

УДК 581.1

## СВИДЕТЕЛЬСТВА В ПОЛЬЗУ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНИНОВ КАРТОФЕЛЯ В ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ РЕТИКУЛУМЕ<sup>1</sup>

© 2020 г. С. Н. Ломин<sup>а</sup>, Е. М. Савельева<sup>а</sup>, Д. В. Архипов<sup>а</sup>, Г. А. Романов<sup>а, \*, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276 Россия

\*e-mail: gar@ippras.ru

\*\*e-mail: gromanov@yahoo.com

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.

После доработки 27.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Цитокинины, классические гормоны растений, узнаются клеткой благодаря рецепторам – гибридным сенсорным гистидинкиназам, мультидоменным трансмембранным белкам. Субклеточная локализация рецепторов во многом определяет характер воздействия гормона на клетку, так и путь трансдукции гормонального сигнала до первичных мишеней. Недавно мы клонировали и исследовали семейство рецепторов цитокининов у картофеля *Solanum tuberosum* L. Два типичных представителя этого семейства, рецепторы StНК2а и StНК4b, были отобраны для изучения их субклеточной локализации. Мы провели фракционирование в двухфазной системе суммарных мембран, выделенных из листьев табака, в которых транзистентно экспрессировали отобранные рекомбинантные рецепторы картофеля, соединенные с GFP-репортером. Были получены две мембранные фракции, одна из которых была обогащена эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), другая – плазматической мембраной (ПМ). Содержание StНК2а и StНК4b в каждой из фракций определяли радиолигандным методом. Каждый из рецепторов был выявлен в обеих фракциях, с некоторым перевесом во фракции, обогащенной ЭР (для StНК4b). Поскольку содержание мембран ЭР в клетке значительно превосходит содержание ПМ, основная масса рецепторов должна быть в составе ЭР. Сайты специфического связывания цитокинина были обнаружены и в аналогичных фракциях мембран из корней картофеля. Хотя удельное содержание цитокинин-связывающих сайтов было выше в ПМ, большая часть этих сайтов, т.е. рецепторов в клетке, все же находилась в ЭР. Для того чтобы выяснить, нет ли ограничений функциональной активности у рецепторов в ЭР, был применен недавно предложенный рН-критерий. Согласно этому критерию, рецепторы цитокининов картофеля, как и их ортологи из других видов, настроены на работу в условиях ЭР, но не ПМ. В пользу ЭР свидетельствуют и результаты молекулярного моделирования интерфейса димеризации рецепторов при разных значениях рН. Таким образом, основным местом субклеточной локализации функционально активных цитокининовых рецепторов картофеля является ЭР, хотя существенная доля рецепторов находится и в составе ПМ. При этом вопрос о функциональности рецепторов в ПМ остается открытым.

**Ключевые слова:** рецептор цитокининов, эндоплазматический ретикулум, плазмалемма, апопласт, молекулярное моделирование, рН-критерий, картофель

**DOI:** 10.31857/S0233475520010077

### ВВЕДЕНИЕ

Характер и значимость функционирования белка в эукариотической клетке во многом зависят от клеточного компартмента, в котором локализуется данный белок. Это в полной мере относится к гормональным рецепторам, субклеточная локализация которых определяет сайты инициации гормонального сигналинга и местоположение ак-

тивного пула гормонов. В этой связи становится понятным то повышенное внимание, которое уделяется проблеме субклеточной локализации белков, особенно таких, которые необходимы для сигналинга гормонов.

Мы изучали субклеточную локализацию рецепторов цитокининов картофеля, крупных трансмембранных белков. Цитокинины – это классические гормоны растений, они регулируют множество процессов, таких, как деление клеток, скорость роста побега и корня, развитие хлоро-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.1134/S0233475520010077 для авторизованных пользователей.

пластов, старение листьев, устойчивость к повреждающим факторам и др. [1]. Рецепторы цитокининов представляют собой сенсорные гибридные гистидинкиназы, гомологичные сенсорным гистидинкиназам бактерий так называемой двухкомпонентной системы передачи сигнала [2]. У бактерий эти белки находятся на мембране клетки и воспринимают сигналы из межклеточного пространства. После открытия рецепторов цитокининов в 2000–2001 гг. возникло представление об их локализации на плазматической мембране (ПМ), видимо, по аналогии с бактериальной клеткой [3–6]. В пользу локализации на ПМ также свидетельствовали биоинформатические оценки [7] и отдельные экспериментальные факты [8].

Однако более основательное изучение свойств рецепторов заставило пересмотреть эти представления. Оказалось, что рецепторы активно связывают гормон, т.е. цитокинин, в условиях нейтрального или слабощелочного значения pH, но резко теряют связывающую способность при снижении pH до 5–5.5 [9–11]. Как известно, такие клеточные компоненты, как ядро, эндоплазматический ретикулум (ЭР), цитозоль, характеризуются слабощелочным pH, близким к нейтральному, тогда как внешняя среда клеток (апопласт) обычно закислена до pH 4.5–6 (ссылки в [12]). Это указывает на то, что локализация сенсорного модуля рецептора на внешней стороне ПМ, как предполагали вначале, неблагоприятна для его функционирования из-за сильного закисления внешней среды, тогда как локализация на внутренних мембранах, например ЭР, снимала бы это ограничение. Последующие прямые опыты, выполненные в основном на арабидопсисе, четко указали на нахождение основной массы цитокининовых рецепторов в составе ЭР [13–15]. Аналогичные данные в пользу преимущественной локализации цитокининовых рецепторов на ЭР были получены на растениях других видов: кукурузы [16], риса [17] и яблони [18]. В то же время появилась статья, авторы которой на основании полученного ими экспериментального, хотя и косвенного, материала утверждали, что активные цитокининовые рецепторы локализуются главным образом на ПМ [19]. Хотя эта работа вызвала серьезную критику [12] и до сих пор не получила независимого подтверждения, она характеризует остроту дискуссии о субклеточной локализации рецепторов цитокининов, которая еще далеко не закончена.

