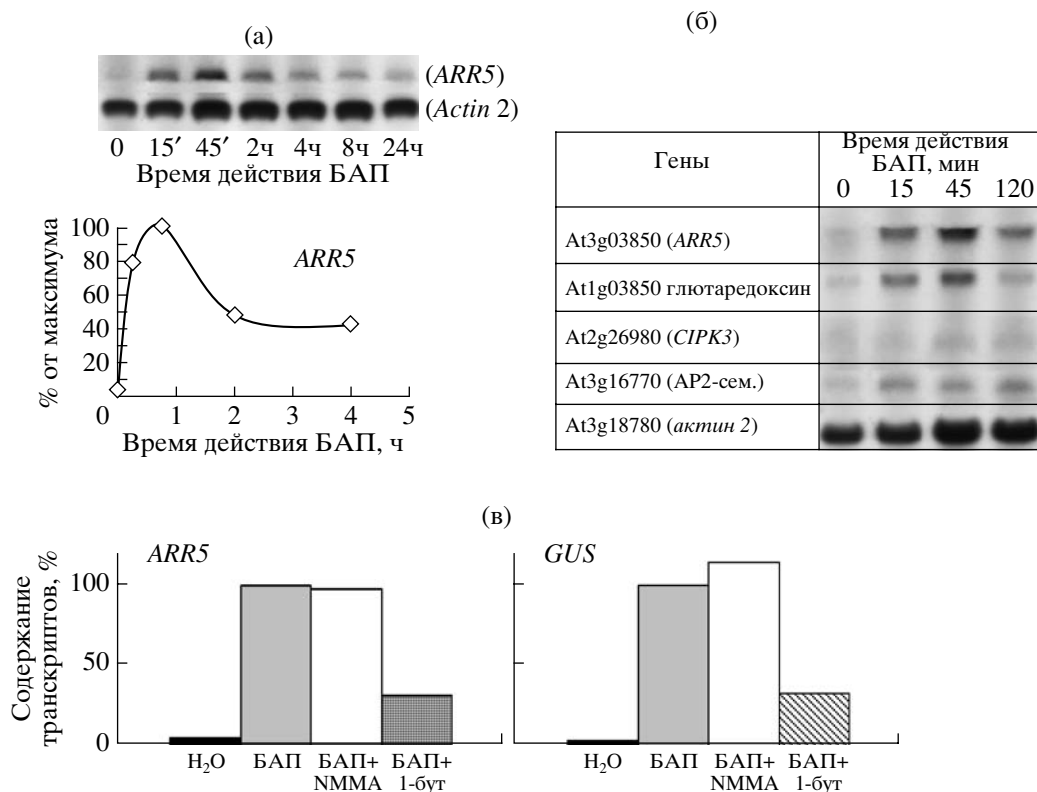
картину его индукции по сравнению с чужеродным геном *GUS*.

Базируясь на данных кинетики активации гена *ARR5*, мы предприняли попытку выявления максимально полного спектра генов первичного ответа на цитокинин [41]. С этой целью были использованы микрочипы ATH1 фирмы “Affymetrix” (США), в микроячейках которых закреплены уникальные олигонуклеотиды почти 24 тыс. генов арабидопсиса, представляющие практически весь геном этого растения [42]. Для идентификации так называемых “ранних” генов, т.е. генов первичного ответа, проростки арабидопсиса были обработаны цитокинином в оптимальной концентрации в течение 15 мин. Для выявления реагирующих на цитокинин “поздних” генов проростки выдерживали вместе с гормоном в течение 2 ч. Затем из обработанных цитокинином и контрольных проростков выделяли мРНК, которые служили матрицами для синтеза флуоресцентно-меченных кДНК, а далее с помощью микрочипов анализировали содержание последних, т.е. фактически относительно содержание индивидуальных транскриптов.

Из всего количества генов арабидопсиса заметную экспрессию проявили примерно 11.5 тыс. генов, т.е. около половины всех представленных на биочипе. Удалось обнаружить примерно 80 ге-

нов, уровень транскриптов которых менялся более чем в 1.8 раза уже за 15 мин воздействия цитокининов. Это число составляет менее 1% от общего количества активных генов. Среди обнаруженных генов порядка 70 активировались цитокинином, а 11 генов, наоборот, репрессировались этим фитогормоном. Столь малый процент генов первичного ответа на цитокинин характерен не только для арабидопсиса. Ранее методами Differential Display (DD) и Representational Difference Analysis (RDA) мы исследовали быстрые эффекты цитокининов на активность генома у табака. При этом доля чувствительных к цитокинину “ранних” генов у табака также составляла менее 1% от их общего количества [43, 44].

Что можно сказать о генах арабидопсиса, напрямую активируемых цитокинином? Среди них обнаруживается группа из 7 генов регуляторов ответа, близкородственных гену *ARR5* (табл. 1). Эти гены оказывают влияние на функционирование двухкомпонентной системы трансдукции сигналов, о чем речь пойдет дальше. Значительная доля непосредственно регулируемых цитокинином генов относится к генам транскрипционных факторов и других регуляторных белков (табл. 1). Эти гены кодируют такие факторы транскрипции, как *APETALA2* (AP2), фактор *HAT22*, включающий



**Рис. 4.** Влияние цитокинина (5 мкМ БАП) на уровень транскриптов цитокинин-чувствительных генов проростков арабидопсиса. а – кинетика накопления транскриптов гена *ARR5* (вверху – вид нозерн-блота; внизу – результат количественного анализа); б – кинетика накопления транскриптов отдельных цитокинин-чувствительных генов; в – содержание транскриптов гена *ARR5* (слева) и гена *GUS* под контролем промотора гена *ARR5* (справа) через 35 мин воздействия БАП, в том числе в присутствии некоторых ингибиторов. NMMA (5 мМ) – ингибитор NO-синтазы; 1-бут – бутан-1-ол (1%), ингибитор генерации фосфатидных кислот фосфолипазой D.

гомеодомен и “лейциновую молнию”, bHLH фактор, имеющий мотив “спираль–петля–спираль”, Муб-транскрипционный фактор, фактор, обладающий типичным NAC-доменом, а также белок с “цинковыми пальцами”. Это белковые факторы различной структуры; они способны специфически узнавать разные нуклеотидные последовательности, т.е. взаимодействовать с промоторами самых разных генов [45, с. 124–132; 46, с. 14–38]. Быстрая индукция активности различных транскрипционных факторов цитокинином создает условия для массового и координированного изменения экспрессии следующей волны (так называемых поздних) генов, прямо или косвенно контролируемых этими факторами.

Помимо генов факторов транскрипции, среди ранних цитокинин-зависимых генов оказались гены регуляторных белков, обладающих протеинкиназной или фосфатазной активностью (серин-треониновая протеинкиназа, SVL-взаимодействующая протеинкиназа 3, предположительно тирозин-фосфатаза) (табл. 1). Эти белки могут участвовать в модуляции активности транскрипционных факторов и/или белков-трансдукторов сигналов и тем самым также приводить к изменению интен-

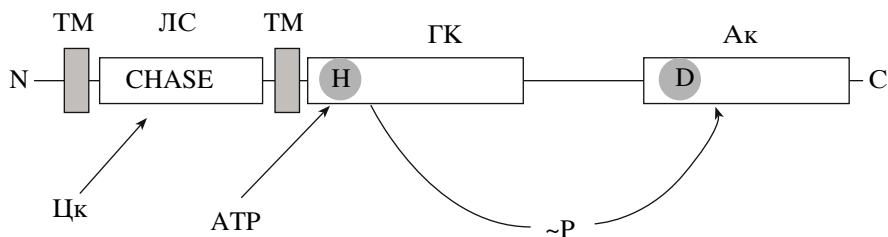
сивности транскрипции большого числа генов. Еще одна группа генов первичного ответа относится к генам направленной деградации белков. Эта клеточная система сейчас вызывает особый интерес в связи механизмами гормональной регуляции у растений. Недавно было обнаружено, что молекулярный механизм действия ауксинов и гиббереллинов напрямую связан с процессом деградации белков – репрессоров транскрипции гормон-зависимых генов [47–49]. Для цитокининов также имеются указания на участие субъединицы 26S протеасомы в действии этих гормонов на клетку [50]. В этой связи обнаруженные изменения в экспрессии сразу 4-х генов, участвующих в направленном протеолизе белков (E2, убиквитин-конъюгирующий фермент 16; лектин-подобный белок F-бокса; АТФ-зависимая субъединица протеазы, и взаимодействующий с белком F-бокса SKP1) могут приводить к сдвигам в содержании транскрипционных факторов в ядре и, как следствие, к изменениям интенсивности транскрипции генов, управляемых данными факторами.

Таким образом, функциональный анализ показывает, что функция значительной части генов

**Таблица 1.** Гены первичного ответа на цитокинин у арабидопсиса, способные регулировать транскрипцию генов

Обозначение гена	↑↓*	Описание функции
Регуляторы ответа типа А		
At3g48100	↑	регулятор ответа 5 (ARR5) 2КС, А-тип
At5g62920	↑	регулятор ответа 6 (ARR6) 2КС, А-тип
At1g10470	↑	регулятор ответа 4 (ARR4) 2КС, А-тип
At1g74890	↑	регулятор ответа 15 (ARR15) 2КС, А-тип
At1g19050	↑	регулятор ответа 7 (ARR7) 2КС, А-тип
At3g57040	↑	регулятор ответа 9 (ARR9) 2КС, А-тип
At2g40670	↑	регулятор ответа 16 (ARR16) 2КС, А-тип
Транскрипционные факторы		
At1g76410	↑	RING белок с “цинковыми пальцами”(вероятный)
At5g13330	↑	AP2-домен содержащий белок <i>RAP2.6</i> (вероятный)
At4g37790	↑	гомеобоксный белок NAT22
At2g18300	↑	bHLH фактор транскрипции (bHLH064 вероятный)
At3g16770	↑	AP2-домен содержащий фактор транскрипции <i>RAP2.3</i>
At1g08810	↑	фактор транскрипции myb семейства
At4g26150	↑	GATA белок с “цинковыми пальцами”
Регуляторные ферменты		
At4g23290	↑	сходный с серин/треониновой киназой белок
At2g26980	↑	СBL-взаимодействующая протеинкиназа 3 (СIPK3)
At5g16480	↑	вероятный белок сходный с тирозиновой фосфатазой
At1g75440	↑	E2, убиквитин-конъюгирующий фермент 16 (UBC16)
At3g61060	↑	белок F-бокса (сходный с лектином)
clpP	↑	АТФ-зависимая субъединица протеазы
At2g02310	↓	белок F-бокса (SKP1-взаимодействующий партнер)

\* Направленность изменений: ↑ – увеличение, ↓ – уменьшение.



**Рис. 5.** Доменная структура рецептора цитокининов CRE1/АНК4 арабидопсиса. Домены белка: ТМ – трансмембранный; ЛС – лиганд-связывающий (CHASE); ГК – гистидинкиназный; Ак – акцепторный; Цк – цитокинины; Н – остаток консервативного гистидина; D – остаток консервативного аспартата. N и C обозначают N- и C-концы белка. Стрелки справа указывают на сайт фосфорилирования и переноса высокоэнергетического фосфата (~P).

первичного ответа на цитокинин состоит в управлении генной экспрессией. Нами был проведен анализ характера экспрессии генов арабидопсиса в более отдаленный период воздействия гормона. Как оказалось, картина генной экспрессии “поздних” генов сильно отличалась от “ранних”. Прямые измерения уровня экспрессии генов через 2 ч действия цитокинина обнаружили большое число новых генов, транскрипция которых менялась к этому времени под действием гормона. Таких “поздних” генов, отвечающих на цитокинин, оказалось более 1500, что примерно в 20 раз больше, чем генов первичного ответа. Интересно отметить, что, если среди “ранних” преобладали гены, активируемые цитокининами, то среди “поздних” большинство, наоборот, составляли гены, репрессируемые цитокининами. Это означает, что в целом на уровне транскрипции структурных генов двухчасовое воздействие цитокининов вызывало не столько активацию, сколько репрессию генома. Поэтому, хотя цитокинины принято относить к гормонам-стимуляторам, вызываемая ими активация отдельных значимых метаболических путей клетки вовсе не коррелирует напрямую со степенью активации транскрипции генома в целом: причинно-следственные связи здесь гораздо сложнее. Видимо, активация неких доминирующих метаболических процессов в клетке неизбежно требует подавления многих других, т.е. определенного уменьшения метаболического разнообразия в целом.

