

УДК 581.1

# Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов

С. Н. Ломин<sup>1</sup>, Д. М. Кривошеев<sup>1</sup>, М. Ю. Стеклов<sup>1</sup>, Д. И. Осолодкин<sup>2</sup>, Г. А. Романов<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

\*E-mail: gar@ippras.ru

Поступила в редакцию 19.04.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Цитокинины – одни из самых важных и известных гормонов растений. Открытые более полувека назад, цитокинины неизменно привлекают внимание исследователей многообразием своего действия на рост и развитие растений, участием в адаптации к внешним условиям, возможностью применения в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине и даже в косметике. Однако молекулярный механизм действия цитокининов долгое время оставался неизвестным, он начал проясняться только в 21 веке после открытия рецепторов этих фитогормонов. Как оказалось, растения адаптировали для сигналинга цитокининов двухкомпонентную систему передачи сигнала, позаимствованную у прокариотических организмов. В обзоре рассмотрены достижения последних лет в области изучения молекулярных основ восприятия и трансдукции цитокининового сигнала. Основное внимание уделено рецепторам цитокининов, их доменной и пространственной структуре, субклеточной локализации, сигнальной активности и влиянию мутаций, лигандсвязывающим свойствам и филогении.

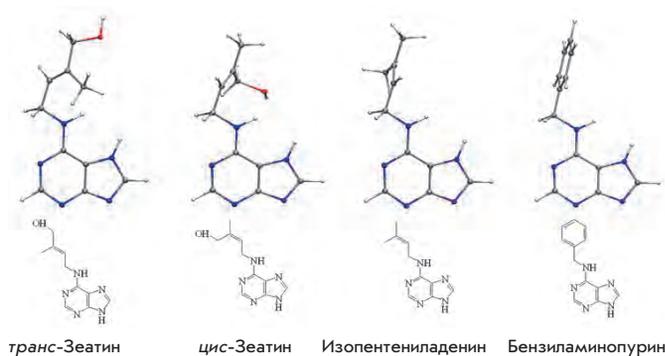
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** цитокинины, рецепторы, сенсорные гистидинкиназы, двухкомпонентные системы, передача сигнала.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** НК – гистидинкиназа; НР – фосфотрансмиттер; RR – регулятор ответа; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

## ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины, наряду с ауксинами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой и этиленом, относятся к классическим гормонам растений. Цитокинины обнаружили в лаборатории Ф. Скуга в 1955 г. [1] и назвали так из-за их способности активировать деление (цитокinesis) растительных клеток *in vitro*. По структуре природные цитокинины представляют собой производные аденина с небольшим заместителем в N<sup>6</sup>-положении (рис. 1). У большинства цитокининов в этом положении находится изопентенильная группа (например, у зеатина, изопентениладенина), хотя заместитель может быть и ароматическим (N<sup>6</sup>-бензиладенин, кинетин). Цитокининовой активностью обладают также отдельные синтетические производные фенилмочевины (тидазулон и др.). Цитокинины влияют на целый ряд физиологических процессов: стимулируют деление и рост клеток, дифференцировку пластид, задерживают старение листьев, активируют приток

метаболитов, а также образование побегов из каллусов в культуре (см. обзоры [2–5]). Цитокинины активно используются в биотехнологии и агропроизводстве для выращивания культур клеток растений в биореакторах, микроразмножения (клонирования) полезных растений, получения трансгенных растений, регуляции пола растений, дефолиации хлопчатника и др. [4, 5]. Цитокинины участвуют в минеральном питании растений, формировании азотфиксирующих клубеньков на корнях, влияют на устойчивость растений к неблагоприятным факторам, а также на размер зерна злаков, т.е. на урожайность [6–8]. В последние годы цитокинины и родственные им соединения находят все более широкое применение в медицине и косметологии, их используют в качестве противоопухолевых средств и ингибиторов нейродегенеративных процессов, а также как активный ингредиент в мазях для предотвращения возрастных изменений кожного покрова [4, 9, 10].



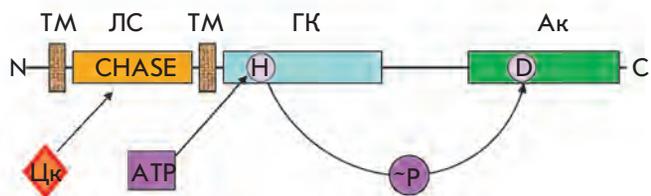
**Рис. 1.** Структуры типичных цитокининов. Вверху показаны наиболее вероятные пространственные конфигурации цитокининов, внизу – их химическое строение в традиционном представлении.

За последние 15 лет достигнут заметный прогресс в выяснении молекулярного механизма действия цитокининов, причем важную роль сыграло секвенирование генома модельного растения *Arabidopsis thaliana* [11]. Особое значение имело обнаружение ключевых компонентов восприятия и передачи гормонального сигнала в клетке – рецепторов. В 2001 г. были опубликованы четыре статьи, посвященные идентификации и характеристике рецепторов цитокининов арабидопсиса [12–15]. Был охарактеризован рецептор, получивший название CRE1 (Cytokinin Response 1), или АНК4 (*Arabidopsis* Histidine Kinase 4). Еще раньше обнаружили мутацию, которая проявлялась укорочением корня арабидопсиса при отсутствии там флоэмы (*wooden leg*, или сокращенно *wol*). Эта мутация затрагивала тот же самый ген, названный *WOL* [16]. Наряду с геном *CRE1/АНК4/WOL* в геноме арабидопсиса выявили два его паралога, названные *АНК2* и *АНК3* [13, 14, 16, 17]. Таким образом, у арабидопсиса обнаружены три рецептора цитокининов, которые представляют собой сходные по структуре трансмембранные белки с массой более 100 кДа.

В настоящем обзоре рассмотрены основные вопросы, связанные с узнаванием и сигналингом цитокининов: доменная структура рецепторов; биохимические основы восприятия и передачи сигнала; субклеточная локализация, лигандсвязывающие свойства и влияние мутаций на свойства рецепторов; пространственная структура рецепторов; появление и эволюция рецепторов у растений.

### ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

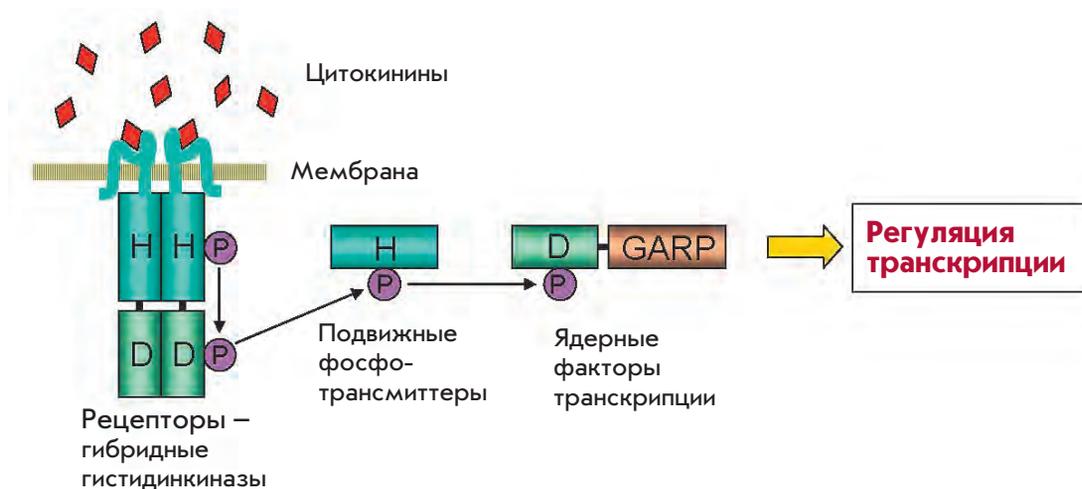
Рецепторы цитокининов относятся к типу каталитических рецепторов, они имеют сложную мульти-



**Рис. 2.** Доменная структура рецептора цитокининов (на примере CRE1 / АНК4 арабидопсиса). Домены белка: ТМ – трансмембранный; ЛС – лигандсвязывающий (CHASE); ГК – гистидинкиназный; Ак – акцепторный; Цк – цитокинины; (H) – консервативный остаток гистидина; (D) – консервативный аспартат. N и C – N- и C-концы белка. Стрелки справа указывают на сайты фосфорилирования и переноса высокоэнергетического фосфата ( $-P$ ).

доменную структуру (рис. 2). Гормонсвязывающей активностью обладает так называемый CHASE-домен (Cyclase/Histidine kinase Associated Sensory Extracellular) [18, 19], расположенный на N-конце молекулы рецептора. С двух сторон этого сенсорного домена находятся два или более трансмембранных домена. За последним трансмембранным доменом следует каталитический домен с гистидинкиназной активностью. Коровая часть этой области состоит из димеризационного домена и АТФ/АДП-связывающего фосфотрансферного домена. Димеризационный домен (А-домен) состоит из двух примыкающих друг к другу так называемых *two-stranded coiled-coils*. А-домены двух рецепторов могут взаимодействовать, образуя четырехспиральный узел. Согласно современным представлениям, каждая из гистидинкиназ в димере фосфорилирует другую (реакция *in trans*) [20]. В фосфотрансферном домене имеется консервативный сайт (H-box) общей структуры  $-ATVSH $\underline{E}$ IRTP-$ , в центре которого располагается фосфорилируемый остаток гистидина.

