25 лет открытию рецептора цитокининов

Г.А. Романов

В 2001 году в биологии растений произошло знаменательное событие: были открыты рецепторы цитокининов и расшифрован в общих чертах молекулярный механизм их сигналинга. Это открытие сделали ученые двух японских лабораторий, под руководством T. Kakimoto (*Inoue et al. 2001*) и T. Mizuno (*Suzuki et al. 2001*). Этот первый обнаруженный белок-рецептор получил название CRE1 (Cytokinin Response 1) (*Inoue et al. 2001*) или AHK4 (Arabidopsis Histidine Kinase 4) (*Suzuki et al. 2001*). Цитокинин стал третьим фитогормоном после этилена и брассиностероидов, который обрел своего рецептора. Стоит отметить общие черты трех первых рецепторов фитогормонов (*Романов 2002*). Во-первых, все обнаруженные тогда рецепторы представляли собой крупные мультидоменные трансмембранные белки. Во-вторых, рецепторы обладали энзиматической активностью (каталитические рецепторы), которая индуцировалась или блокировалась в присутствии гормона. В-третьих, эта энзиматическая активность была связана с направленным переносом фосфорильной группы на специфические регуляторные белки, что показывало важность транзиентного фосфорилирования белков для сигналинга фитогормонов. При этом рецептор цитокининов оказался типичной сенсорной гистидинкиназой и использовал известный вариант двухкомпонентной системы, широко распространенной среди бактерий, для трансдукции сигнала на гены первичного ответа (рис. 1).

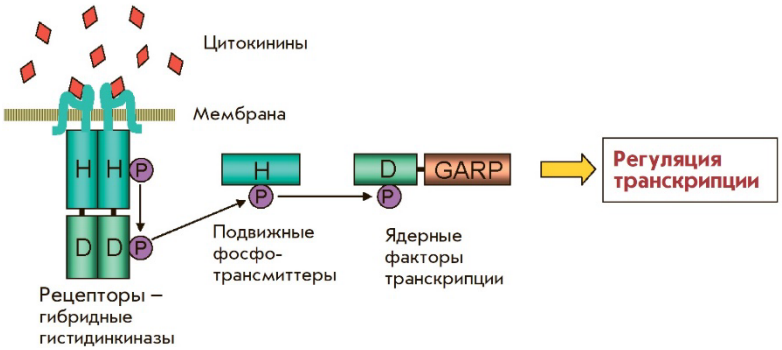

Рис. 1. Схема сигналинга рецепторов цитокининов

Эти первые работы были выполнены с использованием генов/белков модельного растения арабидопсиса, геном которого незадолго до этого был полностью расшифрован. Было установлено, что геном этого растения кодирует три сенсорные гистидинкиназы, активность которых стимулируется цитокининами. Но оставалось много вопросов, связанных с видовой и органной спецификой аппарата рецепции цитокининов, особенностями структуры рецепторов, их лигандной специфичностью и субклеточной локализацией, и другими аспектами сигналинга. Эти и другие вопросы стали темой многочисленных публикаций, число которых быстро нарастало от года к году (рис. 2). Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, где цитокининам, наряду с другими фитогормонами, также уделялось большое внимание, активно включился в эти исследования.

