

# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

## ОБНАРУЖЕНИЕ АБК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В ЦИАНОБАКТЕРИЯХ (*SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803*)\*

Г.В. Шевченко, Н.Н. Каравайко, А.В. Демиденко,  
С.Ю. Селиванкина, Н.К. Зубкова, Е.В. Куприянова,  
Д.А. Лось, В.В. Кузнецов, О.Н. Кулаева

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН  
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

Работа посвящена изучению эволюции гормональной системы растений, в частности, обнаружению в цианобактериях, которые рассматриваются в качестве предшественников хлоропластов, компонентов регуляторной системы абсцизовой кислоты (АБК). С помощью аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованной АБК были выделены из лизата цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803* АБК-связывающие белки (АСБ) с молекулярными массами 23, 50, 60 и 67 кДа, которые взаимодействовали с антиидиотипическими антителами, полученными к АБК. АСБ активировали транскрипцию *in vitro* в транскрипционной системе цианобактерии. Это позволяет предполагать, что элементы гормональной системы растений, связанные с АБК, могли быть привнесены в эукариотическую клетку цианобактериями.

**Ключевые слова:** гормональная система растений, регуляторная система абсцизовой кислоты (АБК), цианобактерии, АБК-связывающие белки, транскрипция.

Согласно современным представлениям, хлоропласты произошли от древних фотосинтезирующих цианобактерий, претерпевших в эукариотической клетке в ходе эволюции множество серьезных изменений [1]. 95% генов бывших цианобактерий были перенесены в ядерный геном или утеряны в ходе эволюции. Установились сложные ядерно-пластидные взаимоотношения, которые определяют не только развитие фотосинтетического аппарата, но и всей растительной клетки.

Хлоропласты оказались под воздействием различных регуляторных систем высших растений и, прежде всего, под влиянием гормональной системы; из фитогормонов наибольшее влияние на развитие хлоропластов оказывают цитокинины и абсцизовая кислота (АБК). Цитокинины активируют накопление многих пептидов тилакоидных мембран хлоропластов, как пластидного, так и ядерного кодирования [2], осуществляя свое действие в том числе и на уровне транскрипции [3]. В хлоропластах обнаружены различные природные цитокинины [4].

\* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 08-04-00739), а также гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-915.2008.4).

Большой интерес представляет выделение авторами данной статьи хлоропластного цитокинин-связывающего белка, который гормон-зависимым способом регулирует транскрипцию в условиях *in vitro* [5]. Несмотря на большие различия между цианобактериями и хлоропластами, они имеют значительное сходство, что относится, прежде всего, к консервативной структуре генов, их регуляторных элементов, организации генов в опероны, процессу трансляции, липидному составу и т.д. [1]. В связи с этим возникает вопрос: не участвуют ли фитогормоны в регуляции физиологических процессов не только в пластидах, но и в цианобактериях? В этом отношении представляют большой интерес наши результаты, которые показали, что цитокинин-транс-зеатин ( $10^{-9}$ — $10^{-5}$  М) влиял на синтез РНК *in vitro* в транскрипционной системе цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 [6]. Эти данные позволили предположить, что у цианобактерий существует система восприятия цитокининового сигнала, которая, возможно, могла быть привнесена в растительную клетку.

Абсцизовая кислота является антагонистом цитокининов и подавляет биогенез хлоропластов [2].

В последние годы идет активное изучение механизма действия АБК на высших растениях: изучены пути биосинтеза АБК, выяснена ее функция во многих физиологических процессах, обнаружено множество АБК-регулируемых генов, несколько АБК-связывающих белков, однако признанный всеми рецептор абсцизовой кислоты пока не выделен [7; 8].

Несмотря на большой прогресс в изучении механизма действия абсцизовой кислоты, отсутствуют какие-либо данные о влиянии АБК на цианобактерии и абсолютно не исследован вопрос об эволюции сигналинга АБК.