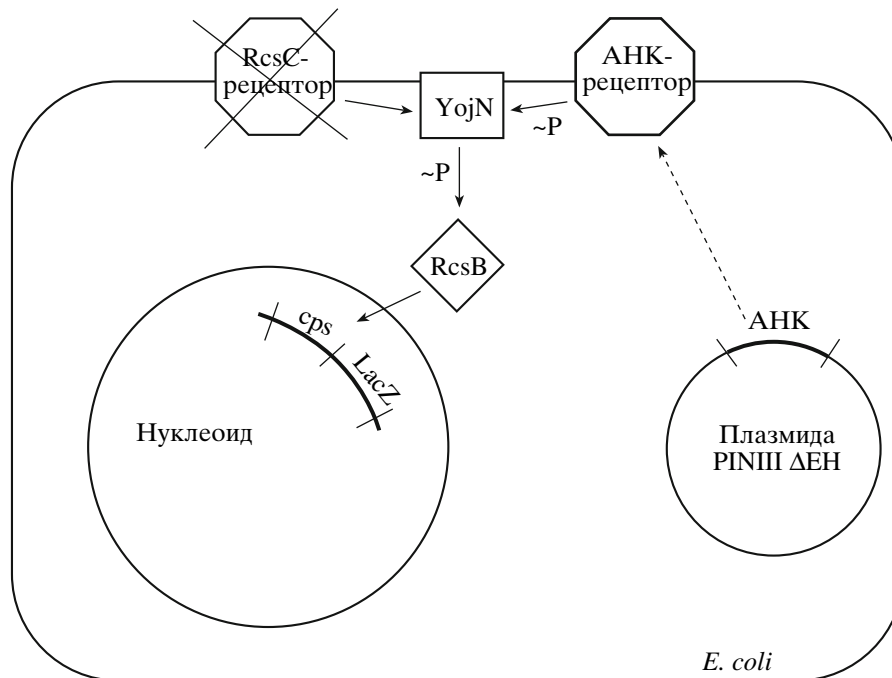
Ранее уже выдвигалось предположение о том, что фитогормоны и, в частности, цитокинины, вызывают изменения активности генома по принципу транскрипционных каскадов [51], когда небольшое количество быстро активируемых генов, кодирующих транскрипционные факторы и/или их модуляторы, приводит в дальнейшем к изменению экспрессии большого набора генов, участвующих в реализации глобальных физиологических программ. Полученные в наших и аналогичных исследованиях данные хорошо согласуются с этим предположением. В частности, в работе [52], где были использованы микрочипы, содержащие ДНК-реплики большого (хотя далеко не пол-

ного) набора генов арабидопсиса (~ 8300 генов), обнаружено всего несколько десятков генов, транскрипция которых устойчиво менялась (увеличивалась или снижалась) под действием цитокинина. Значительная часть быстро активируемых генов продолжала реагировать на цитокинин даже в присутствии циклогексимида (блокирующего биосинтез белка). Это позволило авторам отнести эти “ранние” гены к генам первичного ответа на данный фитогормон. Среди них также были обнаружены многие гены, кодирующие белки-регуляторы транскрипции, в том числе относящиеся к классу AP2-транскрипционных факторов. В дальнейших исследованиях этой лабораторией [53] было установлено, что цитокинин стимулирует не только активацию генов AP2-факторов транскрипции, но и быстрое перемещение отдельных транскрипционных факторов в клеточное ядро.

#### *Рецепторы цитокининов, мутанты по рецепторам*

Как же цитокининовый сигнал доходит до первичных внутриклеточных мишеней, т.е. генов раннего ответа? В 1996 г. японский ученый Т. Какимото впервые высказал предположение о том, что рецептором цитокинина может быть сенсорная гистидинкиназа [54], а в 2001 г. он же, а также независимо Т. Мицуно с сотрудниками доказали, что сенсорная гистидинкиназа арабидопсиса CRE1/АНК4 является рецептором цитокининов [55, 56]. В настоящее время считается общепринятым, что арабидопсис содержит 3 близких по строению сенсорных гистидинкиназы – рецепторов цитокининов: CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2. Сходные по структуре рецепторы цитокининов были обнаружены у эволюционно далеких от арабидопсиса видов: кукурузы и риса [57–59]. Растения арабидопсиса, у которых были инактивированы все три рецептора цитокининов, теряли чувствительность к этому гормону, а гены первичного ответа переставали отзываться на цитокинины [60–62]. Такие тройные мутанты представляли собой крохотные растеньица, маложизнеспособные и в основном стерильные. Интересно отме-





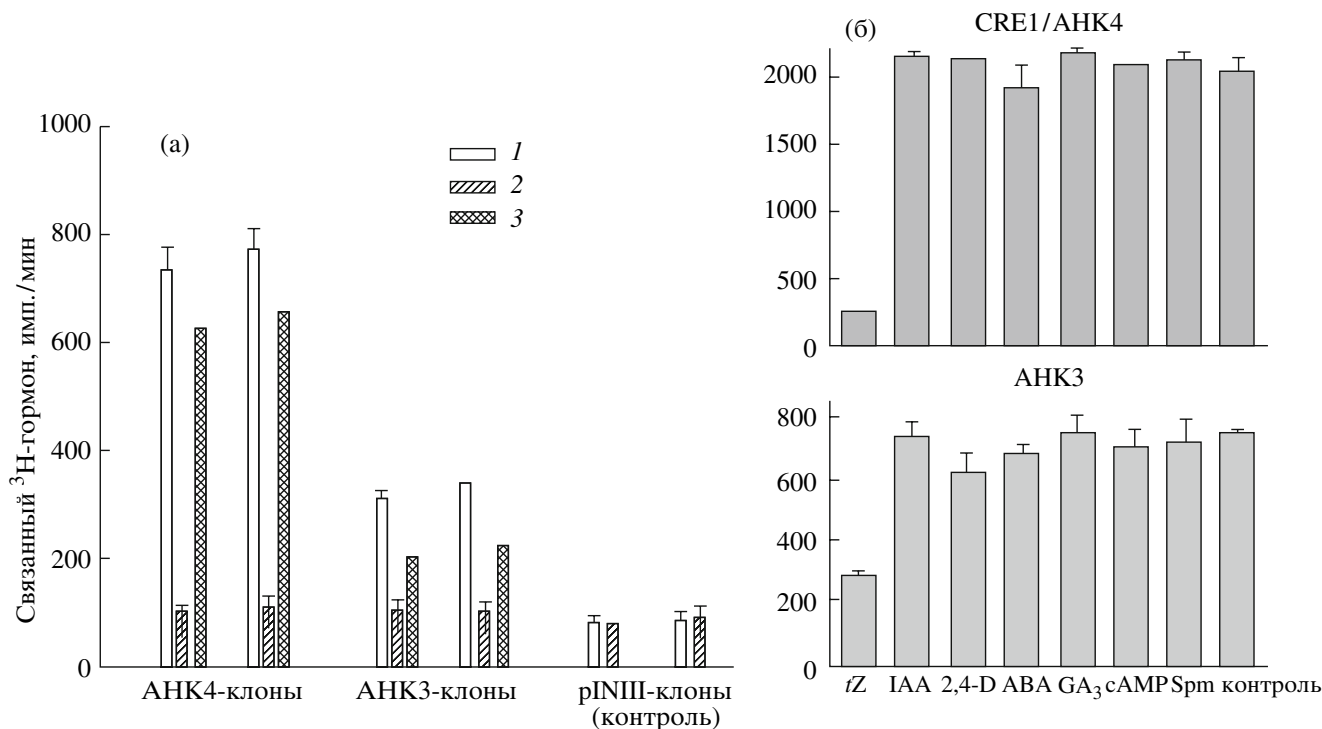
**Рис. 6.** Схематическое изображение трансгенной бактериальной клетки *E. coli*, экспрессирующей рецепторы цитокининов и чувствительной к цитокининам. YoiN – переносчик активного фосфата (~P) на фактор транскрипции RcsB, регулятор *cps*-промотора. RcsC – гибридная гистидинкиназа бактерии, аналог АНК-рецепторов.

тить, что у двойных и особенно тройных мутантов по рецепторам наблюдали резкий подъем эндогенной концентрации цитокининов Z-типа. Однако при этом никаких характерных признаков действия избытка цитокининов не наблюдали [62], что свидетельствует в пользу отсутствия каких-либо иных, чем три сенсорные гистидинкиназы, рецепторов цитокининов у арабидопсиса.

Структура рецептора цитокининов CRE1/АНК4 показана на рис. 5. Эта сенсорная гистидинкиназа состоит из нескольких доменов. На N-конце белка расположена пара гидрофобных сегментов, определяющих трансмембранную локализацию рецептора. Исходно полагали, что рецепторы цитокининов локализованы на плазмалемме клетки. В этом случае участок полипептидной цепи, располагающийся между гидрофобными сегментами, должен находиться снаружи от плазмалеммы, т.е. вне клетки. Этот участок гомологичен лиганд-связывающим доменам многих других рецепторных белков прокариот, одноклеточных эукариот и растений и получил общее название CHASE (от *C*yclase/*H*istidine kinase-*A*ssociated *S*ensing *E*xtracellular) [63, 64]. Как будет показано далее, именно CHASE-домен отвечает за узнавание и связывание цитокининов. Центральная часть белка, находящаяся внутри клетки, включает несколько доменов, один из которых представляет собой домен с активностью гистидинкиназы. На краю этого домена расположен остаток так называемого консервативного гистидина (т.е. гистидина в составе консерватив-

ной последовательности – ATVSH~~E~~IRTP-), способный акцептировать фосфат от АТФ. В С-концевой области белка располагается типичный воспринимающий домен, где имеется остаток консервативного аспартата, способный акцептировать фосфат с фосфогистидина. Согласно современным представлениям, при взаимодействии цитокининового рецептора с соответствующим гормоном происходит димеризация рецепторов и активация их гистидинкиназной активности, в результате чего вначале фосфорилируется остаток консервативного гистидина внутри гистидинкиназного домена, а затем этот высокоэнергетический фосфат перебрасывается на остаток консервативного аспартата в С-концевой части белка (рис. 5). Таким образом, в ходе рецепции гормона события внутри белка разворачиваются, начиная с его N-конца и далее в направлении С-конца: связывание гормона на N-конце, далее фосфорилирование белка в его срединной части, и затем переброска фосфата ближе к С-концу. Цитокининовые рецепторы арабидопсиса АНК2 и АНК3 близки по общей структуре к рецептору CRE1/АНК4 (идентичны по аминокислотным последовательностям на 52–54%), но, видимо, отличаются числом трансмембранных сегментов, соседствующих с CHASE-доменом (см. ниже).

Для более детального изучения свойств рецепторов цитокининов мы взяли за основу модельную систему на основе трансгенных бактерий, экспрессирующих индивидуальные рецепторы



**Рис. 7.** Характеристика связывания высокоочищенного  $^3\text{H}$ -*транс*-зеатина интактными трансгенными бактериями (*E. coli*), экспрессирующими рецепторы цитокининов арабидопсиса АНК3 или CRE1/АНК4. а – тотальное (1), неспецифическое (2) и специфическое связывание (3) в АНК-экспрессирующих и контрольных клонах; б – гормональная специфичность рецепторов. АВА – АБК; сАМР – циклический АМФ; IAA – ИУК, GA<sub>3</sub> – гибберелловая кислота, Spm – спермин; tZ – *транс*-зеатин. Концентрация соединений 8.6 мкМ, за исключением Spm (17.3 мкМ).

цитокининов [56, 65, 66]. У этих бактерий (*Escherichia coli*) отсутствовала одна из собственных гистидинкиназ (RcsC), близкая по структуре к гистидинкиназам арабидопсиса – рецепторам цитокининов. Данная бактериальная гистидинкиназа RcsC в норме передает сигнал на промотор *cps*-оперона бактерии. Оказалось, что экспрессированная в бактерии сенсорная гистидинкиназа арабидопсиса CRE1/АНК4 может замещать отсутствующую бактериальную гистидинкиназу RcsC и передавать свой сигнал на *cps*-оперон с использованием бактериальной системы трансдукции сигнала. Однако важно отметить, что передача сигнала от CRE1/АНК4 происходила только при воздействии активных цитокининов [56, 65, 66]. Это показывает, что растительный рецептор в бактериях находится в функционально-активном состоянии и способен узнавать цитокинины. Для удобства наблюдения за активностью рецептора цитокининов бактерию снабдили также встроенным репортерным геном *lacZ* (галактозидазы) под контролем того же *cps*-промотора [56] (рис. 6). Таким образом, простое тестирование репортерной активности галактозидазы позволяло оценить степень функциональной активности цитокининового рецептора в бактериях. На основе измерения активности *lacZ* мы сопоставили эффективность большого количества цитокининов и структурно

сходных лигандов при их воздействии на бактерии, экспрессирующие 2 различных рецептора цитокининов: АНК3 или CRE1/АНК4 [66]. Оказалось, что при общем сходстве относительных активностей различных цитокининов в обеих тест-системах наблюдались и определенные различия между рецепторами по степени ответа на те или иные лиганды. Это, в частности, относится к таким соединениям, как дигидрозеатин, *цис*-зеатин, рибозидам и некоторым другим. Эти результаты позволили предположить наличие определенных различий лигандной специфичности между близкородственными рецепторами цитокининов из одного вида растений [66].