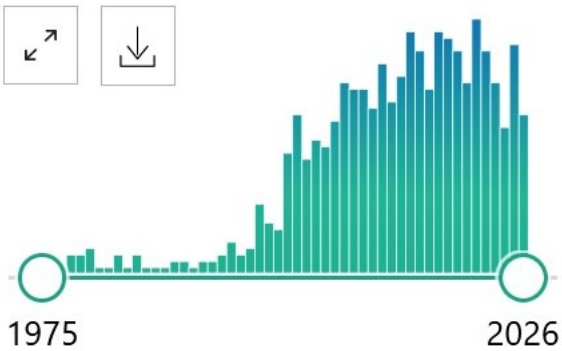

Рис. 2. Динамика публикации статей по рецепторам цитокининов

Однако изучение свойств рецепторов осложнялось отсутствием удобного количественного метода, подходящего для крупных трансмембранных белков-рецепторов. Такой радиолигандный метод с использованием живых трансгенных бактерий был нами разработан в 2005 г. (*Romanov et al. 2005*) и апробирован на рецепторах цитокининов арабидопсиса (*Romanov et al. 2006*). В результате впервые были определены ряды сродства лигандов к рецепторам цитокининов и установлены различия в лигандной специфичности разных рецепторов.

В ходе дальнейших исследований наша методология усовершенствовалась и расширялась, в частности, вместо гетерологичной бактериальной системы радиолигандного анализа была разработана и успешно применена более адекватная система на основе растительных мембран (*Lomin et al. 2015; Lomin & Romanov 2020; Savelieva et al. 2022*). В целом был использован самый широкий спектр современных методов биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии, биоинформатики, физиологии растений, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, что позволило превратить ИФР РАН в мировой центр по изучению рецепции и сигналинга цитокининов в растениях. Достаточно сказать, что сотрудники нашей лаборатории изучили в общей сложности 19 белков-рецепторов из 7 видов растений: арабидопсиса, кукурузы, риса, картофеля, ели, мха, плауна, причем из 4-х последних видов цитокининовые рецепторы были выделены и охарактеризованы впервые. Это при том, что изучение рецепторов цитокининов в других лабораториях по всему миру (США, Япония, Китай, Ю. Корея, Франция, Чехия и др.) включало лишь один, максимум два вида растений.

Коротко перечислим основные результаты работ с рецепторами цитокининов, выполненных в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. академика М.Х. Чайлахяна ИФР РАН:

- При изучении лиганд-рецепторных взаимодействий установлено, что только цитокинины-основания, но не их производные (рибозиды, глюкозиды и др.) обладают высокой гормональной активностью (*Romanov et al. 2006*; *Lomin et al. 2015; Romanov & Schmülling 2021*). Тем самым уточнена природа биологически активных цитокининов: доказано, что только цитокинины-основания, среди которых главными являются *транс*-зеатин и изопентениладенин, обладают истинной гормональной активностью.

- Установлена основная субклеточная локализация рецепторов цитокининов – на мембранах эндоплазматического ретикулума. Выдвинута и подтверждена экспериментально концепция о том, что сигналинг цитокининов в клетке инициируется главным образом в эндоплазматическом ретикулуме с участием внутриклеточных цитокининов (рис. 3) (*Romanov et al. 2006, 2018*; *Lomin et al. 2011, 2018, 2020; Ломин и др. 2012*).

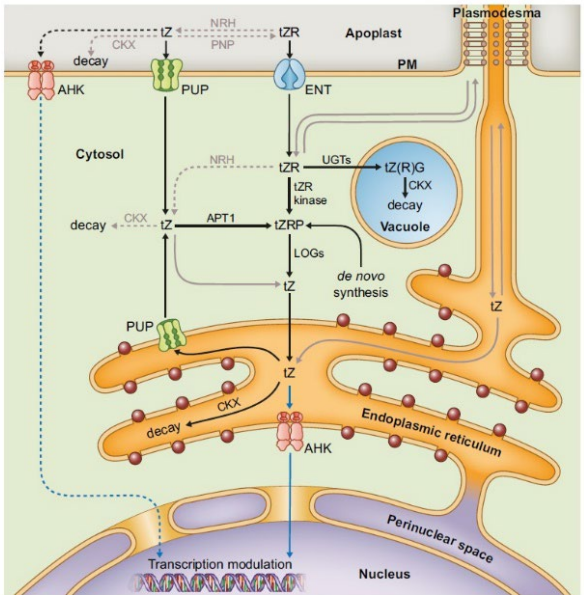

Рис. 3. Рецепторы цитокининов расположены на эндоплазматическом ретикулуме

- Охарактеризованы лиганд-связывающие свойства рецепторов цитокининов разных видов растений. Установлены различия семейств рецепторов по профилю лигандной специфичности, предложена модель межорганной коммуникации у растений на основе «корневых» и «листовых» рецепторов с участием разных форм (*транс*-зеатиновых и изопентенильных) цитокининов (рис. 4) (*Romanov et al. 2006; Романов 2009; Lomin et al. 2011; Ломин и др. 2012, 2015*).

