

Учреждение образования «Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Биологический факультет
Кафедра ботаники и физиологии растений

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 Н.М. Дайнеко

«12» ноября 2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 В.С. Аверин

«12» ноября 2020 г.

ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

ТРАНСДУКЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ

для специальности

1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология)

Составитель:

канд.биол.наук, доцент Храмченкова О.М.

Рассмотрено и утверждено на заседании
кафедры ботаники и физиологии растений
23.10.2020 г., протокол № 2.

Рассмотрено и утверждено на заседании
научно-методического совета
28.12.2020 протокол № 3

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

А.А. Дворник, заведующий лабораторией моделирования и минимизации антропогенных рисков ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», кандидат биологических наук;

Кафедра биологии УО «Гомельский государственный медицинский университет».

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

**Содержание электронного учебно-методического комплекса
по дисциплине «Трансдукция фитогормональных сигналов»
для специальности 1-31 80 01 Биология
(профилизация Функциональная биология)**

	Пояснительная записка.....	4
1	Теоретический раздел.....	7
1.1	Перечень теоретического материала.....	7
1.2	Материалы для обеспечения самостоятельной учебной работы магистрантов.....	9
2	Практический раздел.....	13
2.1	Перечень практических (семинарских) занятий и задания к ним.....	13
3	Контроль знаний.....	17
3.1	Перечень тем экзаменационных работ.....	17
4	Вспомогательный раздел.....	19
4.1	Учебная программа дисциплины.....	19
4.2	Перечень рекомендуемой литературы.....	19

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Трансдукция фитогормональных сигналов» компонента учреждения высшего образования, модуля «Клеточная биология и молекулярно-генетические механизмы биосигнализации», создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для магистрантов специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Содержание разделов УМК соответствует Образовательному стандарту высшего образования второй ступени (магистратура) ОСВО 1-31 80 012012, учебным планам ГГУ имени Ф. Скорины специальности 1-31 80 01 Биология, регистрационные номера G 310117/2М от 08.06.2017 и G 310117/2МЗФ от 08.06.2017. Главная цель ЭУМК – оказание методической помощи магистрантам в систематизации учебного материала при изучении дисциплины и в процессе подготовки к итоговой аттестации по курсу «Трансдукция фитогормональных сигналов».

В современной физиологии и биохимии растений фитогормоны рассматриваются как интегральные химические сигналы, отражающие состояние внутренней среды растительного организма, регулирующие рост и развитие растений. **Целью** освоения курса является формирование целостной системы знаний о гормонах растительного организма, их строении, метаболизме и физиологической роли.

Основные задачи дисциплины – дать целостные представления о механизмах биосигнализации в растительных клетках, метаболизме и сигнальных функциях фитогормонов; научит обобщать фактический материал в области биохимии и физиологии фитогормонов; ознакомить с научными достижениями в данной области физиологии и биохимии растений.

В преподавании данной дисциплины, наряду с лекциями, учебным планом предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у обучающихся таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение научной литературы, закрепляют знания, полученные на первой ступени высшего образования, прививают навыки самостоятельной работы. На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения, основанных на психологии человеческих взаимоотношений и взаимодействиях.

Высокий уровень освоения дисциплины «Трансдукция фитогормональных сигналов» достигается не только в результате выполнения аудиторной работы на лекциях и практических (семинарских) занятиях, но и в ходе выполнения самостоятельной работы.

После изучения дисциплины обучающийся должен обладать компетенциями:

АК-1. Уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач.

АК-2. Владеть системным и сравнительным анализом.

АК-4. Уметь работать самостоятельно.

АК-6. Владеть междисциплинарным подходом при решении проблем.

СК-2. Быть способным использовать знания о молекулярных основах функционирования клеточных систем и механизмах биосигнализации в разработке актуальных вопросов физиологии животных и растений, биотехнологии, экологии, фармации, сельском и лесном хозяйстве

ПК-2. Осваивать новые модели, теории, методы исследования, участвовать в разработке новых методических подходов.

ПК-3. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научной литературе, составлять аналитические обзоры.

ПК-4. Готовить научные статьи, сообщения, рефераты, доклады и материалы к презентациям.

В результате изучения дисциплины обучающийся должен **знать**:

- принципы структурной и функциональной организации основных сигнальных систем клетки;
- отличия поверхностных и внутриклеточных рецепторов;
- особенности передачи внешнего сигнала различными трансдуцирующими системами в клетку;
- структуру первичных и вторичных мессенджеров;
- терминологию, используемую в клеточной сигнализации;
- роль основных сигнальных систем в регуляции клеточных процессов;

уметь:

- представлять возможные пути решения наиболее актуальных проблем при изучении регуляции сигналинга растений;
- использовать полученные знания в области исследования систем внутриклеточной и межклеточной коммуникации для решения профессиональных задач;
- использовать полученные знания при изучении других биологических дисциплин;
- применять полученные знания в оценке нарушений механизмов сигнальной трансдукции;

владеть навыками:

- работы с различными литературными источниками, поиска информации по заданной проблематике;
- методологическими основами современной науки.

Изучение данной учебной дисциплины предусмотрено магистрантами 1 курса специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Общее количество часов для магистрантов **дневной** формы обучения – 102 (3 зачетных единицы); аудиторных – 42, из них: лекции – 34, в том числе – УСР – 12, практические (семинарские) занятия – 8. Форма отчетности – экзамен в 1 семестре. Общее количество часов для

магистрантов **заочной** формы обучения – 102 (3 зачетных единицы); аудиторных – 14, из них: лекции – 10, практические (семинарские) занятия – 4. Форма отчетности – экзамен в 1 семестре.

Структура УМК включает:

Учебно-методическое обеспечение дисциплины

1. Теоретический раздел (перечень материала для теоретического изучения дисциплины в объеме, установленном учебным планом по специальности).

2. Практический раздел (материалы для проведения практических (семинарских) занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

3. Контроль самостоятельной работы магистрантов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательных стандартов высшего образования и учебно-программной документации, в том числе задания управляемой самостоятельной работы магистрантов, темы экзаменационных работ).

4. Вспомогательный раздел.

4.1. Учебно-программные материалы (учебная программа (рабочий вариант) для магистрантов дневной и заочной форм получения образования).

4.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с УМК должна включать ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в учебной программе. С помощью учебной программы по дисциплине можно получить информацию о тематике лекций и практических (семинарских) занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для подготовки к практическим (семинарским) занятиям и промежуточным контрольным мероприятиям необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1 Перечень теоретического материала

Раздел 1 Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток

Тема 1 Сущность передачи сигнала.

- 1 Компоненты сигнальных систем.
- 2 Механизмы передачи сигнала.
- 3 Система убиквитин-опосредованной деградации белков.

Тема 2 Рецепция внешнего сигнала

- 1 Общая характеристика клеточных рецепторов.
- 2 Лиганд-связывающие рецепторы.
- 3 G-белок сопряженные рецепторы, каналоформеры, внутриклеточные рецепторы.

Тема 3 Световые рецепторы

- 1 Растения и ультрафиолет.
- 2 Фототропины.
- 3 Криптохромы.
- 4 Фитохромы.

Раздел 2 Передача сигнала внутри клетки

Тема 4 G-белки и фосфолипазы

- 1 G-белки.
- 2 Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры.
- 3 Фосфолипазы.

Тема 5 NO-сигналинг и нуклеотидциклазные сигнальные системы

- 1 Пути образования NO.
- 2 NO-сигналинг.
- 3 Нуклеотидциклазные сигнальные системы.

Тема 6 Ионы кальция в системе передачи сигнала

- 1 Структура Ca^{2+} -связывающих белков.
- 2 Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал.
- 3 Индуцированное поступление кальция в цитоплазму.
- 4 Модуляция активности транскрипции кальмодулинами.

Тема 7 Ковалентная модификация сигнальных посредников

- 1 Значение обратимой ковалентной модификации.
- 2 Растительные протеиновые киназы.
- 3 MAP-киназы. Циклин-зависимые киназы.
- 4 Протеиновые фосфатазы. Разнообразие и значение растительных фосфатаз.

Раздел 3 Механизмы передачи сигнала растительных гормонов

Тема 8 Ауксины

- 1 Метаболизм ауксина.
- 2 Движение ауксина в растении.
- 3 Физиологическое действие ауксинов.

4 Рецепторы ауксинового сигнала.

Тема 9 Гиббереллины

1 Химическая структура и классификация.

2 Передвижение гиббереллинов в растениях.

3 Физиологическое действие гиббереллинов.

4 Рецепция и передача сигнала гиббереллинов.

Тема 10 Цитокинины

1 Биосинтез и метаболизм цитокининов.

2 Передвижение цитокининов в растении.

3 Сигнальная роль цитокининов в развитии растений.

Тема 11 Абсцизовая кислоты

1 Метаболизм АБК.

2 Движение АБК в растении.

3 Физиологическое действие АБК.

4 Сигнальные пути АБК.

Тема 12 Этилен

1 Образование этилена тканями.

2 Передвижение этилена по растению.

3 Физиологические функции этилена.

4 Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала.

Тема 13 «Неклассические гормоны»

1 Биохимический механизм действия brassinosteroidов.

2 Жасминовая кислота. Структура, биосинтез и физиологические функции.

3 Салициловая кислота. Структура, биосинтез и физиологическая роль в растениях.

4 Пептидные гормоны растений.

Тема 14 Методы изучения фитогормонов

1 Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей

2. Количественные методы определения фитогормонов

3. Особенности иммунохимии фитогормонов

Раздел 4 Синтетические гормоны

Тема 15 Продукты химического синтеза

1 Аналоги ауксинов: препараты гетероауксин, корневин, укоренить, томаты.

2 Аналоги гиббереллинов: препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень.

3 Аналоги цитокининов и brassinosteroidов: препараты цитодеф и эпин-экстра.

Тема 16 Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием

1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М).

2 Соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат) и тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва).

3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

Тема 17 Культуры клеток и тканей в биотехнологии растений

1 Типы культур клеток и тканей растений.

2 Направления использования культуры клеток и тканей.

3 Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений.

Краткий курс лекций, сгруппированный по разделам, находится на сайте УО «ГГУ имени Ф. Скорины» по адресу: <http://dot3.gsu.by/course/view.php?id=1989>.

1.2 Материалы для обеспечения самостоятельной учебной работы магистрантов.

Для организации самостоятельной работы магистрантов по учебной дисциплине рекомендуется использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа учебной дисциплины, учебно-методический комплекс, методические указания к практическим занятиям, задания в тестовой форме, темы рефератов, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов и др.). Для общей оценки качества усвоения магистрантами учебного материала предлагается использование рейтинговой системы.

УСР № 1. Ковалентная модификация сигнальных посредников

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Растительные протеиновые киназы. Кальций-зависимые протеиновые киназы. SnRK – SNF1-подобные киназы. Рецептор-подобные киназы. MAP киназы. Циклин-зависимые киназы. Казеиновые киназы SK1 и SK2. Семейство GSK3/Shaggy. CTRL/Raf-подобное семейство.

2 Протеиновые фосфатазы. Классификация фосфатаз. Серин/треониновые фосфатазы. Тирозиновые фосфатазы. Растительные фосфатазы. Разнообразие растительных фосфатаз. Значение растительных фосфатаз.

Форма работы – индивидуальная.

Форма контроля выполнения заданий: проверка конспектов.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Трансдукция фитогормональных сигналов: физиологические и биохимические аспекты: учебно-методическое пособие к спецкурсу

«Вторичный метаболизм растений» / [сост. к.б.н. Й.Р. Абдрахимова]. – Казань: КазГУ, 2009. – 21 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

УСР № 2. Цитокинины

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Химическая структура, классификация, биосинтез и метаболизм цитокининов.

2 Рецепция и передача сигнала цитокининов. Функции цитокининов в развитии растений.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Трансдукция фитогормональных сигналов: физиологические и биохимические аспекты: учебно-методическое пособие к спецкурсу «Вторичный метаболизм растений» / [сост. к.б.н. Й.Р. Абдрахимова]. – Казань: КазГУ, 2009. – 21 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

УСР № 3. Этилен

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Химическая структура, биосинтез и метаболизм этилена.

2 Рецепция и передача сигнала этилена. Функции этилена в развитии растений.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.

5 Муравьева Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.

УСР № 4. Методы изучения фитогормонов

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Комплексный метод разделения и очистки основных групп фитогормонов.

2 Тонкослойная хроматография фитогормонов.

3 ВЭЖХ и масс-спектрометрия фитогормонов.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

2 Биохимия сельскохозяйственных растений / Б.П. Плешков. – М.: Агропромиздат, 2007. - 494 с.

3 Биохимия растений / [Л.А. Красильникова, О.А. Авксентьева, Ю.А. Жмурко и др.]; под ред. к.б.н. Л.А. Красильниковой. – Харьков: Феникс, 2004. – 224 с.

4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.

5 Физиология растений – Онлайн-энциклопедия – <http://www.fizrast.ru>.

УСР № 5. Продукты химического синтеза

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Аналоги ауксинов: индолил-3-уксусная кислота (препарат гетероауксин), 4-индолил-масляная кислота (препараты корневин, укоренить), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (препарат томатын).

2 Аналоги гиббереллинов: натриевые соли гиббереллиновых кислот (препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень).

3 Аналоги цитокининов: N-(1,2,4-триазол-4-ил)-N-фенилмочевина (препарат цитодеф).

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

- 4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.
- 5 Физиология растений – <http://www.maik.ru>.
- 6 Физиология растений – Онлайн-энциклопедия – <http://www.fizrast.ru>.

УСР № 6. Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М).
- 2 Тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва),
- 3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 5 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.

РАЗДЕЛ 1 СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК

Тема 1. Сущность передачи сигнала.

- 1 Компоненты сигнальных систем.
- 2 Механизмы передачи сигнала.
- 3 Система убиквитин-опосредованной деградации белков.

1 Компоненты сигнальных систем.

Живые организмы представляют собой открытые термодинамические системы, которые в значительной степени зависят от внешнего окружения. С одной стороны, среда является источником энергии и строительного материала. Организму необходимо адекватно реагировать на эти источники, чтобы оптимально их использовать. С другой стороны, среда не является стабильной и постоянно изменяется, поэтому может быть фактором дестабилизации. Такие изменения могут иметь как периодический (сезонные, суточные ритмы), так и произвольный характер. Флуктуации внешних условий наблюдаются не только в рамках нормы реакции организма. Экстремальные условия могут нарушить структурную целостность и функциональную активность организма, ставя под угрозу его существование. В любом случае, чтобы минимизировать негативное влияние неблагоприятных условий, организм должен уметь распознавать изменения в окружающей среде и, соответственно, отвечать на них изменением функциональной активности. Такая способность позволяет организму адаптироваться к изменяющимся условиям, а также эффективно регенерировать повреждения, спровоцированные экстремальными условиями.

Способностью распознавать изменения в среде существования обладает не только организм в целом, но и каждая его клетка. При этом внешней (экстраклеточной) по отношению к отдельной клетке является не только окружающая среда как таковая, но и внутренняя среда организма. Пространственно удаленные друг от друга части многоклеточного организма являются взаимозависимыми и должны функционировать согласованно. Согласованность работы всех частей организма обеспечивается благодаря функционированию сложной системы передачи межклеточных сигналов (химических, электрических).

Биологические функции клетки, связанные с онтогенетическим развитием организма и реакцией на изменяющиеся внешние условия, реализуются посредством распознавания экстраклеточного стимула рецептором и дальнейшей активации механизмов передачи внутриклеточных сигналов, которые приводят к формированию ответной реакции клетки на внешние воздействия.

Быстрые и медленные реакции. Восприятие экстраклеточного сигнала осуществляется клеточными рецепторами, а затем передается в соответствующие клеточные компартменты к конечным мишеням, от

которых зависит функциональная активность клетки. Ответные реакции клетки принято делить на быстрые и медленные. **Быстрые реакции** проявляются практически сразу после восприятия сигнала, поскольку они связаны с изменением активности систем и их компонентов, которые присутствуют в клетке на момент восприятия сигнала. Примером быстрых реакций могут служить изменения интенсивности и направления трансмембранных ионных потоков и связанных с этим процессов модуляции активности ферментов. **Медленные реакции** зависят от белков, синтезированных de novo, то есть они сопряжены с изменением экспрессии генов, поэтому развиваются в течение более длительного времени по сравнению с быстрыми. Изменение набора экспрессирующихся генов осуществляется как за счет модуляции активности предсуществующих транскрипционных факторов, так и синтеза новых транскрипционных регуляторов.

Компоненты сигнальных систем. Системы внутриклеточной трансдукции сигналов состоят из разнообразных компонентов, различающихся по назначению и выполняемым функциям. Основными компонентами сигнальных систем являются рецепторы, эффекторы, вторичные мессенджеры, G-белки, модифицирующие сигнальные ферменты, адаптерные молекулы и конечные мишени.

Рецепторы воспринимают экстраклеточные сигналы и запускают каскадный сигнальный механизм внутри клетки. Клетки обладают разными типами специализированных рецепторов, распознающих определенный вид сигнала.

G- белки – особые сигнальные молекулы, обладающие GTPазной активностью. Способность передавать сигнал зависит от того, какой из нуклеотидов (GDP или GTP) находится в гуаниннуклеотид-связывающем центре.

Эффекторы (или эффекторные молекулы) – это ферменты, катализирующие синтез вторичных мессенджеров. К эффекторам также следует отнести кальциевые каналы и переносчики, от которых непосредственно зависит концентрация ионов кальция в цитоплазме.

Вторичные мессенджеры – это низкомолекулярные органические соединения или ионы, способные обеспечивать передачу сигнала путем аллостерической регуляции сигнальных посредников. Модуляция активности компонентов сигнальной цепи вторичными мессенджерами осуществляется при достижении ими определенной концентрации. На уровне эффекторов обеспечивается усиление сигнала, так как они синтезируют большое количество вторичных посредников, которые могут активировать множество последующих сигнальных посредников или конечных мишеней.

Адаптерные молекулы – белки, как правило, не обладающие специфической активностью, помимо способности в определенных условиях взаимодействовать одновременно с двумя или более сигнальными посредниками. Взаимодействие осуществляется за счет комплементарных

поверхностей. Например, рецептор может воздействовать на эффектор или иную сигнальную молекулу только через адаптерный белок.

Сигнальные молекулы- ферменты обеспечивают посттрансляционную модификацию посредников передачи сигнала. (Следует отличать от эффекторов, которые тоже являются ферментами, но специализируются на синтезе вторичных мессенджеров.) Большинство посттрансляционных модификаций, используемых в сигналинге, имеет обратимый характер. Ведущую роль среди таких сигнальных посредников выполняют протеинкиназы и протеинфосфатазы, обеспечивающие киназно-фосфатазный цикл.

Конечные мишени обеспечивают необходимое функциональное состояние клетки для конкретных условий. В качестве конечных мишеней выступают, например, ферменты или транскрипционные факторы.

Запуск трансдукции сигнала в клетке начинается с рецептора и заканчивается модуляцией активности конечных мишеней. Однако промежуточные компоненты сигнальной системы могут быть представлены широким спектром разнообразных функциональных молекул. Количество и тип компонентов каждой конкретной сигнальной системы в определенной мере специфичны. Например, в некоторых системах могут отсутствовать эффекторы и вторичные мессенджеры, а в других в передаче сигнала могут быть задействованы несколько типов эффекторных молекул, а соответственно, и вторичных посредников, действующих последовательно или параллельно. Наиболее короткая сигнальная цепочка наблюдается в том случае, если рецептор является одновременно конечной мишенью. Например, существуют рецепторы липофильных лигандов, которые одновременно являются транскрипционными факторами.

Сущность передачи сигнала. Избирательность взаимодействия. Между двумя любыми макромолекулами или микромолекулами возможно взаимодействие. Однако при наличии огромного разнообразия веществ в клетке наблюдается строгая упорядоченность взаимодействий, некая их «осмысленность». Например, каталитическая активность ферментов направлена на специфический субстрат, структурные молекулы укладываются в агрегаты, образуя клеточные структуры, гормоны взаимодействуют с определенными рецепторами и т.д. Подобным образом специфично взаимодействуют друг с другом сигнальные молекулы.

Межмолекулярные взаимодействия осуществляются за счет слабых сил. Чтобы эти силы были эффективными и позволили избирательность взаимодействия, необходимо образование множества связей. Слабые силы, как известно, приобретают максимальные значения, если взаимодействующие группы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга. Поверхности взаимодействующих молекул, позволяющие образовывать оптимальное количество слабых связей, называются **комплементарными**.

При формировании структурных агрегатов, представляющих собой статичные комплексы, часто является важным наличие максимального

количества слабых связей. Однако при образовании динамических систем, для функционирования которых принципиальным является не только ассоциация, но и диссоциация молекулярного комплекса, необходимо установить оптимальное число слабых связей, которое, с одной стороны, позволит специфичность взаимодействия, а с другой, не затруднит диссоциацию.

При специфическом взаимодействии макромолекул наблюдается взаимное влияние их электронных плотностей друг на друга. В результате это приводит к изменению конформации молекул, что непосредственно отражается на их активности.

2 Механизмы передачи сигнала.

В основе передачи сигнала лежит молекулярный механизм, посредством которого изменяется активность сигнальных посредников. Модуляция активности посредников осуществляется разными способами, среди которых наиболее важными являются:

1) **взаимное связывание**, определяемое наличием комплементарных поверхностей (например, узнавание гормона рецептором);

2) **ковалентная модификация** (введение или отщепление групп; образование или разрыв связей в макромолекулах-компонентах сигнальной цепи);

3) **изменение микроокружения** (изменение концентрации ионов, в том числе протонов (рН), и низкомолекулярных органических регуляторов).

Любое из этих воздействий провоцирует изменение конформации макромолекулы-посредника, от которой зависит ее активность. Модуляция активности сигнального посредника определяет его способность воздействовать на последующие компоненты сигнальной цепи. В целом, акт передачи сигнала в рамках одного посредника можно представить в таком виде: **воздействие → изменение конформации → изменение активности**.

Необходимо заметить, что при восприятии сигнала активность посредника может изменяться в различных направлениях и с различной силой. Это зависит от конкретной сигнальной пары и особенностей их взаимодействия. Активность посредника может градиентно уменьшаться или увеличиваться, а также активироваться из репрессированного состояния (включаться) или, наоборот, ингибироваться (выключаться). (Для описания функционирования гипотетических сигнальных систем и посредников мы будем говорить о модуляции или изменении активности макромолекул-посредников, так как активация сигнальной системы может быть сопряжена как с активацией, так и с репрессией отдельных компонентов и модулей системы.)

Для низкомолекулярных регуляторов (вторичных мессенджеров), которые опосредуют передачу сигнала между двумя макромолекулами, существенным признаком участия в сигнальном механизме является изменение концентрации.

Макромолекулярные посредники • воздействие (принятие сигнала); • изменение конформации; • изменение активности (готовность к передаче сигнала)	Низкомолекулярные посредники • модуляция активности эффекторов или ионных каналов; • изменение концентрации вторичных мессенджеров; • модуляция активности сигнальных посредников
---	--

Трансдукция сигнала от рецептора до конечных мишеней, в которой может быть задействовано множество компонентов, является, по существу, поочередным изменением активности переносчиков сигнала, а в случае вторичных мессенджеров – их концентрации.

Например, рецептор в результате активации приобретает способность взаимодействовать с адаптерным белком, через который он стимулирует эффектор. Эффектор катализирует синтез вторичных мессенджеров, модулирующих активность протеиновых киназ и т. д. Таким образом, каждый сигнальный переносчик влияет на очередной компонент системы трансдукции сигнала, изменяя его функциональное состояние. Причем модуляция активности одного компонента предопределяет изменение активности другого. Последовательное изменение состояния переносчиков сигнала представляет собой каскад реакций, поэтому такой способ передачи внутриклеточных сигналов часто называют **каскадным механизмом**.

При описании сигнальных систем для обозначения относительного положения компонентов часто используется термины апстрим (upstream – вверх по течению) и даунстрим (downstream – вниз по течению). Все регуляторы, от которых стекается сигнал на конкретный компонент, являются по отношению к нему апстрим сигнальными компонентами. Тогда как регуляторы, на которые передается сигнал, называют даунстрим сигнальными компонентами. Предположим, в сигнальной системе функционируют 5 компонентов, и передача сигнала осуществляется в направлении $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5$. Тогда относительно компонента 3 регуляторы 1 и 2 являются апстрим, а 4 и 5 – даунстрим сигнальными партнерами.

В упрощенном варианте каскадный механизм может быть представлен в виде линейной последовательной передачи сигнала. Однако, на самом деле, чаще всего распространение сигнала в клетке имеет веерный характер, то есть стимуляция одного рецептора модулирует активность, как правило, множества конечных мишеней. Например, под воздействием конкретного гормона в клетке активируется экспрессия целого набора генов.

Кроме того, многие из интраклеточных сигнальных систем тесно взаимосвязаны друг с другом. Взаимодействуя, они могут способствовать взаимному усилению, ослаблению, а также проявлению качественно иного эффекта по сравнению с тем, который проявляется при функционировании этих систем по отдельности. Каскадные механизмы можно представить в виде сигнальной сети, пронизывающей клетку. Сигнальные пути могут быть

настолько переплетены и взаимозависимы, что порой трудно идентифицировать причинно-следственные связи при изучении механизмов трансдукции сигнала.

Эффект усиления в сигнальных системах. Важной характеристикой механизма внутриклеточной передачи сигнала является **эффект усиления**. Благодаря этому свойству клетки способны формировать существенные ответные реакции на воздействие слабых внешних сигналов. **Общий принцип усиливающего эффекта – увеличение количества сигнальных посредников в процессе распространения сигнала.**

Усиление сигнала осуществляется только на конкретных участках сигнальной цепи. Если посредники участвуют в передаче сигнала в эквимоллярных количествах, то усиления не происходит. Например, при передаче сигнала путем взаимного связывания одна макромолекула модулирует активность только одной молекулы. Однако если в сигнальном механизме участвуют ферменты, наблюдается усиливающий эффект. Так, эффекторная молекула в результате активации синтезирует множество вторичных мессенджеров, которые будут регулировать активность значительного количества сигнальных посредников, в том числе конечных мишеней.

На участке усиления сигнала помимо увеличения количества однотипных регуляторных молекул, в сигнальный механизм могут вовлекаться посредники разных типов. Например, такие вторичные мессенджеры, как ионы Ca^{2+} способны модулировать активность нескольких типов сигнальных посредников – ферментов, транскрипционных факторов, ионных каналов и др.

Эффект усиления обеспечивается в результате функционирования следующих процессов:

- синтез вторичных мессенджеров эффекторами;
- посттрансляционная модификация сигнальных макромолекул (киназы, фосфатазы и др.);
- трансляция и транскрипция;
- изменение скорости потока ионов Ca^{2+} через мембрану (Ca^{2+} -каналы и переносчики).

Транскрипционный каскад. Развитие ответной реакции на внешние воздействия часто сопровождается активацией генов, кодирующих транскрипционные регуляторы. Вновь синтезированные факторы транскрипции участвуют в регуляции экспрессии второй группы генов. Таким образом, сигнальный механизм может включать в себя не только активацию транскрипционных факторов, но и их синтез. Механизм, включающий несколько последовательных транскрипций, называют **транскрипционным каскадом**.

Транскрипционный каскад представляет собой широко распространенное явление. Группа генов, активность которых изменяется под действием внешнего сигнала в первую очередь, называется **ранними**. Гены, активность которых модулируется вновь синтезированными

транскрипционными регуляторами, называются поздними. Большинство ранних генов являются регуляторными. Они кодируют транскрипционные регуляторы, компоненты убиквитинирующей системы и другие регуляторные белки. Продукты ранних генов во многом определяют образец экспрессии поздних генов, от которых непосредственно зависит функциональная активность клетки.

Регуляторный механизм, задействующий последовательный синтез нескольких групп транскрипт-факторов, на первый взгляд, может показаться медленно действующим и громоздким. Тем не менее, это необходимо для осуществления регуляции генной экспрессии с позиции максимальной экономичности процессов. При изменении условий, как правило, активируются и репрессируются множественные гены. Обеспечить моментальную модуляцию сразу всех необходимых генов достаточно сложно, так как для этого нужно значительное количество транскрипционных факторов и компонентов сигнальных систем, активирующих эти транскрипт-факторы. Причем синтез и тех, и других молекул необходимо поддерживать на определенном уровне в неиндуктивных условиях. Поддержание в рабочем состоянии многочисленных сигнальных систем, обеспечивающих прямую активацию большого количества генов, невыгодно для клетки. Система регуляции путем последовательной активации синтеза нескольких транскрипционных факторов требует минимальных затрат на постоянное поддержание сравнительно небольшого количества сигнальных систем. Кроме того, синтез факторов регуляции транскрипции в результате активации каскадных механизмов оказывает усиливающий эффект. Активация экспрессии одного гена приводит к неоднократной транскрипции, причем каждый образованный транскрипт после сплайсинга может служить матрицей для синтеза множества молекул белка. Существенное повышение количества регуляторных белков оказывает значительный эффект на развитие ответной реакции клетки. Таким образом, **каскадная система регуляции, включающая последовательную активацию экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, дает незначительную задержку во времени, однако является экономичной и способствует усилению сигнала.**

Типы сигнальных механизмов. Передача сигнала в клетке сопровождается изменением активности посредников сигнальной системы и конечных мишеней. Эти изменения в отдельно взятом каскадном механизме могут иметь разнонаправленный характер. Кроме того, один и тот же внешний сигнал, с одной стороны, стимулирует активацию (или повышение активности) одних конечных мишеней, но в то же время приводит к репрессии других. Поэтому описать однозначно направление изменения активности, происходящие в каскадном механизме, вряд ли возможно. Скорее, следует говорить о том, как работают ключевые модули регуляторной сигнальной системы. В этом плане можно различать **активаторные, репрессорные и дерепрессорные** сигнальные механизмы.

Активаторные механизмы связаны с усилением или включением активности сигнальных посредников или конечных мишеней, а **репрессорные** – с ослаблением или выключением. **Дерепрессорные** сигнальные системы характеризуются тем, что один из компонентов системы активно репрессируется в отсутствие стимула, в результате чего система находится в репрессированном состоянии. Активация системы приводит к ингибированию репрессора и активации сигнальной системы. Таким образом, репрессия репрессора обеспечивает активацию (дерепрессию) системы.

Дерепрессорные сигнальные механизмы. Снятие действия репрессоров может осуществляться за счет механизмов двух основных типов:

- 1) инактивация репрессора путем модуляции его активности;
- 2) разрушение репрессора через направленный протеолиз.

В первом случае репрессор остается физически присутствовать в клетке, но в репрессированном состоянии. Ингибирование репрессора достигается любым из способов модуляции активности, характерных для сигнальных систем. Это может быть связывание репрессора регуляторным белком-ингибитором, ковалентная модификация молекулы репрессора или ее взаимодействие с низкомолекулярными регуляторами. Наиболее распространенный способ «выключения» репрессора является его ковалентная модификация киназами или фосфатазами (фосфорилирование / дефосфорилирование).

Второй механизм связан с функционированием убиквитин-зависимого селективного протеолиза. Принцип этого механизма заключается в том, что под действием специфического внешнего сигнала репрессоры определенного типа узнаются убиквитирующей протеиновой лигазой, которая присоединяет к белковому субстрату полиубиквитиновые метки. Меченные таким способом репрессоры в дальнейшем подвергаются деградации в протеасомной системе.

3 Система убиквитин-опосредованной деградации белков.

Во всех живых клетках происходит постоянное обновление структурных блоков и функциональных систем клетки. Белки, пришедшие в негодность в результате необратимой денатурации, и по этой причине не способные выполнять свои функции, разрушаются протеазами, а образованные в результате протеолиза свободные аминокислоты используются для синтеза новых белков. Протеазы узнают белки с нарушенной структурой по ряду характерных признаков, например, по наличию на поверхности молекул гидрофобных аминокислот.

Существует также механизм, который отличается от обычного протеолиза тем, что он приводит к разрушению белков, не обладающих признаками нарушения структуры и функциональной активности, и при этом протеолизу подвергаются не все белки, а только лишь белки определенного

типа. Такой механизм называют **селективным** или **направленным протеолизом**.

Селективный протеолиз осуществляется в два этапа. Сначала белки, предназначенные для разрушения, распознаются особым мультиполипептидным комплексом, который присоединяет к особым участкам этих белков полиубиквитиновые цепочки. Этот комплекс называют **убиквитинирующей протеиновой лигазой** и в общей системе убиквитинирования обозначают E3. Затем убиквитинированные белки привлекаются к 26S протеасоме и разрушаются. Поскольку в описываемом механизме разрушению белков предшествует их убиквитинирование, его называют также убиквитин-опосредованным протеолизом белков.

Этап первый – выбор субстрата. Убиквитин и убиквитинирование. **Убиквитин** – это низкомолекулярный высоко консервативный белок с молекулярной массой 8,5 кД. Он состоит из 76 аминокислотных остатков и обладает кислыми свойствами, так как содержит значительное количество остатков дикарбоновых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Полипептидную цепь убиквитина с карбокситерминальной стороны молекулы замыкает остаток глицина, через карбоксильную группу которого осуществляется конъюгирование убиквитина с белками-мишенями или друг с другом посредством образования изопептидной связи. В состав убиквитина входят 7 остатков лизина, занимающие положения 6, 11, 27, 29, 33, 48 и 63. Через эти лизиновые остатки возможна конъюгация убиквитинов друг с другом. Убиквитин у эукариот кодируется несколькими генами, а синтез осуществляется в виде неактивного полиубиквитинового предшественника или отдельной копии, сшитой с рибосомными белками. Процесинг убиквитина протекает с участием деубиквитинирующих ферментов.

Убиквитин-подобные белки. В природе были обнаружены белки, близкие по структуре убиквиту. Низкомолекулярные белки, обладающие высокой степенью сходства с убиквитином, подразделяют в две группы: 1) **белки с убиквитин-подобным доменом (UDP – ubiquitin-domain proteins)** и 2) **убиквитин-подобные модификаторы (Ubl – ubiquitin-like modifiers)**. Белки с убиквитин-подобным доменом (UDP) не образуют конъюгатов с белками. Взаимодействуя за счет слабых связей с убиквитином или убиквитин-подобными модификаторами, они выполняют роль адаптеров. Убиквитин-подобные модификаторы (Ubl), так же, как и убиквитин, способны конъюгировать с белками через карбокситерминальный глицин. К убиквитинподобным модификаторам относятся SUMO (Small ubiquitin-like modifier), NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8), ISG15 (IFN-stimulated gene 15), FAT10 (F-adjacent transcript 10) и другие.

Убиквитинированием называют образование изопептидной связи между ε-аминогруппой остатка лизина белка-мишени и карбоксильной группой C-концевого глицина убиквитина. Убиквитинирование является одной из возможных посттрансляционных модификаций белков наряду с фосфорилированием, гликозилированием и др.

Процесс убиквитинирования в большинстве случаев не ограничивается присоединением одной молекулы убиквитина. Белок может нести одну или несколько убиквитиновых молекул, а также полиубиквитиновые цепочки разной формы и длины. Большая часть убиквитинированных белков несут полиубиквитиновые группы. Конъюгация двух молекул убиквитина осуществляется путем образования изопептидной связи между С-концевым глицином и ϵ -аминогруппой одного из семи остатков лизина убиквитина. Первоначально были обнаружены полиубиквитиновые цепочки, в которых убиквитины соединены друг с другом через лизин-48. Однако позже было показано, что все семь лизинов убиквитина могут участвовать в образовании полиубиквитиновых групп. Если в процессе полиубиквитинирования используются лизиновые остатки в одном положении, то образуются линейные цепочки. При использовании нескольких сайтов самоконъюгации возможно образование разветвленных полиубиквитиновых структур. Особенности полиубиквитиновой цепочки, то есть ее длина и сайты самоконъюгации, имеют решающее значение в определении судьбы убиквитинированного белка.

Ковалентная модификация белков путем убиквитинирования имеет чрезвычайно разнообразное значение для функциональной активности клеток. Можно выделить три основные группы функций, для которых имеет значение убиквитинирование.

Дегградация белков. Впервые значение убиквитинирования было показано для взаимодействия белков с протеасомами, которое приводило к разрушению убиквитинированных белков. Наиболее распространенным сигналом для протеолиза является полиубиквитиновая линейная цепочка, состоящая из четырех и более убиквитиновых мономеров, которые соединены друг с другом через лизин-48. Считается, что все полиубиквитиновые цепочки, за исключением тех, которые образованы через лизин-63, могут быть использованы в качестве меток для дегградации.

Активность хроматина. Убиквитинированию подвергаются гистоновые белки H2a и H2b. В одной нуклеосоме с убиквитином конъюгируется обычно одна из этих молекул. Наличие убиквитиновой метки характерно для эухроматиновой области генома. Известно, что посттрансляционные модификации нуклеосомных гистонов важны для трехмерной структуры и функциональной активности хроматина, а также клеточной памяти. Убиквитинирование является динамическим процессом, который имеет большее значение для собственно ремоделирования хроматина, а не для поддержания его структуры.

Модуляция активности функциональных белков. Убиквитинирование негистоновых белков не всегда приводит к дегградации, а может только изменять их активность. Как правило, это связано с моноубиквитиновыми или полиубиквитиновыми модификациями с незначительным количеством убиквитиновых мономеров в цепочке. Например, моноубиквитинированные белки участвуют в регуляции трансмембранного переноса, эндоцитоза, экспрессии генов и репарации ДНК.

Полиубиквитиновые линейные цепочки, образованные через лизин-63, важны для генерации сигналов, которые играют ключевую роль в регуляции репарации ДНК, трансмембранного переноса, эндоцитоза, активации протеинкиназ, трансляции и транскрипции.

Убиквитинирующий комплекс. Центральное место в системе убиквитин-опосредованной деградации белков занимает убиквитинирующая лигаза (E3), которая распознает соответствующие белки-мишени и обеспечивает их убиквитинирование. В системе убиквитинирования участвуют еще два фермента (E1 и E2), контролирующие предварительную активацию убиквитина.

Минимальный убиквитинирующий комплекс состоит из трех ферментов:

- 1) E1 – убиквитин-активирующий фермент;
- 2) E2 – убиквитин-конъюгирующий фермент;
- 3) E3 – убиквитинирующая протеиновая лигаза.

На первом этапе происходит активация убиквитина. **Убиквитин-активирующий фермент (E1)** образует тиоэфирную связь между консервативным остатком цистеина и карбокситерминальным остатком глицина убиквитина. Этот процесс требует затраты метаболической энергии в виде АТФ. Затем убиквитин переносится от E1 на **убиквитин-конъюгирующий фермент (E2)**. В этом случае для удержания убиквитина также используется консервативный остаток цистеина фермента. При взаимодействии E2 с третьим компонентом – **убиквитинирующей протеиновой лигазой (E3)** – убиквитин переносится на специфический остаток лизина белка-мишени. В зависимости от типа убиквитин-протеиновой лигазы убиквитин может быть перенесен на молекулу субстрата напрямую от E2, или же убиквитин предварительно ковалентно связывается с реакционным центром E3, а затем присоединяется к субстрату.

Известные убиквитин-протеиновые лигазы по структуре каталитических доменов можно разделить на три группы:

- 1) HECT (Homologous to E6AP Carboxyl Terminus);
- 2) RING (Really Interesting New Gene);
- 3) U-box или PHD.

HECT-домены ковалентно связывают убиквитин, принимая его от конъюгирующего фермента E2, а затем переносят на субстрат. RING- и U-box-содержащие лигазы не образуют тиоэфирной связи с убиквитином, а осуществляют его прямой перенос от E2 на субстрат. В растительных организмах преимущественно функционируют RING-содержащие SCF-подобные убиквитиновые лигазы.

В ряде случаев полиубиквитинирование контролируется дополнительными U-box-домен-содержащими E3-лигазами, которые в системе убиквитинирования также называют E4-лигазы.

В геноме эукариотических организмов кодируются сотни E3-лигаз различных классов, что говорит о чрезвычайной важности этих ферментов.

Структура SCF-подобной убиквитинирующей лигазы. SCF-лигаза является мультимерным комплексом, который состоит из четырех основных субъединиц: RBX, Cullin, F-box, и SKP1.

RBX – каталитическая субъединица. Выполняет собственно лигазную функцию, катализирует перенос убиквитина от убиквитин-конъюгирующего фермента на белок-мишень. Реакционный центр субъединицы содержит домен RING-H2 пальцы. RING-finger-домены E3-энзимов включают мотив из восьми цистеиновых и гистидиновых остатков, содержащий два иона цинка.

Cullin – регуляторная субъединица. Через эту субъединицу осуществляется регуляция активности E3-лигазы. Cullin образует с RBX прочно связанный функционально активный димер, способный катализировать формирование мультиубиквитиновой цепочки.

F- box – обеспечивает выбор субстрата для убиквитинирования. Субъединица имеет лейцин-обогащенный домен F-box, по которому названа субъединица. Через F-box домен осуществляется взаимодействие убиквитинирующей лигазы с белками-мишенями.

SKP1 – структурно-регуляторная субъединица. Объединяет RBX–Cullin димер и F-box субъединицу в единый функциональный комплекс.

Регуляция активности SCF-лигазы. Регуляция активности SCF-лигазы осуществляется в процессе обратимой посттрансляционной модификации субъединицы Cullin путем присоединения/отщепления убиквитин-подобного белка RUB1. Присоединение RUB1 к Cullin во многом напоминает процесс убиквитинирования. Вначале RUB1 активируется гетеродимерным RUB1-активирующим комплексом путем образования тиоэфирной связи между карбокситерминальным аминокислотным остатком RUB1 и цистеином одной из субъединиц RUB1-активирующего фермента. Примечательно, что одна из субъединиц этого фермента гомологична аминотерминальному домену убиквитин-активирующего фермента E1, а вторая – карбокситерминальному домену E1. Затем RUB1 переносится на RUB1-конъюгирующий фермент (RCE1), который присоединяет этот белок на субъединицу Cullin. Удаляется RUB1 от Cullin с помощью сигнасомы COP9.

Как показывают исследования, для развития нормального функционирования E3-лигазы очень важно поддержание циклического конъюгирования/удаления RUB1. Точная роль данного регуляторного цикла еще не выяснена. Существует несколько предположений на этот счет. Согласно одному из них, присоединение RUB1 к Cullin и его удаление может быть связано с изменением компарментации SCF-подобной убиквитиновой лигазы. Другая гипотеза предполагает, что RUB1-конъюгационный цикл имеет значение в опосредовании взаимодействия SCF-подобной убиквитиновой лигазы с 26S протеасомой.

Связывание субстрата с убиквитинирующей лигазой. Одним из ответственных этапов убиквитин-опосредованного протеолиза белков является выбор белка-мишени убиквитинирующей лигазой. Общий принцип механизма узнавания связан с формированием комплементарных

поверхностей, позволяющих специфическое взаимодействие протеиновой лигазы и субстрата. Под действием внешних сигналов активируются процессы, стимулирующие изменение структуры белка-мишени или F-box субъединицы лигазы. Как правило, достаточно изменения конформации одного из этих компонентов. При этом поверхность одной молекулы подстраивается под поверхность другой. Если для обеспечения взаимодействия белка-мишени и лигазы E3 необходимо участие третьего компонента, выполняющего роль адаптерного белка, то связывание субстрата лигазой может стимулироваться в результате изменения структуры адаптерного белка.

Таким образом, специфическое взаимодействие лигазы E3 и субстрата обеспечивается процессами, в результате которых стимулируется изменение структуры, по крайней мере, одного из компонентов:

- 1) белка-мишени;
- 2) F-box субъединицы убиквитинирующей лигазы;
- 3) адаптерного белка, через который осуществляется взаимодействие субстрата и лигазы.

При этом не существует универсального механизма – взаимное узнавание белка-мишени и F-box субъединицы лигазы E3 достигается различными способами.

Особенности белков-мишеней убиквитинирующей лигазы. Белки, которые вовлекаются в убиквитин-опосредованный протеолиз, имеют особый участок, необходимый для взаимодействия с F-box доменом убиквитинирующей лигазы. Этот участок молекулы называют **дегроном**, так как он функционально связан с деградацией молекулы. Мутации в области данного домена приводят к увеличению стабильности белка и нарушению процессов, в которых они участвуют.

Белки-мишени, подвергающиеся деградации при воздействии различных сигналов, выполняют разнообразные функции, преимущественно регуляторные. Значительная часть таких белков являются транскрипционными регуляторами. Например, репрессоры транскрипции ауксин-регулируемых генов семейства Aux/IAA убиквитинируются под действием ауксина и впоследствии разрушаются 26S протеасомой. Особый участок молекулы, состоящий из 13 аминокислотных остатков (дегрон) определяет уровень стабильности белка. Он необходим для взаимодействия белка-мишени с F-box субъединицей убиквитинирующей лигазы. F-box белки, связывающие репрессоры Aux/IAA (TIR1, AFB1, AFB2, AFB3), одновременно выполняют функции рецепторов ауксина (см. раздел «F-box рецепторы»).

Этап второй – деградация субстрата. 26S протеасома. Протеолитическая активность в клетках эукариот локализована в лизосомах и 26S протеасомах. В лизосомах деградируют только мембранные, а также инородные белки, попавшие в клетку путем эндоцитоза. Большая часть клеточных белков (до 90%) разрушается 26S протеасомами. 26S протеасома имеет особую структуру, которая позволяет локализовать протеолитическую

активность во внутренней полости комплекса, вход в которую строго регулируется и для большинства белков закрыт. Благодаря этому, присутствие 26S протеасомы в цитоплазме, нуклеоплазме и иных компартментах клетки является абсолютно безопасным для нативных белков. Чтобы попасть в полость 26S протеасомы, белок должен быть помечен особым образом. В качестве метки используется полиубиквитиновая цепочка, состоящая не менее чем из четырех убиквитинов, последовательно соединенных друг с другом через лизин-48. Меченые (убиквитинированные) белки распознаются и связываются 26S протеасомой, разворачиваются с помощью АТФ-зависимых компонентов протеасомы, а затем проникают в ее полость, где подвергаются разрушению. Убиквитиновая метка перед проникновением белка в протеолитическую полость, снимается изопептидазами и разбирается на отдельные убиквитины, которые впоследствии вторично используются для процесса убиквитинирования.

Структура 26S протеасомы. Протеасома состоит из двух основных модулей:

- коровая (каталитическая) 20S протеасома;
- регуляторная 19S частица.

Регуляторные частицы присоединяются к 20S протеасоме с одной или с двух сторон, формируя соответственно структуры с коэффициентами седиментации 26S и 30S. Для обозначения обеих структур обычно используют термин «26S протеасома», вкладывая в него функциональный смысл. Термин «30S протеасома» используется в том случае, если необходимо акцентировать внимание на структуру и физические свойства данного комплекса.

Коровая 20S протеасома. 20S протеасома состоит из 28 субъединиц, которые формируют четыре гептамерных кольца, сложенных в виде стопки друг на друга. У эукариот внешние кольца собраны из семи различных α -субъединиц (обозначаются соответственно α_1 – α_7), а внутренние – из семи β -субъединиц (β_1 – β_7). У прокариот все α - и β -субъединицы идентичные. Внутренняя полость протеасомы разделена на три отдела. Две внешние полости предваряют вход в центральную протеолитическую полость, которая сформирована β -субъединицами. В клетках эукариот протеолитической активностью обладают β -субъединицы трех типов: β_1 проявляют каспазоподобную активность, β_2 – трипсиноподобную и β_5 – хемотрипсиноподобную активность. В прокариотической 20S протеасоме все 14 идентичных β -субъединиц каталитически активны.

Все частицы, из которых собрана 20S протеасома, обладают высокой гомологией и имеют сходную пространственную структуру. Однако α -субъединицы, в отличие от β -субъединиц, имеют дополнительную N-концевую α -спираль. Этот участок молекулы α -субъединицы принципиально важен для ограничения доступа во внутреннюю полость протеасомы. У прокариот все α -субъединицы в равной степени вносят вклад в открывание поры, а у эукариот основная роль принадлежит субъединице α_3 . У этой субъединицы N-концевая α -спираль больше всего выступает в канал и

взаимодействует с остальными шестью α -субъединицами. Свободная 20S протеасома не участвует в протеолизе, так как каналы доступа в протеолитическую полость у нее закрыты. Для открывания канала и активации протеолиза необходимо взаимодействие 20S протеасомы с одной или двумя регуляторными 19S частицами.

Регуляторная 19S частица. 19S частица состоит как минимум из 17 субъединиц. Кроме основных субъединиц в состав 19S частицы могут входить дополнительные белки, принимающие участие в сборке и регуляции активности протеолитического комплекса.

В структуре 19S частицы принято различать основание и крышку. Девять субъединиц формируют основание частицы, которое крепится на полюсах 20S протеасомы. Шесть из девяти субъединиц основания обладают АТФ-азной активностью. Остальные субъединицы 19S частицы образуют крышку.

Присоединение 19S частицы к 20S протеасоме сопровождается конформационными перестройками в аминотерминальных областях α -субъединиц внешних гептамерных колец. В результате этого поря протеасомы переходит в открытую конформацию. Однако доступ в протеолитическую полость строго контролируется регуляторной частицей, наиболее важной функцией которой является избирательное связывание субстрата.

Особенности функционирования 26S протеасомы. Субстрат узнается по наличию полиубиквитинированных групп и связывается несколькими субъединицами. В узнавании и связывании субстрата, помимо субъединиц 19S частицы, могут принимать участие лабильно ассоциированные с ней вспомогательные белки. Субъединицы, принимающие участие в узнавании субстрата, не только распознают пространственную структуру полиубиквитиновой цепи, но и способствуют правильной ориентации убиквитинированного субстрата на протеасоме. Корректное расположение субстрата позволяет его дальнейшее разворачивание и транслокацию в протеолитическую полость за счет АТФ-азной активности субчастиц основания 19S частицы. Разворачивание полипептидной цепи является необходимым условием, так как размер поры 20S протеасомы не позволяет белку с развитой пространственной структурой проникать в канал протеасомы.

В процессе взаимодействия субстрата с протеасомой стимулируется изопептидазная (деубиквитинирующая) активность одной из субъединиц крышки 19S частицы. Полиубиквитиновые цепочки снимаются с субстрата и расщепляются изопептидазами на отдельные убиквитины, которые вторично могут быть использованы в убиквитинировании.

Попадая в протеолитическую полость 26S протеасомы, полипептидные цепи белков-субстратов гидролизуются до коротких полипептидов, включающих от 3 до 25 аминокислотных остатков.

В эукариотических клетках 26S протеасомы могут диссоциировать на 20S и 19S частицы, которые способны вновь объединяться в функционально

активные 26S протеасомы. Кроме 19S частицы, существует множество белков, которые способны взаимодействовать с 20S протеасомой и формировать альтернативные формы протеасомы. Основным отличием таких протеасом является их неспособность связывать убиквитинированный субстрат и отсутствие АТФ-азной активности. Данные протеасомы используются клеткой для убиквитин-независимого протеолиза. Убиквитин-независимый протеолиз может быть связан с такими функциями:

- гидролиз коротких пептидов до аминокислот;
- участие в репарации ДНК (разрушение хроматиновых белков для обеспечения доступа к ДНК ферментам репарации);
- разрушение денатурированных белков (белки с нарушенной структурой часто имеют на поверхности молекулы обширные гидрофобные участки развернутой цепи, которые узнаются протеасомой; гидролиз белков с нарушенной структурой часто не требует затраты АТФ на разворачивание цепи);
- процессинг белков (как правило, эндопротеолиз – разрыв в полипептидную цепь вносится на значительном удалении от концов молекулы белка; в полость протеасомы проникает полипептидная цепь, сложенная в виде шпильки).

Тема 2. Рецепция внешнего сигнала

- 1 Общая характеристика клеточных рецепторов.
- 2 Лиганд-связывающие рецепторы.
- 3 G-белок сопряженные рецепторы, каналоформеры, внутриклеточные рецепторы.

1 Общая характеристика клеточных рецепторов.

Что такое рецептор? Рецепторы являются частью сигнальной системы клеток, обеспечивающей восприятие внешних стимулов. Во избежание путаницы следует заметить, что в физиологии животных термин «рецептор» используется также для обозначения части сенсорной системы организма (анализатора). В данном случае рецептором называют сложное многоклеточное образование, которое состоит не только из чувствительных клеток, специализированных на восприятии внешних раздражителей, но включает также нервные окончания дендритов чувствительных нейронов, глии, специализированные образования, сформированные из межклеточного вещества и клеток других тканей. Функция таких рецепторов заключается в преобразовании воздействия раздражителя в нервный импульс. Таким образом, рецептор, который является частью анализатора и представляет собой **многоклеточную** структуру, необходимо отличать от клеточного рецептора, являющегося **молекулярным** образованием.

Клеточный рецептор – это макромолекула или олигомерный белковый комплекс, способный специфически реагировать на определенное внешнее воздействие и запускать внутриклеточный сигнальный каскад,

приводящий к формированию специфического ответа на это воздействие посредством изменения функциональной активности клетки.

Далее для обозначения клеточного рецептора мы будем использовать термин «рецептор».

В клетках рецепторы присутствуют в значительном количестве и разнообразии. Их различают по многим критериям, и главным образом, по:

- типу воспринимаемого сигнала;
- локализации;
- структурным особенностям;
- механизму активации.

Растительные клетки способны реагировать на разные стимулы: химические соединения, свет, температуру, прикосновение, механическое воздействие, гравитацию и др. В рамках учебного курса мы будем рассматривать две наиболее изученные группы рецепторов: химические (лиганд- связывающие) и световые.

Клеточные рецепторы могут располагаться в различных частях клетки. В зависимости от их расположения, различают внешние и внутренние рецепторы. Внешние рецепторы локализуются на плазматической мембране, а внутренние – внутри клетки. Внешние химические рецепторы являются преимущественно трансмембранными белками, у которых лиганд-связывающие домены расположены на экстраклеточной поверхности плазмалеммы, а регуляторные – с цитоплазматической стороны. Внутренние рецепторы могут быть связаны с эндомембранами, находиться в растворимом состоянии, а также входить в состав мультимерных белковых комплексов.

Структурно-функциональные особенности рецепторов. Субъединичная и доменная структура. Рецепторы могут быть мономерными молекулами и состоять из нескольких субъединиц. В ряде случаев субъединичный состав молекулы рецепторов изменяется в процессе активации. Так, рецепторные киназы в неактивном состоянии могут находиться в мономерном состоянии, но при активации димеризуются.

Среди основных структурных модулей следует выделить три домена:

- **рецепторный** – обеспечивает восприятие сигнала, например, связывание лиганда;
- **регуляторный** – необходим для взаимодействия с сигнальными партнерами, через него осуществляется передача сигнала;
- **домен локализации** – участок, определяющий локализацию рецептора.

Остальные функциональные домены характерны для определенных групп рецепторов.

Например, рецепторы могут иметь участки регуляции собственной активности. Эти участки или содержат сайты посттрансляционной модификации или служат для связывания с аллостерическими регуляторами разной природы (белками, низкомолекулярными веществами, ионами). В

зависимости от статуса клетки, активность рецептора через данные участки может усиливаться, ослабляться или полностью ингибироваться.

Для рецепторных киназ характерно наличие киназного домена, в который входят реакционный центр, а также множественные сайты автофосфорилирования. Процесс автофосфорилирования является необходимой частью механизма активации этого типа рецепторов.

Основные механизмы активации рецепторов. Механизмы активации рецепторов имеют различный характер, однако в большинстве случаев они сводятся к формированию связывающей поверхности, через которую осуществляется взаимодействие рецептора с даунстрим сигнальными посредниками, что необходимо для передачи сигнала. Только в случае рецепторов-каналоформеров, которые совмещают функцию рецепторов и ионных каналов, сигнал передается посредством изменения концентрации ионов, выполняющих роль вторичных мессенджеров.

1. Изменение конформации. Изменения конформации молекулы рецептора, стимулированные в результате восприятия сигнала, приводят к формированию связывающей поверхности, необходимой для взаимодействия рецептора с даунстрим сигнальным партнером. Для некоторых рецепторов это событие является достаточным для передачи сигнала.

2. Ковалентная модификация. Изменение пространственной структуры ряда рецепторов является первым этапом активации, тогда как поверхность взаимодействия формируется в результате последующей посттрансляционной ковалентной модификации. Этот механизм характерен для рецепторных киназ. Он сводится к тому, что в результате рецепции и изменения конформации у рецепторов повышается сродство друг к другу – они образуют гомодимерные конструкции и взаимно фосфорилируют друг друга. Фосфорилирование приводит к формированию связывающей поверхности. Ковалентная модификация рецепторов может также осуществляться вспомогательными регуляторными компонентами, обладающими каталитической активностью. Посредством такого механизма регулируется способность рецептора не только взаимодействовать с даунстрим сигнальным партнером, но и воспринимать внешний сигнал.

3. Высвобождение рецептора из связанного состояния. Существует группа рецепторов, которые в неактивном состоянии связаны с белком (часто шапероном), закрывающим доступ к определенным участкам поверхности молекулы рецептора, необходимым для проявления или регуляции его функциональной активности. В результате рецепции неактивный комплекс распадается, рецептор высвобождается и приобретает возможность передавать сигнал. Наиболее важными участками рецепторных молекул, которые могут экранироваться регуляторами, являются:

- **участки взаимодействия с мишенями:** открывание участка позволяет рецептору связываться с мишенями и модулировать их активность;
- **домены локализации:** изменение локализации рецепторов необходимо для пространственного разобщения или сближения рецептора и мишени;

- **регуляторные домены:** участки взаимодействия с аллостерическими регуляторами или сайты посттрансляционной модификации, через которые осуществляется регуляция активности рецептора.

4. Перераспределение рецептора между плазмалеммой и эндосомной фракциями. Этот механизм актуален только для мембраносвязанных рецепторов. Посредством этого механизма часть плазматической мембраны, содержащей рецепторы определенного типа, путем эндоцитоза переходит в эндосомы. Возможен обратный процесс – слияние эндосом с плазмалеммой. Таким образом, рецепторы изымаются из мембраны или возвращаются в нее. Переход рецептора из плазмалеммы в эндосомы имеет как минимум два значения, противоположных по значению:

- удаление рецептора из плазмалеммы делает невозможным его взаимодействие с лигандами, что приводит к прерыванию сигнала;
- переход в эндосомы является своеобразным механизмом доставки активированного рецептора к внутриклеточным мишеням, что в ряде случаев является необходимым условием для передачи сигнала.

Активация рецепторов и передача сигнала часто представляют собой достаточно сложные процессы, которые включает в себя несколько разнообразных механизмов. Например, рецепторы брассиностероидов, которые являются рецепторными киназами, в процессе активации фосфорилируют друг друга, а также подвергаются фосфорилированию корецепторными молекулами и другими регуляторами. Кроме этого, каталитическая активность брассиностероидного рецептора направлена на даунстрим сигнальный посредник, а в некоторых случаях механизм передачи сигнала предполагает образование и транслокацию эндосомных везикул.

Функциональная активность. По функциональной активности рецепторы можно разделить на две условные категории: классические и рецепторы с двойной функцией.

Классические рецепторы не выполняют никаких иных функций кроме собственно рецепции и передачи сигнала.

Рецепторы с двойной функцией помимо рецепции выполняют иные функции. К данной группе можно отнести рецепторы-каналоформеры – трансмембранные белковые комплексы, которые совмещают функцию рецепторов и ионных каналов. Существуют также внутриклеточные рецепторы с двойной функцией. Например, рецептор ауксина TIR1 является частью убиквитинирующей протеиновой лигазы. TIR1 – это F-box белок, функцией которого является выбор и связывание субстрата для убиквитинирования. Рецептор TIR1 приобретает сродство к белку-субстрату только в результате рецепции ауксина.

2 Лиганд-связывающие рецепторы.

Существует огромное количество клеточных рецепторов, которые специфически связывают химические соединения (лиганды) определенного типа. Такими веществами могут быть гормоны, другие биологически активные вещества с гормоноподобным действием, элиситоры, трофические

соединения (сахара, аминокислоты), ионы (например, нитраты) и др. Экстраклеточные лиганды, которые специфически взаимодействуют с рецепторами, называют **первичными мессенджерами**. Специфическое связывание с первичными мессенджерами провоцирует конформационные изменения рецептора, необходимое для запуска трансдукции внутриклеточного сигнала. Следует заметить, что с конкретным химическим рецептором могут связаться соединения разной природы, однако далеко не все способны активировать сигнальную систему. Специфичность взаимодействия, позволяющая стимулировать процесс передачи сигнала, возможна только при взаимодействии рецептора с определенным типом лиганда, который называют также активным агонистом.

Химический рецептор обладает определенной степенью **аффинности** (сродства) к лиганду. Значение аффинности во многом зависит от концентрации лиганда в тканях организма. Любой рецептор настроен на определенный уровень концентрации агониста, при котором возможно эффективное связывание. Например, трофические соединения присутствуют в значительно больших концентрациях, чем регуляторы гормональной природы. Соответственно, рецепторы, специфичные к трофическим соединениям, обладают более низким сродством к агонистам, чем рецепторы гормонов и гормоноподобных регуляторов.

Прочность связывания рецептора с лигандом (аффинность) является важной кинетической характеристикой и выражается константой диссоциации (KD), значение которой равно концентрации лиганда, при которой половина рецепторов связана с лигандом. Чем ниже константа диссоциации, тем более низкие концентрации лиганда требуются для связывания с рецептором. Низкие значения KD также являются признаком более прочно связанного комплекса рецептор-лиганд и более продолжительного время его существования. Взаимодействие рецептора и лиганда может иметь различный временной характер. Однако для эффективной работы сигнальной системы клетки важное значение имеет не только прочность связывания рецептора с лигандом, но также и скорость диссоциации рецептора и лиганда. Изменение условий может привести к необходимости быстрого прекращения стимуляции рецептора лигандом, а этого легче достичь при сравнительно низкой аффинности. По этой причине константа диссоциации большинства рецепторов с лигандами чаще имеет промежуточные значения и оценивается в среднем 10^{-9} – 10^{-7} М, но у различных рецепторов может варьировать в значительных пределах.

Один и тот же лиганд может связываться различными типами специализированных рецепторов, которые обладают разным сродством к лиганду. Например, у растений обнаружено множество этиленовых рецепторов (гистидиновых киназ), которые связывают этилен в диапазоне концентраций $0,1 \cdot 10^{-9}$ М – $5 \cdot 10^{-9}$ М. По степени сродства с этиленом их разделяют на две группы: высокоаффинные и низкоаффинные рецепторы. Период полураспада комплекса высокоаффинных этиленовых рецепторов с лигандом *in vitro* достигает 6 часов и более, тогда как для второй группы,

низкоаффинных рецепторов, эта величина не превышает 30 минут. По-видимому, наличие рецепторов с различной аффинностью к лиганду необходимо для того, чтобы отличать концентрации, в которых присутствует лиганд в ткани. Это имеет принципиальное значение в регуляторном отношении, поскольку разные типы рецепторов (в ответ на различные концентрации лиганда) могут стимулировать неоднозначные сигнальные механизмы. Кроме того, важным может быть продолжительность поддержания сигнала. Например, в стрессовых условиях воздействие этилена на рецепторы актуально только лишь при влиянии неблагоприятного фактора, то есть эта реакция обратима при изменении условий. В то же время, процессы созревания сочных плодов или старения органов представляют собой своего рода векторные механизмы, которые можно ускорить или замедлить, но невозможно отменить. Хотя данных об аффинности рецепторов этилена, участвующих в описанных механизмах, нет, можно предположить, что для обратимых процессов используются рецепторы с меньшим сродством, по сравнению с процессами необратимыми. Косвенно это подтверждается тем, что в ювенильных и зрелых тканях растений поддерживается экспрессия генов, кодирующих различные наборы этиленовых рецепторов.

На плазматической мембране или внутри клетки находится огромное количество различных рецепторов. Рецепторы определенного типа могут присутствовать в разной копиях, причем в некоторых случаях их количество может достигать несколько тысяч в расчете на одну клетку. Так, на плазматической мембране типичной животной клетки насчитывается 10 000 – 20 000 рецепторов одного типа. Причем для активации специфического ответа достаточно стимуляции не более 2% гормон-специфических рецепторов. Такая большая концентрация рецепторов, вероятно, необходима для ответа на низкие концентрации лиганда.

Локализация лиганд-связывающих рецепторов. Расположение лиганд-связывающих рецепторов во многом определяется природой лиганда, который они воспринимают в качестве сигнала. Липорастворимые лиганды легко проникают через плазмалемму внутрь клетки путем обычной диффузии сквозь билипидный слой или через специализированные переносчики посредством облученной диффузии. Такие сигнальные молекулы могут связываться и с внешними, и с внутренними рецепторами. Например, стероидные гормоны животных легко проникают в клетку вследствие липофильных свойств и связываются с рецепторами, локализующимися в цитоплазме или в нуклеоплазме. Вместе с тем, наличие внутриклеточных рецепторов для липофильных регуляторов, по-видимому, не является обязательным. Растительные стероидные гормоны, брассиностероиды, близки по своей природе животным аналогам, хотя растительные и животные стероидные регуляторы и имеют существенные различия в кольце В. Известные рецепторы брассиностероидов локализуются на плазмалемме, а существуют ли их внутриклеточные рецепторы, не известно. С другой стороны, рецепторы растительного гормона этилена, идентифицированные

до настоящего времени, располагаются исключительно на плазмалемме, хотя этилен достаточно легко диффундирует через мембраны.

Такие растительные гормоны, как ИУК, АБК и гиббереллины являются слабыми кислотами, вследствие чего имеют переходные свойства растворимости. В кислых условиях их молекулы протонируются и приобретают электронейтральное состояние, при котором данные вещества хорошо растворяются в липидной фазе и поэтому легко проникают в клетку. Однако в щелочных условиях эти гормоны теряют протон и переходят в ионное состояние (ИУК^- , АБК^- , ГК^-), которое обеспечивает им гидрофильные свойства. Межклеточное пространство у растений (апопласт) имеет низкие значения pH, при которых слабые кислоты не заряжены. Поэтому диффузия ИУК, АБК и гиббереллинов через плазматическую мембрану из апопласта внутрь клетки происходит достаточно легко. Обратный выход гормонов из клетки затруднен и требует затраты дополнительной энергии. Таким образом, слабокислотные свойства данных гормонов, а также распределение заряда относительно плазмалеммы позволяют внутриклеточную локализацию их рецепторов. Предполагается, что рецепторы этих гормонов локализуются на плазмалемме и внутри клетки. Однако для всех трех групп гормонов в настоящее время обнаружены внутриклеточные рецепторы, а внешний рецептор идентифицирован только для ИУК. Внешний рецептор ауксина ABP1 (auxin binding proteins 1) является поверхностным белком, который расположен на внешней поверхности плазмалеммы. Предполагается, что ABP1 взаимодействует с трансмембранным белком, через который осуществляется передача сигнала внутрь клетки.

Многие гормоны совсем не проникают в клетку, или этот процесс осуществляется с трудом. Препятствует этому полярность молекулы (в том числе наличие заряда) или ее большие размеры. Примером гормонов с большой молекулярной массой являются полипептидные гормоны. Все они, включая даже относительно низкомолекулярные растительные гормоны, такие как фитосульфокины (группа сульфатированных по тирозину тетра- и пентапептидов), связываются со специфическими рецепторами на внешней поверхности плазмалеммы.

Внешние рецепторы. Рецептор-подобные киназы. Рецептор-подобные киназы являются мономерными интегральными белками, пересекающими мембрану один раз. Они локализуются на плазматической мембране, но обнаруживаются также в микросомной фракции.

К рецептор-подобным киназам относятся рецепторы брассиностероидов, многих элиситоров, а также все идентифицированные до нынешнего времени рецепторы пептидных гормонов.

Молекула рецептор-подобных киназ состоит из трех основных структурных элементов.