В связывании АТФ участвуют четыре консервативных мотива: N-, G1-, F- и G2-боксы. Возможно, они участвуют также в катализе и переносе остатка фосфата. На C-конце рецептора находится ресиверный (принимающий) домен с остатком консервативного акцепторного аспартата в последовательности, обозначаемой как DD-D-K. У цитокининовых рецепторов между областью гистидинкиназы и ресиверным доменом находится псевдоресиверный домен, сходный по структуре с ресиверным, но не способный к приему фосфата от консервативного остатка гистидина [21, 22]. Функция псевдоресиверного домена пока не ясна.



**Рис. 3.** Схема передачи цитокининового сигнала по принципу многоступенчатого (His-Asp-His-Asp) фосфопереноса. Фосфорилирование ядерных факторов транскрипции (регуляторов ответа типа В) приводит к их активации и воздействию на транскрипцию генов первичного ответа.

Таким образом, по своей общей структуре рецепторы цитокининов принадлежат к группе мембранных сенсорных гистидинкиназ и обладают гомологией с некоторыми другими сенсорными белками растений: рецепторами этилена и фитохромами [22, 23].

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРЕДАЧИ ЦИТОКИНИНОВОГО СИГНАЛА

Рецепторы цитокининов структурно и функционально родственны сенсорным гистидинкиназам двухкомпонентных систем передачи сигналов, широко распространенным у прокариот и найденным также у ряда эукариот, кроме животных [20, 24]. Классическая двухкомпонентная система прокариот состоит из двух белков: сенсорной гистидинкиназы и регулятора ответа (обычно фактора транскрипции). Под влиянием внешних воздействий гистидинкиназа активируется, автофосфорилируется и далее передает высокоэнергетический фосфат регулятору ответа. В двухкомпонентных системах фосфат переносится от консервативного остатка гистидина одной белковой молекулы (гистидинкиназы) на консервативный остаток аспартата другой (ресиверного домена регулятора ответа) (phosphorelay). Фосфорилирование регулятора ответа вызывает его активацию, что, в свою очередь, включает транскрипцию определенного гена или набора генов [25].

В случае рецепции цитокининов схема передачи сигнала усложнена, так как ресиверный домен включен в состав сенсорной гистидинкиназы (гибридный тип белка). При этом сигнал передается по эстафетному принципу многоступенчатого (His-Asp-His-Asp) фосфопереноса (multistep phosphorelay) (рис. 3). При связывании гормона с сенсорным CHASE-доменом происходит фосфорилирование консерва-

тивного остатка гистидина в образованном димере гистидинкиназ. Затем этот фосфат переносится внутримолекулярно на остаток консервативного аспартата ресиверного домена гистидинкиназы, а оттуда на консервативный остаток гистидина подвижного низкомолекулярного белка-фосфотрансмиттера (АНР), который постоянно курсирует между цитоплазмой и ядром клетки [26]. Когда фосфорилированный фосфотрансмиттер оказывается в ядре, он передает высокоэнергетический фосфат на остаток консервативного аспартата в ресиверном домене регулятора ответа. Данный белок, являющийся, как правило, фактором транскрипции, при фосфорилировании переходит в активное состояние и становится способным регулировать (обычно активировать) транскрипцию генов первичного ответа [27–29]. Регуляция биосинтеза мРНК гена первичного ответа цитокининами зависит только от (нетранскрибируемого) промотора, т.е. происходит на стадии инициации транскрипции [4].

### ОСОБЕННОСТИ СИГНАЛИНГА ЦИТОКИНИНОВ У АРАБИДОПСИСА

Первые рецепторы цитокининов были обнаружены у арабидопсиса, а их способность воспринимать гормональный сигнал подтвердили в опытах с трансформированными бактериями и дрожжами. Экспрессия цитокининовых рецепторов растений в этих одноклеточных организмах приводила к появлению у них способности активно реагировать на низкие (гормональные) концентрации цитокининов [12–14, 30, 31]. Роль этих белков *in vivo* как рецепторов подтвердили при изучении инсерционных мутантов арабидопсиса. В целом, выключение одного рецептора не приводило к каким-либо заметным изменениям фенотипа рас-

тений. Однако выключение двух и особенно всех трех рецепторов имело серьезные последствия. При инактивации всех рецепторов тройной мутант оказывался нечувствительным к цитокининам и представлял собой стерильное карликовое растение с пониженной жизнеспособностью [32–34].

Рецепторы функционально дополняют друг друга, хотя в ряде процессов они не равнозначны. Рецептор CRE1/АНК4 активно экспрессируется в корнях, тогда как АНК3 превалирует в листьях. В соответствии с этим цитокининовые эффекты в надземной части растения больше зависят от рецептора АНК3, тогда как в подземной – от CRE1/АНК4 [4]. У арабидопсиса среди элементов двухкомпонентной системы идентифицировано пять типичных фосфотрансмиттеров (АНР) и 22 регулятора ответа. Фосфотрансмиттеры представляют собой небольшие белки размером около 17 кДа [35]. Как и рецепторы, белки АНР функционируют аддитивно в передаче цитокининового сигнала, а мутант по всем пяти генам обладал резко сниженной чувствительностью к цитокининам и фенотипически напоминал тройной мутант по рецепторам [36–39]. Основную роль в передаче цитокининового сигнала играют АНР 1, 2, 3 и 5. Согласно современным представлениям, белки АНР постоянно курсируют между ядром и цитоплазмой, и паттерн их локализации не зависит от их фосфорилирования [26, 35, 40].

Еще один белок арабидопсиса, структурно напоминающий фосфотрансмиттер, – АНР6. Однако этот белок относится к псевдоАНР, так как не содержит консервативного остатка гистидина, необходимого для переноса фосфата. При этом АНР6 может связываться как с рецепторами, так и с регуляторами ответа, ингибируя их взаимодействие с типичными фосфотрансмиттерами и являясь таким образом негативным регулятором передачи сигнала цитокинина [41].

Регуляторы ответа арабидопсиса подразделяют на три группы – А, В и С, при этом существует еще группа белков-псевдорегуляторов [42]. Настоящими транскрипционными факторами являются регуляторы ответа В-типа (ARR-В), которые содержат как фосфорилируемый N-концевой ресиверный домен, так и особый В-мотив, который включает ДНК-связывающий GARP-домен и глутамин-богатый домен [43–46]. Благодаря сигналам ядерной локализации (NLS) регуляторы ответа В-типа локализируются в ядре. Всего насчитывается 11 генов *ARR-В*, однако регуляторы ответа В-типа не равнозначны в передаче цитокининового сигнала. Особое значение имеют гены *ARR1*, *10* и *12*: тройной мутант с нокаутом этих генов фенотипически сходен с тройным мутантом по цитокининовым рецепторам [47–49]. Экспрессия генов регуляторов ответа В-типа цитоки-

нинами не регулируется [28, 29, 50, 51]. Важно отметить, что получены прямые доказательства взаимодействия белков – компонентов передачи сигнала, их способности отдавать и принимать фосфат как предусмотрено схемой на *рис. 3* [13, 36, 38].

В отличие от ARR-В, гены регуляторов ответа А-типа (ARR-А) быстро активируются цитокининами и относятся к генам первичного ответа на эти гормоны [27–29, 52]. ARR-А состоят из типичного ресиверного домена и небольшого С-концевого фрагмента. Регуляторы ответа А-типа могут принимать фосфат с фосфотрансмиттеров подобно регуляторам В-типа, но при этом они не способны вызвать характерный транскрипционный ответ. Совокупность наблюдений позволяет заключить, что ARR-А играют роль негативных регуляторов передачи сигнала, причем консервативный остаток аспартата необходим для реализации их ингибиторного эффекта [53–55]. Комплексный мутант по генам регуляторов ответа А-типа характеризуется повышенной чувствительностью к цитокинину. Предполагается, что регуляторы ответа А-типа могут подавлять передачу сигнала цитокинина с белков АНР, конкурируя с регуляторами В-типа за высокоэнергетический фосфат. Таким образом, с участием ARR-А в системе передачи цитокининового сигнала осуществляется отрицательная обратная связь. Регуляторы ответа С-типа, хотя и сходны по структуре с ARR-А, не индуцируются цитокининами и, по-видимому, не играют заметной роли в передаче цитокининового сигнала [42, 56]. Отметим, что рецептор CRE1/АНК4 в отсутствие цитокинина функционирует как фосфатаза, удаляя фосфат с АНР-белков и тем самым выключая передачу сигнала и с других цитокининовых рецепторов [57]. В целом, многочисленные исследования на растениях арабидопсиса убедительно показывают, что передача цитокининового сигнала осуществляется по типу двухкомпонентных систем с гибридными гистидинкиназами в качестве рецепторов.

### СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Цитокининовый рецептор является интегральным трансмембранным белком, CHASE-домен которого расположен по одну сторону от мембраны, а гистидинкиназный и ресиверный домены – по другую. Вначале полагали, что рецепторы цитокининов локализованы на плазматической мембране, при этом считалось очевидным, что CHASE-домен должен располагаться вне клетки, а остальная часть белка – внутри клетки. Данное предположение отчасти основывалось на предсказании субклеточной локализации с помощью компьютерных программ [12, 14, 16], а также на аналогии с бактериальной клеткой, у которой CHASE-домен сенсорных белков находит-

ся вне клетки (что отражено в самом названии домена). В подтверждение этому появилось сообщение о локализации цитокининового рецептора в плазмалемме, основанное на результатах экспрессии конструкции *АНК3-GFP* в протопластах арабидопсиса [58]. Локализация рецепторов цитокининов на плазматической мембране предполагает, что цитокининовый сигнал поступает в клетку из окружающей среды за счет внеклеточных цитокининов. С другой стороны, определение рН-зависимости связывания цитокинина рецепторами показало, что это связывание оптимально в нейтральной и слабощелочной среде, типичной для цитоплазмы, и резко снижается в условиях закисления, характерных для внеклеточного пространства (апопласта) [59]. Это, наоборот, указывало на внутриклеточную локализацию рецептора. Поэтому изучение субклеточной локализации рецепторов цитокининов было продолжено.

Недавно опубликовали сразу три статьи о том, что рецепторы (по крайней мере, основная их часть) локализованы внутри клетки на мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) [60–62]. Опыты с субклеточными органеллами выявили высокоаффинные сайты связывания  $^3\text{H}$ -*транс*-зеатина во фракции мембран (микросом), но не во фракциях митохондрий и хлоропластов [60]. После разделения микросом в водной полимерной двухфазной системе на плазмалемму и эндомембраны оказалось, что высокоаффинные сайты приурочены в основном к фракции эндомембран как у арабидопсиса [61], так и у кукурузы [60]. С учетом преобладания эндомембран в клетке рассчитали, что более 90% сайтов связывания гормона находятся внутри клетки.

Изучение локализации сшитых с флуоресцентными белками рецепторов арабидопсиса, экспрессированных в листьях табака [61, 62], и рецептора кукурузы *ZmHK1* в протопластах из листьев кукурузы [60] показало, что распределение флуоресценции соответствует сети эндоплазматического ретикулума. В случае рецептора *АНК3* картина флуоресценции совпала с картиной маркера эндоплазматического ретикулума, но не маркера плазмалеммы [61, 62]. Кроме того, белок *АНК3* был гликозилирован *in vivo* по сайтам, чувствительным к гликозидазе эндоН, что указывает на локализацию в ЭР [62]. В контрольных экспериментах аналогичное гликозилирование регистрировалось у рецептора этилена *ERS1*, интегрированного в ЭР [63, 64], тогда как у гистидинкиназы *АНК1*, локализованной в плазмалемме, потенциальные эндоН-сайты не гликозилировались [62].

Важно отметить, что выявленная с помощью флуоресценции внутриклеточная локализация цитокининовых рецепторов наблюдалась при различных условиях экспрессии встроенных генов с использо-

ванием промоторов разной силы. Однако наиболее убедительный результат получен при анализе локализации рецепторов, экспрессируемых в естественных условиях. Такой подход был реализован с применением иммуноблотинга с антителами против рецептора кукурузы *ZmHK1*. Анализировали мембранные фракции, полученные после их разделения в градиенте сахарозы в присутствии и в отсутствие катионов магния [60]. В отсутствие магния рибосомы диссоциируют от ЭР, что смещает положение ЭР к верхней части градиента. Такое смещение не происходит в присутствии в среде магния. Этот эффект, известный как Mg-сдвиг, характерен именно для ЭР, но не для других мембран, не связанных с рибосомами. Анализ фракций из клеток кукурузы показал, что белок *ZmHK1* претерпевает Mg-сдвиг и колокализуется с белком-маркером ЭР (*BiP*) [60].

Получены стабильные трансформанты арабидопсиса, экспрессирующие гены рецепторов *АНК2* или *АНК3* под собственными промоторами и с Мус-пептидом на С-конце белка. Экспрессия этих конструкций компенсировала фенотип двойного мутанта арабидопсиса по генам *ahk2* и *ahk3*, что свидетельствовало о функциональности таких модифицированных рецепторов. При анализе мембранных фракций с помощью иммуноблотинга с антителами против Мус были также выявлены типичный Mg-сдвиг и корреляция с маркером ЭР [61].

Совокупность всех этих данных дает основание заключить, что рецепторы цитокининов в основном локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. Этот результат, вместе с данными о способности ЭР-локализованных рецепторов связывать цитокинины и типичной для цитоплазматических белков рН-зависимости этого связывания, может указывать на то, что рецепция цитокининового сигнала происходит главным образом внутри клетки, и решающую роль в этом процессе играют внутриклеточные цитокинины. Однако при этом нельзя исключить присутствия небольшого количества рецепторов и на плазматической мембране. Эти рецепторы могут отвечать за восприятие сигнала внеклеточных цитокининов. Для оценки функциональных качеств каждого пула цитокининовых рецепторов необходимы дальнейшие исследования.

### ЛИГАНДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ

Цитокинины (как и гиббереллины) представлены в растении большим количеством изоформ (рис. 1), среди которых обычно преобладают *транс*- и *цис*-зеатины, изопентениладенин, дигидрозеатин (основания), их  $\text{N}^9$ -рибозидные производные (рибозиды) и  $\text{N}^9$ -рибозидфосфатные производные (нуклеотиды). Встречаются также ароматические цитокинины, та-

Таблица 1. Ряды аффинности цитокининов для рецепторов арабидопсиса и кукурузы

Вид	Рецептор*	Ряд аффинности цитокининов**
<i>Zea mays</i>	ZmHK1	iP ≥ BA >> tZ ≥ cZ >> DZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRE1/АНК4	iP ≥ tZ > BA > DZ > cZ >> Ade
<i>Zea mays</i>	ZmHK2	tZ ≥ iP > DZ > BA > cZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	АНК3	tZ > DZ > iP > cZ > BA >> Ade
<i>Zea mays</i>	ZmHK3a	iP > tZ > BA > cZ >> DZ >> Ade
<i>Arabidopsis thaliana</i>	АНК2	iP > tZ > BA > cZ > DZ >> Ade

\*Рецепторы-ортологи сгруппированы попарно.

\*\*Цитокинины: iP – изопентениладенин; BA – N<sup>6</sup>-бензиламинопурин; tZ – транс-зеатин; cZ – цис-зеатин; DZ – дигидрозеатин. Ade – аденин.

кие, как N<sup>6</sup>-бензиладенин и производные, тополины и некоторые другие [4, 5, 65]. Цитокинины перемещаются в растении по транспортным каналам: снизу вверх из корня в побег по ксилеме и сверху вниз и в других направлениях по флоэме. При этом наборы цитокининов в ксилеме и флоэме различны: в ксилеме преобладают цитокинины транс-зеатинового типа, в основном транс-зеатин-рибозид, тогда как во флоэме – цитокинины изопентенильного типа нередко плюс цис-зеатин [66–68].

Физиологическая роль каждой изоформы цитокининов определяется ее сродством к рецептору, поэтому изучение взаимодействия цитокинин–рецептор и лигандной специфичности рецепторов имеет важное значение. Лигандсвязывающие свойства цитокининовых рецепторов исследовали главным образом с помощью гетерологичных модельных систем, при экспрессии генов рецепторов в трансформированных клетках бактерий (*Escherichia coli*) или дрожжей. При этом рецепторы растений оказались способными функционально замещать мутантные сенсорные гистидинкиназы одноклеточных организмов сходной (гибридной) структуры [12, 13, 30].

На основе указанных модельных систем проводили как функциональные тесты [13, 15, 30, 69, 70], так и опыты по связыванию рецептора с гормоном [59, 60, 71, 72]. В целом, как и ожидалось, сродство гормона к рецептору положительно коррелировало со способностью гормона вызывать биологический ответ [59, 71]. транс-Зеатин является одним из самых активных лигандов большинства изученных рецепторов, с  $K_d$  гормон–рецепторного комплекса в диапазоне 1–10 нМ. Такие значения констант характерны для высокоаффинных гормон–рецепторных взаимо-

действий. Заметим, что эти значения констант близки к измеренным концентрациям транс-зеатина в живых растениях [34, 66, 68, 73]. Скотчардовский анализ показал наличие одного сайта связывания лиганда рецептором, без признаков кооперативности взаимодействия [59, 74]. При этом природные (производные N<sup>6</sup>-аденина) и синтетические (тидиазурон – производное фенилмочевины) цитокинины связывались с одним и тем же сайтом рецептора [59].

Однако рецепторы различаются по предпочтению разных изоформ цитокининов [59, 60, 75]. Так, рецепторы арабидопсиса CRE1/АНК4 и АНК2 имеют высокое и сходное сродство к транс-зеатину и изопентениладенину, но существенно более низкое сродство к дигидрозеатину. Рецептор АНК3, напротив, имеет относительно высокое сродство к дигидрозеатину, но более низкое – к изопентениладенину. Все три рецептора арабидопсиса способны связывать, хотя и с низким сродством, также и цис-зеатин. Глюкозилирование цитокинина по атомам азота N3 или N7, а также кислорода боковой цепи блокирует связывание гормона с рецептором [30, 59].