В связи с этим задача работы заключалась в выяснении возможности существования в цианобактериях отдельных компонентов регуляторной системы абсцизовой кислоты. Прежде всего нас интересовало наличие в *Synechocystis* АБК-связывающих белков, а также, в случае их обнаружения, выяснение их возможной биологической роли. Данная работа направлена на исследование эволюции гормональной системы высших растений.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803, полученный от проф. В.В. Зинченко (кафедра генетики МГУ). Цианобактерии культивировали фотоавтотрофно в стерильных условиях на среде BG11, содержащей 20 мМ Нерес-NaOH, pH 7,5, при температуре 34 °С, при постоянном освещении 70 мкмоль квантов света  $m^{-2}s^{-1}$  и барботировании газо-воздушной смесью, содержащей 2% CO<sub>2</sub>.

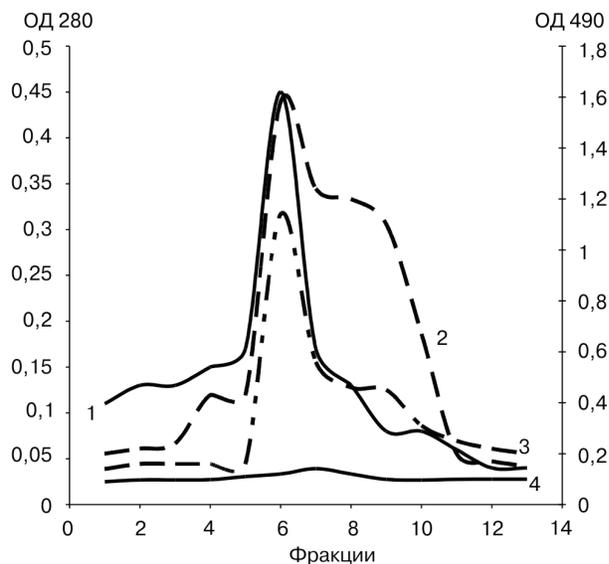
После трех дней культивирования в указанной среде клетки цианобактерий отделяли от культуральной среды центрифугированием при 15 500 g на центрифуге 5810R (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин. После центрифугирования осадок промывали в среде, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl и 4 мМ 2-меркаптоэтанола. Затем клетки разрушали с помощью стеклянных бус (G4649, «Sigma», США) и центрифугировали при 150 000 g в течение 90 мин при 4 °С. Белки полученной водорастворимой фракции очищали с помощью гидрофобной хроматографии на колонке с фенил-сефарозой CL-4В («Pharmacia», Швеция). АБК-связывающие белки (АСБ) выделяли из водорастворимой фракции лизированных клеток цианобактерий, используя многоступен-

чатый процесс, включающий аффинную хроматографию на сефарозе с иммобилизированной АБК.

После отмывки колонки от неспецифически связавшихся белков элюировали АСБ 0,2 N NaOH со скоростью 30 мл/час, раствор белков собирали в 6 мл фракции. Элюцию белков с колонки контролировали с помощью спектрофотометра Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Швеция) при длине волны 280 нм (рис. 1, линия 1).

После нейтрализации полученного раствора белки осаждали пятикратным объемом 80% охлажденного ацетона, содержащего 2% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), и осадок трижды промывали охлажденным 80% ацетоном. Разделение белков проводили электрофорезом в денатурирующих условиях в системе Laemmly в 10% полиакриламидном геле (ПААГ). Идентифицировали АСБ после переноса на нитроцеллюлозную мембрану с помощью антиидиотипических антител (АТ<sub>а-и</sub>) к АБК, фактически являющихся антителами к сайту связывания гормона. Активность РНК-полимеразы цианобактерии определяли *in vitro* в предварительно оптимизированной реакционной среде [6] объемом 100 мкл, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и по 0,2 мМ АТФ, ЦТФ и ГТФ.

