



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ. ЧАСТЬ 2

НОСОВ
АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА VK.COM/TEACHINMSU.

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
VK.COM/TEACHINMSU.

СОДЕРЖАНИЕ

Лекция 1. Фитогормоны	6
Стратегия существования растений.....	6
Ключевые моменты роста и развития растений:	6
Фитогормоны	7
Общие критерии гормонов.....	7
Особенности фитогормонов	7
Общие представления (феноменология)	8
"Стимулирующие" фитогормоны	8
Ауксины	8
Цитокинины.....	13
Гиббереллины.....	16
Лекция 2. Неклассические фитогормоны.	17
Гиббереллины - продолжение	17
"Тормозящие" фитогормоны	19
Абсцизовая кислота - АБК.....	19
Этилен.	21
Неклассические фитогормоны:	23
Брассиностероиды.....	23
Жасмонаты.....	25
Стриголактоны	27
Салициловая кислота.....	27
Лекция 3. Фоторецепция	28
Рецепторы светового восприятия.....	28
Фитохромы.	28
Рецепторы синего света.....	35
Биологические часы.	39
Лекция 4. Развитие растений, устойчивость растений к стрессу.	42
Морфогенез цветка	42
Определение пола у растений	47
Устойчивость растений.....	49
Лекция 5. Сигнальные системы растений.....	58
Факторы регулирования судьбы клетки.....	58

Взаимодействие гормонов в клетках	58
Белковые факторы – кандидаты в фитогормоны	59
Сопоставление гормонов животных и растений.....	60
Система восприятия и трансдукции сигналов в растениях	60
Общая схема	60
Рецепторы клетки животных и растений.....	61
Вторичные мессенджеры сигналинга растительной клетки.....	63
Аденилатциклазная сигнальная система	64
Вторичные мессенджеры из диацилглицеридов.....	64
Фосфоинозитольная сигнальная система	65
MAP-киназы	66
Классификация сигнальных систем клетки	66
NAFDH-оксидаза	67
NO-синтаза и NO.....	68
Протоны	68
Система убиквитинирования	68
MiRNA	69
Рецепторы фитогормонов	70
Критерии рецептора.....	70
Рецепция ауксина.....	70
Рецепция Гиббереллинов	72
Лекция 6. Рецепция фитогормонов	75
Рецепторы – убиквитинЕ3лигазы	75
Рецепция ауксинов и гиббереллинов коротко	75
Рецепция жасмонатов	76
Рецепция этилена	80
Рецепция брацциностероидов	82
Рецепция АБК	84
Лекция 7. Эмбриогенез растений.....	88
Различия стратегии развития растений и животных.....	88
Этапы развития растений:.....	88
Развитие от зиготы до семени.....	88
Покой семян.....	93
Прорастание.....	94
Формирование тканей корня и побега	94
Лекция 8. Защита растений от патогенов	101

Абиотический стресс – кратко	101
Биотический стресс	101
Понятия и термины.....	101
Типы патогенов	103
Взаимодействие патоген-растение.	104
Лекция 9. Вторичные метаболиты.....	118
Практическое применение вторичных метаболитов.....	118
Что такое вторичные метаболиты.....	119
Классификация вторичных метаболитов	120
Изопреноиды	120
Алкалоиды	129
Фенольные соединения	132
Минорные группы вторичных метаболитов	139
Синтез вторичных метаболитов	147
Логика синтеза вторичных метаболитов	147
Физиология вторичного метаболизма	149
Лекция 10. Завершение роста и развития растений.....	153
Вегетативное развитие растений.....	153
Ювенильная стадия развития растений	153
Развитие побега	153
Цветение	158
Процесс зацветания	158

Лекция 1. Фитогормоны

Стратегия существования растений

Рост и развитие растений. Стратегии существования растений и животных отличны. Животные независимы и активны, растения автотрофны и ведут прикрепленное существование. Они не неподвижны, но фиксированы в пространстве. Отсюда вытекает следующая стратегия: растения четко отслеживают внешние факторы и избирательно подстраиваются под них. Рост и развитие растений - процессы, в которых она тоже будет прослеживаться. На уровне клетки, на каждом этапе развития растения различаются. В клетке три генома, они взаимодействуют, это достаточно сложно. Клеточная стенка и пластиды - особые структуры.

Ключевые моменты роста и развития растений:

1. Метамерное строение. Растения построены из блоков, в отличие от животных никогда нельзя предугадать, какой будет окончательный габитус, вид растения. Метамер - побег: лист, пазуха, междуузлие. Сколько будет побегов, зависит от условий существования. Это - в пространстве.
2. Во времени - стадийность развития. Лысенко предложил идею о ней. Растение четко отслеживает внешние и внутренние факторы. Только при совпадении внутренних и внешних условий переходит к следующей стадии. Стадийность - принципиальная система развития растений.

Этапы развития растений во времени:

А. Эмбриогенез - получение миниатюрного растения до стадии семени, упаковка в специальное образование - семя - тоже отличие от животных. Если животные размножаются на стадии взрослого состояния, когда они активны, то растения вынуждены из-за прикрепленного состояния расселяться на уровне зародышей (зародыш - маленькое растение в упаковке с питательными веществами).