Лигандная специфичность рецепторов цитокининов изучена также у однодольного растения кукурузы, три рецептора которой являются ортологами рецепторов двудольного арабидопсиса: ZmHK1 – ортолог CRE1/АНК4; ZmHK2 – ортолог АНК3; ZmHK3 – ортолог АНК2 [76]. У рецепторов кукурузы обнаружили черты сходства и различий с рецепторами арабидопсиса [60, 76]. В целом, ряды относительной активности лигандов оказались довольно сходными у ортологов кукурузы и арабидопсиса (табл. 1). Если в отношении ZmHK1 и ZmHK3 изопентениладенин более активен, чем транс-

зеатин, то в случае ZmHK2 наблюдалась обратная картина. Еще более резкое различие между рецепторами кукурузы проявляется при их взаимодействии с дигидрозеатином: сродство ZmHK2 к этому цитокинину более чем на два порядка выше, чем у ZmHK1 и ZmHK3. Особенностью рецепторов кукурузы является их относительно высокое сродство к *цис*-зеатину, при этом у ZmHK1 сродство к *транс*- и *цис*-зеатинам практически одинаково. Эта особенность рецепторов кукурузы согласуется с повышенной концентрацией *цис*-зеатина в растениях данного вида [77, 78].

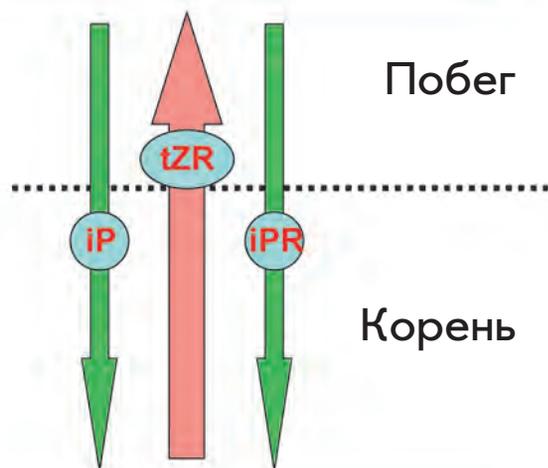
Закономерности лигандной специфичности рецепторов можно объяснить с учетом их возможной роли в дальнедистанционной сигнализации в растении. Рецепторы арабидопсиса ANK3 и их кукурузные ортологи ZmHK2 экспрессируются в основном в побеге и контролируют процессы метаболизма в листьях. Эти рецепторы «настроены» в первую очередь на цитокинины типа *транс*-зеатина, т.е. на цитокинины, поступающие в побег из корней. В свою очередь, рецепторы CRE1/ANK4 и ZmHK1, преобладающие в корнях, активно реагируют на изопентениладенин, главный цитокинин флоэмы, поступающий в корни из побега вместе с флоэмным соком (рис. 4). Таким образом может осуществляться сигнальный обмен между разными частями и органами растительного организма, при котором цитокининовые сигналы отдаленного органа оказываются более значимыми для клетки, чем сигналы из близкорасположенных тканей [4, 59, 79].

#### ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ

Открытие рецепторов цитокининов связано с обнаружением мутации арабидопсиса, названной *wooden leg* (*wol*). Мутантные растения отличались от растений дикого типа уменьшением длины и нарушением развития проводящей системы главного корня: она была представлена только протоксилемой (формирования метаксилемы и флоэмы не происходило), а общее число клеток было значительно снижено. Кроме того, у растений отсутствовали боковые корни и наблюдалось усиленное образование придаточных корней. Фенотипическое проявление этой мутации впервые описали в 1995 г. [80].

Впоследствии установили, что мутация *wol* локализована в гене сенсорной гистидинкиназы CRE1/ANK4 и представляет собой замену треонина-278 (по современной нумерации треонина-301) на изолейцин в гормонсвязывающем CHASE-домене [12, 15, 16]. Позднее с помощью химического мутагенеза получили мутацию *wol-2*, при которой лейцин-529 заменяется на фенилаланин [81], *wol-3*, при которой метионин-459 меняется на изолейцин [82], а также

«Листовые» рецепторы чувствительны к Цк tZ-типа



«Корневые» рецепторы чувствительны к Цк iP-типа

Рис. 4. Модель дальнедистанционного действия цитокининов. Стрелка в центре — перемещение цитокининов (Цк) *транс*-зеатинового типа из корня в побег по ксилеме. Латеральные стрелки — перемещение цитокининов изопентенильного типа из побега в корень по флоэме.

*cre1-1*, в которой глицин-490 заменен на аспаратат [12]. Все эти мутации также имеют типичный *wol*-фенотип, обусловленный недоразвитием проводящей системы вследствие уменьшения числа инициальных клеток в меристеме по причине блокирования клеточных делений [16]. В результате дефектов проводящей системы затруднено поступление ауксинов к перикарпу, вследствие чего не закладываются боковые корни. Вместе с тем нарушение проводящей системы главного корня ведет к накоплению ауксинов в области гипокотыля, что, в свою очередь, стимулирует образование придаточных корней. Интересно отметить, что у мутантов *wol-3* в придаточных корнях, в отличие от главного, наблюдалось нормальное развитие проводящей системы [82].

С использованием радиолигандного метода показано, что мутация *wol* приводит к потере рецептором способности связывать цитокинины [15]. Однако введение стоп-кодона в мутантный ген CRE1/ANK4 восстанавливало фенотип дикого типа у растений *wol* [57]. Поэтому было логично предположить, что му-

тантный рецептор CRE1/АНК4 не просто перестает участвовать в передаче цитокининового сигнала, но и подавляет передачу этого сигнала от других рецепторов, АНК2 и АНК3. Ранее установили, что некоторые гистидинкиназы бактерий обладают не только киназной, но и фосфатазной активностью, действие которой приводит к дефосфорилированию фосфопротеинов [83]. В опытах *in vitro* и с использованием трансгенных дрожжей было показано, что CRE1/АНК4 также обладает конститутивной фосфатазной активностью, а его гистидинкиназная активность проявляется только в присутствии цитокининов [57]. Таким образом, мутация *wol*, лишаящая CRE1/АНК4 способности связывать цитокинин, блокирует его гистидинкиназную активность при сохранении фосфатазной. Вследствие этого CRE1/АНК4 с мутацией *wol* дефосфорилирует белки-фосфотрансмиттеры, фосфорилированные рецепторами АНК3 и АНК2, блокируя тем самым передачу цитокининового сигнала. CRE1/АНК4 превалирует в клетках корня [17, 32], поэтому мутантный *wol*-фенотип проявляется в основном в корнях.

Аналогичные мутации в CHASE-доме рецепторов АНК3 и АНК2 не приводили к появлению *wol*-подобного фенотипа [31]. Это указывает на отсутствие фосфатазной активности у рецепторов АНК2 и АНК3.

Таким образом, выявлен ряд мутаций рецептора CRE1/АНК4, приводящих к возникновению типичного *wol*-фенотипа. Показано, что при всех этих мутациях рецептор прекращает передавать цитокининовый сигнал, хотя только мутация *wol* (*wol-1*) локализуется в CHASE-доме. Мутация *wol-3* расположена в участке, лежащем между вторым трансмембранным и гистидинкиназным доменами, а *wol-2* и *cre1-1* – в гистидинкиназном домене.

В целом, анализ мутаций позволил подтвердить и уточнить функции отдельных частей цитокининовых рецепторов. Изолированный CHASE-дом с соседствующими трансмембранными доменами сохранял способность к высокоаффинному связыванию цитокинина, тогда как рецептор без CHASE-домена этой способности лишался [84]. Другие мутации в этом домене также подавляли связывание гормона рецептором [84]. Таким образом, не вызывает сомнений, что именно CHASE-домен выполняет функцию связывания гормона.

Хотя мутации CHASE-домена в абсолютном большинстве случаев нарушали функционирование рецепторов, у рецептора АНК3 найдена мутация этого домена, приводящая к конститутивной активности гистидинкиназы [58]. При этой мутации, названной *ore12-1*, пролин-243, расположенный в самой середине CHASE-домена, заменялся на серин. Предпо-

лагается, что подобная замена аминокислот может приводить к изменению структуры CHASE-домена, сходному с изменением, которое вызывает связывание цитокинина [58].

Известно, что особую функцию в молекулах сенсорных гибридных гистидинкиназ выполняют консервативные остатки гистидина и аспартата, фосфорилирование которых происходит в ходе передачи сигнала. Замены этих остатков (His482Gln и Asp996Asn) приводили к потере как гистидинкиназной активности, так и способности CRE1/АНК4 реагировать на цитокинины [12]. Замена Asp996Asn приводила также к полной утрате фосфатазной активности, в то время как замена гистидина – лишь к ее незначительному снижению [57]. Кроме того, замена His482Gln не влияла на способность рецептора связывать цитокинины [84].

С использованием ПЦП получен ряд мутаций в CRE1/АНК4: Gly435Cys, Phe436Ser, Met447Thr во втором трансмембранном домене, Val471Ala на участке между вторым трансмембранным и гистидинкиназным доменами и Met494Leu в гистидинкиназном домене. Все эти мутации расположены на коротком участке длиной примерно 60 аминокислотных остатков между лигандсвязывающим доменом и консервативным остатком гистидина, важным для автофосфорилирования белка [31]. Эти мутации приводили к появлению у CRE1/АНК4 конститутивной гистидинкиназной активности, т.е. этот рецептор приобретал способность посылать сигнал вне зависимости от присутствия цитокининов в среде. При этом мутантные рецепторы сохраняли способность связывать цитокинины, что подтверждено опытами по связыванию меченного тритием изопентениладенина данными рецепторами в составе мембран *Schizosaccharomyces pombe*. Интересно отметить, что рецептор CRE1/АНК4 с мутацией Phe436 сохранял свою конститутивную гистидинкиназную активность даже при дополнительном введении мутации *wol*, несмотря на потерю способности связывать цитокинин. Таким образом, при наличии данных конститутивных мутаций способность рецептора связывать цитокинины не имеет значения для передачи сигнала [31].