1. Экстраклеточный (рецепторный) домен формируется N-терминальным районом молекулы. Согласно строению этого домена различают четыре основные группы рецептор-подобных киназ: LRR-группа

(лейцин-обогащенные повторы – leucine riched repeat); S-домен группа; лектин-подобный домен; EGF.

2. Трансмембранный домен представлен α -спиральным участком, который пронизывает мембрану один раз, соединяя внешнюю и внутриклеточную части рецепторной молекулы.

3. Цитоплазматический домен – внутриклеточная часть рецептора, сформированная С-терминальным участком. Включает **регуляторный** фрагмент, который содержит каталитический киназный центр, множественные сайты фосфорилирования и участки взаимодействия с сигнальными молекулами. Киназная активность рецептор-подобных киназ может быть направлена на рецепторы (себе подобные молекулы), корецепторы и другие мишени, в качестве которых могут выступать различные регуляторы, а также даунстрим сигнальные белки, на которые передается сигнал.

Механизм передачи сигнала. Восприятие сигнала (связывание агониста) осуществляется экстраклеточным доменом рецептора. Связывание лиганда способствует изменению конформации рецепторной области молекулы, но мало отражается на структуре цитоплазматического домена. Вместе с тем, изменение конформации внешнего домена способствует повышению сродства рецепторных молекул друг к другу. Поскольку молекулы рецептор-подобных киназ могут латерально диффундировать по мембране, они способны образовывать димерные комплексы (рецептор-рецептор). В механизме активации рецепторных киназ могут участвовать также корецепторы.

За счет сближения двух рецепторов активируются киназные центры, и рецепторные молекулы фосфорилируют друг друга по остаткам серинов и треонинов в разных участках цитоплазматического домена. Этот процесс называют **автофосфорилированием** или точнее **трансмолекулярным автофосфорилированием**, так как рецепторные молекулы фосфорилируют не самих себя, а себе подобные молекулы. Источником фосфорных групп выступает АТФ. Некоторые рецептор-подобные киназы обладают двойной специфичностью и способны помимо остатков серина и треонина фосфорилировать также остатки тирозина.

Автофосфорилирование рецепторов является необходимым начальным этапом их активации, но, как правило, недостаточным для передачи сигнала. В процессе автофосфорилирования подготавливается поверхность для взаимодействия с корецепторами. Например, автофосфорилирование рецепторов брассинолида BKI1 (BRI1 kinase inhibitor 1) необходимо для последующего связывания с корецептором BAK1 (BRI1-associated kinase 1), без участия которого невозможна окончательная активация рецептора.

Корецептор рецептор-подобных киназ обладает сходной с рецептором структурой, но не имеет лиганд-связывающего домена. Корецептор в процессе активации образует гетеродимеры с рецептором и участвует во взаимном фосфорилировании. В некоторых случаях образуются гетеротетрамеры, состоящие из двух молекул рецептора и двух молекул

корцептора. Многие корцепторы могут взаимодействовать с различными рецептор-подобными киназами. Так, корцептор BAK1 участвует в активации рецептора брассинолида BRI1, а также флагеллин-связывающего рецептора FLS2 (flagellin sensitive 2). Исследователи часто называют BAK1 универсальным корцептором.

Взаимное фосфорилирование рецептора и корцептора (трансфосфорилирование) направлено на подготовку рецептора к передаче сигнала. В результате рецептор приобретает способность воздействовать на следующий компонент сигнальной системы.

Передача сигнала рецептор-подобными киназами возможна двумя способами:

- 1) путем межмолекулярного взаимодействия с даунстрим сигнальным посредником (ассоциация или диссоциация);
- 2) посредством ковалентной модификации сигнального посредника (активация киназной активности рецептор-подобной киназы в отношении даунстрим посредника).

В обоих случаях воздействие рецептора способствует модуляции активности сигнального посредника, а следовательно, передаче сигнала.

Таким образом, трансдукция сигнала через рецептор-подобные киназы не требует проникновения лиганда внутрь клетки, а механизм передачи сигнала можно представить в такой последовательности:

- 1) связывание лиганда с рецептором;
- 2) образование димеров рецепторных молекул;
- 3) трансмолекулярное автофосфорилирование рецепторов;
- 4) образование гетерополимерных комплексов с корцепторами;
- 5) трансфосфорилирование между рецепторами и корцепторами;
- 6) воздействие рецептора на даунстрим сигнальный посредник и модуляция его активности (передача сигнала).

Механизмы передачи сигнала в каждом конкретном случае могут отличаться. Например, рецептор при активации может связываться с даунстрим сигнальным посредником через поверхность, которая формируется в результате авто- и трансфосфорилирования. В других случаях рецептор связан с посредником в неактивном состоянии, а при активации происходит их диссоциация. Кроме этого, рецепторы, корцепторы и сигнальные посредники могут взаимодействовать с различными регуляторами, модулирующими их активность. Разнообразные взаимоотношения между сигнальными партнерами определяют особенности активационного цикла и механизма передачи сигнала.

Гистидиновые рецепторные киназы. Гистидиновые рецепторные киназы первоначально были обнаружены у бактерий. Для эукариотических клеток существование гистидиновых киназ было показано в начале 1990-х годов после открытия у растения *Arabidopsis* этиленового рецептора ETR1, а у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – осмосенсора SLN1. Гистидиновые киназы в изобилии встречаются у растений и бактерий, но у животных они не обнаружены.

У растений гистидиновые рецепторные киназы представлены двумя типами:

- гибридные гистидиновые киназы;
- этиленовые рецепторы.

Рецепторы обеих групп имеют гомологичные участки и в целом обладают сходной структурой. Однако между ними есть принципиальные структурно-функциональные различия. Главное различие заключается в механизме передачи сигнала.

Гибридные гистидиновые киназы. Гистидиновые рецепторные киназы являются частью двухкомпонентных сигнальных систем, функционирующих у растений и бактерий. В профессиональном сленге молекулярных биологов эти рецепторы называют часто «двухкомпонентными гистидиновыми киназами» или «двухкомпонентными рецепторами». В данном случае термин «двухкомпонентный» имеет отношение к типу сигнальной системы и не связан с особенностями структуры рецептора. Гистидиновые рецепторные киназы растений и бактерий имеют гомологичные участки, но отличаются доменным составом. Более сложные по структуре гистидиновые киназы растений называют **гибридными**.

Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы. Двухкомпонентные сигнальные системы бактерий состоят из двух типов молекул:

- 1) гистидиновые рецепторные киназы (His-киназы);
- 2) регуляторы ответа (RR – response regulator).

По этой причине данные сигнальные системы называют **двухкомпонентными**.

Бактериальные гистидиновые рецепторные киназы являются интегральными мономерными белками, которые локализуются на плазмалемме. Молекула рецептора два раза пересекает мембрану N-концевым участком. Обе терминальные области расположены с цитоплазматической стороны. Внешний участок гистидиновой киназы, расположенный между двумя трансмембранными доменами, формирует **рецепторный (input)** домен, или CHASE-домен (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular). Карбокситерминальная часть молекулы рецептора формирует **transmitter** домен, который содержит каталитический киназный центр и консервативный остаток гистидина, который фосфорилируется при трансмолекулярном автофосфорилировании.

Регуляторы ответа состоят из двух основных функциональных структур. Аминотерминальная область молекулы формирует **receiver** домен, содержащий консервативный остаток аспарагиновой кислоты. В карбокситерминальной части регулятора ответа расположен **регуляторный (output)** домен, через который осуществляется модуляция активности мишеней.

Различают регуляторы ответа двух типов:

1) RR- A – регуляторы ответа А-типа модулируют активность функциональных белков.

2) RR- B – регуляторы ответа В-типа являются транскрипционными факторами. У регуляторов ответа В-типа в отличие от RR-А в регуляторном домене имеется дополнительная область (GARP-домен – Glutamic Acid-Rich Protein), необходимый для сайт-специфичного связывания с промоторами генов.

Механизм активации и передачи сигнала. Связывание лиганда His-киназой повышает сродство рецепторов друг к другу, которые проявляют выраженную тенденцию к образованию гомодимерных структур. Сближение гистидиновых киназ стимулирует взаимное фосфорилирование остатков гистидина в transmitter доменах. Затем фосфатная группа переносится с остатка гистидина рецептора на консервативный остаток аспарагиновой кислоты **receiver** домена регуляторов ответа. Следовательно, гистидиновые рецепторные киназы проявляют не только свойства гистидиновой киназы, но и фосфотрансферазы. Регуляторы ответа в фосфорилированном состоянии приобретают способность модулировать активность своих мишеней. Таким образом, передача сигнала в двухкомпонентных сигнальных системах представляет собой **фосфорелейный** механизм (перенос фосфорной группы), который инициируется в результате автофосфорилирования рецептора после рецепции экстраклеточного сигнала.

Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений. У растений, как и у бактерий, функционируют аналогичные сигнальные системы с участием гистидиновых рецепторных киназ и регуляторов ответа. Эти системы у обеих групп организмов имеют общий принцип активации и передачи сигнала, поэтому растительную систему традиционно называют **двухкомпонентной**. Однако у растений двухкомпонентные системы включают дополнительный белковый модуль – **гистидиновую фосфотрансферазу**. Поэтому такие растительные системы называют также **двухкомпонентными многошаговыми сигнальными системами**. Примером подобной системы у растений служит цитокининовая сигнальная система.

Таким образом, двухкомпонентные многошаговыми регуляторные системы растений представлены тремя компонентами:

- 1) гистидиновые гибридные киназы;
- 2) гистидиновые фосфотрансферазы;
- 3) регуляторы ответа.

Гибридные гистидиновые киназы растений близки по структуре бактериальным, но имеют более сложное строение. Они также локализованы на плазматической мембране, имеют два трансмембранных домена, внешний рецепторный домен и цитоплазматический **transmitter** домен, который обладает свойствами гистидиновой киназы и содержит консервативный остаток гистидина. Однако в карбокситерминальной области молекулы рецептора находится дополнительный **receiver** домен, гомологичный **receiver**

домену регулятора ответа. Он также содержит консервативный остаток аспарагиновой кислоты, на который переносится фосфатная группа.

Гистидиновые фосфотрансферазы имеют низкую молекулярную массу и содержат консервативный остаток гистидина, который используется для переноса фосфатной группы. В двухкомпонентной сигнальной системе гистидиновую фосфотрансферазу часто называют **HPt доменом**, а функционально активный остаток гистидина – **вторичным гистидином**. Вторичный гистидин принимает фосфатную группу от остатка аспарагиновой кислоты гесеивер домена гибридной гистидиновой киназы и переносит его на остаток аспарагиновой кислоты гесеивер домена регулятора ответа.

Регуляторы ответа растений сходны с бактериальными. Их молекулы состоят из аминотерминального гесеивер домена, содержащего консервативный остаток аспартата, и карбокситерминального **регуляторного** домена. В механизмах регуляции участвуют два типа регуляторов ответа: модуляторы активности белков (RR-A) и транскрипционные факторы (RR-B).

Механизм функционирования. Рецепция внешнего сигнала гистидиновой гибридной киназой способствует димеризации рецепторных молекул. В составе гомодимерной группы рецепторные киназы фосфорилируют друг друга по остатку гистидина. После этого инициируется трехтактный фосфорелейный механизм. Первый этап осуществляется внутри молекулы рецептора: фосфатная группа переносится от остатка гистидина transmitter домена на остаток аспартата гесеивер домена. Затем фосфатную группу принимает гистидиновая фосфотрансфераза (фосфат присоединяется к остатку вторичного гистидина) и переносит ее на остаток аспартата регулятора ответа. Фосфорилированные регуляторы ответа связываются со своими мишенями и модулируют их активность.

Причины усложнения эукариотических двухкомпонентных систем. Усложнение двухкомпонентных систем у растений связано с усложнением строения эукариотической клетки, по сравнению с прокариотической. У бактерий передача сигнала путем фосфорелейного механизма осуществляется беспрепятственно, так как все компоненты сигнальной системы локализованы в одном компартменте – цитоплазме. Все регуляторы ответа могут контактировать одновременно с цитоплазматическим доменом рецептора и со своими мишенями, в том числе с ДНК. У растений, как и у всех эукариот, ДНК отделена от цитоплазмы ядерной мембраной. Регуляторы ответа В-типа локализованы преимущественно в ядре и не могут непосредственно взаимодействовать с рецепторными гистидиновыми киназами. Этим определяется необходимость участия в фосфорелейном механизме мобильного компонента, обладающего фосфотрансферазной активностью. Функцию такого компонента выполняет гистидиновая фосфотрансфераза (HPt домен). Она принимает на себя фосфатную группу от рецепторной киназы, затем транслоцируется в ядро и передает фосфат на регулятор ответа. Таким образом, компартментация эукариотической клетки

является причиной усложнения двухкомпонентных регуляторных систем растений.

Этиленовые рецепторы. Структура. Рецепторы этилена обладают существенным сходством с гистидиновыми рецепторными киназами, функционирующими в двухкомпонентных сигнальных системах растений и бактерий. Этиленовые рецепторы растений являются интегральными белками, локализованными в плазмалемме. В N-терминальной области они имеют три гидрофобных трансмембранных домена, которыми пересекают мембрану. Аминоконцевой участок молекулы расположен снаружи клетки, а карбокситерминальный – в цитоплазме. Экстраклеточные участки рецепторной молекулы формируют этилен-связывающий домен и участвуют в димеризации молекул. В отличие от двухкомпонентных рецепторов, этиленовые рецепторы всегда существуют в виде гомодимеров, в которых мономеры ковалентно связаны друг с другом. Связь обеспечивается двумя цистеиновыми мостиками, образованными между остатками цистеинов, занимающих положения 4 и 6 в полипептидных цепях рецепторов (cys-4–cys-4', cys-6–cys-6').

Все обнаруженные этиленовые рецепторы растений кодируются одним семейством генов. Однако по структуре цитоплазматической области молекулы их можно разделить на две группы. Рецепторы первой группы имеют значительное сходство с гибридными гистидиновыми киназами растений, а рецепторы второй — с двухкомпонентными рецепторами бактерий.

В цитоплазматической части этиленовых рецепторов обеих групп находится гистидинкиназный каталитический домен и консервативный остаток гистидина, который фосфорилируется при автофосфорилировании. Этот участок молекулы гомологичен transmitter-домену двухкомпонентных рецепторов. Но только рецепторы первой группы в карбокситерминальном районе имеют домены, гомологичные receiver-доменам гибридных гистидиновых киназ и регуляторов ответа. Эти участки содержат консервативные остатки аспарагиновой кислоты.

Примером рецептора, близкого по структуре гибридным гистидиновым киназам растений, является рецептор ETR1 (ethylene triple response 1) арабидопсиса. К рецепторам второй группы относится ERS (ethylene response sensor). Несмотря на структурные различия, ETR1 и ERS обладают 67% гомологией аминокислотной последовательности и выполняют идентичные функции.

Механизм передачи сигнала. Этиленовые рецепторы в составе гомодимера в отсутствии лиганда (этилена) находятся в конститутивно активном состоянии, при котором консервативный остаток гистидина transmitter-домена несет фосфатную группу. В отличие от гистидиновых рецепторных киназ двухкомпонентных регуляторных систем этиленовые рецепторы не участвуют в фосфорелейном механизме. Активные этиленовые рецепторы поддерживают в активном состоянии даунстрим сигнальный компонент – серин/треониновую киназу CTR1 (constitutive triple response 1).

Взаимодействие осуществляется между киназным доменом рецептора и аминотерминальной областью киназы. Киназа CTR1 является негативным регулятором этиленового сигнала, и в отсутствие гормона она активно ингибируется.

Рецепция этилена стимулирует изменение конформации рецептора и его инактивацию. Это приводит к последующей инактивации киназы CTR1 и дерепрессии системы этиленового сигнала.

Таким образом, этиленовые рецепторы принципиально отличаются от всех других рецепторных киназ механизмом рецепции и передачи сигнала. Основными отличительными характеристиками этиленовых рецепторов являются:

- 1) постоянное пребывание в гомодимерном состоянии;
- 2) конститутивная активность в отсутствие лиганда;
- 3) инактивации в результате рецепции;
- 4) передача сигнала осуществляется за счет изменения конформации;
- 5) киназная активность в отношении даунстрим сигнальных партнеров не проявляется;
- 6) фосфорелейный механизм не иницируется.

3 G-белок сопряженные рецепторы, каналоформеры, внутриклеточные рецепторы.

У животных в плазматической мембране клеток в значительном количестве и разнообразии присутствуют рецепторы, имеющие 7 трансмембранных доменов. Эти рецепторы функционально связаны с гетеротримерными G-белками и составляют с ними устойчивую сигнальную пару. Структурные и функциональные особенности данного семейства рецепторов определяют их названия: **7ТМ** (семитрансмембранные) или **GPCR (G-Protein Coupled Receptor)** – G-белок сопряженные рецепторы. Ранее их называли также серпентиновыми или змееподобными рецепторами, однако в современной литературе эти термины постепенно выходят из употребления.

GPCR – это большой класс мономерных рецепторов, которые выполняют самые разнообразные сигнальные функции у животных. К данному типу относятся вкусовые, обонятельные, адренергические, мускариновые ацетилхолиновые и другие рецепторы. Все они имеют общий принцип строения и функционирования, а различаются лиганд-специфичностью, то есть способностью воспринимать разные внешние сигналы.

Полипептидная цепь GPC-рецепторов семь раз пронизывают мембрану. N-терминальный участок полипептида располагается на экстраклеточной стороне плазматической мембраны, а С-концевая область – на цитоплазматической. Некоторые аминокислотные остатки внешеклеточных областей полипептидной цепи (N-концевой и межатрансмембранные участки) рецепторной молекулы гликозилированы. Олигосахаридные группы играют существенную роль в формировании лиганд-связывающего участка

рецептора. Цитоплазматическая С-терминальная область GPCR формирует участок связывания G-белка, через который опосредуется передача сигнала на G-белок. Гетеротримерный мембраносвязанный G-белок является обязательным компонентом сигнальных механизмов, которые стимулируются через G-белок сопряженные рецепторы.

Существует множество типов GPC-рецепторов, специфичных к лигандам различной химической природы. Они связывают пептидные и гликопротеиновые гормоны, амины, нуклеотиды, эйкозаноиды, аминокислоты, ионы кальция и т. д. Кроме того, есть рецепторы, активация которых осуществляется протеазами, отрезающими экстраклеточный участок рецепторной молекулы. Трансдукция сигнала от рецептора на G-белок осуществляется при рецепции, в результате которой изменяется конформация рецепторной молекулы. Активированный G-белок диссоциирует на α -субъединицу и $\beta\gamma$ -димер, которые взаимодействуют с последующими сигнальными белками.

G-белки GPCR-типа (GTG). Секвенирование генома *Arabidopsis* позволило постулировать существование GPCR у растений. Однако применение жестких критериев идентификации не позволило подтвердить наличия семи трансмембранных доменов у продуктов генов, кодирующих гипотетические GPCR, а также их мембранную локализацию и способность взаимодействовать с α -субъединицей гетеротримерного G-белка. Таким образом, еще не известно, существуют ли у растений типичные GPCR животного типа. Не исключено, что у растений подобные мембранные рецепторы имеют особую «растительную» структуру и способ функционирования. Примером таких особых рецепторов являются белки GTG, которые являются предположительными рецепторами АБК.

У растений *Arabidopsis* были обнаружены два белка (GTG1 и GTG2), обладающих существенной гомологией с одним из GPCR человека и имеющих рецептор-подобную топологию.

В отличие от GPCR, в структуре белков GTG присутствуют:

- 1) девять трансмембранных доменов;
- 2) АТФ/ГТФ-связывающий домен;
- 3) домен, ответственный за усиление ГТФазной активности.

Очищенные GTG1 и GTG2 связывают ГТФ и проявляют ГТФазную активность. Поскольку эти белки гидролизуют ГТФ и обладают сходством с GPCR, их назвали G- белками GPCR- типа (GPCR-Type G Protein – GTG).

Помимо структурных особенностей, GTG обладают свойствами, которые существенно отличают их от известных G-белок-сопряженных рецепторов животных.

Наличие ГДФ или ГТФ в гуаниннуклеотид-связывающем домене (ГДФ- и ГТФ-связанная конформация) определяет сродство GTG к АБК. ГДФ-связанная форма GTG связывает АБК и инициирует передачу сигнала АБК, а ГТФ-связанная форма GTG теряет сродство к гормону.

Считается, что переход между двумя основными конформациями обеспечивает механизм регуляции распространения сигнала АБК. Следует

отметить, что цикл активации GTG отличается от циклов активации гетеротримерных и мономерных G-белков. Все известные G-белки активируют сигнальную систему в ГТФ-связанной форме, тогда как GTG в этой форме пребывает в неактивном состоянии.

Рецепторы-каналоформеры. Изменение направления и интенсивности транспорта ионов способствует осцилляциям их внутриклеточной концентрации. Этот феномен используется в механизмах трансдукции сигнала. Ионные каналы могут быть как промежуточными компонентами сигнальной цепи, так и рецепторами, воспринимающими экстраклеточные сигналы. Рецепторы, которые одновременно являются ионными каналами, называют **рецепторами-каналоформерами** ионотропными рецепторами.

Примером рецептора этого класса является ацетилхолиновый рецептор никотинового типа у животных (название обусловлено сродством рецептора к никотину). В отличие от мускаринового ацетилхолинового рецептора, относящегося к GPCR, никотиновый рецептор формирует неспецифический ионный канал, который проводит ионы Na^+ и K^+ .

Ацетилхолиновые никотиновые рецепторы состоят из различных комбинаций пяти типов субъединиц (α , β , γ , δ , ϵ), причем в структуру любого ацетилхолинового рецептора входят две α -субъединицы, на которых находятся участки связывания ацетилхолина. Полипептидные цепи всех субъединиц четыре раза пронизывают плазмалемму. N- и C-концевые домены находятся снаружи клетки и гликозилированы. Цитоплазматические области рецепторной молекулы взаимодействуют с компонентами цитоскелета – тубулиновыми и актиновыми белками.

Ацетилхолиновые рецепторы-каналоформеры, располагаются на постсинаптических участках мембран возбудимых клеток (нервных, мышечных, секреторных) и участвуют в преобразовании сигнала. Молекулы нейротрансмиттера ацетилхолина высвобождаются через пресинаптические мембраны нервных окончаний путем экзоцитоза, диффундируют через синаптическую щель и связываются с двумя α -субъединицами ацетилхолиновых рецепторов.

Связывание нейротрансмиттера с холинергическим рецептором вызывает конформационные изменения в олигомерном комплексе, которые приводят к формированию ионного канала. Это позволяет ионам Na^+ входить в клетку, что вызывает локальную деполяризацию мембраны и стимулирует специфический ответ. В нейромышечной системе, например, действие ацетилхолина на холинергические рецепторы вызывает сокращение мускулатуры.

У растений подобные рецепторы-каналоформеры не обнаружены. Растительные ионные каналы, активность которых регулируется лигандами, связывают вторичные мессенджеры. Например, семейство CNGC (cyclic nucleotide-gated channels) ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами cAMP и cGMP, и рецепторы фосфорилированных форм инозитола.

Внутриклеточные рецепторы. Внутриклеточные рецепторы растений представлены разнообразными группами. Они имеют различную локализацию, структуру и функции. Среди них есть классические рецепторы и рецепторы, обладающие двойной функцией, которые, помимо рецепции внеклеточных лигандов, выполняют иные специфические функции. Для большинства внутриклеточных рецепторов растений характерна их «растительная» специфичность. Как правило, внутриклеточные рецепторы, обнаруженные у растений, нетипичны для животных, и наоборот, типично животные внутриклеточные рецепторы не найдены у растений.

Ядерные рецепторы животных. Наиболее характерной группой внутриклеточных рецепторов животных являются ядерные рецепторы. Они являются транскрипционными факторами, которые активируются липофильными лигандами – стероидными, ретиноидными и тиреоидными гормонами. Эти рецепторы подразделяются на четыре класса.

Рецепторы класса I преимущественно связывают лиганд в цитоплазме. Многие рецепторы этого класса, при отсутствии соответствующего лиганда образуют неактивные комплексы с шаперонами, которые экранируют домен ядерной локализации и участки взаимодействия с ДНК и/или другими коактиваторами транскрипции. Различные виды стероидных рецепторов специфически связываются с шаперонами определенного типа. Например, у животных рецепторы стероидных гормонов GR, MR, PR и AR взаимодействуют с белком теплового шока Hsp90. При взаимодействии с гормональным лигандом комплекс рецептор-шаперон диссоциирует, а рецептор диффундирует в ядро, где выполняет роль транскрипционного регулятора.

Рецепторы класса II локализуются в ядре и в отсутствии лиганда связаны с корепрессорами, принимая участие в ингибировании транскрипции. Связывание с лигандом приводит к замене корепрессоров на коактиваторы, в результате чего индуцируется транскрипция лиганд-активируемых генов.

Рецепторы классов III и IV немногочисленны и механизм их работы еще недостаточно понятен.

Активность многих ядерных рецепторов контролируется также и разными регуляторными белками. Эти рецепторы могут находиться в разных состояниях, которые характеризуются определенной способностью рецептора связывать лиганд и инициировать транскрипцию.

Внутриклеточные рецепторы растений. В растительных клетках не присутствуют ядерные рецепторы, характерные для животных. Этот факт для многих исследователей был несколько удивительным, так как растительные регуляторы АБК и брассиностероиды близки по структуре, соответственно, ретиноидным и стероидным гормонам животных. Тем не менее, у растений механизм восприятия липофильных молекул внутриклеточными рецепторами совершенно иной, чем у животных.

Известные в настоящее время внутриклеточные рецепторы растений можно разделить на три группы. Не исключено, что будут обнаружены

рецепторы, обладающие структурно-функциональными особенностями принципиально отличными от известных рецепторов. Номенклатура внутриклеточных рецепторов растений только начинает разрабатываться. На данный момент принято называть группы по семействам белков, к которым они относятся:

- 1) F-box рецепторы;
- 2) гормон-чувствительные липазы;
- 3) START-домен рецепторы.

F- box рецепторы. F-box рецепторы являются частью убиквитинирующей протеиновой лигазы. Известно, что F-box субъединицы SCF-подобных лигаз выполняют функцию связывания субстрата – белков-мишеней, предназначенных для убиквитинирования и последующей деградации. Специфическое узнавание и связывание белков-мишеней с F-box белками контролируется различными механизмами. Один из таких механизмов представляет собой гормональную модуляцию аффинности F-box белка к мишени.

На поверхности F-box рецепторов находится лейцин-обогащенный участок (LRR-мотив), который формирует специфический гидрофобный карман с высокой аффинностью к гормону определенного типа. Связывание гормона с F-box белком приводит к образованию связывающей поверхности, необходимой для специфического узнавания белков-мишеней. В этом случае говорят, что гормон выступает в качестве «молекулярного клея», который обеспечивает гидрофобные взаимодействия между F-box рецептором и мишенью. В результате белки-мишени убиквитинируются и разрушаются 26S протеасомным комплексом. Как правило, данный механизм связан с дерепрессорным регуляторным механизмом, который обеспечивает в ответ на стимул (гормон) удаление определенной группы репрессоров.

F-box рецепторы были обнаружены для двух растительных гормонов: индолил-3-уксусной кислоты и изолейцин-жасмоната (JA-Ile).

У растений арабидопсиса обнаружено 6 F-box рецепторов ауксина: TIR1 (transport inhibitor response 1) и AFB1–5 (auxin signaling F-box). Белок TIR1 был идентифицирован у мутантов, устойчивых к ингибиторам полярного транспорта ауксина, в середине 1990-х и описан как белок, участвующий в транспорте ИУК. Мутация *tir1* является достаточно слабой, поэтому рассматривалась возможность существования генов с перекрывающимися функциями. Действительно, TIR1 является одним из шести близкородственных F-box белков. У растений, имеющих нарушения сразу в четырех генах *tir1 afb1 afb2 afb3*, в значительной степени снижена чувствительность к ауксину.

Последующие исследования показали, что TIR1 имеет отношение к восприятию клеткой ауксина. Этот белок содержит F-box домен и является компонентом убиквитинирующей протеиновой лигазы. Мишенями TIR1 являются белки из семейства негативных транскрипционных регуляторов Aux/IAA, которые репрессируют гены ауксинового ответа. Активировать экспрессию ауксин-чувствительных генов возможно, если удалить

определенные виды Aux/IAA. Под действием ауксина у TIR1 значительно повышается сродство к белкам Aux/IAA, в результате чего они привлекаются к лигазе E3, убиквитинируются, а затем разрушаются 26S протеасомой.

Восприятие жасмонатов растительными клетками осуществляется сходным механизмом. Активная форма жасмонатов – изолейцин-жасмонат (JA-Ile) – специфически взаимодействует с белком **COI1** (**coronatine insensitive 1**), который является F-box белком. Связывание изолейцин-жасмоната с особым гидрофобным участком COI1 приводит к формированию поверхности, необходимой для специфического связывания белков семейства JAZ (JASMONATE ZIM-domain). JAZ-белки, которые являются негативными регуляторами жасмонат-зависимых реакций, в ответ на воздействие JA-Ile убиквитинируются и деградируют. Если сравнить систему восприятия ауксина и жасмонатов, то следует отметить, что F-box рецептор COI1 является функциональным аналогом TIR1, а репрессоры JAZ-белки – аналогами Aux/IAA.

Гормон-чувствительные липазы. В системе регуляции гиббереллина был выявлен растворимый гиббереллин-связывающий белок GID1 (GA insensitive dwarf 1), идентифицированный как рецептор гиббереллина. Молекула GID1 имеет в структуре консервативный липазный каталитический домен. По этому признаку данный рецептор был отнесен к семейству гормон-чувствительных липаз. Однако в каталитическом домене из трех существенных для липазной активности аминокислотных остатков присутствует только два. По этой причине GID1 не обладает каталитической активностью. Вместе с тем, нефункциональный каталитический домен формирует гиббереллин-связывающий участок (кор), обладающий высокой аффинностью к активным формам гиббереллина, с существенным предпочтением GA1 и GA4. Аминотерминальный домен GID1 образует над участком связывания гиббереллина крышкоподобную структуру, которая также взаимодействует с молекулой гормона. Гиббереллин полярной стороной молекулы взаимодействует с кором, а гидрофобная сторона – с липофильным N-терминальным участком, который как «крышкой» прикрывает молекулу гиббереллина. Гиббереллин оказывается в гормон-связывающем кармане как в кармане. Связывание гиббереллина приводит к изменению конформации рецептора и стабилизации его структуры. Поверхность молекулы GID1 в области «крышки» становится приспособленной для связывания белков, имеющих DELLA-домен. К DELLA-белкам относятся репрессоры гиббереллинового сигнала. Образование комплекса GID1(GA)–DELLA приводит к существенным конформационным изменениям в карбокситерминальной части DELLA-белка, в результате чего они приобретают способность специфического взаимодействия с F-box субъединицей SCF-подобной убиквитинирующей лигазы. Далее DELLA-белок убиквитинируется и подвергается протеолизу.

Гиббереллиновый сигнал, следовательно, тоже задействует направленный протеолиз белков, однако рецептор GID1, в отличие от F-box рецепторов не является частью убиквитинирующей лигазы, а участвует в

подготовке белков-мишеней (DELLA-белков) к связыванию с F-box субъединицей лигазы.

START- домен рецепторы. Рецепторы этой группы были обнаружены при изучении АБК-сигнала. При использовании искусственного функционального аналога АБК пирабактина был выявлен пирабактин-устойчивый мутант *Arabidopsis pyr1* (pyrabactin resistance 1). Как оказалось, локус *PYR1* кодирует белок *PYR1*, высокоаффинный к АБК, который был идентифицирован как рецептор АБК. Позже было показано наличие других *PYR1*-подобных белков со сходной функцией и структурой (*PYR1-LIKE* – *PYL*). Другая исследовательская группа обнаружила белок, напрямую взаимодействующий с продуктом гена *ABI2* – протеиновой фосфатазой 2С (*PP2C*), которая давно была известна как негативный регулятор АБК-сигнала. Этот белок получил название регуляторный компонент АБК- сигнала 1 – *RCAR1* (REGULATORY COMPONENT OF ABA RESPONSE 1). Белок *RCAR1*, как было выяснено впоследствии, соответствует белку *PYR9*. Одновременное появление сообщений о сигнальных белках *PYR1/PYL* и *RCAR* привело к возникновению двух номенклатур для одной группы белков.

По этой причине рецепторы АБК этой группы обозначают *PYR/PYL/RCAR*. Белки *PYR/PYL/RCAR* относят к большому суперсемейству *START*-белков, имеющих в своей структуре особый домен *START* (steroidogenic acute regulatory related lipid transfer).

START-домен формирует АБК-связывающий карман, который фланкируется двумя петлями, называемыми ворота и замок. Связывание АБК с рецептором приводит к закрыванию петель, и молекула АБК оказывается запертой внутри кармана. Это провоцирует изменение конформации, в результате чего рецептор приобретает способность выступать в качестве конкурентного ингибитора фосфатазы 2С. Он связывается с реакционным центром фермента и ингибирует его активность.

Рецепторы АБК в отсутствии гормона находятся в клетке преимущественно в виде гомодимеров. Мишень рецептора – протеиновая фосфатаза 2С – находится в активном состоянии и ингибирует протеинкиназу *SnRK2*. Эта *SNF1*-подобная киназа является позитивным регулятором АБК-регулируемых генов. Связывание рецептора с АБК приводит к изменению его конформации, в результате чего гомодимеры диссоциируют, а каждый рецептор приобретает способность взаимодействовать с реакционным центром *PP2C*, конкурентно ингибируя его активность. Репрессия фосфатазы 2С приводит к активации протеинкиназы *SnRK2*, которая фосфорилирует группу транскрипционных факторов – активаторов АБК-регулируемых генов.

Тема 3. Световые рецепторы

1 Растения и ультрафиолет

2 Фототропины

3 КRYPTOХРОМЫ

4 ФИТОХРОМЫ

1 Растения и ультрафиолет

Свет, как источник тепла и энергии, имеет существенное значение для живых существ и, главным образом, для фотосинтезирующих организмов, в том числе для растений. Действие солнечного света на поверхность Земли не является постоянным: интенсивность инсоляции в течение светового дня может изменяться в зависимости от погодных условий, от положения солнца относительно уровня горизонта (иными словами, от времени суток) зависит спектральный состав солнечных лучей. Кроме того, световые периоды чередуются с темновыми, причем на большей части земной поверхности соотношение продолжительности этих периодов изменяется в течение года. Это обусловило эволюционное развитие у большинства наземных организмов сенсорных светозависимых систем, через которые осуществляется тонкая настройка физиологической активности, а также процессов роста и развития.

Светорегулируемые механизмы растений преимущественно зависят от двух диапазонов световых волн, соответствующих синему и красному спектрам. В настоящий момент у растений обнаружено три семейства фоторецепторов. Фитохромы поглощают красный свет, фототропины – синий, а спектр поглощения криптохромов охватывает синий и длинноволновую область ультрафиолета (UV-A). Также рассматривается возможность существования рецепторов ультрафиолета диапазона В (UV-B).

Все фоторецепторы растений являются белками, которые имеют хромофор – простетическую светопоглощающую часть. Хромофор удерживается полипептидной частью рецептора слабыми или ковалентными связями. Основной принцип функционирования фоторецепторов заключается в том, что поглощение лучей определенного спектра хромофором запускает молекулярный механизм, приводящий к значительным изменениям конформации рецептора. Это отражается на активности фоторецепторов, то есть на их способности взаимодействовать с сигнальными партнерами и стимулировать внутриклеточный сигнальный механизм.

Электромагнитное излучение Солнца, кроме лучей видимого спектра (380-770 нм), содержит ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), составляющие около 7 % общей солнечной радиации, достигающей поверхности Земли. Все лучи УФ-спектра делят в зависимости от длины волны на три части: А (400-320 нм), В (320-280 нм) и С (280-180 нм). Только УФ-радиация с длиной волны больше 290 нм достигает земной поверхности, остальная часть ультрафиолетовой радиации поглощается озоновым слоем планеты. Фотоны УФ обладают энергией, достаточной для поглощения их всеми биологически важными структурами и ионизации атомов. По этой причине УФ-радиация имеет огромное значение для эволюции живого мира.

Озоновый слой, который находится на высоте 10-50 км, начал формироваться около 400 млн лет назад. Появление озонового экрана

защищало живые организмы от жесткого (коротковолнового) УФ-излучения и снизило интенсивность ультрафиолетовой радиации в среде обитания организмов.

Характер влияния УФ-радиации на физиологические процессы зависит от длины волны, интенсивности и продолжительности облучения.

Растения отвечают на повышение интенсивности УФ-радиации уменьшением сухой и сырой массы, площади листовой поверхности, появлением некрозов на листьях (участков мертвых тканей), нарушением корреляции между ростом надземных и подземных органов, ослаблением апикального доминирования, угнетением развития генеративных органов. Серьезно нарушается работа фотосинтетического аппарата. Причиной этого являются инактивация фотосистемы II, снижение активности RuБисКО и других фотосинтетических ферментов, содержания хлорофиллов и каротиноидов, а также изменение ультраструктуры хлоропластов и устойчивой проводимости для CO_2 и водяных паров.

Однако главную угрозу для растений представляет мутагенное действие ультрафиолетовых лучей, в основе которого лежат повреждения ДНК, приводящие не только к возникновению мутаций, но, возможно, и к гибели организма. Поглощение фотонов УФ-В-лучей основаниями ДНК запускает образование циклобутановых димеров пиримидиновых оснований (ЦПД) и в меньшей мере пиримидин-пиримидоновых димеров. ЦПД возникают из двух соседних оснований вследствие разрыва двойной связи между 5'- и 6'-атомами углерода и соединения тимидинового и цитидинового остатков. В результате образуется так называемая циклобутановая структура. Как ДНК-, так и РНК-полимеразы не могут считывать информацию с цепи ДНК, содержащей подобные ЦПД, что приводит к блокированию транскрипции генов и репликации ДНК. Образование большого числа пиримидиновых димеров происходит в клетках внешних тканей органов, подвергающихся более сильному УФ-В-облучению по сравнению с их внутренними тканями. Наличие столь серьезных повреждений генетического аппарата несовместимо с жизнью.

Все множество механизмов устойчивости растений к ультрафиолетовой радиации может быть сведено к двум принципиально разным стратегиям: 1) уходу от действующего фактора, т. е. снижению интенсивности облучения и 2) восстановлению (репарации) повреждений. Снижение интенсивности облучения ультрафиолетом жизненно важных макромолекул и биологических структур клетки достигается за счет формирования анатомических и биохимических приспособлений (адаптаций), т. е. на органном и клеточном уровнях организации. Репарации вызванных УФ-радиацией повреждений осуществляются прежде всего на молекулярном уровне.

Лишь небольшая часть солнечного спектра (менее одного процента) представлена ультрафиолетом В-диапазона; тем не менее, у растений имеются рецепторы, способные специфично распознавать фотоны УФ-В. В настоящий момент *Arabidopsis* обнаружен только один фоторецептор с такой

функцией (UVR8), однако, гены-гомологи этого рецептора обнаруживаются во всех секвенированных геномах высших растений, мхов и водорослей. UVR8 *Arabidopsis* представляет собой белок, который в неактивном состоянии существует в форме димера, локализованного в цитоплазме, а при поглощении УФ-В переходит в активную мономерную форму, которая может перемещаться в ядро.

Значительная часть активной формы рецептора остается в цитоплазме, но ее функции там пока не известны. Хромофором, поглощающим свет УФ-В, выступают остатки триптофана в полипептидной цепи UVR8. В димере UVR8 остатки триптофанов и аргининов, расположенные вблизи друг от друга, взаимодействуют, образуя связи; поглощение триптофаном квантов УФ-В вызывает разрушение этих связей и мономеризацию белка. В темноте в течение нескольких часов происходит редимеризация и инактивация рецептора; этому способствуют регуляторные белки RUP.

В ядре UVR8 напрямую связывается с промоторами генов, кодирующих транскрипционные активаторы. Фотоморфогенеза, взаимодействует с основным репрессором фотоморфогенеза E3-убиквитин-лигазой COP1. Однако, в отличие от других фоторецепторов – фитохромов и криптохромов, которые, связываясь с COP1, приводят к «ингибированию ингибитора», в сигналинге, опосредованном УФ-В, COP1 играет роль активатора.

UVR8 может напрямую взаимодействовать с COP1, при этом запускается фототропизм и УФ-В-зависимый фотоморфогенез, который может включать де-этиоляцию, остановку роста гипокотилия проростков, активацию биосинтеза флавоноидов, и даже регуляцию циркадных ритмов и устойчивость растений к патогенам и грызущим насекомым.

2 Фототропины

Первый фототропин был идентифицирован в 1997 году у растений *Arabidopsis*. Фототропины представляют собой протеинкиназы, активируемые светом. Они, как правило, локализуются у плазмалеммы, но не являются интегральными мембранными белками; они также могут ассоциироваться с внешней мембраной хлоропластов. Известны два фототропина: фототропин 1 – phot1 и второй фототропин – phot2. Оба рецептора крайне важны для регуляции трех основных функций, которые направлены на оптимизацию процесса фотосинтеза: 1) фототропизм; 2) движение хлоропластов; 3) открывание устьиц.

В молекуле фототропинов выделяют аминотерминальный фотосенсорный и карбокситерминальный серин-треониновый киназный домен. В состав фотосенсорной части фототропинов входят два похожих LOV (Light, Oxygen, Voltage) домена – LOV1 и LOV2. Домены семейства LOV активируются внешними воздействиями, такими как свет, кислород и напряжение (отсюда аббревиатура), и обнаруживаются у многих регуляторных белков, выполняющих рецепторные функции. LOV1 и LOV2

связывают FMN (флавиномононуклеотид) и функционируют в качестве сенсоров синего света.

Несмотря на значительное сходство, домены LOV1 и LOV2 выполняют различные функции. Для регуляции биологической активности фототропина принципиально важным является домен LOV2. Именно он служит световым переключателем, контролирующим активность С-терминального домена. Значение LOV1-домена окончательно не выяснено, но предполагается, что он участвует в димеризации фототропинов и способствует поддержанию функционально активной структуры фоторецептора.

В темноте LOV-домены нековалентно связывают FMN. При этом хромофоры прочно удерживаются в структуре LOV-доменов за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. В этом состоянии киназный домен ассоциирован с фотосенсорным, то есть молекула фототропина находится в сложенном состоянии, и киназный домен не может проявлять свои свойства, так как не имеет доступа к субстрату. Такую конформацию называют закрытой. В неактивном состоянии молекулы фототропина связаны с плазматической мембраной.

Световая активация. Отделенный от рецептора LOV-домен в темноте имеет максимум поглощения 447 нм (LOV447). Облучение синим светом стимулирует фотохимическую реакцию, в результате которой возбужденная хромофорная группа образует ковалентную связь с консервативным остатком цистеина. Образуется LOV390 с максимумом поглощения 390 нм. Фотоконверсия осуществляется в течение нескольких микросекунд. Обратный переход в неактивное состояние (LOV390 → LOV447) происходит спонтанно в темноте на протяжении от нескольких десятков до нескольких сотен секунд.

Реверсия в исходное неактивное состояние может стимулироваться при облучении LOV390 ультрафиолетом. Имеет ли этот процесс UV-стимулированной конверсии биологическое значение, в настоящее время неизвестно.

Эти события провоцируют существенные структурные перестройки фототропина: молекула раскрывается – киназный и фотосенсорный домены диссоциируют, что позволяет рецептору выполнять киназные функции. Одновременно с этим фототропин теряет связь с мембраной и высвобождается в цитоплазму. Возвращение фототропина в неактивное состояние является относительно медленным процессом. То есть, активное состояние достаточно стабильное и имеет продолжительное время существования.

В обоих фототропинах LOV2-домены более эффективно подвергаются светозависимой конверсии, по сравнению с LOV1.

Фосфорилирование. Подобно лиганд-связывающим рецепторным киназам, фототропины интермолекулярно автофосфорилируются. Активация фототропинов стимулирует образование гомодимеров, в составе которых рецепторы попарно фосфорилируют друг друга по специфическим остаткам серина.

Фототропины имеют множественные сайты фосфорилирования, и только часть их используется для трансдукции светового сигнала. Другие сайты необходимы для регуляции активности и чувствительности рецептора к свету.

Автофосфорилирование фототропинов по конкретным сайтам происходит в зависимости от интенсивности освещения. Дифференциальное фосфорилирование связано с особенностями регуляции фототропинов и фототропин-зависимых ответов. Так, фосфорилирование phot1 в условиях слабой и средней освещенности способствует формированию поверхности молекулы, необходимой для взаимодействия с даунстрим партнерами. Фосфорилирование, стимулированное синим светом высокой интенсивности, наоборот, прерывает возможность передачи сигнала от гиперфосфорилированной формы phot1. Это достаточно важно для регуляции тех процессов, в которых phot1 и phot2 выступают антагонистами, например, движение хлоропластов в условиях различной освещенности. Кроме того, особенности фосфорилирования фоторецепторов могут определять специфический набор сигнальных белков, с которыми будут взаимодействовать фототропины.

Локализация. Фототропины phot1 и phot2 являются гидрофильными белками, однако в неактивном состоянии они связаны с плазматической мембраной через плазмалеммные белки.

Под действием синего света локализация фототропинов быстро изменяется: phot1 высвобождается в цитоплазму, а phot2 перераспределяется к аппарату Гольджи. Функциональная значимость этого процесса еще не выяснена. Однако известно, что для локализации phot2 на мембранах аппарата Гольджи существенную важность имеет киназная активность.

Передача сигнала. Светозависимое фосфорилирование необходимо для формирования связывающей поверхности, через которую фототропины взаимодействуют с сигнальными посредниками. Активный фототропин способен связываться с различными регуляторными компонентами, через которые осуществляется регуляция конкретных фототропин-зависимых реакций. Каталитическая (киназная) активность фототропинов обеспечивает не только трансмолекулярное автофосфорилирование, но может быть направлена также на молекулы сигнальных партнеров. Например, в реакции открывания устьиц осуществляется фосфорилирование плазмалеммной H^+ -АТФазы фототропинами. Взаимодействие фоторецепторов с протонными помпами в значительной степени облегчается регуляторными белками.

3 Криптохромы

Криптохромы – класс светочувствительных белков растений и животных. Эти белки дают клеткам возможность воспринимать синий и ультрафиолетовый свет. Первоначально криптохромы были обнаружены у *Arabidopsis*, но впоследствии были найдены у других растений, а также у животных и бактерий. Криптохромы являются широко распространенными фоторецепторами в природе. Они изначально возникли в эволюции как ФАД-

зависимые ДНК-фотолиазы, то есть ферменты, репарирующие вызванные синим светом разрывы в ДНК. У представителей различных таксономических групп, эволюционно удаленных друг от друга, криптохромы выполняют сходные функции. Наиболее универсальной функцией этих рецепторов является регуляция циркадных ритмов. Этот механизм имеет очень древнее происхождение и в общих чертах сходен у разных царств живого мира.

Помимо контроля циркадных осцилляций, криптохромы выполняют также функции, характерные только для растений. Они опосредуют процессы деэтиоляции и участвуют в регуляции фотопериодически зависимых флоральных механизмов. Многие процессы регулируются криптохромами совместно с фитохромами.

В растениях *Arabidopsis* обнаружено 3 криптохрома (cryptochrome – cry1, cry2 и cry3). Два из них, cry1 и cry2, обладают высокой степенью гомологии и выполняют сходные функции, однако cry1 отвечает за восприятие синего света высокой интенсивности, а cry2 – низкой. Функции этих рецепторов частично перекрываются в регуляции деэтиоляции. Существенное ремодулирование экспрессии большой группы генов при выходе проростков на свет контролируется преимущественно криптохромами cry1 и cry2, со значительно меньшим вкладом фитохрома А. Важным регуляторным моментом в замедлении роста гипокотилия при деэтиоляции является снижение уровня гиббереллинов и ауксинов, а также снижение чувствительности тканей к этим гормонам.

В регуляции цветения cry2 имеет намного большее значение, чем cry1. Было показано, что криптохромы непосредственно вовлекаются в светозависимую стабилизацию транскрипционного активатора флоральных генов CO (CONSTANCE). Криптохром cry3 значительно отличается по структуре от cry1 и cry2. Функции его еще не выяснены.

Структура. По особенностям молекулярного строения и ряду свойств криптохромы очень близки к ДНК-фотолиазам, но не проявляют ДНК-фотолиазной активности. ДНК-фотолиазы – это ферменты, которые участвуют в восстановлении ДНК, поврежденной UV-B излучением. Криптохромы и ДНК-фотолиазы поглощают синий свет и ультрафиолет диапазона UV-A.

Помимо улавливания света криптохромы обладают свойствами серин/треониновых киназ, способных к автофосфорилированию. Аминотерминальная область молекулы криптохромов cry1 и cry2, фотолиаза-гомологичный район – PHR (photolyase homology region) – связывает нековалентно FAD, который выполняет функции основного светопоглощающего хромофора, а также птерин (или деазафлавин) – вторичный светособирающий хромофор. Благодаря наличию двух хромофорных групп диапазон поглощения криптохромов охватывает области синего и UV-A света. Карбокситерминальная часть криптохромов cry1 и cry2 в большей степени вариабельна, чем PHR-домен и содержит DAS-мотивы. Основу молекулы криптохрома cry3 также составляет PHR-домен, однако cry3 не имеет карбокситерминального расширения, характерного для cry1 и

cry2, а с N-стороны молекулы находится короткий сигнальный пептид (TP – transient peptide), определяющий хлоропластную и митохондриальную локализацию рецептора.

Механизм активации. На основе ДНК-фотолиазной реакции был предложен механизм активации криптохрома, который в целом был подтвержден. В результате поглощения света хромофорными группами молекула FAD переходит в возбужденное состояние – снижается ее окислительно-восстановительный потенциал (FAD непосредственно поглощает квант света или принимает энергию от возбужденного птерина). В результате снижения ОВП FAD теряет электрон, который переносится на белковую часть фоторецептора через остаток триптофана на тирозин. Это событие сопровождается смещением электронной плотности, вызывающей конформационные изменения молекулы криптохрома. Изменение конформации способствует стимуляции киназной активности, которая приводит к автофосфорилированию множественных сайтов криптохрома. Фосфорилированный криптохром ингибирует активность убиквитинирующей протеиновой лигазы COP1. Следует заметить, что регуляторные механизмы криптохромов и фитохромов частично перекрываются. Убиквитинирующая лигаза COP1 является мишенью обеих групп фоторецепторов, поэтому многие светозависимые гены находятся под совместным контролем рецепторов красного и синего света. Светозависимая деградация белков лежит в основе регуляторных механизмов контролируемых криптохромами и фитохромами.

4 Фитохромы

Фитохромы являются рецепторами красного/дальнего красного света. Это димерные белки, состоящие, как правило, из двух идентичных апопротеинов. Каждый из мономеров ковалентно связан с фитохромобилином – линейным тетрапирролом, выполняющим функции хромофора. Синтетическим предшественником фитохромобилина является гем (замкнутый тетрапиррол), кольцо которого размыкается при встраивании хромофора в апопротеин рецептора.

При абсорбции красного (660 нм) и дальнего красного (730 нм) света хромофор подвергается обратимой фотоизомеризации, при которой кольцо D разворачивается на 180° относительно двойной связи у C-15. Исходная форма фитохрома содержит хромофор в конформации, которая способна поглощать красный свет. Такая форма фитохрома считается физиологически неактивной. Под действием кванта красного света хромофор переходит в активную конформацию, которая способна поглощать дальний красный свет, под действием которого хромофор вновь переходит в неактивную форму.

Фитохромы обозначают буквой P (от англ. phytochrome), в нижнем индексе указывают спектр поглощения в цифровом или буквенном виде. Неактивную форму фитохрома обозначают Pr или P660, потому что она поглощает красный (red) свет с максимумом 660 нм, а активную – Pfr или P730 (соответственно far red и 730 нм). В русскоязычной литературе также

приняты обозначения Фк или Ф660 для неактивной формы фитохрома и Фдк или Ф730 для активной.

Фитохромы синтезируются *de novo* в неактивной форме Pr. Фотоинверсионный переход Pr → Pfr возможен только под действием света. Обратный переход Pfr → Pr может осуществляться не только под действием дальнего красного света, но и спонтанно в темноте.

Фотоконверсия хромофорной группы приводит к существенному изменению конформации фитохрома, что отражается на киназной активности рецептора. Фитохромы способны к трансмолекулярному автофосфорилированию и фосфорилированию иных субстратов. Путем фосфорилирования регулируется также стабильность фитохромов. Изменение уровня фосфорилирования фитохромов делает возможным их взаимодействие с другими регуляторными и функциональными молекулами. Модуляция активности сигнальных партнеров фитохромом следует рассматривать как первый шаг декодирования светового сигнала, поглощенного этим рецептором.

В геноме растений кодируются несколько различных фитохромов, как правило, в количестве не меньше трех. У модельного вида *Arabidopsis*, например, их пять: PHYA, PHYB, PHYC, PHYL, PHYE. У сосны четыре фитохрома, у риса и гинкго – три, а у томата – семь. Разные формы фитохромов у одного вида растения имеют различные молекулярные свойства и функции, хотя и частично перекрывающиеся. Наибольшие структурно-функциональные отличия обнаруживаются между фотолабильными и фотостабильными фитохромами. Фотостабильные фитохромы способны к обратимой фотоконверсии, то есть под влиянием красного и дальнего красного света переходят соответственно в активную и неактивную форму. Для фотолабильных фитохромов обратимая фотоконверсия не характерна. Активная форма фотолабильных фитохромов имеет непродолжительный период существования и под действием света быстро разрушается. Независимо от количества видов фитохромов, как правило, один из них является фотолабильным, а остальные фотостабильными.

Различают три группы фитохром-зависимых ответов согласно воспринимаемой интенсивности иррадиации, вызывающей специфическую реакцию растения.

- 1) VLFR (very low fluence response) – ответ на очень низкий уровень иррадиации;
- 2) LFR (low fluence response) – ответ на низкий уровень иррадиации;
- 3) HIR (high irradiance response) – ответ на высокий уровень иррадиации.

Фотолабильный фитохром А (PHYA) отвечает на очень низкий уровень иррадиации (VLFR) и на высокий уровень интенсивности дальнего красного света (FR-HIR). Фотостабильные фитохромы (PHYB, PHYC, PHYL, PHYE) опосредуют специфические ответы при влиянии света низкого уровня иррадиации (LFR) и высокого уровня интенсивности красного (R-HIR).

Фитохром-зависимые реакции растений весьма разнообразные и сложные, но при этом можно выделить три основные группы реакций, которые развиваются под воздействием света определенного спектра и интенсивности:

- 1) поиск света – обеспечивается фотолабильным фитохромом (VLFR и FR-HIR);
- 2) оптимальное использование света – фотостабильные фитохромы (LFR);
- 3) избегание света – фотостабильные фитохромы (R-HIR).

Фитохромы участвуют в фотопериодических реакциях, посредством которых регулируется множество морфогенетических механизмов растений (прорастание семян, переход к цветению, созревание плодов, подготовка к сезонным изменениям и др.).

Важной функцией фитохромов являются регуляция деэтиоляции, причем у многих растений в этом процессе участвуют все виды фитохромов. Многие реакции регулируются фитохромами совместно с криптохромами.

Структура фитохромов. В молекулах фитохромов различают два основных структурно-функциональных района: фотосенсорный N-концевой домен и димеризационный C-концевой домен. Фотосенсорный домен подразделяют на P1, P2/PAS, P3/GAF и P4/PHY, а димеризационный – на PAS-A, PAS-B и HKRD (histidine kinase-related domain). Среди этих субдоменов P1, PAS-A и PAS-B являются уникальными растительными структурами, тогда как остальные входят в состав фитохром-подобных белков нерастительных организмов.

Активация фитохромов и передача светового сигнала. В молекуле неактивного фитохрома N- и C-концевые части молекулы тесно контактируют друг с другом. Взаимодействие осуществляется за счет N-концевого домена. При активации в результате фотоконверсии $Pr \rightarrow Pfr$ в молекуле фитохрома происходят значительные структурные изменения. В активной форме Pfr увеличивается доля α -спиральных структур (на 5% больше по сравнению с Pr). Это сопровождается диссоциацией N- и C-концевых частей, в результате чего молекула приобретает открытую структуру. За счет этого значительно увеличивается площадь, предназначенная для межмолекулярных взаимодействий. Раскрытие молекулы фитохрома индуцирует последующие сигнальные события, которые направлены на регуляцию процессов и в цитоплазме (например, движение хлоропластов), и в ядре (модуляция генной экспрессии). Транслокация фитохрома в ядро представляет собой один из важных этапов световой регуляции.

Перенос фитохромов в ядро. Молекулярная масса димера фитохрома (240 кД) намного превышает массу белков (не более 40 кД), способных спонтанно диффундировать через ядерные поры. Поэтому транслокация фитохромов в ядро является энергозависимым процессом и осуществляется при взаимодействии с другими белками.

К белкам, которые обеспечивают перенос белков через ядерные поры, относятся, например, импортины и группа общих компонентов, участвующих в переносе: малые G-белки класса Ran, RanGTPаза активирующие белки, нуклеопорин 50 и др. Помимо общих компонентов, необходимо участие специфических факторов, взаимодействующих с определенными видами белков.

Фитохром В (PHYB) содержит функциональный домен ядерной локализации NLS. При активации PHYB светом этот участок открывается и через него рецептор может взаимодействовать с импортинами – факторами, обеспечивающими перенос в ядро.

Молекулы PHYA, в отличие от PHYB, не имеют доменов ядерной локализации и неспособны непосредственно взаимодействовать с факторами транслокации, такими как импортины.

Ядерная локализация фитохрома PHYA обеспечивается белками FHY1 (Far-red elongated Hypocotyl 1) и FHL (FHY1-Like).

В ядре фитохромы связываются со своими мишенями и модулируют их активность. Функционирование фитохромов в ядре часто ассоциировано с образованием ядерных частиц, в которые вовлекаются сплайсосомы, транскрипционные комплексы и иные функциональные молекулы и мультимерные образования.

Активные фитохромы подвергаются разнообразным регуляторным эффектам, которые направлены на изменение двух основных свойств фоторецепторов:

1) стабильность активного состояния (скорость спонтанного перехода в неактивную форму при отсутствии света);

2) продолжительность существования белка (интенсивность вовлечения молекул фитохромов в убиквитин-опосредованный протеолиз).

Краткое описание механизма световой активации фитохрома.

1. Абсорбция света.

2. Фотоизомеризация хромофора.

3. Изменение конформации молекулы фитохрома.

4а. Связывание с цитоплазматическими мишенями и модуляция их активности.

4б. Связывание с белками, обеспечивающими перенос в ядро.

5. Транслокация фитохрома в ядро.

6. Связывание с ядерными мишенями и модуляция их активности.

РАЗДЕЛ 2 ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ

Тема 4. G-белки и фосфолипазы

1 G-белки.

2 Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры.

3 Фосфолипазы.

Передача сигнала от рецепторов, в зависимости от их типа, может осуществляться непосредственно на промотор гена или на эффекторные молекулы, а также на многочисленные промежуточные компоненты внутриклеточных сигнальных систем. Компоненты, участвующие в передаче сигнала от рецепторов к конечным мишеням чрезвычайно разнообразны по структуре, свойствам и механизмам трансдукции сигнала.

1 G-белки.

Одними из компонентов, опосредующими внутриклеточный сигнал, являются регуляторные GТРазы, которые также называют G-белками. В совокупности G-белки – это гуанин-нуклеотид-связывающие белки, обладающие GТРазной активностью и выполняющие в клетках разнообразные функции, не ограничивающиеся регуляторными. Они принимают участие в транспорте макромолекул, организации цитоскелета, синтезе белков, образовании и транслокации везикул. Среди множества G-белков можно выделить также группу сигнальных молекул, которые принимают участие в трансдукции внутриклеточных сигналов.

Сигнальные G-белки, согласно их субъединичному составу, подразделяются на два типа: гетеротримерные и мономерные. В ранней литературе, посвященной G-белкам, часто гетеротримерные белки называли собственно G-белками без соответствующей субъединичной характеристики «гетеротримерные», тогда как мономерные первоначально получили название Ras-белков. Данная терминология была достаточно «экономной» и вместе с тем, понятной. Однако после того как выяснилось, что Ras-белки – это всего лишь одно из семейств огромной группы мономерных G-белков (в настоящее время выделяют пять семейств малых G-белков), во избежание путаницы появилась необходимость использовать термины гетеротримерные и мономерные (или малые) G-белки.

Гуанин-нуклеотидсвязывающие белки широко распространены в живом мире, но при этом неравномерно представлены у животных и растений. Причем наибольшие различия характерны для сигнальных G-белков. Так, гетеротримерные GТРазы в изобилии обнаруживаются в животных клетках, а у растений они присутствуют в минорных количествах. У животных около 80 % первичных мессенджеров взаимодействуют со специфическими рецепторами, сопряженными с гетеротримерными G-белками. Для растений многие аспекты участия этих молекул в сигнальных механизмах до сих пор непонятны. Во всяком случае, гетеротримерные GТРазы у растений, если и принимают участие в трансдукции сигнала, вряд ли имеют механизм активации, аналогичный механизму у животных.

Значимость гетеротримерных G-белков для животных подтверждается обилием идентифицированных в геноме млекопитающих генов, кодирующих субъединицы GTPаз: 23 α -субъединицы, 5 β -субъединиц, 12 γ -субъединиц. У растений набор подобных генов значительно меньше.

На фоне незначительного количества гетеротримерных GTPаз гены малых G-белков в геномах растений обнаруживаются в изобилии. Например, в геноме *Arabidopsis* идентифицировано 93 гена. В регуляторных и сигнальных механизмах у растений ведущая роль принадлежит мономерным G-белкам.

Гетеротримерные G-белки. Впервые G-белки были обнаружены при изучении механизмов функционирования 7ТМ рецепторов (или GPCR) у животных. Рецепторы этого класса непосредственно взаимодействуют с G-белками и передают через них сигнал на эффекторы. GPCR и G-белки у животных всегда функционируют вместе и являются стандартными сигнальными партнерами. По этой причине 7ТМ-рецепторы называют также G-белок сопряженными рецепторами (GPCR).

G-белки состоят из трех различных субъединиц. Наибольшая по размеру α -субъединица (40–50 кД) прочно связана с димером $\beta\gamma$. Субъединицы β и γ имеют меньшие молекулярные массы – соответственно 35 кД и 8 кД. Связь между ними поддерживается также за счет слабых сил, однако при различных функциональных состояниях молекулы G-белка димер $\beta\gamma$ всегда находится в ассоциированном виде.

За счет липофильных групп α -субъединица и $\beta\gamma$ -димер независимо друг от друга удерживаются на внутриклеточной стороне плазмалеммы и могут отдельно или в составе G-белка латерально диффундировать по мембране.

В структуре α -субъединицы есть гуаниннуклеотид связывающий центр, в котором может находиться GTP или GDP. Этот участок также обладает GTPазными свойствами. При связывании GTP G-белок переходит в активное состояние (способен передавать сигнал), а GDP-связанная форма является неактивной.

Структура различных G-белков уникальна. В состав индивидуального G-белка входит конкретный набор изоформ субъединиц. Это позволяет им специфически взаимодействовать с соответствующими рецепторными и эффекторными молекулами.

Взаимодействие G-белка с G-белок сопряженными рецепторами осуществляется через α -субъединицу. С эффекторами могут взаимодействовать как α -субъединица, так и $\beta\gamma$ -димер.

Цикл активации. При отсутствии соответствующего внешнего сигнала G-белок находится в тримерном неактивном состоянии, причем в гуаниннуклеотид-связывающем сайте α -субъединицы располагается GDP. В результате рецепции экстраклеточного сигнала изменяется конформация рецепторного белка, а это, в свою очередь, вызывает ряд изменений в состоянии G-белка. Теряется сродство α -субъединицы с GDP, место которого занимает GTP. В большинстве случаев (но не всегда) активированный G-белок диссоциирует на две части: α -субъединица отделяется от $\beta\gamma$ -димера. В

любом случае G-белок находится в активном состоянии, если α -субъединица связана с GTP.

Однако это состояние сравнительно недолговременное, так как α -субъединица гидролизует GTP и переходит в неактивное тримерное состояние. Если рецептор продолжает воспринимать внешний сигнал, то G-белки активируются снова.

GTPазная активность α -субъединицы зависит от ряда внутриклеточных факторов. Во-первых, активность усиливается, как правило, при взаимодействии α -субъединицы с эффекторными молекулами, например, с фосфолипазой C. Во-вторых, существует большое количество регуляторных белков, способных модулировать GTPазную активность α -субъединицы. Эти белки относятся к семейству RGS (regulators of G-protein signaling) белков – регуляторов сигнализации G-белка. В основном, это небольшие белки, состоящие из 220 и менее аминокислотных остатков, но также обнаружены высокомолекулярные RGS белки (до 1400 аминокислотных остатков). Эти белки не только модулируют GTPазную активность α -субъединицы. Некоторые из них участвуют в передаче сигнала, поскольку обладают структурой, позволяющей им взаимодействовать с другими компонентами системы передачи сигнала.

Трансдукция сигнала на эффектор осуществляется α -субъединицей или $\beta\gamma$ -димером, а в некоторых случаях – целым тримером, связанным с GTP. Поскольку ни G-белок, ни его составные части не отделяются от плазматической мембраны, эффекторные молекулы, активируемые G-белком, также имеют мембранную локализацию или привлекаются к мембране в процессе активации. Взаимодействие G-белков с эффекторами приводит к изменению конформации и активности последних.

Димеры $\beta\gamma$ не только регулируют активность эффекторных молекул, например, таких как фосфолипазы (PLA₂, некоторые изоформы фосфолипазы C), ионные каналы (K^+ , Ca^{2+}), но также выполняют другие функции. Они обеспечивают локализацию, связывание и деактивацию α -субъединиц, стабилизируют их инактивированное состояние путем понижения уровня диссоциации GDP от α -субъединицы, регулируют сродство рецепторов к активирующим их лигандам.

Мономерные (малые) G-белки первоначально были открыты как продукты Ras-протоонкогенов, ассоциированных с саркомой крыс (отсюда аббревиатура Ras – rat sarcoma). Впоследствии были выявлены многочисленные мономерные белки с GTPазной активностью, близкие по структуре и молекулярной массе к Ras-белкам. Все эти белки обладают ограниченной гомологией (до 30%) и имеют консервативные последовательности аминокислот, ответственные за связывание гуанозинфосфатов, GTPазную активность и взаимодействие с эффекторами. Молекулярная масса большинства мономерных G-белков варьирует в пределах 20–30 кД. В настоящее время считают, что малые G-белки являются обязательными компонентами эукариотических клеток и участвуют в важных регуляторных механизмах.

Известные малые GTPазы, согласно их аминокислотной последовательности и функциям, разделяют на пять семейств: Ras, Rho, Rab, Arf и Ran.

Активность двух семейств G-белков – Ras и Rho – ассоциирована с трансдукцией сигнала. Остальные выполняют специфические клеточные функции.

Белки семейства Ras не обнаружены у растений и найдены только у животных.

В геноме *Arabidopsis* выявлено 11 генов, кодирующих Rho белки. Эти белки несколько отличаются по структуре от Rho белков животных и составляют обособленное подсемейство Rho- подобных белков растений – ROP (Rho of plants).

Малые G-белки, не несущие сигнальной нагрузки, в меньшей степени отличаются у растений и животных. Функционирование таких G-белков связывают с участием в специфических фундаментальных механизмах:

Arf – образование везикул, в растениях Arf белки важны для полярного транспорта ауксина, так как принимают участие в перераспределении переносчика ауксина PIN1 между цитоплазмой и плазмалеммой;

Rab – транспорт и докирование везикул;

Ran – трафик РНК и белков через ядерные поры.