Этап специфического гормон-рецепторного взаимодействия является ключевым при восприятии гормонального сигнала и его передаче внутрь клетки. Поэтому столь важным является знание характеристик этого взаимодействия [67]. Для более точного анализа лигандной специфичности рецепторов цитокининов, а также их основных свойств была использована способность рецепторов специфически связывать соответствующие лиганды, в данном случае цитокинины. Эти исследования мы проводили на тех же бактериальных штаммах, экспрессирующих индивидуальные цитокининовые рецепторы арабидопсиса. Экспрессируемые рецепторы были функционально активны и при этом при-

существовали в концентрации, достаточной для количественного измерения их гормон-связывающей способности. Так как бактерии *E. coli* не имеют собственных систем специфического связывания и метаболизма цитокининов, искажающее влияние побочных процессов на получаемые данные было маловероятным.

Результаты с применением высокоочищенного  $^3\text{H}$ -*транс*-зеатина показали, что живые трансгенные бактерии действительно были способны специфически связывать цитокинины, однако только те клоны, которые экспрессировали гены растительных рецепторов цитокининов (рис. 7а) [68, 69]. О специфическом связывании меченого зеатина свидетельствовала существенная и достоверная разница между тотальным и неспецифическим связыванием, которая количественно зависела от типа рецептора и использованного клона, но полностью отсутствовала у контрольных клонов, экспрессирующих “пустой” вектор. Связывание цитокининов исключительно специфично: наряду с цитокининами был протестирован ряд других фитогормонов, но только цитокинины взаимодействовали с данными рецепторами (рис. 7б). Двухвалентные катионы ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) в диапазоне физиологических концентраций практически не влияли на интенсивность связывания гормонов обоими рецепторами.

Связывание цитокининов рецепторами оказалось по большей части легко обратимым. Если добавить немеченый зеатин после формирования комплексов рецепторов с меченым зеатином, то происходит быстрое вытеснение метки из состава комплекса немеченым гормоном. Вытеснение меченого гормона немеченым проходило гораздо полнее в случае рецептора CRE1/АНК4, чем АНК3. Величину сродства рецепторов к зеатину определяли при добавлении к ним разных доз меченого или немеченого гормона (рис. 8) [67–69]. В координатах Скэтчарда были получены линейные зависимости, что указывает на присутствие однотипных сайтов связывания гормона без признаков кооперативности этого связывания. Рассчитанные константы диссоциации ( $K_D$ ) для зеатина составили 1–2 нМ для АНК3 и 2–4 нМ для CRE1/АНК4, что характерно для высокоаффинных гормон–рецепторных взаимодействий. Более того, величины констант хорошо соответствуют данным о концентрациях цитокининов *in planta*. Недавние прямые измерения разных лабораторий [62, 70] у арабидопсиса дикого типа дали значения для эндогенных концентраций *транс*-зеатина и изопентениладенина в диапазоне 0.7–2.5 нМ, что близко к величинам измеренных  $K_D$ .

Лигандную специфичность взаимодействия мы исследовали, исходя из способности цитокининов и их аналогов конкурировать с меченым зеатином за связывание с рецептором [68, 69], для

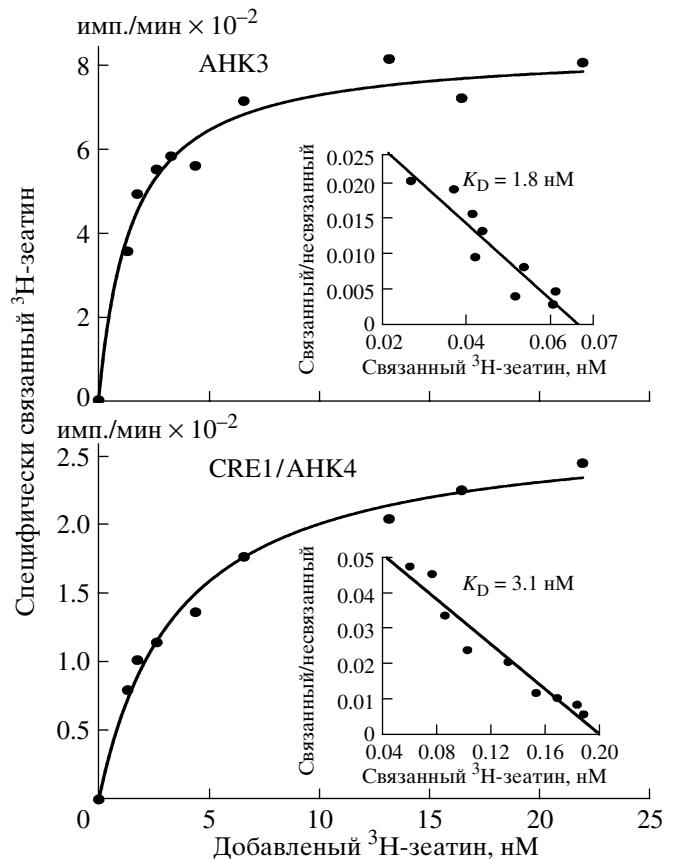
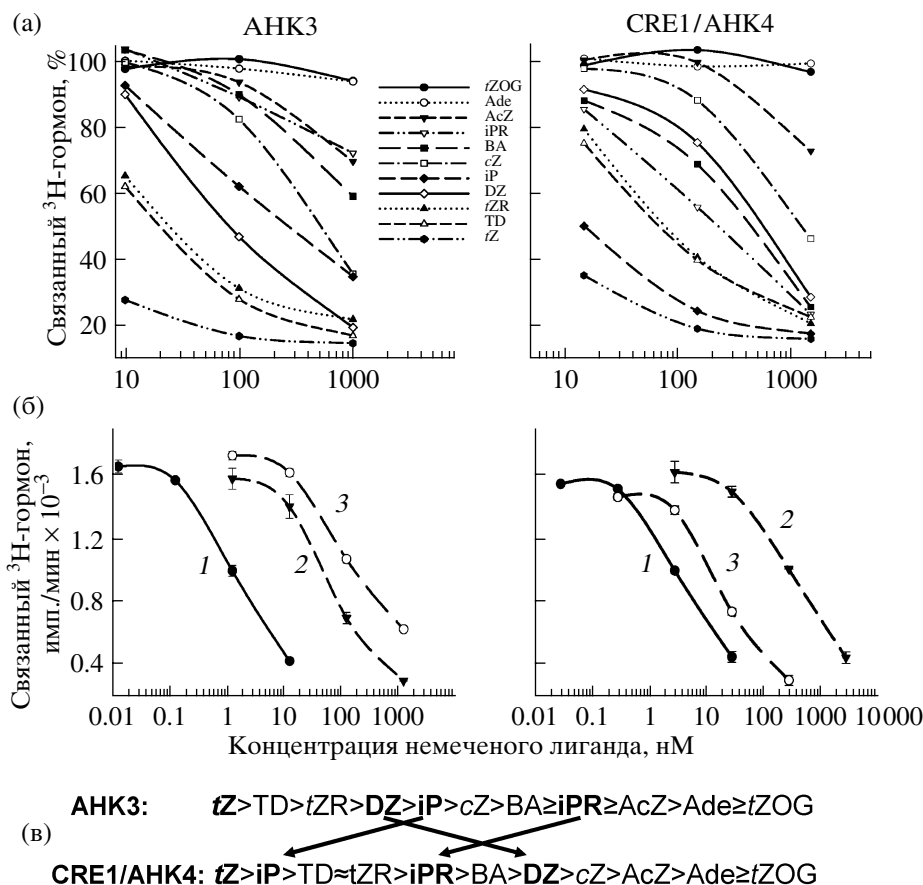


Рис. 8. Дозовая зависимость связывания  $^3\text{H}$ -*транс*-зеатина с цитокининовыми рецепторами АНК3 и CRE1/АНК4 и ее анализ в координатах Скэтчарда.

чего был применен классический радиолигандный метод (рис. 9) [67]. Оказалось, что оба рецептора обладали наиболее высоким сродством к *транс*-зеатину (рис. 9а). Все модификации *транс*-зеатина, даже минорные, существенно снижали его способность связываться с рецепторами. Удаление у зеатина алифатической боковой цепи с последним аденином практически лишало последний способности взаимодействовать с рецепторами. То же самое происходило при присоединении к этой боковой цепи остатка глюкозы (реакции глюкозилирования). Изомеризация боковой цепи с переходом ОН-группы цепи из *транс*- в *цис*-положение резко снижала связывание молекулы с рецепторами, хотя это связывание сохранялось на вполне достоверном уровне. К удивлению, БАП, аденин с ароматическим боковым радикалом, традиционно считающийся одним из самых эффективных цитокининов, показал весьма умеренную связывающую активность.

Наиболее значимыми представляются наши результаты по установлению различий лигандной специфичности связывания между рецепторами АНК3 и CRE1/АНК4 [69]. Цитокинины *iP*-типа, изопентениладенин и его рибозид, связыва-



**Рис. 9.** Лигандная специфичность цитокининовых рецепторов АНК3 и CRE1/АНК4. а, б – конкурентные кривые вытеснения <sup>3</sup>H-*транс*-зеатина немечеными лигандами; в – ряды средства цитокининов к рецепторам. Ade – аденин; AcZ – ацетил-*O*-зеатин; BA – 6-бензиладенин (БАП); *cZ* – *цис*-зеатин; DZ – дигидрозеатин; iP – изопентениладенин; iPR – изопентениладенозин; TD – тидиазурон; *tZ* – *транс*-зеатин; *tZOG* – *транс*-зеатин-*O*-глюкозид; *tZR* – *транс*-зеатинрибозид; б – кривые конкуренции для *tZ* (1), DZ (2) и iP (3).

лись с относительно высоким сродством с рецептором CRE1/АНК4, но сравнительно слабо – с рецептором АНК3. С другой стороны, DZ, продукт гидрирования двойной связи бокового радикала, гораздо сильнее взаимодействовал с АНК3 по сравнению с CRE1/АНК4. Опыт по тестированию активности этих соединений в широком диапазоне концентраций наглядно демонстрирует различия лигандной специфичности связывания между рецепторами (рис. 9б). Относительное расположение кривых вытеснения метки для лигандов iP и DZ у рецепторов АНК3 и CRE1/АНК4 взаимно инвертировано. На основе полученных конкурентных кривых были построены ряды средства лиганд-белковых взаимодействий для каждого из изученных рецепторов (рис. 9в). Важно отметить, что эти ряды средства оказались сходны с рядами активности, определенными в функциональном тесте по активации промотора теми же цитокининами. Полученные радиолигандным методом ряды средства хорошо коррелируют и с ранее установленной в многочисленных биотестах физио-

логической активностью этих фитогормонов. Наши последние результаты указывают на высокую консервативность лигандной специфичности связывания, которая качественно не меняется даже у рецепторов с мутациями в CHASE-домене [71]. Все это говорит о том, что полученные радиолигандным методом на бактериальной системе данные о лигандной специфичности рецепторов отражают их реальные функциональные свойства в растительной клетке.

На основе полученных кривых вытеснения нам удалось рассчитать константы средства различных цитокининов к рецепторам (табл. 2). Очевидно, что эти константы расположены в широком диапазоне значений и могут различаться для разных соединений более чем в 1000 раз. В случае некоторых молекул, например iP или DZ, наблюдались существенные различия между рецепторами по средству к ним, эти различия достигали порядка величин.

Эти различия, естественно, зависят от особенностей строения центра связывания фитогормона

на молекуле рецепторного белка. Пока еще мы не можем точно описать сайты связывания цитокининов в рецепторах. Хотя факт, что именно CHASE-домен формирует связывающий цитокинин сайт, установлен вполне надежно. К настоящему времени известно несколько мутаций рецепторов, снижающих или подавляющих специфическое связывание цитокининов. Все эти мутации, как оказалось, расположены внутри CHASE-домена (рис. 10) [72]. Если от цитокининового рецептора (в данном случае CRE1/АНК4) полностью “отрезать” всю его “цитоплазматическую” часть и экспрессировать оставшийся N-концевой фрагмент белка с CHASE-доменом в *E. coli*, то связывание гормона этим фрагментом сохраняется, причем на уровне, близком к уровню интактного рецептора. Напротив, отделенный С-концевой фрагмент белка практически лишен связывающей способности. Все это однозначно указывает на CHASE-домен как на гормон-связывающий участок белка. Окончательная структура связывающего сайта будет определена, по всей видимости, после кристаллизации рецепторного белка или его CHASE-содержащего фрагмента.