В реакционную среду добавляли лизат цианобактерии, содержащий 10 мкг ДНК. В качестве меченого предшественника использовали <sup>3</sup>H-УТФ (1,28 ТБк/мМ, 10 мкМ). Реакцию проводили при 25 °С в течение 25 мин. и останавливали добавлением 100 мкл холодной 10% ТХУ, содержащей 0,9% пирофосфата натрия. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике фирмы «LKB» (Швеция).



**Рис. 1.** Профиль элюции белков водорастворимой фракции лизата цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 с АБК-сефарозы (ОД 280) и взаимодействие их с антителами в системе твердофазного ИФА (ОД 490):

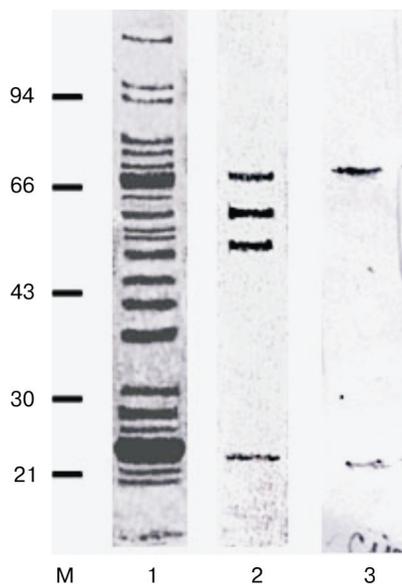
ОД — оптическая плотность при указанной длине волны (нм); 1 — элюция белков с АБК-сефарозы 0,2 N раствором NaOH; 2 — взаимодействие элюированных белков с поликлональными антителами к СР2.1; 3 — взаимодействие элюированных белков с АТ<sub>а-и</sub> к АБК; 4 — контроль (неимунная сыворотка)

**Результаты и обсуждение.** АСБ, выделенные из водорастворимой фракции лизата клеток *Synechocystis*, фракционировали по 6 мл; присутствие АСБ в каждой фракции определялось с помощью антиидиотипических антител к АБК в системе твердофазного ИФА на полистероловых планшетах (ELISA) [9].

На рис. 1 представлены данные иммунологического анализа взаимодействия белков с АТ<sub>а-и</sub> к АБК (рис. 1, линия 2) и поликлональных АТ к фрагменту из 125 аминокислот на N-конце белка Сір2.1, экспрессия гена которого [10] контролируется АБК (рис. 1, линия 3). Как видно из рис. 1, выделенные на АБК-сефарозе белки активно взаимодействуют с АТ<sub>а-и</sub> к АБК, что говорит о наличии у них АБК-связывающих сайтов.

В качестве контроля использовалась неиммунная сыворотка (рис. 1, линия 4), взаимодействия которой с белками не проявлялось, что говорит о специфическом действии использованных нами иммунных сывороток.

Белки полученной фракции разделяли с помощью одномерного электрофореза в денатурирующем ПААГ (в присутствии додецил сульфата натрия). Полипептиды из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану и идентифицировали АСБ с помощью АТ<sub>а-и</sub> к АБК. Результаты показали, что антитела взаимодействовали с полипептидами, имеющими молекулярные массы 23, 50, 60 и 67 кДа, что доказывает АБК-связывающие свойства этих полипептидов (рис. 2). Нельзя исключить, что некоторые другие белки, выделенные с помощью АБК-сефарозы, утратили возможность связываться с АТ<sub>а-и</sub> при денатурации или при переносе на нитроцеллюлозную мембрану.