Сигнальные мономерные G-белки. Ras и Rho белки являются мембранными поверхностными белками, которые удерживаются на мембране, подобно гетеротримерным G-белкам, за счет липофильной группы небелковой природы. Малые G-белки подвергаются посттрансляционным ковалентным модификациям. Один из способов модификации не характерен для гетеротримерных G-белков: по завершению синтеза удаляется три С-концевых аминокислоты, а образовавшийся новый С-конец полипептидной цепи метилируется. Затем к цистеину гипервариабельной С-терминальной области присоединяется жирнокислотный или полипреновый остаток, который обеспечивает связь белка с мембраной.

Исследование структуры Ras белка показало наличие двух высокоподвижных участков, названных «switch I» и «switch II», которые окружают g-фосфат GTP. Положение этих последовательностей существенно изменяется в зависимости от того, какой из нуклеотидов (GTP или GDP) находится в гуаниннуклеотидсвязывающем центре. Изменение конформации молекулы вследствие смещения switch-последовательностей способствует переключению неактивного состояния молекулы в активное, и наоборот. В аминотерминальной части G-белка расположен участок взаимодействия с эффекторами.

Цикл активации мономерных G- белков. Мономерные G-белки, в отличие от гетеротримерных, не взаимодействуют непосредственно с рецепторами. Передача сигнала между ними осуществляется посредством адаптерных молекул. В неактивном состоянии в гуаниннуклеотидсвязывающем центре G-белка связана молекула GDP.

Стимуляция G-белка путем взаимодействия с адаптерами способствует замене GDP на GTP.

Адаптерные молекулы, непосредственно взаимодействующие с малыми G-белками, называют гуанин-нуклеотид обменивающие факторы (GEF – guanine nucleotide exchanging factor).

После замены гуанозинфосфатов малые G-белки изменяют конформацию и переходят в активное состояние, то есть приобретают способность регулировать активность своих мишеней. Помимо GEF в цикле активации G-белков могут участвовать иные регуляторы, причем не только активаторы, но и ингибиторы передачи сигнала. Предполагается участие гуанин-нуклеотид диссоциирующего ингибитора – GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Этот регулятор был обнаружен при изучении механизма активации Rab-белков. Суть его действия заключается в том, что он связывает липофильную группу неактивного GDP-связанного G-белка, в результате чего последний диссоциирует от мембраны. Этим способом GDI изолирует неактивный G-белок. Ассоциированный с GDI G-белок не имеет возможности взаимодействовать с GEF.

Инактивация GTP-связанной формы G-белка осуществляется в результате GTPазной реакции. Отщепление γ -фосфата приводит к образованию GDP, и G-белок, таким образом, переходит в неактивную GDP-связанную форму.

GTPазная активность, а соответственно, и скорость инактивации G-белка не являются постоянными. Так, активность повышается при взаимодействии GTP-связанной формы G-белка со своей мишенью. Помимо этого, существуют специализированные регуляторы активности. Они называются белки, активирующие GTPазу или GAP (GTPase activating protein). GTPазная активность G-белков, связанных с GAP, увеличивается пятикратно.

2 Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры

Эффекторные молекулы являются компонентами сигнальных систем, которые участвуют в образовании внутриклеточных низкомолекулярных посредников – вторичных мессенджеров.

Эффекторы – это ферменты, которые преимущественно располагаются на плазматической мембране, но могут иметь цитоплазматическую локализацию. В качестве эффекторов можно также рассматривать кальциевые ионные каналы.

Важным свойством эффекторов является их способность усиливать сигнал, поскольку их функционирование приводит к образованию значительного количества вторичных мессенджеров, передающих сигнал на дальнейшие компоненты сигнальных цепей. Таким образом, одна эффекторная молекула посредством вторичных мессенджеров может влиять на активность множества сигнальных посредников.

Состояние эффекторов зависит от внешних сигналов, но активность каждого из них модулируется различными способами, в зависимости от конкретного типа эффекторной молекулы. Они могут получать сигнал:

- 1) непосредственно от рецепторов;
- 2) опосредованно через белковые компоненты сигнальных систем;
- 3) при связывании первичного мессенджера (рецепторы-каналоформеры);
- 4) под влиянием вторичных мессенджеров.

Эффекторы-ферменты ковалентно модифицируют субстрат, образуя низкомолекулярные соединения, выполняющие роль вторичных мессенджеров. Вторичные мессенджеры обладают несколькими важными свойствами. Во-первых, они хорошо диффундируют внутри клетки, а некоторые соединения (например, NO) легко проникают в соседние клетки. Во-вторых, это коротко живущие соединения: они разрушаются ферментативным путем или спонтанно. В случае ионов существуют механизмы, способствующие быстрому снижению их концентрации.

Эффектор, синтезирующий молекулы вторичных посредников, и фермент, способный разрушать их, составляют в клетке своеобразную антагонистическую пару. Примером такой пары могут служить аденилатциклаза (АЦ) и фосфодиэстераза (ФЭ).

Каталитическая активность ФЭ направлена на разрушение циклического АМР (сАМР) – вторичного мессенджера, который синтезируется АЦ. Эти ферменты не только обладают противоположными свойствами, но имеют также противоположные способы регуляции. Если аденилатциклаза активируется при получении определенного сигнала, то фосфодиэстераза в этих условиях теряет активность. Однако, когда данный сигнал отсутствует, то АЦ ингибируется, а ФЭ, наоборот, переходит в активное состояние. Противоположно направленная регуляция активности этих ферментов позволяет клетке быстро реагировать на внешние условия, так как способствует эффективному синтезу или разрушению вторичных мессенджеров при соответствующих условиях.

3 Фосфолипазы

Фосфолипазы – это ферменты, катализирующие гидролиз определенных эфирных связей в молекулах фосфолипидов. Согласно расположению гидролизуемой связи различают пять классов фосфолипаз (PLD, PLC, PLA1, PLA2 и PLB). В качестве отдельной группы выделяют ферменты, катализирующие расщепление лизофосфолипидов – лизофосфолипазы. В сигнальных механизмах наиболее важными являются фосфолипазы C, D и A2. Активность всех этих фосфолипаз приводит к образованию целого ряда вторичных мессенджеров, участвующих в модуляции активности компонентов каскадных сигнальных систем.

Фосфолипазы D. Каталитическая активность фосфолипаз D (PLD) наблюдается на разных этапах онтогенеза растений и имеет важное значение при воздействии широкого спектра абиотических и биотических стрессовых

факторов. PLD выполняют центральную роль в стрессовых реакциях растений, в которых опосредуют действие стрессовых гормонов (АБК, жасмоната, этилена), а также продукцию этих регуляторов.

Фосфолипазы D расщепляют терминальную фосфоэфирную связь фосфолипида. Продуктами расщепления являются фосфатидная кислота (PtdOH) и водорастворимая головная группа (спирт). Эти ферменты обладают уникальным свойством: в присутствии первичных спиртовых групп они могут переносить фосфатидил на спирты с образованием соответствующих фосфатидилалкоголей. Подобная обратимость катализируемой реакции для других фосфолипаз не характерна.

Согласно субстратной специфичности и требованиям двухвалентных ионов фосфолипазы D подразделяют на три группы:

1) обычные PLD имеют максимальную активность при миллимолярной концентрации Ca^{2+} (20–100 мМ);

2) полифосфоинозитид-зависимые PLD наиболее активны при микромолярном уровне Ca^{2+} и специфичны к фосфатидилинозитолполифосфатам;

3) фосфатидилинозитол-специфичные фосфолипазы D являются Ca^{2+} -независимыми.

В растениях преобладают обычные PLD. Помимо главных трех классов, основанных преимущественно на требовании ионов Ca^{2+} , PLD разделяют на группы согласно аминокислотной последовательности, архитектуре генов и биохимическим свойствам.

Катализ. Ферменты суперсемейства PLD гидролизуют Р–О связи путем двухшаговой пинг-понг реакции, в процессе которой фосфатидил сначала присоединяется к ферменту (то есть вовлекается фосфатидил-ферментный посредник). Для нуклеофильной атаки фосфорной группы субстрата фосфолипазы D используют консервативный остаток гистидина.

Большинство растительных PLD имеют широкую субстратную специфичность, проявляя при этом предпочтение определенному типу субстрата. Активность PLD зависит от многих факторов – концентрации Ca^{2+} , липидного состава, pH, инозитолфосфатов и др.

Механизм активации. PLD предполагает связывание молекулы фермента с мембраной. Растворимая фракция PLD является неактивной. Важным фактором активации PLD являются осцилляции Ca^{2+} . Усиление связывания PLD с мембранами может представлять собой быстрый и ранний этап активации фермента в условиях стресса.

Передача сигнала. Продукт каталитической активности PLD – фосфатидная кислота – модулирует активность множества мишеней. Фосфатидная кислота взаимодействует не только с мембранными мишенями, но и способствует связыванию с мембранами многих цитоплазматических белков.

К мишеням фосфатидной кислоты относятся протеиновые и липидные киназы, фосфатазы, фосфолипазы, ионные каналы и активные трансмембранные переносчики, например, аутоингибируемые Ca^{2+} -АТФазы.

Также считают, что фосфатидная кислота способна непосредственно взаимодействовать с фосфолипазами С и А₂ и модулировать их активность, влияя на интенсивность синтеза низкомолекулярных регуляторов. Таким образом, активация PLD и последующее образование фосфатидной кислоты приводят к стимулированию сигнальных систем, опосредованных фосфолипазами С и А₂, в том числе октадеканоеидного пути.

Фосфолипазы С (PLC) гидролизуют глицерофосфатную эфирную связь фосфолипидов в процессе чего образуются диацилглицерол (ДАГ) и свободная фосфорилированная головная группа.

Фосфолипазы С являются цитоплазматическими мономерными белками. Молекулярные структуры различных изоформ имеют сходные и уникальные черты. На N-концах полипептидных цепей всех фосфолипаз С локализованы участки, необходимые для присоединения фермента к мембране. С-концевая область обеспечивает дополнительные участки связывания молекулы с мембраной и выполняет регуляторные функции – через нее осуществляется взаимодействие с регуляторными белками. Два консервативных домена формируют в молекулах PLC каталитический центр. Причем эти домены могут быть расположены близко друг к другу или разделены большой аминокислотной последовательностью, которая включает участки, необходимые для связывания с регуляторными белками.

Согласно субстратной специфичности и функции PLC можно подразделить на три группы:

1) полифосфоинозитид-специфичные PLC гидролизуют фосфатидилинозитолполифосфаты;

2) неспецифичные PLC действуют на фосфатидилхолин и ряд других фосфолипидов (так как ферменты этой группы преимущественно расщепляют фосфатидилхолин, их также называют фосфатидилхолин-специфичные PLC);

3) гликозилфосфатидилинозитол-специфичные PLC (GPI-PLC) отщепляют белки (гликопротеины), заякоренные на мембранах с помощью гликозидных связей через фосфатидилинозитол. GPI-заякоренные белки являются экстраклеточными и функционируют в качестве ферментов (фосфатазы, нитратредуктазы), рецепторов, взаимодействующих с экстраклеточными лигандами, или матриксных белков клеточной стенки (арабиногалактанпротеин).

Среди фосфолипаз С полифосфоинозитид-специфичные PLC (PI-PLC) занимают центральное положение в сигнальных механизмах. Растительные PI-PLC – Ca^{2+} -зависимые ферменты. Ионы Ca^{2+} необходимы не только для эффективного связывания фермента с мембраной, они также влияют на катализ.

Сигнальный механизм с участием PI-PLC является важным для ответа растений на различные стимулы, включая осмотический стресс, АБК, свет, гравитацию, воздействие патогенов и загрязнение. Под действием этих факторов стимулируется активность полифосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С и фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы (PI4P5K)

ключевого фермента синтеза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата – субстрата PI-фосфолипазы C. На функционирование этого сигнального пути в значительной степени влияет фосфолипаза D. Продукт катализа PLD – фосфатидная кислота – непосредственно взаимодействует с фосфатидилинозитол-4-фос-

фат-5-киназой (PI4P5K) и активирует ее. Увеличение концентрации фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата является основным фактором активации PI-PLC.

PI-PLC расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) на инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG). Мобилизация ионов Ca²⁺ и кальциевые осцилляции играют важную роль в PI-PLC-опосредованном сигнальном пути.

Ионы Ca²⁺ способствуют связыванию PLD с мембранами, в результате чего этот фермент активируется.

Краткая схема PI- PLC опосредованного сигнального механизма.

1. Активация полифосфоинозитид-специфичной фосфолипазы C и фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы.

2. Расщепление фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата на инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола.

3. Синтез низкомолекулярных регуляторов (вторичных мессенджеров) из продуктов распада PI-4,5-P₂: высокофосфорилированных форм инозитола, фосфатидной кислоты и диа-цилглицерол-пирофосфата.

4. Модуляция активности мишеней вторичными мессенджерами.

Фосфолипазы A₂ отщепляют sn-2 ацилэфирные связи фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 1-ацил2-лизофосфолипидов. В растениях присутствуют фосфолипазы A₂ двух основных типов:

1) секреторные (secretory) низкомолекулярные фосфолипазы A₂ (sPLA₂);

2) внутриклеточные (intracellular) Ca²⁺-независимые фосфолипазы A₂ (iPLA₂).

Внутриклеточные фосфолипазы A₂ (iPLA₂) представляют группу, включающую мембраносвязанные и цитозольные ферменты с молекулярной массой 40–48 кД. Все известные растительные iPLA₂ предпочтительно отщепляют линолевую и линоленовую группы, находящиеся в sn-2 положении фосфатидилхолина. Эти ферменты стимулируются кальмодулином, в отсутствие которого не реагируют на изменение концентрации Ca²⁺.

Октадеканонидный путь. Растительные PLA₂ регулируют, главным образом, октадеканонидный путь, в котором из линоленовой кислоты образуются жасмонаты и другие оксипиены. В отличие от других эффекторов, главная сигнальная функция PLA₂ заключается в катализе синтеза не собственно вторичных мессенджеров, а предшественников для синтеза других регуляторов.

Синтез жасмоновой кислоты стимулируется различными внешними сигналами через активацию фосфолипазы A₂ и липоксигеназы. Фосфолипаза

A2 отщепляет жирнокислотный остаток в положении sn-2 от молекулы мембранного фосфолипида. В этом положении, как правило, локализуются жирные кислоты с высокой степенью ненасыщенности, а чаще всего — линоленовая. Липоксигеназа вводит в молекулы свободных высоконенасыщенных жирных кислот пероксидную группу, специфически узнавая пентадиеновую систему (пять атомов углерода и две двойных связи). В структуре линоленовой кислоты можно выделить две пентадиеновые системы, включающих атомы углерода с номерами 9–13 и 12–16. Пентадиеновая система, распознаваемая 13-липоксигеназой, сформирована атомами от C-9 до C-13. Липоксигеназа отщепляет 11-про-S-атом водорода (HS) от C-11 и присоединяет молекулу кислорода к C-13 в виде пероксидной группы. В результате образуется двойная 11-транс-связь (между атомами C-11 и C-12). Далее фермент аллен-оксид синтаза (гидропероксид-дегидраза) отщепляет от 13-гидроксипероксилиноленовой кислоты гидроксил с образованием эпоксидной группы у атомов C-12–C-13. 12-13-эпоксилиноленовая кислота за счет каталитической активности фермента аллен-оксид циклазы формирует пентациклическую структуру, образуя связь между C-9 и C-13.

В результате циклизации эпоксидный кислород сохраняет связь только с C-12 и становится кислородом кето-группы в молекуле 12-оксофитодиеновой кислоты. Двойная связь в цикле (C-10–C-11) насыщается NADPH-зависимой редуктазой. При этом образуется 12-оксофитомоноеновая кислота, из которой в результате трех этапов β -окисления (молекула теряет при этом 6 атомов углерода) синтезируется жасмоновая кислота.

Тема 5. NO-сигналинг и нуклеотидциклазные сигнальные системы

1 Пути образования NO.

2 NO-сигналинг.

3 Нуклеотидциклазные сигнальные системы.

1 Пути образования NO.

Оксид азота (NO) является повсеместно распространенной биоактивной молекулой. NO и его производные способны модулировать активность своих мишеней, связывая металлы редоксцентров металлопротеинов, или путем ковалентной модификации остатков цистеина и тирозина.

Ранее предполагалось, что присутствие оксидов азота в живых тканях является результатом повреждений или загрязнения, поэтому первоначальные исследования еще 1980-е годы были сфокусированы на фитотоксичных свойствах различных форм оксидов азота и их неблагоприятное действие на металлсодержащие ферменты и на развитие растений в целом. Однако в скором времени было выяснено, что значительные количества NO и N_2O продуцируются незагрязненными почвенными и водными экосистемами, которые вносят основной вклад в

процесс естественной деструкции озонового слоя. В 1990 году появилось первое сообщение о стимулирующем действии оксида азота на растительный организм: NO ускорял прорастание семян павлонии войлочной (*Paulownia tormentosa*). В настоящее время достоверно установлено, что оксид азота (II) широко используется в живой природе в качестве вторичного мессенджера – это соединение является компонентом сигнальных механизмов, контролируемых защитных реакций, процессы развития, пролиферацию клеток и многое другое.

Химические и антиоксидантные свойства NO. Оксид азота представляет собой свободно-радикальную липофильную двухатомную молекулу. Маленький радиус и электронейтральность позволяют молекуле NO эффективно диффундировать в клетке, а также проникать через мембраны.

Молекула NO имеет неспаренный электрон на π -разрыхляющей орбитали, что определяет ее свободно-радикальные свойства и реакционную способность. Удаление этого электрона приводит к образованию иона нитрозония (NO^+), а добавление одного электрона – к образованию нитроксиланиона (NO^-).

Наличие неспаренного электрона обеспечивает высокую скорость взаимодействия NO с молекулярным кислородом и супероксидом (O_2^-), производными азота и металлами с переходной валентностью $\text{Me}^{+/2+}$. В биологических системах при взаимодействии NO с молекулярным кислородом образуются другие оксиды с общей формулой NO_x . Взаимодействие NO с супероксидом (O_2^-) приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-), а при взаимодействии с металлами ($\text{Me}^{+/2+}$) – металл-NO производные. Стабильность или распад NO зависит от его концентрации, окислительно-восстановительного статуса системы и концентрации молекул-мишеней и металлов.

Реакционная способность NO лежит в основе NO-зависимых регуляторных механизмов, но вместе с тем, NO может влиять на окислительно-восстановительный гомеостаз клетки независимо от сигнальных механизмов. В зависимости от условий оксид азота NO может проявлять как антиоксидантные, так и токсичные свойства.

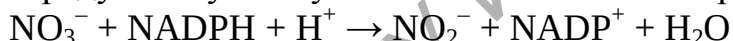
Реакция между перекисью водорода (H_2O_2) и ионами редокс-активных металлов часто приводит к образованию гидроксил-радикала ($\text{OH}^\bullet$). Это сильный окислитель, который способен окислять многие биомолекулы. Присутствие NO может ослабить окислительное повреждение, предотвращая формирование оксидантов, связывая железо и супероксиды, ограничивая, таким образом, формирование гидроксил-радикала. Было продемонстрировано, что NO задерживает также перекисление липидов. Цитозащитные свойства NO у растений наблюдаются при биотических и абиотических стрессах, в том числе при фотоокислении. В ряде случаев, например, при фотоокислении листьев картофеля, или при гиббереллин-опосредованном повышении АФК в клетках алейронового слоя семян ячменя при прорастании, защитные свойства NO проявляются без активации

антиоксидантных ферментов и кодирующих их генов. Однако в условиях окислительного стресса, при котором в клетке накапливается существенное количество АФК, активируются NO-опосредованные защитные системы.

NO может оказывать и токсичное действие. Главным образом это наблюдается при реакции NO с супероксид анионом (O_2^-), которая приводит к образованию сильного окислителя пероксинитрита ($ONOO^-$). Пероксинитрит может окислять тиольные группы до сульфоновых и сульфеновых кислот. Кроме того, пероксинитрит может нитрировать фенильную группу тирозиновых остатков. Это предотвращает фосфорилирование тирозина и нарушает функциональные свойства белков. Тем не менее, нитрирование тирозина широко используется для модуляции активности посредников в сигнальных системах.

Пути образования NO. В растительных клетках синтез NO осуществляется различными способами. К регулируемым процессам относятся ферментативные пути образования. Оксид азота NO образуется в тканях живых организмов из органических и неорганических субстратов. К субстратам NO-синтезирующих ферментов относятся нитраты, нитриты, аргинин и полиамины.

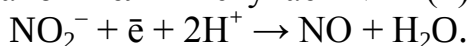
Нитрат/нитрит- зависимые ферментативные пути. Ферментативное образование NO у растений главным образом связано с активностью нитрат-редуктазы (NR). NR – растворимый цитозольный фермент, который играет ключевую роль в утилизации неорганического азота в форме нитратов. Нитрат-редуктаза участвует в восстановлении нитрат-анионов до нитритов:



Нитриты не накапливаются в растительных тканях, а восстанавливаются в дальнейшем нитрит-редуктазой до аммонийной формы, которая далее включается в состав органических соединений.

Нитрат-редуктаза является сложной редокс-системой с внутренней короткой цепью переноса электронов. Активная нитратредуктаза является гомодимером с массой около 200 кД. Каждая из субъединиц содержит три простетические группы: FAD, цитохром b и Mo-молибдоптерин. Катализ сопряжен с переносом пары электронов от NAD(P)H через FAD, гемовое железо и молибден на NO_3^- .

В 1979 году Л. Клеппером (L. Klepper) была обнаружена способность нитрат-редуктазы продуцировать NO. Однако выяснение особенностей катализа синтеза NO и значение этого процесса стало возможным значительно позже. Оказалось, что NR может восстановить NO_2^- (продукт нитрат-редуктазной реакции) до оксида азота (II). Реакция представляет собой одноэлектронное восстановление нитрит-аниона (в качестве восстановителя выступает NAD(P)H):

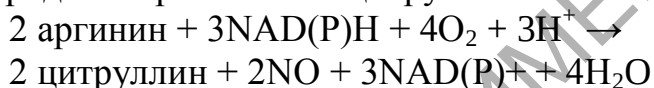


Эта активность фермента является контролируемым процессом и регулируется путем фосфорилирования. Нитрат-редуктаза обеспечивает базальный уровень NO во всех тканях растения и имеет важное значение для развития стрессовых реакций. Было показано, что у мутантных растений, не

проявляющих нитрат-редуктазной активности, нарушен АБК-зависимый механизм закрывания устьиц. Из этого был сделан вывод, что NR-опосредованный синтез NO является важным этапом АБК-зависимой регуляции состояния замыкающих клеток устьиц.

Нитрит-NO редуктаза. В начале 2000-х годов у растений табака был обнаружен плазмалеммный фермент, который катализирует восстановление NO_2^- до NO исключительно в корневых тканях – нитрит-NO редуктаза (Ni-NOR). Активность этого фермента координируется с плазмалеммосвязанной нитрат-редуктазой: Ni-NOR восстанавливает нитрит-анионы, образованные нитрат-редуктазой. Этот путь синтеза может вовлекаться в механизмы развития, а также в ответ на недостаток кислорода и симбиотические взаимодействия.

Аргинин- зависимые пути синтеза. У млекопитающих образование NO катализируется, главным образом, NO-синтазой (NOS). Этот фермент является гем-содержащим белком, который содержит четыре простетические группы: железо-протопорфирин IX, тетрагидробиоптерин, FAD и FMN. Активный фермент NOS представляет собой гомодимер с молекулярной массой около 260 кД. Он катализирует пятиэлектронное окисление терминальной аминокислотной группы L-аргинина с участием молекулярного кислорода и образованием цитруллина и NO.



Активность некоторых изоформ NO-синтазы зависит от кальмодулина, связывание которого осуществляется через специфический сайт. В тканях человека NO-синтаза была обнаружена в трех основных изоформах: двух конститутивных и индуцибельной. Конститутивная форма NOS присутствует постоянно в нервной ткани (нейрональная NOS – nNOS) и эндотелии (эндотелиальная NOS – eNOS). Индуцибельная форма (iNOS) синтезируется при активации иммунной системы и играет центральную роль в развитии иммунного ответа. Конститутивные формы nNOS и eNOS являются Ca^{2+} -зависимыми, а индуцибельная форма iNOS – Ca^{2+} -независимая.

Анализ последовательности ДНК показал, что у растений нет белков, близких по структуре NO-синтазе млекопитающих.

Полиамин-зависимый путь образования. У растений есть ферменты, которые катализируют превращение L-аргинина и косвенным образом связаны с синтезом оксида азота. Например, у растений *Arabidopsis* полиамины спермин и спермидин вызывают значительное усиление продукции оксида азота, тогда как нарушение синтеза полиаминов отражается на снижении синтеза NO. Предполагают, что существует фермент, конвертирующий полиамины в NO. В то же время сами полиамины образуются из аргинина с участием аргинин-связывающих ферментов, таких как аргиназа или аргинин-декарбоксилаза. Поскольку аргиназа, аргинин-декарбоксилаза и NO-синтаза используют аргинин в качестве субстрата, они имеют частично сходные свойства. В частности, активность всех этих ферментов репрессируется структурными аналогами L-аргинина.

Кроме того, они имеют определенное сходство в области реакционных центров, поэтому могут давать положительный ответ на применение одинаковых антител. Таким образом, попытка воздействовать в эксперименте на NOS-подобную активность растений приводит к модуляции активности ферментов полиамин-зависимого пути синтеза NO. Если у животных NO-синтаза обеспечивает прямую конвертацию аргинина в NO, то в полиамин-зависимом механизме из аргинина синтезируются полиамины, которые далее преобразуются в NO: аргинин → полиамины → NO.

Считают, что полиамин-зависимый путь у растений обеспечивает существенную часть синтезируемого в растительных тканях NO.

Нитрит-зависимые неферментативные пути. В биологических системах NO может генерироваться неферментативным путем из нитритов. В растениях обнаружено несколько возможных способов химического восстановления NO_2^- до NO без участия ферментов:

- 1) в апопласте при низких значениях pH (эта реакция *in vitro* может катализироваться аскорбиновой кислотой);
- 2) при светозависимой конверсии каротиноидов в хлоропластах;
- 3) в митохондриях восстановление NO_2^- до NO может происходить при использовании электронов из электрон-транспортной цепи.

Неферментативные пути восстановления нитритов вносят определенный вклад в общее содержание NO, однако ведущими путями являются ферментативные механизмы образования.

2 NO-сигналинг

Оксид азота NO – уникальное низкомолекулярное соединение, обладающее свойствами классического вторичного мессенджера. NO является короткоживущей молекулой с низкой молекулярной массой, которая способна легко диффундировать в тканях, проникая в клетки через мембраны без участия специализированных переносчиков. Реакционная способность позволяет NO связываться со своими мишенями – сигнальными посредниками – и модулировать их активность. Важными посредниками передачи сигнала, наряду с NO, являются ион нитрозония (NO^+) и продукт взаимодействия NO с супероксидом (O_2^-) – пероксинитрит (ONOO^-).

Известно три основных механизма, посредством которых NO и его производные модулируют активность внутриклеточных мишеней.

1. Нитрозилирование металлов. NO комплексуются с металл-содержащими белками, непосредственно модулируя их активность;
2. S-нитрозилирование цистеина. Ион нитрозония (NO^+) формирует с тиоловыми группами цистеина S-нитрозотиол (RS-NO).
3. Нитрирование тирозина. Взаимодействие пероксинитрита (ONOO^-) с остатком тирозина приводит к нитрированию его ароматического кольца.

Нитрозилирование металлов. Впервые способность NO модулировать активность ферментов была показана в клетках гладкой мускулатуры млекопитающих на примере гуанилатциклазы. Цитоплазматическая гуанилатциклаза катализирует синтез циклического

GMP (сGMP), который регулирует активность сGMP-зависимых мишеней, в том числе, киназ. Модуляция активности растворимой гуанилатциклазы млекопитающих осуществляется путем связывания NO с гемом. В результате образуется ферро-нитрозил-гемовый комплекс, который необходим для активации фермента.

Гуанилатциклаза животных является гетеродимером, состоящим из субъединиц α и β . Обе субъединицы необходимы для проявления каталитической активности и имеют N-концевые регуляторные и C-концевые каталитические домены. В состав регуляторных доменов субъединиц входит гемовая группа, нековалентно связанная с белком.

У растений не было обнаружено гомологов гуанилатциклаз, регулируемых оксидом азота, однако существует множество металлсодержащих, в том числе гем-содержащих, растительных ферментов, активность которых потенциально может регулироваться NO. Обнаружено, что оксид азота взаимодействует с липоксигеназами, митохондриальной и цитозольной аконитазами, каталазой, аскорбат-пероксидазой, цитохром с-оксидазой путем нитрозилирования металлов. Образование нитрозил-металл-ферментного комплекса приводит к инактивации указанных ферментов.

Инактивация цитохром с-оксидазы снижает интенсивность потока электронов через дыхательную цепь и, соответственно, ингибирует синтез АТФ в митохондриях. В данных условиях поток электронов может перераспределяться к альтернативным терминальным оксидазам. Функционирование альтернативных переносов электронов значительно снижает продукцию АТФ, но в то же время, существенно уменьшает риск образования активных форм кислорода.

Среди мишеней NO есть неферментативные белки. Например, в корневых клубеньках бобовых с оксидом азота взаимодействует симбиотический белок легемоглобин (Lb) с образованием нитрозил-легемоглобинового комплекса ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{NO}$). Легемоглобин участвует в транспорте кислорода в бактериоиды, формируя обратимую форму оксилегемоглобина ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$). При взаимодействии с кислородом может также образоваться ферриллегемоглобин (LbFe^{IV}). Эти формы ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ и LbFe^{IV}) способны эффективно очищать цитозоль от NO и пероксинитрита (ONOO^-), формируя нитраты и LbFe^{III} . Форма LbFe^{III} эффективно преобразуется в $\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Считают, что эти реакции оказывают защитное действие на функционально активные клубеньки и участвуют в циклическом обращении $\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Некоторые несимбиотические гем-содержащие (Hb) белки способны конвертировать NO в нитрат NAD(P)H-зависимым способом. Снижение внутриклеточного уровня NO при различных стрессах является основной защитной функцией Hb-белки в адаптивных реакциях растений.

S- нитрозилирование цистеина. У растений идентифицировано значительное количество белков, которые подвергаются обратимому S-нитрозилированию. Эти белки вовлечены во множественные функции клеток: метаболизм, фотосинтез, регуляцию окислительно-

восстановительного баланса, адаптивные реакции и др. Процесс S-нитрозилирования цистеина происходит спонтанно неферментативным путем, но не все остатки цистеина нитрозилируются в одинаковой степени. Для эффективного протекания реакции необходимо соответствующее аминокислотное окружение цистеина. Определенное расположение кислотных и основных мотивов может облегчать или, наоборот, затруднять нитрозилирование. Существует три возможных варианта:

- 1) S-нитрозилирование происходит конститутивно при фоновых концентрациях NO;
- 2) S-нитрозилирование происходит при повышенных концентрациях NO, то есть в результате индукции синтеза оксида азота;
- 3) S-нитрозилирование не происходит ни при каких условиях.

В зависимости от положения цистеина его нитрозилирование может по-разному отражаться на состоянии и активности белка. Нитрозилирование является преимущественно обратимой модификацией, что позволяет использовать ее в механизмах передачи внутриклеточных сигналов. Денитрозилирование происходит в восстановительных условиях с участием глутатиона (GSH). При этом образуется нитрозоглутатион (GSNO), который затем окисляется нитрозоглутатион-редуктазой (GSNOR) до глутатион-дисульфида и иона аммония. Следует заметить, что при определенных условиях нитрозоглутатион может быть получен при взаимодействии NO с глутатионом, а потом использоваться как донор NO для нитрозилирования белков. Таким образом, нитрозилирование и денитрозилирование осуществляются спонтанно неферментативным путем, при этом смещение равновесия в сторону денитрозилирования в восстановительных условиях обеспечивается нитрозоглутатион-редуктазой, которая играет ключевую роль в выключении S-нитрозотиол-опосредованного сигнала.

Существенность S-нитрозилирования в механизме регуляции активности была показана для ряда растительных белков.

Одним из объектов нитрозилирования является метионинаденозилтрансфераза – фермент который катализирует синтез S-аденозилметионина. Это соединение используется как источник метильной группы в реакциях транسمетилирования и является предшественником в биосинтезе этилена и полиаминов. У *Arabidopsis* обнаружено три изоформы метионин-аденозилтрансферазы.

Белок **метакаспаза 9** (*Arabidopsis thaliana* metacaspase 9 – AtMC9), принимающий участие в механизмах апоптоза, конститутивно нитрозилируется преимущественно по цистеину-147, расположенному в каталитическом домене. Эта ковалентная модификация поддерживает AtMC9 в неактивном состоянии. При активации апоптозного пути AtMC9 подвергается действию регуляторной протеазы. В результате частичного протеолиза конформация AtMC9 изменяется так, что другой цистеин-29 пространственно заменяет цистеин-147 в каталитическом центре.

Цистеин-29 участвует в протеолитической реакции, катализируемой AtMC9, и при этом не подвергается нитрозилированию, которое не

происходит в виду отсутствия соответствующих последовательностей, облегчающих нитрозилирование. Активация AtMC9 происходит однократно и необратимо, так как белок не может вернуться в исходное состояние.

Гликолитический фермент 3ФГА-дегидрогеназа также подвергается S-нитрозилированию. Эта модификация провоцирует структурные изменения молекулы, которые приводят к инактивации фермента, а также повышают его способность к взаимодействию с другими белками. Мишени, с которыми взаимодействует S-нитрозилированная 3ФГА-ДГ, и значение этого механизма у растений не выяснено. Однако известно, что у млекопитающих нитрозилирование 3ФГА-ДГ, помимо инактивации этого фермента, стимулирует его связывание с убиквитинирующей лигазой Siah1. Это взаимодействие способствует переносу лигазы Siah1 в ядро, где она убиквитинирует ядерные мишени и стимулирует их деградацию, включая таким образом механизм апоптоза – программируемой гибели клеток.

Нитрирование тирозина. До недавнего времени нитрирование тирозина расценивали как признак окислительного стресса, который выражается в потере нитрированными белками своих функций. Кроме того, существуют данные о том, что нитрированные белки обладают повышенной чувствительностью к протеолизу. Мишени нитрирования и функциональное значение этой модификации у растений еще не выяснены. Однако сейчас продолжают накапливаться данные о том, что этот процесс имеет важное регуляторное значение. Помимо этого, есть сведения об обратимости данной модификации. Все это позволяет со значительной долей уверенности предположить, что нитрирование остатков тирозина используется в природе как полноценный сигнальный механизм.

Связь NO и Ca^{2+} -сигналов. NO и Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути тесно взаимосвязаны между собой. Стимуляция синтеза NO приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме за счет активации мембранных кальциевых каналов, локализованных в плазмалемме и внутренних мембранах, главным образом, в тонопласте и ЭПР. Существуют два основных механизма воздействия NO на кальциевые каналы:

- 1) прямой – путем нитрозилирования каналов;
- 2) косвенный – опосредованный вторичными мессенджерами циклическим гуанозинмонофосфатом (сGMP) и циклической аденозиндифосфатрибозой (сADPR).

Существует также обратная связь между NO и Ca^{2+} . Например, повышение цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} , вызванное активацией плазмалеммного Ca^{2+} -канала CNGC2 под действием элиситоров, приводит к усилению продукции NO. Способность ионов кальция стимулировать синтез NO представляет собой регуляторную положительную петлю, посредством которой NO контролирует свой собственный синтез.

3 Нуклеотидциклазные сигнальные системы

Сигнальные механизмы с участием циклических нуклеотидов функционируют у всех основных царств живых организмов. Однако

формирование данной концепции заняло около полувека. О том, что циклический аденозинмонофосфат (сАМР) выполняет функции вторичного мессенджера в животных клетках, известно с конца 50-х годов двадцатого века после открытия Сазерленда 1957 года. Еще через десятилетие аналогичный вывод был сделан для прокариотов. Однако для растений длительное время не существовало никаких экспериментальных доказательств не только о функционировании нуклеотидциклазных сигнальных систем, но даже о присутствии в их тканях циклических нуклеотидов. По этой причине в 1970-х годах сложилось мнение, что у растений не синтезируются циклические нуклеотидмонофосфаты, в том числе сАМР, и не работают сигнальные системы с их участием. Основная причина этого – чрезвычайно низкие концентрации этих веществ у растений. Концентрация сАМР в растительных тканях составляет менее 20 пМ на 1 г сырой массы, тогда как у животных – более 250 пМ. Количество сGMP у растений, как правило, меньше в 20–30 раз, по сравнению с сАМР. Содержание циклических нуклеотидов существенно различается в разных тканях и органах растений. Кроме того, их концентрация может значительно варьировать под влиянием внешних воздействий. Например, в листьях *Arabidopsis thaliana* концентрация сGMP под действием авирулентного штамма *Pseudomonas syringae* повышалась с 0,4 до 1 пМ на 1 г сырой массы.

Обнаружить циклические нуклеотиды у растений стало возможным только благодаря усовершенствованию методов идентификации химических соединений. Исследования последних двух десятилетий позволяют заключить, что, несмотря на низкие концентрации циклических нуклеотидмонофосфатов, у растений, как и у животных, функционируют нуклеотидциклазные сигнальные системы. Показано, что с участием сАМР и сGMP осуществляется регуляция многих реакций растений, в том числе модуляция устьичной транспирации, ростовые реакции, защитные механизмы и др. Однако до настоящего момента сигнальные механизмы с участием циклических нуклеотидов у растений являются наименее изученными.

Аденилатциклазная система.

Аденилатциклазы (АЦ) – это ферменты, катализирующие образование циклического АМР из АТР в присутствии ионов Mg^{2+} . В результате реакции отщепляется пирофосфатная группа, а между α-фосфатом и гидроксильной группой 3-го атома углерода остатка рибозы образуется эфирная связь. Таким образом, продуктом реакции является 3'-5'-сАМР (рис. 40) и пирофосфат. $ATP \rightarrow cAMP + PP_i$

Образующийся вторичный мессенджер 3'-5'-сАМР чаще называют циклическим аденозинмонофосфатом или сАМР без указания положения гидроксильных групп, участвующих в образовании циклической фосфодиэфирной связи.

Расщепление сАМР осуществляется фосфодиэстеразой (ФЭ). Этот фермент гидролизует циклическую фосфоэфирную связь, в результате чего образуется АМР. В зависимости от того, какие изоформы ФЭ проявляют

активность, могут образоваться две формы АМР с разным положением фосфорной группы: 5'-АМР или 3'-АМР.

Несмотря на то, что аденилатциклазы разных видов живых организмов катализируют одну и ту же реакцию, они имеют существенные различия в структуре и механизме регуляции. Причем значительные расхождения обнаруживаются даже по аминокислотной последовательности каталитических доменов. Существует несколько классификаций АЦ на основе первичной структуры различных функциональных доменов этих ферментов и, главным образом, каталитических. Однако ни в одну из этих классификаций пока еще не включены растительные АЦ, поскольку сведения о них крайне ограничены.

Мембраносвязанные аденилатциклазы (мАЦ) млекопитающих представляют собой сложные интегральные белки гликопротеины с молекулярной массой 180–200 кД (1064–1248 аминокислотных остатков). Полипептидная цепь всех мембранных АЦ 12 раз пересекает мембрану, формируя два модуля, каждая из которых состоит из 6 трансмембранных доменов. На внешней стороне плазмалеммы находятся только небольшие междоменные полипептидные участки, которые частично гликозилированы олигосахаридными группами. С цитоплазматической стороны находятся короткий N-конец и значительно больший C-конец молекулы, а также большой фрагмент, расположенный между двумя 6-доменными трансмембранными структурами. Средний цитоплазматический фрагмент и C-терминальный участок полипептидной цепи АЦ формируют активный центр, включающий участок связывания АТР, а также регуляторный сайт, через который осуществляется взаимодействие фермента с α -субъединицей гетеротримерного G-белка. Предполагают, что каталитическая активность АЦ проявляется только у гомодимерной формы фермента.

Аденилатциклазы растений. **Изоферментный состав аденилатциклаз растений не изучен**, причем большинство данных об этих ферментах имеют косвенный характер. Некоторые ионы двухвалентных металлов оказывают различный, а иногда и противоположный эффект на аденилатциклазную активность, ассоциированную с мембранами в растительных тканях. Это указывает на присутствие у растений нескольких изоформ мембраносвязанной аденилатциклазы (мАЦ). Наличие растворимой формы (рАЦ) этого фермента многими исследователями ставится под сомнение. Вместе с тем, предполагается, что у растений функционирует аденилатциклаза слабо ассоциированная с клеточными органеллами и элементами цитоскелета. Эта форма, по-видимому, является поверхностным мембранным белком, который не имеет трансмембранных доменов.

Фосфодиэстеразы. Фосфодиэстеразы представляют большую группу ферментов, которые расщепляют циклические фосфодиэфиры. Отдельные изоформы ФЭ животных проявляют субстратную специфичность в отношении 3'5'-циклических нуклеотидмонофосфатов (сАМР, сGMP) или 2'3'-циклических нуклеотидов. Фосфодиэстеразы, расщепляющие сАМР и

cGMP, функционируют в нуклеотидциклических сигнальных системах, а ФЭ, специфичные к 2'3'-циклическим нуклеотидам, участвуют в деградации РНК.

Большинство растительных ФЭ обладают меньшей субстратной специфичностью, по сравнению с животными ферментами, и могут расщеплять не только 3'5'-циклофосфаты, но и 2'3'-циклические нуклеотиды. Кроме того, фосфодиэстеразы растений воздействуют на фосфодиэфирную связь с разных сторон относительно фосфорной группы, в результате чего образуется не один, а смесь продуктов реакции. Например, при расщеплении cAMP образуется смесь 5'-AMP и 3'-AMP. Соотношение этих продуктов зависит от изоформы ФЭ и условий, однако в большинстве случаев из двух возможных продуктов преобладает 3'-AMP. При каталитическом действии животных фосфодиэстераз на cAMP или cGMP преимущественно образуются соответствующие 5'-моонуклеотиды.

Роль cAMP в регуляции активности протеинкиназы А животных. В неактивном состоянии протеинкиназы А существуют в виде тетрамеров C2R2, которые состоят из двух каталитических (С) и двух регуляторных (R) субъединиц. Регуляторные субъединицы образуют прочно связанный димер (R2), который сохраняется при диссоциации тетрамера.

В результате присоединения 4-х молекул cAMP к двум регуляторным субъединицам, изменяется конформация последних, что приводит к высвобождению двух отдельных каталитических субъединиц.

Каталитически активные субъединицы С фосфорилируют белки, имеющие характерные последовательности, модулируя их активность. После диссоциации тетрамерного неактивного комплекса связь cAMP с регуляторными субъединицами ослабевает.

Активность протеинкиназы А зависит от концентрации cAMP, а соответственно, и от соотношения активностей аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. При устранении внешнего стимула, который активирует синтез cAMP, содержание вторичного мессенджера снижается. Регуляторный димер при низкой концентрации cAMP связывает и инактивирует каталитические субъединицы.

Протеинкиназа А была выявлена у всех животных. Этот фермент выполняет важнейшие регуляторные функции, поскольку фосфорилирует многие цитоплазматические и ядерные белки, в том числе гистоны. Активация протеинкиназ А приводит к модуляции активности ферментов, транскрипционных и хроматиновых факторов. Таким образом, протеинкиназы А участвуют в регуляторных механизмах, контролирующих не только метаболическую активность клетки, но также экспрессию генов и процессы ремоделирования хроматина. Белки, гомологичные протеинкиназам А, у растений обнаружены не были.

cAMP-регулируемые белки растений. В животных клетках основными мишенями cAMP являются протеинкиназы А и ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (cyclic nucleotide-gated channels – CNGCs), поэтому была предпринята попытка поиска подобных белков у растений. Протеинкиназа А-подобные ферменты, активность которых

регулируется циклическими нуклеотидами, у растений не были обнаружены. Поиск таких киназ проводился биоинформационными методами (по наличию последовательностей, гомологичных последовательностям протеинкиназы А животных), и биохимическими с использованием субстратов, характерных для киназ млекопитающих. Нельзя исключать возможность, что у растений сАМР-регулируемые протеинкиназы обладают низкой гомологией к аналогичным ферментам животных и проявляют специфичность к иному субстрату. Таким образом, несмотря на отсутствие у растений протеинкиназы А, вопрос о том, участвуют ли сАМР-регулируемые протеинкиназы в сигнальных механизмах растений, остается открытым.

Ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs), у растений были обнаружены, причем доказано их участие и в трансдукционных механизмах.

CNGC растений. Первый ионный канал, который был охарактеризован у растений как канал, открываемый циклическими нуклеотидами, был AtCNGC2. Это K^+ -канал, который способен проводить ионы K^+ и другие моновалентные катионы, за исключением Na^+ . Интенсивность трансмембранного потока ионов через этот канал прямо зависит от сАМР. Однако на активность AtCNGC2 влияют не только сАМР, но и ионы кальция: микромолярные концентрации Ca^{2+} блокируют AtCNGC2.

CNGC принимают участие в защитных механизмах, работе транспирационного аппарата, росте пыльцевой трубки, светочувствительности и других реакциях растений. Окончательно физиологическая роль CNGC растений не установлена, однако предполагается, что общая функция этих каналов заключается в повышении уровня ионов кальция в клетке.

Среди CNGC растений особый интерес вызывают Ca^{2+} -специфичные каналы. Эти каналы участвуют в преобразовании сигнала сАМР (концентрационного) в кальциевый сигнал в виде осцилляций цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , поэтому сАМР-зависимый сигнальный механизм растений может полноценно работать без участия киназ. Модуляция активности K^+ -проводящих CNGC циклическими нуклеотидами чрезвычайно важна для регуляции осмотических механизмов, в том числе, устьичной транспирации.

Гуанилатциклазы и сGMP. Циклический гуанозинмонофосфат – вторичный мессенджер, который регулирует значительное количество разнообразных функций в клетках растительного организма. С участием сGMP осуществляется трансдукция сигналов внутри клетки в ответ на воздействие гормонов и внешних стимулов, развиваются стрессовые реакции, контролируется активность ионных каналов, а также регулируется уровень транскрипции. Показано, что сGMP имеет существенное значение в механизмах патогенеза. Например, при воздействии патогенных микроорганизмов сGMP является критически важным для стимуляции экспрессии генов, кодирующих фенилаланин-аммоний лиазу и PR-белки (pathogenesis-related proteins).

Синтез cGMP из GTP катализируется гуанилатциклазами. У животных известно два класса этих ферментов: мембраносвязанные и растворимые (цитоплазматические). Мембраносвязанные гуанилатциклазы один раз пересекают мембрану и включают один циклазный домен с цитоплазматической стороны молекулы. Мембраносвязанные формы гуанилатциклаза обладают свойствами рецепторов, то есть их каталитическая активность модулируется при связывании лиганда (экстраклеточный домен связывает пептидные регуляторы). Как большинство рецепторных молекул, имеющих один трансмембранный домен, мембраносвязанные гуанилатциклазы приобретают функциональную активность в димерном состоянии. В состав димера входят две одинаковые субъединицы. Растворимые гуанилатциклазы – это гетеродимеры, состоящие из двух различных субъединиц. Гем-содержащие редокс-центры растворимых гуанилатциклаз связывают NO, который является специфическим активатором этого фермента. Молекулярными мишенями cGMP у животных являются cGMP-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G) и ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs).

У высших растений экспериментально доказано существование двух белков с гуанилатциклазной активностью, принадлежащих к разным классам. Оба белка были идентифицированы у *Arabidopsis*. Растворимая гуанилатциклаза растений, в отличие от животного фермента, не чувствительна к NO.

В аминотерминальной области молекулы расположен каталитический гуанилилциклазный домен, а в карбокситерминальной – цистеин протеаза-подобный домен. Сочетание этих двух доменов является уникальным для растительной растворимой гуанилатциклазы, и ранее не было обнаружено у других белков. Мембраносвязанная гуанилатциклаза *Arabidopsis* является рецептором брассинолида AtBRI1 и имеет в цитоплазматической области молекулы гуанилатциклазный домен. Растительные ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs), регулируются циклическим GMP. Другие молекулярные мишени cGMP не идентифицированы.

Тема 6. Ионы кальция в системе передачи сигнала

1 Кальциевый сигналинг

2 Структура Ca^{2+} -связывающих белков

3 Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал

4 Декодирование Ca^{2+} -сигнала

1 Кальциевый сигналинг

Ионы Ca^{2+} выполняют важнейшую регуляторную роль в клетках: они контролируют модуляцию активности ферментов, стабилизируют клеточные структуры, активируют сборку элементов цитоскелета и т. д. Вместе с этим,

ионы Ca^{2+} являются одними из ключевых внутриклеточных сигнальных посредников, выполняющих функции вторичных мессенджеров.

Клетки всех известных организмов способны поддерживать мембранный градиент концентраций ионов Ca^{2+} . Уровень концентрации свободного кальция в цитоплазме нестимулированных клеток обычно составляет 10^{-7} – 10^{-6} М. В двумембранных органеллах (митохондриях, пластидах) и люмене эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток поддерживается более высокая концентрация этого иона. В растительных клетках значительные его количества накапливаются в вакуолях. Содержание кальция в межклеточном пространстве превышает его концентрацию в цитоплазме на несколько порядков и может достигать 10^{-3} М, как, например, в апопласте растений. Поддержание градиента концентраций ионов Ca^{2+} чрезвычайно важно для функционирования клетки, поскольку долговременное повышение уровня кальция в цитозоле приводит к ее гибели.

Эволюционный выбор ионов кальция для выполнения сигнальной функции связывают с тем, что первоначально живые клетки научились избавляться от них, поскольку кальций как щелочноземельный металл способен взаимодействовать с фосфатами с образованием нерастворимых солей. Фосфаты необходимы клетке для синтеза нуклеиновых кислот, фосфолипидов, макроэргических соединений и др. Соответственно, высокие концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме могут привести к значительному снижению концентрации растворимых фосфатов, что, в свою очередь, привело бы к нарушению как энергетического обмена клетки, так и ее деятельности в целом.

В определенных условиях под воздействием внешних факторов провоцируется деполяризация мембраны, которая сопровождается кратковременным повышением концентрации ионов кальция. Это событие является своеобразным сигналом тревоги для клетки, поэтому в процессе эволюции возникли регуляторные системы, функционирование которых непосредственно зависит от флуктуации внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Макромолекулы, способные специфически связывать ионы Ca^{2+} , были приспособлены для выполнения функций внутриклеточных кальциевых рецепторов. Большинство Ca^{2+} -регулируемых процессов в клетках происходит при кратковременных изменениях цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} в диапазоне 10^{-7} – 10^{-5} М.

Таким образом, эволюционно первыми возникли системы, удаляющие ионы кальция из цитоплазмы, а следующим этапом было возникновение сигнальных клеточных систем, использующих ионы Ca^{2+} в качестве вторичных мессенджеров. В процессе формирования кальциевой сигнальной системы, совершенствовались также способы индуцированного поступления кальция в цитоплазму.

Эффективная работа Ca^{2+} -зависимого сигнального механизма возможна в том случае, если в клетке работают три основных функциональных модуля.

1) Системы активного транспорта Ca^{2+} , направленного из цитоплазмы в экстраклеточное пространство, ЭПР, митохондрии и вакуоль. Энергозависимые переносчики Ca^{2+} располагаются в мембранах, отделяющих цитоплазму от данных компартментов.

2) Системы индуцированного поступления кальция в цитоплазму: кальциевые каналы, через которые ионы Ca^{2+} в определенных условиях проникают в цитоплазму по градиенту концентраций.

3) Цитоплазматические компоненты сигнальных цепей (ферменты, ионные каналы, каталитически неактивные сигнальные посредники, транскрипционные регуляторы и другие функциональные молекулы), активность которых модулируется при изменении концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

Модуляция активности Ca^{2+} -транспортеров под влиянием конкретных стимулов приводит к изменениям цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , которые следует рассматривать не как односторонне направленные изменения концентрации, а как осцилляции – повторяющиеся флуктуации, имеющие определенную регулярность, которая характеризуется частотой, амплитудой и формой. Форма осцилляционной кривой зависит от скорости изменений, которые могут быть плавными и скачкообразными. Кривая может приобретать форму синусоиды с плавными или заостренными экстремумами или квадратной волны. Специфическое воздействие определенной силы кодируется в виде кальциевых осцилляций, которые затем декодируются цитоплазматическими сигнальными компонентами, что в конечном итоге выражается в изменении функциональной активности клетки.

2 Структура Ca^{2+} -связывающих белков

Для эффективного связывания и удержания ионов Ca^{2+} необходимо наличие в структуре белка системы, которая позволяет образовать с ионом от 6 до 8 координационных связей определенной длины. Кроме того, данная структура должна обладать высокой подвижностью, чтобы иметь возможность захватывать ион Ca^{2+} , окружая его со всех сторон, полностью изолируя от молекул воды. Такой структурой обладают Ca^{2+} -связывающие центры белков, которые также называют EF-руками.

EF-рука является обязательным модулем Ca^{2+} -связывающих белков. Этот участок имеет вид спираль–петля–спираль. Полипептидная цепочка петли EF-руки состоит из 12 аминокислотных остатков. Она оборачивается вокруг иона кальция, образуя практически правильный октаэдр, на шести вершинах которого находятся аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании ионов кальция через кислородсодержащие группы. Таким образом, устанавливается 6 координационных связей. Средство каждого индивидуального Ca^{2+} -связывающего сайта составляет 10^{-6} – 10^{-5} М.

Высокая подвижность EF-руки позволяет не только эффективно связывать ионы Ca^{2+} , но и избавляться от них при снижении цитоплазматического уровня кальция. Лабильность структуры – это важное

свойство, необходимое для выполнения белком регуляторных функций, но с другой стороны, является фактором его нестабильности. Эта проблема частично решается за счет особенности структуры Ca^{2+} -связывающих участков молекулы: EF-руки формируются попарно на одном участке полипептидной цепи. Парные Ca^{2+} -связывающие центры взаимодействуют друг с другом и, не теряя подвижности, способствуют взаимной стабилизации. По этой причине большинство Ca^{2+} -связывающих белков содержат парное количество EF-рук (от 2 до 6). При этом существуют также Ca^{2+} -связывающие белки с нечетным количеством EF-рук. Однако следует уточнить, что у таких белков нечетное количество функционально активных Ca^{2+} -связывающих центров, однако физически присутствует четное количество EF-рук. Одна из EF-рук может нести мутацию, которая не позволяет ей выполнять Ca^{2+} -связывающие функции, но при этом она стабилизирует структуру парной функционально активной EF-руки.

Наиболее простым Ca^{2+} -связывающим белком является низкомолекулярный белок кишечника млекопитающих – кальбиндин. Полипептидная цепь молекулы кальбиндина формирует лишь две EF-руки, то есть является, по сути, минимальным Ca^{2+} -связывающим модулем. Кальбиндин имеет значение в связывании и удержании кальция. Регуляторной функцией он не обладает. При связывании кальция существенных изменений в пространственной структуре молекулы кальбиндина не наблюдается.

Самый распространенный в природе Ca^{2+} -связывающий регуляторный белок – это кальмодулин (CAM) – низкомолекулярный белок с молекулярной массой 18 кД. Содержание белка кальмодулина в клетке достаточно высокое. В типичной животной клетке оно составляет около 1 % от общей массы клеточного белка (более 107 молекул). Кальмодулин представляет собой консервативный одиночный полипептид, состоящий примерно из 150 аминокислотных остатков. Его структура сформирована преимущественно α -спиральными участками. Пространственная структура белка по форме напоминает гантель. На N- и C-концевых участках молекулы находятся по два Ca^{2+} -связывающих центра, представленных EF-руками. Срединная часть молекулы сформирована центральной α -спиралью, имеющей отрицательно заряженные аминокислотные остатки. Кальмодулин присутствует практически во всех клетках животных, растений и грибов, функционируя в них как многоцелевой внутриклеточный рецептор ионов Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} –кальмодулин (Ca^{2+} /CAM) не обладает ферментативной активностью, он выполняет роль аллостерического регулятора, который участвует в большинстве процессов, регулируемых ионами Ca^{2+} . Этот белок модулирует активность множества различных ферментов, например, протеинкиназ, ферментов, участвующих в образовании и разрушении циклических нуклеотидов (нуклеотидциклаз, фосфодиэстераз) и других энзимов, а также транскрипционных факторов. В некоторых случаях кальмодулин всегда связан со своей мишенью, являясь постоянной регуляторной субъединицей

ряда ферментных комплексов, например, киназы фосфоорилазы млекопитающих.

С кальмодулином связана регуляция активности белков цитоскелета, а, следовательно, процессы экзо- и эндоцитоза. Внутриклеточное движение также зависит от уровня кальцинирования кальмодулина.

3 Транспортные системы, кодирующие кальцевый сигнал

Экстраклеточный транспорт кальция. Ионы кальция выводятся из цитозоля против градиента концентраций, поэтому этот процесс требует затраты энергии. Существуют транспортеры кальция, активность которых зависит от энергии гидролиза АТФ, – Ca^{2+} -АТРазы. Другие транспортеры используют протон-движущую силу – энергию электрохимического градиента концентраций ионов H^+ .

Ca^{2+} -АТРазы. АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} через мембраны осуществляется АТФазами Р-типа класса Р2. Ca^{2+} -АТРазы называют также кальцевыми помпами или насосами. По структуре и механизму активации они делятся на 2 группы:

- 1) группа Р2А – Ca^{2+} -АТРазы ER-типа (endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPases – ЕСА);
- 2) группа Р2В – автоингибируемые Ca^{2+} -АТРазы (autoinhibited Ca^{2+} -ATPases – АСА).

Между двумя группами Ca^{2+} -АТРаз обнаруживаются два основных отличия.

Первое отличие связано с особенностями регуляции переносчиков. Активность Ca^{2+} -АТРаз ЕСА-типа не зависит от кальмодулина, тогда как АТРазы АСА-типа являются кальмодулин-зависимыми. В аминотерминальном цитоплазматическом районе молекулы АСА транспортера находится участок связывания кальцинированного кальмодулина (Ca^{2+} /САМ).

Второе отличие – функциональное. ER-АТРазы обеспечивают доставку ионов Ca^{2+} во внутриклеточные компарменты, главным образом, в эндоплазматический ретикулум. Попадая в эндомембранную систему, ионы Ca^{2+} в дальнейшем включаются в состав секрета и выводятся в межклеточное пространство, например, в виде пектинатов кальция – компонентов матрикса клеточной стенки.

Кроме того, в люмене различных эндомембранных образований ионы кальция используются также в качестве кофактора, необходимого для регуляции активности ферментов. Автоингибируемые Ca^{2+} -АТРазы выполняют в клетках ключевую сигнальную роль. Это связано с тем, что их активность в значительно большей степени изменяется под воздействием внешних факторов, по сравнению с переносчиками ER-типа. Соответственно, автоингибируемые Ca^{2+} -АТРазы вносят более существенный вклад в формирование внутрицитоплазматических кальцевых осцилляций.

В геноме *Arabidopsis* кодируется 10 автоингибируемых Ca^{2+} -АТРаз. Отдельные изоформы АСА селективно экспрессируются в различных

условиях. Например, синтез АСА12 и АСА13 стимулируется патогенами, АСА8 и АСА10 – холодовым воздействием, а АСА8 и АСА9 появляются в ответ на обработку АБК.

Автоингибируемые Ca^{2+} -АТразы обнаруживаются в различных клеточных мембранах, но каждая изоформа, как правило, тяготеет к определенному типу мембраны. Так, АСА8, АСА9 и АСА10 локализируются в плазмалемме, АСА2 – в ЭПР, а АСА4 и АСА11 – в тонопласте.

Активность Ca^{2+} -АТраз группы Р2В модулируется различными способами. Помимо кальмодулина, многие АСА регулируются кислыми фосфолипидами, например, фосфатидной кислотой, которая образуется в результате гидролиза мембранных фосфолипидов фосфолипазой D, а локализованная в ЭПР АСА2 регулируется путем фосфорилирования.

Механизм переноса. В процессе переноса ионов Ca^{2+} -АТразы претерпевают ряд структурных изменений, влияющих на сродство с ионами Ca^{2+} и АТР. Изменения происходят последовательно и повторяются циклически.

1) Ca^{2+} -АТраза связывает два иона кальция (все Ca^{2+} -АТразы имеют один типичный Ca^{2+} -связывающий домен, включающий две EF-руки).

2) Связывание ионов кальция способствует повышению сродства АТразы к АТР. Молекулы АТР связываются в виде комплекса с ионами Mg^{2+} .

3) Осуществляется автофосфорилирование переносчика – γ -фосфатная группа АТР переносится на остаток аспарагиновой кислоты.

4) Фосфорилирование стимулирует конформационные изменения молекулы АТразы, в результате которых связанные ионы Ca^{2+} переносятся с цитоплазматической стороны на экстраклеточную сторону мембраны.

5) В результате изменения конформации молекулы снижается сродство АТразы к ионам Ca^{2+} , которые высвобождаются во внеклеточное пространство.

6) Фосфатная группа отщепляется от остатка аспарагиновой кислоты.

7) Дефосфорилированная и декальцинированная молекула Ca^{2+} -АТразы принимает исходную конформацию.

$\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортеры. На всех мембранах растительных клеток поддерживается электрохимический градиент протонов. Этот градиент создается H^{+} -АТразами Р-типа и может использоваться для энергетического обеспечения трансмембранных процессов. Транспорт ионов Ca^{2+} осуществляется $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерами, которые называют катионными обменниками (cation exchanger – САХ).

У Arabidopsis выявлено 6 таких транспортеров. Молекулы САХ имеют предположительно 11 трансмембранных доменов. Из шести САХ, обнаруженных у Arabidopsis, наиболее значимую роль в поддержании кальциевого гомеостаза выполняют САХ1 и САХ3. Антипортеры САХ регулируются подобно кальциевым насосам через автоингибиторный аминотерминальный домен.

Индукцированное поступление кальция в цитоплазму. Ионы Ca^{2+} проникают в цитоплазму по градиенту концентраций через селективные Ca^{2+} -каналы. В нестимулированных условиях каналы находятся в неактивном состоянии и не пропускают ионы Ca^{2+} . В структуре ионных каналов выделяют автоингибиторный участок, который запирает канал. При получении соответствующего сигнала конформация молекулы переносчика изменяется, в результате чего формируются мгновенные ионоселективные поры, через которые ионы Ca^{2+} проникают через мембрану по градиенту концентраций.

Существует значительное количество Ca^{2+} -каналов, различающихся по структуре, способу активации и локализации. Многие из них являются функционально неоднозначными и активируются разными стимулами. Например, при холодной обработке активируются тонопластные Ca^{2+} -каналы, активные формы кислорода задействуют плазмалеммные каналы, а в корневых волосках бобовых растений Nod-факторы провоцируют мобилизацию кальция из перинуклеарного района эндоплазматического ретикулума.

Потенциал-управляемые каналы. Потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы (Voltage-Gated Ca^{2+} -Channel – VGCC) активируются при изменении мембранного потенциала. В структуру каналов этого типа включены один или несколько сенсорных доменов, которые несут заряженные аминокислотные остатки, благодаря чему способны реагировать на изменение мембранного потенциала. Количество и расположение зарядов на сенсорных доменах определяют «настройку» канала, то есть его чувствительность на определенные изменения трансмембранного потенциала. Изменения потенциала вызывают сдвиг сенсорных доменов, что приводит к модификации пространственной структуры молекулы и открытию (или закрытию) канала. Потенциал-управляемые каналы делят на две основные группы: каналы одной группы активируются при деполяризации мембраны, а второй – при гиперполяризации.

Лиганд-управляемые каналы. Лиганд-управляемые Ca^{2+} -каналы (Ligand-Gated Ca^{2+} -Channel – LGCC) обладают свойствами рецепторо-каналоформеров. Они связывают лиганд определенного типа и формируют при этом кальциевый канал, по которому ионы кальция устремляются в цитоплазму. В растительных клетках предполагается наличие в тонопласте и эндоплазматических мембранах Ca^{2+} -каналов, регулируемых инозитол-1,4,5-трифосфатом (IP3) и циклической аденозиндифосфат-рибозой (сADPR). Однако физически эти каналы не выделены. Данные структуры идентифицированы и изучены у животных. Как показал геномный анализ, у растений нет гомологов рецепторов IP3 и сADPR животных. Вместе с тем, существование принципиально различных структур, выполняющих сходные функции у разных групп организмов, отрицать нельзя.

Рецептор IP3 животных. У животных IP3-рецептор локализуется на мембранах эндоплазматического ретикулума в виде гомотетрамера. Вторичный посредник инозитолтрифосфат (IP3) образуется в результате

расщепления фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата фосфолипазой C. Связываясь с IP₃-рецептором, IP₃ стимулирует открывание Ca²⁺-проводящего канала и способствует мобилизации Ca²⁺ из ЭПР. С-концевая часть молекулы образует шесть трансмембранных доменов, которые участвуют в образовании канала. N-концевая область молекулы обращена в сторону цитоплазмы. В них расположены сайты связывания IP₃, Ca²⁺ и АТР, а также два сериновых остатка, которые фосфорилируются протеинкиназами PKA и PKG. Карбокси-терминальный участок молекулы ориентирован в сторону цитозоля и вовлекается в контроль открывания канала. Повышение концентрации IP₃ в цитоплазме приводит к его связыванию с рецептором. В большинстве клеток млекопитающих IP₃-рецептор активируется при концентрации IP₃ порядка 0,1–2 мкМ. Выход Ca²⁺ через ионные каналы сопровождается противотоком ионов K⁺ из цитоплазмы. Благодаря этому компенсируется вынос заряда в цитоплазму, то есть снимается электрогенный эффект.

Точный механизм мобилизации кальция с участием инозитолфосфатов у растений не выяснен. Известно, что у растений, помимо IP₃, во внутриклеточной передаче сигнала используются и другие формы фосфорилированного инозитола – инозитол-пентакисфосфат (IP₅) и инозитол-гексакисфосфат (IP₆). При этом IP₃ также стимулирует мобилизацию внутриклеточных запасов кальция, однако IP₆ оказывает более сильное действие.

Также неизвестно, используется ли какая-либо форма инозитолфосфата в качестве непосредственного регулятора активности кальциевых каналов или регуляция осуществляется опосредовано через иные регуляторы.

Ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами (Cyclic Nucleotide-Gated Channels – CNGC) представляют группу каналоформеров, связывающих циклические нуклеотид-монофосфаты (сАМР и сGMP). В геноме *Arabidopsis* кодируется 20 подобных каналов. Они имеют шесть трансмембранных доменов и поровый домен. В мембранах они образуют тетрамерные структуры, которые необходимы для формирования канала. Ряд растительных CNGC представляют собой Ca²⁺-каналы, но некоторые из них проницаемы также для моновалентных ионов.

Кроме циклических нуклеотидмонофосфатов растительные CNGC связывают также кальмодулин. Все известные CNGC локализируются в плазматической мембране.

Глутамат-рецептор-подобные Ca²⁺-каналы растений являются гомологами ионотропных рецепторов глутамата (Glutamate Receptor – GLR). В *Arabidopsis* семейство генов GLR включает 20 членов. Продукты генов предположительно имеют три трансмембранных домена и объединяются в мембранах в тетраи пентамерные структуры.