Введение мутаций в те же области других рецепторов цитокининов также может привести к сходному результату. Так, замены консервативных гидрофобных аминокислот в рецепторах АНК2 (Ile586Ala) и АНК3 (Val449Ala), аналогичные замене Val471Ala в рецепторе CRE1/АНК4, приводили к появлению у рецепторов конститутивной гистидинкиназной активности [31]. Возможно, что замены аминокислот во втором трансмембранном домене и нижележащем (*downstream*) участке приводят к конформационным изменениям в молекуле белка, аналогичным тем, ко-

торые возникают при связывании рецептором цитокинина, стимулируя тем самым гистидинкиназную активность в отсутствие гормона.

Исходя из структуры цитокининового рецептора, естественно ожидать, что мутации, удаляющие ресиверный домен или нарушающие его структуру, будут приводить к инактивации рецептора. Действительно, были получены растения *A. thaliana* с мутациями в гене рецептора CRE1/АНК4, названные *cre1-3* и *cre1-7*, в которых произошла замена триплетов, кодирующих Trp1026 и Gln475 соответственно, на стоп-кодона [85]. Очевидно, что при таких мутациях синтезируется «укороченный» рецептор, лишенный целого ресиверного домена или его части. Еще у одного мутанта, *cre1-6*, замена нуклеотидов, приводившая к замене Gly493Ala, видимо, вызывала нарушения в ходе сплайсинга, в результате чего также образовывался «укороченный» рецептор. У мутанта *cre1-4* произошла замена Thr1008Ile, а у *cre1-9* – Ala1032Thr, при этом образовались полноразмерные белки, но с мутациями в ресиверном домене [85]. У полученных мутантных растений проверили реакцию на фосфатное голодание, которую в норме подавляют цитокинины. В мутантных растениях, в отличие от контрольных, эффект цитокининов в этом биотесте практически не проявлялся. Таким образом, мутации, приводящие к образованию «укороченных» рецепторов CRE1/АНК4, и мутации ресиверного домена приводят к подавлению у растений чувствительности к цитокининам в биотесте на фосфатное голодание [85].

Сходные мутации цитокининового рецептора MtCRE1 получены и изучены у люцерны *Medicago truncatula* [86]. Эти мутации затрагивали гистидинкиназный домен рецептора, при этом в случае мутации *mtcre1-1* триплет, кодирующий Trp573, расположенный в середине домена, заменялся на стоп-кодон, что приводило к образованию укороченного белка. Мутация *mtcre1-2* заключалась в замене Thr642Ile в консервативном G2-мотиве домена, а при мутации *mtcre1-3* замена Gly545Glu локализовалась в вариабельном участке домена. В биотесте на подавление роста корня было показано, что мутанты *mtcre1-1* и *mtcre1-2*, в отличие от *mtcre1-3*, теряли чувствительность к цитокинину. У мутантов *mtcre1-1* и *mtcre1-2* нарушалось формирование клубеньков при их инфицировании симбиотическими бактериями [86]. Все это еще раз подчеркивает важную роль каждого из консервативных доменов для нормального функционирования рецептора.

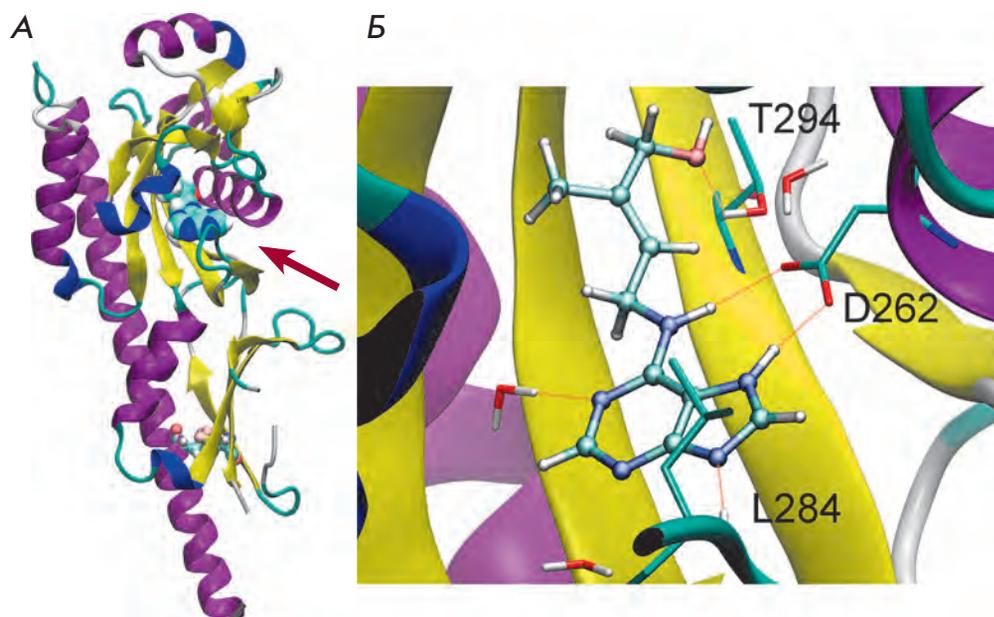
### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРА

Для ясного понимания особенностей строения и функционирования рецептора необходимо иметь

представление о пространственной структуре изучаемого белка. Самый распространенный способ ее изучения – рентгеноструктурный анализ (РСА), для проведения которого необходимо иметь монокристалл нужного белка. Однако рецепторы цитокининов представляют собой высокомолекулярные трансмембранные белки, что делает их кристаллизацию затруднительной, поэтому к сегодняшнему дню полная трехмерная структура не получена ни для одного из этих рецепторов.

Более реально установить пространственную структуру какого-либо домена рецептора. Работы в этом направлении проводились в отношении лигандсвязывающего [79, 87–89] и ресиверного [90, 91] доменов. Попытка предсказать третичную структуру CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4 была предпринята еще в 2004 г. [87]. В этой работе использовали моделирование структуры CHASE-домена на основе его гомологов, пространственное строение которых определили методом РСА. В качестве шаблонов были выбраны лигандсвязывающие области сенсорных гистидинкиназ бактерий *E. coli* (PDB ID: 1OJG) и *Klebsiella pneumoniae* (PDB ID: 1P0Z). Затем для выявления потенциального сайта связывания гормона проводили молекулярный докинг цитокининов *транс*-зеатина и кинетина в предполагаемый сайт связывания построенной модели. Согласно полученным результатам, CHASE-домен соответствовал так называемому PAS-типу, а сайт связывания полностью охватывал молекулу цитокинина. Отмечен ряд аминокислотных остатков, отвечающих за связывание белка с лигандом [87], в том числе Thr278, замена которого на Ile (мутация *wol*) приводила к инактивации рецептора. Однако предложенная модель оказалась неверной, по-видимому, из-за слишком далекого родства белковых структур, взятых в качестве шаблонов для моделирования CHASE-домена.

Изучение возможной структуры сайта связывания гормона в CHASE-домене было продолжено с использованием метода эволюционной протеомики, т.е. поиска консервативных аминокислот CHASE-домена, необходимых для узнавания и связывания лиганда [84]. Найдено несколько аминокислотных остатков – потенциальных участков взаимодействия с гормоном, и проведены замены пяти из них на аланин в рецепторе CRE1/АНК4. При экспрессии таких мутантных рецепторов в *E. coli* две замены из пяти (Phe281Ala и Thr294Ala) привели к полному исчезновению способности связывания гормона с рецептором, еще в двух случаях (Trp221Ala и Arg282Ala) связывание заметно уменьшилось по сравнению с интактным рецептором CRE1/АНК4. Мутация Lys274Ala не дала эффекта. Отмечается, что большинство результативных мутаций локализованы вблизи предсказанных



**Рис. 5.** Пространственная структура CHASE-домена рецептора цитокининов CRE1/АНК4 арабидопсиса. Общий вид (А) и строение сайта связывания с молекулой *транс*-зеатина (Б). Молекула цитокинина показана в виде модели с заполнением пространства, цистиновый мостик показан в виде шаростержневой модели. Стрелкой показано положение связанного цитокинина.

центральных  $\beta$ -структур домена, что предполагает важную роль этих  $\beta$ -структур для связывания гормона. Впоследствии эти результаты были в основном подтверждены при расшифровке пространственной структуры CHASE-домена в комплексе с гормоном [89]: аминокислотные остатки Thr294, Phe281 и Arg282 действительно находились в контакте с цитокинином, тогда как Lys274 в контакте с гормоном прямо не участвовал.