**Рис. 2.** АСБ водорастворимой фракции лизированных *Synechocystis sp* PCC 6803, выделенные с помощью аффинной хроматографии на АБК-сефарозе:

1 — белки, элюированные с колонки АБК-сефарозы, разделенные с помощью SDS-ПААГ-электрофореза, перенесенные на нитроцеллюлозную мембрану и окрашенные хлорамином-Т; 2 — идентификация АСБ с помощью АТ<sub>а-и</sub> к АБК; 3 — полипептиды, с которыми взаимодействуют АТ к Сір2.1 белку; М — маркеры молекулярных масс белков

Как видно из рис. 2, среди белков, элюированных с АБК-сефарозной колонки, идентифицируются два полипептида, связывающиеся с поликлональными антителами к фрагменту СР2.1. Это говорит о том, что в *Synechocystis sp* присутствуют полипептиды, гомологичные СР2.1 белку, с молекулярными массами 73 кДа, что соответствует молекулярной массе полноразмерного СР2.1 белка, и 23 кДа, соответствующей массе фрагмента СР2.1, содержащего АБК-связывающий сайт. АБК-связывающие свойства СР2.1 белка были показаны нами ранее [10].

Близкие по аминокислотному составу и молекулярной массе гомологи этого белка обнаружены во многих цветковых растениях, как однодольных, так и двудольных. Гены, кодирующие СР2.1 белок в люпине желтом и *Arabidopsis thaliana*, являются АБК-регулируемыми.

Функциональную активность АСБ исследовали с помощью метода, применявшегося ранее для определения транскрипционной активности цитокинин-связывающих белков различных растительных объектов [11]. Для этого нами была разработана транскрипционная система из *Synechocystis sp* PCC 6803 [6].

При проведении опыта использовали в качестве транскрипционной системы водорастворимую фракцию лизата цианобактерий, содержащую ДНК, РНК-полимеразу и необходимые факторы транскрипции. Непосредственное добавление абсцизовой кислоты в концентрации  $10^{-6}$  М в реакционную среду существенно активировало общую транскрипционную активность в лизате клеток. АСБ, выделенные с помощью АБК-сефарозы, также повышали активность синтеза РНК (табл. 1). При совместном действии АСБ и абсцизовой кислоты эффект был несколько большим, чем в присутствии только АСБ. Полученные результаты позволяют предположить, что АСБ являются транскрипционными факторами, участвующими в регуляции транскрипции генома *Synechocystis sp* PCC.

Таблица 1

**Действие АБК, АСБ, выделенных из водорастворимой фракции *Synechocystis* 6803, на активность транскрипции in vitro в транскрипционной системе *Synechocystis***

Вариант опыта	Включение $^3\text{H}$ -АМФ в РНК имп./мин на 10 мкг ДНК	Активация транскрипции, % от контроля
Контроль	13 624 ± 6 500	100
АБК $10^{-6}$ М	38 383 ± 2 100	282
АСБ, 10 мкг	50 060 ± 3 009	368
АБК $10^{-6}$ М + АСБ, 10 мкг	57 115 ± 3 500	420

Таким образом, при помощи аффинной хроматографии на АБК-сефарозе из растворимой фракции лизированных клеток *Synechocystis sp* PCC были выделены и с помощью антител идентифицированы АСБ различного размера, показана их способность активировать синтез РНК в транскрипционной системе in vitro, а также увеличение транскрипционной активности в этой системе под действием абсцизовой кислоты. Это позволяет заключить, что в цианобактериях существуют компоненты регуляторной системы абсцизовой кислоты, подобные тем, ко-