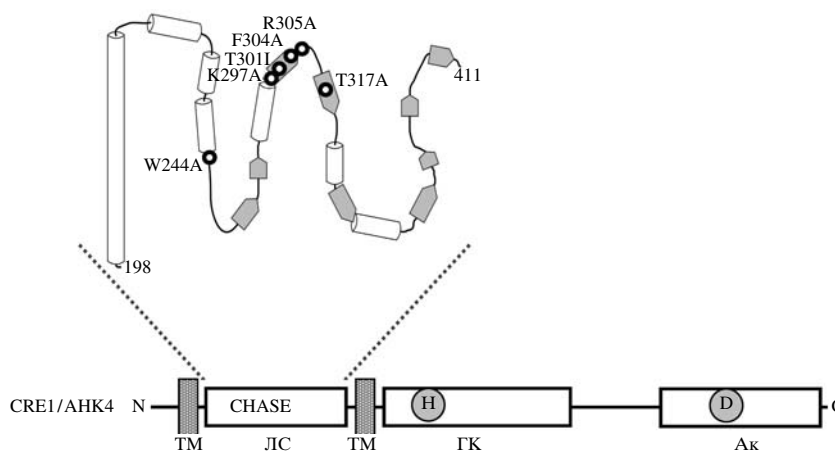
Сейчас мы можем строить только более или менее правдоподобные предположения о том, как именно меняется структура рецептора после связывания цитокинина. Как показано выше, сам факт высокоаффинного связывания гормона рецептором установлен вполне надежно. Таким образом, наиболее простая гипотеза действия цитокинина на рецептор состоит в том, что при образовании комплекса цитокинина с сайтом связывания, как при всяком высокоаффинном взаимодействии, увеличивается свободная энергия комплекса, которая затрачивается на изменение структуры рецепторного белка, возможно, с ликвидацией каких-либо стерических препятствий для его димеризации. Далее, как уже отмечалось выше, наиболее

**Таблица 2.** Примерные константы сродства ( $K_D$ ) цитокининов к рецепторам АНК3 и CRE1/АНК4 арабидопсиса

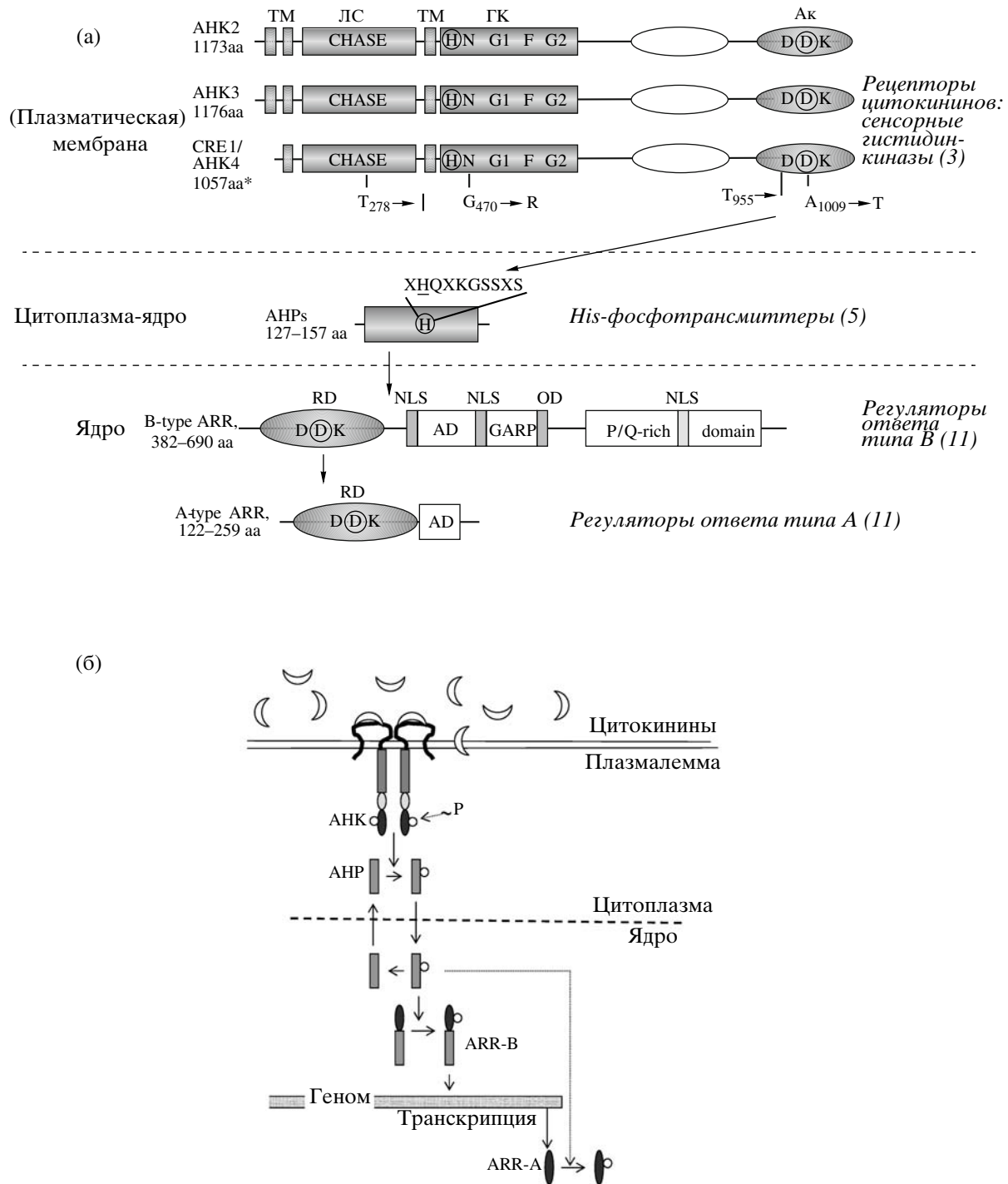
Цитокинин	Сокращения	Примерные $K_D$ , нМ	
		АНК3 (“лиственной”)	CRE1/АНК4 (“корневой”)
<i>транс</i> -Зеатин	<i>tZ</i>	<b>1.3</b>	<b>3.9</b>
Тидиазурон	TD	13	40
<i>транс</i> -Зеатинрибозид	<i>tZR</i>	15	50
Дигидрозеатин	<b>DZ</b>	<b>50</b>	<b>400</b>
N6-( $\Delta^2$ -изоопентенил)-аденин	<b>iP</b>	<b>150</b>	<b>17</b>
<i>цис</i> -Зеатин	<i>cZ</i>	375	830
N6-бензиладенин	BA	1050	300
N6-( $\Delta^2$ -изоопентенил)-аденозин	iPR	$\geq 2300$	130
<i>транс</i> -Зеатин- <i>O</i> -ацетил	<i>tZOAc</i>	$\geq 2300$	$\geq 2750$
<i>транс</i> -Зеатин- <i>O</i> -глюкозид	<i>tZOG</i>	н.о.	н.о.
Аденин	Ade	н.о.	н.о.

Примечание. н.о. – константа не определена, т.к. сродство очень низкое.

вероятна димеризация гормон-рецепторных комплексов, причем каждый белок в составе димера может использовать другой белок (точнее – его конкретный “консервативный” гистидин) как субстрат своего гистидинкиназного домена. Затем фосфорилированный гистидин передает свой активированный фосфат на остаток аспартата на С-конце белка. Этот “активированный” фосфат и является той специфической сигнальной “меткой”, служащей для передачи цитокининового сигнала внутри клетки. Но как этот “горячий” фосфат до-



**Рис. 10.** Мутации рецептора цитокининов CRE1/АНК4, нарушающие связывание цитокининов. Кружками обозначены замены аминокислот в определенных позициях CHASE-домена. Остальные обозначения, как на рис. 5.



**Рис. 11.** Двухкомпонентная система трансдукции цитокининового сигнала у арабидопсиса (модифицировано из [72]). а – структура и представленность белков системы. Слева обозначены размеры белков (количество аминокислотных остатков, aa). В скобках справа – общее количество белков данного типа. NLS – сигнал ядерной локализации; H – остаток консервативного гистидина; D – остаток консервативного аспаргата. AD, F, G1, G2, GARP, N, P/Q-rich – консервативные последовательности аминокислот. Остальные обозначения – как на рис. 5; б – базовая схема внутриклеточной трансдукции цитокининового сигнала. АНК – рецепторы; АНП – фосфотрансмиттеры; ARR-B – регуляторы ответа типа В (транскрипционные факторы); ARR-A – регуляторы ответа типа А; светлые кружочки – активированные фосфаты (–P).

ходит до ядра и способствует там активации специфических генов первичного ответа?

*Трансдукция и аттенуация цитокининового сигнала*

По своей структуре сенсорные гистидинкиназы – рецепторы цитокининов – относятся к белкам так называемой двухкомпонентной системы передачи сигналов (см. рис. 5). Такие системы трансдукции сигналов основательно изучены у бактерий, где они широко представлены [73]. В своем классическом виде двухкомпонентная система состоит из сенсорной гистидинкиназы (рецептор) и регулятора ответа (транскрипционный фактор). Под влиянием специфического сигнала рецептор димеризуется, фосфорилируется и далее передает свой “горячий” фосфат на остаток аспартата регулятора ответа. Последний обладает ДНК-связывающим доменом, связывается в результате активации с определенной последовательностью ДНК в составе промотора и активирует или, наоборот, репрессирует соответствующий ген или оперон. У арабидопсиса и других растений также обнаружены факторы транскрипции со структурой, гомологичной регуляторам ответа бактерий (рис. 11) [58, 59, 74–76].

Однако эти факторы, как и другие белки хроматина, локализуются в ядрах клеток, а сенсорные гистидинкиназы, согласно последним данным, встроены в клеточные мембраны: как в плазмалемму, так и во внутренние мембраны клеток [71, 77]. Поэтому для того, чтобы активированный фосфат достиг своей конечной цели, а именно факторов транскрипции двухкомпонентной системы (у арабидопсиса эти факторы называются ARR-B), он должен быть перенесен от той или иной мембраны в ядро с помощью какого-либо переносчика. У арабидопсиса идентифицировано 5 таких белков-переносчиков, получивших название фосфотрансммиттеры (рис. 11а). Эти белки принимают активированный фосфат от остатка аспартата рецептора на остаток консервативного гистидина в своей структуре, далее перемещаются в ядро и там отдают этот фосфат регуляторам ответа типа В. ARR-B имеют в своем составе так называемый GARP домен, способный к сайт-специфичному связыванию с ДНК. В результате фосфорилирования ARR-B обретают возможность связываться с ДНК и взаимодействуют со специфическими участками ДНК в составе промоторов генов (рис. 11б). Как полагают, эти консенсусные участки включают короткие АТ-богатые последовательности [52, 74, 78, 79]. Недавно установлено, что консенсусная последовательность для транскрипционного фактора ARR1 представляет собой палиндром или псевдопалиндром типа AAGAT<sup>c</sup>/TТ [80]. Такая структу-

ра узнаваемого сайта предполагает взаимодействие с ДНК димерных форм ARR-B.

В результате фосфорилирования ARR-B-транскрипционных факторов несколько десятков генов, в промоторах которых присутствуют узнаваемые факторами нуклеотидные последовательности, активируются или репрессируются уже через несколько минут после воздействия цитокинином. Это и есть как раз те самые ранние гены, или гены первичного ответа, о которых шла речь выше.

Такой на сегодняшний день представляется ставшая уже “канонической” схема внутриклеточной передачи цитокининового сигнала (рис. 11). При этом цитокинины мало влияют на транскрипцию генов самой двухкомпонентной системы, непосредственно участвующих в проведении цитокининового сигнала [41, 52]. Некоторое положительное влияние отмечалось лишь для гистидинкиназы CRE1/АНК4. По всей видимости, базовая двухкомпонентная система стабильно присутствует и готова функционировать вне зависимости от того, какова концентрация цитокининов в клетке и ткани. Однако имеется один тип регуляторов ответа, также имеющих отношение к двухкомпонентной системе, на которые цитокинины оказывают большое влияние. Это регуляторы ответа типа А (ARR-A), во многом гомологичные регуляторам ответа типа В, но отличающиеся от последних отсутствием ДНК-связывающего домена [58, 59, 74–76]. Очевидно, что регуляторы ответа типа А не являются непосредственными факторами транскрипции. Зато ARR-A обладают функциональным ресиверным доменом, способным воспринимать активированный фосфат с фосфотрансммиттеров аналогично ARR-B. Это и предопределяет роль ARR-A как негативных регуляторов действия цитокининов: с началом активации этих регуляторов ответа они, как предполагается, перехватывают на себя значительную часть активированных фосфатов, направляемых в ядро, и уровень цитокинин-индуцированной транскрипции снижается. Это объясняет своеобразный характер кинетики индукции транскрипции промотора типичного гена раннего ответа *ARR5*, в частности, следующий за резким подъемом быстрый спад количества транскриптов, что было показано нами (рис. 4) [41] и другими авторами [35, 37] в прямых экспериментах.