В этой связи мы попытались определить субклеточную локализацию рецепторов у нового для таких исследований вида растений, а именно у картофеля. Недавно рецепторы цитокининов картофеля были клонированы и детально охарактеризованы [11], что создало базу для дальнейше-

го изучения этих белков. Все полученные разными методами результаты свидетельствовали в пользу локализации основного пула активных цитокининовых рецепторов картофеля на мембранах ЭР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Плазмидные конструкции.** В работе использованы конструкции для транзientной экспрессии генов рецепторов в листьях табака *Nicotiana benthamiana*, как описано у Lomin *et al.* [11]. Тотальная РНК была получена из растений картофеля сорта Désirée, выращенных *in vitro* на агаризованной среде Мурасиге и Скуга. Эту РНК использовали для синтеза кДНК. Затем на матрице кДНК были амплифицированы кодирующие последовательности генов рецепторов *StHK2a* и *StHK4b*. Для амплификации гена *StHK2a* использовали праймеры 5'-TACAAAAAGCAGGCTTGATGAGCTTTTCTGCTCTGGGTG-3' (*StHK2\_attB1*) и ACAAGAAAGCTGGGTAACCTGACCCGAAGAAG (*StHK2\_attB2*), предполагаемая длина ампликона *StHK2a* – 3823 пн. Для амплификации гена *StHK4b* использовали праймеры ACTAGTATGGGTGAGAAGATGCAAAGCC (*StHK4\_BcuI*) и AGGAATTCCAAGTCTCTTCAGATGGTATC (*StHK4\_EcoRI*), предполагаемая длина ампликона *StHK4* – 2163 пн.

*StHK2a* был встроен с помощью технологии GATEWAY (ThermoScientific) в плазмиду pB7FWG2 [20]. *StHK4b* был встроен в конструкцию pB7FWG2-АНК3 [10] вместо *АНК3* по сайтам рестрикции *BcuI* и *EcoRI*. В полученных конструкциях ген рецептора был на 5'-конце объединен с конститутивным промотором 35S *CaMV*, а на 3'-конце – с геном флуоресцентного белка GFP, причем в случае *StHK4b* – через сохранившийся фрагмент 3'-концевой последовательности *АНК3* длиной 804 пн. Затем полученными плазмидными конструкциями трансформировали агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101.

**Экспрессия генов рецепторов.** Трансформацию листьев табака *N. benthamiana* осуществляли согласно Sparkles *et al.* [21]. Для инфильтрации использовали растения возрастом 8 недель. Инфильтрацию проводили смесью клонов *A. tumefaciens*: клона с плотностью OD600 0.035, несущего ген рецептора, и клона с плотностью OD600 0.05, несущего рекомбинантную плазмиду с геном *p19* [22]. Экспрессию целевых генов детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Листья с выраженной транзientной экспрессией рецепторов использовали для получения мембран. Иммуноблоттинг с антителами против GFP показал, что экспрессируемые рекомбинантные рецепторы обладают массой, близкой к ожидаемой.

**Получение мембранных фракций.** Все операции проводили при 4°C. Мембранные фракции не-трансенного картофеля выделяли из корней и листьев растений сорта Жуковский ранний возрастом 55 дней, выросших в условиях поля. Листья табака (10 г), экспрессирующие рецепторы цитокининов, или органы (корней или листьев) картофеля, растирали с помощью ступки и пестика в 30 мл буфера гомогенизации 100 мМ Трис-HCl pH 7.6, 0.33 М сахарозы, 10 мМ EDTA, 5 мМ метабисульфата калия, 0.6% PVP K30, 5 мМ дитиотреитола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. Полученный гомогенат фильтровали через ткань Miracloth (Calbiochem®). Фильтрат центрифугировали при 10000 g 10 мин, удаляя клеточный дебрис и крупные органеллы. Супернатант далее центрифугировали при 100000 g 30 мин. Последний супернатант удаляли, а осадок мембран тщательно ресуспендировали с помощью стеклянного гомогенизатора до отдельных везикул в фазовом буфере 5 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7.8, 0.33 М сахарозы, 3 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA. Аналогично выделяли суммарные мембраны из листьев и корней картофеля. Фракционирование мембран осуществляли в водной полимерной двухфазной системе на основе декстрана 500000 и PEG 3350. Разделение проводили в 36 г раствора при равной концентрации полимеров 7.2% в/в для листьев табака и 6.6% в/в для корней и листьев картофеля. Для этого соответственно 2.59 г или 2.38 г декстрана 500000 и PEG 3350 смешивали с фазовым буфером до общей массы 27 г. Затем к полученной смеси добавляли 9 г суспензии тотальных мембран в фазовом буфере. Полученную смесь перемешивали и разделяли фазы центрифугированием при 3000 g 10 мин в бакет-ротаторе. Далее верхнюю фазу объемом около 18 мл, обогащенную ПМ, переносили в новую пробирку, содержащую 1.224 г  $KH_2PO_4$  и 0.784 г  $K_2HPO_4$ . После растворения солей в содержимом верхней фазы смесь центрифугировали при 3000 g 10 мин в бакет-ротаторе. При этом смесь разделялась на две фазы, а мембраны перемещались в интерфазу. Содержимое интерфазы переносили в новую пробирку и разбавляли 30 мл фазового буфера. 2 мл нижней фазы, содержащей все внутриклеточные мембраны, переносили в новую пробирку и разбавляли 30 мл фазового буфера. Затем полученные смеси центрифугировали повторно при 100000 g 30 мин. Полученные осадки ресуспендировали в 0.5 мл раствора 50 мМ KCl и 10% глицерина. Определяли содержание белка по методу Брэдфорд.