Двупоровые Ca²⁺-каналы. У *Arabidopsis* обнаружен ген TPC1, кодирующий единственный представитель семейства двупоровых каналов (Two-Pore Channel – TPC). Предположительно молекула TPC1 имеет 12 трансмембранных доменов (TMD) и включает два поровых домена. TPC1

локализуется в тонопласте, в котором, по-видимому, присутствует в виде гомодимера. Цитозольная петля между TMD6 и TMD7 формирует кальций-связывающий центр (EF-рука) и домен связывания регуляторного белка 14-3-3. TMD4 и TMD10, имеющие положительно заряженные аминокислотные остатки, функционируют в качестве сенсорных доменов, реагирующих на изменения мембранного потенциала. Таким образом, TRP1 является не только Ca^{2+} -индуцируемым каналом, но и потенциал-управляемым.

4 Декодирование Ca^{2+} -сигнала

Изменение концентрации кальция в клетке отслеживается Ca^{2+} -сенсорными белками. В клетках присутствует значительное количество Ca^{2+} -связывающих белков, обладающих разной способностью связывать ионы Ca^{2+} , имеющих различную клеточную локализацию, и взаимодействующих с определенными даунстрим сигнальными партнерами. Это позволяет клетке дифференцированно реагировать на специфические внешние воздействия разной интенсивности.

Активация кальмодулин-зависимых белков. При низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме в молекуле кальмодулина α -спирали, фланкирующие петли EF-руки, располагаются практически параллельно центральной α -спирали. В таком состоянии гидрофобные участки терминальных доменов молекулы кальмодулина оказываются закрытыми, поскольку они прижаты к центральной α -спирали. Это делает невозможным взаимодействие этого белка с его мишенями.

Когда клетка получает внешний сигнал, стимулирующий повышение концентрации кальция в цитоплазме, кальмодулин связывает 4 иона Ca^{2+} . Это сопровождается конформационными изменениями: α -спирали EF-рук отдаляются от центральной α -спирали, принимая относительно нее перпендикулярное положение. Таким образом, молекула кальмодулина разворачивается. В результате этого высвобождается центральная α -спираль и гидрофобные районы терминальных доменов, необходимых для взаимодействия кальмодулина с белками-мишенями.

Белки-мишени кальмодулина имеют особый участок, представленный амфифильной α -спиралью, обогащенной положительно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Причем заряженные и гидрофобные группы располагаются на противоположных поверхностях α -спирали.

Раскрытая молекула кальмодулина взаимодействует отрицательно заряженным участком центральной α -спирали с положительно заряженной поверхностью амфифильной α -спирали белка-мишени, а гидрофобными участками терминальных доменов – с гидрофобной поверхностью α -спирали белка-мишени. Кальмодулин, таким образом, обхватывает амфифильную спираль белка-мишени и стимулирует изменение его пространственной структуры и активности.

Снижение концентрации ионов кальция приводит к обратному эффекту – ионы Ca^{2+} диссоциируют от САМ, а декальцинированный кальмодулин теряет родство с мишенями.

У *Arabidopsis* выявлено семь генов, кодирующих четыре изоформы кальмодулина (САМ1/САМ4, САМ2/САМ3/САМ5, САМ6, САМ7). Эти изоформы незначительно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности. Так САМ1/САМ4 и САМ7 отличаются между собой четырьмя аминокислотными остатками, а кальмодулины САМ2/САМ3/САМ5 и САМ6 отличаются от САМ7 всего одной аминокислотой. Несмотря на минимальные различия, кальмодулин САМ7 существенно отличается от трех других изоформ по функциям. САМ7 является транскрипционным регулятором. Как было показано, САМ7 способен непосредственно взаимодействовать с промоторами ряда свет-индуцируемых генов и модулировать активность их экспрессии.

Модуляция активности транскрипции кальмодулинами. В регуляцию транскрипционной активности клетки вовлечено множество Ca^{2+} -связывающих белков. Считают, что экспрессия 3,3 % генов *Arabidopsis* находится под контролем Ca^{2+} -зависимых механизмов. Транскрипция многих АБК-регулируемых генов, продукты которых участвуют в ранних стрессовых реакциях, зависит от повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле. Среди них гены транскрипционных факторов С-repeat/DRE Binding Factor (CBF) – ключевых регуляторов реакции на абиотические стрессовые воздействия.

В механизме активации экспрессии генов участвует группа транскрипционных факторов САМТА (Ca^{2+} /calmodulin-binding transcription activator). У *Arabidopsis* обнаружено шесть таких факторов. Карбокситерминальная часть молекулы САМТА формирует Ca^{2+} /кальмодулин-связывающий домен, а в аминотерминальной части находится CG1-домен, который опосредует взаимодействие с промотором гена через cis-элемент, который называют САМТА-связывающий сайт. Показано, что транскрипционные факторы САМТА1 и САМТА3 опосредуют кальциевый сигнал и транскрипцию генов устойчивости к холодовому стрессу. Это опосредование осуществляется следующим образом:

- 1) при повышении концентрации кальция в цитоплазме молекула кальмодулина (САМ – calmodulin) связывает четыре иона Ca^{2+} ;
- 2) кальцинированный кальмодулин Ca^{2+} /САМ связывается с С-терминальным Ca^{2+} /кальмодулин-связывающим доменом транскрипционного фактора САМТА;
- 3) активированный САМТА в комплексе Ca^{2+} /САМ/САМТА взаимодействует с САМТА-связывающим элементом промотора и участвует в инициации экспрессии гена.

Кальмодулин САМ7, как указывалось выше, является транскрипционным регулятором и способен непосредственно взаимодействовать с промоторами некоторых генов.

Модуляция активности белков кальций-зависимыми киназами. В кальциевом сигнальном механизме задействовано большое количество киназ, активность которых зависит от флуктуаций ионов кальция в цитозоле.

Кальций-зависимые протеиновые киназы растений (CDPK – Calcium-Dependent Protein Kinases) в С-терминальной части молекулы имеют кальмодулин-подобный домен, который содержит четыре консервативных EF-руки и позволяет непосредственно связывать ионы Ca^{2+} . Связывание четырех ионов Ca^{2+} приводит к высвобождению киназного активного центра от автоингибиторного домена и последующему автофосфорилированию CDPK, которое необходимо для полной активации фермента.

В ответ на действие гиббереллина киназа CDPK1 регулирует активность транскрипционного фактора RSG (Repression of Shoot Growth). Многие кальций-зависимые киназы функционируют в сигнальной системе АБК. Например, кальций-зависимые киназы CPK3 (Calcium Dependent Protein Kinase 3) и CPK6 модулируют активность анионных каналов S-типа, участвуя в АБК-регуляции устьичной транспирации. CPK4 и CPK11 фосфорилируют транскрипционные факторы ABF1 (ABRE-Binding Factor 1) и ABF4, имеющие важное значение в функционировании замыкающих клеток устьиц.

CBL/CPK. В растительных клетках присутствует регуляторный Ca^{2+} -связывающий белок CBL (Calcineurin B-Like – кальцинейрин В подобный белок), который функционирует в качестве кальциевого сенсора. Он имеет, как и кальмодулин, четыре Ca^{2+} -связывающих EF-руки и модулирует активность CBL-взаимодействующих протеиновых киназ (CPK – CBL-interacting protein kinase). Белки CBL имеют ацильную группу, которая удерживает их на мембране. CBL были идентифицированы в плазмалемме и тонопласте. Киназы CPK являются растворимыми белками и локализуются в цитоплазме и нуклеоплазме. При взаимодействии с кальцинированными CBL киназы CPK привлекаются к мембранам. В растительных геномах кодируются множество индивидуальных видов CBL и CPK. Оба семейства белков являются многофункциональными сигнальными компонентами, которые способны образовывать множество альтернативных комплексов CBL/CPK. Совокупность комплексов CBL/CPK находится в центре системы декодирования Ca^{2+} -сигналов.

Схема функционирования системы CBL/CPK:

- 1) Увеличение цитоплазматической концентрации кальция приводит к связыванию четырех ионов Ca^{2+} EF-доменами регуляторного белка CBL.
- 2) Кальцинированный CBL соединяется с CPK через NAF-домен, расположенный в карбокситерминальной части киназы.
- 3) Изменение конформации, вызванное взаимодействием белков, приводит к смещению автоингибиторного домена CPK, который высвобождает активный киназный центр.
- 4) Активированная киназа CPK взаимодействует со своими мишенями и фосфорилирует их.

Через CBL/CIPK регуляторную систему регулируется множество ионных каналов, модуляция активности которых важна в развитии разнообразных стрессовых реакций.

Киназа CIPK24 является важным регуляторным компонентом в механизме солевой устойчивости. В комплексе с плазмалеммным белком CBL4 эта киназа регулирует активность Na^+/H^+ -антипортера SOS1 (Salt Overly Sensitive 1). Кроме этого, CIPK24 может связываться с CBL10, который локализуется в вакуолярной мембране. Комплекс CBL10/CIPK24 модулирует активность тонопластного Na^+/H^+ -антипортера.

Сенсоры CBL1 и CBL9 взаимодействуют с CIPK23, образуя комплексы CBL1/CIPK23 и CBL9/CIPK23, которые специфически регулируют активность только одного шейкер-подобного K^+ -канала AKT1 (Arabidopsis K^+ Transporter 1). На другие K^+ -каналы эти комплексы не влияют.

CIPK1 совместно с CBL1 и CBL9 регулирует АБК-зависимые и АБК-независимые реакции на стрессовые воздействия. Многие АБК-зависимые ответы контролируются комплексом CBL9/CIPK3.

Тема 7. Ковалентная модификация сигнальных посредников

- 1 Значение обратимой ковалентной модификации.
- 2 Растительные протеиновые киназы.
- 3 Протеиновые фосфатазы.

1 Значение обратимой ковалентной модификации.

Модуляция активности функциональных белков вследствие изменения их конформации осуществляется не только при взаимодействии с аллостерическими регуляторами, но и путем ковалентной модификации. Третичная или четвертичная структура белков может быть изменена в результате различных посттрансляционных механизмов. Это может быть достигнуто путем:

- присоединения или отщепления простетических групп (фосфатов, сульфатов, моно- и олигосахаридов и т. д.);
- модификации первичной структуры (ограниченный протеолиз, отщепление концевых аминокислотных остатков и др.).

Подобные изменения белков происходят посттрансляционно в процессе их созревания, но многие из модификаций могут быть обратимыми и используются клетками в регуляторных механизмах.

Наиболее значимыми в регуляторном отношении и повсеместно распространенными в природе являются модификации белков посредством фосфорилирования и дефосфорилирования. Фосфорилирование белков (присоединение фосфатных групп) осуществляется протеиновыми киназами – ферментами, которые катализируют перенос γ -фосфата АТФ на специфический аминокислотный остаток белка-мишени. Фосфатные группы

в белковых молекулах могут быть связаны с различными аминокислотными остатками: серинов, треонинов, тирозинов, гистидинов и др. Дефосфорилирование фосфопротеинов осуществляется протеиновыми фосфатазами.

Посттрансляционная обратимая модификация белков путем фосфорилирования/дефосфорилирования, или киназно-фосфатазный цикл, является важным регуляторным механизмом. Введение или удаление фосфатной группы способствует существенному перераспределению зарядов в белковых молекулах, что в значительной степени отражается на их пространственной структуре и активности.

Косвенным подтверждением важности фосфорилирования белков является наличие у эукариот большого количества генов, кодирующих протеиновые киназы и фосфатазы. Например, в геноме дрожжей обнаружено более 120 генов различных протеинкиназ, а геном человека, по некоторым оценкам, кодирует более 1000 этих ферментов. В растениях *Arabidopsis thaliana* идентифицировано 175 серин/треониновых киназ и около 100 фосфатаз. Кроме того, значительное количество цитоплазматических белков эукариотических клеток (примерно третья часть) имеют ковалентно связанный фосфат.

Фосфорилирование и дефосфорилирование оказывают противоположное действие на субстрат. Эти процессы являются своеобразными переключателями активности функциональных белков. При этом общей зависимости между наличием фосфатной группы (или нескольких групп) и состоянием белка не существует. Одни белки в фосфорилированном состоянии переходят в активную форму, а другие, наоборот, – ингибируются.

(Напомним, что под активностью следует понимать не только лишь каталитическую активность ферментов, но и способность белков взаимодействовать с иными сигнальными партнерами, то есть способность передавать сигнал).

Значительное количество белков имеют множественные сайты фосфорилирования, которые могут иметь различное назначение. Например, в молекулах рецептор-подобных киназ одна часть сайтов фосфорилирования необходима для модулирования каталитической активности, а другая участвует в формировании связывающей поверхности, необходимой для взаимодействия с другими белками. Переключение активности может осуществляться по принципу «все или ничего» или иметь градиентный характер, то есть введение фосфорных групп не просто «включает» или «выключает» белок, а усиливает или ослабляет его активность.

Присоединение остатков фосфорной кислоты к молекулам белков осуществляется не только протеинкиназами, но и ферментами другого типа – фосфотрансферазами, которые переносят фосфат от одного фосфорилированного белка на другой без использования АТФ. Примером такой трансферазы является гистидиновая фосфотрансфераза HPr^t, которая функционирует в двухкомпонентной многошаговой регуляторной системе

растений. HPr^t принимает фосфат на остаток гистидина от остатка аспарагиновой кислоты ресеивер-домена гистидиновой рецепторной киназы и переносит его на аспарагиновую кислоту ресеивер-домена регулятора ответа. Помимо источника фосфорной группы киназные и фосфотрансферазные реакции отличаются тем, что в сигнальных механизмах на уровне киназ происходит усиление сигнала, а на уровне фосфотрансфераз – нет.

2 Растительные протеиновые киназы

В растительных тканях протеинкиназы содержатся в значительном количестве и разнообразии. Протеиновые киназы разделяют, главным образом, по субстратной специфичности – они фосфорилируют конкретные аминокислотные остатки, локализованные в определенных последовательностях. Эти ферменты различаются также по аминокислотной последовательности, пространственной структуре, субъединичному составу, локализации, способу активации и другим характеристикам.

В растительных организмах серин/треониновые киназы представляют собой наиболее важную и разнообразную группу. Гистидиновые киназы представлены рецепторными киназами двухкомпонентных систем. Типичные тирозиновые киназы у растений (а также у грибов) не обнаружены.

Фосфорилирование тирозиновых остатков у растений, тем не менее, осуществляется, однако в значительно меньшем масштабе, чем у животных. Катализируются эти реакции серин/треониновыми киназами, которые обладают широкой специфичностью. Было обнаружено, что такими свойствами обладают:

- киназы семейства MAPKK, участвующие в киназных каскадах;
- киназы, фосфорилирующие циклин В-зависимые киназы;
- некоторые рецептор-подобные киназы (например, рецептор брассиностероида BRI1).

Среди белковых киназ самыми распространенными в живом мире являются серин/треониновые киназы. Если, например, тирозиновые (рецепторные) киназы характерны для животных, а гистидиновые (рецепторные) киназы – для растений и бактерий, то серин/треониновые киназы обнаружены у всех групп организмов и присутствуют у каждого отдельного вида в большом разнообразии.

К наиболее важным серин-треониновым протеиновым киназам растений относятся:

- кальций-зависимые киназы (CDPK);
- SNF1-подобные киназы;
- рецептор-подобные киназы;
- MAP-киназы (MAPK), MAPKK, MAPKKK;
- циклин-зависимые киназы;
- казеин киназы I (CK1), казеин киназы II (CK2);
- GSK3;
- CTR1.

Кальций-зависимые протеиновые киназы. Кальций является универсальным внутриклеточным мессенджером, который принимает участие в регуляции жизнедеятельности клетки. Ионы Ca^{2+} могут прямо воздействовать на функциональные белки, связываясь с ними через Ca^{2+} -связывающие центры (EF-руки), или опосредованно через низкомолекулярные регуляторные Ca^{2+} -связывающие белки, например кальмодулин.

Существует три семейства Ca^{2+} -зависимых протеиновых киназ:

- 1) кальций-кальмодулин-зависимые протеиновые киназы;
- 2) кальций-зависимые киназы (кальмодулин-подобный домен протеин-киназы);
- 3) CBL-взаимодействующие протеиновые киназы.

Кальций-кальмодулин-зависимые киназы (CaCMK – calcium-calmodulin-dependent kinases), являются типичными для животных ферментами, но как оказалось, не имеют широкого распространения у растений. Например, в геноме *Arabidopsis* не было обнаружено генов, кодирующих киназы этого семейства.

Многие серин/треониновые киназы животных регулируются Ca^{2+} -кальмодулином (Ca^{2+} /CAM). В отсутствие кальцинированного кальмодулина CaCMK поддерживаются в неактивном состоянии, при котором автоингибиторный район (псевдосубстратный мотив) закрывает доступ субстрата к киназному домену. Присоединение Ca^{2+} /CAM к Ca^{2+} /CAM-связывающему участку стимулирует изменение конформации киназы, что приводит к ее активации.

Кальций-зависимые протеиновые киназы (CDPK – calcium-dependent protein kinases). Активация этих киназ ионами Ca^{2+} не требует присутствия кальмодулина. В С-терминальном районе растительных кальций-зависимых протеин-киназ находится домен, который содержит четыре консервативных EF-руки и на 39 % идентичен кальмодулину. Этот участок называют кальмодулин-подобным доменом (CLD – CaM-like domain). Растительные кальций-зависимые киназы, в виду особенности их структуры, называют также кальмодулин-подобный домен протеин-киназы (аббревиатура CDPK при этом сохраняется: CaM-like domain protein kinase).

Наличие EF-рук в молекуле определяет способность киназ непосредственно связывать ионы Ca^{2+} и реагировать на изменение их концентрации в клетке. Связывание четырех ионов Ca^{2+} кальмодулин-подобным доменом вызывают конформационные изменения молекулы киназы, что приводит к высвобождению киназного активного центра от автоингибиторного домена. Эти изменения сопровождаются автофосфорилированием CDPK, которое необходимо для полной активации фермента.

В геноме растений идентифицированы множественные гены CDPK. У *Arabidopsis thaliana* обнаружено 34 киназы семейства CDPK и 8 близких им по структуре CDPK-подобных киназ (CDPK-related kinases). Большое количество изоформ, вероятно, обеспечивает специфичность и пластичность

ответа на различные стимулы, влияющие на повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Многие изоформы CDPK у растений экспрессируются специфично в зависимости от типа клеток и стадии развития организма и отдельных органов. Кроме того, отдельные формы CDPK взаимодействуют с определенными белковыми мишенями. Мишенями CDPK являются многие функциональные белки с различными функциями. Например, аквапорины (нодулин 26 – аквапорин симбиотической мембраны, окружающей азотфиксирующие бактерии в клубеньках бобовых растений; а-TIP – тонопластный существенный белок–а, обнаружен в семенах фасоли в мембране вакуолей с запасным белком), нитрат-редуктаза, Cl^- -каналы, сахарозо-синтаза, NADPH-оксидаза, транскрипционные регуляторы и др.

CBL-взаимодействующие протеиновые киназы (CIPK – CBL-interacting protein kinase) не имеют кальций-связывающих доменов, но их активность зависит от концентрации ионов Ca^{2+} опосредовано через кальций-сенсорные кальцинеин B-подобные белки (CBL – Calcineurin B-Like). Белок CBL имеет значительное сходство с регуляторной B-субъединицей кальцинеина и нейрональным кальциевым сенсором животных и дрожжей. Подобно кальмодулину, CBL имеет четыре Ca^{2+} -связывающих EF-руки и взаимодействует со своими мишенями в кальцинированном состоянии, модулируя их активность. Однако в отличие от кальмодулина, CBL связаны с мембранами и регулируют активность ферментов только одного семейства – CBL-взаимодействующих протеиновых киназ. Мембранная локализация CBL определяется наличием у этого белка посттрансляционной модификации в виде ацильной группы. Обнаружены CBL в плазматической и вакуолярной мембранах. Киназы CIPK имеют цитоплазматическую и ядерную локализацию и привлекаются к мембранам при взаимодействии с кальцинированной формой CBL.

Молекула CIPK состоит из аминотерминального киназного домена и карбокситерминального регуляторного домена, между которыми находится вариабельный соединительный участок. В карбокситерминальном регуляторном районе находится консервативный NAF-домен, необходимый для взаимодействия с CBL, и PPI (protein-phosphatase interaction) домен, опосредующий взаимодействие с фосфатазой PP2C.

Увеличение цитоплазматической концентрации кальция приводит к связыванию четырех ионов Ca^{2+} EF-доменами регуляторного белка CBL. Кальцинированный CBL соединяется с CIPK через NAF-домен. Взаимодействие белков стимулирует изменение конформации киназы, в результате чего автоингибиторный и киназный домены диссоциируют. Активированная киназа CIPK взаимодействует со своими мишенями и фосфорилирует их.

В геноме растения *Arabidopsis* кодируется 10 CBL и 26 CIPK а у риса – 10 CBL и 30 CIPK. Конкретные виды CBL и CIPK специфически взаимодействуют друг с другом, а образованные комплексы CBL/CIPK модулируют активность мембраносвязанных мишеней путем фосфорилирования. Между индивидуальными CBL и CIPK возможно

образование альтернативных комплексов. Это увеличивает количество возможных комбинаций и обеспечивает тонкую настройку активности мембранных компонентов под влиянием различных внешних воздействий разной интенсивности. Совокупность комплексов CBL/CIPK представляет собой своеобразный центральный «процессор» системы декодирования Ca^{2+} -сигналов, которые формируются при широком диапазоне стимулов. Через CBL/CIPK регуляторную систему регулируется множество ионных каналов, модуляция активности которых важна в развитии разнообразных стрессовых реакций.

SnRK-SNF1-подобные киназы. Растительные киназы семейства SnRK являются гомологами дрожжевых киназ SNF1. Отсюда SnRK-SNF1-подобные киназы (SNF1 related kinase). К этому же типу киназ относятся AMP-активируемые киназы (AMPK) млекопитающих. У *Arabidopsis thaliana* идентифицированы два подсемейства: SnRK1 и SnRK2.

Все киназы, гомологичные SNF1, активируется предпочтительно в стрессовых условиях, при которых снижается уровень глюкозы и аденозинтрифосфатов, а концентрация AMP повышается. Основная стратегия механизмов, регулируемых этими киназами, направлена на снижение уровня биосинтетических процессов и активацию альтернативных катаболических путей.

Это способствует повышению продукции АТФ, и перераспределению энергетических ресурсов на адаптационные процессы. Киназы SNF1, AMPK и SnRK близки по структуре и свойствам, но каждое семейство имеет специфические особенности.

Киназы дрожжей и животных имеют гетеротримерную структуру: α -субъединица каталитическая, α β и γ выполняют регуляторные функции и участвуют в связывании субстрата. Растительные SnRK различаются между собой по структуре. SnRK1 существует в виде мультимерного комплекса, подобно животным и дрожжевым гомологам, а SnRK2 является одиночным полипептидом.

Каталитические субъединицы киназ SNF1, AMPK и подсемейства SnRK1 имеют высокую степень гомологии (60-70 %) в области киназного домена. У SnRK2 выявлена 43 % гомология с киназным доменом SNF1. Кроме этого, для SnRK2 характерен очень короткий С-терминальный домен, который включает кислый участок, состоящий из полиглутаматных и полиаспартатных последовательностей. Различия в карбокситерминальной области, по-видимому, определяют субъединичный состав SnRK1 и SnRK2.

Активация. SNF1 киназа активируется при глюкозном голодании. Механизм активации включает фосфорилирование SNF1 специфической киназой. Активность AMPK находится под двойным контролем: регуляция осуществляется через аллостерические AMP-связывающие центры и путем фосфорилирования специфической киназой AMPK (AMPKK). Активация AMPK и последующее фосфорилирование мишеней приводит к снижению потребления метаболической энергии в виде АТФ за счет инактивации ряда анаболических процессов. Одновременно с этим происходит переключение

метаболизма на использование альтернативных энергетических субстратов для усиления синтеза АТФ. При наличии множества сходных черт между SNF1-подобными киназами животных и дрожжей, тем не менее, SNF1 не активируется АМР.

Растительные киназы семейства SnRK по большинству признаков очень сходны с АМПК млекопитающих, но они не активируются аденозин-5'-монофосфатом и регулируются только фосфорилированием. SnRK1 имеет специфический остаток треонина-172, фланкированный консервативной последовательностью. Подобная последовательность, включающая треонин-172, есть у АМПК, причем АМПК фосфорилирует АМПК по данному треонину. Предполагается, что SnRK1 также фосфорилируется по этому сайту. Активация SnRK1 происходит в условиях стресса при истощении источника легко утилизируемого углерода. Как было показано *in vitro*, растительные SnRK1 фосфорилируют гидроксиметил-глутарил-КоА-редуктазу, сахарозофосфат-синтазу и нитрат-редуктазу. Фосфорилируя эти ферменты, SnRK1 ингибирует синтез изопреноидов и сахарозы, а также восстановление неорганического азота и включение его в состав органических соединений. Активация SnRK1 влияет также на изменение генной экспрессии. SnRK1 дерепрессирует гены катаболических путей. Например, гены сахарозосинтазы и ферментов глиоксилатного цикла репрессируются глюкозой, но активируются SnRK1.

Протеинкиназы семейства SnRK2 в физиологически оптимальных условиях ингибируются специфическими фосфатазами 2С. Под воздействием различных абиотических стрессов репрессия снимается путем инактивации фосфатаз. Мишенями SnRK2 являются, например, транскрипционные факторы, регулирующие активность АБК-зависимых генов. Примером SnRK2 киназы является 42 кД белок NtOSAK (*Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase*), обнаруженный в клетках табака.

Рецептор-подобные киназы. Рецептор-подобные киназы (receptor-like kinase – RLK) у растений представлены в большом разнообразии. Все они имеют сходную структуру и механизм активации. Рецептор-подобные киназы преимущественно являются мономерными трансмембранными белками, которые пересекают мембрану один раз.

Значительные отличия обнаруживаются в экстраклеточном рецепторном домене киназ. Различают 4 основные группы рецептор-подобных киназ:

- 1) LRR-группа;
- 2) S-домен группа;
- 3) лектин-подобный домен группа;
- 4) EGF-группа.

У растений *Arabidopsis* также обнаружено несколько рецептор-подобных киназ, обладающих специфическими структурными особенностями, которые не позволяют отнести эти молекулы к одной из указанных групп.

LRR- группа. Экстраклеточный лиганд-связывающий домен рецептор-подобных киназ этой группы включает тандемы множества лейцин-обогащенных повторов. Например, рецептор брассиностероидов BRI1 содержит 24 лейцин-обогащенных повтора (LRR). LRR расположены последовательно друг за другом, и только между 20 и 21 LRR расположен участок, который называют островной домен – ID (island domain). Один из лейциновых повторов – LRR21 – отличается от других LRR необычным метионин-обогащенным повтором. Участок, состоящий из 94 аминокислотных остатков, включающий островной домен и LRR21 (ID-LRR21), идентифицирован как брассиностероид-связывающий сайт.

Кроме рецептора BRI1, к серин/треониновым LRR-рецептор-подобным киназам относятся рецепторы пептидных регуляторов. CLV1 (CLAVATA1) – рецептор пептидного регулятора CLV3. CLV1 участвует в механизме, посредством которого устанавливается и поддерживается баланс процессов пролиферации и дифференциации клеток апикальных меристем стебля. Связывание CLV3 с CLV1 приводит к ингибированию воспроизводящего деления клеток и стимулирует процесс дифференциации. SR160 – рецептор системы томата TomSys. Системин выполняет ключевую роль в реакции растения на воздействие стрессового фактора, активируя продукцию мобильного фактора, который обеспечивает развитие системной устойчивости.

S-домен группа. Внешнеклеточный домен рецептор-подобных киназ S-домен группы близок по структуре гликопротеину S-локуса (S-locus glycoprotein – SLG) растений рода Brassica. Для S-домена характерно наличие консервативных цистеин-обогащенных мотивов. Пространственная структура этих доменов стабилизируется путем образования дисульфидных связей между остатками консервативных цистеинов.

Одним из представителей этой группы является рецептор SRK (S-locus receptor-like kinase) Brassica, участвующий в механизме самонесовместимости. Система самонесовместимости растений обеспечивает распознавание и отторжение пыльцы близкородственных индивидов (в том числе и своей собственной) при попадании ее на рыльце пестика. Это свойство способствует предотвращению близкородственного скрещивания и поддержанию внутривидового генетического разнообразия. Лигандом SRK является пептидный регулятор SCR/SP11 (S-locus cysteine-rich protein / S-locus protein 11). Самонесовместимость контролируется единичным мультиаллельным локусом, названным локусом стерильности (S-локус). В систему самонесовместимости Brassica входит также гликопротеин SLG, однако значение этого белка в механизме несовместимости невыяснена. У растений *Arabidopsis thaliana* обнаружено три рецепторподобные киназы S-домен группы, однако к системе самонесовместимости они не имеют никакого отношения.

Лектин-подобный домен группа. Экстраклеточный домен этих рецептор-подобных киназ по структуре относится к лектинам бобовых и лектин-подобному белку *Arabidopsis thaliana* Lec2. Предполагается, что

рецепторы этой группы связывают олигосахариды – продукты разрушения компонентов клеточной стенки, вызванного действием патогенных грибов.

EGF- группа. Экстраклеточная часть молекул EGF-группы содержат повторы, характерные для эпидермального ростового фактора (EGF) млекопитающих. Значение рецептор-подобных киназ EGF-группы у растений неизвестно.

МАР киназы. В клетках животных и грибов выявлены и охарактеризованы киназы, формирующие каскадные регуляторные системы (или модули). Их называют митоген-активируемыми протеиновыми киназами и обозначают МАРК (mitogen-activated protein kinase) или МРК. Киназные каскады включают три (реже четыре) киназы, которые последовательно фосфорилируют друг друга. Модули работают в направлении $\text{МАРККК} \rightarrow \text{МАРКК} \rightarrow \text{МАРК}$. Киназу, замыкающую каскад (МАРК), фосфорилирует киназа МАР киназы (МАРКК), которая в свою очередь фосфорилируется киназой киназы МАР киназы (МАРККК).

Все киназы киназного каскада имеют альтернативные обозначения:

МАРК (МАР киназа) – МРК;

МАРКК (киназа МАР киназы) – МАР2К, МЕК или МКК;

МАРККК (киназа киназы МАР киназы) – МАР3К, МЕКК.

Если в каскаде участвует четвертая киназа, фосфорилирующая МАРККК, ее называют киназой киназы киназы МАР киназы – МАРКККК или МАР4К.

Большинство киназных каскадов у животных активируются через малые G-белки, которые в GTP-связанной (активной) форме непосредственно взаимодействуют с МАРККК (или МАРКККК).

В растительных клетках идентифицированы киназы всех трех подсемейств стандартного модуля. В геноме арабидопсиса, например, обнаружено 20 МАРК, 10 МАРКК и 60 МАРККК. Многие из этих генов были клонированы. Посредством киназных каскадов регулируется активность множества функциональных белков, в том числе ферментов и транскрипционных факторов.

Растительные киназы обладают консервативными структурами, характерными для аналогичных киназ животных и грибов. МАРК содержат мотив Thr-X-Tyr в «Т-петле», которую также называют сегментом активации. Для активации МАРК необходимо фосфорилирование треонина и тирозина в сегменте активации, которое катализирует МАРКК – киназа широкой специфичности. МАРККК фосфорилирует в молекуле МАРКК остатки серинов или треонинов, которые являются консервативными для растений.

Киназные каскады активируются многими внешними стимулами и гормонами. При добавлении ауксина в культуру клеток табака МАРК активировалась через пять минут. В листьях табака через минуту после поранения была активирована одна из МАРК – WIPK (wound-induced МАРК). Показано также, что WIPK вовлекается в активацию ферментов октадеканоидного пути (синтеза жасмоновой кислоты).

В протопластах клеток алейронового слоя ячменя МАРК активировалась абсцизовой кислотой через минуту. В листьях клевера активация этого фермента происходила под влиянием различных стрессовых воздействий (холодовой шок, обезвоживание, повреждение) без участия АБК.

Важной особенностью большинства известных МАРК является то, что активация этих ферментов кратковременна. Это связано с тем, что при активации МАРК стимулируется транскрипция специфических МАРК фосфатаз двойной специфичности, которые дефосфорилируют МАР киназы всех уровней.

Циклин-зависимые киназы (CDK). Циклин-зависимые киназы (CDK – cyclin-dependent kinases) и циклины были первоначально открыты как ключевые регуляторы клеточного цикла, откуда и получили свое название. Совместно эти белки контролируют переход к синтетической фазе или митозу. Однако не все циклин-зависимые киназы имеют отношение к регуляции клеточного деления.

Циклин-зависимые киназы дрожжей и млекопитающих являются небольшими белками (около 34 кД) и представляют собой минимальный киназный домен. В свободном состоянии эти белки каталитически неактивны и приобретают киназные свойства после связывания с циклинами. Важный для взаимодействия с циклинами участок содержит консервативную последовательность PSTAIRE. Большинство циклин-зависимых киназ выполняют множественные роли, и их функциональная активность зависит от того, с какими циклинами они будут ассоциироваться.

Циклины и циклин-зависимые киназы синтезируются и деградируют в определенные периоды клеточного цикла. Образованный гетеродимер циклин-CDK еще не активен и требует дальнейшей активации путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Циклин-зависимые киназы имеют два основных участка фосфорилирования:

- 1) остаток треонина в активационной Т-петле фосфорилируется циклин-активирующей киназой (CAK – cyclin activating kinase);
- 2) остаток тирозина в последовательности GXGX_YX фосфорилируется другой киназой (например, у делящихся дрожжей подобный фермент называется Wee1).

Если фосфорилирование треонина необходимо для активации CDK, то фосфорилирование тирозина, наоборот, ингибирует фермент. Для окончательной активации циклин-зависимой киназы необходима активность фосфатазы, отщепляющей фосфорную группу от тирозина (у делящихся дрожжей – CDC25).

Таким образом, циклин-зависимые киназы активируются в несколько этапов:

- 1) ассоциация с циклинами (этот этап контролируется на уровне транскрипции);
- 2) фосфорилирование участков активации (треонин) и ингибирования (тирозин);

3) дефосфорилирование фосфотирозина.

У растений *Arabidopsis thaliana* обнаружены 2 гена, кодирующих циклин-зависимые киназы – CDC2a и CDC2b. Одна из них, CDC2a, содержит мотив PSTAIRE, который полностью соответствует аналогичной последовательности у киназы CDC2 дрожжей. В молекуле CDC2b этот мотив отличается двумя аминокислотами: PPTALRE. Первая киназа с последовательностью PSTAIRE экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла, тогда как вторая (с вариантом PPTALRE) – в течение ограниченного временного периода между синтетической фазой и митозом.

В растениях *Arabidopsis thaliana* обнаружены и клонированы также CDK-активирующая киназа, 10 циклинов A/B типа, участвующих в регуляции перехода $G2 \rightarrow S$, и три циклина D типа (регуляция перехода $G1 \rightarrow M$).

Казеиновые киназы СК1 и СК2. Два подсемейства казеиновых киназ (casein kinase – СК) были выявлены по их способности фосфорилировать молочный белок казеин. СК1 и СК2 значительно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности и пространственной структуре, но, тем не менее, имеют некоторые близкие свойства. Киназы обеих подсемейств фосфорилируют остатки треонинов и серинов возле кислых участков аминокислотной цепи.

Разница заключается в том, что СК1 предпочитает участки, в которых кислые аминокислоты находятся относительно серина/треонина с N-концевой стороны в положении P–3, а СК2 с карбоксиконцевой – в положении P+3.

Предполагается, что активность СК1 и СК2 не находится под тонким контролем. По-видимому, эти киназы обеспечивают конститутивный базальный уровень фосфорилирования, а регуляция осуществляется за счет активности протеиновых фосфатаз.

Киназы СК1 являются мономерными белками. У них достаточно широкий спектр субстратов *in vitro*, но в большинстве случаев фосфорилирование не приводит к изменению активности субстрата.

Функции СК1 не выяснены, но как показывает мутационный анализ, эти киназы имеют чрезвычайно важное значение в деятельности клеток. На дрожжах показано, что делеции двух генов СК1 (YCK1 и YCK2) являются летальными, а нарушение гена HRR25 приводит к гиперчувствительности к действию ДНК-повреждающих агентов. То есть, продукт гена HRR25 участвует в механизмах репарации ДНК. В геноме *Arabidopsis thaliana* выявлено пять генов, кодирующих изоформы СК1.

Структура СК1 растений сходна с СК1 млекопитающих. Киназы СК2 млекопитающих существуют преимущественно в форме тетрамера $\alpha_2\beta_2$ и обладают необычной для киназ особенностью: наряду с АТФ они используют также ГТФ. Субъединицы α являются каталитическими, а β выполняют регуляторную роль – модулируют активность по отношению к определенным типам субстрата. Среди мишеней СК2 у млекопитающих есть ДНК-связывающие белки, например, p53, и топоизомераза II. Активность СК2

связывают с установлением клеточной полярности и функционированием клеточного цикла. Нарушение двух генов SK2 у *Saccharomyces cerevisiae* (SKA1 и SKA2) имеют летальный характер.

У *Arabidopsis thaliana* выявлены две изоформы каталитической субъединицы а и две – регуляторной b. В клетках SK2 присутствует в мономерной форме (a) и в виде тетрамера (a₂b₂). Как и у млекопитающих SK2 растений фосфорилирует серин, фланкированный кислыми аминокислотными остатками, и использует АТФ и GTP.

Семейство GSK3/Shaggy. GSK3-подобные киназы представляют группу высококонсервативных конститутивно активных серин-треониновых киназ, которые принимают участие в многочисленных сигнальных путях, посредством которых регулируется метаболизм и развитие клеток и тканей. Один из ферментов млекопитающих, участвующих в инсулин-зависимом механизме синтеза гликогена, киназа гликогенсинтазы-3 (glycogen synthase kinase-3 – GSK3), является главным представителем этого семейства киназ и дает ему название. Активность животных GSK3 регулируется фосфорилированием. Протеинкиназа В инактивирует GSK3, фосфорилируя сериновый остаток в аминотерминальном домене. Гомологичная киназа *Drosophila melanogaster*, продукт гена shaggy/zeste-white 3, необходима для контроля процессов развития.

К данному семейству относится растительная киназа BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), участвующая в брассиностероидном сигнале. BIN2 имеет 70 % гомологию с GSK3. Наибольшее сходство обнаруживается в области каталитического домена. В *Arabidopsis* BIN2 принадлежит к 10-членному семейству, включающему четыре филогенетических подгруппы. Все они имеют высоко консервативные серин-треониновые киназные домены, но различаются N- и C-терминальными участками.

GSK3-подобные киназы у *Arabidopsis* называют также AtSK (*Arabidopsis thaliana* Shaggy-like Kinases). Показано, что в регуляции брассиностероидного сигнала избыточно функционируют три AtSK подгруппы II: AtSK21, AtSK22 и AtSK23/BIN2.

Киназа AtSK23/BIN2 является негативным регулятором брассиностероидного сигнального пути. Она фосфорилирует транскрипционные регуляторы BZR1 и BES1 – активаторы брассиностероид-регулируемых генов. Фосфорилирование факторов BZR приводит к их 26S-зависимому протеолизу. Дефосфорилирование фосфатазой BSU1 ингибирует активность BIN2 и дерепрессирует брассиностероидный сигнал.

CTR1/Raf-подобное семейство. Киназа CTR1 (constitutive triple response 1) была обнаружена у растений как существенный сигнальный компонент этиленового сигнала. Нарушение гена CTR1 с потерей функции приводит к конститутивной тройной реакции, которая проявляется даже в отсутствии гормона. По структуре CTR1 является гомологом киназ семейства Raf-1 млекопитающих. Активность киназы Raf-1 в животных клетках модулируется Ras G-белком, а ее мишенью является MAPKKK – первая киназа MAP-киназного каскада. Сигнальный механизм, в котором участвует

CTR1, значительно отличается от Raf-1. Было показано, что аминотерминальная область CTR1 непосредственно взаимодействует с киназным доменом этиленовых рецепторов (гистидиновых рецепторных киназ), а мономерные G-белки совсем не участвуют в этиленовом сигнале. Мишень CTR1 не идентифицирована. Показано, что после CTR1 в этиленовом сигнале активируется 12-трансмембранный белок EIN2, гомологичный переносчикам двухвалентных металлов, но функционирует ли киназный каскад между CTR1 и EIN2, не известно.

3 Протеиновые фосфатазы

Протеиновые фосфатазы (PP – protein phosphatase) или фосфопротеинфосфатазы – ферменты, дефосфорилирующие фосфопротеины, являются функциональными антагонистами протеиновых киназ, совместно с которыми участвуют в регуляции функциональной активности клеток. Механизмы регуляции активности фосфатаз и их антагонистов протеиновых киназ имеют, как правило, противоположную направленность.

Классификация фосфатаз. Фосфопротеинфосфатазы принято делить на три основных семейства, различающиеся по субстратной специфичности, биохимическим характеристикам, аминокислотной последовательности и архитектуре генов: два семейства серин/треониновых фосфатаз (PPP и PPM) и семейство PTP, включающее тирозиновые фосфатазы и фосфатазы двойной специфичности.

Серин/треониновые фосфатазы. Принцип разделения серин/треониновых фосфатаз по группам был разработан в начале 1970–х годов и до нынешнего времени используется в качестве основы в современной классификации данных ферментов. Первоначально серин/треониновые фосфатазы у животных были разделены на два основных класса (PP1 и PP2) согласно их субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. В качестве субстратного «эталона» использовали субъединицы киназы фосфорилазы млекопитающих. Фосфопротеинфосфатазы PP1 предпочтительно дефосфорилируют β -субъединицу, фосфопротеинфосфатазы PP2 – α -субъединицу. Кроме того, PP1 чувствительны к пептидным ингибиторам, известными как ингибитор-1 (I-1) и ингибитор-2 (I-2), а PP2 устойчивы к ним.

Фосфатазы PP1 являются гетеродимерами, состоящими из каталитической субъединицы PP1c и регуляторной субъединицы R. Фосфатазы PP2 представляют собой разнообразную группу, поэтому было предложено разделить их на три подкласса, согласно отношению ферментов к ионам двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}). Кроме того, для каждого подкласса является характерным определенный субъединичный состав.

PP2A – это тримеры, состоящие из двух регуляторных субъединиц (A и B) и одной каталитической – PP2Ac. Для проявления активности ферменты не требуют присутствия двухвалентных ионов.

PP2B – гетеродимеры, состоят из каталитической субъединицы A и регуляторной B. Активируются ионами кальция через регуляторную B-

частицу, которая имеет Ca^{2+} -связывающие центры EF-руки. Полная активация фосфатаз PP2B животных достигается при связывании кальцинированного кальмодулина.

PP2C – мономерные фосфатазы. Активируются ионами Mg^{2+} .

Семейство PPP. Изучение аминокислотной последовательности каталитических субъединиц показало, что каталитические домены фосфатаз PP1, PP2A и PP2B представлены консервативными последовательностями (около 280 аминокислотных остатков), имеющими высокую степень сходства – 40-60 %. Наличие высококонсервативного каталитического домена было основанием для объединения фосфатаз PP1, PP2A и PP2B в одно семейство PPP. Все фосфатазы PPP являются гетерополимерными молекулами. Аминотерминальные и карбокситерминальные домены каталитических субъединиц необходимы для их ассоциации с регуляторными субъединицами.

Каждая индивидуальная каталитическая субъединица может объединяться с разными изоформами регуляторных субъединиц. В результате образуется целый ряд холоферментов с разнообразными свойствами и локализацией. В реакционном центре всех PPP находятся металлы с переменной валентностью, которые являются существенно важными для каталитической активности. Для каталитического центра PP1с, например, характерно наличие ионов Mn^{2+} и $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, а для PP2B – Zn^{2+} и $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Эти металлы используются ферментами для активации молекулы воды или гидроксил-иона. Благодаря этой особенности фосфатазы семейства PPP осуществляют одноступенчатую реакцию дефосфорилирования без формирования фосфат-ферментного посредника.

Семейство PPM. Все мономерные Mg^{2+} -зависимые серин/треониновые фосфатазы были отнесены к семейству PPM. Основу этой группы составляют липазы PP2C. Мономерные PP2C фосфатазы не имеют гомологии с ферментами группы PPP. Не смотря на это, пространственные структуры PPP и PPM фосфатаз в целом сходны. Последовательности каталитических доменов фосфатаз внутри группы PPM обладают ограниченной гомологией (20-35 %). Аминотерминальные области выполняют регуляторную роль и служат для взаимодействия с другими молекулами. В каталитическом районе PP2C находится бинуклеарный центр, содержащий два иона Mn^{2+} . Дефосфорилирование субстрата, как и у PPP, осуществляется посредством активации молекулы воды в одноступенчатой реакции без формирования фосфат-ферментного посредника.

Новые группы фосфатаз. Терминальные области молекулы растительных фосфатаз часто представлены уникальными последовательностями, которые могут быть характерными для узкой группы ферментов, а некоторые мотивы типичными для фосфатаз растений, принадлежащих к определенным таксономическим группам. Идентификация этих последовательностей позволила расширить стандартную классификацию фосфатаз. Помимо групп PP1, PP2A и PP2B к семейству PPP

сейчас относят сравнительно недавно обнаруженные фосфатазы PP4, PP5, PP6, PP7.

Тирозиновые фосфатазы. У животных организмов тирозиновые фосфатазы присутствуют в значительном количестве и выполняют существенную регуляторную роль, участвуя в контроле таких важных процессов, как рост и пролиферация клеток. В геноме человека насчитывается более 100 генов, кодирующих РТР. В отношении субстрата, на который направлена каталитическая активность ферментов, тирозиновые фосфатазы подразделяют на тирозин-специфичные (РТР) и фосфатазы двойной специфичности (DsРТР), которые дефосфорилируют не только фосфотирозины, но и фосфосерины/фосфотреонины.

Семейства тирозиновых фосфатаз РТР и DsРТР обладают незначительной гомологией, но при этом у них есть ряд принципиально сходных структурных характеристик.

Во-первых, молекулы фосфатаз, несмотря на низкую степень сходства аминокислотных последовательностей, формируют пространственно сходные каталитические домены.

Во-вторых, в каталитическом центре ферментов находится мотив (V/I)HCXAGXGR(S/T)G, который содержит остаток цистеина, необходимый для образования фосфат-ферментного посредника. Этот цистеин занимает положение, оптимальное для нуклеофильной атаки фосфорной группы. Он находится в расщелине, в которую проникает фосфорилированный аминокислотный остаток при взаимодействии фермента с субстратом.

В-третьих, последовательность внешней области каталитического домена, которая определяет субстратную специфичность ферментов, является характерной для всех тирозиновых фосфатаз. Примечательно, что в данной области молекулы DsРТР не имеют никакой гомологии с серин/треониновыми фосфатазами.

Специфичность фосфатаз зависит от двух особенностей субстрата:

- наличие фосфорилированного аминокислотного остатка;
- положение, которое занимает этот остаток, или иными словами – фланкирующие последовательности.

Последовательности внешней области каталитического домена фосфатаз узнают поверхность субстрата (последовательности, фланкирующие фосфорилированный остаток). Глубина расщелины, в которой находится мотив с существенным остатком цистеина, соответствует длине фосфорилированного остатка субстрата. У тирозин-специфичных фосфатаз глубина щели в каталитическом центре соответствует длине остатка фосфотирозина, тогда как остатки фосфосеринов и фосфотреонинов слишком короткие, чтобы взаимодействовать с цистеином. По этой причине тирозин-специфичные фосфатазы дефосфорилируют только остатки фосфотирозина. Фосфатазы двойной специфичности формируют каталитическую щель меньшей глубины, поэтому при наличии соответствующих последовательностей, окружающих фосфорилированный остаток, эти ферменты могут осуществлять дефосфорилирование не только

остатков фосфотирозина, но также фосфосеринов и фосфотреонинов. Считают, что фосфатазы двойной специфичности являются усеченной версией тирозин-специфичных фосфатаз.

Растительные фосфатазы. У растений выявлено большинство основных групп фосфатаз. Причем набор и соотношение фосфатаз у растений и животных значительно отличается. Для растений характерно существенное преобладание мономерных фосфатаз. Например, в геноме *Arabidopsis* идентифицировано 7 генов, кодирующих каталитические субъединицы PP1, 6 генов каталитических субъединиц PP2A и 70 генов PP2C.

Из главных семейства PPP у растений были идентифицированы фосфатазы PP1 и PP2A. Каталитические субъединицы PP1с были клонированы, а регуляторные субъединицы, не смотря на то, что активность фосфатаз PP1 ассоциируется с большими белковыми комплексами, пока не обнаружены. Гены каталитических и обеих регуляторных субъединиц фосфатазы PP2A были идентифицированы и клонированы. Регуляторные субъединицы А и В растительных PP2A имеют 70 % сходство с животными гомологами.

Активность Ca^{2+} -зависимых PP2В-подобных фосфатаз в растительных тканях также были зарегистрированы, но генов, близких к генам субъединиц фосфолипаз PP2В животных, в растительных геномах не обнаружено. Предполагается, что Ca^{2+} -зависимые фосфатазы растений имеют уникальные растительно-специфичные последовательности и взаимодействуют не с кальмодулином, а с кальцинейрин В-подобными белками. Анализ генома *Arabidopsis* показывает также наличие других фосфатаз семейства PPP: PP4, PP5, PP6 и PP7.

Фосфатазы PP2С у растений представлены в значительно большем разнообразии, чем у других эукариотов. Эти ферменты имеют незначительное сходство с PP2С животных и грибов (20-35 %). Аминоконцевые некаталитические области молекул растительных PP2С чрезвычайно разнообразны и представлены растительно-специфичными последовательностями, которые не встречаются за пределами царства растений.

Тирозиновые фосфатазы у растений представлены в значительно меньшем разнообразии, чем серин/треониновые. В геноме *Arabidopsis* идентифицировано около 20 генов, кодирующих тирозиновые фосфатазы, из которых только одна является тирозин-специфичной, а остальные обладают двойной специфичностью.

Значение растительных фосфатаз. Растительные фосфатазы вместе с киназами поддерживают определенный уровень фосфорилирования функциональных и регуляторных белков, который зависит от конкретных условий. Изменение статуса фосфорилирования белков отражается на их активности. Под контролем киназно-фосфатазной системы находится активность ферментов, ионных каналов, трансмембранных переносчиков, транскрипционных факторов и других клеточных компонентов.

Семейство PPP. Субстратом фосфатаз PP1 и PP2A являются ферменты гидроксиметил-глутарил-СоА-редуктаза, сахарозо-фосфат-синтаза и нитрат-редуктаза. Эти ферменты фосфорилируются киназой SnRK1 под действием различных стрессовых факторов и АБК. Фосфорилируя эти ферменты, SnRK1 ингибирует синтез изопреноидов и сахарозы, а также восстановление неорганического азота и включение его в состав органических соединений. Фосфатазы PP1 и PP2A выступают антагонистами киназы SnRK1 в данном механизме. PP1 и PP2A снижают уровень фосфорилирования указанных ферментов, стимулируя их активность и пути, в которых они участвуют. Фосфатазы PP2A участвуют в механизме брассиностероидного сигнала – активируют транскрипционные факторы BES1 и BZR1 путем дефосфорилирования.

Семейство PPM. Протеиновые фосфатазы PP2C участвуют в контроле АБК-регулируемых генов. У *Arabidopsis* были идентифицированы две гомологичные мономерные серин/треонин фосфатазы, которые выполняют роль негативных регуляторов сигнала АБК: ABI1 и ABI2. В отсутствие АБК эти фосфатазы конститутивно ингибируют активность протеинкиназы SnRK2, от активности которой зависит уровень экспрессии АБК-регулируемых генов. Появление гормона в клетке приводит к его связыванию с внутриклеточным START-домен рецептором АБК семейства PYR/PYL. Комплекс PYR/PYL-АБК специфически связывает фосфатазу PP2C в области реакционного центра, ингибируя ее активность. Ингибирование фосфатазы 2C приводит к дерепрессии протеинкиназы SnRK2, которая фосфорилирует группу транскрипционных факторов активаторов АБК-регулируемых генов и стимулирует активность соответствующих генов.

Вторая группа мономерных фосфатаз, механизм действия которых у растений изучен – это KAPP (Kinase-Associated Protein Phosphatase). Фосфатазы KAPP имеют плазмалеммную локализацию и ассоциируются с рецептор-подобными киназами и/или их корецепторами и дефосфорилируют эти молекулы, что приводит к репрессии соответствующего сигнала.

Связывание KAPP с мишенями в некоторых случаях осуществляется только на мембранах везикул. Это зависит от конкретного механизма активации/репрессии рецептор-подобной киназы. У различных растений были идентифицированы фосфатазы KAPP, которые контролируют активность рецепторов брассинолида и CLV1 (CLAVATA1) – рецептор пептидного регулятора CLV3, который участвует в механизме контроля процессов пролиферации и дифференциации клеток апикальных меристем стебля.

Семейство РТР. Тирозиновые фосфатазы двойной специфичности участвуют в регуляции MAP-киназного каскада. Последний компонент каскада, MAPK, фосфорилируется киназой MAPKK по специфическим остаткам треонина и тирозина. Активация MAPK кратковременна, так как сопровождается стимуляцией специфических MAPK фосфатаз двойной

специфичности. В растениях *Arabidopsis* показано, что фосфатаза двойной специфичности AtPTP1 дефосфорилирует AtMPK4 (аналог MAPK).

Фосфатазы DsPTP участвуют также в контроле клеточного цикла. Активность циклин-зависимых киназ подсемейства CDC2 (у *Arabidopsis* обнаружено две киназы CDC2a и CDC2b), взаимодействующих с циклинами В типа и участвующих в регуляции перехода G2→S, контролируется двумя типами киназ: циклин-активирующая киназа (CAK) фосфорилирует остатки треонина в активационной Т-петле CDC2, а вторая (например, у делящихся дрожжей подобный фермент называется Wee1) – остатки тирозина. Фосфорилирование по тирозину ингибирует CDC2, тогда как окончательная активация этой киназы достигается действием фосфатазы двойной специфичности (у дрожжей – CDC25), которая дефосфорилирует фосфотирозины CDC2.

У растений гомологи Wee1 и CDC25 не обнаружены, однако существуют косвенные доказательства, что описанный механизм активации перехода G2→S у растений функционирует: CDC25 дрожжей активирует клеточный цикл у растений. Предполагают, что фосфатаза, функционально аналогичная CDC25, у растений обладает структурой специфичной для растений.

РАЗДЕЛ 3 МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

Тема 8 Ауксины

- 1 Общая характеристика ауксинов
- 2 Рецепция и передача сигнала ауксинов.
- 3 Физиологическое действие ауксинов

1 Общая характеристика ауксинов

Ауксины (от др.-греч. αὔξω – увеличиваюсь, расту) – стимуляторы роста плодов (побегов) растений, апикальное доминирование, растет по фототропизму (к свету), стимулирует рост корней по положительному геотропизму (рост вниз), обладают высокой физиологической активностью.

Природные ауксины являются производными индола – 3-(3-индолил)пропионовая, индолил-3-масляная, 4-хлориндолил-3-уксусная и 3-индолилуксусная кислоты. Наиболее распространенным ауксином, широко применяющимся в растениеводстве, является гетероауксин – индолил-3-уксусная кислота.

История открытия. В 1880 г. Ч. и Ф. Дарвины решали проблему воспринимающего свет органа. Растения изгибаются к боковому источнику света, причем изгиб происходит в субапикальной зоне (ниже апекса побега). Исследователи защищали от света субапикальную область – зону изгиба – светонепроницаемой тканью и наблюдали при этом, что растения все-таки изгибались. Когда незакрытую верхушку (стеблевой апекс) проростка накрыли черным колпачком, изгиб в сторону света не происходил, хотя зона изгиба была хорошо освещена. По-видимому, направление света воспринималось апексом стебля, откуда сигнал передавался в нижележащую зону изгиба. Ч. и Ф. Дарвины предположили, что апекс стебля вырабатывает вещество, транспортирующееся вниз и вызывающее неравномерный рост, и это гипотетическое вещество они назвали Ауксином (от греч. Αυχο – расту).

Гипотеза Ч. и Ф. Дарвинов – не единственное объяснение. Сигнал мог передаваться в виде электрических импульсов и приводить к тому же эффекту. Ауксиновая гипотеза нуждалась в экспериментальной проверке. Через 50 лет наш соотечественник Н. Г. Холодный и немец Ф. В. Вент независимо друг от друга провели эксперименты для изучения природы этого сигнала. Вещество, передающее сигнал из апекса в зону изгиба, должно растворяться в воде. Значит, при помещении побеговых апексов в воду в раствор перейдут и гипотетические ауксины. Затем нужно создать несимметричное распределение «ауксина»: верхушку с собственными ауксинами удалить, а на срез несимметрично нанести водный экстракт апексов. По техническим причинам опыт видоизменили: апексы располагали на агаровом геле, а растение декапитировали и сбоку накладывали на срез кубик агара с экстрактом. В таких условиях растения изгибались в сторону, противоположную наложенному агаровому блоку. Контролем служил агаровый блок, не пропитанный экстрактом побеговых апексов, – изгиба не было.

Биосинтез, катаболизм и инактивация ауксинов

Основное место биосинтеза ИУК в растении – молодые листья и их примордии. Помимо растений, способностью к биосинтезу ИУК обладают некоторые грибы и патогенные бактерии (например, представители родов *Agrobacterium* и *Pseudomonas*, поражение которыми вызывает аномальное разрастание тканей растения-хозяина).

У растений существуют два пути синтеза ИУК: подробно изученный триптофан-зависимый путь и триптофан-независимый путь, который до сих пор является гипотетическим. Триптофан-зависимый путь представляет собой синтез ИУК из триптофана в несколько этапов. Существует несколько вариантов триптофан-зависимого пути биосинтеза ИУК, основными из которых являются синтез через индолпировиноградную (IPA) кислоту, через индолацетамид (IAM), через триптами́н (ТАМ) и через индолацетальдоксим (IAOx). У разных видов растений преобладает тот или иной вариант триптофан-зависимого биосинтеза ИУК – например, у арабидопсис и других крестоцветных преобладающим является путь синтеза через IAOx; для *Agrobacterium* и *Pseudomonas* характерен путь синтеза через IAM. Триптофан-зависимый путь биосинтеза ИУК изучен весьма подробно; у растений и бактерий выделены ферменты, катализирующие все стадии разных его вариантов, выявлена значительная часть генов, кодирующих эти ферменты. Интересно, что мутанты с потерей функции генов, действующих на разных этапах триптофан-зависимого пути биосинтеза ИУК, часто характеризуются не пониженным, а повышенным содержанием ауксинов в тканях. Причиной этого является резкая активация других вариантов триптофан-зависимого пути синтеза ИУК при обрыве одного из них.

Помимо триптофан-зависимого пути биосинтеза ИУК, у растений существует триптофан-независимый путь, про который, несмотря на длительность изучения этого вопроса, абсолютно ничего не известно. Доказательством существования такого пути является получение жизнеспособных мутантов арабидопсис (*trp* 1, 2, 3, 4 и 5) и кукурузы, дефектных по синтезу триптофана. Это мутанты с потерей функции генов, контролирующих разные стадии синтеза триптофана из его предшественника хоризмата. У них не синтезируется триптофан, но, тем не менее, наблюдается нормальный или даже многократно повышенный уровень ИУК. Вероятно, при невозможности работы у таких мутантов триптофан-зависимого пути биосинтеза ИУК у них происходит активация гипотетического пути синтеза ИУК без использования триптофана.

У растений также – существует несколько путей **инактивации** ИУК: во-первых, это образование индолбутировой кислоты (ИБК) – запасной формы ауксинов, во-вторых – образование конъюгатов с аминокислотами и сахарами. Конъюгаты обладают слабовыраженной ауксиновой активностью и также являются запасными формами ауксинов. Синтез конъюгатов осуществляет большая группа ферментов GH3-1. Экспрессия генов GH3-1 позитивно регулируется ауксинами – таким образом, имеет место негативная обратная связь в контроле уровня активной ИУК. Кроме того, у арабидопсис выявлены

многочисленные ферменты, осуществляющие гидролиз конъюгатов с образованием активной ИУК, клонированы кодирующие их гены. Мутанты с потерей функции этих генов накапливают соответствующие конъюгаты и обладают повышенной чувствительностью к ним.

Полярный транспорт ауксинов. Поскольку основным местом биосинтеза ИУК являются апикальные части побега, необходим базипетальный транспорт ИУК в нижележащие органы растения. Существуют два вида транспорта ауксинов.

1. Быстрый транспорт по флоэме, представляющий собой перемещение ауксинов с потоком метаболитов и питательных веществ. Таким способом могут перемещаться по растению как активная ИУК, так и её конъюгаты.

2. Полярный транспорт ауксинов (ПАТ) характерен только для активной ИУК и происходит в основном по клеткам перицикла и молодым (живым) сосудистым элементам. При полярном транспорте имеет место вход ИУК в клетку с одной стороны и выход из неё с противоположной, в обоих процессах задействованы разные группы белков-переносчиков. Это транспорт более медленный и имеет строго выраженную направленность: в частности, в побеге он направлен базипетально, от апикальной меристемы и молодых листьев к корню; в кончике корня происходит разворот ПАТ, и дальше ИУК движется акропетально до зоны образования боковых корней. ИУК – единственный фитогормон, обладающий сложноорганизованной системой полярного транспорта; от направления ПАТ в различных органах растения зависит полярность их развития.

Определенные вещества, например, нафтилфталамовая кислота (NPA) и 2,3,5-трийодбензойная кислота (TIBA), специфически блокируют ПАТ. При этом происходит накопление ИУК внутри клеток, что позволило предположить существование по-разному организованных входных и выходных (influx и efflux) каналов для полярного транспорта ИУК, причем направление ПАТ связано с расположением входного и выходного канала на разных сторонах клетки (соответственно, на апикальной и базальной). Блокирование ПАТ с помощью NPA и TIBA связано с их влиянием на работу выходного канала.

2 Рецепция и передача сигнала ауксинов.

Несмотря на длительное изучение ауксинов, в рецепции и передаче сигнала этих фитогормонов в настоящее время остается много нерешенных вопросов.

При длительном изучении ауксинов было выделено большое количество ауксин-связывающих белков (ABP) с разными функциями. В настоящее время функция в качестве рецепторов ауксина была продемонстрирована для двух белков:

- трансмембранного белка ABP1, взаимодействующего с G-белками;
- белка TIR1, входящего в состав убиквитин-лигазного комплекса SCF.

Каждый из этих белков при связывании ауксина запускает экспрессию ауксин-регулируемых генов, причем потеря функции каждого из них приводит к потере жизнеспособности растения. О взаимодействии этих двух

независимых рецепторных систем или каком-либо разделении функций между ними в настоящее время ничего не известно.

Кроме того, в настоящее время не выявлены «средние» компоненты пути передачи ауксинового сигнала, действующие между рецептором ABP1 и ауксин-зависимыми транскрипционными факторами. При ответе на ауксин имеет место активация MAP-киназного каскада и киназы PID, но точное место этих протеинкиназ в пути передачи сигнала ауксинов не установлено.

3 Физиологическое действие ауксинов

Свойства ауксинов:

- влияют на рост клетки в фазах растяжения;
- стимулируют рост клеток камбия;
- обуславливают взаимодействие отдельных органов;
- регулируют коррелятивный рост;
- перемещается со скоростью 10 мм в час;
- уменьшение концентрации ауксина в растении приводит к увяданию листьев;
- дифференцирует клетки;
- помогает при росте придаточных корней.

Функции ауксинов многообразны и связаны с такими характеристиками этих гормонов, как наличие полярного транспорта, стимуляция работы ионных каналов и контроль экспрессии определенных генов. К основным функциям этих фитогормонов относятся: контроль клеточного цикла, стимуляция роста клеток растяжением, контроль полярности развития растительного организма, фото- и гравии- тропические реакции, стимуляция закладки боковых и придаточных корней, стимуляция закладки и развития латеральных органов в апикальной меристеме побега.

Активация ионных каналов

К числу наиболее быстрых ответов клетки на ауксины относится активация потока различных ионов через клеточную мембрану. Причина этого – ауксин-зависимая активация ряда белков ионного транспорта:

- мембранных H^+ -АТФаз, которые осуществляют выкачивание ионов H^+ из клетки;
- калиевых каналов, осуществляющих вход в клетку ионов K^+ ;
- кальциевых каналов, осуществляющих вход в клетку ионов Ca^{2+} .

Помимо активации работы ионных каналов, ауксины также стимулируют экспрессию ряда генов, кодирующих белки ионных каналов.

Активация H^+ -АТФаз лежит в основе ряда физиологических функций ауксинов – в частности, ауксин-зависимого роста клетки растяжением, а также фото- и гравитропизмов. Известно, что активация H^+ -АТФаз индуцируется ауксином даже на изолированных мембранных фракциях, но гораздо менее эффективно, заставляя предполагать существование неких клеточных факторов, опосредующих действие ауксина на протонные помпы. Таким фактором могут быть некоторые ауксин связывающие белки (ABP – Auxin Binding Proteins).

Действительно, в присутствии некоторых из них, например трансмембранного ауксинового рецептора ABR1 и цитоплазматического белка ABR 57, повышается эффективность активации H⁺-АТФаз в мембранах. Кроме того, для белка ABR 57 показана способность непосредственного взаимодействия с H⁺-АТФазами на клеточной мембране. Ауксины вызывают также повышение количества мембранных H⁺-АТФаз за счет позитивной регуляции экспрессии их генов.

Активация калиевых каналов также относится к числу быстрых событий при ответе клетки на ауксин. Работа калиевых каналов зависит от мембранного потенциала, в связи с этим считается, что их ауксин-зависимая активация происходит за счет гиперполяризации мембраны вследствие активации протонных помп. Для одного из Двух генов калиевых каналов кукурузы, ZMK1, показана позитивная регуляция экспрессии ауксинами.

Активация кальциевых каналов лежит в основе ауксин-зависимого открывания устьиц. Их активация является более медленным ответом по сравнению с активацией H⁺-АТФаз и калиевых каналов, что свидетельствует об опосредованном влиянии ауксинов на их работу. Активация кальциевых каналов также требует изменения мембранного потенциала, который возникает вследствие активации мембранных H⁺-АТФаз.

Контроль клеточного цикла

Наряду с цитокининами, ауксины относятся к гормонам, участвующим в контроле клеточного цикла у растений. Несмотря на то что основными индукторами пролиферации растительных клеток являются цитокинины, многие ауксины (в особенности синтетический ауксин 2,4-D) при добавлении в культуральную среду также способствуют усилению деления клеток. В растительном организме ауксины способствуют делению клеток апикальной меристемы корня, а также развивающегося листового примордия. Механизмы влияния ауксинов на клеточный цикл иные, чем у цитокининов.

Клеточный цикл всех эукариот находится под контролем циклин-зависимых протеинкиназ (CDK, от Cyclin-Dependent protein Kinases), которые фосфорилируют нижележащие регуляторы клеточного цикла (гистоны, белки пререпликационных комплексов, белок Retinoblastoma и т.д.). Для активности CDK необходимы их сменные каталитические субъединицы – циклины. Разные классы циклинов, присоединяясь к CDK, регулируют разные фазы клеточного цикла. Основными классами циклинов у растений являются циклины A, B и D: циклины класса A контролируют ход S-фазы клеточного цикла, циклины B – переход G2-M, а также нормальный ход и завершение митоза, циклины D контролируют переход G1-S, а также осуществляют связь клеточного цикла с внешними сигналами. Экспрессия генов D-циклинов – основных индукторов пролиферации растительных клеток – регулируется цитокининами и сахарозой. В промоторах генов циклинов A (CycA), а также гена CDKA, который кодирует основную CDK растений, обнаружены последовательности AuxRE для связывания транскрипционных факторов ARF. Тем не менее в опытах с синхронизированными суспензионными культурами растительных клеток не было выявлено значительного усиления экспрессии этих генов при добавлении

в культуральную среду ауксинов. При этом было показано, что повышение концентрации ауксинов повышает количество активных комплексов СДКА-циклинов за счет усиления ассоциации этих молекул или за счет стабилизации их связи. Молекулярные механизмы этого явления не выяснены.