Однако только ли двухкомпонентная система бактериального типа участвует во внутриклеточной передаче цитокининового сигнала? Мы провели фармакологический анализ влияния различных ингибиторов и активаторов конкретных сигнальных путей эукариотического типа на модельных системах проростков амаранта [81] и *ARR5::GUS* арабидопсиса [38]. Среди большого количества соединений было проанализировано действие ингибиторов протеинфосфатаз и проте-

**Таблица 3.** Фармакологический (ингибиторный) анализ активации *ARR5::GUS* цитокинином (БАП) в проростках арабидопсиса

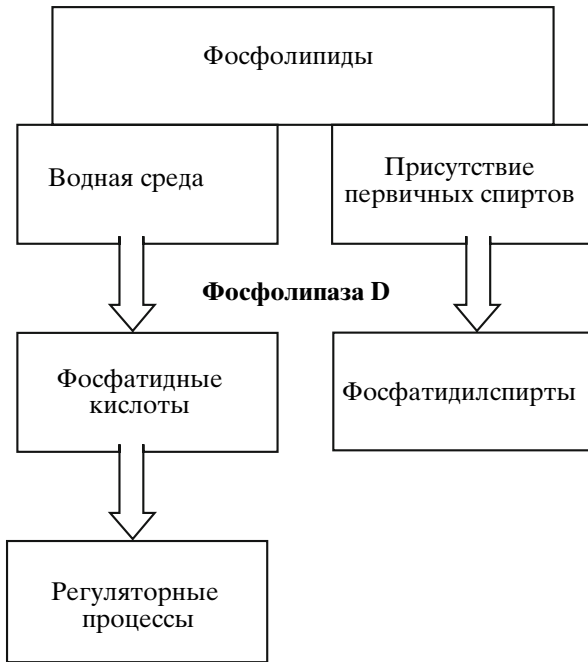
Ингибитор	Концентрация	Индукция, %	Мишень(и) ингибитора
БАП без ингибитора	5 мкМ	100	
Бутан-1-ол	~1%	22 ± 2	фосфолипаза D
Пропан-1-ол	~1%	29 ± 3	фосфолипаза D
Бутан-2-ол	~1%	80–100	изомер бутан-1-ола
Пропан-2-ол	~1%	80–100	изомер пропан-1-ола
ЭДТА	10 мМ	0	дивалентные катионы
ВАРТА	10 мМ	2 ± 2	кальций
W7	500 мкМ	0	кальмодулин
Каликулин А	2 мкМ	9 ± 1	протеинфосфатаза (1 = 2А)
Окадаевая кислота	2 мкМ	67 ± 6	протеинфосфатаза (2А > 1)
Таутомицин	0.5–2 мкМ	100	протеинфосфатаза (1 > 2А)
K252a	4 мкМ	40 ± 19	протеинкиназы
Генистеин	50–500 мкМ	100	тирозинкиназы
Росковитин	10–100 мкМ	100	циклин-зависимые киназы
L-NMMA	10 мМ	2.5 ± 2	NO синтаза
Спермин	50 мМ	3.5 ± 1	неизвестна
U73122	10 мкМ	70 ± 3	фосфолипаза С
Вортманнин	1–4 мкМ	100	фосфатидилинозитол–3-киназа
Пропранолол	250 мкМ	17 ± 3	фосфатаза фосфатидной кислоты

инкиназ, ингибиторов фосфолипаз D и C, доноров оксида азота и ингибиторов его синтазы, антагонистов кальция и кальмодулина, активаторов G-белков и многих других. Список ряда ингибиторов, проявивших или не проявивших свою действенность на модели трансгенного арабидопсиса, приведен в табл. 3. Оказалось, что первичные спирты обладали способностью подавлять действие цитокинина, тогда как близкие по свойствам вторичные спирты в этих условиях были неактивны. Известно, что свойством специфически взаимодействовать с первичными, но не со вторичными спиртами обладают фосфолипазы группы D (ФлD) [82–84]. В результате взаимодействия с первичными спиртами ФлD перестает производить основной продукт катализируемой реакции – фосфатидные кислоты, а вместо этого образует фосфатидилспирты (рис. 12). Фосфатидные кислоты являются посредниками при трансдукции многих сигналов, в том числе гормональных [85, 86]. Поэтому специфическое подавление того или иного процесса жизнедеятельности первичными, но не вторичными спиртами часто служит указанием на то, что в данном процессе участвуют ФлD.

Мы провели специальное исследование возможности участия ФлD в трансдукции цитокинового сигнала. Первичные спирты (этанол, пропан-1-ол, бутан-1-ол) обладали селективной спо-

собностью в низких концентрациях (начиная с 0.1–0.2%) подавлять действие цитокинина. Бутан-1-ол проявил более высокую активность по сравнению со спиртами меньшего молекулярного веса (рис. 13а), что находится в согласии со свойствами типичных ФлD [87]. На модельной системе проростков амаранта с помощью кинетико-ингибиторного анализа было показано раннее действие первичных спиртов (бутан-1-ола), происходящее до начала активации транскрипции [81]. На модельной системе проростков арабидопсиса было показано подавление аккумуляции цитокинин-зависимых транскриптов в присутствии бутан-1-ола (рис. 13б, 13в) [38, 87]. Эти данные находятся в согласии с предположением о действии ФлD на стадии трансдукции цитокинового сигнала, т.е. в период до начала подъема транскрипции. Установлено также, что не только первичные спирты, но и другие ингибиторы ФлD подавляют действие цитокининов. В наших опытах известный ингибитор ФлD, LPE [88], снижал степень индукции *ARR5::GUS* трансгена практически до уровня контроля [89]. В других опытах на проростках амаранта, проведенных в совместном исследовании с лабораторией В.С. Кравца в рамках проекта ИНТАС, были получены прямые данные об активации ФлD в ранний период действия цитокининов, причем эта активация проявлялась уже через 10 мин после добавления фито-





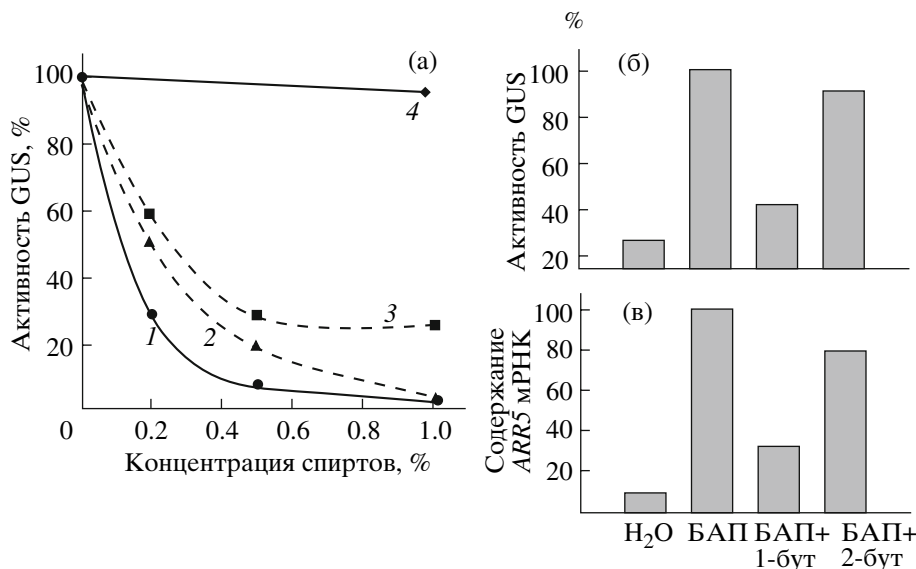
**Рис. 12.** Схема образования фосфатидных кислот (посредников в передаче сигналов) фосфолипазой D и блокирования этого процесса первичными спиртами.

гормона к проросткам [90, 91]. Предполагается, что чувствительная к цитокинину ФлД является зависимой от фосфатидилинозит-4,5-дифосфата (PIP<sub>2</sub>). При этом бутан-1-ол в физиологически эффективных концентрациях никакого специфического эффекта на собственно гормон–рецепторное взаимодействие не оказывал [69]. Все эти и другие результаты служат важными аргумента-

ми в пользу участия ФлД именно в процессе внутриклеточной трансдукции цитокининового сигнала.

Пока еще мы не в состоянии точно обозначить конкретные место и роль ФлД в трансдукции сигнала цитокинина, для этого нужны дальнейшие исследования. Фосфатидная кислота, продукт ФлД, может прямо взаимодействовать с различными белками и влиять на их биологическую активность [92]. С другой стороны, фосфатидные кислоты способны вызывать перераспределение отдельных белков между различными клеточными компартментами, в частности, “заякоривая” белки на мембранах [93]. Такое перераспределение может облегчать или, наоборот, затруднять белок–белковые взаимодействия, участвующие в трансдукции сигналов. Таким способом фосфатидные кислоты могут регулировать, в том числе, активность каскадов фосфорилирования белков [94]. Кроме того, активность ФлД может быть необходимой для структурных перестроек самих рецепторов в мембране после их взаимодействия с гормоном.

В отношении других эффективных ингибиторов, таких, как хелаторы кальция (ЭДТА, ВАРТА), полиамины (спермин) или ингибиторы NO-синтазы (L-NMMA), дополнительные исследования не подтвердили их участия на стадии трансдукции цитокининового сигнала [38, 40, 81, 95, 96], что указывает на возможность их относительно неспецифического ингибирующего действия на более поздних стадиях генного ответа. Мастопаран, пептидный активатор гетеротримерных G-белков, в широком диапазоне концентраций не воспроизводил эффекта цитокининов, что свидетельствует против участия G-белок-за-



**Рис. 13.** Подавление действия цитокинина (БАП, 5 мкМ) первичными спиртами на модели трансгенного *ARR5::GUS* арабидопсиса.

а – концентрационные зависимости влияния ряда спиртов; б, в – влияние бутан-1-ола (1-бут) и бутан-2-ола (2-бут) (1%) на активность GUS (б) и на содержание транскриптов гена *ARR5* (в). 1 – 1-бут; 2 – метанол; 3 – этанол; 4 – 2-бут.

висимых трансмембранных рецепторов в сигнальном цитокининовом. В целом полученные данные позволяют рассматривать процесс трансдукции цитокининового сигнала как достаточно сложный, в котором участвуют не только элементы двухкомпонентной системы бактериального типа, но и компоненты систем эукариотического типа, в том числе связанные с активностью ФЛД.

## НЕКОТОРЫЕ СЛЕДСТВИЯ “МОЛЕКУЛЯРНЫХ” ОТКРЫТИЙ

### *Путь от сигнала до эффекта*

Достижения последних лет позволяют лучше представить молекулярные механизмы, благодаря которым цитокинины реализуют свое физиологическое действие в растении. На примере модельного растения арабидопсис установлено, что магистральным путем восприятия цитокининового сигнала клеткой является путь с участием мембранных гистидинкиназ как рецепторов и двухкомпонентной системы для трансдукции сигналов на ограниченный спектр генов первичного ответа. Реакция этих генов на цитокинин определяется их промоторами и происходит на уровне инициации транскрипции. Этот процесс реализуется быстро, в течение минут, а интенсивность всплеска генного ответа ограничена механизмами обратной связи. При этом рецепторы могут реагировать не только на внеклеточные цитокинины в апопласте, но и, по всей видимости, на внутриклеточные гормоны в симпласте или эндопласте, так как значительная доля рецепторов обнаруживается внутри клеток. Многие гены первичного ответа на цитокинин кодируют регуляторные белки, которые вызывают вторичные глобальные изменения экспрессии генома по каскадному принципу. В этом случае возможны разные уровни регуляции. Например, известны случаи регуляции экспрессии генов цитокининами не только на уровне их транскрипции, но и на уровне стабильности мРНК [97]. Возможно также прямое влияние цитокининов на синтез белка на рибосомах [14, 98, 99] и даже посттрансляционную стабильность белка [100, 101]. У арабидопсиса цитокинины положительно влияют на экспрессию генов (*AtSAHH1*, *AtADK1*), контролирующих уровень глобального метилирования генома [102], которое, в свою очередь, во многом управляет экспрессией генов [103]. Не исключены и другие уровни действия цитокининов; однако пока они мало изучены.