Решающий успех в определении пространственной структуры CHASE-домена был достигнут в 2011 г., когда ученым из Salk Института (США) удалось получить кристалл CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4, подходящий для РСА [89]. В результате была определена структура лигандсвязывающего CHASE-домена рецептора CRE1/АНК4 в комплексе с различными гормонами (PDB ID: 3T4J, 3T4K, 3T4L, 3T4O, 3T4Q, 3T4S, 3T4T; разрешение 1.53–2.30 Å). Согласно этим данным (рис. 5), N-конец домена представляет собой длинную  $\alpha$ -спираль, рядом с которой находятся два петлеобразных домена типа PAS, соединенные между собой спиральными линкерами. Последняя  $\beta$ -структура, ближайшая к С-концу PAS-домена, ковалентно связана с N-концевой  $\alpha$ -спиралью через дисульфидный мостик, что делает структуру домена более жесткой и компактной. Интересно отметить, что сходные третичные структуры сенсорных доменов описаны ранее у гистидинкиназ некоторых бактерий (*Bacillus subtilis*, PDB ID: 2FOS, 4DBJ; *Sinorhizobium meliloti*, PDB ID: 3E4P; *Shewanella oneidensis*, PDB ID: 3LIC), несмотря на низкий уровень сходства последовательностей бактериальных рецепторов и CRE1/АНК4 [92]. Сенсорные домены

как CRE1/АНК4, так и их бактериальных гомологов кристаллизовались в виде гомодимеров. Установлено, что для узнавания цитокининов CRE1/АНК4 использует удаленный от мембраны PAS-домен. Лигандсвязывающая полость рецептора полностью охватывает лиганд, что показано для ряда наиболее известных цитокининов: изопентениладенина (3T4J), N<sup>6</sup>-бензиламинопурина (3T4K), *транс*-зеатина (3T4L) и кинетина (3T4S); различия между структурами рецептора в комплексе с различными гормонами пренебрежимо малы. «Нижняя» часть цитокининсвязывающего сайта сформирована центральной  $\beta$ -структурой PAS-домена и облицована небольшими гидрофобными аминокислотными остатками. Замена этих остатков на аминокислоты с более объемными радикалами перекрывает область связывания цитокининов и тем самым инактивирует рецептор. Именно это происходит в случае самой известной мутации *wol* при замене небольшого остатка Thr278 на Ile, боковая цепь которого длиннее. Две короткие  $\beta$ -структуры формируют «верхнюю» часть активного центра и вносят дополнительные гидрофобные связи. Водородные связи образуются между адениновой частью цитокинина и остатком Asp262 (эта связь критична для связывания), Leu284, Tyr250, Thr286, причем две последние аминокислоты контактируют с молекулами воды, которые, в свою очередь, взаимодействуют с атомами цитокинина. Остальные аминокислоты участвуют в гидрофобных взаимодействиях как с адениновой, так и, особенно, с хвостовой частью цитокинина (табл. 2). Всего лигандсвязывающий карман формируют примерно 20 аминокислот ([89] и Nothern M., личное сообщение).

Таблица 2. Аминокислотные остатки рецептора CRE1/АНК4, формирующие сайт связывания цитокина

Область контакта с гормоном	Аминокислотные остатки полости CHASE-домена, окружающие связанный N <sup>6</sup> -изопентениладенин*												
	G200	M226	V248	Y250	L251	D262	F281	R282	L283	L284	T286	V292	A322
Адениновая часть	1	1	2	H*H*	3	HH	1	1	3	H; 2	H*	3	3
Хвостовая часть	3	3	3	3	3	3	3	3	3				

\* 1, 2 и 3 – условная сила гидрофобных взаимодействий iP с CRE1/АНК4, H и HH – 1–2 водородные связи, а H\* – водородная связь, образуемая с участием молекулы воды.

Важные для связывания аминокислоты оказались достаточно консервативными у разных цитокиновых рецепторов; замены этих консервативных аминокислот в CHASE-домене CRE1/АНК4 приводили, как правило, к инактивации рецептора [89].

В растениях цитокинины могут быть гликозилированы по атомам азота в адениновом кольце, а OH-группа изопреноидной части лиганда может подвергаться ацилированию или гликозилированию. Как уже отмечалось выше, все эти модификации делают цитокинины неактивными [30, 59]. Пространственная структура рецептора подтверждает эти результаты, так как ограниченная полость, в которой происходит связывание лиганда, не может вместить цитокинины, обладающие дополнительными гликозильными или другими группами.

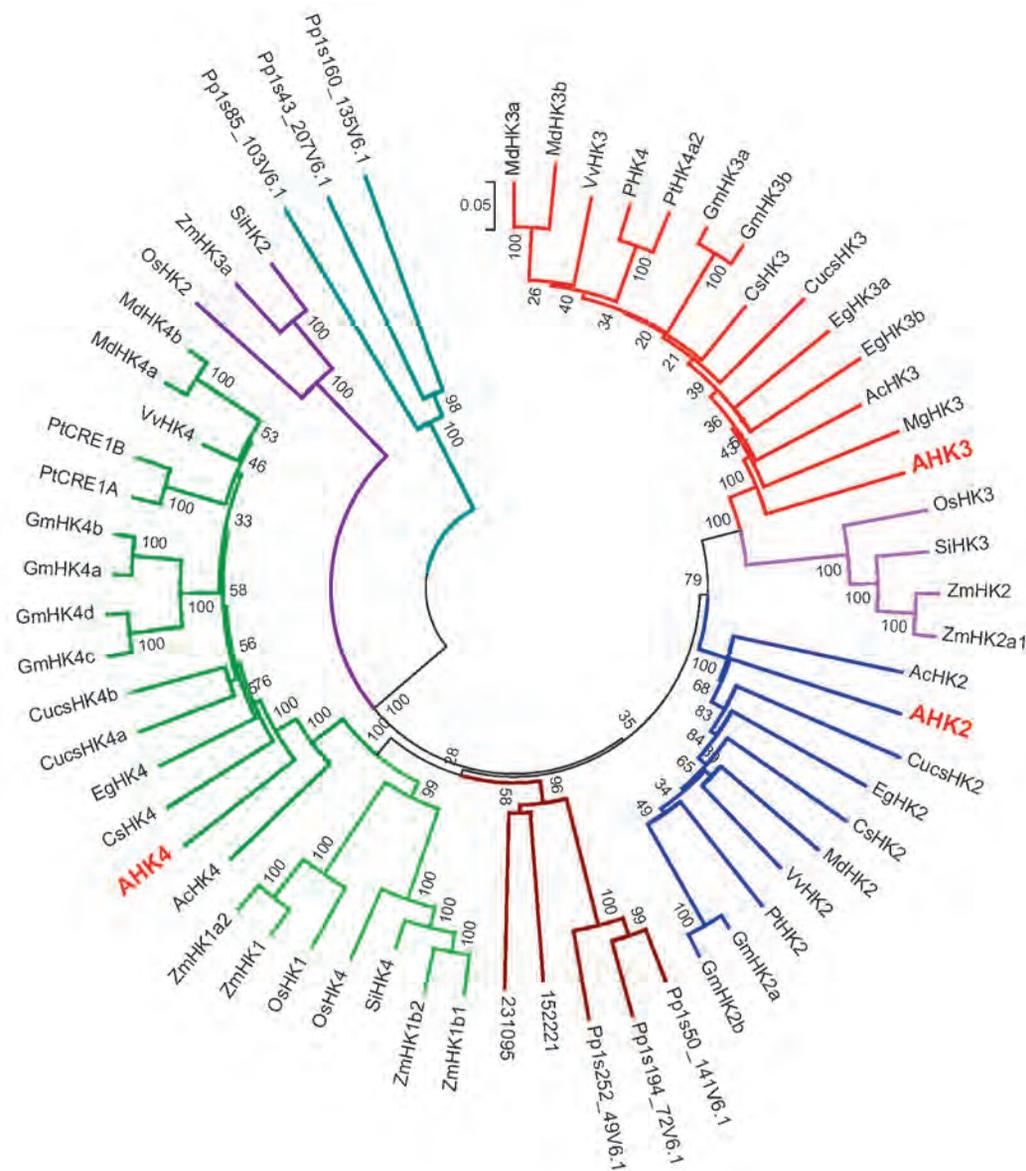
Транс-зеатин, в отличие от цис-зеатина, образует дополнительную водородную связь через OH-группу бокового радикала с Thr294 [89], что объясняет, почему CRE1/АНК4 с большим сродством связывает транс-, а не цис-зеатин. На примере кинетина и бензиламинопурина показано, как рецептор связывается с цитокининами, обладающими более объемными ароматическими хвостовыми группами (как в случае кинетина). Фурфурильный фрагмент кинетина, как и изопренильная группа транс-зеатина, образует водородную связь с Thr294, которая в кинетине реализуется с участием молекулы воды. А на примере тидиазурона (структура ЗТ4Т) подтверждено, что рецептор CRE1/АНК4 использует для связывания с синтетическими и природными цитокининами один и тот же сайт, при этом синтетические цитокинины образуют водородные связи с теми же аминокислотами, что и цитокинины – производные N<sup>6</sup>-аденина. Приведены общие принципы дизайна соединений с цитокининовой активностью: у таких соединений должна быть плоская кольцевая структура, занимающая «адениновую» часть лигандсвязывающей полости, с линкером, способным образовывать водородные связи с Asn262 и присоединяющим пло-

скую алифатическую или ароматическую хвостовую группу небольшого размера [89].

### ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ

До сих пор рецепторы цитокининов основательно изучали в основном у двух видов растений, правда, филогенетически достаточно отдаленных: арабидопсиса и кукурузы. Поэтому представляет интерес выяснить, каковы особенности аппарата рецепции цитокининов у растений других видов, а также проследить становление цитокининовой сигнальной системы в ходе эволюции растений. Такое исследование стало возможным благодаря расшифровке полных геномов целого ряда видов растений.

Результаты филогенетического анализа ряда геномов привели к заключению о том, что способ рецепции и трансдукции цитокининового сигнала на основе двухкомпонентной системы возник у многоклеточных растений после их выхода на сушу, видимо, как один из элементов их биохимической адаптации к новым условиям существования [93]. Гены, кодирующие сенсорные гистидинкиназы с CHASE-доменом и регуляторы ответа А-типа, в геномах изученных видов низших и высших растений обнаруживались, начиная со мхов и плаунов. У более высокоорганизованных растений число компонентов системы сигналинга цитокининов, как правило, возрастало по сравнению с более примитивными. Особенно это касалось фосфотрансмиттеров и регуляторов ответа. Отмечено, что рецепторы цитокининов всех проанализированных цветковых растений подразделяются на три филогенетически отдельные ветви, соответствующие рецепторам арабидопсиса CRE1/АНК4, АНК3 и АНК2. При этом рецепторы архегониальных растений (мох, плаун) располагались в эволюционном древе особняком, что указывало на появление трех основных типов рецепторов скорее всего в период появления цветковых растений, но еще до их разделения на однодольные и двудольные [93].



**Рис. 6.** Филогенетический анализ рецепторов цитокининов. Для выравнивания последовательностей белков использовали программу Clustal W, для построения филогенетического древа – программу MEGA5.05, бутстрэп-анализ с 1000 случайными выборками. Числа в узлах показывают вероятность (%) формирования отходящих ветвей.

Проведенный нами более широкий филогенетический анализ на основе секвенированных геномов 30 видов наземных многоклеточных растений позволил дополнительно прояснить ряд вопросов эволюции цитокининовых рецепторов. Среди аннотированных генов выявлено 112, кодирующих белки с типичной для цитокининовых рецепторов структурой, включающей CHASE-домен, гистидинкиназный и ресерверный домены (рис. 6). Гены таких сенсорных гистидинкиназ представлены во всех расшифрованных геномах высших растений. Число сенсорных гистидинкиназ с CHASE-доменом варьировало от одного у картофеля *Solanum tuberosum* и губастика крапчатого *Mimulus guttatus* до восьми у сои культурной *Glycine max*. Филогенетический анализ позволил выявить у цветковых растений несколько ветвей

близкородственных рецепторов. Наиболее представительными снова оказались три ветви, соответствующие рецепторам арабидопсиса ANK2, ANK3 и CRE1/ANK4. Внутри этих ветвей наблюдалось подразделение на группы однодольных и двудольных ортологов. Кроме того, некоторые небольшие ветви стояли особняком, в частности группа однодольных ортологов *ZmHK3*. В целом, рецепторы цитокининов можно разделить филогенетически на три группы у двудольных и четыре у однодольных. При этом рецепторы одного вида растений, входящие в разные группы, более сходны с ортологами других видов своей группы, чем между собой. У разных видов растений рецепторы в этих группах представлены по-разному. Как уже отмечалось выше, у двудольных – картофеля и губастика крапчатого – найдено

всего по одному рецептору, относящихся к ортологам CRE1/АНК4 и АНК3 соответственно. Не исключено, что у этих видов могут быть и другие рецепторы, если в их геномах будут идентифицированы новые гены. При этом в рецепторе картофеля StНК4 вместо консервативного Tyr318 находится фенилаланин. Правда, прямых доказательств важности этой аминокислоты для функционирования рецептора не представлено [89]. Интересно, что у томата, близкого родственника картофеля, имеются нормальные представители рецепторов всех трех основных эволюционных ветвей. В семействе бобовых наблюдается дубликация ортолога CRE1/АНК4, причем у сои найдены четыре ортолога CRE1/АНК4, по два в каждой группе дубликации (рис. 6). В двух других ветвях имеются по два представителя рецепторов сои. У люцерны *Medicago truncatula* единственный ортолог CRE1/АНК4 относится к одной из двух групп дубликации. Фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* и *Lotus japonicus* имеют по два представителя ортолога CRE1/АНК4, но лишены ортологов АНК3 и АНК2 соответственно. Однако в белке PvНК4а фасоли в позиции 284 вместо высококонсервативного лейцина находится триптофан, что ставит под сомнение функцию этого белка в качестве рецептора цитокининов. Отдельные замены консервативных аминокислот выявлены также у некоторых других видов двудольных (апельсин *Citrus sinensis*, огурец *Cucumis sativus*, маниок *Manihot esculenta*). Общим свойством всех видов двудольных, за исключением губастика крапчатого, является обязательное присутствие ортологов рецептора CRE1/АНК4.

У однодольных риса и кукурузы также имеются представители двух эволюционных ветвей рецепторов, ортологов АНК3 и АНК4, при этом группу АНК4 можно разделить на две подгруппы, условно ZmНК1a и ZmНК1b. У кукурузы в каждую из этих групп/подгрупп входят по два рецептора. Однако у щетинника итальянского *Setaria italica* отсутствуют ортологи CRE1/АНК4 в одной из подгрупп (ZmНК1a), а у сорго *Sorghum bicolor* и *Brachypodium distachyon* отсутствуют ортологи ZmНК3a (рис. 6). Таким образом, все известные геномы однодольных растений кодируют хотя бы один представитель ортологов CRE1/АНК4. Стоит отметить, что ортологи CRE1/АНК4 представлены в доступных геномах практически всех однодольных в двух вариантах, однако не исключено, что эта особенность характерна только для семейства злаков, геномы которых уже известны, а в прочих семействах однодольных содержится иное число изоформ CRE1/АНК4. Однако в любом случае ортологи CRE1/АНК4 сейчас представляются наиболее важными рецепторами цитокининов у цветковых растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные гормоны растений известны уже с середины 20 века, но именно в последние десятилетия исследования фитогормонов переживают период ренессанса. В первую очередь, это связано с раскрытием молекулярного механизма их действия на клетку: обнаружением рецепторов и кодирующих их генов, возможностью клонирования генов рецепции, биосинтеза и сигнальной трансдукции, а также получения направленных мутаций [94–101]. Фундаментальные основы внутриклеточного сигналинга фитогормонов аналогичны основам сигналинга гормонов животных и человека: для восприятия гормона служат рецепторы, которые при формировании гормон-рецепторных комплексов меняют некоторые свои свойства, что приводит к передаче сигнала на первичную клеточную мишень с помощью соответствующей системы сигнальной трансдукции. Как и у животных, в клетках растений рецепторы располагаются в основном в двух компартментах: в составе мембран или (растворимые) внутри ядра. Основной клеточной мишенью сигналинга гормонов растений, как и гормонов животных, служит узкий набор генов первичного ответа, специфичный для каждого из фитогормонов. Но, как оказалось, молекулярные механизмы сигналинга гормонов у животных и растений существенно различаются. У растений обнаружены такие пути внутриклеточной передачи сигнала, которые не встречаются у животных. Благодаря этому результаты изучения растений существенно обогатили молекулярную гормонологию как науку в целом.

Для сигналинга цитокининов растения используют аналог двухкомпонентной системы передачи сигнала, позаимствованной у цианобактерий [20, 24, 94, 102]. Как полагают, именно симбиоз цианобактерий и эукариотических клеток позволил растениям обрести хлоропласты и попутно использовать бактериальные гены для своих нужд [103, 104]. Переход к наземному образу жизни дал многоклеточным растениям мощный стимул для формирования новых гормональных систем регуляции, в том числе и цитокининовой. В животной же клетке органелл типа хлоропластов нет. По-видимому, из-за отсутствия симбиоза с соответствующими бактериальными прародителями (цианобактерии) этих органелл системы двухкомпонентной передачи сигнала животным не достались.

Большой прогресс в раскрытии молекулярных механизмов действия фитогормонов достигнут в 21-м «постгеномном» веке не случайно, а именно благодаря работам по расшифровке полных геномов растений, начало которым положило секвенирование генома арабидопсиса в 2000 г. [11]. В результате арабидопсис является пока единственным видом, у которого к сегодняшнему дню детально охарактеризован аппарат

рецепции и трансдукции цитокининового сигнала. Однако даже и здесь остается еще много нерешенных вопросов. В этой связи стоит отметить, что работы по изучению цитокининовой системы регуляции проводятся в настоящее время широким фронтом, на разных объектах, с применением самых современных методов молекулярной биологии, гормонологии, геномной инженерии, биоинформатики и других. Не вызывает сомнений то, что скоро мы станем свидетеля-

ми новых открытий в этой интригующей и перспективной области изучения жизни на нашей планете. ●