Природный фитогормон, участвующий в **растяжении клеток**, особенно в колеоптилях, в инициации корнеобразования при ингибировании его роста, доминировании верхушки и ингибировании почкования, опадании листьев и плодов, дифференциации и партенокарпии роста плодов. Активирует выведение протонов и захват K^+ в чувствительных клетках; ионы водорода прямо или косвенно (путем воздействия на ферменты) увеличивают пластичность клеточных стенок, обеспечивая расширение клетки в ответ на клеточное тургорное давление. Ауксины действуют также на уровне экспрессии генов.

Контроль роста клеток растяжением. Одной из наиболее известных функций ауксинов на клеточном уровне является стимуляция роста клеток растяжением, которое лежит в основе ауксин-зависимого удлинения стебля.

Ауксин-зависимое растяжение клеток связано с повышением лабильности клеточных стенок. Один из механизмов ослабления клеточной стенки получил название «рост под действием кислоты» (или «кислый рост») и осуществляется за счет стимуляции ауксинами работы мембранных H^+ -АТФаз. H^+ -АТФазы выбрасывают ионы H^+ из клетки, что приводит к закислению узкого пространства между плазмалеммой и клеточной стенкой. Под действием кислой среды происходит активация экспансинов – белков, ассоциированных с клеточной стенкой, которые разрушают водородные связи между целлюлозными микрофибриллами, что позволяет клетке расширяться под действием тургорного давления. Направление роста клетки зависит от ориентации целлюлозных фибрилл, которая также контролируется ауксинами (механизм неизвестен). Помимо усиления каталитической активности экспансинов, ауксины позитивно регулируют экспрессию их генов: в промоторах ряда генов EХР имеются последовательности AuxRE.

Дифференцировка специфических типов клеток: развитие проводящей системы. Проводящая система высших растений – протяженная клеточная сеть, необходимая для транспорта растворенных веществ и механической стабильности. Сосудистые пучки, составляющие проводящую систему, включают в себя флоэму, по которой транспортируются главным образом фотоассимиляты, и ксилему, по которой перемещаются растворенные в воде минеральные вещества. Сосуды ксилемы дифференцируются из клеток прокамбия, которые имеются в любом органе растения и появляются в примordiaх органов на самых ранних стадиях их развития.

Дифференцировка сосудов из прокамбия находится под контролем ауксинов – например, установлено, что места дифференцировки сосудов в развивающейся листовой пластинке совпадают с зонами максимальной концентрации ауксинов. Ключевую роль в создании зон повышенной концентрации ауксинов, необходимых для развития сосудов, играет полярный транспорт ауксинов, который осуществляется по клеткам прокамбия. О точном молекулярном механизме дифференцировки сосудов в настоящее время данных

нет, вместе с тем, был выявлен ряд ключевых регуляторов этого процесса. У арабидопсис среди мутаций по генам, участвующим в передаче сигнала при ответе на ауксины, три мутации – *tr*, *bdl* и *axgb* – вызывают недоразвитие сосудистых пучков. Таким образом, развитие сосудов зависит от активности транскрипционного фактора ARF5/MP и его антагониста транскрипционного Депрессора IAA12/BDL. Кроме того, важную роль в этом процессе играет белок AXR6/CUL1, который является компонентом убиквитин-лигазного комплекса SCFTIR1. Другой группой регуляторов развития сосудов у арабидопсис являются транскрипционные факторы AtHB8 и AtHB20, относящиеся семейству HD-ZIP (другие представители этого семейства транскрипционных факторов – PHB, PHV и REV – играют ключевую роль в формировании адаксиально-абаксиальной полярности листовой пластинки. Экспрессия генов AtHB8 и AtHB20 индуцируется ауксином позже, чем экспрессия генов IAA -это может быть связано с тем, что в контроле развития сосудов транскрипционные факторы AtHB8 и AtHB20 действуют ниже белков ARF и Aux/IAA. Действительно, у трансгенных растений 35S::MPc повышенным уровнем экспрессии гена MP/ARF5 наблюдается повышенный уровень экспрессии генов AtHB8 и AtHB20.

Ауксин оказывает влияние на **дифференцировку проводящей** ткани в растущем побеге. Если вырезать сектор из стебля таким образом, чтобы перерезать и удалить части сосудистых пучков, то из клеток сердцевины образуются новые проводящие ткани, которые установят связь с пучками неповрежденных участков. Если удалить листья и почки выше места среза, то формирование новых клеток задержится. Если добавить ИУК к оставшемуся черешку листа, расположенному как раз над местом среза, формирование сосудистой ткани возобновится. Ауксин играет важную роль в присоединении сосудистых тяжей развивающихся листьев к сосудистым пучкам стебля.

Сходные реакции отмечаются в каллусах. Если взять каллус сердцевины сирени и привить на него почку, в каллусе начинает формироваться сосудистая ткань. Сосудистая ткань образуется и при выращивании каллуса на среде, содержащей ауксин и сахар (сахар необходим, поскольку в каллусе нет фотосинтезирующих клеток). Р. Уэтмор показал, что, регулируя количество сахара в среде, можно вызвать формирование только ксилемы, ксилемы и флоэмы или только флоэмы. Низкая концентрация сахарозы (от 1,5 до 2,5%) способствует образованию ксилемы, высокая (4%) – образованию флоэмы, а промежуточная – образованию обеих тканей. Это указывает на большую чувствительность регуляторов роста и привлекает внимание к тому немаловажному факту, что гормоны никогда не действуют независимо, а только во взаимосвязи с другими веществами или гормонами.

Ауксин и камбий. У древесных растений ауксин способствует росту камбия. Когда весной начинают делиться клетки меристематической зоны побега, ауксин, поступая из верхушки побега, стимулирует деление клеток камбия, образование вторичной флоэмы и вторичной ксилемы. Вместе с тем эти процессы модулируются в растительном организме и другим регуляторами роста.

Опыты с применением экзогенной ИУК и гибберелловой кислоты показывают, что в интактном растении взаимодействие между ауксинами и гиббереллинами определяет относительную скорость образования вторичной флоэмы и вторичной ксилемы. Например, ИУК и гибберелловая кислота каждая по отдельности стимулируют активность камбия у многих древесных растений. Однако в отсутствие гибберелловой кислоты ИУК стимулирует только развитие ксилемы. Образование флоэмы происходит под влиянием одной гибберелловой кислоты, а максимальное совместное развитие как ксилемы, так и флоэмы наблюдается только в присутствии ИУК и гибберелловой кислоты.

Контроль фото-и гравитропизма. Ауксины были открыты как вещества, контролирующие направленные ростовые движения растений – тропизмы. Выделяют гравитропизм – например, изгиб стебля и корня при изменении вектора силы тяжести, фототропизм – примером является изгиб гипокотилей по направлению к свету, хемотропизм – рост корней в сторону больших концентраций питательных веществ в почве и т. д. Все эти изгибы контролируются ауксинами и связаны с изменением направления градиента их концентрации, которое, в свою очередь, зависит от изменения направления полярного транспорта ауксинов (ПАТ), опосредованного PIN-белками.

Изгибы стебля и корня при возникновении всех тропизмов зависят от асимметричного распределения ауксинов в радиальном направлении, благодаря которому одна сторона стебля или корня накапливает больше ауксинов, чем другая, что приводит к неравномерности растяжения клеток и формированию изгиба. Эта модель, получившая название «гипотеза Холодного-Вента», была впервые предложена в 1928 году и в дальнейшем была подтверждена экспериментами с радиоактивно меченым ауксином. На примере гравитропизма корня было установлено, что центральную роль в обеспечении радиального распределения ауксинов играет белок PIN3, который в норме локализован на «боковой», ориентированной в сторону проводящей системы, поверхности клеток эндодермы, и контролирует центрипетальное направление ПАТ. Роль PIN-белков, в частности PIN3, в фототропизме не выяснена – несмотря на то, что асимметричное распределение ауксинов играет центральную роль в фототропических изгибах стебля.

Бета-Индолилуксусная кислота (ИУК, индолил-3-уксусная кислота) часто применяется для **укоренения** микрочеренков *in vitro* (в дальнейшем может угнетать корнеобразование). На свету нестабильна, поэтому ее надо хранить в темном месте. Используется в качестве эффектора при работе с культурами клеток и тканей значительно реже, чем синтетические ауксины. Объясняется это, возможно, тем, что такие культуры обычно сохраняют способность к образованию достаточных количеств эндогенной ИУК. ИУК в сочетании с гиббереллинами индуцирует митозы в тканях растений. Содержится во всех частях растения, особенно молодых. Наиболее интенсивно синтез ИУК происходит в апикальных меристемах и молодых листьях. На ювенильных этапах развития основным источником ИУК является эндосperm и семядоли,

которые обеспечивают гормонами надземную и подземную части растения. ИУК – главный гормон растений и во многом именно она обуславливает апикальное доминирование и аттрагирующий эффект. Основной предшественник в растительных тканях – триптофан.

Бета-Индолилмасляная кислота (ИМК, индолил-3-масляная кислота) – еще один гормон укоренения, обычно используемый культиваторами. Может синтезироваться в растениях природным путем, однако существует и искусственный аналог. В составе сред структурно более устойчива, чем ИУК, поэтому предпочтительна для индукции корнеобразования *in vitro* (в дальнейшем может угнетать их формирование).

Альфа-Нафтилуксусная кислота (НУК, 1-нафтилуксусная кислота) – очередной промотор корнеобразования, который часто используют для поддержания стабильного роста каллуса (далее может угнетать корнеобразование).

2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) – также синтетический ауксин, который получил наибольшее распространение на практике. Обычно способствует делению клеток, тем самым поддерживая хороший рост культуры. Это соединение широко используется при размножении *in vitro* для инициации роста каллуса. Однако в некоторых случаях было отмечено ингибирующее действие 2,4-Д на образование тех или иных вторичных соединений в каллусах. Известно, что 2,4-Д разобщает процессы окислительного фосфорилирования и тем самым нарушает обеспечение митоза энергией. Следовательно, эти вещества препятствуют началу митоза, но не удвоению хромосом, т. е. митоз не наступает, но объем ядер увеличивается. Следует отметить, что во многих случаях важное значение имеет используемая концентрация 2,4-Д.

В практике декоративного цветоводства и древоводства наиболее широко используются регуляторы роста класса ауксинов и ингибиторы роста из групп ретардантов и парализаторов (гербициды и дефолианты). Их применение включено в технологические производственные схемы. В меньшей степени изучено влияние гиббереллинов на декоративные древесные растения, во всяком случае степень изученности не позволяет еще включить их в технологический процесс выращивания декоративных древесных растений в питомниках и ухода за ними на объектах озеленения.

Включение регуляторов роста в технологию выращивания древесных растений позволяет сократить ручной труд при их формировании, уходе за кустарниками в живых изгородях, регулировании цветения, предупреждении периода старения, в борьбе с сорняками в школах питомников и на газонах объектов озеленения; улучшить условия пересадки растений за счет расширения сроков пересадочных работ (использование дефолиантов).

Одна из наиболее старых областей применения регуляторов роста растений – индукция, или ускорение, укоренения стеблевых черенков и отводков..

Черенки и отводки обрабатывают стимуляторами роста в местах образования корней. Для наилучшей индукции корнеобразования применяют

водные или спиртовые растворы, пудры, содержащие тальк или измельченный древесный уголь и стимуляторы роста в сухом измельченном виде, и пасты, приготовленные на основе пудр.

Пудрами обрабатывают черенки, не переносящие предпосадочного вымачивания (листья, травянистые черенки).

Водными растворами черенки обрабатывают чаще, чем спиртовыми.

Действие стимуляторов роста на черенки и отводки внешне проявляется в ускорении процесса корнеобразования, увеличении количества придаточных корней первого порядка и суммарной длины образовавшихся корней.

Внутренний механизм действия стимуляторов роста очень сложен, изучен еще не до конца, но из всех исследований следует, что в зоне, обработанной стимуляторами роста, повышаются оводненность тканей и уровень дыхания. Это способствует активному притоку питательных веществ, а в листьях обработанных черенков повышается интенсивность фотосинтеза. В черенке возрастает интенсивность синтетических процессов, усиливается гидролиз Сахаров и белковых веществ, увеличивается проницаемость протоплазмы, повышается активность некоторых ферментов и фитогормонов.

Концентрация раствора стимулятора должна учитывать условия роста побегов на маточном растении. В частности, побеги, выросшие в некотором затенении, можно обрабатывать растворами меньшей концентрации при меньшей экспозиции, так как в таких побегах содержание ауксинов несколько выше и у многих пород они могут хорошо укореняться и без стимулятора. Условием, которое способствует формированию у побегов свойств к образованию меристематических зачатков придаточных корней, является густое размещение маточников в ряду, при котором рост корней и побегов несколько ограничен. Почвы под маточниками не должны содержать избытка азота, так как это вызывает усиленный рост побегов и ослабляет регенерационную способность черенков. Эти черенки требуют растворов повышенной концентрации.

Повышенное содержание ауксинов в побегах вызывается искусственно с помощью этиолирования, т.е. затенения зоны предполагаемого образования корней. Так поступают, например, при зеленом черенковании такой трудно укореняемой породы, как краснолистная форма лещины обыкновенной. Весной перед началом роста маточные растения лещины накрывают черной пленкой, под которой образуются бледные, бесхлорофильные побеги. Когда у этих побегов образуется три-четыре междоузлия, маточники открывают и на этиолированные побеги (под третьей-четвертой почкой, считая сверху) надевают черные трубочки, скрученные из целлофана. Побеги с затемненными основаниями оставляют на свету. Когда листочки разовьются и окрасятся, побеги снимают и черенкуют. В результате получают 80-90 % укорененных черенков лещины.

Стимуляторы корнеобразования применяют при пересадках декоративных пород и при уходе за корнями деревьев на объектах озеленения. При пересадке корни небольших деревьев обрабатывают глиняной болтушкой, содержащей стимуляторы. Болтушку готовят чаще всего на растворе

гетероауксина концентрации 0,01 % (100 мг/л воды). При пересадке деревьев с комом земли раствором гетероауксина поливают приствольный круг или корневые срезы обмазывают пастой, содержащей гетероауксин.

Для количественного определения ауксина в любой ткани растения эту ткань экстрагируют каким-либо растворителем, а затем наносят экстракт на другую ткань, которая количественно реагирует на содержащийся в нем ауксин. Обычно эту ткань помещают в диэтиловый эфир при температуре около 0 °С и осторожно встряхивают в течение 2-4 ч. Полученную эфирную вытяжку затем концентрируют до небольшого объема и вводят в агаровый блок, который помещают на одну сторону чувствительного к ауксину декапитированного органа. Обычно для этой цели используют влагалище первого листа, или колеоптиль, выращенного в темноте овса. Асимметрично расположенный ауксин усиливает в исследуемом растении рост только той ткани, которая находится непосредственно под ним. Неравномерный рост двух сторон колеоптиля приводит к образованию изгиба, угол которого прямо пропорционален количеству введенного в блок ауксина. Таким образом, для количественного определения ауксина в неизвестном органе из него готовится вытяжка, которая наносится на чувствительный к ауксину орган. Возникший изгиб измеряется и сравнивается с изгибами, вызванными известными количествами ауксина в других сериях опытов. Описанный метод использования ответной реакции организма для измерения количества химического соединения, содержащегося в вытяжке, называется биотестом.

Тема 9 Гиббереллины

- 1 Общая характеристика гиббереллинов.
- 2 Рецепция и передача сигнала гиббереллинов
- 3 Физиологическое действие гиббереллинов

1 Общая характеристика гиббереллинов.

Еще одну группу важных ростовых гормонов растений, открытую благодаря ряду случайных обстоятельств и тонких наблюдений, составляют гиббереллины. В последнем десятилетии прошлого века японские рисоводы обнаружили на своих чеках появление чрезвычайно вытянутых проростков. Они стали внимательно наблюдать за этими проростками, так как хороший фермер обычно рассматривает любое крупное растение как возможный материал для селекции сорта с целью улучшения его общей продуктивности. Однако эти высокие проростки никогда не доживали до созревания и лишь изредка зацветали. Болезнь была названа баканаэ (болезнь «дурных проростков»). В 1926 г. японский ботаник Куросава обнаружил, что эти проростки были заражены грибом, названным позднее *Gibberella fujikuroi* (представитель сумчатых грибов). Если споры гриба перенести с зараженного проростка на здоровое растение, то последнее заболевает и его рост становится аномальным. При выращивании гриба в колбе на искусственной среде в ней накапливается какое-то вещество, которое, будучи перенесено на растение-

рецептор, вызывает у него чрезмерный рост – один из симптомов, типичных для болезни «дурных проростков». Это вещество было названо гиббереллином (производное от *Gibberella*).

В 30-х годах японским физиологам и химикам удалось выделить из среды, на которой выращивали гриб *Gibberella*, несколько веществ, ингибирующих и стимулирующих рост. Предложенная ими в итоге структурная формула стимулятора роста гиббереллина была не совсем верна. Тем не менее, эти ученые правильно определили общую природу вещества и получили кристаллы, при нанесении которых на испытываемые растения наблюдались типичные для болезни баканаэ симптомы очень сильного удлинения стебля. Эта информация была опубликована в Японии во многих статьях еще до 1939 г., но, к сожалению, вторая мировая война прервала начатую работу и отвлекла внимание большинства ученых на исследования для военных целей. Волнующая история открытия гиббереллина оставалась неизвестной на Западе примерно до 1950 г., когда несколько групп исследователей в Англии и США обнаружили старые статьи о гиббереллине и вновь приступили к решению этой проблемы.

К 1955 г. английские ученые подтвердили первоначальное наблюдение, сделанное в Японии, а также выделили вещество, которое они назвали гибберелловой кислотой. Она несколько отличается от материала, выделенного японцами. Вскоре много других соединений с такой же основной структурой было обнаружено как в грибах, так и в незараженных тканях высших растений. Стало ясно, что гиббереллины представляют собой целое семейство молекул, насчитывающее в настоящее время свыше 50 соединений. Все они обладают основным тетрациклическим гиббереллановым скелетом, но у каждого из них имеются различные модификации и химические группы (например, -ОН) в разных частях молекулы.

Химическая структура и классификация. Наиболее распространенными активными гиббереллинами являются GA1, GA3, GA4 и GA7 (от *Gibberellic Acid*), более слабой активностью обладают GA5 и GA6, которые тем не менее играют ключевую роль в гиббереллин-зависимой индукции цветения у однодольных. Среди прочих гиббереллинов большинство являются предшественниками в биосинтезе активных гиббереллинов либо продуктами их инактивации.

В отличие от ауксинов, критерием отнесения вещества к группе гиббереллинов является скорее соответствие определенной химической структуре, нежели наличие биологической активности. У растений, грибов и бактерий найдено 136 различных, близких по строению, веществ, относимых к группе гиббереллинов. Таким образом, гиббереллины – самый обширный класс фитогормонов. Гиббереллины представляют собой производные энт-гиббереллана и являются дитерпеноидами, однако предшественником биосинтеза служит энт-каурен. Гиббереллины могут иметь тетра- или пентациклическую структуру (дополнительное пятичленное лактонное кольцо) и соответственно содержат 20 (C₂₀-гиббереллины, например, ГК12) или 19 (C₁₉-гиббереллины) атомов углерода. Большинство гиббереллинов – кислоты и

поэтому принято обозначение ГК (гибберелловая кислота) с индексом, означающим порядок открытия, например, ГК1, ГК3. Индекс никаким образом не отражает близость химической структуры или положения в метаболических путях. Несмотря на многообразие гиббереллинов, значительной биологической активностью обладает несколько соединений (ГК4, ГК1, ГК7, ГК3), остальные являются предшественниками биосинтеза или неактивными формами. В экспериментальной работе наиболее часто используется ГК3. Гиббереллины неустойчивы и быстро разрушаются в кислой или щелочной среде.

Содержание в растениях. У высших растений наиболее богаты гиббереллинами быстрорастущие ткани; они содержатся в незрелых семенах и плодах, проростках, развёртывающихся семядолях и листьях.

Биосинтез и инактивация гиббереллинов. Основное место синтеза гиббереллинов в растении – листовые примордии и молодые листья. Можно выделить три основных этапа биосинтеза гиббереллинов:

1. Синтез энт-каурена из ГГДФ – катализируется ферментами группы терпен-синтаз (TPS): CPS (копалил-дифосфат-синтазой) и KS (энт-каурен-синтазой). Эти же ферменты принимают участие в синтезе фитоалексинов. Все ферменты TPS локализованы в пластидах.

2. Синтез GA12 из энт-каурена – катализируется ферментами группы P450-монооксигеназ: КО (энт-каурен-оксидазой) и КАО (оксидазой энт-кауреновой кислоты). Этот этап биосинтеза гиббереллинов проходит в эндоплазматической сети.

3. Синтез прочих гиббереллинов из GA12 происходит в цитозоле и катализируется ферментами группы 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ (2ODD). Среди ферментов 2ODD следует выделить GA-20-оксидазы и GA-3-оксидазы, которые осуществляют синтез биологически активных GA1, GA3, GA4 и GA7; а также GA-2-оксидазы, катализирующие реакции инактивации гиббереллинов (например, превращение активного GA1 в неактивный GA8).

У арабидонсиса и риса каждый из ферментов, катализирующих первые этапы биосинтеза гиббереллинов, кодируется одним-двумя генами: например, в геноме арабидонсиса имеется по одному гену, кодирующему ферменты CPS, KS и КО. Потеря функции этих генов у мутантов *ga1*, *ga2* и *ga3* соответственно приводит к серьёзному сокращению уровня гиббереллинов и развитию фенотипа, типичного для гиббереллин-дефицитных мутантов – это карлики с низкой плодovitостью, без добавления экзогенных гиббереллинов их семена имеют низкую всхожесть, а взрослые растения не формируют цветоноса. В то же время ферменты 2ODD, действующие на последнем этапе биосинтеза гиббереллинов, кодируются большими мультигенными семействами, члены которых обладают ткане- и органоспецифическим характером экспрессии, а также по-разному регулируются в зависимости от внешних условий и стадии онтогенеза. Мутации с потерей функции любого из этих генов имеют более слабое фенотипическое проявление.

Основными путями инактивации гиббереллинов являются 2β-гидроксилирование с помощью GA-2-оксидаз; эпоксидирование с помощью фермента из группы цитохром-P450-монооксигеназ EUI (Elongated Uppermost

Internode, назван по фенотипу мутанта с потерей функции соответствующего гена) и метилирование с использованием S-аденозил-метионина как донора метильных групп – эту реакцию катализируют ферменты GAMT1 и GAMT2 (GA Methyl Transferase). По-видимому, все эти пути инактивации имеют одинаково важное значение в регуляции пула активных гиббереллинов в растении, так как потеря функции любого из перечисленных генов у мутантов *eu1*, *gamt1* и *gamt2*, а также у трансгенных растений с косупрессией генов *GA2ox* ведет к повышению концентрации активных гиббереллинов в десятки раз. Кроме того, существует слабо изученный путь инактивации гиббереллинов за счет образования конъюгатов с глюкозой – GA-глюкозильных эфиров.

Пути регуляции уровня активных гиббереллинов в тканях растений. Последний этап биосинтеза – синтез активных гиббереллинов из GA12 – играет ключевую роль в контроле уровня активных гиббереллинов в растении. Действительно, повышение уровня экспрессии гена *GA20ox* у трансгенных растений арабидопсис вызывает резкое повышение уровня гиббереллинов в тканях и серьезные фенотипические изменения, тогда как сверхэкспрессия гена *AtCPS* приводит только к накоплению энт-каурена, энт-кауреновой кислоты и GA12. В связи с этим основным способом регулирования концентрации активных гиббереллинов в тканях растения является **контроль экспрессии генов**, кодирующих ферменты семейства 2ODD, разные представители которого катализируют как реакции активации гиббереллинов (синтез GA1, GA3, GA4 и GA7 из GA12, который катализируется GA-3 и GA-20-оксидазами), так и реакции их инактивации (2 β -гидроксилирование GA1, GA3, GA4 и GA7, которое катализируется GA-2-оксидазами). В настоящее время изучены генетические механизмы регуляции уровня экспрессии генов 2ODD в разных органах растений, а также в зависимости от определенных факторов внешней среды.

Регуляция конечным продуктом. Важную роль в поддержании гомеостаза гиббереллинов играет регуляция их биосинтеза конечным продуктом. Например, у арабидопсис повышение концентрации активных гиббереллинов вызывает транскрипции генов *AtGA20ox* и *AtGA3ox*, а снижение их концентрации повышает уровень экспрессии этих же генов. С другой стороны, активные гиббереллины позитивно регулируют уровень экспрессии генов *AtGA2ox*, участвующих в их инактивации. Точные механизмы, лежащие в основе регуляции экспрессии вышеперечисленных генов в зависимости от концентрации активных гиббереллинов, неизвестны, но показано, что в этот процесс вовлечены компоненты пути передачи сигнала гиббереллинов: рецептор GID1, репрессоры гиббереллинового сигналинга DELLA-белки, F-бокс-содержащий белок SLY/GID2.

Регуляция другими гормонами. В контроле развития растений гиббереллины являются антагонистами цитокининов, этилена и АБК и действуют в одном направлении с ауксинами. Для некоторых групп фитогормонов установлена способность регулировать концентрацию активных гиббереллинов через контроль экспрессии генов 2ODD. Например, ауксины, которые выполняют сходные с гиббереллинами функции, могут регулировать

концентрацию активных гиббереллинов путём позитивной регуляции уровня экспрессии генов GA3ox и негативной регуляции экспрессии генов GA2ox. Основную роль в ауксин-зависимом контроле концентрации активных гиббереллинов играет транскрипционный фактор NPH4/ARF7, который регулирует экспрессию генов 2ODD, напрямую связываясь с их промоторами. Антагонистом NPH4/ARF7 в этом процессе является транскрипционный репрессор MSG2/IAA19.

Регуляция концентрации гиббереллинов в разных органах растений. Помимо регуляции экспрессии генов 2ODD в зависимости от концентрации активных гиббереллинов и других гормонов, существуют также механизмы регуляции их экспрессии в разных органах растения; некоторые из них:

В апикальной меристеме побега (ПАМ). Транскрипционные факторы KNOX напрямую репрессируют экспрессию генов GA20ox, контролирующих биосинтез гиббереллинов, и позитивно регулируют экспрессию генов IPT, контролирующих биосинтез цитокининов. Гены KNOX экспрессируются в корпусе ПАМ, в результате баланс гиббереллинов и цитокининов в центральной части ПАМ смещен в сторону цитокининов, что приводит к активной пролиферации клеток без дифференцировки. На периферии ПАМ, в зоне закладки листовых примордиев, экспрессия генов KNOX подавляется, что приводит к экспрессии гена GA20ox, повышению концентрации гиббереллинов и дифференцировке клеток. В основании ПАМ экспрессируется ген GA2ox, контролирующий инактивацию гиббереллинов, что важно для поддержания конститутивно низкого уровня гиббереллинов в ПАМ.

В семенах. В темноте, при отсутствии активного фитохрома, активируется белок PIL5, который негативно регулирует экспрессию гена GA3ox и позитивно – экспрессию гена GA2ox; снижение уровня активных гиббереллинов подавляет процесс прорастания. На свету активация фитохромов вызывает инактивацию PIL5, усиление экспрессии GA3ox и подавление экспрессии GA2ox – в результате повышается уровень активных гиббереллинов, что приводит к прорастанию (регуляция светом).

2 Рецепция и передача сигнала гиббереллинов

Путь передачи сигнала при ответе на гиббереллины включает в себя четыре основных компонента:

1. Рецептор GID1 – растворимый ядерный белок.
2. Компоненты убиквитин-лигазного комплекса SCFSLY / GID2.
3. Репрессоры ответа на гиббереллин – белки DELLA, относящиеся к семейству транскрипционных факторов GRAS.
4. Гиббереллин-зависимые транскрипционные факторы GAMYB, которые относятся к MYB-семейству транскрипционных факторов.

Активные формы гиббереллина (GA_x и GA₄) связываются с внутриклеточным цитоплазматическим рецептором GID1. Взаимодействие с гиббереллином приводит к изменению конформации рецептора и стабилизации его активной структуры. Молекулы рецептора GID1 приобретает способность связываться с DELLA-белками, к которым относятся репрессоры

гиббереллинового сигнала. Во взаимодействии GID1 с DELLA-белками молекула гиббереллина выступает в роли «молекулярного клея». В результате присоединения к рецептору в карбокситерминальной части молекулы DELLA-белка происходят существенные конформационные изменения, приводящие к возможности специфического взаимодействия с F-box субъединицей SCF-подобной убиквитинирующей лигазы. DELLA-белок убиквитинируется лигазой и далее подвергается протеолизу.

Разрушение репрессоров гиббереллинового сигнала приводит к активации экспрессии генов MYB-подобных транскрипционных регуляторов (GAMYB), представляющих важную группу транскрипционных активаторов гиббереллин-регулируемых генов, к которым относится группа генов, кодирующих комплекс гидролитических ферментов. Факторы GAMYB специфически связываются с промоторами генов в области cis-элемента GARE (GA-Response Elements) и участвуют в сборке преинициаторного комплекса. Функциональная активность GAMYB-белков контролируется не только на уровне транскрипции, но и посттрансляционно. Предполагается возможность регуляции активности GAMYB-факторов путем их ковалентной модификации посредством фосфорилирования.

Предположительная модель гиббереллинового сигнала:

- 1) Гиббереллин (GA) связывается с рецептором GID1.
- 2) Изменение конформации рецептора приводит к связыванию DELLA-белков (негативных регуляторов гиббереллинового сигнала).
- 3) Образование комплекса GID1(GA)-DELLA приводит к существенным конформационным изменениям в карбокситерминальной части DELLA-белков.
- 4) DELLA-белки специфически взаимодействуют с F-box субъединицей убиквитинирующей лигазы.
- 5) DELLA-белки убиквитинируются и подвергается протеолизу.
- 6) Разрушение DELLA-белков приводит к дерепрессии гиббереллинового сигнала.
- 7) Активируются гены, кодирующие транскрипционные активаторы GAMYB.
- 8) Транскрипционные активаторы GAMYB связываются с GARE-мотивом гиббереллин-регулируемых генов и совместно с другими активаторами инициируют их экспрессию.

3 Физиологическое действие гиббереллинов

К числу наиболее известных функций гиббереллинов относятся контроль прорастания семян, роста стебля в длину, перехода к цветению и развития органов цветка. В настоящее время изучены молекулярные механизмы реализации этих функций: все они связаны с деградацией DELLA-белков, опосредованной рецептором GID1.

Контроль прорастания семян. Созревание семян связано с накоплением питательных веществ в зародыше и эндосперме. При прорастании происходит лизис запасных макромолекул эндосперма различными гидролитическими

ферментами. Основную функцию в гидролизе крахмала в эндосперме выполняют α - и β -амилазы: α -амилазы гидролизуют крахмал до олигосахаридов, которые затем превращаются в мальтозу с помощью β -амилаз.

Гены α -амилаз были первыми генами, для которых установлен прямой контроль экспрессии с помощью гиббереллин-зависимого транскрипционного фактора GAMYB. Таким образом, гиббереллины, выделяемые зародышем, вызывают запуск экспрессии генов α -амилаз в алейроновом слое, что приводит к лизису крахмальных гранул эндосперма и обеспечивает молодой проросток питательными веществами.

Обработка растений гиббереллинами стимулирует пролиферацию клеток междоузлий и их рост растяжением. Гиббереллин-зависимое повышение частоты митозов наиболее хорошо заметно в субапикальных районах побега при переходе к цветению у розеточных растений длинного дня, а также в интеркалярных меристемах риса, растущего в глубокой воде. При этом в апикальной меристеме побега гиббереллины выполняют строго противоположную функцию – ингибируют пролиферацию и стимулируют дифференцировку клеток, благодаря чему для нормального развития растения важно поддержание конститутивно низкой концентрации гиббереллинов в ПАМ. Таким образом, гиббереллины могут выполнять противоположные функции в контроле развития разных меристем.

Регуляция зацветания. Согласно многочисленным исследованиям существуют четыре основных пути регуляции зацветания: путь длинного дня, отвечающий за переход к цветению при увеличении продолжительности светового периода; автономный путь, который контролирует зацветание как при длинном, так и при коротком дне; путь вернализации, запускающий цветение после кратковременного периода низких температур; и гиббереллин-зависимый путь, который наиболее важен для перехода к цветению в условиях короткого дня.

Все эти пути могут взаимодействовать между собой – например, у арабидопсис, который может цвести как при длинном, так и при коротком дне. В связи с ослаблением гиббереллин-зависимого пути контроля зацветания, гиббереллин-дефицитные *ga*-мутанты арабидопсис совсем не цветут при коротком дне, а также демонстрируют задержку цветения в условиях длинного дня.

В основе гиббереллин-зависимого контроля зацветания лежит позитивная регуляция экспрессии генов, играющих ключевую роль в интеграции процессов цветения: индуктора экспрессии гомеозисных генов цветка – гена LEAFY (LFY), основного инициатора цветения – гена FLOWERING LOCUS T (FT) и его мишени – гена SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1).

В промоторе гена LFY обнаружена GAMYB-связывающая последовательность, с которой напрямую взаимодействует транскрипционный фактор GAMYB33. Мутации по GAMYB-связывающей последовательности делают невозможным повышение уровня экспрессии LFY в условиях короткого дня. В то же время трансформация гиббереллин-дефицитных *ga*-мутантов

геном LFY под конститутивным промотором запускает их цветение при коротком дне.

У растений длинного дня роль гиббереллинов в контроле зацветания менее понятна. У этих растений увеличение продолжительности светового периода стимулирует рост стебля в длину (особенно хорошо это заметно у розеточных растений) с последующей индукцией цветения. Причиной этого, по-видимому, является фитохром-зависимое повышение уровня экспрессии генов GA20ox, которое приводит к увеличению концентрации свободных гиббереллинов в побегах. На арабидопсис было показано, что повышение концентрации гиббереллинов в листьях приводит к усилению экспрессии гена FT, кодирующего белок-флориген, который синтезируется в листьях и в дальнейшем перемещается в ПАМ. К сожалению, молекулярные механизмы влияния гиббереллинов на экспрессию FT в настоящее время не выяснены.

Роль в регуляции перехода к цветению. Фитохром-зависимое повышение концентрации GA20ox в листьях вызывает повышение концентрации гиббереллинов, которое, в свою очередь, вызывает повышение концентрации белка FT. Этот процесс может также регулироваться фотопериодом, через ТФ CO. Белок FT перемещается из листьев в ПАМ.

Повышение уровня гиббереллинов в ПАМ вызывает усиление экспрессии гена SOC, который негативно регулируется DELLA-белками GAI и RGA. Этот процесс негативно регулируется ТФ KNOX, которые стимулируют экспрессию генов GA2ox в Rib-зоне ПАМ.

Экспрессия гена LFY напрямую позитивно регулируется гиббереллин-зависимым ТФ GAMYB33. DELLA-белки GAI и RGA негативно регулируют этот процесс через miPHK 156.

Белки SOC1 и AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24) формируют гетеродимер и позитивно регулируют экспрессию гена LFY; ТФ LFY позитивно регулирует экспрессию генов SOC1 и AGL24.

Итак, функции гиббереллинов связаны со стимуляцией вегетативного развития растений (прорастание, рост стебля в длину) и генеративного развития (перехода к цветению). Гиббереллины действуют в одном направлении с ауксинами и стимулируют биосинтез и передачу сигнала друг друга; кроме того, системы их рецепции передачи сигнала организованы по одному плану (рецепторы взаимодействуют с компонентами убиквитин-лигазных комплексов E3 и индуцируют протеолиз транскрипционных репрессоров). Цитокинины и АБК, напротив, являются антагонистами гиббереллинов.

Наиболее общим и ярким проявлением физиологического действия гиббереллина является его способность **резко усиливать рост стебля** у карликовых форм различных растений. Считается, что карликовость – это результат изменения (мутации) в одном гене. Возможно, что именно этот ген ответствен за образование гиббереллина или, точнее, за образование фермента, катализирующего одну из ступеней его синтеза. Однако некоторые исследователи полагают, что карликовые мутанты содержат ингибиторы роста и внесение гиббереллина лишь нейтрализует их действие. Обычно карликовость выражается в уменьшении длины междоузлий стебля при

сохранении их числа. Обработанные гиббереллином карликовые растения выравниваются по высоте с нормальными, однако в последующих поколениях карликовость продолжает сохраняться.

Гиббереллины заметно усиливают вытягивание стебля у многих неповрежденных растений. Так, высота стебля конопли под влиянием опрыскивания гиббереллином увеличивается примерно на 30–50%. Существует определенная зависимость между скоростью роста стебля растений и содержанием ГПВ. Так, содержание ГПВ и ход роста стебля конопли хорошо коррелируют друг с другом. Это свойство позволяет некоторым исследователям считать гиббереллин гормоном роста стебля. Увеличение роста стебля происходит как за счет усиления деления клеток, так и за счет их растяжения. С ростом стебля и выходом растения из розеточного состояния (стрелкованием) связано влияние гиббереллина на зацветание длиннодневных растений в условиях короткого дня. ГПВ накапливается в почках при выходе из покоящегося состояния. В соответствии с этим обработка гиббереллином вызывает прерывание покоя у почек. Сходная картина наблюдается на семенах. При выходе семян из покоящегося состояния в них накапливаются ГПВ. Обработка гиббереллином может заменить воздействие красного света при прорастании светочувствительных семян. По-видимому, при разных проявлениях гиббереллины действуют разным путем (поливалентно). При действии гиббереллинов возрастает общая масса растительного организма, способствуя не перераспределению питательных веществ, а общему их накоплению. Гиббереллин усиливает процесс фотосинтетического фосфорилирования. Показано, что листья, содержащие большое количество ГПВ, характеризуются более интенсивным фотосинтетическим фосфорилированием. Обработка гиббереллином повышает интенсивность фотофосфорилирования при одновременном снижении содержания хлорофилла. Следовательно, под влиянием гиббереллина повышается интенсивность использования единицы хлорофилла, возрастает ассимиляционное число. При рассмотрении процесса фотосинтеза указывалось, что имеются два типа фотофосфорилирования – циклическое и нециклическое. Оказалось, что гиббереллин повышает интенсивность нециклического фотофосфорилирования и, как следствие, основных продуктов этого процесса (АТФ и НАДФ-Н₂). Имеются данные, что ГПВ накапливаются в хлоропластах. На свету влияние гиббереллина, внесенного извне, сказывается сильнее. Все это указывает на значение гиббереллина для регуляции процесса фотосинтеза. В темноте гиббереллин воздействует лишь на растяжение клеток, не вызывая возрастания интенсивности их деления. Можно полагать, что в темноте гиббереллин влияет косвенно через изменение уровня содержания ауксинов.

Еще один пример аттрагирующего действия гиббереллинов - стимуляция развития бессемянных плодов. Особенно это важно при выращивании бескосточковых сортов винограда. Если применить гиббереллин, ягоды получаются более крупными и урожай возрастает.

Гиббереллин и проявление пола у растений. С помощью гиббереллина можно вызвать изменение пола у растений. В 1970-х годах под руководством

М.Х.Чайлахяна были проведены исследования на огурцах и конопле. Огурцы образуют как мужские, так и женские цветки на одном растении, а конопля относится к типично двудомным растениям (мужские и женские цветки на разных экземплярах). Обработка гиббереллинами вызывала увеличение % мужских растений у конопли и усиливала закладку мужских цветков на огурцах. Гормоном-антагонистом в этих экспериментах выступал цитокинин, который вызывал образование женских цветков.

Иногда проявление пола зависит не только от вида, но и от генетической линии, к которой принадлежит растение. Например, обработка гиббереллинами томатов дикого типа вызывала образование избыточного числа гнезд в завязях (стимулировала женское развитие). У мутантов томата *stamenless*, лишенных тычинок, гиббереллин вызывал нормализацию андроеца, т.е. стимулировал развитие мужской сферы в цветке.

Несомненно, уровень гиббереллинов влияет на проявление пола у растений. Однако, результат зависит от вида, линии, и внешних обстоятельств, при которых проводится обработка.

Гиббереллины применяют также для повышения выхода волокна у льна и конопли, при производстве солода, для увеличения вегетативной массы кормовых культур и других целей.

Получение и применение. Гиббереллины получают главным образом микробиологическим способом из продуктов жизнедеятельности грибов рода *Fusarium*.

Гиббереллины применяют в практике растениеводства для повышения выхода волокна конопли и льна, для увеличения размеров ягод у бессемянных сортов винограда, для повышения урожайности трав, стимуляции прорастания семян (обработка гиббереллинами нарушает состояние покоя тканей и оказывает стратифицирующее действие на семена; при естественном выходе семян из состояния покоя содержание эндогенных гиббереллинов повышается) и др. Так как гиббереллины вызывают резкое ускорение роста зелёной массы растений, применение их должно сопровождаться усилением питания растений.

Для ускоренного созревания томатов, черешни, яблок, а также для предотвращения вылегания злаковых культур, используют обработки растений веществами-ретардантами, тормозящими действие гиббереллинов, например, 2-хлорэтилфосфоновой кислотой (этефоном).

Тема 10 Цитокинины

- 1 Общая характеристика цитокининов
- 2 Рецепция и трансдукция сигнала цитокининов
- 3 Физиологические функции цитокининов

1 Общая характеристика цитокининов

Цитокинины (греч. κύτταρο ячейки + греч. κίνηση движение), класс гормонов растений 6-аминопуринового ряда, стимулирующих деление клеток

(цитокинез). С этой способностью цитокининов связаны их основные функции в развитии растений. Молекулярная масса (~ 5-20 кДа).

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

Первый природный цитокинин зеатин из зародышей кукурузы был выделен и описан Letham с соавт. (Австралия) лишь спустя почти десятилетие после получения Скугом с соавт. синтетического цитокинина кинетина, а биосинтез цитокининов в растениях был доказан японскими исследователями лишь в 2001 г., т.е. уже в XXI в.

Структура цитокининов. Цитокинины представляют собой относительно простые производные аденина или аденозина, модифицированные по атому азота в 6-м положении шестичленного гетероцикла. У большинства цитокининов в этом положении к аденину присоединена короткая алифатическая цепь остатка изопентенила. Если эта цепь остается немодифицированной, цитокинины относят к группе изопентенильных (цитокинины iP-типа). Однако в растениях существуют ферменты, гидроксилирующие алифатическую цепь по концевому атому углерода. Именно цитокинины с гидроксилированной алифатической цепью получили название зеатинов (цитокинины Z-типа). Возможны два основных типа стереоизомеров зеатинов: транс- и цис-зеатин. В молекуле транс-зеатина гидроксил направлен в сторону от аденинового гетероцикла; транс-зеатин считается наиболее распространенным и активным цитокинином в растениях. У цис-зеатина концевой гидроксил, наоборот, сближен с адениновым ядром, причем возможно образование водородной связи между водородом ОН-группы и атомом азота в 1-м положении аденинового гетероцикла.

Среди других природных цитокининов широко известны такие, как дигидрозеатин (DZ), у которого восстановлена двойная связь боковой цепи, бензиламинопурин (БАП), а также тополин, обнаруженный первоначально в растениях тополя ароматический цитокинин, у которого вместо алифатической цепи присутствует остаток гидроксибензила.

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

цитокининов – производных аденина, цитокининовая активность была обнаружена у синтетических производных фенилмочевины.

Распространенность цитокининов. Цитокинины распространены в биосфере повсеместно в буквальном смысле слова. Они обнаруживаются практически во всех живых организмах, в том числе в организме человека, а также в воде и почве. Биосинтез цитокининов происходит в высших растениях, мхах, водорослях, ряде бактерий и даже некоторых насекомых-паразитах растений. Из этих объектов цитокинины попадают в почву и различные водные резервуары. У животных также обнаруживаются небольшие количества цитокининов, хотя эти соединения вряд ли имеют там гормональные функции. Дело в том, что отдельные изоформы тРНК содержат изопентенилированные по №6 остатки аденина по соседству с антикодоном. Эти модифицированные основания обычно представляют собой цис-зеатин или изопентениладенин, а также их метилтиопроизводные. При распаде тРНК цитокинины высвобождаются и в принципе могли бы влиять на метаболизм компетентных клеток. Однако у растений тРНК, по-видимому, не является основным и существенным источником цитокининов. У цитокинин-продуцирующих бактерий также обнаружены ферменты прямого, не через тРНК, биосинтеза цитокининов. В отличие от свободных iP-цитокининов, которые гидроксилируются в растениях с образованием еще более активного транс-зеатина, iP в составе тРНК гидроксилируется, напротив, с образованием малоактивного цис-зеатина.

К биосинтезу цитокининов также способны представители бактерий, грибов, насекомых и нематод. Такие особенности были сформированы в ходе длительной коэволюции этих организмов и растений. Так, например, личинки бабочки *Stigmella* вырабатывают цитокинины, чтобы предотвратить увядание пораженных листьев, которые в итоге остаются зелеными даже во время осеннего листопада.

Многие бактерии, способные к синтезу цитокининов и ауксинов, вызывают опухоли растений. Примером служит знаменитая *Agrobacterium tumefaciens* – агробактерия корончатых галлов у растений, которая является одним из основных инструментов в биотехнологии благодаря своей способности трансформировать геном растения участками собственных плазмид.

Главное место образования основной массы цитокининов – кончики корней, в том числе боковых и придаточных. Цитокинины образуются также в почках, основании очень молодых листьев, развивающихся семенах и зародышевой оси прорастающих семян. Следовательно, синтез цитокининов происходит в разных участках растения в зависимости от этапа онтогенеза.

Предшественниками **биосинтеза цитокининов** в растениях являются свободные АТФ и АДФ, а также тРНК. Первая стадия био-синтеза цитокининов – синтез изопентил-нуклеотидов из АТФ или АДФ и диметилаллилпирофосфата – катализируется ферментом изопентенилтрансферазой (IPT). Кроме IPT, у растений выявлены ферменты тРНК-IPT, использующие в качестве субстрата тРНК – они используются для

синтеза цис-зеатина. В дальнейшем изопентенил-нуклеотиды могут превращаться в зеатин-нуклеотиды с помощью фитохром P450-монооксигеназ. Наконец, последней стадией является получение активных цитокининов из цитокининовых нуклеотидов путём дефосфорилирования и дерибозилирования – это реакция катализируется ферментом монофосфатфосфорибогидролазой.

Фермент аденозинфосфатизопентилтрансфераза катализирует первую реакцию в биосинтезе изопреновых цитокининов, фермент использует АТФ, ADP или AMP как субстрат и диметилаллил-дифосфат или гидроксиметилбутенилдифосфат как донор прениль-ной группы. Данная реакция является лимитирующей в биосинтезе цитокининов, субстраты – доноры пренильных групп образуются в пентилэритрол-фосфатном биохимическом пути.

У растений и бактерий цитокинины также могут образовываться из продуктов распада тРНК. Транспортные РНК, с антико-доном, начинающимся с уридина и имеющие пренилированные аденозины рядом с антикодоном, освобождают при деградации аденозины как цитокинины. Пренилирование таких аденинов осуществляется тРНК-изопентилтрансферазой.

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

Из корней цитокинины пассивно передвигаются вместе с пасокой по сосудам и попадают в листья и другие органы. Таким способом передается информация о состоянии растущих частей корневой системы в надземную часть растения. При этом создается определенный градиент концентрации цитокининов вдоль вертикальной оси растения, который вместе с градиентом ауксинов служит сигналом для дифференцировки клеток и образования по оси определенных тканей. В 10 мл пасоки, например виноградной лозы, содержится 0,5-1,0 мкг цитокининов. Однако транспорт по сосудам сильно зависит от транспирационного тока, а следовательно, от температуры, влажности воздуха, ветра, и поэтому он нестабилен. Именно для того чтобы достичь более постоянной концентрации в зонах деления клеток, где цитокинины особенно нужны, растения сформировали в побеге локальные зоны биосинтеза цитокининов. Цитокинины, образующиеся в почках, молодых листьях, развивающихся семенах и зародышевой оси, не передвигаясь в другие органы.

Физиологическое действие цитокининов суммировано ниже.

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

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

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

2 Рецепция и трансдукция сигнала цитокининов

Рецепторы цитокининов относятся к типу каталитических рецепторов, они имеют сложную мультидоменную структуру. Гормонсвязывающей активностью обладает так называемый cHAsе- домен (cyclase/Histidine kinase Associated Sensory extracellular), 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 АТР/АДР-связывающего фосфотрансферного домена. Димеризационный домен (А-домен) состоит из двух примыкающих друг к другу так называемых twostranded coiled-coils. А-домены двух рецепторов могут взаимодействовать, образуя четырехспиральный узел. Согласно современным представлениям, каждая из гистидинкиназ в димере фосфорилирует другую (реакция in trans). В фосфотрансферном домене имеется консервативный сайт (H-box) общей

структуры –AtVSH_eIRtP–, 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 С-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. Функция псевдоресиверного домена пока не ясна.

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.

Рецепторы цитокининов структурно и функционально родственны сенсорным гистидинкиназам двухкомпонентных систем передачи сигналов, широко распространенным у прокариот и найденным также у ряда эукариот, кроме животных. Классическая двухкомпонентная система прокариот состоит из двух белков: сенсорной гистидинкиназы и регулятора ответа (обычно фактора транскрипции).

Связывание экстраклеточного рецепторного CHASE-домена с цитокинином стимулирует димеризацию рецепторов и трансмолекулярное автофосфорилирование гистидинового остатка transmitter домена. Фосфорилирование провоцирует фосфорелейный механизм – последовательный перенос фосфатной группы. Сначала фосфатная группа переносится в рамках рецепторной молекулы с остатка гистидина на остаток аспарагиновой кислоты гесеивер домена, а затем на остаток гистидина низкомолекулярной фосфотрансферазы HPt. Этот компонент является высоко мобильным и легко диффундирует по цитоплазме и проникает в ядро. В отсутствие цитокинина в клетке присутствует незначительное количество регуляторов ответа А-типа, поэтому на первых этапах активации цитокининового сигнала в фосфорелейном механизме участвуют преимущественно регуляторы ответа В-типа – транскрипционные регуляторы. Фосфотрансфераза HPt переносит фосфат на аспарагиновую кислоту гесеивер домена регулятора ответа.

В фосфорилированном состоянии регуляторы ответа В-типа модулируют активность нескольких десятков цитокинин-чувствительных генов раннего ответа.

К ранним генам, активность которых модулируется цитокинином, относятся гены, кодирующие факторы транскрипции, различные регуляторные белки, в том числе обладающие киназной и фосфатазной активностью, а также участвующие в механизме направленного протеолиза белков (убиквитин-конъюгирующий фермент, F-box белок, АТФ-зависимая субъединица протеазы, структурный белок убиквитинирующей лигазы SKP1). Среди ранних генов цитокининового ответа важное место занимают гены, кодирующие регуляторы

ответа А-типа. Эти белки также как и RR В-типа участвуют в функционировании двухкомпонентной системы. Существенное повышение концентрации RR-A приводит к тому, что они составляют ощутимую конкуренцию регуляторам ответа В-типа, перехватывая на себя значительную часть фосфатов от гистидиновой фосфотрансферазы. В результате этого снижается уровень транскрипции цитокинин-активируемых генов. Следовательно, RR А-типа можно рассматривать как негативные регуляторы цитокининового ответа.

В активированном состоянии регуляторы ответа А-типа связываются с различными функциональными белками, модулируя их активность. Эти белки могут быть ферментами или регуляторами, через которые возможна дальнейшая передача сигнала.

3 Физиологические функции цитокининов

Гены, чувствительные к цитокинину. На протяжении многих десятилетий после открытия цитокининов оставалось неясным, что представляет собой внутриклеточная мишень их действия, влияют ли они напрямую на активность генов и если да, то каков механизм передачи цитокининового сигнала. Конечно, эти вопросы активно дебатировались в научных кругах, однако убедительные данные о существовании генов первичного ответа на цитокинин и цитокининовых рецепторов появились сравнительно недавно. В 1998 г. в лабораториях Дж. Кибера (США) и Т. Сугиямы (Япония) у арабидопсиса и кукурузы были обнаружены гены, напрямую активирующиеся цитокинином. Одним из первых обнаруженных цитокинин-чувствительных генов был ген так называемого регулятора ответа, получивший название ARR5 (от Arabidopsis Response Regulator 5). Транскрипция данного гена быстро активировалась цитокинином, причем ингибитор трансляции циклогексимид не препятствовал этой активации, т.е. для нее не требовалось биосинтеза какого-либо белка.

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

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

Также давно известно об антагонистических взаимоотношениях цитокининов и АБК в таких процессах, как функционирование устьиц, прорастание семян, формирование хлоропластов. В ходе онтогенеза цитокинин часто оппонирует и этилену, активирующему генетическую программу старения у растений, хотя в определенных условиях может и сам увеличивать продукцию этилена. Гораздо меньше известно о взаимоотношениях цитокининов с другими фитогормонами, в частности, с гиббереллинами, хотя имеются сообщения об их противоположном влиянии на некоторые биохимические и физиологические процессы.

Физиологическое действие цитокининов

Цитокинины обладают многообразным физиологическим действием на растения, причем характер действия этих гормонов сильно зависит от их концентрации. Одним из важнейших эффектов цитокининов, благодаря которому эти фитогормоны и были обнаружены, является стимуляция деления клеток. Многие эффекты цитокининов на организменном уровне, например, формирование сосудистых тканей в корнях, обусловлены именно их способностью стимулировать деление определенной группы клеток-предшественников.

Рост растений вдоль продольной оси, обусловленный функционированием апикальных меристем побега и корня, находится под контролем цитокининов совместно с ауксинами. При этом цитокинины в физиологических концентрациях стимулируют апикальную меристему и рост побега, но подавляют меристему и рост корня. Помимо деления, цитокинины способствуют также растяжению клеток, особенно в листьях и семядолях. Наряду с ауксинами, цитокинины в значительной степени формируют фенотип растения, стимулируя рост боковых побегов, но подавляя рост боковых корней. Вместе с ауксинами и гиббереллинами цитокинины формируют донорно-акцепторные отношения в растении, усиливая аттрагирующую способность отдельных органов или их частей. В культуре растительных каллусов или тканей цитокинины вызывают формирование побегов. Цитокинины способствуют фотосинтезу, активируя формирование хлоропластов, часто даже в темноте. У многих растений цитокинины задерживают старение листьев, как отделенных, так и на интактных растениях. У растений, способных к симбиозу с азотфиксирующими бактериями, цитокинины и системы их рецепции

необходимы для запуска процесса образования симбиотических клубеньков. Также у целого ряда растений цитокинины стимулируют прорастание семян и образование пигментов.

Тема 11 Абсцизовая кислота

- 1 Общая характеристика фитогормона абсцизовая кислота.
- 2 Рецепция и передача сигнала АБК
- 3 Эффекты абсцизовой кислоты

1 Общая характеристика фитогормона абсцизовая кислота.

Абсцизовая кислота (англ. ABA), абсцизин, дормин – это гормон растений (изопреноид).

По химическому строению АБК представляет оптически активный сесквитерпеноид, состоящий из трех остатков изопрена. Активной является S(+)-форма. АБК, подобно гиббереллину, с которым по химической структуре имеет много общего, образуется из мевалоновой кислоты. Существуют два пути биосинтеза абсцизовой кислоты из мевалоновой кислоты. Один, так называемый прямой путь, через фарнезилпирофосфат (ФПФ) и не прямой, или каротиноидный. Во втором случае АБК образуется в результате деградации каротиноидов, при этом из ксантофилла образуется ингибитор ксантоксин, который затем превращается в АБК.

Впервые была обнаружена в экспериментах по поиску вещества по способности вызывать опадение листьев и коробочек хлопчатника. Первые препараты абсцизовой кислоты (АБК) были независимо выделены в 1963 г. из листьев березы Ф. Эддикоттом и сотрудниками (США) и Ф. Уорингом и сотрудниками (Великобритания).

Основное место синтеза АБК – листья и корневой чехлик. Она присутствует в клетке как в свободной форме, так и в виде конъюгатов с глюкозой.

АБК называют гормоном-антагонистом ауксина, цитокининов, гиббереллина, так как она тормозит реакции, которые вызывают эти гормоны.

Биосинтез. По своей химической природе АБК, как и гиббереллины, является терпеноидом; у этих двух групп гормонов-антагонистов есть общий предшественник – геранилгеранил-дифосфат, который также является предшественником хлорофилла. Из ГГДФ синтезируются каротиноиды, их производным является зеаксантин, который является первым предшественником в пути биосинтеза АБК.

Биосинтез АБК в растении происходит в основном в молодых сосудистых пучках, а также в замыкающих клетках устьиц. Основными этапами биосинтеза АБК являются:

Синтез виолоксантина из зеаксантина, который катализируют ферменты зеаксантин-эпоксидазы (ZEP).

Синтез неоксантина из виолоксантина, который катализируют две группы ферментов: неоксантин-синтазы (NSY) и изомеразы, важные для синтеза цис-изомеров виолоксантина и неоксантина.

Синтез ксантоксина из цис-неоксантина, который катализируют 9-цис-эпоксикаротеноид-диоксигеназы (NCED).

Синтез АБК из ксантоксина через АБК-альдегид, две последовательные стадии которого катализируются ксангоксин-дегидрогеназой (АВА2) и АБК-альдегидоксидазой (ААОЗ).

Первые три этапа биосинтеза АБК, как и синтез каротиноидов, проходят в пластидах, последний – в цитозоле.

Инактивация и катаболизм. Существует два типа реакций, приводящих к инактивации АБК, – гидроксилирование и синтез конъюгатов.

С-7, С-8 и С-9-гидроксилированные формы АБК обладают слабой биологической активностью, кроме того, гидроксилирование по С-8 является первым шагом в образовании конъюгатов АБК с глюкозой.

АБК и её С-8-гидроксилированная форма являются мишенью для образования конъюгатов с глюкозой, наиболее распространенным среди которых является АБК-глюкозильный эфир. Как правило, конъюгаты АБК физиологически неактивны и накапливаются в вакуолях при старении. В то же время АБК-глюкозильный эфир играет роль в дальнем транспорте АБК, которая проходит по флоэме и ксилеме.

Место и время образования. Образуется в период предуборочного подсушивания растений при уплотнении почвы. Образуется в зеленых фруктах и семенах перед началом зимнего периода. Может быстро транспортироваться из корней в листья по сосудам ксилемы. Синтезируется в ответ на стрессовое воздействие факторов окружающей среды. Синтезируется во всех органах растений – корнях, цветках, листьях, стебле.

Основными органами синтеза АБК являются листья. АБК накапливается преимущественно в хлоропластах, и, в меньших количествах, в цитозоле и в вакуолях. Транспорт АБК осуществляется в восходящем и в нисходящем направлении, как по флоэме, так и по ксилеме. АБК содержится в различных органах растений, особенно в состоянии глубокого покоя. Она обнаружена в почках, сухих семенах, в клубнях картофеля. Показано, что содержание АБК резко повышается при недостатке азота и, особенно при водном дефиците. Так, имеются данные, что при завядании содержание АБК в листьях винограда возрастает в 40 раз. Под влиянием полива содержание АБК падает. Не только водный стресс, но и другие неблагоприятные воздействия повышают содержание АБК. При этом важно отметить высокую скорость в изменении содержания АБК в зависимости от условий. В этой связи АБК называют гормоном стресса. Содержание АБК повышается в почках при переходе растений в состояние покоя и уменьшается с началом ростовых процессов. Находящиеся в покое семена тоже характеризуются повышенным содержанием АБК.

Транспорт абсцизовой кислоты на дальние расстояния происходит по ксилеме и флоэме, на ближние – по апопласту (клеточным оболочкам и

межклетникам) и симпласту (протопластам клеток, сообщающимся между собой при помощи плазмодесм).

Абсцизовая кислота обладает многообразным физиологическим действием, хотя получены «увядающие» мутанты растений, которые её не образуют или не чувствительны к ней.

Абсцизовая кислота особенно значима для поддержания водного баланса в условиях засухи. Недостаток влаги ведёт к резкой активации синтеза этого фитогормона и его выходу из мест депонирования во внутри- и внеклеточное пространство. В устьичных клетках она вызывает быстрый выход калия, что ведёт к падению тургора этих клеток и закрытию устьичной щели, при этом ею одновременно активируется всасывание воды корнями.

Абсцизовая кислота во многих физиологических процессах является антагонистом ауксина, гиббереллина или цитокинина.

Она препятствует преждевременному прорастанию семян при их созревании и усиливает состояние покоя зрелых семян, спящих почек, клубней и корнеплодов, затормаживает стимулируемый ауксинами рост coleoptилей. Вместе с этиленом абсцизовая кислота усиливает процессы старения и опадения, особенно увядших цветков и плодов.

На биохимическом уровне различают быстрые и медленные эффекты этого фитогормона. Быстрые эффекты происходят за считанные минуты на уровне плазматической мембраны (устьичных клеток) и связаны асимметричным транспортом ионов калия, кальция и анионов через мембрану, в результате чего замедляется поступление воды в устьичные клетки и их тургор падает. Медленные же эффекты связаны с изменением активности (активацией или репрессией) определенного набора компетентных генов, характерного для данной ткани. Её открытие стимулировало работы по созданию новых форм устойчивых к засухе растений, а также синтезу эффективных химических регуляторов транспирации растений.

Известно, что в контроле синтеза и количественного уровня агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) принимает участие АБК. Показано, что, помимо АБК, в регуляции содержания этого белка в корнях проростков пшеницы принимают участие 2,4-эпибрассинолид (ЭБ), гибберелловая кислота (ГК) и ИУК. Это позволило предположить возможное участие данных фитогормонов и в индукции экспрессии гена лектина пшеницы. Анализ транскрипционной активности гена АЗП показал, что все указанные фитогормоны вызвали активацию синтеза лектиновых м-РНК, хотя скорость этого процесса заметно различалась. Так, выдерживание проростков на растворах АБК, ЭБ и ГК приводило к сравнительно быстрому (в течение 2-3 ч) увеличению транскрипции гена АЗП. При этом ЭБ и ГК не изменяли эндогенный уровень АБК в корнях проростков пшеницы, что дает основание к предположению о непосредственном участии этих фитогормонов в регуляции синтеза лектина пшеницы.

Несколько иная картина наблюдалась при инкубировании растений пшеницы на ИУК: индукция экспрессии гена АЗП происходила гораздо медленнее (лишь к 16 часам). При этом ИУК вызывала повышение уровня АБК,

которое предшествовало по времени активации синтеза лектиновых мРНК, что может свидетельствовать об опосредованном через АБК участии ИУК в регуляции экспрессии гена АЗП.

Абсцизовая кислота появляется в клетке в ответ на изменение состояния воды, вызванный тремя факторами: подсушиванием, повышением концентрации веществ в клетке, охлаждением. В этих случаях вода для клетки менее доступна, т. е. наблюдается водный дефицит.

АБК усиливает синтез полиаминов (спермидина, путресцина), которые в комплексах с ДНК и РНК более устойчивы и к изменению ионной силы, и к обезвоживанию. Синтез новых ДНК и РНК под действием АБК прекращается, клетка переходит в состояние покоя.

При холодовом стрессе главная задача клетки – не допустить кристаллизации воды, так как кристаллы льда нарушают структуру мембран. Опасен также эффект «вымораживания»: растворенные в воде вещества не включаются в кристаллы льда и в незамерзшем растворе их концентрация повышается, т.е. увеличивается ионная сила. При охлаждении АБК останавливает синтез белков, ДНК и РНК, накапливаются полиамины, оксипролин, сахара и осмотин.

Осмотически активные вещества препятствуют кристаллизации воды: вода становится аморфной и не повреждает мембраны. От АБК зависит биосинтез антоцианов, т.е. при понижении температуры растения становятся красными или фиолетовыми, но физиологический смысл этой реакции пока не ясен. Мутанты по синтезу АБК (не синтезируется АБК) гибнут при легкой засухе и слабых заморозках. Хотя все защитные механизмы имеются, они не включаются без абсцизовой кислоты. Если перед стрессом такие мутанты обработать АБК, их устойчивость повышается.

2 Рецепция и передача сигнала АБК

Первым этапом в регуляции экспрессии генов при водном дефиците является рецепция сигнала. Воспринятый клеткой сигнал приводит к включению систем сигнальной трансдукции и активированию белков, образующих цепь передачи сигнала. Имеются данные, свидетельствующие о том, что у растений рецепция сигнала при водном стрессе осуществляется аналогично тому, как это происходит у *E. coli* и дрожжей. У этих организмов восприятие изменений осмотического давления наружной среды совершается с помощью сенсорной системы, состоящей из локализованного в мембране осмосенсора (сенсорной киназы) и находящегося в цитоплазме регулятора ответа.

Система состоит из локализованного в мембране осмосенсора и находящегося в цитозоле регулятора ответа. Сигнал возникает при изменении натяжения плазмалеммы в ответ на изменение осмотического давления наружной среды. При получении сигнала осмосенсор, подвергаясь автофосфорилированию, активируется. С гистидинового остатка молекулы осмосенсора фосфатная группа затем переносится на остаток аспарагиновой кислоты регулятора ответа. Фосфорилированная молекула регулятора ответа приводит к включению MAP-киназного пути передачи сигнала

Эта система воспринимает изменения в натяжении ПМ при водном дефиците. В ПМ дрожжей осмосенсор, трансмембранный белок Slu 1 p, при высокой осмолярности среды активируется путем автофосфорилирования, приводя затем к последовательному фосфорилированию белков цитоплазмы Ypd 1 и Ssk 1 p, которые образуют регулятор ответа.

МАР-киназный каскад. У дрожжей фосфорилированный белок Ssklp активирует различные пути передачи сигнала, в частности МАР(mitogen activated protein)-киназный каскад, состоящий из трех последовательно фосфорилируемых в присутствии АТФ протеинкиназ: Ssk 2 p (МАРККК) – МАРКК-киназы, Pbs 2 p (МАРКК) – МАРК-киназы и Hog 1 p (МАРК) – МАР-киназы.

Активированная фосфорилированием МАР-киназа индуцирует экспрессию многих генов дрожжевой клетки при водном и солевом стрессах, в частности генов, кодирующих ферменты биосинтеза глицерина – главного осмолита у дрожжей. Гомологи некоторых компонентов МАР-киназного каскада дрожжевых клеток обнаружены у растений. Экспрессия генов этих компонентов индуцируется стрессовыми условиями. В частности, у *A. thaliana* ген МАР-киназы (АТМРКЗ) и ген МАРККК (АТМЕКК1) индуцируются засухой, низкими температурами и высокими концентрациями соли.

Фосфорилированные белки регулятора ответа (РО) активируют МАР-киназный каскад, состоящий из МАРККК (МАРКК-киназы), МАРКК (МАРК-киназы) и МАРК (МАР-киназы). Последняя осуществляет прямую регуляцию транскрипционных факторов (ТФ), вовлеченных в индукцию стрессовых белков при водном дефиците.

Вторичные мессенджеры. В регуляции тургорного давления растительной клетки участвуют вторичные мессенджеры. Локализованный в мембране фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат расщепляется активируемой при осмотическом стрессе фосфолипазой С, освобождая вторичный мессенджер инозитол-1,4,5-трифосфат. Последний индуцирует выход Ca^{2+} , другого вторичного мессенджера, из вакуоли и эндоплазматического ретикулума в цитозоль и соответственно концентрация Ca^{2+} в нем возрастает. Концентрация Ca^{2+} в цитозоле может увеличиваться также за счет его поступления в клетку через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы при индуцируемой стрессором деполяризации этой мембраны. Возросшие концентрации Ca^{2+} активируют Ca^{2+} /кальмодулинзависимые протеинкиназы (CDPK), что в свою очередь стимулирует биосинтез стрессовых белков.