торые обнаружены в высших растениях. Особенно важно отметить, что, согласно нашим предварительным данным, в *Synechocystis* присутствует АБК. Представленные результаты подтверждают предположение о том, что гормональная система, включающая АБК, хотя бы частично была передана высшим растениям от предшественников хлоропластов — цианобактерий. Это делает целесообразным дальнейшее изучение действия гормонов, в частности АБК, на цианобактерии и сравнительное исследование ответа цианобактерий и хлоропластов на гормоны.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. — Минск: Тэхнолоґія, 2003.
- [2] Kusnetsov V.V., Oelmuller R., Sarwat M.I., Porfirova S.A., Cherepneva G.N., Herrmann R.G., Kulaeva O.N. Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels // *Planta*. — 1994. — V. 194. — P. 318—327.
- [3] Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Selivankina S.Yu., Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Kudryakova N.V., Zubkova N.K., Liere K., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Borner Th. Cytokinins Stimulate Chloroplast Transcription in Detached Barley Leaves // *Plant Physiol.* — 2008. — V. 148. — P. 1082—1093.
- [4] Benková E., Witters E., van Dongen W., Kolář J., Motyka V., Brzobohaty B., van Onckelen H.A. and Macháčková I. Cytokinins in Tobacco and Wheat Chloroplasts. Occurrence and Changes Due to Light/Dark Treatment // *Plant Physiol.* — 1999. — V. 121. — P. 245—251.
- [5] Kulaeva O.N., Karavaiko N.N., Selivankina N.N., Kusnetsov V.V., Zemlyachenko Ya.V., Cherepneva G.N., Maslova G.G., Lukevich T.V., Smith A.R., Hall M.A. Nuclear and Chloroplast Cytokinin-Binding Proteins from Barley Leaves Participating in Transcription Regulation // *Plant Growth Regul.* — 2000. — V. 32. — P. 329—335.
- [6] Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Курпьянова Е.В., Люкевич Т.В., Кузнецов В.В., Лось Д.А., Кулаева О.Н. Цианобактерии реагируют на цитокинин // *Физиология растений*. — 2006. — Т. 53. — С. 851—856.
- [7] Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon Ch., Frey N.F., Leung J. An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More // *Molecular Plant*. — 2008. — V. 1. — P. 198—217.
- [8] Pennisi E. Stressed Out Over a Stress Hormone // *Science*. — 2009. — V. 324. — P. 1012—1013.
- [9] Каравайко Н.Н., Земляченко Я.В., Селиванкина С.Ю., Кулаева О.Н. Выделение из цитозоля листьев ячменя зеатин-связывающего белка, участвующего в активации транс-зеатином синтеза РНК *in vitro* // *Физиология растений*. — 1995. — Т. 42. — С. 547—554.
- [10] Каравайко Н.Н., Демиденко А.В., Кудрякова Н.В., Шевченко Г.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. АБК-связывающие свойства белка СІР 2.1 из люпина желтого / Годичное собрание ОФР России. Международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». 6—11 октября. — Екатеринбург, 2008. — С. 201—202.
- [11] Селиванкина С.Ю., Каравайко Н.Н., Земляченко Я.В., Маслова Г.Г., Кулаева О.Н. Регуляция транскрипции рецептором цитокинина в системах *in vitro* // *Физиология растений*. — 2001. — Т. 48. — С. 434—440.

**ABA-BINDING PROTEINS  
WAS DETECTED IN CYANOBACTERIA  
(*SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803*)**

**G.V. Shevchenko, N.N. Karavaiko, A.V. Demidenko,  
S.Yu. Selivankina, N.K. Zubkova, E.V. Kupriyanova,  
D.A. Los, V.V. Kuznetsov, O.N. Kulaeva**

Timirjazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science  
*Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276*

This article dedicates the study concerning evolution of the hormonal system of plants, in particular, detection of components of the regulatory system of abscisic acid (ABA) in cyanobacteria, which are considered as the precursors of the chloroplasts. ABA-binding proteins with molecular masses of 23, 50, 60 and 67 kDa were isolated using affinity chromatography on Sepharose conjugated with ABA from the lysate of cyanobacteria *Synechocystis sp. PCC 6803*. Interaction of isolated proteins with idiotypic antibodies to the ABA was shown. Total transcription in transcription system of cyanobacteria was activated by this ABA-binding proteins in vitro. This suggests, that some elements of the hormonal system of plants, which are associated with the ABA, was transferred from cyanobacterias to the eukaryotic cell.

**Key words:** hormonal system of plants, regulatory system of abscisic acid (ABA), cyanobacteria, ABA-binding proteins, transcription.