**Анализ гомогенности мембранных фракций.** Степень гомогенности мембранных фракций проверяли с помощью иммуноблотинга с антителами против белков-маркеров мембран. Маркером ПМ была плазмалеммная  $H^+$ -АТФ-аза, мар-

кером ЭР – белок-шаперон BiP. Мембраны в количестве 7 мкг тотального белка каждой фракции смешивали с буфером нанесения на гель. Образец инкубировали в течение часа при 37°C, затем наносили на 10% полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия (SDS). После электрофореза белки из геля переносили на мембрану из поливинилиденфторида. После этого проводили иммуноблотинг с первичными кроличьими поликлональными антителами против плазмалеммной  $H^+$ -АТФ-азы (Agrisera, AS07 260) при разведении 1 : 600, против BiP (Agrisera, AS09 481) при разведении 1 : 1000 и против GFP (Agrisera, AS15 2987) при разведении 1 : 5000. Инкубацию с антителами проводили в течение 2 ч в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 5% обезжиренного сухого молока. Прочно связанные первичные антитела “проявляли” вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Millipore, AP132P), в разведении 1 : 30000 в буфере PBS с 5% обезжиренного сухого молока. Активность пероксидазы выявляли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad). Люминесценцию детектировали с применением рентгеновской фотопленки CL-XPosure™ Film (ThermoScientific).

**Детектирование рецепторов в мембранных фракциях.** Рецепторы в мембранных фракциях детектировали по связыванию меченного тритием изопентениладенина ( $[^3H]iP$ , 17.4 Ки/ммоль) [10, 23]. Реакцию проводили в 0.75 мл PBS с  $[^3H]iP$  в концентрации 2.6 нМ (2 пмоль на пробу) с суспензией мембран (25 мкг тотального белка) при температуре 4°C в течение часа. Затем мембраны осаждали при 16000 g в течение 20 мин. Супернатант удаляли, а связанный с мембранами  $[^3H]iP$  экстрагировали в 200 мкл этанола в течение 16 ч. Затем экстракт смешивали со сцинтилляционной жидкостью и определяли радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Для определения неспецифического связывания инкубацию с  $[^3H]iP$  проводили в присутствии большого избытка (10 мкМ) немеченого iP. Специфическое связывание определяли количественно по разнице между тотальным и неспецифическим связыванием. Анализ влияния pH на связывание гормона рецептором был выполнен, как описано ранее [10, 11].

**Молекулярное моделирование структуры и взаимодействия сенсорных модулей рецепторов.** Молекулярное моделирование белковых структур по гомологии проводили в программе Modeller 9.20 [24] с использованием класса automodel. Шаблоном для моделирования служила кристаллическая структура сенсорного модуля цитокининового рецептора ANK4 (PDB ID: 3T4L) [25]. После

добавления атомов водорода, структуры были минимизированы в программе USCF Chimera 1.13.1 [26] в силовом поле AMBER ff14SB [27]. Стереохимическую достоверность и качество упаковки моделей проверяли в программе ProCheck [28]. Для изучения комплементарности интерфейсов по гидрофобности и электростатическому потенциалу в программе MolSurfer были получены 2D проекции интерфейсов [29] с использованием PQR-файлов, подготовленных с помощью сервера PDB2PQR [30], при различных значениях pH для симуляции среды, характерной для апопласта и ЭР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В тетраплоидном картофеле сорта Désirée ранее мы идентифицировали шесть рецепторов цитокининов: StНК2a, StНК2b, StНК3a, StНК3b, StНК4a и StНК4b [11]. Целью нашей работы было установить субклеточную локализацию рецепторов цитокининов картофеля на примере белков StНК2a и StНК4b. В каждой паре паралогов (a и b) рецепторы очень похожи друг на друга. Поэтому мы ограничились характеристикой одного представителя из каждой из этих двух групп. Что касается рецепторов группы StНК3, то при экспрессии в гетерологичных системах возникли проблемы с детекцией связывания лиганда. Гены анализируемых рецепторов были соединены в векторе с геном флуоресцентного белка GFP, что позволило оценивать экспрессию таких рекомбинантных рецепторов по уровню флуоресценции. Гены рецепторов были транзигентно экспрессированы в листьях табака *N. benthamiana*. На пятый день после инокуляции листьев соответствующим клоном *A. tumefaciens* проводили оценку уровня экспрессии с помощью флуоресцентной микроскопии. Затем из экспрессирующих листьев выделяли суммарную фракцию мембран с помощью дифференциального центрифугирования. Мембраны представляли собой осадок микросом, полученный в результате центрифугирования при 100 000 g. Выделенные микросомы разделяли на фракции, предположительно обогащенные ПМ или внутриклеточными мембранами, с помощью двухфазной полимерной водной системы декстран–полиэтиленгликоль [31]. После этого мембраны концентрировали путем вторичного ультрацентрифугирования. По общему количеству в пересчете на тотальный белок фракция, соответствующая внутриклеточным мембранам, преобладала над фракцией ПМ в среднем в 10–15 раз. Степень фактического обогащения фракций мембранами ПМ и ЭР определяли с помощью иммуноблотинга с антителами против плазмалеммной H<sup>+</sup>-АТФ-азы и белка-шаперона BiP, резидента ЭР. Согласно иммуноблотингу,