АБК-зависимые и АБК-независимые гены. Важную роль в регуляции экспрессии генов при осмотическом стрессе играет гормон АБК. Экспрессия многих генов в условиях засухи, засоления или низких температур требует предварительного накопления в тканях эндогенной АБК, тогда как экспрессия других генов происходит без участия АБК. На основании этого и анализа действия АБК на экспрессию индуцируемых водным дефицитом генов в АБК-дефицитном (aba) и АБК-нечувствительном (abi) мутантах *A. thaliana* был сделан вывод, что существуют АБК-зависимые и АБК-независимые пути передачи сигнала в ответной реакции растений на водный дефицит.

Промоторная область АБК-независимых генов содержит специфическую последовательность нуклеотидов DRE, которая связывается с транскрипционными факторами, белками DREBP и AP2. Промоторная область АБК-зависимых генов содержат нуклеотидную последовательность ABRE, которая связывается с транскрипционным фактором – белком EmBP. Помимо ABRE промоторная область АБК-зависимых генов включает сопрягающий элемент CE1, взаимодействующий с белком CEBP

Несколько транскрипционных факторов и специфических нуклеотидных последовательностей в генах идентифицированы для обоих путей. АБК-индуцируемые гены содержат в промоторной области специфическую последовательность нуклеотидов, получившую сокращенное название ABRE (ABA-responsive element). ABRE функционирует как цис-элемент ДНК, вовлеченный в АБК-регулируемую экспрессию генов. Такого рода элемент был сначала идентифицирован в Em-гене пшеницы (*Triticum aestivum*), а затем обнаружен в АБК-индуцируемых генах кукурузы (*Zea mays*), ячменя, риса, табака и арабидопсиса. Для индукции экспрессии генов необходимо, чтобы ABRE связался с белком EmBP1. В большинстве случаев ABRE достаточен для АБК-регулируемой экспрессии генов, но в некоторых генах ABRE ассоциирован с еще одной нуклеотидной последовательностью, которая называется сопрягающим элементом (CE). Например, в гене HVA22 ячменя сопрягающий элемент CE1 требуется для экспрессии наряду с ABRE. Для экспрессии таких генов требуется еще один ДНК-связывающий белок, специфичный к CE, – CEBP (coupling element binding protein). ABRE, CE и оба белка EmBP1 и CEBP образуют комплекс, индуцирующий экспрессию АБК-зависимого гена. Однако до настоящего времени не ясно, как АБК активирует EmBP1, вызывая его последующее взаимодействие с ABRE и инициацию транскрипции. В ряде генов, регулируемых с участием АБК, обнаружены другие цис-элементы, отличающиеся от ABRE. Индукция таких генов происходит при специфическом связывании этими элементами транскрипционных факторов MYC и MYB.

Промоторная область АБК-независимых генов содержит последовательность нуклеотидов DRE (drought-responsive element). DRE вовлечен в регуляцию генов, индуцируемых непосредственно водным дефицитом и не требующих АБК для экспрессии. Транскрипционные факторы для таких генов – DRE-связывающие белки DREBP и AP2 – обнаружены в ядерном экстракте из *A. thaliana*.

3 Эффекты абсцизовой кислоты.

АБК и геотропизм в корнях. Если рассмотреть растение, которое расположено горизонтально, то понятно, что его корни растут вниз под действием силы тяжести. Ранее считалось, что на это оказывает влияние перераспределение индолил-3-уксусной кислоты в корне. Однако позднее в опытах было показано, что в механизме геотропизма корнями играет важную роль АБК: она синтезируется в корневом чехлике, перемещается по сосудистым тканям в направлении нарастания (базипетально). Но, если корень расположить

горизонтально, то абсцизовая кислота под действием силы тяжести транспортируется в нижнюю часть, где она подавляет рост. Искривление корня вниз происходит потому, что не подавляется рост верхней части корня.

Абсцизовая кислота в организме животных и человека

Любопытно, что абсцизовая кислота выполняет функции химического сигнала не только в организме растений. Оказалось, что распространена она по всему живому миру. Помимо фитопатогенных грибов (которым она, в принципе, может быть нужна, чтобы «обмануть» клетку растения) и бактерий, абсцизовая кислота синтезируется животными – от морских губок до человека. Вначале обратим взгляд на «низших» животных – губок.

У губок абсцизовая кислота участвует в реакции на температурный стресс, аналогично реакции растений на засуху, с вовлечением аналогичных биохимических механизмов. В частности, одним из посредников действия гормона в клетке губки является фермент АДФ-рибозилциклаза (абсцизовая кислота стимулирует повышение его активности), как и в растительной клетке.

Это наводит на мысль о потрясающей консервативности функций абсцизовой кислоты во всем живом мире. А если забраться по эволюционной лестнице «повыше»? Что насчет млекопитающих и человека?

У них абсцизовая кислота вовлечена в два более конкретных процесса: регуляцию иммунного ответа и контроль уровня глюкозы в крови. Она выделяется из человеческих гранулоцитов (особой фракции лейкоцитов) при стимуляции каким-либо обычным и привычным для них раздражителем, который они принимают за вредного микроба (зимозаном или искусственными частицами). И стимулирует активность клеток этого же типа: хемотаксис (подползание к объекту), фагоцитоз (его заглатывание) и продукцию активных форм кислорода (которые убивают бактерии). Этим абсцизовая кислота похожа на вещества, участвующие в сигнализации между иммунными клетками – цитокины.

Что касается обмена глюкозы, то здесь абсцизовая кислота стимулирует выделение инсулина β -клетками поджелудочной железы, что должно приводить к снижению уровня глюкозы в крови. Биохимический механизм проведения сигнала абсцизовой кислоты в клетку здесь такой же, как и в случае с лейкоцитами.

Этот механизм в человеческих лейкоцитах изучен детально и показан на рисунке. Выделенный оранжевым белок на поверхности клетки с названием LANCL2 – это, как предполагают ученые, рецептор абсцизовой кислоты в организме животных и человека: связывание с ним абсцизовой кислоты и запускает все вышеперечисленные эффекты.

Сигнальные пути внутри человеческой клетки, активируемые абсцизовой кислотой (ABA). В сетке взаимодействий внутри клетки (в нижней части рисунка) внимание привлекают соединения, обозначенные зелеными стрелками. Это циклический аденозинмонофосфат (сAMP), инозитолтрифосфат (IP₃) и кальций (Ca²⁺). Это общие для многих процессов и многих веществ внутриклеточные посредники, они являются ключевыми и в случае абсцизовой кислоты. В правой части буквами cADPR обозначен продукт уже

обсуждавшегося фермента АДФ-рибозилциклазы, которая при действии абсцизовой кислоты активируется и у животных, и у растений.

Тема 12 Этилен – фитогормон!

- 1 Образование этилена тканями.
- 2 Передвижение этилена по растению.
- 3 Физиологические функции этилена.
- 4 Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала.

1 Образование этилена тканями.

Все фитогормоны делятся на стимуляторы и ингибиторы. Ингибиторы (от лат. «Inhibeo» – останавливаю, сдерживаю) в биологии, природные и синтетические вещества, угнетающие активность ферментов (как в организме, так и в бесклеточных системах); различаются по характеру действия, специфичности и др. свойствам. К ингибиторам роста относится этилен. Ряд соединений оказывает на растение сходное влияние, но уступают ему в эффективности. Этилен единственный газообразный регулятор роста растений.

Газ этилен (C_2H_4) справедливо относят к гормонам растений, так как он синтезируется в растениях и в крайне низких концентрациях регулирует их рост, активирует созревание плодов, вызывает старение листьев и цветков, опадение листьев и плодов, участвует в ответе растений на различные стрессовые факторы и в регуляции многих других важных событий в жизни растения. Этилен, точнее, этиленпродуценты – соединения, разрушение которых сопровождается выделением этилена, имеют широкое применение в практике сельского хозяйства.

В последние годы большие успехи достигнуты в получении и изучении мутантных растений, нечувствительных к этилену. Эти мутанты обеспечили прогресс в выделении генов, отвечающих за восприятие и передачу этиленового сигнала в растениях, и помогли частично расшифровать молекулярные пути, по которым сигнал проходит, вызывая включение или подавление определенных физиологических программ.

Этилен впервые был получен немецким химиком Иоганном Бехером в 1680 году при действии купоросного масла на винный спирт. Вначале его отождествляли с «горючим воздухом», т. е. с водородом. Позднее, в 1795 году этилен подобным же образом получили голландские химики Дейман, Потс-ван-Трусвик, Бонд и Лауеренбург и описали под названием «маслородного газа», так как обнаружили способность этилена присоединять хлор с образованием маслянистой жидкости – хлористого этилена («масло голландских химиков»).

Изучение свойств этилена, его производных и гомологов началось с середины XIX века. Начало практического использования этих соединений положили классические исследования А.М. Бутлерова и его учеников в области непредельных соединений и особенно создания Бутлеровым теории

химического строения. В 1860 году он получил этилен действием меди на йодистый метилен, установив структуру этилена.

В 1901 году Дмитрий Николаевич Нелюбов выращивал горох в лаборатории, в Санкт-Петербурге, но семена давали искривленные, укороченные проростки, у которых верхушка была согнута крючком и не сгибалась. В теплице и на свежем воздухе проростки были ровные, рослые, и верхушка на свету быстро распрямляла крючок. Нелюбов предложил, что фактор, вызывающий физиологический эффект, находится в воздухе лаборатории.

В то время помещения освещали газом. В уличных фонарях горел тот же газ, и давно было замечено, что при аварии в газопроводе стоящие рядом с местом утечки газа деревья преждевременно желтеют и сбрасывают листья.

Осветительный газ содержал разнообразные органические вещества. Чтобы удалить примесь газа, Нелюбов пропускал его через разогретую трубку с оксидом меди. В «очищенном» воздухе проростки гороха развивались нормально. Для того чтобы выяснить, какое именно вещество вызывает ответ проростков, Нелюбов добавлял различные компоненты светильного газа по очереди, и обнаружил, что добавка этилена вызывает:

- 1) замедление роста в длину и утолщение проростка,
- 2) «не разгибающуюся» апикальную петельку,
- 3) Изменение ориентации проростка в пространстве.

Эта физиологическая реакция проростков была названа тройным ответом на этилен. Горох оказался настолько чувствительным к этилену, что его стали использовать в биотестах для определения низких концентрациях этого газа. Вскоре было обнаружено, что этилен вызывает и другие эффекты: листопад, созревание плодов и т.д. Оказалось, что этилен способны синтезировать сами растения, т.е. этилен является фитогормоном.

Свойства этилена

Этилен представляет собой бесцветный газ, обладающий слабым, едва ощутимым запахом. Он плохо растворим в воде (при 00 в 100г воды растворяется 25,6 мл этилена), горит светящимся пламенем, образует с воздухом взрывчатые смеси. Термически менее устойчив, чем метан. Уже при температуре выше 350 0 этилен частично разлагается на метан и ацетилен. При температуре около 12000 диссоциирует главным образом на ацетиле и водород.

В природных газах (за исключением вулканических) этилен не встречается. Он образуется главным образом при пирогенетическом разложении природных соединений, содержащих органические вещества.

Этилен синтезируется в бактериях, грибах, низших и высших растениях, причем в больших количествах. Далеко не все организмы способны к синтезу этилена. Так, из исследованных 228 видов микроскопических грибов лишь 25% выделяют этилен. Организмы контролируют скорость синтеза этилена. Тем самым регулируется его концентрация, кроме того избыток этилена может свободно диффундировать в окружающую среду. Скорость образования этилена различна у разных органов и систем. Образование этилена возрастает при старении и опадении листьев и плодов. Оно тормозится недостатком

кислорода (у всех сельскохозяйственных растений, кроме риса) и может регулироваться температурой и светом. Влияет на синтез этилена и уровень CO_2 . Причем у разных растений углекислый газ может, как стимулировать, так и угнетать образование этилена.

Биосинтез этилена

Ключевым соединением для биосинтеза этилена в растениях является аминокислота метионин. При взаимодействии метионина с макроэргическим соединением АТФ возникает промежуточный продукт S-аденозилметионин, который далее превращается в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) – непосредственный предшественник этилена в растениях. Затем АЦК в присутствии кислорода разлагается с образованием этилена, аммиака, муравьиной кислоты и CO_2 . Каждый этап катализируется определенным ферментом. Ключевым ферментом, на уровне которого регулируется биосинтез этилена, является АЦК-синтаза. АЦК-синтаза не синтезируется в клетках постоянно, а индуцируется индукторами – веществами, вызывающими ее синтез. Такие ферменты принято называть индуцибельными. Синтез АЦК-синтазы индуцируют высокие концентрации ауксина, молекулы – химические сигналы грибной инфекции, а также сам этилен. Синтез АЦК-синтазы идет до тех пор, пока присутствует индуктор. Затем синтез прекращается, а образованные молекулы фермента быстро разрушаются, так как период их полураспада составляет 20–30 мин. Это подчеркивает, как жестко растение контролирует синтез этилена на уровне образования и разрушения ключевого фермента биосинтеза АЦК-синтазы.

Существенно, что в геноме растений существует большое семейство генов АЦК-синтазы, которые различаются по своей регуляции: одни включаются на разных стадиях нормального развития растений, другие – при поранении, третьи – при действии патогена и т.д. Это обеспечивает многофакторную систему регуляции синтеза этилена в растениях. Гены АЦК-синтазы и АЦК-оксидазы привлекают большое внимание генных инженеров, так как модификация растений по этим генам позволяет регулировать синтез этилена и, следовательно, регулировать скорость созревания плодов. На этом пути американские генные инженеры получили трансгенные растения томатов с увеличенным на месяц сроком хранения плодов.

Следующий этап биосинтеза этилена сводится к окислению АЦК. Он кислородозависим и не протекает в условиях кислородного голодания (анаэробноза). Такая ситуация возникает в корнях при затоплении почвы. Без кислорода подавляются дыхание корня, синтез АТФ и зависящие от нее процессы. Нарушается снабжение побегов водой, элементами минерального питания, гормонами (цитокининами) и другими продуктами жизнедеятельности корня. Все это грозит гибелью растений. И тут включается этиленовая система защиты. В условиях анаэробноза превращение в корнях АЦК в этилен прекращается. АЦК поступает в составе пасоки – раствора, поступающего из корней в побеги, в надземные органы, где нет недостатка O_2 , и превращается там в этилен. Этилен индуцирует в побегах эпинастию – изменение угла наклона черешка к стеблю, в результате которого листья опускаются вниз,

уходят от прямого действия солнечных лучей. При этом листья меньше нагреваются и меньше испаряют воды. Этилен индуцирует образование на стеблях корней, которые не выполняют поглощающей функции, но осуществляют специфические синтетические процессы, необходимые для нормального функционирования побега, в том числе восстанавливают снабжение надземных органов цитокининами. Кроме того, этилен индуцирует образование в стебле аэренхимы – ткани, по которой O_2 попадает из стеблей в корни и обеспечивает их нормальную жизнедеятельность. Этот пример хорошо иллюстрирует, как этилен обеспечивает адаптацию растений к условиям кислородной недостаточности в зоне корней, возникающей при затоплении почвы.

При нормальном протекании жизни растений этилен активно синтезируется в созревающих плодах и стареющих листьях. Это понятно: он индуцирует созревание плодов, старение и опадение листьев. Однако высокий уровень синтеза этилена характерен также для меристематических тканей – зон клеточного деления. Это пока трудно объяснить. Синтез этилена в растениях вызывают высокие концентрации ауксина, что происходит на уровне индукции генов АЦК–синтазы. Синтезированный этилен подавляет реакции, вызываемые ауксином. Например, в определенном диапазоне концентраций ауксин активирует рост корня. Их превышение индуцирует синтез этилена, который подавляет рост корня. Таким образом, этилен включается в контроль растением действия ауксина по принципу обратной связи. Этилен выполняет такую же роль и в реакциях растений на высокие концентрации цитокининов (Bleecker, 1996).

2 Передвижение этилена по растению.

Транспорт фитогормонов является важным звеном цепи передачи гормонального сигнала. Он обеспечивает перераспределение концентрации фитогормона, а также возможность его действия на значительном удалении от места синтеза. Этилен является единственным газообразным гормоном растений, поэтому его транспорт не требует специализированных механизмов – газ свободно диффундирует из клетки в клетку. Кроме того, выделяясь из растения в окружающую среду, этилен может обеспечивать передачу сигналов между растениями.

С другой стороны, дистанционное действие этилена может быть достигнуто благодаря транспорту его предшественника, АЦК, который можно рассматривать как неактивную транспортную форму этилена. Транспорт АЦК осуществляется, как правило, по сосудистым тканям. Ярким примером является эпинастия листьев при гипоксии корней у томата. Синтезируемый в ответ на неблагоприятное воздействие АЦК не окисляется в корне в условиях дефицита кислорода, а по ксилеме транспортируется к листьям, где окисляется с образованием этилена. Помимо транспорта по ксилеме показана возможность транспорта АЦК по флоэме.

3 Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала.

В месте своего действия этилен воспринимается компетентными клетками и активирует цепочку посредников, которые передают гормональный сигнал и запускают реакцию ответа на гормон. Модель восприятия и передачи сигнала этилена представляет собой линейный сигнальный путь и включает в качестве последовательных звеньев: (1) рецепторные гистидин-киназы, (2) серин-треониновую протеинкиназу CTR1, (3) мембранный белок EIN2 и (4) транскрипционные факторы семейств EIN3/EIL и AP2/ERF.

Рецепторы этилена. Связывание лиганда. Восприятие этилена начинается с его связывания с рецепторами, которые локализованы в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) и аппарата Гольджи (АГ). Необычная внутриклеточная локализация рецепторов не препятствует восприятию гормона, поскольку газообразный этилен свободно диффундирует в водной и липидной среде. В структуре этиленовых рецепторов выделяют три основных блока. Консервативный N-терминальный трансмембранный домен рецепторов содержит этилен-связывающий активный сайт. С-терминальные гистидин-киназный и акцепторный домены сходны по структуре с бактериальными двухкомпонентными регуляторами, и так же, как и последние, способны к аутофосфорилированию. Между N- и С-терминальными структурами расположен GAF домен, регулирующий гетеромерные взаимодействия рецепторов.

Рецепторы этилена контролируют этиленовый ответ по принципу негативной регуляции: в отсутствие этилена рецептор находится в активном состоянии, подавляя развитие ответа, тогда как связывание этилена инактивирует рецептор, разрешая ответ.

В силу негативной регуляции рецепторами ответа на этилен в результате деградации рецепторов происходит пролонгирование действия этилена. Для устранения избыточного количества фитогормона не существует специальных систем инактивации, газ выводится в окружающее пространство путем диффузии.

4 Физиологические функции этилена.

Этилен выполняет в жизненном цикле растений многообразные функции, среди которых контроль развития проростка, созревание плодов (в частности, фруктов), распускание бутонов (процесс цветения), старение и опадание листьев и цветков. Этилен называют также гормоном стресса, так как он участвует в реакции растений на биотический и абиотический стресс, и синтез его в органах растений усиливается в ответ на разного рода повреждения. Кроме того, являясь летучим газообразным веществом, этилен осуществляет быструю коммуникацию между разными органами растений и между растениями в популяции, что важно, в частности, при развитии стресс-устойчивости.

Этилен как гормон механического стресса

Выделение этилена тесно связано с механическим воздействием на клетки растений. Возьмем пример ответа проростка гороха, который наблюдал Нелюбов. Пока росток не достигнет поверхности, нужно защищать нежные

клетки верхушечной меристемы от повреждения. Поэтому происходит изгиб и образование апикальной петельки. Сквозь почву растет не меристема, а более прочный нижележащий участок.

Когда на пути проростка появляется механическое препятствие (камень), проросток выделяет больше этилена, рост в длину приостанавливается и начинается утолщение. Проросток стремится преодолеть препятствие, усилив давление. Если это удалось, концентрация этилена падает, и рост в длину восстанавливается. Но если препятствие слишком крупное, то продукция этилена еще больше усиливается. Проросток отклоняется от вертикали и погибает камешек.

В воздушной среде концентрация этилена падает, проростки разгибают апикальную меристему, и начинается развитие листьев.

Этилен и прикосновение

Вплоть до 1991 года у физиологов растений были достаточно отрывочные представления о том, как именно растения чувствуют прикосновение. Методом вычитания с–ДНК–библиотек было установлено, что опрыскивание растений *Arabidopsis thaliana* водой вызывает синтез новых матричных РНК – через 10–15 минут их уровень поднимался в сотни раз.

Опрыскивание является комплексным фактором: изменяется влажность воздуха, создается тень от водяных паров, и, наконец, листья подвергаются механической нагрузке. Каждый из факторов был исследован по отдельности. Выяснилось, что влажность не играет никакой роли, но если растение потереть стеклянной палочкой, оно почувствует это и через 10–15 минут ответит экспрессией новых м–РНК. Обнаруженные гены были обозначены как ТСН1, ТСН2, ТСН3, ТСН4, ТСН5 (от английского touch – прикосновение).

Если, не прикасаясь к растению внезапно накрыть его черным колпаком, то в нем также повышается уровень ТСН–матриц. Создание достаточно мощных звуковых эффектов не привело к желаемому результату: матричные РНК ТСН в составе клеток не появились.

За что же отвечают гены, продукты которых появляются в клетках при прикосновении? Они оказались очень похожи на известные кальций–связывающие белки – кальмодулины. Эти белки вместе с Ca^{2+} активизируют работу цитоскелета и способствуют переходу из золя в гель многих структур в растительной клетке. Растения, которые часто беспокоили стеклянной палочкой, заметно отстают в росте, от тех к которым не прикасались, однако оказываются механически более прочными, закаленными.

Белковый продукт гена ТСН 4 оказался ксилоглюкан–эндотрансгликозилазой. Синтез этого белка можно вызвать также brassinosterоидами. Те же эффекты можно вызвать добавлением этилена. При этом также происходит синтез Са–связывающих ТСН–белков.

Этилен и заживление ран. Многие растения образуют млечники, которые содержат латекс (натуральный каучук). Однако каучук не "застывает" внутри млечников (как и не сворачивается кровь в сосудах). Но стоит растение повредить, на поверхность выступает латекс, который быстро твердеет и закупоривает место повреждения. Латекс склеивает споры грибов и бактерий,

застывает в ротовом аппарате насекомых или приклеивает их к капельке выступившего каучука.

О том, что заставляет латекс быстро твердеть при повреждении растения, долгое время ничего не знали бы, если бы не запросы сельского хозяйства. На плантациях гевеи затверждение латекса – вредный процесс: приходится заново делать насечки на стволах деревьев, подставлять сосуды для сбора каучука в новые места, что создает массу лишней работы.

Оказалось, что латекс застывает под действием этилена. Важную роль при этом играет минорный белок латекса – гевеин. С застыванием латекса можно до некоторой степени бороться, обрабатывая растения ингибиторами синтеза этилена. Наиболее известный ингибитор – ионы серебра, но есть и более дешевые. Таким образом, у растений–каучуконосов этилен способствует заживлению механических повреждений.

Кроме того, под действием этилена активизируется особая ткань раневая перидерма. Образуется пробковый камбий, который образует слой суберинизированной пробки, отделяющей здоровую (живую) ткань от больной (мертвой). Пробка высоко гидрофобная, что позволяет эффективно пресечь распространение грибов и бактерий, попавших в рану, предохраняет здоровую ткань от чрезмерного испарения.

Размеры и место образования раневой перидермы отличаются у разных растений. Так медуница образует раневую перидерму в нескольких миллиметрах от зоны повреждения (например, грибами). Участок листа, окруженный раневой перидермой, выпадает.

У фасоли активизируется раневая перидерма в основании листовой пластинки, и растение жертвует поврежденной частью сложного листа во имя безопасности целого растения.

Казалось бы, раневая перидерма может быть полезна лишь при нападении бактерий и грибов. Однако и при нападении насекомых и клещей она играет немаловажную роль. Под действием этилена происходит локальный "листопад" – поврежденный лист опадает на землю вместе с вредителем. Шансов вновь добраться до кроны у вредителей меньше. Защитный "листопад" наблюдается, например, у роз при нападении паутинного клеща.

Регуляция листопада в умеренных широтах

Этилен регулирует явление листопада. Эта реакция настолько впечатлила физиологов растений, что этилен иногда считают гормоном старения растений. Явление листопада – это не просто старение. Так, в тропиках отдельные листья живут 3–4 года (часто больше). Сокращение сроков жизни листа связано с защитной реакцией на механический стресс.

При опадании листьев образуется много открытых ранок в местах прикрепления. Чтобы лист отделился без вреда для целого растения, в его основании формируется отделительный слой. Его работа практически идентична работе раневой перидермы. Место будущего повреждения закрывается пробкой, вышележащая ткань разрыхляется и становится непрочной, лист опадает. Что бы разрыхлить клеточную стенку, в нее выделяются пектиназы. При расщеплении пектина высвобождаются

физиологически активные вещества – олигосахарины, которые стимулируют дальнейшее размягчение клеточных стенок.

Листья, которые готовятся к листопаду, передают соединения азота и углеводы другим частям растения. Хлорофилл разрушается, и лист желтеет. В тканях накапливаются вредные вещества, которые будут удалены из растения листопадом.

Таким образом, явления листопада и защиты от повреждений тесно связаны. В случае листопада в умеренных широтах мы видим опережающую физиологическую реакцию. Зимой листья повреждаются морозом, на них падает снег, вызывая усиление механической нагрузки на ветки. Растение как бы "предусматривает" будущий механический стресс и заранее освобождается от листьев. Поэтому, не удивительно, что все процессы, связанные с потерей листьев в районах с холодной и снежной зимой, находятся под контролем этилена.

Формирование и созревание плодов

Начало жизни плода лежит еще в цветке, точнее в завязи. На поверхности рыльца попадают пыльцевые зерна, они начинают прорастать и механически давят на проводниковую ткань столбика, чтобы достичь семязачатков, спрятанных в глубине пестика. Естественно, что при прорастании пыльцы ткани столбика начинают выделять этилен.

Разные части цветка по-разному отвечают на сигнал этилена. Так, все органы, привлекавшие насекомых-опылителей, либо отмирают, либо меняют окраску. В считанные часы после опыления лепестки и пестик теряют тургор и увядают. У листочков околоцветника лилии в основании активизируется отделительный слой, и они опадают (сравните с явлением листопада). У медуницы меняется рН (кислотность) вакуолярного сока и цветки из розовых превращаются в синие. У белокрыльника (*Calla palustris*) этилен вызывает изменение цвета покрывала соцветия с белого на зеленый. В дальнейшем растение использует покрывало как дополнительный источник фотоассимилятов для развивающихся плодов. Заметим, что в одних случаях этилен вызывает разрушение хлорофилла, пожелтение и опадание листьев, тогда как в других, способствует усилению фотосинтеза.

Тычинки при действии этилена увядают, а завязи начинают активно расти, привлекая новые питательные вещества.

Особенно важен этилен на последнем этапе созревания сочных плодов. Здесь "играют" практически все рассмотренные эффекты. Плод останавливается в росте (как и проросток, наткнувшийся на препятствие), клетки плода начинают выделять в апопласт пектиназы – плоды становятся мягкими. Кроме того, образуются физиологически активные фрагменты пектина – олигосахарины. В ножках плодов активизируется отделительный слой и образуется раневая перидерма (как при листопаде), меняется рН – плоды становятся менее кислыми, а также меняется их окраска с зеленой на более желтую или красную (как у лепестков некоторых растений).

Заметим, что раньше других созревают и опадают поврежденные плоды. Механический стресс вызывают птицы, личинки насекомых или

фитопатогенные грибы. Как в случае листьев, растение стремится отбросить некачественный плод, чтобы остальные плоды оказались по возможности здоровыми.

Созревание плодов под действием этилена – это такая же упреждающая физиологическая реакция, как листопад. Сочные плоды распространяются птицами и млекопитающими, которые повреждают плоды при поедании, и растение заранее продуцирует этилен.

Этилен использовался для стимулирования созревания плодов ещё в Древнем Египте. Древние египтяне намеренно царапали или слегка мяли, отбивали финики, фиги и другие плоды с целью стимулировать их созревание (повреждение тканей стимулирует образование этилена тканями растений). Древние китайцы сжигали деревянные ароматические палочки или ароматические свечи в закрытых помещениях с целью стимулировать созревание персиков (при сгорании свеч или дерева выделяется не только углекислый газ, но и недоокисленные промежуточные продукты горения, в том числе и этилен).

Свойство ускорять созревание плодов было обнаружено у этилена давно, еще в 20-е годы и с тех пор его широко используют. При транспортировке важно, чтобы плоды оставались прочными и зелеными. Для этого их перевозят в проветриваемой таре, оберегая плоды от механических повреждений, вызывающих синтез этилена. Кроме того, биосинтез этилена замедляется при пониженной температуре и при высокой концентрации углекислоты в воздухе. В принципе можно было бы применять и ингибиторы биосинтеза этилена, если бы не их токсичность для человека. Единственное место применения ингибиторов – хранение срезанных цветов. В Голландии цветы ставят не в обычную воду, а в специальный раствор, который помимо минеральных солей, продуктов фотосинтеза и антисептиков содержит ингибиторы синтеза этилена. С помощью таких добавок торговцам удастся сохранять букеты свежими в течении многих дней.

Чтобы этилен не образовывался в плодах, получают мутанты с нарушенным биосинтезом этилена. Уже получены сорта томатов, созданные на основе таких мутантов. Эти томаты можно очень долго хранить и перевозить на далекие расстояния. Незадолго до продажи их обрабатывают этиленом, и плоды быстро созревают. Однако, такая технология заметно снижает вкусовые качества плодов.

Существует поговорка, что одно гнилое яблоко портит, целую бочку. Это действительно так. Гнилое яблоко служит источником этилена, который вызывает размягчение тканей у остальных яблок. Более того, каждый плод начинает вырабатывать свой этилен по мере созревания и в бочке начинается "цепная реакция" производства этилена.

Практическое значение этилена

Этилен находит широкое использование в сельском хозяйстве. Применяют не непосредственно этилен, а так называемые этилен–продуценты, которые разлагаясь образуют этилен. Наиболее распространен среди них этефон – 2–хлорэтилфосоновая кислота.

Этефон применяют для ускорения созревания и облегчения уборки томатов, для их послеуборочного дозревания (дозаривания), что особенно важно в условиях короткого лета. Обработка этефоном облегчает механизированную уборку яблок, вишен, citrusовых, облепихи, винограда. На плантациях каучуконосов этефон усиливает отделение латекса у каучуконосных деревьев гевеи, ускоряет выделение живицы у сосны. Его применяют для борьбы с полеганием посевов ржи и ячменя. Этефон способствует формированию укороченного толстого стебля, не лежащего под тяжестью колоса. Его применяют при выращивании огурцов для консервирования. Этефон подавляет развитие мужских цветков и стимулирует формирование женских цветков с последующим партенокарпическим (без оплодотворения) развитием плодов. Этефон используют для опадения листьев хлопчатника перед машинной уборкой коробочек, применяют для регуляции зацветания ананасов и на многих других культурах.

Для использования в сельском хозяйстве удобны соединения, которые освобождают связанный этилен. Наиболее активен в этом отношении этрел. Этрел не связывается в тканях растений прочно, его можно извлечь отмыванием. Он успешно используется для ускорения созревания плодов, дефолиации (обработка растений для ускорения опадания листьев перед уборкой с целью ее облегчения), ускорения вытекания латекса из каучуконосов, ускорения цветения ряда растений, увеличения количества женских цветков у огурцов, образования клубней у картофеля и т.д.

В северных районах за короткий вегетационный период у многих культур плоды не успевают вызревать до полной зрелости. Народное средство, ускоряющее процесс созревания, – окуривание дымом. Действующее начало в дыме – окись углерода и этилен. Еще в 20-х годах нашего столетия этилен был испытан в качестве вещества, ускоряющего созревание. Его ценность в том, что это естественный фактор созревания, ведь растения сами на стадии созревания плодов продуцируют этилен. Закончившие рост, но еще зеленые плоды, помещали в герметические камеры при температуре 20 – 22° С. В эти камеры периодически подается этилен из расчета 0,2 – 1 литр на 1 м³. Конкретное количество этилена зависит от вида плодов. В этих условиях помидоры созревают за 5 – 6 суток (вместо 10 – 12), лимоны и апельсины – за 4 – 5 суток (вместо 20 – 25). Недостаток этилена – его летучесть.

Используют этрел и для облегчения условий механизированной уборки плодов и ягод. Это свойство этрела основано на способности этилена ускорять образование отделительного слоя в плодоножке. За 5 – 14 дней до уборки обрабатывают деревья этрелом, в результате более чем вдвое уменьшаются усилия, затрачиваемые на вибрацию стволов. К тому же этрел, как уже говорилось, ускоряет созревание и улучшает качество плодов и ягод.

Применяют этрел и для обработки хлопчатника с целью его дефолиации (обезлиствливания), что также существенно облегчает машинный сбор хлопка. Одновременно ускоряется дозревание и раскрытие коробочек. Этот мягкий способ дефолиации применяют и других случаях, когда необходимо избавиться

от листвы: перед укрытием кустов на зиму, для длительной транспортировки саженцев древесных и кустарниковых пород и т.д.

Практическое значение этилена можно рассмотреть на примере выращивания ананасов. Цветение ананасов (как и других растений из семейства бромелиевых) можно вызвать обработкой этиленом. В природе бромелиевые цветут, когда им удастся набрать некоторый "критический" размер. Но в промышленной культуре это свойство не очень полезно: растения цветут и плодоносят не одновременно.

Цветение ананасов можно регулировать. В оранжереях Санкт-Петербурга царские садовники применяли такой прием: ананасы вынимали из горшка и несколько дней подвешивали корнями кверху. Механический стресс (подвешивание) вызывает синтез этилена, и именно этот газ вызывает цветение ананасов. Вопрос лишь в том, как добыть этилен и массово обработать им ананасы на плантациях, что бы все они одновременно зацвели.

На Гавайских островах среди ананасов расставляли плошки с нефтепродуктами и поджигали. При неполном сгорании получаются небольшие порции этилена (которых, впрочем, вполне достаточно для стимуляции цветения). На Кубе ананасы поливали карбидной водой. Карбид кальция при взаимодействии с водой дает ацетилен, микрофлора почвы восстанавливает его до этилена, что и нужно для цветения ананасов. Можно рекомендовать поместить горшок с ананасом в полиэтиленовый пакет вместе со спелым бананом и плотно завязать его.

Тема 13 «Неклассические гормоны»

- 1 Биохимический механизм действия brassinosteroidов.
- 2 Жасминовая кислота. Строение, биосинтез и физиологические функции.
- 3 Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях.
- 4 Пептидные гормоны растений.

1 Биохимический механизм действия brassinosteroidов. В науке долго существовала точка зрения, согласно которой растения отличаются от животных тем, что у них нет стероидных и пептидных гормонов. Однако, зная важную роль стероидных гормонов в организме животных и человека, предполагали, что такие гормоны должны быть и у растений.

В 1970 г. Дж. Митчелл с сотрудниками (США) выделили из пыльцы рапса новое вещество, интенсивно стимулирующее рост растений. Это вещество назвали brassinolidом от родового латинского названия рапса *Brassica*. Установить химическую природу данного вещества ($C_{28}H_{48}O_6$) удалось лишь в 1979 г. М. Д. Грови, когда из 40 кг собранной пчелами пыльцы выделили в чистом виде 4 мг этого вещества. Его структура доказывает сходство стероидных гормонов растений и животных.

Брассиностероиды – фитогормоны класса стероидов, поддерживающие нормальное функционирование иммунной системы растения, особенно в неблагоприятных условиях, например, при пониженных температурах, заморозках, затоплении, засухе, болезнях, действии пестицидов, засолении почвы и др.

Брассиностероиды – стрессовые адаптогены, обладающие сильной ростостимулирующей активностью. Содержатся в каждой растительной клетке в очень малом количестве. Концентрация ферментов биосинтеза брассиностероидов наиболее высока в молодых тканях растения: этиолированных проростках, меристемах, флоральных примordiaх, развивающейся пыльце.

К настоящему времени известно более шестидесяти брассиностероидов: из настоящего каштана (*Castanea sativa*) был выделен кастастерон, из рогаза (*Typha*) – тифастерол, из чая (*Thea*) – теастерон, из катарантуса (*Catharanthus*) – катастерон и т.д.

Низкое содержание брассиностероидов в растениях обуславливает исключительную роль химического синтеза как основного источника этих фитогормонов для всестороннего изучения и практического использования. Первым брассиностероидом, полученным синтетическим путём, стал эпибрассинолид, абсолютно идентичный природному растительному гормону.

Кроме пыльцы, брассиностероиды присутствуют в листьях, стеблях, незрелых семенах, галлах. В настоящее время эти гормоны обнаружены не только у цветковых растений, но и у сосновых и даже водорослей.

Биосинтез брассиностероидов идет по мевалонатному пути и включает общие для других терпеновых соединений (гиббереллинов, абсцизовой кислоты) стадии. Первым специфическим продуктом, из которого происходит биосинтез остальных брассиностероидов, является 24-метилхлестерол, превращающийся в кампестерин и кампестанол. От кампестанола расходятся две параллельные ветви биосинтеза, которые в итоге заканчиваются брассинолидом – физиологически активным брассиностероидом.

Транспорт. Брассиностероиды – высокогидрофобные молекулы, но зарегистрировано образование гидрофильных гликозидов, сульфатов и ацилпроизводных брассиностероидов. Именно в форме таких гидрофильных производных брассиностероиды транспортируются по растению.

Физиологические эффекты. Стимуляция роста растяжением. Одной из особенностей брассиностероидов является способность стимулировать ростовые процессы в очень низких концентрациях. Стимулирующее действие брассиностероидов на ростовые процессы связано с активацией процессов деления и растяжения клеток.

Регуляция процессов клеточной дифференцировки. Брассиностероиды регулируют процессы клеточной дифференцировки. Наряду с ауксинами, брассиностероиды необходимы для запуска синтеза таких ферментов, как ФАЛ (фенилаланин-аммиак лиаза) и гидроксилаза коричной кислоты, участвующих в лигнификации клеточных стенок при образовании элементов ксилемы.

Ингибирование образования боковых корней. Действие на корневую систему brassinosterоидов и ауксинов заметно различается: если ауксины стимулируют образование боковых корней, то brassinosterоиды ингибируют их образование. Участие в процессах фотоморфогенеза. Полагают, что brassinosterоиды выполняют функцию репрессоров светозависимых генов морфогенеза. Повышение устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Экзогенная обработка brassinosterоидами оказывает влияние не только на процессы роста и развития растений, она может повышать их устойчивость к таким стрессовым воздействиям, как резкие колебания температуры, засухи, засоление, аноксия и воздействие патогенов. В больших дозах brassinosterоиды сдерживают рост и повышают устойчивость к неблагоприятным внешним факторам, что позволяет рассматривать их как перспективную для практического применения в растениеводстве группу фитогормонов.

Выяснение механизма действия brassinosterоидов находится на начальном этапе и требует дальнейших обстоятельных исследований для его понимания. Регуляторная роль brassinosterоидов проявляется в растениях в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, изменении белкового метаболизма, поступления ионов и многих других сторон обмена веществ. Открытие у brassinosterоидов антистрессовых свойств к абиотическим факторам (высоким и низким температурам, засухе, засолению и др.) служит основанием для расширения сфер их применения. Обнаружение способности brassinosterоидов повышать прочность стебля зерновых культур может быть использовано для разработки способа повышения устойчивости к полеганию.

2 Жасминовая кислота. Строение, биосинтез и физиологические функции.

Жасминовая кислота впервые была выделена в 1962 г. из эфирного масла жасмина крупноцветкового, где она присутствует в виде летучего эфира метилжасмината. В 1980-е гг. обнаружили физиологическое действие этого вещества на растения. К настоящему времени у растений обнаружены многочисленные производные жасминовой кислоты, включая сульфатированные соединения и метиловые эфиры. Эти соединения получили общее название жасминатов, обнаружены у грибов, мхов, папоротников и у всех цветковых растений.

Жасминовая кислота усиленно образуется при повреждении растения животными, насекомыми или патогенами и участвует в индукции защитных реакций. Например, в ответ на механический стресс (повреждение ветром) жасминаты вызывают усиленное утолщение стебля и усиков, что улучшает стабильное положение стебля. Ее много в зонах деления клеток, молодых почках, цветках, околоплоднике, гипокотиле. Жасминовая кислота действует в концентрациях более 10~5 моль/л.

Биосинтез жасминовой кислоты начинается в пластидах с окисления α -линоленовой кислоты, которая освобождается из мембранных липидов (1), и

образования первого циклического метаболита 9,13,12-оксофитодиеновой кислоты (2). В результате восстановления цикlopентенонового кольца и укорочения боковой цепи после трех циклов [3-окисления из 9,13,12-оксофитодиеновой кислоты в глиоксисомах или пероксисомах образуется жасминовая кислота (3). После синтеза жасминовая кислота может метилироваться, превращаясь в физиологически активный метилжасминат (6), кукурбиновую и тубероновую кислоты (4) или присоединяя глюкозу, и переходить в неактивную запасную форму (5).

Жасминаты транспортируются по флоэме.

Физиологическая роль. Первоначально была установлена роль жасминовой кислоты в иммунитете растений. В ответ на инфекцию ее концентрация увеличивается, и индуцируется синтез защитных веществ. Если в растениях ингибировать работу липоксигеназы, жасминовая кислота не образуется и теряется иммунитет к фитопатогенам.

Поранение животными во многих случаях вызывает защитные реакции не только в поврежденных листьях, но и в соседних. Поскольку эфир жасминовой кислоты является летучим соединением, выделяясь из клеток, он может передавать информацию о повреждении соседним растениям через атмосферу. В опыте неповрежденные растения томатов при выращивании в камере, содержащей эфир жасминовой кислоты, накапливали в листьях такое же количество защитных веществ, как и листья поврежденных растений.

Позднее были обнаружены и другие функции этого фитогормона и его эфиров. Они ингибируют рост корня и проростков, прорастание пыльцевых трубок, образование каллуса, стимулируют созревание плодов, образование клубней и луковиц, влияют на цитоскелет, меняя его расположение, подавляют синтез рибулозобисфосфата и вызывают хлороз, контролируют изгиб усиков. Вызывая старение листьев и сдерживая вегетативный рост, они способствуют переходу растения в состояние покоя. Жасминат вызывает в зародышах синтез LEA-белков.

Белки позднего эмбриогенеза (LEA-белки, от англ. Late Embryogenesis Abundant) группа животных и растительных белков, защищающих другие клеточные белки от агрегации при дегидратации (потере воды) или осмотическом стрессе, связанном с низкими температурами. Первоначально было показано накопление LEA-белков на поздних этапах эмбрионального развития семян хлопка. LEA-белки широко представлены в семенах и пыльце растений, поскольку эти структуры в ходе нормального процесса развития проходят через стадию дегидратации и криптобиоза.

Жасминаты контролируют синтез белков, характерных для водного дефицита. Появление этих белков сопровождается ослаблением дальнего транспорта по флоэме и закрытием устьиц. В ответ на механический стресс, например, от ветра, жасминаты вызывают синтез экстенсина, что приводит к утолщению стебля. Предшественник жасминовой кислоты 9,13,12-оксофитодиеновая кислота вместе с этиленом и индолил-3-уксусной кислотой вовлекаются в регуляцию ростовых реакций после механического повреждения.

К уникальной физиологической реакции, индуцируемой жасминатом, относится синтез «вегетативных» запасных белков VSP (от англ. vegetative storage proteins). У некоторых растений эти белки по структуре похожи на запасные белки семян, но у других растений заметно от них отличаются. Синтез этих белков наблюдается только при хорошем снабжении растений азотом, а при голодании эти белки не образуются.

Жасмоновая кислота (распространённое международное обозначение JA – от англ. jasmonic acid) – растительный гормон из класса жасмонатов.

Сложные эфиры и соли жасмоновой кислоты называют жасмонаты, например, биологически важный метиловый эфир – метилжасмонат.

Биосинтез жасмоновой кислоты в растениях осуществляется из α -линоленовой кислоты.

Жасмоновая кислота принимает участие в регуляции таких процессов роста растений, как замедление роста, старение и опадание листьев. Также жасмоновая кислота способствует формированию клубней, корнеклубней и луковиц, например, у картофеля, батата и лука.

Один из регуляторов закрытия ловушек насекомых у хищных растений, например, у венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*).

Жасмоновая кислота у растений играет важную роль в заживлении повреждений тканей.

Жасмоновая кислота в биохимических реакциях превращается в различные производные, например, эфиры – метилжасмонат, которые далее могут химически соединяться с аминокислотами.

Показаны следующие функции жасмонатов для растений:

Жасмоновая кислота и метилжасмонат ингибируют прорастание неспящих семян и вызывают прорастание спящих.

Высокие уровни жасмоновой кислоты стимулируют накопление запасных белков; гены, кодирующие запасные белки, являются чувствительными к жасмоновой кислоте и её производным и оказывают влияние на формирование клубней.

Применение жасмоновой кислоты может вызывать хлороз и ингибировать гены, продукты которых участвуют в фотосинтезе.

Значение жасмоновой кислоты, которая накапливается в цветках и плодах, неизвестно; однако накопление жасмоновой кислоты может быть связано с созреванием плодов и накоплением каротиноидов.

Жасмоновая кислота играет важную роль в устойчивости растений к насекомым и заболеваниям. Жасмоновые кислоты активирует многие гены защитной системы растений. Она же может выполнять защитные функции совместно с этиленом.

3 Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях.

Салициловая кислота впервые была выделена из ивы (*Salix*) еще в XIX столетии, и с тех пор нашла в виде многочисленных производных широкое

применение как лекарственный препарат. (Самое известное производное салицилата - аспирин или ацетилсалициловая кислота).

Биосинтез салицилата в растениях начинается с активизации фенилаланин-аммиаклиазы (ФАЛ). При этом фенилаланин превращается в транс-коричную кислоту, которая в результате последовательных окислений дает бензойную кислоту - непосредственную предшественницу салицилата. В конечном счете уровень салицилата зависит от активности гидроксилазы бензойной кислоты. Салицилат может депонироваться в виде неактивного глюкозида.

О физиологическом эффекте салицилатов в растениях стали говорить только в 1980-е годы, когда было подробно изучено явление термогенеза у ароидных. Классический объект исследования - *Sauromatum guttatum* – субтропическое растение, которое имеет типичную для ароидных стратегию опыления. Женские генеративные органы собраны на початке у основания. В этом месте базальная часть покрывала образует камеру. Выше на початке расположены щетинки, а покрывало сужено (эта часть початка стерильна). Выше располагаются тычинки (мужская генеративная зона). Початок венчает утолщенный стерильный придаток. Покрывало же отогнуто и образует пестро раскрашенную посадочную площадку для опылителей.

Первый термогенный эпизод начинается около полуночи с нагревания верхнего стерильного придатка и длится приблизительно 7 часов. Перепад температур между початком и окружающей средой достигает 12 градусов. В воздух испаряются вещества, имитирующие запах гниющего органического вещества. На запах слетаются потенциальные опылители, которые по покрывалу забираются в камеру с пестиками. Обратному выходу препятствуют щетинки между женской и мужской частью початка.

Насекомые вынуждены остаться на день в базальной камере, а с вечера их ожидает второй (14-часовой) термогенный эпизод: разогревается нижняя часть початка. Разность температур со средой достигает только 10 градусов. Нагрев стимулирует активность насекомых. В это же время раскрываются пыльники и осыпают насекомых пылью сверху. Щетинки усыхают и опылители, вымазанные пылью, оказываются на свободе.

Термогенные эпизоды распределены в течение суток так, чтобы начало первого у одних растений популяции совпадает с освобождением насекомых после второго у других.

Как оказалось, в предшествующий цветению день в стерильном верхнем придатке идет накопление салициловой кислоты, которое начинается в 12 и достигает максимума в 17 часов. Концентрация салицилата повышается в 100 раз. В середине ночи уровень салицилата повышается также и в нижней части початка. После термогенеза уровень салицилата возвращается к исходному (около 10-15 mmol).

Уровень салициловой кислоты возрастает в ответ на внедрение патогенов. Впервые это было показано при инфицировании табака вирусом табачной мозаики в 1990 г. Устойчивость к вирусу можно было повысить, обрабатывая растения салициловой кислотой. Интересно, что даже при простом

механическом повреждении активизируется начальный фермент биосинтеза салицилата - ФАЛ. Если растение не может синтезировать салицилат (например, в результате блокирования гена ФАЛ или гена гидроксилазы бензойной кислоты), у него снижается иммунная реакция ко многим патогенам.

В ответ на обработку растений салициловой кислотой начинается синтез PR-белков (pathogenesis related proteins). Их делят на несколько классов. Белки PR-1 класса отвечают за проявление системной устойчивости (т.е. устойчивости во всем растении далеко от непосредственного места контакта с патогеном). PR-1 белки токсичны для многих грибов, хотя механизм токсического действия пока еще недостаточно изучен. PR-2 белки оказались β -1,3-глюканазами, расщепляющими глюканы клеточной стенки растений и некоторых грибов на более короткие фрагменты. Фрагменты глюканов также способны вызывать иммунную реакцию растительных клеток. PR-3 класс белков - хитиназы, которые расщепляют хитин клеточных стенок грибов. Появление низкомолекулярных продуктов деградации хитина является сигналом о том, что в место повреждения попали гифы гриба. К PR-4 классу относят гевеин-подобные белки, которые отвечают за "склеивание" латекса при повреждениях. Эти физиологические ответы частично перекрываются с ответами на этилен и жасминовую кислоту.

Салициловая кислота вызывает синтез ФАЛ, и тем самым усиливает собственный биосинтез. Салициловая кислота может связываться с некоторыми Fe-содержащими белками (например, с каталазой). При взаимодействии с салицилатом активность каталазы падает, концентрация перекиси водорода и других активных форм кислорода растет. Повышение концентрации активных форм кислорода стимулирует образование новых порций салициловой кислоты, что приводит к усилению эффекта. В крайнем выражении обработка салициловой кислотой может вызвать гибель клеток (запускается реакция сверхчувствительности).

Таким образом, салицилат, в отличие от других гормонов, не только регулирует процессы через соответствующие рецепторные системы, но и непосредственно участвует в аллостерической регуляции работы ряда ферментов. Т.е. для развития физиологического ответа необходима более высокая концентрация салицилата (до 10^{-3} - 10^{-5} моль/л). Такие высокие концентрации не характерны для «типичных» гормонов, поэтому часто дискутируют о том, стоит ли салициловую кислоту включать в список растительных гормонов.

4 Пептидные гормоны растений.

В 1991 г. у растений сотрудниками лаборатории Райана был обнаружен первый пептидный гормон, который получил название системина.

Впервые системин был выделен из листьев молодых растений томатов. Позднее его обнаружили в картофеле, перце и некоторых других растениях. Молекулы системинов из растений разных видов несколько отличаются по строению, но функционируют они одинаково. Как и другие гормоны растений,

системин проявляет биологическую активность в очень малых концентрациях (10^{-5} М).

Системин представляет собой пептид, состоящий из 18 аминокислот, поэтому такие соединения иногда называют короткими пептидами. Как и большинство пептидных гормонов животных, он образуется из своего предшественника – просистемина, молекула которого содержит 200 аминокислотных остатков. Комплекс «системин – рецептор» активирует липазу, которая действует на мембранные липиды, в результате образуется линоленовая кислота, из которой синтезируется жасмилат. Последний вызывает активацию генов – ингибиторов протеаз. Протеазы катализируют распад белка и полипептидов.

Биосинтез системина контролируют 20 генов и жасминовая кислота. Системин образуется в ответ на ранение, повреждение насекомыми, внедрение патогена и абиотические факторы. Синтезируясь в поврежденных частях растения, он затем выходит в апопласт и по флоэме транспортируется в неповрежденные органы растения, где включает синтез жасминовой кислоты, а также, возможно, и синтез других гормонов (АБК, этилена). В результате иммунный ответ наблюдается не только в месте повреждения, но и во всем растении.

Физиологическая роль. Пептидные гормоны регулируют развитие растения и вместе с жасминовой и салициловой кислотами участвуют в защите растений от патогенов. Некоторые авторы считают системин не фитогормоном, а вторичным мессенджером.

В отличие от ранее известных гормонов, системин не регулирует рост растений непосредственно, а запускает системы растения, защищающие его от патогенов, повышает устойчивость к заболеваниям.

В настоящее время известны и другие пептидные гормоны – фитосульфокины (ФСК). Известны два сульфокинина – α и β . Это небольшие пептиды, состоящие из 4-5 аминокислот.

Фитосульфокины участвуют в регуляции клеточных делений, дедифференцировке, органогенезе (образование листьев, боковых корней) и других ростовых процессах.

Из томатов, табака и конских бобов выделен гормональный пептид, содержащий в молекуле 49 аминокислотных остатков и обеспечивающий быстрое подщелачивание среды, в которой находятся клетки. Он получил название фактора быстрого подщелачивания. Его другие функции пока неизвестны. Предполагают, что он ингибирует деление клеток корня.

Большой интерес представляет пептид, кодируемый геном CLAVATA, обнаруженный у арабидопсиса и играющий важную роль в делении клеток и дифференцировке цветочных меристем.

Тема 14 Методы изучения фитогормонов

- 1 Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей
2. Количественные методы определения фитогормонов

3. Особенности иммунохимии фитогормонов

Для выяснения того, как тот или иной гормон осуществляет регуляцию физиологических функций, какова их роль в ответной реакции растения на факторы внешней среды и адаптации к ним, требуется детальный анализ эндогенного гормонального статуса растения. Предполагается, что регуляторная функция гормонов реализуется в основном через изменение их концентрации, которая в каждый определенный момент является результатом процессов синтеза, распада, транспорта, взаимопревращений свободных и связанных форм гормона. Важно знание роли каждого из этих процессов в регуляции концентрации гормона. Особенно это необходимо при использовании экзогенных регуляторов роста в практике растениеводства, поскольку их эффект зависит от содержания эндогенных фитогормонов. В свою очередь, знание лимитирующего звена в создании оптимальной концентрации гормона в различных органах растения позволяет повысить эффективность применения экзогенных регуляторов направленного действия.

1 Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей

Определение фитогормонов в растительной ткани технически трудоемкий процесс, так как они содержатся в микроколичествах и в клетках им сопутствует множество молекул, близких к ним по физико-химическим свойствам.

Это требует отделения гормона от сопутствующих веществ, что достигается либо длительной очисткой, либо за счет селективности детекции. Для выделения гормона из растения необходима подготовка растительного материала для анализа – его фиксация. Последующее выделение включает экстракцию, очистку от примесей, фракционирование, идентификацию и количественное определение.

Способ фиксации материала, выбор экстрагента, способы и степень очистки зависят как от физико-химических свойств фитогормона и стабильности его молекулы, так и от метода последующего количественного определения и поставленных задач.

Выделение цитокининов пуринового ряда из растительного материала основано на их следующих свойствах: они слабо растворимы в холодной воде, при нагревании растворимость в воде увеличивается; хорошо растворимы в органических растворителях (этанол, этиловый эфир, метанол, бутанол, этилацетат, ацетон), в растворах щелочей и кислот. Цитокинины устойчивы к нагреванию, автоклавированию, действию щелочей и кислот. Поэтому можно применять фиксацию материала горячим спиртом. Для экстракции используют обычно водный этиловый или метиловый спирт. Некоторые авторы перед экстракцией растительный материал замораживают в жидком азоте и лиофильно высушивают. Из кислых растворов цитокинины могут быть осаждены солями серебра или бария; при $\text{pH} = 2,5$ извлекаются с помощью катионитов (например, Дауэкс), из щелочных растворов ($\text{pH} = 10$) – анионитами

(Амберлит). Из водной фазы при $pH = 7,0-7,8$ цитокинины легко переходят в водонасыщенный бутанол, при $pH = 3$ – в этилацетат. Они поглощают в ультрафиолете в пределах 260–275 нм, что позволяет обнаружить локализацию цитокининов на хроматограммах. Свет ускоряет разрушение цитокининов.

Определение ауксина β -индолилуксусной кислоты (ИУК) осложняется тем, что она, в отличие от цитокининов, обладает химической неустойчивостью при низких pH в присутствии следовых количеств железа. В чистом виде легко окисляется на воздухе и на свету, особенно в присутствии желтых пигментов. Поэтому для уменьшения окислительного разрушения ИУК во время экстракции в растворы добавляют антиокислители меркаптоэтанол или диэтилдитиокарбамат натрия. ИУК – очень слабая органическая кислота. Она растворима в этаноле, метаноле, ацетоне, этилацетате, серном эфире, хлороформе. Нерастворима в петролейном эфире, толуоле и других неполярных растворителях. В воде ИУК растворяется слабо, ее растворимость возрастает при увеличении pH и нагревании. В растворе при pH ниже 5 ИУК находится в виде недиссоциированных молекул и в этом состоянии легко переходит в воды в органические растворители. При pH более 7 она диссоциирует, в форме аниона ее переход из воды в органические растворители затруднен. На этих свойствах основаны первоначальные этапы выделения и очистки ИУК. Как и другие индольные вещества, ИУК поглощает в ультрафиолете (максимум при 279 нм) и флуоресцирует в фиолетовой части спектра, что используется для обнаружения на хроматограммах.

Наиболее щадящим способом фиксации растительного материала при определении ИУК является замораживание в жидком азоте. Если требуется длительное хранение, то лучше всего его заморозить и хранить при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ либо лиофильно высушить и лиофилизированный материал хранить над обезвоженным сульфатом натрия или хлористого кальция при $0...+2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Если зафиксированный азотом материал анализируется сразу, то его гомогенизируют на холоде и ведут экстракцию охлажденным метанолом или этанолом. Однако имеются сведения, что фиксация в жидком азоте с последующей гомогенизацией в охлажденном этаноле приводит к значительным потерям ИУК, так как холодный этанол не инактивирует многие ферменты. При этом на выход ИУК влияет продолжительность экстракции.

Сокращение времени экстракции до 1 – 1,5 ч, проведение процедур гомогенизации и экстракции в атмосфере азота с добавлением в растворы антиоксидантов позволяет существенно уменьшить разрушение ИУК и увеличить выход ИУК до 60– 80%. Считается, что лучшим инактиватором ферментной деятельности является метанол. Выход ИУК при экстракции из гомогенизированной замороженной ткани холодным метанолом достаточно высок – 97 %, кипящим – 93%. Поэтому некоторые исследователи предлагают кратковременную фиксацию (1–3 мин) в кипящем метаноле, после чего экстракцию холодным растворителем. При таком способе фиксации одновременно идет экстракция гормона.

При выделении ауксинов из оводненных тканей используют смешивающиеся с водой органические растворители (метанол, этанол, ацетон и

др.), а из высушенных тканей – этилацетат, серный эфир, хлороформ. Если стоит задача извлечь только свободную ИУК, то используют оводненный подкисленный серный эфир. Экстракция этим растворителем имеет то преимущество, что он позволяет извлечь из тканей сравнительно небольшую группу соединений и отгоняется при низкой температуре. При экстракции лиофилизированного материала серным эфиром добавляются инактиваторы ферментов (диэтилдитиокарбамат натрия, метабисульфит натрия и др.). Эфир в обязательном порядке следует освобождать от перекисей. Помимо ИУК оводненный серный эфир извлекает индолилацетамид, индолилацетонитрил, триптамин, а также абсцизовую кислоту, фенолкарбоновые кислоты, халконы и другие соединения.

Если ставится задача извлечь все индольные и полифенольные продукты (за исключением прочно связанных с белками и другими полимерами), то должен использоваться более полярный растворитель – 70%-й метанол или этанол. Метанол экстрагирует связанные формы индолов без их разрушения. В этом случае удастся экстрагировать индолил-гликозиды, флавонол-гликозиды, гликозиды фенолкарбоновых кислот и др.

Абсцизовая кислота представляет собой оптически активный сесквитерпеноид. Она может существовать в двух стереоизомерных (энантиомерных) формах, так как содержит один асимметрически замещенный атом углерода в кольце (1'): в форме S(+)-энантиомера (правовращающей) и в форме R(-)-энантиомера (левовращающей). Растения содержат преимущественно S(+)-АБК, хотя биологическая (ингибирующая) активность R- и S-форм одинакова.

Синтетическая АБК – это рацемическая смесь равных количеств право- и левовращающих форм – (±)-АБК. Природный изомер (+)-АБК обладает предельно высокой оптической активностью: амплитуда кривой дисперсии оптического вращения составляет $+24\ 000^\circ$ (при длине волны 289 нм) и $-69\ 000^\circ$ (при 246 нм). Это свойство используют для определения малых количеств АБК в тканях методом ДОВ (дисперсия оптического вращения).

Помимо оптической молекула АБК проявляет также и геометрическую изомерию по двойной связи С-2–С-3 в боковой цепи. Боковая цепь при С-2 может находиться в цис- и транс-положении. Наиболее распространенная в растениях природная форма АБК имеет 2-цис,4-транс-конфигурацию боковой цепи, и ее называют просто цис-АБК, а 2-транс,4-транс-изомер называют транс-АБК. Под

действием видимого и УФ-света природная форма медленно, без участия ферментов изомеризуется в 2-транс-форму с очень низкой биологической активностью, и в растворе устанавливается соотношение цис-АБК и транс-АБК 1:1.

Абсцизовая кислота поглощает УФ, причем максимум меняется с изменением рН раствора: при рН ниже 7 УФ-спектр с максимумом при 262 нм и плечом при 240 нм, в водных растворах с рН = 7 и более максимум поглощения находится при 245 нм.

Химически чистая S-(+) АБК имеет температуру плавления + 160 °С. Это слабая органическая кислота, хорошо растворима в щелочах и органических растворителях (хлороформ, ацетон, метанол, этанол, диэтиловый эфир, этилацетат), плохо – в воде, бензоле, петролейном эфире, гексане.

Не существует единого универсального метода фиксации и извлечения АБК из растительных тканей. Фиксация растительного материала жидким азотом с последующим лиофильным высушиванием позволяет, как и при определении ИУК, наиболее полно сохранить гормон от разрушения. Лиофилизированный материал хранят над хлористым кальцием при +2...+4 °С, а зафиксированный жидким азотом – при температуре -30...-80 °С или на сухом льду. Однако, если условия не позволяют фиксировать материал этим способом, то можно проводить фиксацию в термостате при +105 °С, так как АБК термостабильна. Затем материал досушивают при +60 °С до воздушно-сухого состояния. Этот вариант менее желателен. Некоторые исследователи предпочитают одновременную фиксацию и экстракцию свежего растительного материала в кипящем метаноле или этаноле, если нет необходимости в его хранении.

Существует достаточно много приемов экстракции растительного материала при анализе АБК. Обычно применяют этиловый или метиловый спирт, ацетон. Лучшим экстрагентом является метанол. Но если вести экстракцию в щелочных условиях, то возможно образование метилового эфира АБК в результате трансметилирования после щелочного гидролиза глюкозного эфира АБК. Проведение экстракции метанолом в кислой среде или ацетоном устраняет подобный эффект. При проведении всех аналитических процедур желательно предохранение образца от действия света, который способствует частичной изомеризации АБК. Как и в случае определения ИУК, дальнейшее фракционирование водного остатка, полученного после упаривания спиртового экстракта, чаще всего осуществляют путем разделения с диэтиловым эфиром. Для удаления нейтральных и основных веществ, слабых кислот используют бикарбонатную очистку: перевод экстракта в раствор бикарбоната натрия и очистка диэтиловым эфиром с последующим подкислением экстракта и переводом в эфир кислых соединений – ИУК и АБК.

Дальнейшая очистка гормонов зависит от того, какой метод количественного анализа будет применен. В любом случае необходимо определение потерь гормона на каждом этапе анализа, начиная с первых этапов очистки (фиксация, экстракция, фракционирование) и при всех дальнейших процедурах выделения (разные способы хроматографирования и др.). Для этого используют внутренние стандарты – соединения, близкие по своим физико-химическим свойствам к данному гормону и не встречающиеся в растении. Чаще всего применяют меченый C^{14} - или H^3 -гормон, а также другие стандарты, специфичные для конкретного метода анализа.

2. Количественные методы определения фитогормонов

Количество гормона в конечном растворе определяют либо с помощью биотестов, либо физико-химическими методами, основанными на той или иной

физико-химической характеристике гормона. Исторически первыми методами анализа фитогормонов были биотесты. Они основаны на применении изолированных клеток, тканей или органов, лишенных собственного гормона или имеющих очень низкое его содержание, а также обладающих высокой чувствительностью к экзогенному гормону. Величина физиологического ответа таких растительных объектов на экзогенный гормон зависит от количества ввального гормона, она пропорциональна в определенных пределах логарифму его концентрации в растворе. Приводя в контакт с растительной тест-системой анализируемый раствор, содержащий эндогенный гормон, и стандартный раствор гормона и сравнивая величину физиологического ответа данной тест-системы, можно оценить количество гормона в анализируемом образце. Для этого метода характерна высокая избирательность, которая основана на специфичности узнавания гормонов соответствующими рецепторами. Благодаря этому именно с помощью биотестов были открыты фитогормоны в растении и установлено присутствие в растительных экстрактах цитокининов, гиббереллинов, ИУК и АБК. Только позднее они были идентифицированы с помощью физико-химических методов. Например, специфические и чувствительные биотесты для определения ИУК основаны на способности ауксина стимулировать удлинение отрезков coleoptiles этиолированных проростков пшеницы или овса; для цитокининов – на активации этим гормоном деления клеток в каллусах и суспензионной культуре клеток или на активации биосинтеза бетацианина в проростках щироцы и др. Для АБК используются такие высокоспецифичные биотесты, как ингибирование роста отрезков coleoptiles или мезокотилей овса; подавление прорастания семян горчицы, изолированных зародышей ячменя; стимуляция закрывания устьиц; ускорение старения изолированных листьев и др.

Специфичность биотестов позволяет снизить степень очистки растительного экстракта по сравнению с тем, что требуют физико-химические методы. Обычно очистка образца ограничивается удалением ингибиторов данного физиологического ответа. Но при этом нужно учитывать, что некоторые пары фитогормонов на отдельные процессы оказывают противоположное действие. Например, ИУК стимулирует, а АБК подавляет удлинение отрезков coleoptiles; цитокинины задерживают старение изолированных листьев, АБК – ускоряет; АБК способствует закрыванию, а цитокинины – открыванию устьиц. Если используются эти биотесты, то перед их проведением нужно разделить ИУК и АБК, а также цитокинины и АБК.

Биотесты широко применяются, они не потеряли своей актуальности и в настоящее время. Система биотестов является единственным критерием для оценки гормональной активности природных соединений. Тесты необходимы для первичного скрининга синтетических аналогов фитогормонов, для подтверждения наличия гормона в ткани перед физико-химическим анализом. Однако необходимо иметь в виду, что они не обладают абсолютной специфичностью. Кроме того, реакция на гормон в биотесте зависит не только от истинной активности соединения, но и от способности гормона проникать в клетки и от скорости его инактивации в клетках. Поэтому надежность выводов

повышается при использовании одновременно различных биотестов. Многие биотесты являются очень трудоемкими, занимающими много времени. Результаты биотестов порой плохо воспроизводимы, что объясняется, очевидно, сложностью биологических систем, с трудом поддающихся факторостатированию для получения стандартизованного ответа. Недостаток всех биологических методов заключается также в том, что они дают в лучшем случае полуколичественную оценку содержания гормона.