Результатом передачи цитокининового сигнала являются такие изменения экспрессии генов, которые ведут к тем или иным типичным физиологическим эффектам. Пока лишь для немногих быстрых эффектов, регулируемых цитокининами, выяснены лежащие в их основе молекулярные процессы. Например, для стимуляции синте-

за пигментов под действием цитокининов достаточно активации лишь небольшого числа генов. У арабидопсиса, в частности, усиливается координированная экспрессия четырех генов биосинтеза антоцианов, причем экспрессия двух генов регулируется транскрипционно, а двух других – посттранскрипционно [104].

При индукции клеточных делений требуется уже гораздо большее число молекулярных участников. У арабидопсиса в переключении G1- и G2-фаз клеточного цикла участвуют не менее 50 разных белков, среди которых идентифицировано 30 циклинов, 11 циклин-зависимых протеинкиназ и еще ряд ингибиторов этих киназ [105, 106]. В зависимости от типа клеток, цитокинины действуют по-разному: в культуре клеток, как правило, они стимулируют клеточные деления, тогда как при инициации боковых корней наоборот, блокируют деление клеток перидикла [107]. Имеются данные о том, что цитокинины могут стимулировать биосинтез отдельных циклинов и влиять на уровень фосфорилирования белков клеточного цикла; однако эти процессы еще недостаточно изучены. В сверхвысоких дозах цитокинины вызывают апоптоз клеток не только растений [27, 28], но и животных [33, 34]. Будущие исследования транскриптомов и протеомов отдельных органов, тканей и клеток помогут проследить цепочки изменений активности ключевых генов и белков, приводящих в конечном итоге к реализации физиологических программ данного фитогормона.

### *Участие цитокининов в дальнедистанционной коммуникации*

Исполнение цитокининами гормональной роли подразумевает их биосинтез в одной части растения, а далее транспорт и сигнальное воздействие на другую часть. Однако ситуация осложняется наличием множественных мест биосинтеза цитокининов и их присутствием в обоих транспортных каналах растения, т.е. в ксилеме и флоэме [16]. Между тем цитокинины уже давно и не без оснований рассматривают как основные гормоны корня, которые передают информацию побегам (листьям) о степени его благополучия и о наличии важных питательных элементов (соединений азота) [2, 15, 20]. Как же клетки побега (листа) отличают пришедшие издалека цитокинины корня от цитокининов, образуемых в самом побеге и передвигающихся по флоэме?

Здесь следует вспомнить об особенностях общей организации цитокининовой сигнальной системы у растений. В отличие от многих других фитогормонов (ауксин, этилен, АБК), цитокинины представлены большим числом изоформ, с возможностью определенных взаимопревращений. Спектры этих изоформ в ксилеме и флоэме сильно различаются [16, 108]. Ксилемные цитокинины представлены,

**Таблица 4.** Роль индивидуальных АНК-рецепторов в регуляции цитокинин-зависимых процессов у арабидопсиса\*

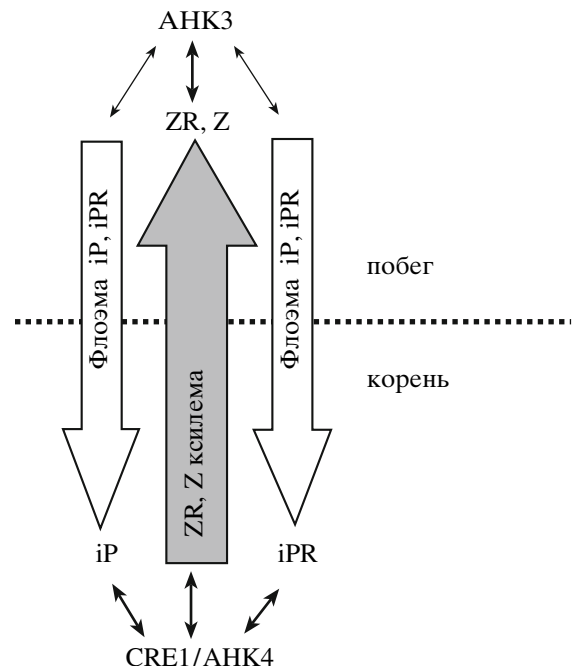
Растительный материал	Регулируемый процесс	Участие рецепторов
Побег	рост листа и побега рост гипокотыля развитие хлоропласта де-этиоляция побега устойчивость побега к ДК-свету старение листа сохранность хлорофилла	АНК3 > АНК2 ≧ АНК4 АНК3 ≧ АНК2, АНК4 АНК3 > АНК2 ≧ АНК4 АНК3 > АНК2, АНК4 АНК3 > АНК2, АНК4 АНК3 ≧ АНК2, АНК4 АНК3 > АНК2 ≧ АНК4
Корень	рост корня (ингибирование) формирование добавочных корней	АНК4 > АНК3, АНК2 АНК4 > АНК3 ≧ АНК2
Клеточная культура	деление клеток формирование пластид	АНК4 > АНК3 ≧ АНК2 АНК4 > АНК3 ≧ АНК2

\* На основе работ с двойными мутантами арабидопсиса по АНК-генам [57–59].

главным образом, цитокининами зеатинового типа (Z-тип), с превалированием *транс*-зеатинрибозида. Зеатиновые цитокинины образуются в основном в кончике корня, где экспрессируются ферменты СУР735А, добавляющие к боковой цепи изопентенильных цитокининов гидроксил в *транс*-положении [7]. Флоэмные же цитокинины гидроксильрованы в меньшей степени и представлены в основном соединениями изопентенильного ряда (iP-тип), главным образом, изопентениладенирибозидом. Содержание *транс*-зеатина во флоэме очень невелико. В ксилеме, и особенно во флоэме, достаточно высоко содержание также *цис*-зеатинрибозида; однако с учетом его низкой биологической активности вклад *цис*-зеатина в общую цитокининую активность арабидопсиса вряд ли существен.

С другой стороны, восприятие разных изоформ цитокининов клеткой зависит от того, какие именно рецепторы в ней представлены. Как обсуждалось выше, основные рецепторы цитокининов арабидопсиса, АНК3 и CRE1/АНК4, имеют сходное и высокое сродство к *транс*-зеатину и его рибозиду, но сильно различаются по сродству к изопентенильным формам цитокининов [69]. Рецептор CRE1/АНК4, экспрессирующийся большей частью в корне и определяющий эффекты цитокининов в подземных органах (табл. 4), имеет высокое сродство к изопентениладенину, близкое к сродству к *транс*-зеатину (табл. 2). Следовательно, этот рецептор чувствителен как к зеатиновым цитокининам корня, так и к изопентенильным цитокининам, которые могут доходить до корня из побега по флоэме. Рецептор АНК3, экспрессирующийся большей частью в побеге (мезофилле листа) и определяющий эффекты цитокининов в надземных органах (табл. 4), имеет низкое сродство к изопентенильным цитокининам флоэмы (табл. 2) и, следовательно, “настроен” на зеатиновые цитокинины, поступающие в побег из корня в результате дальнего транспорта по ксилеме (см.

схему на рис. 14). Значит, в этом случае осуществляется дальнедистанционное действие цитокининов. Таким образом, функциональная гетерогенность рецепторов цитокининов может иметь прямое отношение к их роли в межорганный коммуникации и координировать жизнедеятельность растения как функционально целостного организма.



**Рис. 14.** Предполагаемая схема дальнедистанционного действия цитокининов в растении (на примере арабидопсиса). Z, ZR – цитокинины (*транс*-)зеатинового типа, транспортируемые из корня в побег по ксилеме; iP, iPR – цитокинины изопентенильного типа, синтезируемые в побеге и транспортируемые по флоэме. Доминирующий рецептор в побеге (листе) – АНК3, в корне – CRE1/АНК4. Жирные двусторонние стрелки обозначают сильное гормон-рецепторное взаимодействие, тонкие стрелки – относительно слабое взаимодействие.

### Взаимодействие сигнальных систем

Цитокининовая система регуляции существует в растении не изолированно, а в постоянном контакте с другими регуляторными системами, в первую очередь гормональными. Давно известно о тесном взаимодействии цитокининов и ауксинов, как агонистическом, так и антагонистическом, что зависит от типа процесса, управляемого этими фитогормонами. Цитокинины и ауксины создают свойственный именно растениям противоточный регуляторный контур, во многом определяющий скорость биполярного пролиферативного роста и общую архитектуру побега и корневой системы [2, 20, 21, 108, 109]. Молекулярные основы взаимодействия цитокининовой и ауксиновой сигнальных систем, особенно в ходе регуляции пролиферативной активности клеток, сейчас интенсивно исследуются [105, 111].

Также давно известно об антагонистических взаимоотношениях цитокининов и АБК в таких процессах, как функционирование устьиц, прорастание семян, формирование хлоропластов [112]. В ходе онтогенеза растения цитокинин часто оппонирует и этилену, активирующему генетическую программу старения [113, 114], хотя в определенных условиях может и сам увеличивать продукцию этилена [100]. Гораздо меньше известно о взаимоотношениях цитокининов с другими фитогормонами, в частности, с гиббереллинами, хотя имеются сообщения об их противоположном влиянии на некоторые биохимические и физиологические процессы [81, 115–117]. Полученные нами данные по влиянию цитокининов на транскриптом у арабидопсиса [41] позволили отчасти прояснить процессы взаимодействия цитокининов с другими фитогормонами на генном уровне. Так, цитокинин повышал уровень транскриптов этиленовых рецепторов ETR2 и ERS2, а также ключевого транскрипционного фактора этилен-зависимых генов EIN3. Это указывает на возможность усиления чувствительности клеток к этилену под влиянием цитокинина. В отношении гиббереллинов цитокинины, наоборот, служили негативными регуляторами. Цитокинины подавляли экспрессию генов биосинтеза активных гиббереллинов: GA20 оксидазы и 3 $\beta$ -гидроксиллазы (GA4). Вдобавок цитокинины усиливали экспрессию генов GAI и RGA, продукты которых подавляют гиббереллиновый сигналинг [41].

Цитокинины нередко имитируют эффекты света [17–19], хотя описаны случаи антагонистического влияния цитокининов и фитохрома B, в частности, при клубнеобразовании у картофеля [118, 119].

Исследование лиганд-связывающих свойств цитокининовых рецепторов [68, 69] показало новые возможности взаимодействия сигнальных систем на уровне рецепции гормонального сигнала. Например, вызываемое ауксином закисление

апопласта может изменить восприимчивость к цитокининам отдельных АНК-рецепторов, расположенных на плазмалемме, и тем самым повлиять на эффективность сигналинга цитокининов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитокинины, классические фитогормоны, представляют собой важнейший класс гормоно-стимуляторов, способствующих активному метаболизму и росту растений. Особенностью цитокининов является множественность их изоформ, и, соответственно, сложность их биосинтеза и дальнейшего метаболизма. О важности цитокининовой системы регуляции свидетельствует практическое отсутствие природных мутантов по элементам этой системы, а также большое число генов (более сотни), участвующих в функционировании системы передачи цитокининового сигнала у растений. Огромным достижением последних лет стала идентификация генов и белков цитокининовой системы регуляции, в том числе генов первичного ответа и рецепторов. Именно работы на генном уровне и получение соответствующих мутантов позволили уверенно определить биологическую функцию изучаемых белков в этой регуляторной системе.

Как уже указывалось выше, цитокининовая система регулирует физиологические процессы в растении совместно с другими гормональными и негормональными регуляторными системами. Принципы ее построения и функционирования, по-видимому, имеют много общего с принципами построения других систем гормональной регуляции у растений.

Во-первых, это полифункциональность цитокининов, т.е. большое число физиологических процессов, на которые эти гормоны оказывают свое влияние, и разнообразие эффектов, которые они способны вызвать (плейотропность действия). В принципе, многообразие действия цитокининов могло бы быть следствием множественности их изоформ, если каждый структурный вариант цитокининов отвечал бы за определенный тип метаболических процессов. Однако пока нет серьезных оснований считать цитокининовые изоформы функционально разнокачественными; наоборот, огромный экспериментальный материал свидетельствует о том, что все цитокинины функционально активны, хотя и в разной степени, в реализации одних и тех же физиологических программ. Поэтому многообразие клеточных ответов на цитокинин должно зависеть от специфики клеточных систем восприятия сигнала и от потенции клетки реагировать на цитокинин изменением экспрессии генов первичного и вторичного ответов. На примере арабидопсиса показано, что растение обладает несколькими рецепторами для одного типа фитогормонов, соотношение которых зависит от типа органа и тка-

ни. Тканевая/клеточная разнокачественность аппарата рецепции фитогормонов и каскадность транскрипционного ответа клетки являются важными факторами полифункциональности действия гормонов *in planta*, что позволяет объяснить известный факт, что растениям достаточно значительно меньшего разнообразия гормонов по сравнению с животными [51, 120].