плазмалеммная H<sup>+</sup>-АТФ-аза ожидаемо преобладала в верхней фракции, а BiP – в нижней (рис. 1). По нашим оценкам, во фракциях, обогащенных ПМ, содержание H<sup>+</sup>-АТФ-азы превышало такое во фракции внутриклеточных мембран в 3.1 и 2.4 раза в опытах с рецепторами StНК2a и StНК4b соответственно, тогда как во фракциях, обогащенных внутриклеточными мембранами, преобладало содержание маркера BiP (в 3.7 и 2.7 раза в опытах с рецепторами StНК2a и StНК4b соответственно). Наличие цитокининовых рецепторов в мембранных фракциях оценивали по уровню специфического связывания с меченым тритием изопентениладенином. Присутствием эндогенных рецепторов табака можно было пренебречь, так как их специфическое связывание не превышало 5% от общего уровня специфически связанной метки [10]. Тестируемые рецепторы картофеля были обнаружены в обеих фракциях мембран (рис. 1). В случае рецептора StНК2a его удельное содержание (в расчете на 1 мкг белка) во фракциях было примерно равным, тогда как содержание StНК4b было заметно выше в ЭР, чем в ПМ. Известно, что основная масса внутренних мембран клетки относится к мембранам ЭР, поэтому было естественно ожидать присутствия рецепторов именно в ретикулуме. На это же указывали ранее полученные данные конфокальной микроскопии и сахарозных градиентов для рецепторов арабидопсиса [13–15], кукурузы [16], риса [17] и яблони [18]. По-видимому, оба рецептора присутствуют как в ЭР, так и в ПМ, с несколько более высоким удельным содержанием StНК4b в ЭР. Однако, поскольку внутренние мембраны (т.е. ЭР) в общем пуле микросом преобладают [32], то получается, что основная масса рецепторов цитокининов картофеля находится на мембранах ЭР (см. Приложение на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)).

Следует отметить, что эктопическая экспрессия рецепторов при участии конститутивного промотора в принципе может приводить к артефактной избыточной локализации рецепторов в ЭР. Чтобы проверить эту возможность, мы провели аналогичное двухфазное разделение нативных мембран, выделенных из нетрансгенных зрелых растений тетраплоидного картофеля (сорт Жуковский ранний). Содержание рецепторов в полученных фракциях определяли количественно по связыванию меченого цитокинина [<sup>3</sup>H]iP. Специфическое связывание метки, характеризующее присутствие эндогенных рецепторов цитокининов, достоверно проявилось у микросом корней, но не листьев (рис. 2). Это качественно соответствовало данным о низком уровне специфического связывания цитокинина микросомами из листьев интактных растений табака ([10], данная работа) и кукурузы [16], причем в послед-

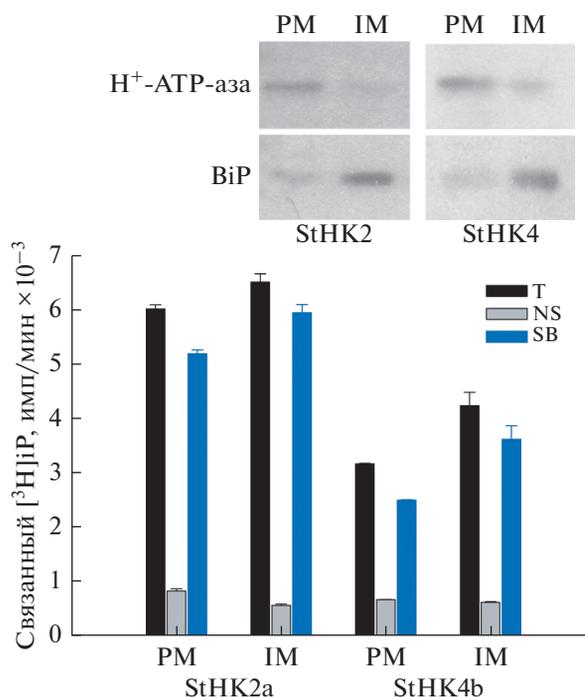
нем случае наблюдалось высокое специфическое связывание меченого цитокина мембранами корней, в отличие от листьев.

Результаты количественных определений связывания [<sup>3</sup>H]iP мембранами корней картофеля представлены на рис. 2. Из рисунка следует, что эндогенные рецепторы картофеля локализируются на мембранах обеих фракций, причем удельное связывание гормона фракцией ПМ в 1.8 раза выше, чем фракцией ЭР. Однако расчеты, сделанные с учетом степени гомогенности (чистоты) полученных фракций и соотношения их количеств, привели к выводу, что большая часть рецепторов цитокининов в клетках корней картофеля все же находится в составе ЭР (см. Приложение на сайте www.elibrary.ru). Таким образом, данные на основе интактных корней картофеля качественно вполне соответствуют результатам, полученным при транзientной экспрессии рецепторов картофеля в листьях табака.

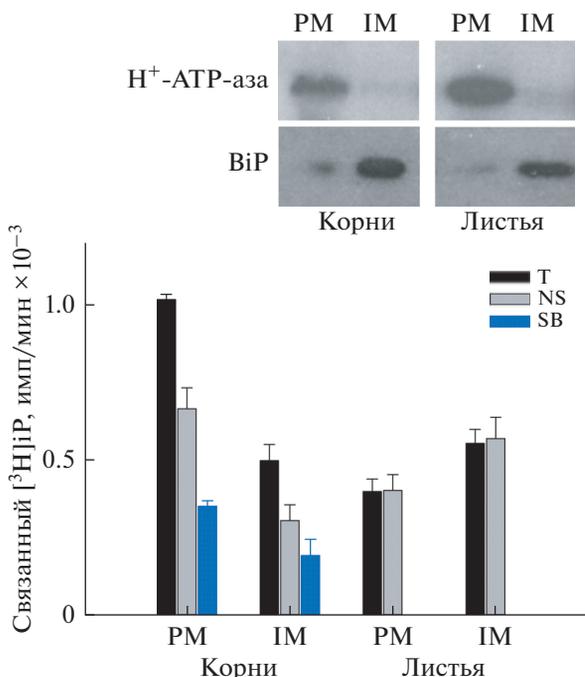
Присутствие белка в том или ином компартменте клетки не означает, что он функционирует в этом же компартменте. Особенно это относится к ЭР, через который проходят практически все трансмембранные белки, направляемые затем в разные мембраны клетки. В работе [33] показано, что белок липаза липопротеинов действительно аккумулируется (на 95%) в ЭР и не проявляет там ферментативной активности. Эта липаза активируется лишь после секреции во внеклеточное пространство. В этой связи нельзя исключить того, что цитокининовые рецепторы активны только в составе ПМ, тогда как в составе ЭР они представляют собой некий резервный пул инертных белков.