Наиболее точное количественное определение гормонов дают физико-химические методы анализа. Большинство используемых методов объединяет хроматографию высокой степени разрешения с детекцией, обеспечивающей селективность. Например, высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) или капиллярная газовая хроматография (ГХ) в сочетании с детектором электронного захвата, пламенно-ионизационным или азотно-фосфорным детектором. Абсолютно достоверными являются методы, сочетающие ВЭЖХ и ГХ с масс-спектрометрией (МС) – ГХ – МС и ВЭЖХ – МС. Они обладают большой точностью и избирательностью и незаменимы в тех случаях, когда необходимо строго идентифицировать новое вещество с гормональной активностью или его метаболиты. Но подготовка растительного материала к анализу физико-химическими методами является еще более длительной и трудоемкой процедурой, чем при биотестировании, так как требуется тщательная предварительная очистка образца и используемых реактивов. Например, ВЭЖХ входит почти во все схемы физико-химического анализа фитогормонов как неременная стадия разделения групп фитогормонов. Несмотря на несомненные достоинства этих методов, они неприемлемы при оперативном контроле за содержанием фитогормонов в большом количестве образцов или при оценке количества гормона в динамике. Кроме того, требуются большие навески растительного материала, что в некоторых случаях невыполнимо (пыльца, пыльники, семена некоторых видов и т.д.), а также специальное дорогостоящее оборудование и инженерное обеспечение.

Альтернативой вышеописанным методам могут служить иммунохимические методы анализа фитогормонов, которые приобретают все большую популярность. Они сочетают в себе высокую чувствительность (можно определить вещества в концентрации 10–100 пг/мл) и исключительно высокую избирательность, которая обусловлена специфичностью процесса, составляющего принцип самого метода. Высокая избирательность – одно из важных преимуществ иммунохимических методов перед другими. Они обладают относительной простотой, что позволяет одновременно анализировать несколько десятков образцов; не требуют больших навесок растительного материала и сложной длительной очистки экстракта, а также серьезного оборудования, как при использовании физико-химических методов.

3. Особенности иммунохимии фитогормонов

В основе всех иммунохимических методов лежит взаимодействие между антигенами (чужеродными для организма веществами) и специфическими антителами, которые вырабатываются лимфоцитами в организме животного в

ответ на введение антигена. Так как антитела (АТ) вырабатываются на введение определенного антигена (АГ), то они «узнают» антиген, специфично и количественно взаимодействуя с ним и образуя комплекс антиген – антитело (АГ–АТ). Специфическое связывание антигена с антителами происходит независимо от того, находится антиген в чистом виде или в смеси с какими-либо сопутствующими веществами. Именно этим привлекательны иммунохимические методы, так как они не требуют абсолютной очистки растительных экстрактов при выделении фитогормона.

Разные варианты иммунохимических методов отличаются друг от друга в основном тем, каким способом отделяют комплекс АГ–АТ от непрореагировавших компонентов (несвязавшихся антител и антигенов) и как оценивают количество комплекса (следовательно, и количество антигена).

Антигены – вещества различной химической природы: белковой, поли- и олигосахаридной, гликопротеидной, гликолипидной. В молекуле антигена выделяют: а) несущую (основную) часть; б) небольшие участки, определяющие чужеродность антигена, – антигенные детерминанты. Их может быть несколько, что определяет валентность антигена. По химической природе антигенные детерминанты разделяют на три группы:

1. Пептидные – свойственны антигенам белковой природы.
2. Олигосахаридные – свойственны многим антигенам (полисахаридной, гликопротеидной и гликолипидной природы), прежде всего микробным антигенам.
3. Гаптены – имеют одну антигенную детерминанту, т.е. не могут присоединять несколько антител. Это относительно низкомолекулярные соединения. Гаптены отличаются от полноценных антигенов по некоторым свойствам:
 - а) в свободном виде не способны вызывать иммунный ответ;
 - б) соединенные с высокомолекулярным носителем (белком) и образуя конъюгат, вызывают иммунный ответ;
 - в) реагируют с антителами, полученными при иммунизации животного конъюгатом;
 - г) способны конкурировать за антитела с конъюгатом белок-гаптен.

Фитогормоны, как антигены, являются гаптенами, так как введенные животным сами по себе не способны вызывать выработку антител. Чтобы у фитогормонов появилась способность вызывать образование антител, необходимо фитогормон связать с белком-носителем и получить конъюгат гормон-белок. Для этого используют разные способы конъюгации гормона с белком, что зависит от присутствия в молекуле гормона функциональных радикалов, например, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, и других групп.

Для получения сыворотки со специфическими антителами к гормону конъюгат гормон-белок вводят животному (обычно кроликам или другим животным). Через 2–3 месяца в крови появляются антитела к введенному конъюгату. Однако сыворотка содержит антитела не только к гормону, но и к белку-носителю. Чтобы антитела к белку-носителю не мешали обнаружению антител к гормону, нужно их разделить. Для этого к сыворотке добавляют

новый конъюгат гормон-белок с другим белком-носителем. Имеющиеся в сыворотке антитела к гормону будут взаимодействовать с гормоном нового конъюгата, а антитела к белку не будут связываться с новым белком-носителем в конъюгате, так как они были выработаны к белку первого конъюгата.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

РАЗДЕЛ 4 СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГОРМОНЫ

Тема 15 Продукты химического синтеза

1 Аналоги ауксинов: препараты гетероауксин, корневин, укоренить, томаты.

2 Аналоги гиббереллинов: препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень.

3 Аналоги цитокининов и брассиностероидов: препараты цитодеф и эпин-экстра.

Химические аналоги природных стимуляторов роста – это регуляторы, активирующие особые фазы роста и онтогенеза растений. К ним относятся синтетические аналоги ауксинов фитогормонов. Стимуляторы роста применяют для активации корнеобразования, роста культуры тканей, предотвращения опадения плодов.

1 Аналоги ауксинов: препараты гетероауксин, корневин, укоренить, томаты.

Гетероауксин применяется для стимулирования корнеобразования у черенков, улучшения корнеобразования у рассады (в том числе цветочной) и взрослых растений, кустарников и деревьев, повышения всхожести семян и луковиц. Действующее вещество, концентрация: индолил-3-уксусная кислота, 950 г/кг

Преимущества:

- Стимулирует корнеобразование у черенков, повышает всхожесть луковиц;
- Ускоряет корнеобразование у рассады;
- Улучшает приживаемость растений при пересадке деревьев и кустарников, посадке рассады;
- Позволяет размножать цветочные культуры частями луковиц;
- Препятствует опаданию завязей и листьев
- Сокращает срок укоренения черенков в 1,5-2 раза;
- Препятствует опаданию завязей и листьев;
- Низкий расход препарата, экономичность;
- Прост в применении.

Гетероауксин является природным фитогормоном роста, образующимся в самих растениях и оказывающим большое влияние на их рост и развитие. Особенно им богаты верхушки стебля растущих побегов, молодые листья, зародыши в прорастающих семенах. Воздействуя на клеточном уровне, гетероауксин выводит семена и черенки из состояния покоя и дает мощный импульс образованию корней. Гетероауксин также препятствует опадению завязей и листьев, которое связано с формированием рыхлого слоя клеток и закупоркой проводящих сосудов в черешках.

Гетероауксин стимулирует корнеобразование у черенков, улучшает корнеобразование у рассады и взрослых растений, кустарников и деревьев, повышает всхожесть семян и луковиц. Наибольший эффект достигается при

размножении растений черенками у хорошо укореняющихся культур (виноградной лозы, роз и других). После обработки черенков гетероауксином ускоряется укоренение и обеспечивается мощное развитие молодых побегов (особенно у виноградной лозы). У слабо или совсем не укореняющихся культур (яблоня, груша, слива, черешня, хвойные, орехоплодные и многие декоративные культуры, а также гвоздика) замачивание черенков в растворе гетероауксина приводит к усиленному образованию боковых корней, что существенно облегчает их укоренение.

Гетероауксин незаменим при посадке и пересадке саженцев плодовых деревьев и кустарников, обработке семян. Обработка корневой системы сметанообразной массой, состоящей из глины и торфяной крошки, замешанной на растворе гетероауксина, способствует быстрому прорастанию новых корней после посадки, образованию мощной корневой системы и, как следствие, росту, приживаемости и укреплению саженцев, снижению вероятности гибели культуры при пересадке. Обработка гетероауксином слабо развивающихся плодов предотвращает их преждевременное опадение и усиливает рост. Кроме того, ауксины способствуют усилению двигательной и функциональной активности у растений.

Отличные результаты дает применение гетероауксина при пересадке рассады на постоянное место. Количество и размер дополнительных корней у обработанных растений увеличиваются в 2-3 раза по сравнению с необработанными. Это обеспечивает прекрасную приживаемость растений, их ускоренное развитие, раннее плодоношение и высокую урожайность.

Скорость воздействия: через 1 – 2 недели после применения. Препарат не фитотоксичен для сельскохозяйственных и садово-огородных культур при рекомендуемых нормах расхода. Его остаточные количества не обнаруживаются через 20-30 дней после применения, поэтому он не может влиять на варьирование культур в севообороте. Случаев устойчивости к препарату не наблюдалось.

Корневин – это вещество группы биостимуляторов. Он применяется для улучшения укоренения черенков плодовых и декоративных растений и повышения их приживаемости в грунте. Препарат не является удобрением, поскольку не содержит питательных веществ, но может использоваться совместно с минеральными и органическими подкормками. Также он сочетается с фунгицидами и другими средствами для защиты растений от инфекционных заболеваний. Основное действующее вещество корневина – индолилмасляная кислота. Ее концентрация в сухом порошке составляет 5 г/кг. При попадании на растительные ткани она оказывает раздражающее действие, благодаря чему ускоряется деление клеток. В дальнейшем они трансформируются в здоровые корни. В грунте это вещество проходит ряд химических превращений и накапливается в форме гетероауксина. Он представляет собой растительный гормон, который ускоряет рост и формирование корневища. Корневин – это универсальное средство. Его используют для разных типов и сортов растений как на стадии проращивания семян, так и после посадки. В каждом случае способ внесения препарата

немного отличается. Также стоит учитывать особенности растений, особенно декоративных и экзотических цветов. Препарат показал высокую эффективность для разных типов культур. Размножение и пересадку растений можно проводить и без применения корневина и его аналогов, но процент приживаемости рассады будет существенно снижен. Саженцы, предварительно обработанные этим стимулятором в сухом виде или в форме раствора, отличаются следующими показателями: ускорением прорастания семян; повышением количества укоренившихся черенков; быстрым и обильным ростом корневой системы; высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе на стадии рассады.

Укорентъ (ДВ - индолилмасляная кислота) – аналог гетероауксина, повышают укореняемость культур на 20-70 %. Используется в виде порошка или раствора для выведения из состояния покоя луковиц и клубнелуковиц, улучшения приживаемости рассады, при черенковании различных культур, для укоренения саженцев. Препарат обеспечивает мягкое и продолжительное действие в самых низких по сравнению с другими ауксинами дозах. Удобная форма препарата в виде пудры позволяет значительно повысить его эффективность. Корневин хорошо прилипает к поверхности черенков и проникает в клетки растения. Появление корней происходит на 15 дней раньше по сравнению с контролем.

Если растения выкопаны с комом земли, и корневая система недоступна для опудривания, растения или рассаду поливают после высадки под корень раствором препарата (1 г/л). Расход раствора для овощных и цветочных культур – 30-50 мл, плодово-ягодных кустарников – 200-300 мл, плодовых, парковых и хвойных деревьев - 2-10 литра. При пересадке взрослых деревьев поливают 2-3 раза с интервалом 10-15 дней.

Томатон представляет собой стимулятор плодообразования. Действующее вещество: 4-хлорфеноксиуксусная кислота – 2,5 г/л. Препарат стимулирует завязывание плодов, особенно при неблагоприятных условиях, предотвращает опадение завязей. Ускоряет рост и созревание плодов, что позволяет увеличивать ранние сборы на 50-100 %, а общий урожай – на 24-50 %.

Особенности:

- Экономичен. Обрабатываются только новые соцветия.
- Удобен. Неиспользованный раствор можно хранить весь сезон и применять по мере появления соцветий.
- Эффективен. Пустоцветов нет, а урожай созревает на 7-10 дней раньше.

2 Аналоги гиббереллинов: препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень.

В настоящее время на основе смеси натриевых солей гиббереллиновых кислот созданы препараты гиббор-М, гибберросс, гибберсиб, а также завязь, бутон, цветень. Практическое применение этих препаратов направлено на

стимуляцию плодообразования, увеличение массы и повышения качества плодов, корнеплодов, клубней и луковиц.

Гиббор-М. Группа: регуляторы роста растений. Препаративная форма: кристаллический порошок. Действующее вещество: Гиббереллиновых кислот натриевые соли. Содержание действующего вещества: 340 г/кг. Класс опасности для человека: 3 (малоопасные). Класс опасности для пчел: 4 (практически не опасные).

ГибберРОС – коммерческое название смесового гиббереллинового препарата, выпускаемого в соответствии с ТУ 9.05.104.63-83. Известно около 80 различных гиббереллинов. Они обладают разной активностью, причем различной для разных агрокультур. Применение препарата ГибберРОС позволяет одновременно использовать все полезные метаболиты грибка *Fusarium moniliforme*. В состав ГибберРОСа наряду с гибберелловой кислотой (А₃) входят гиббереллины А₄, А₇, изо-А₇, А₉, изо-А₃ и ряд других гиббереллинов в количествах, суммарное выражение которых значительно превышает А₃. Перед применением препарат ГибберРОС растворяют в воде до необходимой концентрации, равной 50-300 мг/л. Норма расхода препарата ГибберРОС подобрана экспериментально. При ее повышении или понижении снижается устойчивость овощных культур и картофеля к фитопатогенам.

Гибберсиб. Группа: регуляторы роста растений. Гибберсиб рекомендуется использовать на огурцах и томатах открытого и защищенного грунта, капусте, картофеле. Двух– трехкратное опрыскивание в фазу цветения приводит к увеличению урожайности, сокращению сроков созревания. Препаративная форма: порошок. Действующее вещество: Гиббереллиновых кислот натриевые соли. Содержание действующего вещества: 90 г/кг. Химический класс: фитогормон дитерпеновой природы. Способ проникновения: контактный. Характер действия: Системный, профилактический. Класс опасности для человека: 3 (малоопасные). Класс опасности для пчел: 4 (практически не опасные).

«Завязь» ускоряет образование завязей и рост даже при неблагоприятных погодных условиях и отсутствии опыляющих насекомых. Применяется на всех культурах:

- на томатах - 3 раза (в начале цветения первой, второй и третьей кистей),
- на баклажанах и перцах - 2 раза (в начале бутонизации, затем в начале цветения),
- на огурцах - 2 раза (в начале цветения, затем при массовом цветении),
- на плодовых кустарниках 2 раза, в фазах бутонизации, затем зеленых завязей;
- на плодовых деревьях 2 раза, в фазе массового цветения и повторно после опадания лепестков.

Препарат «Бутон» является природным стимулятором плодообразования, увеличивает количество завязей и снижает количество

пустоцветов, предохраняет завязи от опадения, увеличивает урожай на 20-37% и ускоряет созревание на 5-7 дней, улучшает питательные и вкусовые качества, содержание витаминов.

Кроме того, препарат повышает устойчивость растений к заморозкам и засухе, улучшает приживаемость высаженных или посеянных растений, повышает экологическую чистоту овощей, плодов и ягод. Действующее вещество: гиббереллиновых кислот натриевые соли 20 г/кг, гуматы, микроэлементы.

Эффект от применения:

- Увеличивает количество завязей и сохраняет их от опадения, ускоряет плодообразование.
- Повышает урожайность овощей, плодов и ягод на 30-37%, стимулирует рост вегетативной массы зеленных культур.
- Сокращает сроки созревания урожая на 5-7 дней.
- Увеличивает крупность овощей, плодов и ягод, улучшает их питательные и вкусовые качества.
- Повышает энергию прорастания и увеличивает всхожесть семян овощных и злаковых культур, клубнелуковиц декоративных культур и клубней картофеля, обеспечивает получение их более ранних и дружных всходов.
- Укрепляет растения, повышает их сопротивляемость к болезням и стрессам при выращивании в неблагоприятных условиях внешней среды.
- Восстанавливает урожайность плодово-ягодных культур, пострадавших от весенних заморозков.

Цветень – удобрение и стимулятор, гормональный препарат для ускорения цветения и плодообразования. Универсальный стимулятор цветения, образования завязей и созревания плодов на всех культурах. Состав: 0,9 г/кг натриевых солей гиббереллиновых кислот; удобрение с набором питательных элементов.

Преимущества: обеспечивает цветение и плодоношение даже при неблагоприятных условиях; увеличивает ранний и общий урожай до 30%; удобно – все культуры можно обработать одновременно, сроки совпадают. Цветень применяется для обильного цветения, плодообразования на томатах и огурцах, баклажанах, перце, фасоли, капусте, винограде.

Результат от применения: восполняет недостаток гормона цветения «гиббереллина» и подкармливает растения; стимулирует цветение и плодообразование; уменьшает опадение завязей; ускоряет созревание и повышает урожайность; улучшает вкусовые качества продукции.

Безопасность и экология: 3 класс (умеренно опасное вещество); препарат на основе природного гормона; препарат не опасен для пчёл и насекомых-опылителей.

В растениеводстве – для огородных и ягодных культур, в садоводстве, цветоводстве используются лучшие стимуляторы, проверенные многолетней практикой. Особенно незаменимо их применение при неблагоприятных погодных условиях и изменении климата в период развития растений.

препарат «Цветень» - один из таких наиболее часто используемых стимуляторов. «Цветень» – это ускоритель роста для растений, стимулирующий качество цветения и обильность завязей и повышающий плодообразование. Препарат намного снижает опадение завязи на ягодных и овощных культурах. Кроме этого, «Цветень» ещё и стимулятор роста плодов, ускорения их созревания и повышения урожайности. Если сравнивать другие препараты для завязи, то «Цветень» выгодно отличается – при его использовании урожайность в среднем повышается на 25-30 %.

Препарат можно использовать как на защищённом, так и открытом грунте. Применяется «Цветень» для стимуляции цветения и вызревания плодов – капусты, фасоли, томатов, огурцов, винограда, баклажанов, болгарского перца. «Цветень» улучшает вкусовые качества плодов. Состав и механизм действия препарата «Цветень» имеет следующее описание: в составе препарата – набор необходимых растению питательных веществ и натриевые соли гиббереллиновых кислот. Таким образом, «Цветень» одновременно и удобрение, и ростовой регулятор. Основным механизмом действия «Цветеня» – это быстрое восполнение в растении фитогормона гиббереллина, вызывающего цветение.

«Цветень» отлично справляется с неблагоприятными природно-климатическими факторами (внезапное похолодание, засуха) – обработанные им культуры цветут и плодоносят. Препарат даёт более ранние сроки первого урожая и увеличение общей урожайности. А также удобен в применении – практически все обрабатываемые им культуры высаживаются примерно в одно время, соответственно, и обрабатываются сразу все вместе.

3 Аналоги цитокининов и брассиностероидов: препараты цитодеф и эпин-экстра.

Цитодеф-100. Антистрессовый эффект. Препарат обладает активностью природных фитогормонов цитокининов. Действующее вещество: 100 г/кг N-(1,2,4-триазол-4-ил)-N'-фенилмочевины. Действующее вещество препарата обладает активностью природных фитогормонов цитокининов. При воздействии на растение стрессовых факторов, под действием препарата происходит стабилизация белоксинтезирующих систем растений, повышается температурный порог коагуляции белков цитоплазмы, что обеспечивает устойчивость к недостатку влаги. Препарат обеспечивает стабильный синтез хлорофилла в клетках и устойчивую работу фотосинтетического аппарата даже в условиях пониженных температур; ускоряет процессы накопления сахаров в узлах кущения, что повышает морозостойкость. Использование препарата для предпосевной обработки семян способствует получению более ранних и дружных всходов и эффективному использованию проростками почвенной влаги. Применение препарата по вегетирующим растениям в условиях недостатка влаги, повышенных или пониженных температур, обеспечивает стабильный антистрессовый эффект. В зависимости от продолжительности и

интенсивности стрессовых факторов, эффект от применения препарата сохраняется в течение 2-3 недель.

Брассиностероиды представляют собой класс растительных гормонов необходимых для роста, развития и адаптации растений в окружающей среде. Брассиностероиды инициируют множество процессов в растительной клетке, усиливают клеточное деление, элонгацию, биосинтез протеинов, совместно с другими фитогормонами воздействуют на основные физиологические процессы, которые определяют продуктивность и качественные параметры растений. Применение брассиностероидов таких как брассинолид, 24-эпибрассинолид, 28-гомобрассинолид в количествах 5-20 мг на гектар приводит к значительному увеличению выхода пшеницы, риса, картофеля, ячменя и других сельскохозяйственных культур. Растения, обработанные брассиностероидами, оказываются более устойчивыми к засухе, экстремальным температурным условиями засоленности почвы. Исследования в области биосинтеза брассиностероидов, генетического анализа и сигнальных процессов с участием брассиностероидов позволили понять некоторые основные механизмы их действия.

28-Гомобрассинолид является одним из наиболее активных и перспективных для использования в сельском хозяйстве брассиностероидов. Он присутствует во многих растительных объектах, и обладает ростомодулирующим и адаптогенным действием, при этом в ряде тестов превосходит по своей активности брассинолид и 24-эпибрассинолид. Так, например, 28-гомобрассинолид ускоряет развитие ячменя, значительно повышает урожайность фасоли и капусты. В настоящее время на основе 28-гомобрассинолида создан и проходит регистрацию препарат для сельского хозяйства Эпин-плюс. Известно также, что некоторые синтетические аналоги брассиностероидов проявляют заметную биологическую активность, сопоставимую с природными брассиностероидами.

Эти факторы обуславливают научный и практический интерес к исследованию производных 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассиностероидов на цветочно-декоративных культурах в цветоводстве, а также к разработке удобных, высокочувствительных и быстрых методов их анализа.

Эпин Экстра – регулятор и адаптоген широкого спектра действия, обладает сильным антистрессовым действием, воспроизведенный аналог природного вещества. Препаративная форма – раствор. Преимущества препарата: ускоряет прорастание семян; улучшает укоренение рассады, смягчает стресс при пикировке и пересадке; ускоряет созревание плодов и увеличивает урожайность; защищает растения от заморозков, избыточной влажности и других неблагоприятных условий; повышает устойчивость к фитофторозу, пероноспорозу, парше, бактериозу и фузариозу и др.; снижает содержание в растении остаточных количеств пестицидов, тяжелых металлов, радионуклидов, избытка нитратов. Эпин Экстра, Р применяется для усиления роста, развития растений, повышения урожайности и качества, устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Особенно

рекомендован при заморозках (холодовом стрессе), избыточной влажности, наличии вредителей и возбудителей болезней. Препарат не опасен для человека, теплокровных животных, рыб, пчел и других полезных насекомых. Не загрязняет окружающую среду. Не фитотоксичен. Действующее вещество: 24-эпибрассинолид – 0,025 г/л.

Действие: более быстрое прорастание семян; рассада не вытягивается, повышается ее устойчивость к заморозкам, засухе и болезням, отлично приживается при пересадке в открытый грунт; восстанавливаются подмерзшие и привядшие растения, омолаживаются и начинают хорошо плодоносить старые кустарники; обработанные растения не сбрасывают завязь; растения под пленкой защищены от ожогов и заражения фитофторой; в 1,5 раза повышается урожайность, плоды созревают на 2 недели раньше, дольше хранятся; способствует выведению из растений и их плодов солей тяжелых металлов, радионуклидов, гербицидов, нитратов.

Тема 16 Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием

- 1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М).
- 2 Соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат) и тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва).
- 3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

1 1-Хлорметилсилатран (мивал-агро, энергия-М).

Мивал-Агро – регулятор роста растений, помогает решить одну из важнейших проблем в агрономии на данный момент – отрицательное влияние стрессовых факторов на растение. Препарат Мивал-Агро выполняет сразу несколько важных функций: в первую очередь это защита от неблагоприятных воздействий окружающей среды, снятие стрессовой нагрузки с растения, а также улучшение транспорта питательных элементов и ускорение обменных процессов внутри клетки. Таким образом, Мивал-Агро, в отличие от существующих стимуляторов роста растений, обладает более широким спектром биологического действия, а по специфическому механизму действия не имеет аналогов. Ускоряет рост и развитие растения, повышает продуктивность, формирует урожай более высокого качества.

Функции:

1. Защита от неблагоприятных воздействий окружающей среды (как биотических, так и абиотических). Мивал-Агро повышает устойчивость к стрессам и быстро восстанавливает растения, подвергшиеся стрессу (любые виды стрессов – физические, химические, радиационные, поражение болезнями и вредителями).
2. Транспортная функция. Мивал-Агро улучшает проникновение питательных веществ и фитогормонов внутрь клетки. Высокая мембранопроницающая способность хлорметилсилатрана и стимуляция на

клеточном уровне позволяет использовать низкие концентрации препарата (5-20 г/т семян и 10-20 г/га по вегетирующим растениям).

3. Запуск биологических процессов внутри клетки. Мивал-Агро прямо воздействует на синтез АТФ, способствует активизации энергетических процессов, что оказывает непосредственное воздействие на ускорение обмена веществ, поддержание естественного иммунитета и тонуса клетки.

Силатран, входящий в состав Мивал-Агро, обладает высоким дипольным моментом, легко проникает в клетку и облегчает транспорт фитогормонов и элементов питания через мембрану, а также пролонгирует действие фитогормонов, в частности ауксина, второго действующего вещества. Также действует на энергетику клетки растения, заставляет ее работать. Кремний в соединении силатрана выступает в роли активатора физиологических процессов в клетке, облегчает выброс шлаков и ускоряет процессы метаболизма, обеспечивает функциональную активацию клеточных органелл. В клетке кремний способствует образованию соединений, которые связывают свободную воду и превращают ее, в своего рода, гель, и тем самым повышают водоудерживающую способность клетки и растения в целом. Таким образом, кремний препятствует образованию кристаллов льда при заморозках и испарению воды при высоких температурах в засуху.

Почему сельхозпроизводители выбирают регулятор роста растений «Мивал-Агро»?

- Уникальный механизм действия, помощь растению противостоять стрессам;
- Высокая биологическая эффективность;
- Экологическая и генетическая безопасность;
- Простота использования;
- Низкие нормы расхода;
- Содержание действующего вещества 100%;
- Кристаллический порошок, полностью растворимый в воде;
- Совместимость со всеми удобрениями, средствами защиты растений;
- Длительный срок хранения;
- Пролонгированное действие на растения;
- Зарегистрирован для применения на широком спектре культур.

Энергия-М – новый перспективный кремнеауксиновый регулятор роста растений. Кремнеауксины представляют собой комплексные композиции кремнеатрановых структур с синтетическими фитогормонами - аналогами природных ауксинов. Двухкомпонентный состав препаратов позволяет, изменяя их соотношение, обеспечивать нужное воздействие на корневую систему или биомассу растения, в зависимости от с/х культуры и региона, в котором эта культура производится. Производственные испытания проведены в ведущих специализированных с/х учреждениях страны.

Действующее вещество (95%): триэтаноламмониевая соль орто-крезоксиксусной кислоты – синтетический фитогормон (биогенный амин), аналог содержащихся в растениях фитогормонов; 1-хлорметилсилатран, или силацин, представитель группы силатранов, в которых кремний находится в биологически активной форме.

Получение высокой прибавки урожайности при применении Энергия-М обеспечивается широким спектром воздействия препаратов на семена и вегетирующее растение:

- Высокая мембранопроникающая способность и стимуляция на клеточном уровне, позволяющая также использовать низкие концентрации препаратов (5-10,0 г/т семян и 5 -20г/га по вегетирующим растениям);
- Антиоксидантное действие, препараты ингибируют перекисное окисление липидов в мембране клетки;
- Адаптогенное действие, повышающее устойчивость с/х культур к экстремальным температурам (засуха, заморозки) или к резким сменам погодных условий;
- Фунгицидное действие, существенно повышающее устойчивость растений к грибковым и вирусным заболеваниям, а также эффективная защита от септориоза, бурой ржавчины, оливковой плесени, мучнистой росы, корневой гнили и др.

Наряду с повышением урожайности Энергия-М повышает качество сельхозпродукции - защищает растения от накопления нитратов, пестицидов и тяжелых металлов, обеспечивая тем самым более длительное хранение.

Использование кремнеуксусных препаратов решает и ряд социально-экологических проблем:

- Препараты используют в концентрациях, безопасных для человека, животных и пчел.
- Широкое использование препаратов позволяет отказаться от применения генетически модифицированных с/х культур.
- Использование кремнеуксусных препаратов вписывается в существующие технологии агрохимических методов сельскохозяйственного производства.

«Кавказ» - представляет собой особую органическую композицию, состоящую из аналогов природных биологически активных карбоновых кислот (янтарной, фумаровой, гидроксикротоновой, формилакриловой и др.) и их изомерных и циклических форм, вырабатываемых в живых клетках ростовых веществ. Эти вещества и кислоты участвуют в биологическом цикле Кребса. Препарат не имеет аналогов по уникальному сочетанию эффективности и универсальности действия, низкой дозы расхода и безвредности для живых организмов.

Препарат «Кавказ»:

- Оказывает уникальное действие на приживаемость черенков винограда и выход саженцев. Превосходит по действию гетероауксин.

- Проявляет высокую эффективность при укоренении и стимуляции развития цветочных травянистых культур и древесно-кустарниковых культур.
- Активно спасает розы от заболевания мучнистой росы.
- Является высокоэффективным, безопасным для живых организмов и окружающей среды средством повышения урожайности.

Домоцвет (0,05г/л гидроксикоричных кислот) – активатор роста, общестимулирующего, общеукрепляющего и общеоздоравливающего действия. Контролирует многие естественные процессы в жизни цветочно-декоративных культур открытого и защищенного грунта. Запускает целый каскад их собственных защитных реакций. Активирует ферментативную и гормональную системы растения; индуцирует повышенную сопротивляемость к фитопатогенам (особенно корневым гнилям), вредителям, неблагоприятным условиям выращивания; восстанавливает повреждённые растения после перенесённых стрессов (посадка, пересадка, хранение, длительная транспортировка, неоптимальная освещённость и температура, обработка пестицидами, засоленность и др.); возрождает ослабленные и омолаживает старые растения, за счёт стимуляции побегообразования и корневой системы; способствует росту здоровых корней, стимулируя рост полезных микроорганизмов в корневой зоне; вызывает раннее и обильное цветение, интенсивное окрашивание листьев и сочную окраску цветов за счёт усиления синтеза хлорофилла и других пигментов. препятствует распаду хлорофилла, замедляя процесс пожелтения листьев; обеспечивает более полное усвоение элементов питания (как хелатирующий агент удерживает питательные вещества и способствует их постепенной абсорбции растениями); вызывает активное нарастание вегетативной массы, увеличение размера листьев и цветов.

Рострегулирующий и ростстимулирующий эффекты, связанные с активизацией природных фитогормонов и защитой ауксина (ИУК) через механизм ингибирования активности фермента ауксиноксидазы. Активизация природного ауксина, участвующего в делении и росте клеток на всех этапах развития и посадок растений, особенно необходима на стадии прорастания, появления всходов и пересадок растения. Антибактериальное и фунгипротекторное действие, опосредованное стимуляцией иммунитета растений и непосредственным действием на фитопатогены; антиоксидантное действие за счет активирования ряда антиокислительных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза (СОД), положительно влияющее на различные звенья клеточного метаболизма.

В стрессовых условиях способствует восполнению недостающих биологически активных соединений иммуномодулирующего и адаптогенного характера; Усиливая адаптационный потенциал клеток, повышает их устойчивость к действию УФ-излучения, неоптимального температурного, водного и светового режима и других видов стресса, предотвращает снижение урожайности и товарного вида цветочно-декоративных культур.

Особенности применения на различных культурах: При размножении черенками. Замачивание черенков в растворе препарата улучшает укоренение миниатюрных роз на 10-15%, корейских хризантем на 30%, ускоряет на 3-5 дней развитие каллуса, появление корневых бугорков и корней. ДОМОЦВЕТ® увеличивает число корней и зону окоренения стеблевого черенка. При последующем двукратном опрыскивании укорененных черенков после пересадки в горшки улучшается приживаемость растений, и усиливаются ростовые процессы. Так, в опыте, вес сырой массы корней бальзамина Новогвинейского после обработки составил 1,38 г, тогда как в контроле – 0,86 г.

Циркон не относится к комплексным удобрениям, поскольку в нем нет ни минеральных (азотных, фосфорных, калийных), ни органических веществ. Оно имеет следующие свойства:

- Циркон можно использовать в качестве первичной обработки, а также как усилитель действия других подкормок.
- Применяется как дополнительное питание в целях увеличения плодородности почвы и урожайности.
- Препарат повышает иммунитет у растений, помогает культурам раскрыть свой потенциал для активного роста.
- Циркон влияет на клеточном уровне, способствуя омоложению и пролонгации жизнедеятельности растений.

Состав удобрения «Циркон» включает пурпурную эхинацею в виде экстракта, спирт, кислоты гидроксикоричные (0,1 г / л). Для рассматриваемого средства характерен спиртовой запах и светло-желтый оттенок.

Препарат имеет ряд плюсов при использовании в огородничестве и садоводстве:

- предпосевная обработка материала способствует лучшей всхожести семян;
- повышает выносливость растений к перепадам температур, неблагоприятным погодным условиям;
- увеличивает урожайность, плодоношение, цветение;
- борется с патогенной микрофлорой;
- выступает в роли антиоксиданта;
- продлевает жизнь даже срезанным цветам;
- помогает перенести стресс после подпитки грунта минеральными удобрениями;
- обработанная рассада быстрее и надежнее укореняется;
- выступает активатором и регулятором роста растений;
- плоды после использования средства остаются экологически чистыми;
- завязь не осыпается;
- новые насаждения быстро приходят в норму после стрессовой пересадки;

- стимулирует разрастание корневой системы у недавно посаженных растений;
- способствует нейтрализации вредных химикатов, пестицидов, нитратов;
- экономичный расход;
- омолаживает культуры;
- безвреден для человека и окружающей среды;
- после профилактической обработки рассматриваемым веществом молодые саженцы овощей и декоративных цветов не подвергаются влиянию грибов и бактерий.

«Лариксин» – биологический регулятор роста и развития растений, один из наиболее эффективных регуляторов роста, производимых в настоящее время. «Лариксин» используется для предпосевной обработки семян, посадочного материала, для проведения внекорневой обработки растений в период вегетации. Препарат может быть использован как компонент баковых смесей с большинством распространенных пестицидов и растворимых удобрений. Применение препарата возможно и в комплексе с азотными удобрениями в период весенней обработки растений, что позволит сельхозпроизводителям снизить норму расхода фунгицидов. При протравливании семян препарат «Лариксин» позволяет сократить норму протравителя до 50%, что уменьшит уровень химической нагрузки, а также способствует более качественной обработке семян, так как имеет свойства прилипателя. Препарат «Лариксин» обладает высокой биологической активностью против комплекса болезней, оказывая мощное стимулирующее действие на иммунную систему растений, обеспечивая существенную прибавку урожайности, а также ускоряет развитие вегетативных органов.

Препарат «Лариксин» эффективен на широком спектре культур: на яровой и озимой пшенице, ржи, ячмене, горохе, подсолнечнике, сахарной свекле, просе, картофеле, огурце, томатах, винограде, яблоне.

2 Соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат) и тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва).

Бигус – гуминовый препарат на основе сапропеля. Сапропель – это вещество биологического происхождения, тысячелетиями образующееся на дне пресноводных водоемов из продуктов растительного и животного происхождения в результате бактериальных процессов, происходящих при малом доступе кислорода.

Сапропель богат разнообразными макро- и микроэлементами, среди которых: азот, фосфор, калий, кальций, железо, сера, серебро, молибден, кобальт, магний, марганец, медь, никель, ванадий, цинк и многие другие. Ценную группу биологически активных веществ образуют витамины группы В (В1, В2, В3, В6, В12), С, Е, D, Р и другие.

Органическая часть сапропеля содержит природный комплекс гумусовых веществ, включающий гуминовые и фульвокислоты, а также

аминокислоты, которые участвуют в образовании почвенной структуры и являются ключевыми элементами для формирования плодородия почвы.

Преимущества:

- обеспечивает сбалансированное питание растений всеми полезными элементами повышает усвояемость питательных веществ растением из почвы;
- повышает урожайность до 50%;
- повышает энергию прорастания семян на 10-30%;
- стимулирует развитие корневой системы, рост и развитие растения;
- повышает устойчивость к заболеваниям и снимает «пестицидный» стресс;
- улучшает качество продукции, снижает количество нитратов.

Лигногумат – это высокоэффективный технологичный препарат, созданный путем ускоренной гумификации растительного сырья. Он является сильнейшим естественным стимулятором роста и антистрессантом. Состав содержит микроэлементы в органически связанной форме, которая отлично усваивается растениями. Лигногумат отличается высокой концентрацией биологически активных действующих веществ - до 900 г/кг.

Новосил – натуральный природный стимулятор иммунитета и роста растений. Препарат используется для предпосевной обработки семян и опрыскивания растений в период их роста. Применяется для всех видов овощных, зерновых и технических культур, плодово-ягодных деревьев и кустарников. Химический состав активной части препарата состоит из тритерпеновых кислот, выделенных из древесной зелени сибирской пихты. Потребление препарата составляет 12-30 г. на гектар. Расход рабочей жидкости 300-400 л/га. Используется обычное сельскохозяйственное оборудование. Нормы потребления и условий обработки особых культур описаны в инструкции. Совместим со всеми пестицидами, рекомендуется совместная обработка в баковых смесях. Препарат плотно упакован и сохраняет свою биологическую активность в течение 3-х и более лет. Хранится в закрытом помещении вдали от нагревательных приборов при температуре естественных условий (воздействие прямых солнечных лучей исключается). Урожай на полях с использованием «Новосила» превосходит урожай с полей, обработанных химическими и синтетическими фунгицидами аналогичного назначения. При этом, стоимость гектарной нормы «Новосила» в несколько раз ниже стоимости известных фунгицидов и прочих удобрений.

НОВОСИЛ имеет комплекс уникальных свойств:

- стимулирует рост растений и сокращает время созревания;
- снижает заболеваемость растений грибными болезнями;
- повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды – заморозкам и засухе;
- ускоряет прорастание и всхожесть семян;
- увеличивает урожайность на 10-15%;
- уменьшает потери при хранении урожая.

Биосил, ВЭ (100 г/л смеси тритерпеновых кислот) – регулятор роста растений. Препаративная форма - водная эмульсия, в состав которой входят: экстракт хвои сибирской пихты, прилипатель, бактерицид, микроэлементы в виде хелатных комплексов и другие биодобавки. Препарат обладает ростостимулирующими, фунгицидными и бактерицидными свойствами. Повышает всхожесть семян, усиливает корневую систему и кустистость, увеличивает массу семян и количество зерен в колосе, увеличивает содержание клейковины у пшеницы на 2-3% и повышает урожайность до 15%. Совместим с другими пестицидами. Препарат не фитотоксичен. Расходная норма применения препарата в среднем 50 мл/га. Биосил, ВЭ зарегистрирован на следующих культурах: томаты, огурцы, пшеница озимая и яровая, ячмень яровой и озимый, картофель, капуста белокочанная, кукуруза, подсолнечник, виноград, соя, гречиха, свекла, яблоня.

Регулятор роста растений «ВЭРВА» – натуральный препарат, вырабатываемый из хвои пихты. Он создан учеными Института химии Коми для стимуляции развития и защиты от болезней сельскохозяйственных культур. В итоге его применения урожайность сельскохозяйственных культур увеличивается в среднем на 20-25%. Также за счёт его действия значительно снижается риск поражения растений бактериальными и грибковыми инфекциями, возрастает устойчивость к влиянию неблагоприятных почвенно-климатических условий.

Благодаря применению регулятора роста для предпосевной обработки семян повышается всхожесть, ускоряется формирование корневой системы. Также при предпосевной обработке семян или при опрыскивании растений на стадии вегетации водным раствором препарата «ВЭРВА» в них увеличивается содержание хлорофилла, аскорбиновой кислоты и каротиноидов, что повышает устойчивость к заморозкам и засухе. Растения и плоды накапливают больше сахаров и витаминов, надолго сохраняют товарный вид. При длительном хранении урожай не подвержен порче и гнили.

Проведенные испытания препарата в условиях северной, южной и центральной частей России показали хорошие результаты получения урожаев сельскохозяйственных культур. В ходе их проверки подтвердилось отсутствие в их составе нитратов и других, вредных для здоровья человека химических соединений.

3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

Янтарная кислота – недорогой стимулятор роста растений. Водные растворы янтарной кислоты применяются для замачивания семян, черенков, обработки корней и листовых опрыскиваний.

Янтарная кислота – регулятор роста растений и стрессовый адаптоген: повышает устойчивость к неблагоприятному воздействию окружающей среды, ускоряет цветение и увеличивает урожайность. Она быстро

разлагается в почве и не загрязняет окружающую среду. Наибольший эффект достигается при обработке молодых растений.

У обработанных янтарной кислотой семян повышается всхожесть, растения лучше развиваются и реже болеют. Для замачивания семян используют 0,004%-ный раствор (40 мл 1%-ного основного раствора разбавляют в 1 л воды). Замачивают семена перед посевом не более чем на сутки, после слегка просушивают и высевают в грунт.

Обработка многолетников при пересадке и делении способствует образованию новых корешков и лучшей приживаемости. Для обработки используют 0,02%-ный раствор в течение 2–3 (до 5) часов. В растворе выдерживают корни растений. Листву можно слегка смочить или опрыскать. Жесткие плотные листья можно протереть ватным тампоном, смоченным в растворе.

Опрыскивание растений янтарной кислотой для стимуляции роста молодых побегов у растений. Проводится слабо концентрированным раствором до или после цветения. Опрыскивание 0,01%-ным раствором янтарной кислоты ранней весной повышает устойчивость растений к заморозкам.

По осени также можно провести опрыскивание растений янтарной кислотой, это поможет снизить риск загнивания от избыточной влажности. Для осеннего опрыскивания используют более крепкий раствор.

Янтарная кислота это универсальный стимулятор роста и развития цветов и декоративных растений. Янтарная кислота используется для стимуляции всех вегетативных процессов у растений. Янтарной кислотой обрабатывают как взрослые растения, так и посадочный материал.

Природный стимулятор роста янтарная кислота содержится в янтаре, который представляет собой окаменелую за многие тысячелетия смолу древних сосен. Также она присутствует в не созревших ягодах, репе, сахарном тростнике и т. д. Так как янтарная кислота не токсична, ее применение помогает избавляться от вредного техногенного влияния на почвенные структуры, не загрязняя дополнительно действующим веществом. Препарат благотворно влияет на активность микрофлоры почвы, обеспечивая интенсивную биологическую переработку минеральных удобрений.

Стимулятор роста растений «Универсальный» представляет собой особую органическую композицию, состоящую из аналогов природных биологически активных карбоновых кислот (янтарной, фумаровой, гидроксикротоновой, формилакриловой и др.) и их изомерных и циклических форм, вырабатываемых в живых клетках ростовых веществ.

Под действием препарата снижается осыпание завязи, ускоряется созревание плодов, увеличивается средняя масса одного плода. В следствии повышается качество продукции:

- заметно возрастает содержание сахара;
- заметно возрастает содержание аскорбиновой кислоты;
- заметно возрастает содержание антоцианов и катехинов;
- увеличивается процент стандартных плодов;

- резко повышается дегустационная оценка плодов.

- Препарат дает очень хороший эффект на моркови, свекле, зеленом горошке, луке, чесноке, петрушке и других зеленых культурах при опрыскивании растений в фазу 5-7 листьев (концентрация 0,0075%-0,01%, 0,75-1,0 г/10л или 30-40 г/га при расходе рабочего раствора 400 л/га).

- Обработка картофеля перед посадкой: 0,25 г препарата растворить на 1 л воды, клубни разложить на пленке слоем в ~10 см, смочить приготовленным раствором и накрыть пленкой. Выдержать 6-24 часа и высадить в грунт. Растения картофеля опрыскивают в фазу бутонизации 0,0075%-ным рабочим раствором при расходе раствора 400 л/га (0,75-1,0 г/10л)

- Для обработки семян их погружают в раствор препарата (0,75-1,0 г/10 л, выдерживают 6-12 часов, затем сушат и высевают. Для обработки черенков винограда 0,5 г препарата растворяют в 10 л воды, черенки полностью погружают в раствор на 24-48 часов, затем высаживают.

Препарат легко растворяется в воде, стабилен при хранении, совместим со всеми средствами защиты растений и гербицидами. При работе с ним необходимо соблюдать обычные меры предосторожности (избегать попадания на слизистую оболочку и вовнутрь). Срок годности 3 года.

Тема 17 Культуры клеток и тканей в биотехнологии растений

1 Типы культур клеток и тканей растений.

2 Направления использования культуры клеток и тканей.

3 Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений.

1 Типы культур клеток и тканей растений.

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к следующим асептически выращиваемым частям растения: изолированным зародышам, изолированным органам (кончики корней, меристемы побегов, листовые примордии, части молодых цветков и плодов), каллусной ткани, суспензионной культуре, культуре протопластов.

Эксплант (лат. *explantum* – вырываю что-нибудь, растущее с корнем) – группа клеток, отделенная от материнского организма. У двудольных растений, эксплантами могут являться, например, части гипокотилей, стеблей, корней, семядоли, пыльники и прочее. При культивировании эксплантов на питательных средах различного состава, можно наблюдать **каллусогенез** или **органогенез** (образование корней, побегов и пр.)

Набор объектов растительного происхождения, которые можно перевести в культуру *in vitro*, достаточно широк. Как правило, большинство исследований проводится с эксплантами разных органов, тканей и клеток семенных растений. Это можно объяснить большой ролью в жизни человечества покрыто- и голосеменных растений. Среди них наиболее удобными объектами для культивирования являются двудольные травянистые растения, затем следуют однодольные травянистые виды и

зерновые культуры. Труднее создать условия для стабильных *in vitro* культур древесных растений, особенно голосеменных.

В качестве объектов, используемых для культивирования *in vitro*, также могут выступать мхи, лишайники и папоротники. Многоклеточные водоросли трудны для поддержания их в культуре, хотя они, несомненно, перспективны в качестве источников фитопродуктов для медицины, пищевой промышленности и других биотехнологий. Большое внимание биологи отводят выращиванию микроводорослей.

В настоящее время нет такого высшего растения, из которого нельзя получить культивируемые клетки и ткани. Однако выращиваемые поверхностным способом на агаризованной питательной среде каллусные ткани и растущие в жидкой питательной среде суспензионные клеточные культуры требуют создания разных условий для роста в случае различных таксонов.

В основе метода культуры клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – **тотипотентность**.

Тотипотентность – это способность клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

В отличие от животных в природных условиях у растений тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки, например, при заживлении ран. В этом случае на раневой поверхности растения в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие **каллуса** (лат. «мозоль»). Образование каллуса можно наблюдать при прививках в местах срастания привоя и подвоя. Каллус первоначально состоит из недифференцированных клеток.

Однако в природных условиях растения ряда систематических групп тотипотентность не проявляют. Ввиду высокой специализации клеток многие однодольные растения утратили способность к раневой реакции и вегетативному размножению.

Метод культуры клеток и тканей растений в настоящее время широко используется для решения ряда теоретических и практических задач биологии. Это обусловлено тем, что данный метод имеет следующие преимущества:

- простота клеточных моделей;
- отсутствие коррелятивных взаимодействий и контроля со стороны других тканей, органов, целого организма, что позволяет проследить состояние клетки на уровне первичных элементарных процессов в ответ на любые воздействия;
- возможность быстро получать достаточную массу в асептических условиях;
- контролируемые по многим параметрам условия выращивания.

2 Направления использования культуры клеток и тканей.

Культивируемые растительные клетки используются для изучения вторичного метаболизма, его регуляции путем блокирования или усиления работы отдельных ферментов, а также под влиянием различных факторов.

Важной проблемой физиологии растений является познание сущности процессов роста, клеточной дифференциации и морфогенеза. Ее решение возможно путем моделирования этих процессов в культуре клеток и тканей с применением методов молекулярной биологии и генетики. На культивируемых клетках-моделях можно изучать такие процессы, как деление и растяжение клеток, индукция делений и каллусообразование, дифференцировка клеток и морфогенез под влиянием как внешних, так и внутренних факторов, прежде всего фитогормонов.

Метод культуры тканей позволяет создать хорошо воспроизводимую биологическую модель для изучения опухолевого роста. Для выявления структурных и метаболических особенностей опухолевой ткани ее сравнивают с нормальной тканью того же растения.

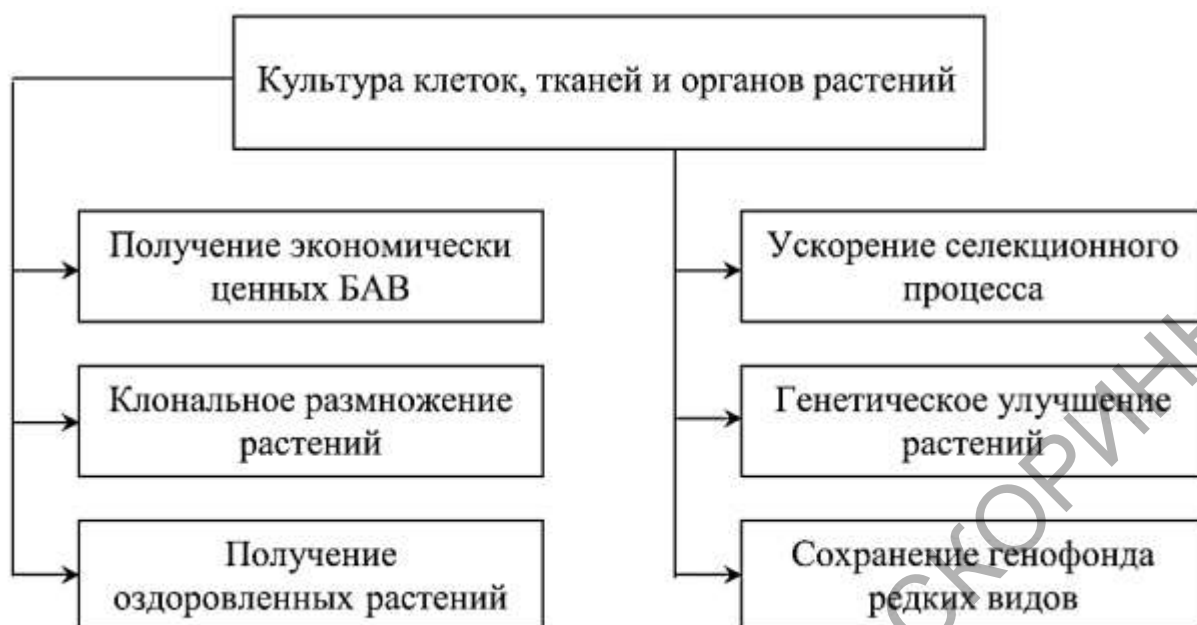
Культура клеток широко используется для изучения генетики соматических клеток. В этих исследованиях наряду с моделями, близкими по характеристикам к клеткам интактного растения, широко используются модельные системы, созданные методами клеточной и генетической инженерии. Этими методами получают гибридные клетки с самыми разными сочетаниями информационных систем не только ядер, но и хлоропластов и митохондрий.

Культура клеток и тканей также служит моделью для изучения устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам окружающей среды: абиотическим (засолению, кислой среде, низким температурам и т.д.) или биотическим факторам (патогены разного происхождения, вызывающие болезни растений и др.).

На культивируемых клетках и тканях исследуются различные аспекты фитопатологии, физиологии и биохимии больного растения. Этот подход позволяет наблюдать прямую реакцию растительной клетки на воздействие патогена.

Однако при использовании культуры клеток и тканей для моделирования физиологических процессов важно помнить, что клетки в системе *in vitro* и в живом организме не всегда равноценны. Несомненно, что дальнейшее изучение биологии культивируемой клетки и совершенствование методов культивирования с целью максимального приближения условий *in vitro* к нативным позволят по-новому и эффективно решать многие проблемы физиологии, биохимии и генетики растений.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в нескольких направлениях.



Первое из них связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Эта особенность широко используется для создания технологий промышленного получения БАВ. Помимо биосинтеза важных соединений, культивируемые клетки способны к биотрансформации, т.е. превращению дешевых предшественников в ценный конечный продукт.

Второе направление – это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Преимущества клонального микроразмножения столь велики, что сейчас разработаны рентабельные биотехнологии получения посадочного материала хозяйственно ценных оздоровленных сортов картофеля, винограда, овощных, плодовых, декоративных растений и лесных пород. Таким путем создается система безвирусного растениеводства.

Третье направление – использование изолированных клеток и тканей в селекции растений. Метод культуры тканей открывает новые возможности для расширения генетического базиса, для облегчения и ускорения селекционного процесса, а также для конструирования принципиально новых форм растений.

Криосохранение культивируемых клеток является еще одним направлением их использования в биотехнологии. Это означает длительное хранение штаммов клеток растений при температуре жидкого азота (-196°C) в целях создания банка генов редких и исчезающих видов, ценных

селекционных объектов и штаммов-продуцентов веществ вторичного происхождения.

На рисунке представлены основные отрасли народного хозяйства, в которых используются культивируемые клетки растений.

Таким образом, в настоящее время прогресс в растениеводстве, фармакологии, пищевой, парфюмерной, легкой, химической промышленности теснейшим образом связан с дальнейшим развитием клеточных технологий растений и их ускоренным внедрением в народное хозяйство.



3 Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений.

Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения. Растения отличаются от бактерий и особенно животных поразительным многообразием синтетических процессов. Количество биологически активных соединений, синтезируемых растениями, огромно. Все они, как правило, относятся к продуктам вторичного (специализированного) обмена. Вторичные метаболиты характеризуются таксономической специфичностью. Основное их назначение заключается в обеспечении биохимической адаптации растений к существованию в биоценозах. Так, среди вторичных метаболитов обнаружены соединения с аллелопатическими, инсектицидными, фунгицидными, бактерицидными свойствами, а также фитоалексины и вещества, подобные гормонам животных.

Особый интерес для человека представляют те биологически активные соединения, которые могут быть использованы в медицине, технике, пищевой и парфюмерной промышленности, сельском хозяйстве.

Если для получения ценных БАВ традиционно использовались целые организмы (микроорганизмы, растения, животные), то современная биотехнология нацелена на клеточные технологии, основанные на культивировании свободных и иммобилизованных клеток.

Как альтернативные источники БАВ растительного происхождения клеточные культуры обладают следующими преимуществами:

- получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды;
- создание клеточных линий-сверхпродуцентов путем генетических манипуляций;
- сохранение пула генов редких и исчезающих растений-продуцентов;
- возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания;
- возможность автоматизации процессов.

На рисунке показаны основные аспекты применения культур клеток растений в качестве продуцентов БАВ.



Благодаря усилиям многих исследователей накоплено немало ценной информации о способности культивируемых растительных клеток синтезировать многие традиционные экономически важные продукты: терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины. Также доказана возможность культур клеток осуществлять биотрансформацию, то есть

синтезировать некоторые БАВ из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных метаболитов не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря активности ферментов клеток растений в культуре происходит их превращение в ценный конечный продукт.

Перевод клеток в условия *in vitro* может также приводить к синтезу совершенно новых соединений с принципиально другим механизмом действия. Например, японские исследователи добились успехов в получении таких новых БАВ, как необычные пептиды, антиканцерогенные соединения, убихинон-10 и др.

Популяциям культивируемых *in vitro* растительных клеток присущи определенные особенности протекания процессов вторичного метаболизма.

Важной их характеристикой является степень стабильности в отношении синтеза, транспорта и депонирования физиологически активных соединений. Высокая биосинтетическая способность может сохраняться в течение всего времени существования популяции. Однако известны примеры постепенного (в течение нескольких лет) увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов. В случае полной «нестабильности» клетки в популяции очень быстро теряют способность к синтезу вторичных метаболитов, что связано с прекращением *in vitro* экспрессии генов, участвующих в образовании БАВ.

В растительном организме синтез метаболитов, их транспорт и отложение в запас зачастую разделены во времени и осуществляются в разных органах растения. Например, алкалоид никотин, который синтезируется в корнях табака, а уже оттуда поступает в листья, где и накапливается. В условиях *in vitro* все стадии вторичного метаболизма – от синтеза до депонирования – обычно проходят в одной клетке.

Эпибласты и млечники, в которых может осуществляться отложение различных веществ, являются редкими структурами в каллусных культурах.

Одной из особенностей популяций культивируемых растительных клеток является различная степень корреляции синтеза вторичных метаболитов с процессами дифференцировки. В организме растения вторичный метаболизм присущ только дифференцированным клеткам, специализированным органам и протекает только на определенных этапах их развития. Каллусные культуры зачастую характеризуются низким содержанием искомого вещества, что, по-видимому, вызвано отсутствием дифференциации ткани. Однако это неабсолютное правило.

Появляется все больше данных, что органогенез в культуре не является необходимым условием для биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. Например, органогенез иногда сопровождается снижением содержания продуктов вторичного обмена веществ. Также неоднозначны данные о взаимосвязи их накопления с фазами ростового цикла клеточных культур. У многих видов при периодическом режиме выращивания вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах лишь при замедлении или остановке роста. Предполагается, что механизмы и условия,

блокирующие деление клеток и активный рост, могут одновременно являться и механизмами активации, обеспечивающими синтез ферментов вторичного метаболизма. Однако известны такие культуры, у которых синтез продукта способствует росту клеток. В любом случае, на первом этапе культивирования стараются создать оптимальные условия для роста, то есть накопления биомассы, а затем исследуют влияние этих условий на биосинтез вторичных метаболитов.

Накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений зависит от ряда факторов. Во-первых, выход продукта определяется генотипом донорного растения, правильным выбором его ткани или органа для введения в культуру. В большинстве случаев это главное условие, определяющее качество получаемого продукта. Как правило, высокий выход продукта наблюдается в культурах, инициированных из высокопродуктивных растений. Выбор органа также имеет немаловажное значение. Например, содержание стероида диосгенина в культуре клеток *Dioscorea floribunda*, полученной из клубня, было на порядок выше, чем в культуре клеток, полученной из побега.

Во-вторых, на выход продукта влияет гетерогенность культивируемых клеток по способности к синтезу вторичных метаболитов. Как отмечалось ранее, у культивируемых *in vitro* клеток могут происходить значительные изменения вторичного метаболизма по сравнению с интактными растениями. Одной из причин изменения интенсивности вторичного метаболизма в культуре клеток выступает генетическая их гетерогенность. Вместе с тем гетерогенность клеточной популяции может играть положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с повышенным синтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно новые вещества.

В-третьих, в качестве факторов, оказывающих влияние на накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений, выступают состав питательной среды и физические условия культивирования. Важнейшими компонентами питательных сред, эффективно регулируемыми и первичный, и вторичный обмен клеток, являются фитогормоны. Показано, что характер влияния фитогормонов зависит от вида растения, природы вторичного соединения, клеточного штамма и т.д. Поэтому результаты экспериментов по выяснению воздействия фитогормонов на синтез вторичных метаболитов крайне противоречивы. При изучении влияния 146 соединений с ауксиновой активностью на рост и образование антрахинонов в культуре клеток моринды лимоннолистной было установлено, что многие регуляторы поддерживали хороший рост клеток, но только два: НУК и 2,3,6-трихлорбензойная кислота, наряду со стимуляцией роста, способствовали образованию антрахинонов.

Увеличение выхода вторичных метаболитов во многих случаях наблюдается при повышении концентрации сахарозы в питательной среде. Вместе с тем высокое ее содержание приводит к возрастанию осмотического потенциала, что может оказывать неблагоприятное влияние на метаболизм культивируемых клеток. Нельзя не учитывать, что увеличение содержания

сахарозы в среде удорожает производство, поэтому поиск дешевых углеводных добавок остается актуальным.

Среди других компонентов питательной среды регулирующее воздействие на накопление вторичных метаболитов могут оказывать источники азота, фосфора и калия. Однако характер их влияния значительно различается в зависимости от вида растения и синтезируемого соединения. Так, если у одних культур присутствие органических форм азота в среде тормозит накопление вторичных метаболитов, то у других – повышает их синтез. Установлено, что недостаток фосфора в среде стимулирует синтез многих БАВ, хотя очень низкие его концентрации будут подавлять процессы энергетического метаболизма и, следовательно, снижать накопление вторичных метаболитов.

Положительный эффект на биосинтез вторичных веществ оказывает наличие в среде некоторых предшественников самих искомым соединений. Это могут быть аминокислоты (глутамат, фенилаланин, лейцин, орнитин и др.) и органические кислоты (ацетат, сукцинат, шикимовая и др.). Однако не всегда их внесение вызывает увеличение выхода продукта. Отсутствие желаемого эффекта можно объяснить разными причинами: предшественники не поглощаются клетками, происходит их распад в процессе приготовления и стерилизации сред или же они переходят в другие физиологически неактивные формы. Не исключено, что некоторые предшественники могут оказывать побочные эффекты на рост культуры, в частности, ингибировать его.

Во многих случаях буферная емкость питательных сред является достаточно низкой, поэтому величина исходного pH при культивировании быстро сдвигается на несколько единиц, а это, в свою очередь, сказывается на биосинтетических свойствах культивируемых клеток. Например, в культуре клеток *Ipomea*, которая биотрансформирует триптофан в различные метаболиты индольной природы, выход такого продукта как триптанол значительно увеличивается при pH 6,3 и полностью подавляется при pH 4,8. Поэтому поддержание кислотности питательной среды на определенном уровне также является важным фактором, от которого зависит образование БАВ в культуре. Следует отметить, что оптимизация состава питательной среды является ключевым условием для повышения выхода продукта. В результате подобных исследований разрабатываются так называемые продукционные среды, на которых культивируемые клетки синтезируют значительное количество вторичных метаболитов.

Физическими факторами, влияющими на накопление БАВ клетками, являются освещенность, температура, аэрация и режим перемешивания в случае суспензии, а также состав газов в колбах. Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, коричных масел, флавоноидов, пластохинонов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. При этом имеет значение и качество света. Однако в некоторых случаях свет оказывал ингибирующее действие, подавляя синтез вторичных метаболитов.

Данных о влиянии температуры на рост и процессы биосинтеза в клеточных культурах очень мало, но поскольку температура влияет на вторичный метаболизм интактных растений, исследования в этом направлении являются достаточно необходимыми. Тем более, что оптимумы температуры для роста культуры клеток и процессов биосинтеза БАВ не всегда совпадают.

Для получения вторичных метаболитов из суспензионных культур важны также аэрация и скорость перемешивания. Так, в культуре клеток табака увеличение скорости перемешивания приводило к повышению выхода никотина.

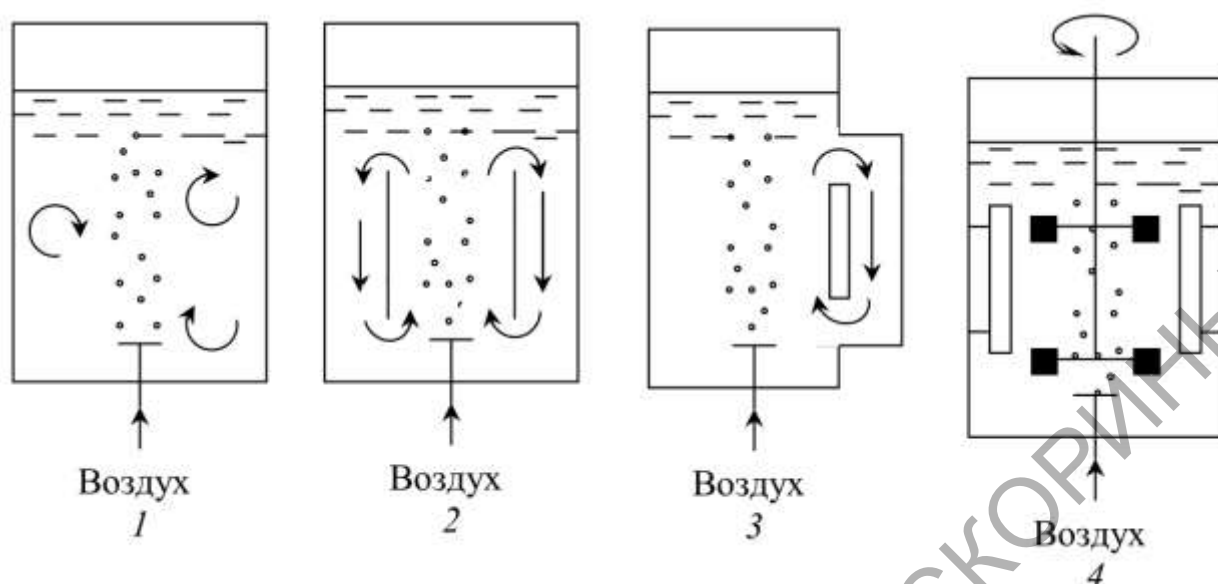
В целом следует отметить, что накопление клетками продуктов вторичного метаболизма является результатом динамического равновесия между биосинтетическим, биотрансформационным и биodeградационным процессами. Влияние внешних и внутренних факторов на каждый из этих процессов имеет сложный характер, и зачастую из-за отсутствия фундаментальных знаний с трудом поддается прогнозированию. Поэтому следует признать оправданным тот эмпирический подход при изучении влияния факторов культивирования на накопление вторичных веществ, который продолжает использоваться и в настоящее время.

Биотехнологическое производство вторичных метаболитов растений осуществляется преимущественно при культивировании клеточных суспензий. Очень большое значение для их роста и образования целевых продуктов имеют технические характеристики систем культивирования.

Длительное время для создания технологий промышленного выращивания суспензионных культур применялась аппаратура, разработанная для микробиологической промышленности. Однако исследования последних лет показали, что растительные клетки в силу своих специфических особенностей требуют особых сосудов для культивирования. Клетки растений в десятки, сотни раз крупнее клеток бактерий и грибов, кроме того, их размеры меняются в процессе онтогенеза. Если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они сильно увеличиваются в размерах и вакуолизируются. Чем крупнее становится клетка, тем больше возрастает опасность ее механического повреждения. В то же время клетки растений крупные и тяжелые требуют эффективного перемешивания.

В зависимости от принципа перемешивания культуральной жидкости биореакторы подразделяются на два больших типа по своей конструкции.

В биореакторах первого типа перемешивание осуществляется только путем аэрирования воздухом. При этом в барботажных биореакторах – за счет поднимающихся пузырьков воздуха, а в аэролифтных – с применением специальной конструкции с внутренним цилиндром, создающей градиент плотности суспензии (рисунок).



Принципиальные схемы биореакторов, наиболее часто применяемых для культивирования суспензионных культур:

- 1 – барботажный биореактор; 2 – аэролифтный биореактор;
- 3 – биореактор с вынесенной циркуляционной петлей; 4 – биореактор с механическим перемешивающим устройством.

Для биореакторов второго типа характерно наличие механических перемешивающих устройств.

- Использование биореакторов для исследования популяций растительных клеточных имеет следующие преимущества:

- большой объем культивационного сосуда позволяет, не внося существенных возмущений, отбирать пробы большого объема, что очень важно при анализе вторичных метаболитов, часто содержащихся в очень низких концентрациях;
- возможность управления процессом культивирования по определенному алгоритму на основе показаний датчиков, установленных в биореакторах.

Вместе с тем культивирование клеточных суспензий в биореакторах связано и с некоторыми проблемами:

- оседанием клеток вследствие недостаточного перемешивания, что приводит к появлению «мертвых» зон в сосудах, в которых происходит быстрое накопление и старение клеток;
- увеличением вязкости суспензии вследствие роста биомассы, приводящим к адгезии – прилипанию клеток друг к другу, поверхности культурального сосуда, погруженных в него мешалок и датчиков;
- образованием в верхней части сосуда «корки» или «безе», состоящей из полисахаридов, белков, слипшихся клеток и снижающей эффективность перемешивания, что в конце концов может привести культуру к гибели.