Во-вторых, для цитокининовой системы характерна высокая надежность, которая проявляется на разных уровнях организации растительного организма и новые элементы которой постоянно выявляются по мере расширения методических возможностей исследователей. Надежность на клеточном уровне связана с ограничениями, как по верхнему, так и по нижнему уровням экспрессии генов первичного ответа, выход за которые может быть летальным для растения. Чрезмерная активация генов первичного ответа блокируется псевдорегуляторами транскрипции ARR типа А, а отсутствие цитокининового сигналинга может, по всей видимости, частично компенсироваться фоновым сигналингом других сенсорных гистидинкиназ, таких как СК11 [54], или рецептора этилена ETR1 [121]. Локальный избыток цитокининов компенсируется также индукцией активности ферментов их инактивации или катаболизма, таких как цитокиноксидаза/дегидрогеназа и других. Нарушения цитокининового гомеостаза вызывают физиологические реакции растения, ведущие к восстановлению нарушенного равновесия. Например, ectopическая экспрессия цитокиноксидазы/дегидрогеназы, снижающая концентрацию эндогенных цитокининов, вызывает разрастание корневой системы [22, 23]. Увеличение объема меристематических зон корня, в свою очередь, может вести к добавочному биосинтезу цитокининов, транспортируемых далее по всему растению. С другой стороны, при недостатке цитокининов сокращается объем верхушечной меристемы, что может снижать биосинтез ауксина и способствовать более быстрому восстановлению ауксин-цитокининового баланса. Другим примером могут служить растения с “выключенными” генами рецепторов цитокининов, у которых по мере удаления рецепторов возрастает эндогенная концентрация цитокининов [62], что должно, очевидно, в какой-то степени компенсировать ослабление аппарата их рецепции. Видимо, поэтому нокаут-мутанты арабидопсиса по двум из трех рецепторов цитокининов имеют лишь небольшие фенотипические изменения по сравнению с растениями дикого типа [60–62].

В-третьих, для цитокининов, как и для других фитогормонов, характерно сочетание дальнедистанционного и локального действия. Арабидопсис является примером типичного растения, у которого синтез основной массы цитокининов происходит в кончике корня. Далее цитокинины транспортируются из корня акропетально по ксилеме по всему

растению. Тем самым осуществляется передача информации о состоянии растущих частей корневой системы в надземную часть растения. При этом создается определенный градиент концентраций цитокининов вдоль вертикальной оси растения, который (совместно с градиентом ауксинов) служит “сигнальным полем” для “разметки” тканей и клеток. Однако ксилемный транспорт сильно зависит от внешних условий (температура, влажность, ветер) и поэтому нестабилен. Видимо, для того, чтобы достичь более стабильной концентрации цитокининов в тех зонах, где они особенно нужны, а именно в зонах делящихся клеток, растения сформировали локальные области биосинтеза цитокининов в побеге. Это, в первую очередь, апикальная меристема, в том числе флоральная флэзма листа, боковые почки, зоны опадения плодов и некоторые другие [16]. Это означает, что цитокинины, являясь истинными гормонами растений, сочетают свойственное гормонам эндокринное (т.е. дальнедистанционное) действие с паракринным (т.е. с локальным в месте их биосинтеза). Наличие локальных мест биосинтеза цитокининов дополнительно повышает надежность функционирования системы цитокининовой регуляции в целом.

Несмотря на кардинальные достижения последнего десятилетия в исследовании молекулярных основ передачи цитокининового сигнала, как внутриклеточного, так и в целом растения, еще остается много вопросов. Тем не менее, выявленные новые закономерности и, самое главное, гены, участвующие в восприятии цитокининового сигнала и ответе на него, открывают широкие перспективы дальнейших углубленных исследований и применения полученных знаний в практическом растениеводстве.

*Автор благодарен Томасу Шмюллингу (Свободный Университет г. Берлина) за полезное обсуждение тематики обзора.*

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 04-04-49120, 07-04-0033, 07-04-91211-ЯФ и 08-04-90429-Укр) и ИИИ-3444.2008.4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller C.O., Skoog F., von Saltza N.M., Strong F.M. Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 1329–1334.
2. Полевой В.В. Фитогормоны. Л.: ЛГУ. 1982. 249 с.
3. Köhler K.-H., Conrad K. Ein Quantitativer Phytokinintest // Biol. Rundschau. 1966. V. 5. P. 36–37.
4. Letham D.S. Zeatin, a Factor Inducing Cell Division Isolated from *Zea mays* // Life Sci. 1963. V. 2. P. 569–573.
5. Letham D.S., Shannon J.S., McDonald I.R. The Structure of Zeatin, a Factor Inducing Cell Division // Proc. Chem. Soc. London. 1964. P. 230–231.
6. Kakimoto T. Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/

- ADP Isopentenyltransferases // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 677–685.
7. *Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T.* Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 26405–26410.
  8. *Takei K., Yamaya T., Sakakibara H.* *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735 A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyse the Biosynthesis of *trans*-Zeatin // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 41866–41872.
  9. *Korszun Z.R., Knight C., Chen C.-M.* A Stereochemical Model for Cytokinin Activity // *FEBS Lett.* 1989. V. 243. P. 53–56.
  10. *Strnad M.* The Aromatic Cytokinins // *Physiol. Plant.* 1997. V. 101. P. 674–688.
  11. *Bruce M.I., Zwar J.A.* Cytokinin Activity of Some Substituted Ureas and Thioureas // *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* 1966. V. 165. P. 245–265.
  12. *Isogai Y.* Cytokinin Activities of N-Phenyl-N'-(4-Pyridyl)ureas // *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins* / Eds Guern J., Peaud-Lenoel C. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. P. 115–128.
  13. *Shudo K.* Chemistry of Phenylurea Cytokinins // *Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function* / Eds Mok D.W.S., Mok M.C. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC, 1994. P. 35–42.
  14. *Романов Г.А.* Цитокинины и тРНК: новый взгляд на старую проблему // *Физиология растений.* 1990. Т. 37. С. 1196–1210.
  15. *Sakakibara H.* Cytokinin Biosynthesis and Metabolism // *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* / Ed. Davies P.J. Dordrecht: Kluwer, 2004. P. 95–114.
  16. *Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.* Regulation of Cytokinin Biosynthesis, Compartmentalization and Translocation // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 75–83.
  17. *Mok M.C.* Cytokinins and Plant Development – an Overview // *Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function* / Eds Mok D.W.S., Mok M.C. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC, 1994. P. 155–166.
  18. *Taiz L., Zeiger E.* *Plant Physiology.* Sunderland (USA): Sinauer Associates, 2002. 571 p.
  19. *Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А.* *Физиология растений.* М.: Высш. шк., 2006. 742 с.
  20. *Романов Г.А.* Модель гормонально-организуемого пролиферативного роста: аналогии с ростом растений // *Онтогенез.* 1992. Т. 23. С. 228–236.
  21. *Romanov G.A.* A Model for Bipolar Plant-Type Growth: Role of Auxin-Cytokinin Countercurrent // *Progress in Plant Growth Regulation* / Eds Karssen C.M. et al. Dordrecht: Kluwer, 1992. P. 459–463.
  22. *Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmuilling T.* Regulation of Plant Growth by Cytokinin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 10487–10492.
  23. *Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H., Schmuilling T.* Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Development Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 2532–2550.
  24. *Murray J.D., Karas B.J., Sato S., Tabata S., Amyot L., Szczyglowski K.* A Cytokinin Perception Mutant Colonized by *Rhizobium* in the Absence of Nodule Organogenesis // *Science.* 2007. V. 315. P. 101–104.
  25. *Tirichine L., Sandal N., Madsen L.H., Radutoiu S., Albrektsen A.S., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Stougaard J.* A Gain-of-Function Mutation in a Cytokinin Receptor Triggers Spontaneous Root Nodule Organogenesis // *Science.* 2007. V. 315. P. 104–107.
  26. *Bopp M., Jacob H.J.* Cytokinin Effect on Branching and Bud Formation in *Funaria* // *Planta.* 1986. V. 169. P. 462–464.
  27. *Mlejnek P., Prochazka S.* Activation of Caspase-Like Proteases and Induction of Apoptosis by Isopentenyladenosine in Tobacco BY-2 Cells // *Planta.* 2002. V. 215. P. 158–166.
  28. *Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F.* Cytokinins: New Apoptotic Inducers in Plants // *Planta.* 2003. V. 216. P. 413–421.
  29. *Cytokinin Bioassays* // *Bioassays and Other Special Techniques for Plant Hormones and Plant Growth Regulators.* Ch. 4 / Eds Yopp J.H., Aung L.H., Steffens G.L. Florida (USA): Plant Growth Regul. Soc. of America, 1986. P. 63–84.
  30. *Сельскохозяйственная биотехнология* / Под ред. Шевелухи В.С. М.: Высш. шк., 2003. 470 с.
  31. *Grossmann K.* Induction of Leaf Abscission in Cotton Is a Common Effect of Urea- and Adenine-Type Cytokinins // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 234–237.
  32. *Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L.* Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 244. P. 771–786.
  33. *Ishii Y., Hori Y., Sakai S., Honma Y.* Control of Differentiation and Apoptosis of Human Myeloid Leukemia Cells by Cytokinins and Cytokinin Nucleosides, Plant Redifferentiation-Inducing Hormones // *Cell Growth Diff.* 2002. V. 13. P. 19–26.
  34. *Spinola M., Colombo F., Falvella S., Dragani T.A.* N6-Isopentenyladenosine: A Potent Therapeutic Agent for a Variety of Epithelial Cancers // *Int. J. Cancer.* 2007. V. 120. P. 2744–2748.
  35. *Brandstatter I., Kieber J.J.* Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1009–1020.
  36. *Taniguchi M., Kiba T., Sakakibara H., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T.* Expression of *Arabidopsis* Response Regulator Homologs Is Induced by Cytokinins and Nitrate // *FEBS Lett.* 1998. V. 429. P. 259–262.
  37. *D'Agostino I., Deruère J., Kieber J.J.* Characterization of the Response of the *Arabidopsis* ARR Gene Family to Cytokinin // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1706–1717.
  38. *Romanov G.A., Kieber J.J., Schmuilling T.* A Rapid Cytokinin Response Assay in *Arabidopsis* Indicates a Role for Phospholipase D in Cytokinin Signalling // *FEBS Lett.* 2002. V. 515. P. 39–43.
  39. *Зверева С.Д., Романов Г.А.* Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика

- ка и методы тестирования // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 479–488.
40. Romanov G.A., Lomin S.N., Rakova N.Yu., Heyl A., Schmölling T. Does NO Play a Role in Cytokinin Signal Transduction? // FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 874–880.
  41. Brenner W., Romanov G.A., Köllmer I., Burkle L., Schmölling T. Immediate-Early and Delayed Cytokinin Response Genes of *Arabidopsis thaliana* Identified by a Genome-Wide Expression Profiling Reveal Novel Cytokinin-Sensitive Processes and Suggest Cytokinin Action through Transcriptional Cascades // Plant J. 2005. V. 44. P. 314–333.
  42. Redman J.C., Haas B.J., Tanimoto G., Town C.D. Development and Evaluation of an Arabidopsis Whole Genome Affymetrix Probe Array // Plant J. 2004. V. 38. P. 545–561.
  43. Романов Г.А., Шеффер З., Хевельт А., Крольчик С., Шмюллин Т. Действие цитокининов на популяцию мРНК в клетках табака // Тез. IV Съезда Общества физиологов растений России. Москва, 1999. С. 675.
  44. Schäfer S., Krolzik S., Romanov G.A., Schmölling T. Cytokinin-Regulated Transcripts in Tobacco Cell Culture // Plant Growth Regul. 2000. V. 32. P. 307–313.
  45. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Т. 1. М.: Наука, 2004. 526 с.
  46. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Туходеев О.Н., Тухонович И.А., Ходжайова Л.Т., Шишкова С.О. Генетика развития растений. С.-Петербург: Наука, 2000. 539 с.
  47. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. The F-Box Protein 1 Is an Auxin Receptor // Nature. 2005. V. 435. P. 441–445.
  48. Kepinsky S., Leyser O. The Arabidopsis F-Box Protein 1 Is an Auxin Receptor // Nature. 2005. V. 435. P. 446–451.
  49. Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Ohow T.Y., Hsing Y.I.C., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 Encodes a Soluble Receptor for Gibberellin // Nature. 2005. V. 437. P. 693–698.
  50. Smalle J., Kurepa J., Yang J., Babiychuk E., Kushnir S., Durski A., Vjestra R.D. Cytokinin Growth Responses in Arabidopsis Involve the 26S Proteasome Subunit RPN12 // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 17–32.
  51. Романов Г.А. Рецепторы фитогормонов // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 615–625.
  52. Rashotte A.M., Carson S.D.B., To J.P.C., Kieber J.J. Expression Profiling of Cytokinin Action in Arabidopsis // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1998–2011.
  53. Rashotte A.M., Mason M.G., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E., Kieber J.J. A Subset of Arabidopsis AP2 Transcription Factors Mediates Cytokinin Responses in Concert with a Two-Component Pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 11081–11085.
  54. Kakimoto T. CK11, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction // Science. 1996. V. 274. P. 982–985.
  55. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. Identification of CRE1 as a Cytokinin Receptor from *Arabidopsis* // Nature. 2001. V. 409. P. 1060–1063.
  56. Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. The Arabidopsis Sensor His-Kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 107–113.
  57. Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to *cis*-Zeatin // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1654–1661.
  58. Pareek A., Singh A., Kumar M., Kushwaha H.R., Lynn A.M., Singla-Pareek S.L. Whole-Genome Analysis of *Oryza sativa* Reveals Similar Architecture of Two-Component Signaling Machinery with Arabidopsis // Plant Physiol. 2006. V. 142. P. 380–397.
  59. Du L., Jiao F., Chu J., Chen M., Wu P. The Two-Component Signal System in Rice (*Oryza sativa* L.): A Genome-Wide Study of Cytokinin Signal Perception and Transduction // Genomics. 2007. V. 89. P. 697–707.
  60. Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. In *Planta* Functions of the Arabidopsis Cytokinin Receptor Family // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 8821–8826.
  61. Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1365–1377.
  62. Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development and Cytokinin Metabolism // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 40–54.
  63. Anantharaman V., Aravind L. The CHASE Domain: A Predicted Ligand-Binding Module in Plant Cytokinin Receptors and Other Eukaryotic and Bacterial Receptors // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 579–582.
  64. Mougel C., Zhulin I.B. CHASE: An Extracellular Sensing Domain Common to Transmembrane Receptors from Prokaryotes, Lower Eukaryotes and Plants // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 582–584.
  65. Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase Is a Cytokinin-Binding Receptor That Transduces Cytokinin Signals across the Membrane // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 1017–1023.
  66. Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in Their Ligand Specificity in a Bacterial Assay // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1299–1305.
  67. Ломин С.Н., Романов Г.А. Анализ гормон-рецепторного взаимодействия. Теоретические и практические аспекты // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 283–299.
  68. Romanov G.A., Spíchal L., Lomin S., Strnad M., Schmölling T. A Live Cell Hormone-Binding Assay on