В случае локализации рецептора на ПМ естественно ожидать, что сенсорный модуль рецептора находится вне клетки, тогда как каталитический и ресиверный (принимающий фосфат и передающий его на фосфотрансмиттер) модули – в цитозоле. Иная топология рецептора не позволит ему выполнять свои функции как инициатора сигналинга фитогормона. Для выполнения той же сигнальной функции в ЭР рецепторы должны быть ориентированы таким образом, чтобы сенсорный модуль выступал в люмен ЭР, а остальная часть рецептора пребывала в цитозоле. Именно такая топология рецептора цитокина в ЭР была подтверждена экспериментально на примере АНК3 [15].

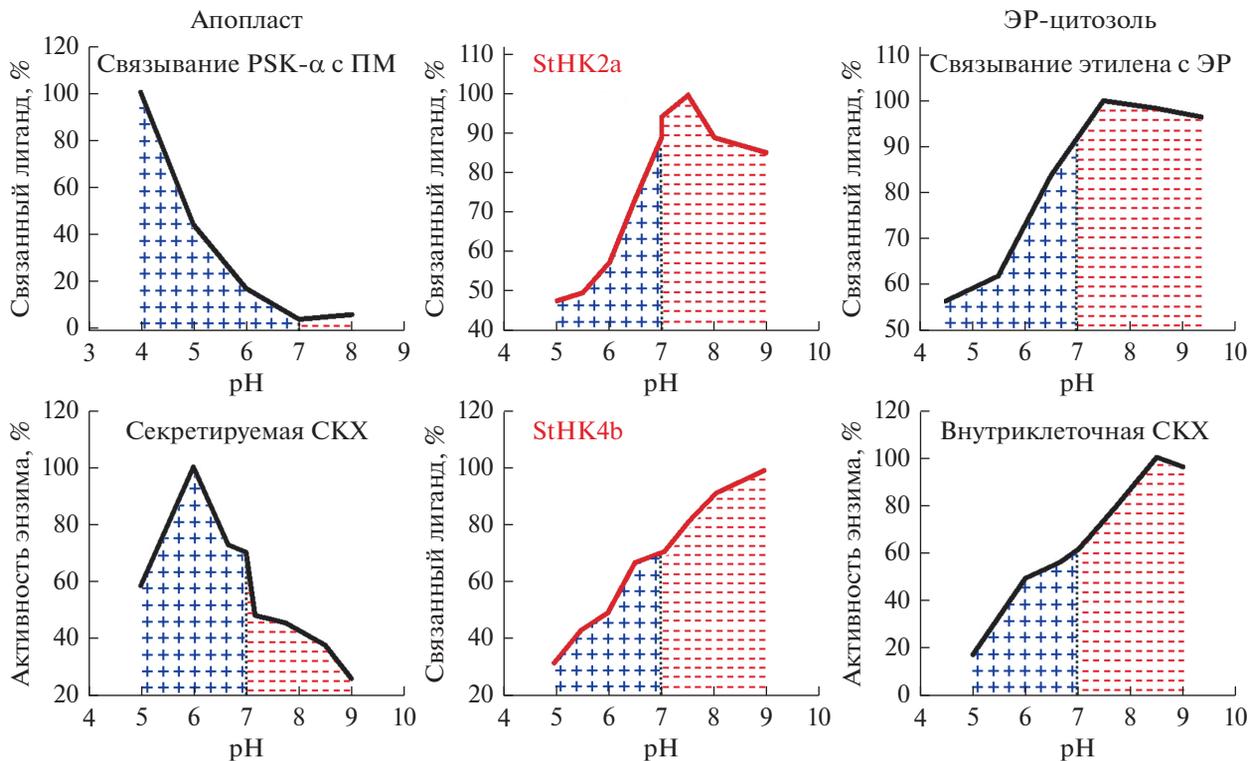
Таким образом, в зависимости от локализации рецептора его сенсорный модуль может находиться либо в кислом растворе апопласта, либо в слабощелочном содержимом ЭР. Рассматриваемые компартменты (ПМ и ЭР) сильно различаются по значениям pH омывающей среды. Поэтому для выбора компартмента функционирова-



**Рис. 1.** Связывание меченого цитокина [<sup>3</sup>H]iP фракциями мембран табака *N. benthamiana* в результате экспрессии рецепторов цитокининов картофеля StHK2a и StHK4b. T, NS и SB обозначают тотальное, неспецифическое и специфическое связывание, соответственно; PM – плазматическая мембрана; IM – внутриклеточные мембраны. Вверху показано распределение специфических маркеров ПМ (H<sup>+</sup>-АТФ-аза) и ЭР (BiP) в полученных фракциях мембран.



**Рис. 2.** Связывание меченого цитокина [<sup>3</sup>H]iP фракциями мембран из корней и листьев зрелых растений картофеля. Обозначения те же, что на рис. 1.