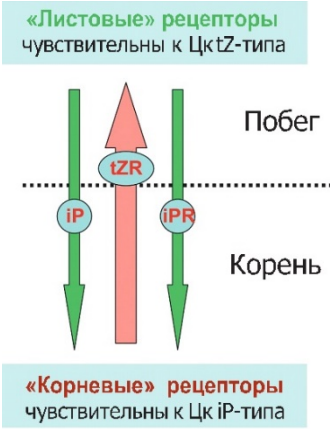

Рис. 4. Коммуникация побега и корня с участием рецепторов цитокининов

- Найдены новые закономерности строения сенсорного модуля и других частей рецепторов цитокининов, обнаружены особые консервативные области и консенсусные мотивы белка. Построена первая функциональная 3D модель полноразмерного рецептора цитокининов (рис. 5) (*Steklov et al. 2013; Arkhipov et al. 2019, 2023*).

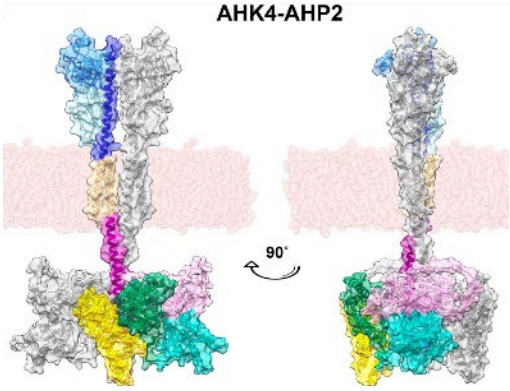

Рис. 5. 3D-модель рецептора AHK4 в комплексе с фосфотрансмиттером AHP2

- Впервые подробно описана цитокининовая регуляторная система у такого практически ценного вида растений, как картофель. У коммерческого тетраплоида картофеля сорта Дезире впервые выделены и детально охарактеризованы рецепторы цитокининов, относящиеся к трем семействам и экспрессируемые с различной интенсивностью в зависимости от органа картофеля и условий выращивания (рис. 6) (*Lomin et al. 2018; 2021*).

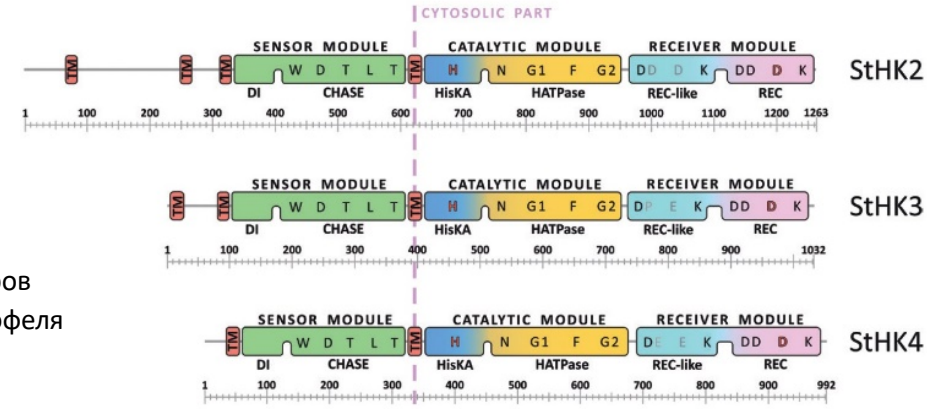

Рис. 6. Модульное строение рецепторов цитокининов картофеля

- Исследования взаимодействия рецепторов с синтетическими аналогами цитокининов позволили обнаружить лиганды с рецептор-специфичной цитокининовой или антицитокининовой активностью. Такие лиганды имеют перспективы практического применения (*Savelieva et al. 2018, 2022; Kolachevskaya et al. 2025*).