*Исследования авторов обзора поддержаны Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 10-04-00638, 11-04-00614 и 11-04-90491).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller C.O., Skoog F., von Saltza N.M., Strong F.M. // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 1392.
2. Mok M.C. Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1994. P. 155–166.
3. Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology, 5<sup>th</sup> Ed. Sunderland (USA): Sinauer Associates, Inc. 2010. <http://5e.plantphys.net/chapter.php?ch=21>
4. Романов Г.А. // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 295–319.
5. Romanov G.A. // McGraw Hill Encyclopedia of Science & Technol. 2012. V. 5. P. 205–207.
6. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.-M., Hwang I. // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 388–394.
7. Zalabák D., Pospíšilová H., Smehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. // Biotechnol. Advances. 2012. In press. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.003.
8. Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S. // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 172–179.
9. Gold-von Simson G., Goldberg J.D., Rolnitzky L.M., Mull J., Leyne M., Voustantiok A., Slaugenhaupt S.A., Axelrod F.B. // Pediatr. Res. 2009. V. 65. P. 341–346.
10. Kolyachkina S.V., Tararov V.I., Alexeev C.S., Krivosheev D.M., Romanov G.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Inshakov A.N., Mikhailov S.N. // Collect. Czech. Chem. Commun. 2011. V. 76. P. 1361–1378.
11. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.
12. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. // Nature. 2001. V. 409. P. 1060–1063.
13. Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 107–113.
14. Ueguchi C., Sato S., Kato T., Tabata S. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 751–755.
15. Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 1017–1023.
16. Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. // Genes Dev. 2000. V. 14. P. 2938–2943.
17. Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 231–235.
18. Anantharaman V., Aravind L. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 579–582.
19. Mougél C., Zhulin I.B. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 582–584.
20. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. // Genome Biol. 2002. V. 3. P. 3013.1–3013.8.
21. Heyl A., Schmölling T. // Cur. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 480–488.
22. Maxwell B.B., Kieber J.J. // Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. Davies P.J. Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 2005. P. 321–349.
23. Schaller G.E., Kieber J.J., Shiu S.-H. // The Arabidopsis Book. 2008. № 6. P. 1–12.
24. Schaller G.E., Shiu S.-H., Armitage J.P. // Current Biol. 2011. V. 21. P. R320–R330.
25. West A.H., Stock A.M. // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26. P. 369–376.
26. Punwani J.A., Hutchison C.E., Schaller G.E., Kieber J.J. // Plant J. 2010. V. 62. P. 473–482.
27. Brandstatter I., Kieber J.J. // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 1009–1020.
28. Rashotte A.M., Carson S.D.B., To J.P.C., Kieber J.J. // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1998–2011.
29. Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Schmölling T. // Plant J. 2005. V. 44. P. 314–333.
30. Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1299–1305.
31. Miwa K., Ishikawa K., Terada K., Yamada H., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1809–1814.
32. Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 8821–8826.
33. Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1365–1377.
34. Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 40–54.
35. Shi X., Rashotte A.M. // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 789–799.
36. Tanaka Y., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. P. 462–465.
37. Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M.W., Maxwell B.B., Perdue T.D., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J. // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 3073–3087.
38. Dortay H., Mehnert N., Bürkle L., Schmölling T., Heyl A. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 4631–4644.
39. Deng Y., Dong H., Mu J., Zheng B., Ji Z., Yang W.-C., Liang Y., Zuo J. // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 1232–1248.
40. Lu J.M., Deschenes R.J., Fassler J.S. // Eukaryot. Cell. 2003. V. 2. P. 1304–1314.
41. Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. // Science. 2006. V. 6. P. 94–98.
42. Gupta S., Rashotte A.M. // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 801–812.
43. Lohrmann J., Sweere U., Zabaleta E., Bäurle I., Keitel C., Kozma-Bognar L., Brennicke A., Schäfer E., Kudla J., Harter K. // Mol. Genet. Genomics. 2001. V. 265. P. 2–13.
44. Sakai H., Aoyama T., Bono H., Oka A. // Plant Cell Physiol.

1998. V. 39. P. 1232–1239.
45. Sakai H., Aoyama T., Oka A. // *Plant J.* 2000. V. 24. P. 703–711.
46. Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2015–2029.
47. Mason M.G., Mathews D.E., Argyros D.A., Maxwell B.B., Kieber J.J., Alonso J.M., Ecker J.R., Schaller G.E. // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 3007–3018.
48. Ishida K., Yamashino T., Yokoyama A., Mizuno T. // *Plant Cell Physiol.* 2008. V. 49. P. 47–57.
49. Argyros R.D., Mathews D.E., Chiang Y.-H., Palmer C.M., Thibault D.M., Etheridge N., Argyros D.A., Mason M.G., Kieber J.J., Schaller G.E. // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 2102–2116.
50. Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. // *Plant Cell Physiol.* 1999. V. 40. P. 733–742.
51. Che P., Gingerich D.J., Lall S., Howell S.H. // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 2771–2785.
52. D'Agostino I.B., Deruère J., Kieber J.J. // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1706–1717.
53. Hwang I., Sheen J. // *Nature.* 2001. V. 413. P. 383–389.
54. To J.P., Haberer G., Ferreira F.J., Deruère J., Mason M.G., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J. // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 658–671.
55. Lee D.J., Park J.Y., Ku S.J., Ha Y.M., Kim S., Kim M.D., Oh M.H., Kim J. // *Mol. Genet. Genomics.* 2007. V. 277. P. 115–137.
56. Müller B. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3273–3288.
57. Mähönen A.P., Higuchi M., Törmäkangas K., Miyawaki K., Pischke M.S., Sussman M.R., Helariutta Y., Kakimoto T. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. P. 1116–1122.
58. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 814–819.
59. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 4051–4058.
60. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5149–5159.
61. Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 1808–1818.
62. Caesar K., Thamm A.M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5571–5580.
63. Chen Y.-F., Randlett M.D., Findell J.L., Schaller G.E. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 19861–19866.
64. Grefen C., Städele K., Růžicka K., Obrdlík P., Harter K., Horák J. // *Mol. Plant.* 2008. V. 1. P. 308–320.
65. Mok D.W.S., Mok M.C. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 89–118.
66. Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 85–93.
67. Corbesier L., Prinsen E., Jackmard A., Lejeune P., van Onckelen H., Perilleux C., Bernier G. // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2511–2517.
68. Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 75–83.
69. Higuchi M., Kakimoto T., Mizuno T. // *Plant Hormones: Methods and Protocols.* 2<sup>nd</sup> Ed. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2009. V. 495. P. 101–109.
70. Spíchal L. // *Plant Kinases: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media, 2011. V. 779. P. 139–147.
71. Romanov G.A., Spíchal L., Lomin S.N., Strnad M., Schmülling T. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 129–134.
72. Romanov G.A., Lomin S.N. // *Plant Hormones: Methods and Protocols.* 2<sup>nd</sup> Ed. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2009. V. 495. P. 111–120.
73. Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1053–1062.
74. Ломин С.Н., Романов Г.А. // *Физиология растений.* 2008. Т. 55. С. 283–299.
75. Stolz A., Riefler M., Lomin S.N., Achazi K., Romanov G.A., Schmülling T. // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 157–168.
76. Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1654–1661.
77. Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vankova R., Mok M.C. // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 1374–1380.
78. Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 433–447.
79. Heyl A., Riefler M., Romanov G.A., Schmülling T. // *Eur. J. Cell Biol.* 2012. V. 91. P. 246–256.
80. Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N. // *Development.* 1995. V. 121. P. 53–62.
81. De Leon B.G., Franco Zorrilla J.M., Rubio V., Dahiya P., Paz-Ares J., Leyva A. // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 70–79.
82. Kuroha T., Ueguchi C., Sakakibara H., Satoh S. // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. P. 234–243.
83. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. // *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 183–215.
84. Heyl A., Wulfetange K., Pils B., Nielsen N., Romanov G.A., Schmülling T. // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 62.
85. Franco-Zorrilla J.M., Martin A.C., Solano R., Rubio V., Leyva A., Paz-Ares J. // *Plant J.* 2002. V. 32. P. 353–360.
86. Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F. // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 622–633.
87. Pas J., von Grotthuss M., Wyrwicz L.S., Rychlewski L., Barciszewski J. // *FEBS Lett.* 2004. V. 576. P. 287–290.
88. Wulfetange K., Saenger W., Schmülling T., Heyl A. // *Mol. Biotechnol.* 2011. V. 47. P. 211–219.
89. Hothorn M., Dabi T., Chory J. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. P. 766–768.
90. Muller-Dieckmann H.J., Grantz A.A., Kim S.H. // *Structure.* 1999. V. 7. P. 1547–1556.
91. Pekárová B., Klumpler T., Třísková O., Horák J., Jansen S., Dopitová R., Borkovcová P., Papoušková V., Nejedlá E., Sklenář V., et al. // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 827–839.
92. Zhang Z., Hendrickson W.A. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 400. P. 335–353.
93. Pils B., Heyl A. // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 782–791.
94. Романов Г.А. // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. С. 615–625.
95. Chow B., McCourt P. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 1998–2008.
96. Bishopp A., Mähönen A.P., Helariutta Y. // *Development.* 2006. V. 133. P. 1857–1869.
97. Spartz A.K., Gray W.M. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 2139–2148.
98. Santner A., Calderon-Villalobos L.I.A., Estelle M. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 301–307.
99. Santner A., Estelle M. // *Nature.* 2009. V. 259. P. 1071–1078.
100. Jaillais Y., Chory J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 642–645.
101. Kumari S., van der Hoorn R.A.L. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. P. 480–488.
102. Bleecker A.B. // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 269–274.
103. Gillham N.W. *Organelle Genes Genomes.* New York: Oxford Univ. Press, 1994. 424 p.
104. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. *Миры геномов органелл.* Минск: Тэхналогія, 2003. 495 с.