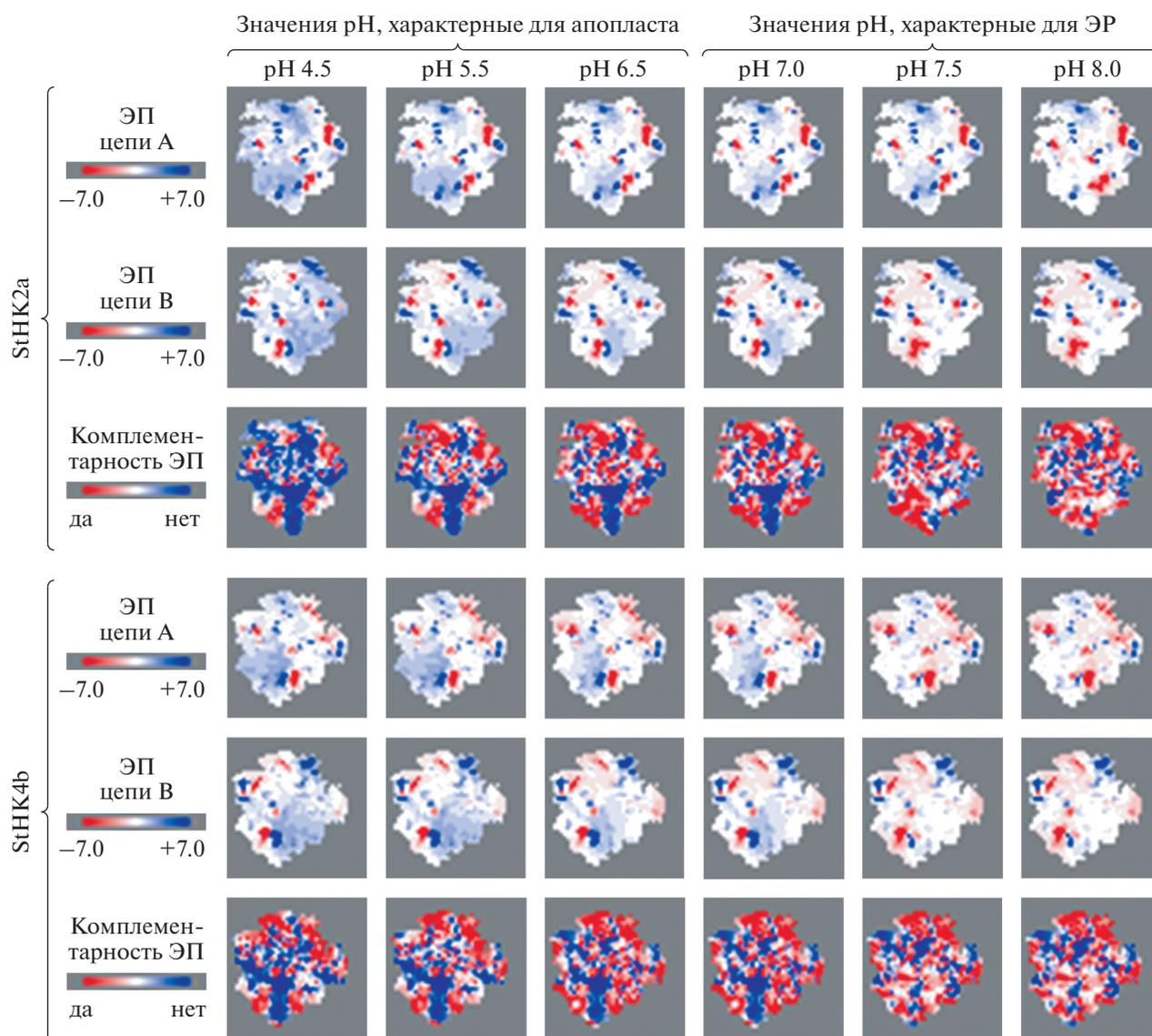


**Рис. 3.** Кривые pH-зависимости активности белков: в левой колонке – примеры типичных белков, функционирующих в кислой среде апопласта; в правой колонке – типичных белков, функционирующих в слабощелочной среде внутри клетки. PSK- $\alpha$  – фитосульфоксин- $\alpha$ , дисульфатированный пентапептид; ПМ – плазматическая мембрана; СКХ – цитокининоксидаза/дегидрогеназа. Очевидно подобие кривых pH-зависимости активности изучаемых цитокининовых рецепторов картофеля (средняя колонка) аналогичным кривым правой колонки и явное несходство с ходом кривых левой колонки. Соотношение ограниченных кривой pH областей выше/ниже pH 7 на графиках смещено в сторону кислых pH (плюсы) у белков, функционирующих на ПМ и в апопласте, а у белков, функционирующих в ЭР, в том числе у испытуемых рецепторов, смещено, наоборот, в сторону щелочных pH (минусы). Обоснование pH-критерия дано в статье [12].

ния рецепторов картофеля можно применить предложенный недавно pH-критерий [12]. В отличие от прямых методов, позволяющих выявлять физическое присутствие изучаемого белка в том или ином компартменте клетки, pH-критерий дает основание для выбора компартмента, где белок реально функционирует. Это следует из того установленного факта, что практически у всех белков pH-оптимум активности коррелирует с типичными диапазонами pH среды, в которой белок осуществляет свою функцию. Так, для апопласта максимальная активность белков приходится на значения pH в районе 4.5–6 (в основном  $5.4 \pm 0.5$ ). Что касается белков, функционирующих внутри клетки (в частности, в ЭР), то здесь пик их активности приходится на pH в интервале 7–8 (в среднем  $7.8 \pm 0.8$ ). Дополнительным критерием служит соотношение площадей под графиками pH-зависимостей (заштрихованы на рис. 3) в щелочной и в кислой областях pH на графиках pH-зависимости связывания. Это простой, но

четкий и наглядный критерий, который ранее уже был применен к рецепторам цитокининов арабидопсиса и кукурузы [12]. Рисунок 3 показывает, что рецепторы картофеля не стали исключением и полностью отвечают критериям функционирования внутри клетки, в компартментах со слабощелочным pH. Для StHK2a максимум активности наблюдался при pH 7.5, а для StHK4b – при pH 9.0, причем в последнем случае пик активности, возможно, еще не был достигнут. Соотношение площадей под графиками pH-зависимостей также полностью соответствует белкам, функционирующим в слабощелочной среде, характерной для цитозоля, ядер и ЭР. На основе всех этих результатов можно заключить, что изучаемые рецепторы картофеля настроены на работу внутри клетки, точнее – в ЭР.