- Изучение pH-зависимости связывания цитокинина рецептором открыло новые перспективы для научного поиска. Так, выдвинуты гипотезы: (i) взаимосвязи субклеточной локализации рецепторов и профиля pH-зависимости их активности; (ii) влияния pH на устойчивость димеров (активных форм) рецепторов; (iii) способности отдельных рецепторов играть роль pH-сенсоров в цитоплазме; (iiii) влияния ауксина на сигналинг цитокининовых рецепторов на плазмамембране за счет изменений кислотности апопласта (*Romanov et al. 2006, 2018; Lomin et al. 2015; Arkhipov et al. 2019*).

О значимости перечисленных выше результатов свидетельствует их активное цитирование, в том числе в фундаментальных исторических обзорах, посвященных цитокининам (*Kaminek 2015; Jameson 2023; Argueso & Kieber 2024*). В последние годы большое внимание уделено практическому использованию накопленных знаний о рецепторах цитокининов (*Savelieva et al. 2026*). В частности, получены новые формы картофеля с измененной экспрессией рецепторов цитокининов, устойчивые к высоким температурам и засухе.

Цитируемые статьи

Argueso CT, Kieber JJ. Cytokinin: From autoclaved DNA to two-component signaling. Plant Cell 2024, 36(5):1429-1450. doi: 10.1093/plcell/koad327.

Arkhipov DV, Lomin SN, Myakushina YA, Savelieva EM, Osolodkin DI, Romanov GA. Modeling of Protein-Protein Interactions in Cytokinin Signal Transduction. Int J Mol Sci. 2019, 20(9):2096. doi: 10.3390/ijms20092096.

Arkhipov DV, Lomin SN, Romanov GA. A Model of the Full-Length Cytokinin Receptor: New Insights and Prospects. Int J Mol Sci. 2023, 25(1):73. doi: 10.3390/ijms25010073.

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, 409(6823):1060-1063. doi: 10.1038/35059117.

Jameson PE. Zeatin: The 60th anniversary of its identification. Plant Physiol. 2023, 192(1):34-55. doi: 10.1093/plphys/kiad094.

Kaminek M. Tracking the story of cytokinin research. J Plant Growth Regul. 2015, 34:723-739.

Kolachevskaya OO, Savelieva EM, Ivanov YV, Myakushina YA, Deigraf SV, Romanov GA. Receptor-specific synthetic cytokinin *S*-CMBA enhances drought tolerance in commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. Russ J Plant Physiol. 2025, 72:47. doi: 10.1134/S102144372461053X.

Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, Arkhipov DV, Osolodkin DI, Schmülling T, Romanov GA. Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. J Exp Bot. 2015, 66(7):1851-1863. doi: 10.1093/jxb/eru522.

Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, Osolodkin DI, Romanov GA. Receptor properties and features of cytokinin signaling. Acta Naturae. 2012, 4(3):31-45.

Lomin SN, Myakushina YA, Arkhipov DV, Leonova OG, Popenko VI, Schmülling T, Romanov GA. Studies of cytokinin receptor-phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. Funct Plant Biol. 2018, 45(2):192-202. doi: 10.1071/FP16292.

Lomin SN, Myakushina YA, Kolachevskaya OO, Getman IA, Arkhipov DV, Savelieva EM, Osolodkin DI, Romanov GA. Cytokinin perception in potato: new features of canonical players. J Exp Bot. 2018, 69(16):3839-3853. doi: 10.1093/jxb/ery199.