В настоящее время наиболее приемлемым способом получения больших количеств вторичных метаболитов растений является двустадийное культивирование. Его первая стадия связана с образованием больших количеств биомассы культивируемой суспензии, а вторая предполагает создание условий для активного биосинтеза необходимых продуктов. Обеспечив благоприятные условия культивирования на обеих стадиях *in vitro* можно добиться получения выхода вторичного метаболита в количестве, синтезируемом *in vivo*, а иногда и выше.

Большой интерес представляет также развитие методов иммобилизации культивируемых клеток и биотрансформации ими метаболитов. Суть иммобилизации состоит в заключении живых клеток в определенный носитель. Затем через носитель с клетками пропускают питательную среду. При этом клетки прекращают рост, но могут достаточно долго оставаться живыми и продуцировать необходимые вещества.

Клетки могут быть иммобилизованы 4 способами:

- иммобилизация в инертном субстрате, т.е. обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред (альгинат, агар, полиакриламид, коллаген или комбинация гелей);
- адсорбция клеток на инертный субстрат;
- адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул;
- ковалентное связывание клеток с каким-либо инертным субстратом типа карбоксилметилцеллюлозы.

Вокруг физически неподвижных иммобилизованных клеток могут циркулировать большие объемы питательной среды, регулируя состав которой, замедляют рост клеток и тем самым повышают выход вторичных продуктов.

Поскольку клетки в иммобилизованном виде культивируются длительное время, то для этого используются клетки, которые сами, естественным путем, секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или могут быть индуцированы к такой секреции какими-либо приемами, например воздействием низких температур и растворителей. Клетки, которые накапливают искомый продукт внутри, например, в вакуолях или пластидах, не пригодны для иммобилизации.

Иммобилизованные клетки могут быть использованы не только для синтеза, но и для биотрансформации различных соединений. Очень часто растения или культуры клеток растений не доводят синтез метаболита до наиболее важного продукта, и тогда можно использовать процесс биотрансформации. В качестве примера можно привести использование суспензии клеток наперстянки, синтезирующей дигитоксин, тогда как для медицинских целей нужен дигоксин. Сердечный гликозид дигоксин обладает большим терапевтическим эффектом по сравнению с дигитоксином, которого в растениях содержится значительно больше. Дигоксин отличается от дигитоксина лишь по наличию дополнительной гидроксильной группы. Недифференцированные культуры клеток наперстянки шерстистой не

образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенную реакцию биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду.

Биотрансформация необходима для гликозилирования фенольных продуктов корня женьшеня *in vitro*. Культура клеток женьшеня корневого происхождения активно трансформирует фенольные вещества (гликозилирует и гептозилирует), модифицирует ароматические карбокислоты.

Другим примером служит биотрансформация монотерпеновых соединений (компонентов эфирных масел) культурами клеток разных видов мяты. Путем биотрансформации можно значительно изменить качественный состав компонентов эфирного масла мяты. В частности, эффективна биотрансформация пулегона в более ценные компоненты (ментол) в культуре клеток *Mentha canadensis*.

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы. Работа по созданию клеточных технологий для получения вторичных метаболитов в настоящее время включает следующие этапы:

1. Экономически обоснованный выбор объекта. Растения, выбранные для введения в культуру, должны содержать значительные количества экономически важных вторичных соединений. Особенно это относится к исчезающим видам растений.

2. Первичное введение тканей в культуру. Для этих целей отбираются отдельные растения, обладающие наибольшим содержанием искомого вещества. Обычно вначале получают каллусы на твердой среде.

3. Биохимическое изучение биомассы по качественному и количественному составу вторичных метаболитов. Определение очень низких концентраций метаболитов в медленно растущих клетках представляет большую трудность. Поэтому в качестве экспресс-методов оценки продуктивности каллусных культур в последнее время применяют радиоиммунохимический и иммуноферментный методы. Последний имеет преимущества благодаря более высокой скорости проведения анализов и возможности их автоматизации.

4. Оптимизация сред и параметров выращивания. Для реализации генетической информации, детерминирующей вторичный обмен, требуются специфические условия. Поскольку нет твердой уверенности в том, что используемые питательные среды полностью отвечают потребностям клеток, в каждом конкретном случае приходится подбирать состав среды и определять влияние других факторов, опираясь на имеющийся опыт. Эта задача еще более усложняется при переводе культуры в жидкую среду, так как при этом следует учитывать влияние факторов аэрации и перемешивания.

5. Создание продуктивных штаммов клеток. Получение гомогенной популяции клеток с высоким содержанием тех или иных вторичных веществ – сложная задача, так как популяции длительно культивируемых клеток даже полученные клонированием одной высокопродуктивной клетки, могут терять способность к синтезу ценного соединения. Для поддержания на высоком

уровне способности культуры к видоспецифическим биосинтезам, помимо оптимизации условий выращивания, требуются значительные усилия, включая проведение с ней генетических манипуляций и клеточную селекцию. Для организации рентабельного крупномасштабного производства на основе клеточной технологии нужны мутанты, синтезирующие гормоны, нетребовательные к питательным средам, а также устойчивые к осмотическому и механическому стрессу. Наиболее эффективным приемом создания продуктивных штаммов является искусственное конструирование клеток методами клеточной и генной инженерии, которым принадлежит будущее.

6. Первичное использование лучших штаммов в суспензионной культуре. Каллусные клетки, первоначально полученные на твердой среде, переводят в жидкую среду. Изменение режима культивирования не должно приводить к потере штаммом своих положительных качеств, т.е. штамм должен быть устойчив к стрессовым условиям культивирования. Особенно это касается момента переноса клеток из условий лабораторного эксперимента в небольших колбах в ферментеры крупных размеров.

7. Выращивание продуктивной и устойчивой культуры в условиях, приближающихся к производственным, в ферментерах с последующим увеличением их емкости. Если в таких полупромышленных условиях культивируемые клетки сохраняют высокие скорости роста и биосинтеза искомого вещества, накапливают его без деградации и в значительных количествах выделяют в среду, то такой штамм пригоден для организации крупномасштабного производства. Кроме того, важным качеством штамма является его генетическая стабильность.

8. Составление технического регламента на производство биомассы клеточной суспензии и его оценка. Производственная технология требует соответствующей аппаратуры, которой располагает, в частности, Япония. Так, в 20 000-литровом ферментере в непрерывной культуре в течение трех месяцев выращивались клетки табака, продуцировавшие убихинон с продуктивностью по биомассе 5,582 г/л в день. Там также налажено крупномасштабное производство и других вторичных метаболитов.

В настоящее время в разных странах для получения экономически важных веществ используются культуры клеток около ста видов растений, среди которых – женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клецелина, агава, амми зубная, мак снотворный и др.

Клональное микроразмножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному. По своей сути микроразмножение аналогично вегетативному типу размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество растений. Асептические

условия и соответствующие питательные добавки позволяют в случае необходимости уменьшить размер экспланта до нескольких миллиметров.

В настоящее время число видов растений, которые можно клонировать «в пробирке» уже составляет около одной тысячи. Хотя метод микроклонального размножения растений является довольно трудоемким и затратным, в ряде случаев на его основе уже стало возможным создавать экономически рентабельные технологии.

Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения (10^5 – 10^6 – для травянистых, цветочных растений, 10^4 – 10^5 – для кустарниковых древесных, 10^4 – для хвойных);
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- получение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Области применения клонального микроразмножения разнообразны и имеют тенденцию к расширению:

- в селекции для поддержания и размножения растений с уникальными генотипами;
- для быстрого размножения новых и уже существующих сортов;
- массового получения оздоровленного посадочного материала у растений, подверженных вирусным заболеваниям.
- для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых культур, обычно размножающихся семенами и расщепляющихся при скрещивании;
- для быстрого клонального размножения *in vitro* лучших экземпляров взрослых древесных растений, разведение и селекция которых осуществляется медленно вследствие длительности процесса полового размножения;
- для сохранения редких и исчезающих видов.

Основное требование к объектам, которые используются для микроклонального размножения, это сохранение генетической стабильности на всех этапах онтогенеза. Этому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки стеблевого происхождения. Для микроклонального размножения также могут быть использованы меристематические ткани и изолированные органы, способные давать адвентивные почки. Такие почки

могут развиваться на корнях, побегах и листьях. Например, африканская фиалка размножается с помощью адвентивных почек, образующихся на листовых черешках. Разработан метод, с помощью которого *in vitro* в результате использования отрезков размером 2 мм, можно получить до 20 000 проростков из каждого черешка.

Существует много методов клонального микроразмножения, и различными авторами предлагаются разные системы их классификации.

Наиболее распространенной является классификация, согласно которой микроклональное размножение может осуществляться за счет:

- активации развития уже существующих в растении меристем (апекса стебля, пазушных и спящих почек, интеркалярных зон стебля);
- индукции адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукции соматического эмбриогенеза;
- дифференциации адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, – это активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии явления апикального доминирования.

В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис) и овощных культур (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.).

Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких, как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней – ценного безвирусного семенного материала.

Второй метод – это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуи, сегментов базальной части донца луковок, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи – из сегментов гипокотилия, семядолей, листьев; лук, чеснок – из верхушечной меристемы, ткани донца луковок;

томаты – из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный – из сегментов листовых пластинок; петунья – из сегментов корней; гloxиния, фиалки – из сегментов листовых пластинок, а также некоторые представители древесных растений – из изолированных зрелых и незрелых зародышей.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, – индукция соматического эмбриогенеза – основывается на дифференциации зародышеподобных структур из соматических клеток, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши.

В настоящее время данное явление используется для размножения большинства растений из семейств орхидных и рутовых, некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда, а также некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

Как правило, соматический эмбриогенез является достаточно трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовать свойственную клеткам тотипотентность. Однако этот метод размножения имеет свои преимущества, связанные с сокращением последнего этапа клонального микроразмножения, требующего подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, т.к. соматические зародыши представляют собой полностью сформировавшиеся растеньица. При использовании соответствующей техники капсулирования из этих эмбриоидов можно получить искусственные семена.

Четвертый метод клонального размножения – дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани – мало используется для получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на питательную среду наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение ploидности клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Данный метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры.

2 ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1 Перечень практических (семинарских) занятий и задания к ним

По дисциплине «Трансдукция фитогормональных сигналов» предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у магистрантов таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение магистрантами актуальной научной литературы, закрепляют знания, полученные при прослушивании лекций, прививают навыки самостоятельной работы, способствуют выработке навыков научной полемики. Практические (семинарские) занятия нацелены на пробуждение научного интереса, стимуляцию накопления научных знаний, формулирование выводов. Проведение практических (семинарских) занятий способствуют более глубокому усвоению широкого круга специальных биологических понятий, повышают познавательные возможности обучающихся. Практические (семинарские) занятия проводятся согласно графика учебного процесса и самостоятельной работы. Темы практических (семинарских) занятий приведены в таблице.

	Раздел дисциплины	Тема занятия
1	Передача сигнала внутри клетки	Сигнальные молекулы
2	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	Трансдукция фитогормональных сигналов
		Сигналинг «неклассических» фитогормонов
3	Синтетические гормоны	Фитогормоны в биотехнологиях растений

Практические (семинарские) занятия проводятся один раз в неделю, продолжительность занятий – два академических часа. Подготовка к семинару сводится к следующему плану:

1. Выбор темы, определение задач.
2. Подбор дополнительной литературы.
3. Подготовка вопросов для обсуждения.
4. Распределение заданий и тем для сообщений.
5. Организация предварительной работы, консультации.
6. Определение критериев оценки выступлений.
7. Выбор методов и приемов проведения.
8. Подбор средств наглядности.
9. Составление плана проведения практических занятий.

Практические занятия организуются с целью расширения и обобщения знаний магистрантов по теме или разделу и сводятся к следующей структуре:

1. Вводное слово преподавателя: формулировка задач, постановка проблемы, знакомство с планом проведения семинара.
2. Выступления магистрантов (сообщения по заданным вопросам).

3. Обсуждение вопросов семинара в процессе беседы.

4. Подведение итогов (анализ сообщений, оценка их выступлений).

Структура практического (семинарского) занятия может быть различной, она зависит от сложности обсуждаемых вопросов, дидактических задач и может проводиться в виде:

- развернутой беседы,
- докладов,
- обсуждение рефератов,
- семинаров-диспутов,
- мини-конференций.

На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения. Учебный процесс, опирающийся на использование интерактивных методов обучения, организуется с учетом включенности в процесс познания всех магистрантов группы без исключения. Совместная деятельность означает, что каждый вносит свой особый индивидуальный вклад, в ходе работы идет обмен знаниями, идеями, способами деятельности. Организуются индивидуальная, парная и групповая работа, используется проектная работа, осуществляется работа с различными источниками информации. Интерактивные методы основаны на принципах взаимодействия, активности обучаемых, обязательной обратной связи. Создается среда образовательного общения, которая характеризуется открытостью, взаимодействием участников, равенством их аргументов, накоплением совместного знания, возможностью взаимной оценки и контроля.

ЗАНЯТИЕ 1 СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И РЕЦЕПТОРЫ

Рассматриваемые вопросы:

- 1 Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры физической и химической природы.
- 2 Рецепция внешних и внутриклеточных сигналов клетки. Основные типы рецепторов.
- 3 G-белки. Рецепторы, сопряженные с G-белками. Цикл активации и гашения G-белков.
- 4 Эффекторные молекулы. Аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфолипаза A₂, cGMP-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, некоторые типы ионных каналов
- 5 Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм. цАМФ, цГМФ, ИФ₃, ДАГ, NO, Ca²⁺.
- 6 Схема кальциевой сигнальной системы. Кальциевая волна и примембранное повышение содержания ионов кальция. Причины. Регуляция. Пути снижения концентрации ионов кальция.

ЗАНЯТИЕ 2 ТРАНСДУКЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ

Рассматриваемые вопросы:

1. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция ауксиновых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия ауксинов.

2. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция гиббереллиновых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия гиббереллинов.

3. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция цитокининовых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия цитокининов.

4. Рецепция и передача сигнала абсцизовой кислоты. Биохимические аспекты механизмов действия АБК.

5. Этилен в жизни растений. Рецепторы этилена. Механизмы передачи и регуляция этиленового сигнала у растений.

6. Природные стимуляторы и ингибиторы роста (витамины, фенолкарбоновые кислоты, фенольные синергисты, паракумаровая кислота, флоридзин и др., портулал, кукурбитацин, бататазины и др.

ЗАНЯТИЕ 3 СИГНАЛИНГ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» ФИТОГОРМОНОВ

Рассматриваемые вопросы:

1. Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала. Роль брассиностероидов в регуляции роста и развития растений.

2. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

3. Пептидные гормоны растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

4. Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

5. Стриголактоны – регуляторы симбиотрофии растений и микроорганизмов. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

6. Растения и тяжелые металлы: рецепция и сигналинг. Активные формы кислорода как посредники при передаче стрессовых сигналов. Гормональная регуляция.

ЗАНЯТИЕ 4 ФИТОГОРМОНЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ РАСТЕНИЙ

Рассматриваемые вопросы:

1 Методы культивирования *in vitro*, применяемые в биотехнологии растений. Доказательство тотипотентности растительной клетки. Источники питания растений в условиях *in vivo* и *in vitro*. Фитогормоны. Витамины. Минеральные вещества.

2 Классы фитогормонов и их особенности. Действие фитогормонов в сигнальной регуляции роста и развития растений. Значение фитогормонов при проведении работ по культивированию *in vitro*.

3 Принципы проведения работ по культивированию *in vitro*. Принцип приготовления культуральных сред и особенности их состава. Культура изолированных клеток и клеточных суспензий.

4 Каллусные и клеточные культуры. Особенности органогенеза и эмбриоидогенеза *in vivo* и *in vitro*. Технология получения искусственных семян.

5 Культура протопластов. Соматическая гибридизация. Методы слияния протопластов. Особенности продуктов слияния протопластов. Перспективы развития клеточной инженерии растений.

6 Генетическая интеграция растений и микроорганизмов (мутуалистические взаимоотношения у растений). Механизмы взаимодействия растений с агробактериями. Природные генные векторы у растений.

Для участия в занятии каждый магистрант готовит сообщение на одну из обозначенных тем. Сообщение состоит из текста и презентации. Оно должно быть рассчитано на 15 минут доклада (3-4 страницы текста) + 35-40 слайдов презентации. Выступление на каждом занятии оценивается. Остальные члены группы готовят проблемные вопросы для дискуссии.

СТРУКТУРА И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ (СЕМИНАРСКИХ) ЗАНЯТИЙ

По дисциплине «Трансдукция фитогормональных сигналов» предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у магистрантов таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение магистрантами актуальной научной литературы, закрепляют знания, полученные при прослушивании лекций, прививают навыки самостоятельной работы, способствуют выработке навыков научной полемики. Практические (семинарские) занятия нацелены на пробуждение научного интереса, стимуляцию накопления научных знаний, формулирование выводов. Проведение практических (семинарских) занятий способствуют более глубокому усвоению широкого круга специальных биологических понятий, повышают познавательные возможности обучающихся. Практические (семинарские) занятия проводятся согласно графика учебного процесса и самостоятельной работы. Темы практических (семинарских) занятий приведены в таблице.

	Раздел дисциплины	Тема занятия
1	Передача сигнала внутри клетки	Сигнальные молекулы
2	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	Трансдукция фитогормональных сигналов
		Сигналинг «неклассических» фитогормонов
3	Синтетические гормоны	Фитогормоны в биотехнологиях растений

Практические (семинарские) занятия проводятся один раз в неделю, продолжительность занятий – два академических часа. Подготовка к семинару сводится к следующему плану:

1. Выбор темы, определение задач.
2. Подбор дополнительной литературы.
3. Подготовка вопросов для обсуждения.
4. Распределение заданий и тем для сообщений.
5. Организация предварительной работы, консультации.
6. Определение критериев оценки выступлений.
7. Выбор методов и приемов проведения.
8. Подбор средств наглядности.
9. Составление плана проведения практических занятий.

Практические занятия организуются с целью расширения и обобщения знаний магистрантов по теме или разделу и сводятся к следующей структуре:

1. Вводное слово преподавателя: формулировка задач, постановка проблемы, знакомство с планом проведения семинара.
2. Выступления магистрантов (сообщения по заданным вопросам).

3. Обсуждение вопросов семинара в процессе беседы.

4. Подведение итогов (анализ сообщений, оценка их выступлений).

Структура практического (семинарского) занятия может быть различной, она зависит от сложности обсуждаемых вопросов, дидактических задач и может проводиться в виде:

- развернутой беседы,
- докладов,
- обсуждение рефератов,
- семинаров-диспутов,
- мини-конференций.

На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения. Учебный процесс, опирающийся на использование интерактивных методов обучения, организуется с учетом включенности в процесс познания всех магистрантов группы без исключения. Совместная деятельность означает, что каждый вносит свой особый индивидуальный вклад, в ходе работы идет обмен знаниями, идеями, способами деятельности. Организуются индивидуальная, парная и групповая работа, используется проектная работа, осуществляется работа с различными источниками информации. Интерактивные методы основаны на принципах взаимодействия, активности обучаемых, обязательной обратной связи. Создается среда образовательного общения, которая характеризуется открытостью, взаимодействием участников, равенством их аргументов, накоплением совместного знания, возможность взаимной оценки и контроля.

ЗАНЯТИЕ 1 СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И РЕЦЕПТОРЫ

Рассматриваемые вопросы:

1 Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры физической и химической природы.

2 Рецепция внешних и внутриклеточных сигналов клетки. Основные типы рецепторов.

3 G-белки. Рецепторы, сопряженные с G-белками. Цикл активации и гашения G-белков.

4 Эффекторные молекулы. Аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфолипаза A₂, cGMP-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, некоторые типы ионных каналов

5 Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм. цАМФ, цГМФ, ИФ₃, ДАГ, NO, Ca²⁺.

6 Схема кальциевой сигнальной системы. Кальциевая волна и приембранное повышение содержания ионов кальция. Причины. Регуляция. Пути снижения концентрации ионов кальция.

ЗАНЯТИЕ 2 ТРАНСДУКЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ

Рассматриваемые вопросы:

1. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция ауксиновых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия ауксинов.

2. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция гиббереллиновых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия гиббереллинов.

3. Рецепторы, механизмы передачи и регуляция цитокининовых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия цитокининов.

4. Рецепция и передача сигнала абсцизовой кислоты. Биохимические аспекты механизмов действия АБК.

5. Этилен в жизни растений. Рецепторы этилена. Механизмы передачи и регуляция этиленового сигнала у растений.

6. Природные стимуляторы и ингибиторы роста (витамины, фенолкарбоновые кислоты, фенольные синергисты, паракумаровая кислота, флоридзин и др., портулал, кукурбитацин, бататазины и др.

ЗАНЯТИЕ 3 СИГНАЛИНГ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» ФИТОГОРМОНОВ

Рассматриваемые вопросы:

1. Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала. Роль брассиностероидов в регуляции роста и развития растений.

2. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

3. Пептидные гормоны растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

4. Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

5. Стриголактоны – регуляторы симбиотрофии растений и микроорганизмов. Механизмы передачи и регуляция сигнала.

6. Растения и тяжелые металлы: рецепция и сигналинг. Активные формы кислорода как посредники при передаче стрессовых сигналов. Гормональная регуляция.

ЗАНЯТИЕ 4 ФИТОГОРМОНЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ РАСТЕНИЙ

Рассматриваемые вопросы:

1. Методы культивирования *in vitro*, применяемые в биотехнологии растений. Доказательство тотипотентности растительной клетки. Источники питания растений в условиях *in vivo* и *in vitro*. Фитогормоны. Витамины. Минеральные вещества.

2. Классы фитогормонов и их особенности. Действие фитогормонов в сигнальной регуляции роста и развития растений. Значение фитогормонов при проведении работ по культивированию *in vitro*.

3. Принципы проведения работ по культивированию *in vitro*. Принцип приготовления культуральных сред и особенности их состава. Культура изолированных клеток и клеточных суспензий.

4. Каллусные и клеточные культуры. Особенности органогенеза и эмбриоидогенеза *in vivo* и *in vitro*. Технология получения искусственных семян.

5 Культура протопластов. Соматическая гибридизация. Методы слияния протопластов. Особенности продуктов слияния протопластов. Перспективы развития клеточной инженерии растений.

6 Генетическая интеграция растений и микроорганизмов (мутуалистические взаимоотношения у растений). Механизмы взаимодействия растений с агробактериями. Природные генные векторы у растений.

Для участия в занятии каждый магистрант готовит сообщение на одну из обозначенных тем. Сообщение состоит из текста и презентации. Оно должно быть рассчитано на 15 минут доклада (3-4 страницы текста) + 35-40 слайдов презентации. Выступление на каждом занятии оценивается. Остальные члены группы готовят проблемные вопросы для дискуссии.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИЦЫ

3 КОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ

3.1 Перечень тем экзаменационных работ

По дисциплине «Трансдукция фитогормональных сигналов» предусмотрено написание экзаменационной работы на одну из заданных тем.

Примерная тематика экзаменационных работ:

1 Протеинкиназы и протеинфосфатазы как ключевые ферменты регуляции сигнальных каскадов клетки.

2 Фосфолипазы и липоксигеназы растений. Липоксигеназная сигнальная система как сложный путь образования оксипинов растений. Дивинилэфирсинтазная, алленоксидсинтазная и гидропероксидлиазная ветви липоксигеназного сигналинга.

3 МАП-киназная сигнальная система растений как группа мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей. Регуляция МАП-киназного сигнального каскада. Роль в регуляции митоза клеток.

4 Метаболизм ауксинов в растениях. Хемиосмотическая гипотеза полярного транспорта ауксина. Рецепторы ауксинов. Действие ИУК на клетку.

5 Гиббереллин-индуцируемая экспрессия генов синтеза антоцианов и амилазы. Гены-мишени гиббереллинового сигнала. Рецепторы гиббереллинов. Физиологические эффекты гиббереллинов.

6 Цитоплазматические цитокининсвязывающие белки. Мембранные рецепторы цитокининов. Гены-мишени цитокининов. Морфогенетическая роль цитокининов и ауксинов.

7 АБК - стрессовый фитогормон. Значение АБК в процессах адаптации к стрессовым воздействиям. АБК и формирование устойчивости к низким температурам. АБК и биотический стресс. Роль АБК в регуляции водного режима растений.

8 Регуляция уровня этилена в растении. Строение рецепторных гистидинкиназ. Тройной ответ растений на действие этилена. Практическое применение этилена.

9 Соединения, образуемые микроорганизмами, способные влиять на рост высших растений: гелиминтоспорол, котиленины, склерин, песталотин, фузикоцин. Соединения, образуемые высшими растениями и влияющие на их рост при экзогенном введении: фенолкарбоновые кислоты, транскоричная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, коричная кислота, кумаровая кислота, феруловая кислота, флавоноиды, кумарины и др.

10 Клональное микроразмножение растений. Роль ауксинов и цитокининов в каллусогенезе. Гормонезависимость каллусных клеток. Образование отдельных органов растений *in vitro*. Роль фитогормонов. Использование фитогормонов при выращивании растений в открытом грунте.

Экзаменационная работа выполняется в электронном виде, включает титульный лист, основное содержание и список использованных источников информации (книги, статьи, интернет-источники). Объем экзаменационной работы – не менее 20 страниц основного текста. Источников информации – не менее 15.

Оформление страницы: поля: верхнее и нижнее – 2 см; левое – 3 см; правое – 1 см. Шрифт Times New Roman, 14 pt. Абзацный отступ – 1,25 см; выравнивание по ширине, междустрочный интервал – одинарный, автоматический перенос слов.

Отдельными страницами являются титульный лист и список использованных источников.

Текст освещается по плану, снабжается цветными иллюстрациями с подписями.

Титульный лист и список использованных источников оформляется по СПП.

4 ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1 Учебная программа дисциплины

Файл прилагается.

4.2 Перечень рекомендуемой литературы

Основная

- 1 Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский; [Отв. ред. А.Н. Гречкин]. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
- 2 Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Бакакина Ю.С., Волотовский И.Д. Циклический гуанозинмонофосфат и сигнальные системы клеток растений / Л.В. Дубовская и др.; [Рецензенты: Н.А. Ламан, Н.В. Шалыго]. – Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии. – Минск: Беларуская навука, 2014. – 275 с.
- 3 Аверина Н.Г., Яронская Е.Б. Биосинтез тетрапирролов в растениях – Минск: Беларуская навука, 2012. – 413 с.
- 4 Джамеев В.Ю. Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие / В. Ю. Джамеев. — Харьков: АССА, 2015. — 224 с.
- 5 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 6 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
- 7 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 8 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

Дополнительная

- 9 Гусев, Н.Б. Внутриклеточные Ca^{2+} -связывающие белки. Часть 1. Классификация и структура / Н.Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 2–9.
- 10 Гусев, Н.Б. Внутриклеточные Ca^{2+} -связывающие белки. Часть 2. Структура и механизм функционирования / Н.Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 10–16.
- 11 Колупаев, Ю.Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец. – К.: Основа, 2010. – 352 с.
- 12 Крутецкая, З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации: монография / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, Л.С. Курилова. – СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2003. – 208 с.
- 13 Кулаева, О.Н. Восприятие и преобразование гормонального сигнала у растений / О.Н. Кулаева // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, №5. – С. 661–671.

14 Лыло, В.В. Убиквитинирование протеинов и его функции в клетке / В.В. Лыло // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 6. – С. 5–13.

15 Сорокин, А.В. Протеосомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.

Интернет-ресурсы

16 https://ru.wikipedia.org/wiki/Сигнальные_пути_MAPK

17 <http://present5.com/signalnye-peptidny-gormony-rastenij-1-sisteminy/>

18 <https://studfiles.net/preview/2362134/page:3/>

19 https://ru.wikipedia.org/wiki/Двухкомпонентная_система

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»



Проректор по учебной работе
ГГУ имени Ф.Скорины

И.В.Семченко

(подпись)

Дата утверждения

Регистрационный № УД-17-2019-64 /уч.

ТРАНСДУКЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ

Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности 1-31 80 01 Биология
(профилизация Функциональная биология)

Учебная программа составлена на основе Образовательного стандарта высшего образования второй ступени (магистратура) ОСВО 1-31 80 012012, учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины специальности 131 80 01 Биология, регистрационные номера G 31-2-01/д-19, G 31-2-01/з-19 от 09.04.2019.

Составитель:

О.М. Храмченкова, доцент кафедры ботаники и физиологии растений учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», кандидат биологических наук, доцент

Рецензенты:

В.В. Копытков, заведующий сектором биорегуляции выращивания посадочного материала государственного научного учреждения «Институт леса НАН Беларуси», доктор сельскохозяйственных наук

М.С. Лазарева, заведующая кафедрой лесохозяйственных дисциплин учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Рекомендована к утверждению:

Кафедрой ботаники и физиологии растений

протокол № 10 от 18.04. 2019

Научно-методическим советом УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

протокол № 8 от 17.05.2019

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная дисциплина «Трансдукция фитогормональных сигналов» относится к компоненту учреждения высшего образования, модулю «Клеточная биология и молекулярно-генетические механизмы биосигнализации» учебного плана специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология).

Данная дисциплина базируется на знаниях и умениях, выработанных при прохождении общего профессионального курса первой ступени высшего образования по специальности 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)»: «Цитология и гистология», «Биохимия», «Физиология растений», и предшествует курсу «Клеточная биология» в рамках магистерской программы образования.

В современной физиологии и биохимии растений фитогормоны рассматриваются как интегральные химические сигналы, отражающие состояние внутренней среды растительного организма, регулирующие рост и развитие растений. **Целью** освоения курса является формирование целостной системы знаний о гормонах растительного организма, их строении, метаболизме и физиологической роли.

Основные задачи дисциплины – дать целостные представления о механизмах биосигнализации в растительных клетках, метаболизме и сигнальных функциях фитогормонов; научит обобщать фактический материал в области биохимии и физиологии фитогормонов; ознакомить с научными достижениями в данной области физиологии и биохимии растений.

В преподавании данной дисциплины, наряду с лекциями, учебным планом предусмотрены практические (семинарские) занятия, которые способствуют развитию у обучающихся таких необходимых навыков, как выбор и решение поставленной задачи, сбор и аналитический анализ опубликованных данных, умение выделять главное и делать обоснованное заключение. Они стимулируют регулярное изучение научной литературы, закрепляют знания, полученные на первой ступени высшего образования, прививают навыки самостоятельной работы. На практических (семинарских) занятиях используются методы интерактивного обучения, основанных на психологии человеческих взаимоотношений и взаимодействий.

Высокий уровень освоения дисциплины «Трансдукция фитогормональных сигналов» достигается не только в результате выполнения аудиторной работы на лекциях и практических (семинарских) занятиях, но и в ходе выполнения самостоятельной работы.

После изучения дисциплины обучающийся должен обладать компетенциями:

АК-1. Уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач.

АК-2. Владеть системным и сравнительным анализом.

АК-4. Уметь работать самостоятельно.

АК-6. Владеть междисциплинарным подходом при решении проблем.

СК-2. Быть способным использовать знания о молекулярных основах функционирования клеточных систем и механизмах биосигнализации в разработке актуальных вопросов физиологии животных и растений, биотехнологии, экологии, фармации, сельском и лесном хозяйстве

ПК-2. Осваивать новые модели, теории, методы исследования, участвовать в разработке новых методических подходов.

ПК-3. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научной литературе, составлять аналитические обзоры.

ПК-4. Готовить научные статьи, сообщения, рефераты, доклады и материалы к презентациям.

В результате изучения дисциплины обучающийся должен **знать**:

- принципы структурной и функциональной организации основных сигнальных систем клетки;
- отличия поверхностных и внутриклеточных рецепторов;
- особенности передачи внешнего сигнала различными трансдуцирующими системами в клетку;
- структуру первичных и вторичных мессенджеров;
- терминологию, используемую в клеточной сигнализации;
- роль основных сигнальных систем в регуляции клеточных процессов;

уметь:

- представлять возможные пути решения наиболее актуальных проблем при изучении регуляции сигналинга растений;
- использовать полученные знания в области исследования систем внутриклеточной и межклеточной коммуникации для решения профессиональных задач;
- использовать полученные знания при изучении других биологических дисциплин;
- применять полученные знания в оценке нарушений механизмов сигнальной трансдукции;

владеть навыками:

- работы с различными литературными источниками, поиска информации по заданной проблематике;
- методологическими основами современной науки.

Изучение данной учебной дисциплины предусмотрено магистрантами 1 курса специальности 1-31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология). Общее количество часов для магистрантов **дневной** формы обучения – 102 (3 зачетных единицы); аудиторных – 42, из них: лекции – 34, в том числе – УСР – 12, практические (семинарские) занятия – 8. Форма отчетности – экзамен в 1 семестре. Общее количество часов для магистрантов **заочной** формы обучения – 102 (3 зачетных единицы); аудиторных – 14, из них: лекции – 10, практические (семинарские) занятия – 4. Форма отчетности – экзамен в 1 семестре

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

РАЗДЕЛ 1 СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК

Модуль 1 (М1). Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток

Тема 1. Сущность передачи сигнала.

Значение сигнальных систем в биологических объектах. Компоненты сигнальных систем, Эффект усиления в сигнальных системах. Транскрипционный каскад. Типы сигнальных механизмов. Дерепрессорные сигнальные механизмы. Система убиквитин-опосредованной деградации белков. Выбор субстрата. Убиквитин и убиквитинирование. Убиквитинирующий комплекс. Структура SCF-подобной убиквитинирующей лигазы. Регуляция активности SCF-лигазы. Связывание субстрата с убиквитинирующей лигазой. Особенности белков-мишеней убиквитинирующей лигазы. Деградация субстрата. 26S протеасома. Коровая 20S протеасома. Регуляторная 19S частица.

Тема 2. Рецепция внешнего сигнала

Общая характеристика клеточных рецепторов. Структурно-функциональные особенности рецепторов. Субъединичная и доменная структура. Основные механизмы активации рецепторов. Функциональная активность. Лиганд-связывающие рецепторы. Рецептор-подобные киназы. Гистидиновые рецепторные киназы. Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы. Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений. Этиленовые рецепторы. G-белок сопряженные рецепторы. Рецепторы-каналоформеры. Внутриклеточные рецепторы. F-box рецепторы. Гормон-чувствительные липазы. START-домен рецепторы.

Тема 3. Световые рецепторы

UV-B рецепторы. Фототропины: функции, структура, световая активация. Криптохромы: функции, структура, световая активация. Фитохромы. Разнообразие и значение фитохромов. Структура фитохромов. Фотосенсорный район. Димеризационный район. Активация фитохромов и передача светового сигнала. Светозависимые изменения структуры фитохромов. Перенос фитохромов в ядро. Регуляция активности фитохрома. Модуляция активности мишеней фитохрома. Механизм световой активации фитохрома.

Модуль контроля 1 (МК₂). Контроль усвоения раздела «Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток». Контроль

осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность).

РАЗДЕЛ 2 ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ

Модуль 2 (М2). Передача сигнала внутри клетки

Тема 4. G-белки и фосфолипазы

G-белки. Гетеротримерные G-белки. Мономерные (малые) G-белки. Разнообразие мономерных G-белков. Сигнальные мономерные G-белки. Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры. Фосфолипазы – общая характеристика. Фосфолипазы D. Фосфолипазы C. Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы C. Фосфатидилинозитол и его производные. PI-PLC-опосредованный сигналинг. Фосфолипазы A_2 . Октадеканойдный путь. Функции фосфолипазы A_2 . Фосфолипазы A_1 и B, лизофосфолипазы A. Взаимодействие фосфолипаз.

Тема 5. NO-сигналинг и нуклеотидциклазные сигнальные системы

Оксид азота NO. Химические и антиоксидантные свойства NO. Пути образования NO. Нитрат/нитрит-зависимые ферментативные пути. Аргинин-зависимые пути синтеза. Нитрит-зависимые неферментативные пути. NO-сигналинг. Нитрозилирование металлов. S-нитрозилирование цистеина. Нитрирование тирозина. Связь NO и Ca^{2+} -сигналов. Аденилатциклазная система. Ферменты аденилатциклазной системы. Роль cAMP в регуляция активности протеинкиназы A животных. Значение cAMP в регуляции активности катаболических генов у бактерий. cAMP-регулируемые белки растений. Гуанилатциклазы и cGMP.

Тема 6. Ионы кальция в системе передачи сигнала

Структура Ca^{2+} -связывающих белков. Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал. Экстраклеточный транспорт кальция. Ca^{2+} -АТФазы. Ca^{2+}/H^+ -антипортеры. Индуцированное поступление кальция в цитоплазму. Потенциал-управляемые каналы. Лиганд-управляемые каналы. Декодирование Ca^{2+} -сигнала. Активация кальмодулин-зависимых белков. Модуляция активности транскрипции кальмодулинами. Модуляция активности белков кальций-зависимыми киназами.

Тема 7. Ковалентная модификация сигнальных посредников

Значение обратимой ковалентной модификации. Растительные протеиновые киназы. Кальций-зависимые протеиновые киназы. SnRK – SNF1-подобные киназы. Рецептор-подобные киназы. MAP киназы. Циклин-зависимые киназы. Казеиновые киназы CK1 и CK2. Семейство GSK3/Shaggy. CTRL/Raf-подобное семейство. Протеиновые фосфатазы. Классификация фосфатаз. Серин/треониновые фосфатазы. Тирозиновые фосфатазы.

Растительные фосфатазы. Разнообразие растительных фосфатаз. Значение растительных фосфатаз.

Модуль контроля 2 (МК₂).

Контроль усвоения раздела «Передача сигнала внутри клетки»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Передача сигнала внутри клетки». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 1 по теме «Ковалентная модификация сигнальных посредников».

РАЗДЕЛ 3 МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

Модуль 3 (МЗ). Механизмы передачи сигнала растительных гормонов

Тема 8. Ауксины.

Общая характеристика. Химическая структура и классификация. Биосинтез ауксина. Метаболизм ауксина. Катаболизм ауксина. Другие метаболиты ауксинов. Синтетические аналоги. Движение ауксина в растении. Латеральный транспорт. Механизм полярного транспорта ауксинов. Физиологическое действие ауксинов. Рецепторы ауксинового сигнала. Биохимические аспекты механизма действия ауксинов. Спектр биологического действия ауксинов.

Тема 9. Гиббереллины.

Общая характеристика. Химическая структура и классификация. Биосинтез гиббереллинов. Метаболизм гиббереллинов. Инактивация гиббереллинов. Передвижение гиббереллинов в растениях. Рецепция и передача сигнала гиббереллинов. Физиологическое действие гиббереллинов. Содержание в растении. Пути регуляции уровня активных гиббереллинов в тканях растений. Получение и применение. Синтетические аналоги.

Тема 10. Цитокинины

Общая характеристика. Химическая структура и классификация. Биосинтез цитокининов. Метаболизм цитокининов. Конъюгация и разрушение цитокининов. Биотесты и распределение цитокининов. Передвижение цитокининов в растении. Биохимические аспекты механизма действия цитокининов. Рецепция и передача сигнала цитокининов. Функции цитокининов в развитии растений.

Тема 11. Абсцизовая кислота.

Абсцизовая кислота (АБК). Обнаружение и характеристика. Измерение количества и распределение АБК. Передвижение АБК в растении. Метаболизм АБК. Биосинтез АБК. Конъюгация и последующий метаболизм АБК. Физиологическое действие АБК. АБК и геотропизм в корнях. АБК и закрывание устьиц. АБК и покой почек и семян. Другие эффекты абсцизовой кислоты. Биохимические аспекты механизмов действия АБК.

Тема 12. Этилен.

Свойства этилена и открытие его фитогормональной роли. Образование этилена тканями. Передвижение этилена по растению. Локализация этилена в растении. Метаболизм этилена. Биосинтез этилена. Катаболизм этилена. Биохимический механизм действия этилена. Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала. Физиологические функции этилена.

Тема 13. «Неклассические гормоны».

Брассиностероиды. Свойства брассинов и их открытие. Биосинтез брассинов. Метаболизм брассинов. Катаболизм брассинов. Биохимический механизм действия брассинов. Жасминовая кислота. Строение, биосинтез и физиологические функции. Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. Пептидные гормоны. Рецепция и передача сигналов «неклассических гормонов».

Тема 14. Методы изучения фитогормонов.

Комплексные методы извлечения, разделения и очистки основных групп фитогормонов. Фиксация и гомогенизация растительного материала. Очистка экстрактов фитогормонов. Разделение фитогормонов. Экстракция свободных ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и абсцизовой кислоты. Гидролиз спирторастворимых конъюгатов фитогормонов. Тонкослойная хроматография фитогормонов. Твердофазный иммуноферментный анализ.

Модуль контроля 3 (МК₃).

Контроль усвоения раздела «Механизмы передачи сигнала растительных гормонов»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела **«Механизмы передачи сигнала растительных гормонов»**. Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 2, № 3 и № 4 по темам «Цитокинины», «Этилен» и «Методы изучения фитогормонов».

РАЗДЕЛ 4 СИНТЕТИЧЕСКИЕ ГОРМОНЫ

Модуль 4 (М₄). Синтетические гормоны

Тема 15. Продукты химического синтеза.

Аналоги ауксинов: индолил-3-уксусная кислота (препарат гетероауксин), 4-индолил-масляная кислота (препараты корневин, укоренить), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (препарат томатын). Аналог гиббереллинов: натриевые соли гиббереллиновых кислот (препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень). Аналог цитокининов: N-(1,2,4-триазол-4-ил)-N-фенилмочевина (препарат цитодеф). Аналог брассиностероидов: 24-эпибрассинолид (препарат эпин-экстра). Хлормекватхлорид (ССС, хлористый (2-хлорэтил)-триметиламмоний) (препарат це це це 750, антивывегач, атлет, стабилан), тринексапак-этил (препарат моддус), хлорид-N,N-диметил-N-(2-хлорэтил) гидразиния (препарат квартазин), 2-хлорэтилфосфоновая кислота (2-ХЭФК) (препараты кампозан, серон, этефон, ХЭФК).

Тема 16. Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием.

1-хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М, 2-(1,3-диоксоланин-2)фуран (препарат фуранол), 2-оксо-2,5-дигидрофуран (препарат кавказ), 5-этил-5-гидроксиметил-2-(фурил-2)-1,3-диоксан (препарат краснодар-1), гидроксикоричная кислота (препараты домоцвет и циркон), дигидрокверцетин (препарат лариксин), соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат), тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва), этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

Тема 17. Культуры клеток и тканей в биотехнологии растений.

Использование фитогормонов в биотехнологических исследованиях. Получение культуры клеток и тканей. Клональное микроразмножение растений. Роль ауксинов и цитокининов в каллусогенезе. Гормоннезависимость каллусных клеток. Образование отдельных органов растений *in vitro*. Роль фитогормонов. Использование фитогормонов при выращивании растений в открытом грунте.

Модуль контроля 4 (МК₄).

Контроль усвоения раздела «Синтетические гормоны»

Модуль обеспечивает контроль основных понятий, знаний и умений, освоенных магистрантами в результате изучения раздела «Синтетические гормоны». Контроль осуществляется в форме контрольной работы или тестирования с разноуровневыми заданиями (уровень узнавания; воспроизведение по памяти; воспроизведение на уровне понимания и применения знаний в знакомой ситуации; применение знаний в незнакомой ситуации; творческая деятельность). Также магистранты выполняют задания УСР № 5 и № 6 по темам «Продукты химического синтеза» и «Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием».

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДЛЯ ОЧНОЙ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ

Номер раздела, модуля, темы	Название раздела, модуля, темы; перечень изучаемых вопросов	Количество часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	управляемая самостоятельная работа			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 1	Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток	6	2					
М1	Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток	6	2					
Тема 1	Сущность передачи сигнала. 1 Компоненты сигнальных систем. 2 Механизмы передачи сигнала. 3 Система убиквитин-опосредованной деградации белков.	2				Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Тема 2	Рецепция внешнего сигнала 1 Общая характеристика клеточных рецепторов. 2 Лиганд-связывающие рецепторы. 3 G-белок сопряженные рецепторы, каналоформеры, внутриклеточные рецепторы.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Тема 3	Световые рецепторы 1 Растения и ультрафиолет. 2 Фототропины. 3 Криптохромы. 4 Фитохромы.	2				Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Раздел 2	Передача сигнала внутри клетки	6	2		2			
М2	Передача сигнала внутри клетки	6	2		2			
Тема 4	G-белки и фосфолипазы 1 G-белки. 2 Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры. 3 Фосфолипазы.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 5	NO-сигналинг и нуклеотидциклазные сигнальные системы 1 Пути образования NO. 2 NO-сигналинг. 3 Нуклеотидциклазные сигнальные системы.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Творческие задания для малых групп

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 6	Ионы кальция в системе передачи сигнала 1 Структура Ca^{2+} -связывающих белков. 2 Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал. 3 Индуцированное поступление кальция в цитоплазму. 4 Модуляция активности транскрипции кальмодулинами.	2	2			Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 7	Ковалентная модификация сигнальных посредников 1 Значение обратимой ковалентной модификации. 2 Растительные протеиновые киназы. 3 MAP киназы. Циклин-зависимые киназы. 4 Протеиновые фосфатазы. Разнообразие и значение растительных фосфатаз.				2	Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Раздел 3	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	8	2		6			
МЗ	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	8	2		6			
Тема 8	Ауксины 1 Метаболизм ауксина. 2 Движение ауксина в растении. 3 Физиологическое действие ауксинов. 4 Рецепторы ауксинового сигнала.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 9	Гиббереллины 1 Химическая структура и классификация. 2 Передвижение гиббереллинов в растениях. 3 Физиологическое действие гиббереллинов. 4 Рецепция и передача сигнала гиббереллинов.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 10	Цитокинины 1 Биосинтез и метаболизм цитокининов. 2 Передвижение цитокининов в растении. 3 Сигнальная роль цитокининов в развитии растений.				2	Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 11	Абсцизовая кислоты 1 Метаболизм АБК. 2 Движение АБК в растении. 3 Физиологическое действие АБК. 4 Сигнальные пути АБК.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 12	Этилен 1 Образование этилена тканями. 2 Передвижение этилена по растению. 3 Физиологические функции этилена. 4 Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала.				2	Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 13	«Неклассические гормоны» 1 Биохимический механизм действия брассиностероидов. 2 Жасминовая кислота. Строение, биосинтез и физиологические функции. 3 Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. 4 Пептидные гормоны растений.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация
Тема 14	Методы изучения фитогормонов 1 Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей 2. Количественные методы определения фитогормонов 3. Особенности иммунохимии фитогормонов				2	Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация
Раздел 4	Синтетические гормоны	2	2		4			
М4	Синтетические гормоны	2	2		4			
Тема 15	Продукты химического синтеза 1 Аналоги ауксинов: препараты гетероауксин, корневин, укоренить, томатын. 2 Аналоги гиббереллинов: препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень. 3 Аналоги цитокининов и брассиностероидов: препараты цитодеф и эпин-экстра.				2	Курс лекций, презентация	[5-8, 13-19]	Текст УСР и презентация
Тема 16	Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием 1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М). 2 Соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат) и тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва). 3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).				2	Курс лекций, презентация	[1-3, 6-11, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 17	Культуры клеток и тканей в биотехнологии растений 1 Типы культур клеток и тканей растений. 2 Направления использования культуры клеток и тканей. 3 Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	
Всего часов		22	8		12			Экзамен в 1 семестре

Доцент кафедры ботаники и физиологии растений, к.б.н.

О. М. Храмченкова

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДЛЯ ЗАОЧНОЙ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ

Номер раздела, модуля, темы	Название раздела, модуля, темы; перечень изучаемых вопросов	Количество часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	управляемая самостоятельная работа			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раздел 1	Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток	2	2					
М1	Структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток	2	2					
Тема 1	Сущность передачи сигнала. 1 Компоненты сигнальных систем. 2 Механизмы передачи сигнала. 3 Система убиквитин-опосредованной деградации белков.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Тема 2	Рецепция внешнего сигнала 1 Общая характеристика клеточных рецепторов. 2 Лиганд-связывающие рецепторы. 3 G-белок сопряженные рецепторы, каналоформеры, внутриклеточные рецепторы.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Тема 3	Световые рецепторы 1 Растения и ультрафиолет. 2 Фототропины. 3 Криптохромы. 4 Фитохромы.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-4, 9-12, 15-19]	Творческие задания для малых групп
Раздел 2	Передача сигнала внутри клетки	2						
М2	Передача сигнала внутри клетки	2						
Тема 4	G-белки и фосфолипазы 1 G-белки. 2 Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры. 3 Фосфолипазы.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 5	Тема 5. NO-сигналинг и нуклеотидциклазные сигнальные системы 1 Пути образования NO. 2 NO-сигналинг. 3 Нуклеотидциклазные сигнальные системы.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Творческие задания для малых групп

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 6	Ионы кальция в системе передачи сигнала 1 Структура Ca^{2+} -связывающих белков. 2 Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал. 3 Индуцированное поступление кальция в цитоплазму. 4 Модуляция активности транскрипции кальмодулинами.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 7	Ковалентная модификация сигнальных посредников 1 Значение обратимой ковалентной модификации. 2 Растительные протеиновые киназы. 3 MAP киназы. Циклин-зависимые киназы. 4 Протеиновые фосфатазы. Разнообразие и значение растительных фосфатаз.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Раздел 3	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	4	2					
МЗ	Механизмы передачи сигнала растительных гормонов	4	2					
Тема 8	Ауксины 1 Метаболизм ауксина. 2 Движение ауксина в растении. 3 Физиологическое действие ауксинов. 4 Рецепторы ауксинового сигнала.	2				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 9	Гиббереллины 1 Химическая структура и классификация. 2 Передвижение гиббереллинов в растениях. 3 Физиологическое действие гиббереллинов. 4 Рецепция и передача сигнала гиббереллинов.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 10	Цитокинины 1 Биосинтез и метаболизм цитокининов. 2 Передвижение цитокининов в растении. 3 Сигнальная роль цитокининов в развитии растений.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 11	Абсцизовая кислоты 1 Метаболизм АБК. 2 Движение АБК в растении. 3 Физиологическое действие АБК. 4 Сигнальные пути АБК.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-17]	
Тема 12	Этилен 1 Образование этилена тканями. 2 Передвижение этилена по растению. 3 Физиологические функции этилена. 4 Рецепторы этилена и механизм передачи сигнала.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Тема 13	«Неклассические гормоны» 1 Биохимический механизм действия брассиностероидов. 2 Жасминовая кислота. Строение, биосинтез и физиологические функции. 3 Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. 4 Пептидные гормоны растений.	2	2			Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация
Тема 14	Методы изучения фитогормонов 1 Способы фиксации и выделения фитогормонов из растительных тканей. 2. Количественные методы определения фитогормонов. 3. Особенности иммунохимии фитогормонов.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	Текст УСР и презентация
Раздел 4	Синтетические гормоны	2						
М4	Синтетические гормоны	2						
Тема 15	Продукты химического синтеза 1 Аналоги ауксинов: препараты гетероауксин, корневин, укоренить, томатон. 2 Аналоги гиббереллинов: препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень. 3 Аналоги цитокининов и брассиностероидов: препараты цитодеф и эпин-экстра.	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[5-8, 13-19]	Текст УСР и презентация
Тема 16	Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием 1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М). 2 Соли гуминовых кислот (препарат бигус, лигногумат) и тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, вэрва). 3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).	Самостоятельное изучение				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-11, 13-17]	Текст УСР и презентация
Тема 17	Культуры клеток и тканей в биотехнологии растений 1 Типы культур клеток и тканей растений. 2 Направления использования культуры клеток и тканей. 3 Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений.	2				Курс лекций, презентация	[1-3, 6-10, 13-19]	
Всего часов		10	4					Экзамен в 1 семестре

Доцент кафедры ботаники и физиологии растений, к.б.н.

О. М. Храмченкова

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

I ЛИТЕРАТУРА

Основная

- 1 Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский; [Отв. ред. А.Н. Гречкин]. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
- 2 Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Бакакина Ю.С., Волотовский И.Д. Циклический гуанозинмонофосфат и сигнальные системы клеток растений / Л.В. Дубовская и др.; [Рецензенты: Н.А. Ламан, Н.В. Шалыго]. – Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии. – Минск: Беларуская навука, 2014. – 275 с.
- 3 Аверина Н.Г., Яронская Е.Б. Биосинтез тетрапирролов в растениях – Минск: Беларуская навука, 2012. – 413 с.
- 4 Джамеев В.Ю. Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие / В. Ю. Джамеев. — Харьков: АССА, 2015. — 224 с.
- 5 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 6 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. – 336 с.
- 7 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 8 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

Дополнительная

- 9 Гусев, Н.Б. Внутриклеточные Ca^{2+} -связывающие белки. Часть 1. Классификация и структура / Н.Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 2–9.
- 10 Гусев, Н.Б. Внутриклеточные Ca^{2+} -связывающие белки. Часть 2. Структура и механизм функционирования / Н.Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 10–16.
- 11 Колупаев, Ю.Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец. – К.: Основа, 2010. – 352 с.
- 12 Крутецкая, З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации: монография / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, Л.С. Курилова. – СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2003. – 208 с.
- 13 Кулаева, О.Н. Восприятие и преобразование гормонального сигнала у растений / О.Н. Кулаева // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, №5. – С. 661–671.
- 14 Лыло, В.В. Убиквитинирование протеинов и его функции в клетке / В.В. Лыло // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 6. – С. 5–13.

15 Сорокин, А.В. Протеосомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.

Интернет-ресурсы

16 https://ru.wikipedia.org/wiki/Сигнальные_пути_MAPK

17 <http://present5.com/signalnye-peptidny-gormony-rastenij-1-sisteminy/>

18 <https://studfiles.net/preview/2362134/page:3/>

19 https://ru.wikipedia.org/wiki/Двухкомпонентная_система

II ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ МАГИСТРАНТОВ

Для организации самостоятельной работы магистрантов по учебной дисциплине рекомендуется использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа учебной дисциплины, учебно-методический комплекс, методические указания к практическим занятиям, задания в тестовой форме, темы рефератов, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов и др.). Для общей оценки качества усвоения магистрантами учебного материала предлагается использование рейтинговой системы.

УСР № 1. Ковалентная модификация сигнальных посредников

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Растительные протеиновые киназы. Кальций-зависимые протеиновые киназы. SnRK – SNF1-подобные киназы. Рецептор-подобные киназы. MAP киназы. Циклин-зависимые киназы. Казеиновые киназы SK1 и SK2. Семейство GSK3/Shaggy. CTRL/Raf-подобное семейство.

2 Протеиновые фосфатазы. Классификация фосфатаз. Серин/треониновые фосфатазы. Тирозиновые фосфатазы. Растительные фосфатазы. Разнообразие растительных фосфатаз. Значение растительных фосфатаз.

Форма работы – индивидуальная.

Форма контроля выполнения заданий: проверка конспектов.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Трансдукция фитогормональных сигналов: физиологические и биохимические аспекты: учебно-методическое пособие к спецкурсу «Вторичный метаболизм растений» / [сост. к.б.н. Й.Р. Абдрахимова]. – Казань: КазГУ, 2009. – 21 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

6 <https://studfiles.net/preview/2362134/page:3/>

УСР № 2. Цитокинины

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Химическая структура, классификация, биосинтез и метаболизм цитокининов.

2 Рецепция и передача сигнала цитокининов. Функции цитокининов в развитии растений.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Трансдукция фитогормональных сигналов: физиологические и биохимические аспекты: учебно-методическое пособие к спецкурсу «Вторичный метаболизм растений» / [сост. к.б.н. Й.Р. Абдрахимова]. – Казань: КазГУ, 2009. – 21 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

5 Биохимия растений / Б. Хельд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

6 <https://studfiles.net/preview/2362134/page:3/>

УСР № 3. Этилен

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Химическая структура, биосинтез и метаболизм этилена.

2 Рецепция и передача сигнала этилена. Функции этилена в развитии растений.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.

2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 336 с.

3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.

5 Муравьева Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.

УСР № 4. Методы изучения фитогормонов

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Комплексный метод разделения и очистки основных групп фитогормонов.

2 Тонкослойная хроматография фитогормонов.

3 ВЭЖХ и масс-спектрометрия фитогормонов.

Учебно-методическое обеспечение:

1 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.

2 Биохимия сельскохозяйственных растений / Б.П. Плешков. – М.: Агропромиздат, 2007. - 494 с.

3 Биохимия растений / [Л.А. Красильникова, О.А. Авксентьева, Ю.А. Жмурко и др.]; под ред. к.б.н. Л.А. Красильниковой. – Харьков: Феникс, 2004. – 224 с.

4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.

5 Физиология растений – Онлайн-энциклопедия – <http://www.fizrast.ru>.

УСР № 5. Продукты химического синтеза

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

1 Аналоги ауксинов: индолил-3-уксусная кислота (препарат гетероауксин), 4-индолил-масляная кислота (препараты корневин, укоренить), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (препарат тоmatон).

2 Аналоги гиббереллинов: натриевые соли гиббереллиновых кислот (препараты гиббор-М, гибберрос, гибберсиб, завязь, бутон, цветень).

3 Аналоги цитокининов: N-(1,2,4-триазол-4-ил)-N-фенилмочевина (препарат цитодеф).

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Журнал – Физиология растений – <http://www.rusplant.ru>.
- 5 Физиология растений – <http://www.maik.ru>.
- 6 Физиология растений – Онлайн-энциклопедия – <http://www.fizrast.ru>.

УСР № 6. Синтетические регуляторы роста с комплексным воздействием

Форма выполнения заданий: конспектирование темы по вопросам, составление презентации.

Перечень изучаемых вопросов:

- 1 1-Хлорметилсилатран (мивал, мивал-агро, энергия-М).
- 2 Тритерпеновые кислоты (препараты новосил, биосил, взрва),
- 3 Этан-1,2-дикарбоновая или янтарная кислота (препарат универсальный).

Учебно-методическое обеспечение:

- 1 Кузнецов, Вл.В. Физиология растений. В 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 459 с.
- 2 Медведев, С.С. Физиология растений: учебник для вузов / С.С. Медведев. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
- 3 Физиология растений: учебник для вузов/ Н.Д. Алехина [и др.]; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Академия, 2005. – 640 с.
- 4 Биохимия растений / Б. Хельд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. - 471 с.
- 5 База научных данных в области биомедицинских наук – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>.

III ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ

В качестве формы итогового контроля по дисциплине рекомендован экзамен. Оценка учебных достижений магистранта осуществляется на экзамене и производится по десятибалльной шкале. Для текущего контроля и самоконтроля знаний и умений магистрантов по данной дисциплине можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- оценка участие в интерактивных лекциях;
- подготовка презентаций на заданную тему;

- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса.

IV ПЕРЕЧЕНЬ ПРАКТИЧЕСКИХ (СЕМИНАРСКИХ) ЗАНЯТИЙ

Очная форма получения образования, 2 часа каждое

Занятие 1. Сигнальные молекулы и рецепторы.

Творческие задания для малых групп. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: первичные и вторичные мессенджеры. Рецепция внешних и внутриклеточных сигналов клетки. Основные типы рецепторов. Рецепторно-конформационный принцип. Рецепторы, сопряженные с G-белками. Рецепторы – ионные каналы. Строение, принцип функционирования. Рецепторы, ассоциированные с ферментом. Рецепторы, имеющие на цитоплазматической стороне каталитический участок. Рецепторы, под действием внешнего сигнала связывающие цитоплазматические протеинтирозинкиназы, или рецептор-«якорь». Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры (гормоны, цитокины, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, пурины и др.). Эффекторные молекулы. Аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфолипаза A₂, cGMP-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, некоторые типы ионных каналов. Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм. цАМФ, цГМФ, ИФЗ, ДАГ, NO, Ca²⁺.

Занятие 2. Трансдукция фитогормональных сигналов.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Рецепторы ауксинового сигнала. Механизмы передачи и регуляция ауксиновых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия ауксинов. Рецепция и передача сигнала гиббереллинов. Биохимические аспекты механизма действия гиббереллинов. Рецепторы цитокининового сигнала. Механизмы передачи и регуляция цитокининовых сигналов у растений. Биохимические аспекты механизма действия цитокининов. Восприятие АБК и передача ее сигнала у растений. Биохимические аспекты механизмов действия АБК. Этилен в жизни растений. Рецепторы этилена. Механизмы передачи и регуляция этиленового сигнала у растений.

Занятие 3. Сигналинг «неклассических» фитогормонов.

Построение карты метаболизма. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Пептидные гормоны растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Роль брассиностероидов в регуляции роста и развития растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль

в растениях. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Стриголактоны – регуляторы симбиотрофии растений и микроорганизмов. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Растения и тяжелые металлы: рецепция и сигналинг. Активные формы кислорода как посредники при передаче стрессовых сигналов. Гормональная регуляция.

Занятие 4. Фитогормоны в биотехнологиях растений.

Интерактивная лекция.

Рассматриваемые вопросы: Методы культивирования *in vitro*, применяемые в биотехнологии растений. Источники питания растений в условиях *in vivo* и *in vitro*. Фитогормоны. Витамины. Минеральные вещества. Классы фитогормонов и их особенности. Действие фитогормонов в сигнальной регуляции роста и развития растений. Значение фитогормонов при проведении работ по культивированию *in vitro*. Культура изолированных клеток и клеточных суспензий. Каллусные и клеточные культуры. Особенности органогенеза и эмбриоидогенеза *in vivo* и *in vitro*. Технология получения искусственных семян. Культура протопластов. Соматическая гибридизация. Методы слияния протопластов. Особенности продуктов слияния протопластов. Перспективы развития клеточной инженерии растений. Генетическая интеграция растений и микроорганизмов (мутуалистические взаимоотношения у растений). Механизмы взаимодействия растений с агробактериями. Природные генные векторы у растений.

Заочная форма получения образования, 2 часа каждое

Занятие 1. Сигнальные молекулы.

Творческие задания для малых групп. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: первичные и вторичные мессенджеры. Рецепция внешних и внутриклеточных сигналов клетки. Основные типы рецепторов. Рецепторно-конформационный принцип. Рецепторы, сопряженные с G-белками. Рецепторы – ионные каналы. Строение, принцип функционирования. Рецепторы, ассоциированные с ферментом. Рецепторы, имеющие на цитоплазматической стороне каталитический участок. Рецепторы, под действием внешнего сигнала связывающие цитоплазматические протеинтирозинкиназы, или рецептор-«якорь». Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры (гормоны, цитокины, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, пурины и др.). Эффекторные молекулы. Аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфолипаза A₂, cGMP-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, некоторые типы ионных каналов. Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм. цАМФ, цГМФ, ИФЗ, ДАГ, NO, Ca²⁺.

Занятие 2. Сигналинг «неклассических» фитогормонов.

Построение карты метаболизма. Коучинг.

Рассматриваемые вопросы: Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Пептидные гормоны растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Роль брассиностероидов в регуляции роста и развития растений. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Салициловая кислота. Строение, биосинтез и физиологическая роль в растениях. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Стриголактоны – регуляторы симбиотрофии растений и микроорганизмов. Механизмы передачи и регуляция сигнала. Растения и тяжелые металлы: рецепция и сигналинг. Активные формы кислорода как посредники при передаче стрессовых сигналов. Гормональная регуляция.

У ИТОГОВАЯ АТТЕСТАЦИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

По дисциплине «трансдукция фитогормональных сигналов» предусмотрено написание экзаменационной работы. Экзаменационная работа выполняется в электронном виде, включает титульный лист, основное содержание и список использованных источников информации (книги, статьи, интернет-источники). Объем экзаменационной работы – не менее 20 страниц основного текста. Источников информации – не менее 15.

Оформление страницы: поля: верхнее и нижнее – 2 см; левое – 3 см; правое – 1 см. Шрифт Times New Roman, 14 pt. Абзацный отступ – 1,25 см; выравнивание по ширине, междустрочный интервал – одинарный.

Отдельные страницы: титульный лист и список использованных источников.

Текст освещается по плану, снабжается цветными иллюстрациями с подписями.

Титульный лист и список использованных источников оформляется по СТП.

Примерная тематика экзаменационных работ:

1 Протеинкиназы и протеинфосфатазы как ключевые ферменты регуляции сигнальных каскадов клетки.

2 Фосфолипазы и липоксигеназы растений. Липоксигеназная сигнальная система как сложный путь образования оксипинов растений. Дивинилэфирсинтазная, алленоксидсинтазная и гидропероксидлиазная ветви липоксигеназного сигналинга.

3 МАП-киназная сигнальная система растений как группа мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей. Регуляция МАП-киназного сигнального каскада. Роль в регуляции митоза клеток.

4 Метаболизм ауксинов в растениях. Хемиосмотическая гипотеза полярного транспорта ауксина. Рецепторы ауксинов. Действие ИУК на клетку.

5 Гиббереллин-индуцируемая экспрессия генов синтеза антоцианов и амилазы. Гены-мишени гиббереллинового сигнала. Рецепторы гиббереллинов. Физиологические эффекты гиббереллинов.

6 Цитоплазматические цитокининсвязывающие белки. Мембранные рецепторы цитокининов. Гены-мишени цитокининов. Морфогенетическая роль цитокининов и ауксинов.

7 АБК - стрессовый фитогормон. Значение АБК в процессах адаптации к стрессовым воздействиям. АБК и формирование устойчивости к низким температурам. АБК и биотический стресс. Роль АБК в регуляции водного режима растений.

8 Регуляция уровня этилена в растении. Строение рецепторных гистидинкиназ. Тройной ответ растений на действие этилена. Практическое применение этилена.

9 Соединения, образуемые микроорганизмами, способные влиять на рост высших растений: гелиминтоспорол, котиленины, склерин, песталотин, фузикоцин. Соединения, образуемые высшими растениями и влияющие на их рост при экзогенном введении: фенолкарбоновые кислоты, транскоричная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, коричная кислота, кумаровая кислота феруловая кислота, флавоноиды, кумарины и др.

10 Клональное микроразмножение растений. Роль ауксинов и цитокининов в каллусогенезе. Гормонезависимость каллусных клеток. Образование отдельных органов растений *in vitro*. Роль фитогормонов. Использование фитогормонов при выращивании растений в открытом грунте.

VI СТРУКТУРА РЕЙТИНГОВОЙ ОЦЕНКИ ЗНАНИЙ

Итоговая оценка по дисциплине (минимум 4, максимум 10 баллов) на основании данных ведомостей модульно-рейтинговой системы оценки знаний определяется по формуле:

$$\text{Итоговая оценка} = A \times 0,4 + B \times 0,6$$

где A – средний балл текущей успеваемости, B – экзаменационный балл.

Итоговая оценка выставляется только в случае успешной сдачи экзамена (4 балла и выше).

Балл текущей успеваемости определяется по формуле:

$$A = (C + D) / 2$$

где C – средний балл за 4 интерактивных практических (семинарских) занятия;

D – среднее арифметическое оценок по 6 контрольным работам УСР.

.

**ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ
ДИСЦИПЛИНЫ «ТРАНСДУКЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ
СИГНАЛОВ» С ДРУГИМИ ДИСЦИПЛИНАМИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ
1 31 80 01 Биология (профилизация Функциональная биология)**

Название дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы по изучаемой учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой, разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Мембраны и межклеточные коммуникации	Зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № 10 от <u>18.04.</u> 2019 г.
Эпигенетика	Зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № 10 от <u>18.04.</u> 2019 г.

**ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

на ____/____ учебный год

№ п/п	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры
ботаники и физиологии растений
(протокол № ____ от _____ 20__ г.)

Заведующий кафедрой химии _____ Н.М. Дайнеко

УТВЕРЖДАЮ

Декан биологического факультета

УО «ГГУ им. Ф. Скорины», д.б.н. _____ В.С. Аверин