Еще одним pH-зависимым критерием может служить способность рецепторов образовывать совершенные димеры, которые, как полагают [34], необходимы для их нормального функцио-



**Рис. 4.** Визуализация комплементарности взаимодействующих поверхностей сенсорных модулей гомодимеров рецепторов цитокининов картофеля, при имитации разных рН среды. ЭП – электростатический потенциал, определен для областей димеризации каждого из изучаемых рецепторов (ряды 1–2 и 4–5). Третий и шестой ряды демонстрируют зоны комплементарности, рассчитанные на основе сопоставления электростатических паттернов областей контакта гомодимеров рецептора. В этих рядах зоны электростатической комплементарности отмечены красным цветом, а некомплементарности – синим.

нирования. Одна из областей димеризации расположена на сенсорном модуле рецептора. Эта область высококонсервативна, что позволяет паралограм рецепторов образовывать как гомо-, так и гетеродимеры [15]. Ранее с применением методов молекулярного моделирования нами были построены модели 3D-структур рецепторов картофеля [11], в том числе сенсорных модулей в форме мономеров и димеров. Здесь мы попытались оценить с помощью специализированных биоинформатических программ, как влияет рН среды на характеристики димеризационного интерфейса рецепторов.

Расчеты, проведенные с помощью программы Molsurfer, показали, что электростатическая комплементарность поверхностей интерфейса сенсорных модулей рецепторов высока в растворах с рН выше 7 (что характерно для ЭР), но существенно уменьшается при закислении среды ниже рН 7 (что характерно для апопласта) (рис. 4). Степень комплементарности поверхностей интерфейса положительно коррелирует с прочностью образованных димеров, поэтому полученные результаты моделирования также свидетельствуют в пользу функционирования рецепторов цитокининов картофеля в форме димеров в со-

ставе ЭР. Эти результаты соответствуют аналогичным данным для рецептора АНК3 арабидопсиса [35].

В целом, проведенное исследование с белками картофеля подтвердило наличие и возможность функционирования рецепторов цитокининов в составе ЭР. Хотя транзистентную экспрессию рецепторов проводили в листьях другого растения, а именно табака, тем не менее, среду нахождения экспрессируемых рецепторов нельзя считать чужеродной, так как табак является близким родственником картофеля (виды одного семейства пасленовых). Маловероятно, что транспортные системы клетки не справились со своевременной транспортировкой из ЭР рекомбинантного белка из-за его сверхвысокой продукции при временной трансфекции. При экспрессии в аналогичных условиях гомологичной гистидинкиназы АНК1 последняя успевала за считанные дни практически полностью встроиться в ПМ, место своей окончательной субклеточной локализации [13]. Опыты с фракционированием собственных мембран из корней картофеля полностью подтвердили присутствие цитокининовых рецепторов как в ПМ, так и в ЭР. Хотя плотность рецепторов в ПМ оказалась в 1.8 раза выше, чем в ЭР, большая часть общего количества рецепторов в клетках, согласно расчетам (см. Приложение на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)), все же находилась в составе ЭР. Отсутствие специфического связывания цитокинина мембранами листьев можно объяснить не только низким уровнем экспрессии рецепторов, но и тем, что в листьях превалирует StНК3 [11], который, в отличие от других рецепторов, при выделении мембран может терять способность связывать лиганд.

Проведенные ранее исследования [12] свидетельствуют о том, что основной пул активных рецепторов находится внутри клетки, на мембранах ЭР. Это указывает на важность внутриклеточного пула цитокининов для осуществления сигналинга этих фитогормонов. Особая роль в сигналинге цитокининов может принадлежать рецепторам, расположенным в непосредственной близости к ядру клетки [12, 14, 15]. Однако данная закономерность вовсе не исключает наличия определенной части рецепторов и в составе других мембран клетки, в первую очередь в ПМ, откуда они также могут посылать сигналы внутрь клетки. В этой связи особую значимость приобретают системы транспорта, активации и метаболизации цитокининов, от которых может зависеть соотношение их активных форм в люменах ЭР и в апопласте.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, проект № 17-74-20181.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kieber J.J., Schaller G.E. 2014. Cytokinins. *Arabidopsis Book*. **12**, e0168.
2. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2012. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*. **4** (3), 31–45.
3. Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev*. **14** (23), 2938–2943.
4. Романов Г.А. 2002. Рецепторы фитогормонов. *Физиология растений*. **49** (4), 615–625.
5. Kakimoto T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev. Plant Biol.* **54**, 605–627.
6. Ferreira F.J., Kieber J.J. 2005. Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8** (5), 518–525.
7. Ueguchi C., Sato S., Kato T., Tabata S. 2001. The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42** (7), 751–755.
8. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103** (3), 814–819.
9. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. 2006. 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.* **57** (15), 4051–4058.
10. Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Arkhipov D.V., Osolodkin D.I., Schmölling T., Romanov G.A. 2015. Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J. Exp. Bot.* **66** (7), 1851–1863.
11. Lomin S.N., Myakushina Y.A., Kolachevskaya O.O., Getman I.A., Arkhipov D.V., Savelieva E.M., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2018. Cytokinin perception in potato: New features of canonical players. *J. Exp. Bot.* **69** (16), 3839–3853.
12. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. 2018. Cytokinin signaling: From the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol.* **218** (1), 41–53.
13. Caesar K., Thamm A.M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K. 2011. Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **62** (15), 5571–5580.
14. Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmölling T. 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **156** (4), 1808–1818.
15. Lomin S.N., Myakushina Y.A., Arkhipov D.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Schmölling T., Romanov G.A. 2018. Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Func. Plant Biol.* **45** (1–2), 192–202.

16. Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. 2011. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J. Exp. Bot.* **62** (14), 5149–5159.
17. Ding W., Tong H., Zheng W., Ye J., Pan Z., Zhang B., Zhu S. 2017. Isolation, characterization and transcriptome analysis of a cytokinin receptor mutant OsCKT1 in rice. *Front. Plant Sci.* **8**, 88.
18. Daudu D., Allion E., Liesecke F., Papon N., Courdavault V., Dugé de Bernonville T., Mélin C., Oudin A., Clastre M., Lanoue A., Courtois M., Pichon O., Giron D., Carpin S., Giglioli-Guivarc'h N., Crèche J., Besseau S., Glévarec G. 2017. CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: From a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front. Plant Sci.* **8**, 1614.
19. Zürcher E., Liu J., di Donato M., Geisler M., Müller B. 2016. Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*. **353** (6303), 1027–1030.
20. Karimi M., Bleys A., Vanderhaeghen R., Hilson P. 2007. Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol.* **145** (4), 1183–1191.
21. Sparkes I.A., Runions J., Kearns A., Hawes C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* **1** (4), 2019–2025.
22. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33** (5), 949–956.
23. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф., Ломин С.Н., Романов Г.А. 2015. Синтез меченного тритием и дейтерием изопентениладенина. *Радиохимия*. **57** (1), 94–96.
24. Sali A., Blundell T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234** (3), 779–815.
25. Hothorn M., Dabi T., Chory J. 2011. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7** (11), 766–768.
26. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25** (13), 1605–1612.
27. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C. 2015. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11** (8), 3696–3713.
28. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. 1993. TI – PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **26** (2), 283–291.
29. Gabdoulline R.R., Wade R.C., Walther D. 2003. MolSurfer: A macromolecular interface navigator. *Nucl. Acids Res.* **31** (13), 3349–3351.
30. Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A. 2004. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucl. Acids Res.* **32**, W665–W667.
31. Трофимова М.С., Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Ломин С.Н. 2012. Получение плазмалеммы методом разделения микросомальных мембран в водной двухфазной полимерной системе. В сб. *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*. М.: БИНОМ, с. 456–466.
32. Morrè D.J., Brightman A.O., Sandelius A.S. 1987. Membrane fractions from plant cells. In: *Biological Membranes: A Practical Approach*. Eds Findlay J.B.C., Evans W.H., Washington, DC: IRL Press, p. 37–68.
33. Scow R.O., Schultz C.J., Park J.W., Blanchette-Mackie E.J. 1998. Combined lipase deficiency (*cld/cld*) in mice affects differently post-translational processing of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase. *Chem. Phys. Lipids*. **93** (1–2), 149–155.
34. Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B. 2002. Histidine protein kinases: Key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3** (10), REVIEWS3013.
35. Arkhipov D.V., Lomin S.N., Myakushina Yu.A., Savelieva E.M., Osolodkin D.I., Romanov G.A. 2019. Modeling of protein-protein interactions in cytokinin signal transduction. *Intern. J. Mol. Sciences*, **20** (9), 2096.

## Evidences for Preferential Localization of Cytokinin Receptors of Potato in the Endoplasmic Reticulum

S. N. Lomin<sup>1</sup>, E. M. Savelieva<sup>1</sup>, D. V. Arkhipov<sup>1</sup>, G. A. Romanov<sup>1, \*, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

\*e-mail: gar@ippras.ru

\*\*e-mail: gromanov@yahoo.com

Cytokinins, classical plant hormones, are recognized by the cell through receptors – hybrid sensor histidine kinases, multidomain transmembrane proteins. The character of the hormonal effect on the cell and the mode of the hormonal signal transduction to the primary targets depends on the subcellular localization of the receptors. Recently, we cloned and investigated a family of cytokinin receptors from a new model plant, potato *Solanum tuberosum* L. Two typical representatives of this family, StHK2a and StHK4b, were selected to study their subcellular localization. In the current study, total membranes isolated from tobacco leaves were

fractionated by aqueous two phase partitioning, in which the selected recombinant potato receptors fused to GFP-reporter were transiently expressed. Two membrane fractions were obtained, one tentatively enriched with endoplasmic reticulum (ER) membranes and the other, with plasma membrane (PM). The content of StHK2a and StHK4b in each fraction was determined by the radioligand method. Both receptors were detected in the two fractions, with a slight predominance of StHK4b in the ER fraction. Given that the content of ER membranes in the cell is markedly higher than the content of PM, the bulk of the receptors should be attributed to the ER. Specific cytokinin-binding sites were detected in the analogous membrane fractions from potato roots. Although the specific content of the cytokinin-binding sites was 1.8-fold higher in the PM, the main part of these sites, i.e., cellular receptors, still resided in the ER. In order to find out whether the receptors in the ER are functional, a recently proposed pH criterion was applied. According to this criterion, potato cytokinin receptors, like their orthologs from other species, seem to be tuned for functioning in ER but not in PM. The results of molecular modeling of the dimerization interface of the receptors at different pH values also evidenced in favor of the ER. Thus, the main site of subcellular localization of the functionally active potato cytokinin receptors is the ER, although a certain amount of the receptors resides within the PM, too. The question of the functional role of PM-located receptors remains open.

**Keywords:** cytokinin receptor, endoplasmic reticulum, plasma membrane, apoplast, molecular modeling, pH criterion, potato