Lomin SN, Myakushina YA, Kolachevskaya OO, Getman IA, Savelieva EM, Arkhipov DV, Deigraf SV, Romanov GA. Global View on the Cytokinin Regulatory System in Potato. Front Plant Sci. 2020, 11:613624. doi: 10.3389/fpls.2020.613624.

Lomin SN, Romanov GA. A new tool for quantification of membrane protein partitioning between different cell membranes. Anal Biochem. 2020, 599:113734. doi: 10.1016/j.ab.2020.113734.

Lomin SN, Savelieva EM, Arkhipov DV, Pashkovskiy PP, Myakushina YA, Heyl A, Romanov GA. Cytokinin Perception in Ancient Plants beyond Angiospermae. Int J Mol Sci. 2021, 22(23):13077. doi: 10.3390/ijms222313077.

Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. J Exp Bot. 2011, 62(14):5149-5159. doi: 10.1093/jxb/err220.

Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. J Exp Bot. 2006, 57(15):4051-4058. doi: 10.1093/jxb/erl179.

Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T. Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! New Phytol. 2018, 218(1):41-53. doi: 10.1111/nph.14991.

Romanov GA, Lomin SN. Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors. Methods Mol Biol. 2009, 495:111-120. doi: 10.1007/978-1-59745-477-3_10.

Romanov GA, Schmülling T. On the biological activity of cytokinin free bases and their ribosides. Planta 2021, 255(1):27. doi: 10.1007/s00425-021-03810-1.

Romanov GA, Schmülling T. Opening Doors for Cytokinin Trafficking at the ER Membrane. Trends Plant Sci. 2021, 26(4):305-308. doi: 10.1016/j.tplants.2021.02.006.

Romanov GA, Spíchal L, Lomin SN, Strnad M, Schmülling T. A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. Anal Biochem. 2005, 347(1):129-134. doi: 10.1016/j.ab.2005.09.012.

Savelieva EM, Lomin SN, Romanov GA. A modified method for quantification of cytokinin-receptor binding using isolated plant microsomes enriched with cognate transmembrane receptors. Russ J Plant Physiol. 2022, 69:140. doi: 10.1134/S1021443722060231.

Savelieva EM, Myakushina YA, Lomin SN, Kolachevskaya OO, Arkhipov DV, Romanov GA. Biotechnological modification of the cytokinin regulatory system to improve drought and heat tolerance in the major crops. Plant Cell Rep. 2026, 45:37. doi: 10.1007/s00299-026-03711-1.

Savelieva EM, Oslovsky VE, Karlov DS, Kurochkin NN, Getman IA, Lomin SN, Sidorov GV, Mikhailov SN, Osolodkin DI, Romanov GA. Cytokinin activity of N^6-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors in planta, in vitro, and in silico. Phytochemistry. 2018, 149:161-177. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.02.008.

Savelieva EM, Zenchenko AA, Drenichev MS, Kozlova AA, Kurochkin NN, Arkhipov DV, Chizhov AO, Oslovsky VE, Romanov GA. In planta, in vitro and in silico studies of chiral N^6-benzyladenine derivatives: Discovery of receptor-specific *S*-enantiomers with cytokinin or anticytokinin activities. Int J Mol Sci. 2022, 23(19):11334. doi: 10.3390/ijms231911334.

Steklov MY, Lomin SN, Osolodkin DI, Romanov GA. Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. Plant Cell Rep. 2013, 32(6):781-793. doi: 10.1007/s00299-013-1408-3.

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, 42(2):107-113. doi: 10.1093/pcp/pce037.

Ломин СН, Кривошеев ДМ, Стеклов МЮ, Осолодкин ДИ, Романов ГА. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов. Acta Naturae 2012, 4(3):33-48.

Романов ГА. Рецепторы фитогормонов. Физиология растений 2002, 49:615-625.