- Transgenic Bacteria Expressing a Eukaryotic Receptor Protein // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 129–134.
69. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. Biochemical Characteristics and Ligand-Binding Properties of *Arabidopsis* Cytokinin Receptor АНК3 Compared to CRE1/АНК4 as Revealed by a Direct Binding Assay // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 4051–4058.
  70. Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. АНПТ3 Is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1053–1062.
  71. Ломин С.Н. Лиганд-связывающие свойства и субклеточная локализация цитокининовых рецепторов: Дисс. ... канд. биол. наук. М.: ИФР РАН, 2008. 190 с.
  72. Heyl A., Wulfetange K., Pils B., Nielsen N., Romanov G.A., Schmölling T. Evolutionary Proteomics Identifies Amino Acids Essential for Ligand-Binding of the Cytokinin Receptor CHASE Domain // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 62.
  73. Mizuno T. His–Asp Phosphotransfer Signal Transduction // *J. Biochem.* 1998. V. 123. P. 555–563.
  74. Heyl A., Schmölling T. Cytokinin Signal Perception and Transduction // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. V. 6. P. 480–488.
  75. Ferreira F.J., Kieber J.J. Cytokinin Signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 518–525.
  76. Müller B., Sheen J. *Arabidopsis* Cytokinin Signaling Pathway // *Science STKE* 2007, cm7.
  77. Lomin S.N., Sakakibara H., Romanov G.A. Two Maize Cytokinin Receptors, ZmHK1 and ZmHK2, Have Different Ligand-Binding Properties // *Abst. II Int. Symp. "Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture"*. Kiev: Polytechnika, 2007. P. 52.
  78. Sakai H., Aoyama T., Oka A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 Response Regulators Operate as Transcriptional Activators // *Plant J.* 2000. V. 24. P. 703–711.
  79. Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. Molecular Structure of the GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the *Arabidopsis* Response Regulators // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2015–2029.
  80. Taniguchi M., Sasaki N., Tsuge T., Aoyama T., Oka A. ARR1 Directly Activates Cytokinin Response Genes That Encode Proteins with Diverse Regulatory Functions // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 263–277.
  81. Romanov G.A., Getman I.A., Schmölling T. Investigation of Early Cytokinin Effects in a Rapid *Amaranthus* Seedling Test // *Plant Growth Regul.* 2000. V. 32. P. 337–344.
  82. Yu C.H., Liu S.Y., Panagia V. The Transphosphatidylase Activity of Phospholipase D // *Mol. Cell. Biochem.* 1996. V. 157. P. 101–105.
  83. Ella K.M., Meier K.E., Kumar A., Zhang Y., Meier G.P. Utilization of Alcohols by Plant and Mammalian Phospholipase D // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 41. P. 715–724.
  84. Wang X. Plant Phospholipases // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 211–231.
  85. Munnik T. Phosphatidic Acids: An Emerging Plant Lipid Second Messenger // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 227–233.
  86. Медведев С.С., Танкелюн О.В., Батов А.Ю., Воронина О.В., Мартинец Я., Махачкова И. Ионорные функции фосфатидной кислоты в растительной клетке // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. С. 45–53.
  87. Romanov G.A., Getman I.A., Bolyakina Yu.P., Rakova N.Yu., Kieber J.J., Schmölling T. Primary Alcohols, Substrates for Phospholipase D-Catalyzed Transphosphatidylation, Suppress the Cytokinin Action // *Phytohormones in Plant Biotechnology and Agriculture* / Eds Macháčková I., Romanov G.A. Dordrecht: Kluwer, 2003. P. 129–139.
  88. Ryu S.B., Karlsson B.H., Özgen M., Palta J.P. Inhibition of Phospholipase D by Lysophosphatidylethanolamine, a Lipid-Derived Senescence Retardant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 12717–12721.
  89. Lomin S.N., Bolyakina Yu.P., Getman I.A., Rakova N.Yu., Martinec J., Romanov G.A. Analysis of the Participation of Non-Canonic Intermediates in Cytokinin Signaling // *Abst. II Int. Symp. "Signalling Systems of Plant Cells: Role in Adaptation and Immunity"*. Kazan, 2007. P. 193–194.
  90. Kolesnikov Ya.S., Kretinin S.V., Kravets V.S., Romanov G.A., Martinec J., Macháčková I. Participation of PIP<sub>2</sub>-Phospholipase D in Cytokinin Signaling // *Abst. II Int. Symp. "Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture"*. Kiev: Polytechnika, 2007. P. 49.
  91. Кравец В.С., Колесников Я.С., Кузнецов Вл.В., Романов Г.А. Регуляторы роста растений: внутриклеточная гормональная регуляция и применение в аграрном производстве // *Физиология растений.* 2008. Т. 55. С. 629–640.
  92. Testerink C., Dekker H.L., Lim Z.-Y., Johns M.K., Holmes A.B., de Koster C.G., Ktistakis N.T., Munnik T. Isolation and Identification of Phosphatidic Acid Targets from Plants // *Plant J.* 2004. V. 39. P. 527–536.
  93. Testerink C., Munnik T. Phosphatidic Acid: A Multifunctional Stress Signaling Lipid in Plants // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 368–375.
  94. Andrsen B.T., Rizzo M.A., Shome K., Romero G. The Role of Phosphatidic Acid in the Regulation of the RAS/MEK/Erk Signaling Cascade // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 65–68.
  95. Романов Г.А., Ракова Н.Ю., Ванюшин Б.Ф. Полиамины подавляют экспрессию цитокининзависимого трансгена у арабидопсиса // *Докл. АН.* 2004. Т. 398. С. 415–418.
  96. Ракова Н.Ю., Романов Г.А. Полиамины препятствуют проявлению первичных эффектов цитокининов // *Физиология растений.* 2005. Т. 52. С. 59–67.
  97. Schmölling T., Schäfer S., Romanov G. Cytokinins as Regulators of Gene Expression // *Physiol. Plant.* 1997. V. 100. P. 505–517.
  98. Клячко Н.Л. Посттранскрипционная регуляция синтеза белка фитогормонами. Дисс. ... докт. биол. наук. М.: ИФР РАН, 1986. 335 с.



99. *Sherameti I., Shahollari B., Landsberger M., Westermann M., Cherepneva G., Kusnetsov V., Oelmüller R.* Cytokinin Stimulates Polyribosome Loading of Nuclear-Encoded mRNAs for the Plastid ATP Synthase in Etioplasts of *Lupinus luteus*: The Complex Accumulates in the Inner-Envelope Membrane with the CF<sub>1</sub> Moiety Located towards the Stromal Space // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 578–593.
100. *Chae H.S., Faure F., Kieber J.J.* The *eto1*, *eto2*, and *eto3* Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis* by Increasing the Stability of ACS Protein // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 545–559.
101. Романов Г.А., Медведев С.С. Ауксины и цитокинины в развитии растений. Последние достижения в исследовании фитогормонов // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 309–319.
102. *Li C.-H., Yu N., Jiang S.-M., Shangguan X.-X., Wang L.-J., Chen X.-Y.* Down-Regulation of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Reveals a Role of Cytokinin in Promoting Transmethylation Reactions // *Planta.* 2008. V. 228. P. 125–136.
103. *Vanyushin B.F.* DNA Methylation in Plants // *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 2006. V. 301. P. 67–122.
104. *Deikman J., Hammer P.E.* Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 47–57.
105. *Dewitte W., Murray J.A.H.* The Plant Cell Cycle // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. V. 54. P. 235–264.
106. *Roef L., van Onckelen H.* Cytokinin Regulation of the Cell Division Cycle // *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* / Ed. Davies P.J. Dordrecht: Kluwer, 2003. P. 241–261.
107. *Li X., Mo X., Shou H., Wu P.* Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. P. 1112–1123.
108. *Corbesier L., Prinsen E., Jackmard A., Lejeune P., van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G.* Cytokinin Levels in Leaves, Leaf Exudate and Shoot Apical Meristem of *Arabidopsis thaliana* during Floral Transition // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2511–2517.
109. Романов Г.А., Суховеров В.С. Исследование кинетики роста и динамики гормональных градиентов на модельных многоклеточных структурах растительного типа – компьютерных растениях // Докл. АН. 1997. Т. 352. С. 845–848.
110. *Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C.I.* Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism // *Ann. Bot.* 2006. V. 97. P. 883–893.
111. *Dodueva I.E., Frolova N.V., Lutova L.A.* Plant Tumorigenesis: Different Ways for Shifting Systemic Control of Plant Cell Division and Differentiation // *Transgen. Plant J.* 2007. V. 1. P. 17–38.
112. *Kusnetsov V.V., Herrmann R.G., Kulaeva O.N., Oelmüller R.* Cytokinin Stimulates and Abscisic Acid Inhibits Greening of Etiolated *Lupinus luteus* Cotyledons by Affecting the Expression of the Light-Sensitive Protochlorophyllide Oxidoreductase // *Mol. Gen. Genet.* 1998. V. 259. P. 21–28.
113. *Buchanan-Wollaston V.* The Molecular Biology of Leaf Senescence // *J. Exp. Bot.* 1997. V. 48. P. 181–199.
114. *Gan S., Amasino R.M.* Making Sense of Senescence // *Plant Physiol.* 1997. V. 113. P. 313–319.
115. Чайлахян М.Х., Хрянин В.Н. Пол растений и его гормональная регуляция. М.: Наука, 1982. 173 с.
116. *Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M.* KNOX Action in *Arabidopsis* Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. P. 1560–1565.
117. *Greenboim-Wainberg Y., Maymon I., Borochof R., Alvarez J., Olszewski N., Ori N., Eshed Y., Weiss D.* Cross Talk between Gibberellin and Cytokinin: The *Arabidopsis* GA Response Inhibitor SPINDLY Plays a Positive Role in Cytokinin Signaling // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 92–102.
118. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Гукасян И.А., Голяновская С.А., Романов Г.А. Усиление фотопериодической чувствительности *PHYV*-трансгенных растений снимается кинетином // Докл. АН. 2003. Т. 391. С. 416–418.
119. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Ложникова В.Н., Голяновская С.А., Гукасян И.А., Гатс К., Романов Г.А. Фотопериодическая и гормональная зависимость клубнеобразования у картофеля, трансформированного геном *PHYV Arabidopsis* // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 701–707.
120. Романов Г.А. Гормон-связывающие белки растений и проблема рецепции фитогормонов // Физиология растений. 1989. Т. 36. С. 166–177.
121. *Stepanova A.N., Ecker J.R.* Ethylene Signaling: From Mutants to Molecules // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. V. 3. P. 353–360.