Б. Стадия прорастания,

В. Ювенильная стадия, когда происходит активное развитие.

Г. Переход к цветению (от вегетативного к репродуктивному состоянию). Многие растения никогда не зацветут.

3. Постоянный рост, отличие от животных. При эмбриогенезе нет перемещения клеток, как у животных. Есть направление и скорость деления.

Многие моменты роста и развития растений специфичны. Как правило, не похожи на то, что происходит у животных. Автотрофность и прикрепленное существование накладывают отпечаток практически на все стадии, этапы и механизмы роста и развития.

Фитогормоны

Эндогенные факторы (регуляторы) внутреннего состояния растений: четко координируют весь организм. Необходимо, чтобы растение могло (биохимически, молекулярными механизмами), отследить свое состояние и решить, переходить к какому-то этапу, или нет. В качестве эндогенных регуляторов программ развития (в какой-то степени, как и у животных) выступают гормоны растений, или фитогормоны. Есть общее и различия с гормонами животных.

Общие критерии гормонов (работают для растений с небольшими исключениями):

1. Необходимо, чтобы гормон вызывал специфический ответ у определенных клеток.
2. Как правило, (для животных обязательно) место синтеза (у животных - эндокринные железы) и место действия разнесены в пространстве. Для растений этот критерий не строг.
3. Нет специальных органов для выработки гормонов.
4. Вещество не должно играть роли в основном метаболизме. Не энергетика, не важные синтезы белков, только сигналинг.
5. Обязательны очень низкие концентрации - на уровне 10^{-5} и ниже.

Особенности фитогормонов

1. Как правило, низкомолекулярны. Причина - большие белки не могут проникнуть через клеточную стенку.
2. Если у гормонов животных мишень конкретна и очень четка (адреналин регулирует работу сердца), то у растений такого не прослеживается. Фитогормоны растений запускают целые программы развития, влияют на целые блоки.
3. У нормальных гормонов животных можно четко определить, что они делают. У гормонов растений специфика действия может быть различна в зависимости от того, где эти гормоны работают: в каком органе и ткани; на какой фазе онтогенеза (стадии развития) и от внешних условий.
4. Нет специальных желез. В принципе, любая клетка растений может синтезировать гормон.
5. Кроме того, что каждый гормон может запускать целую программу развития, наблюдаются переговоры гормонов (crosstalk). В зависимости от того, с каким гормоном взаимодействует конкретный гормон, действие может быть совершенно разным. Можно сказать, что нет действия отдельных гормонов, есть сеть воздействия гормональных

систем на растения. Это очень осложняет изучение. В настоящее время гормонология - самая горячая точка изучения физиологии растений.

Общие представления (феноменология)

Что из себя представляют фитогормоны? Рис. 1 Из-за того, что запускают программы развития и есть переговоры, их мало. Пять открыты в прошлом веке. Новые - относительно недавно. Есть споры о том, что из них - гормоны. Брассиностероиды и жасмонаты - да. Салицилаты и стриголактоны - сомнительно.

Фитогормоны

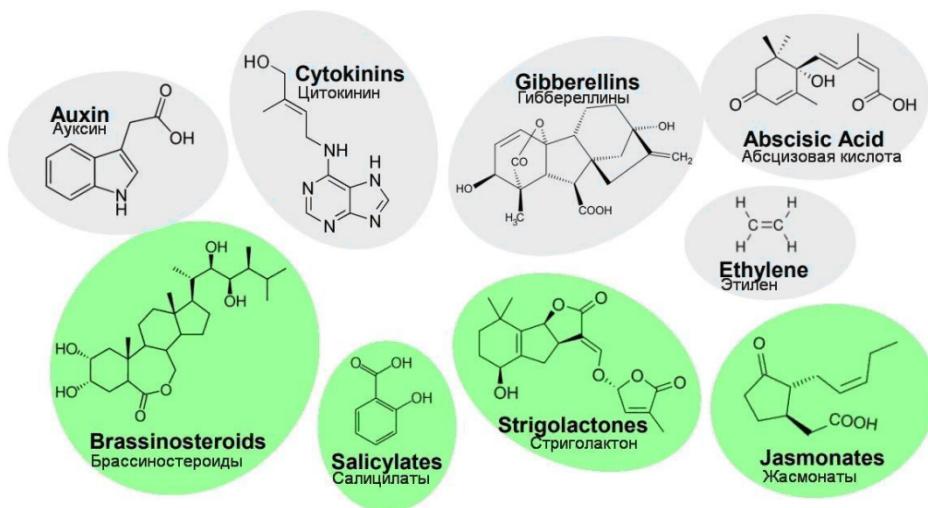


Рис.1. Фитогормоны

Ауксины, цитокинины, гиббереллины – часто можно прочесть, что они – "стимулирующие". Абсизовая кислота и этилен – "тормозящие". Их функции

различны в онтогенезе. Первая группа гормонов играет большую роль на ювенильных стадиях развития. Абсизовая кислота и этилен – часто при формировании семян. Главная их функция – защита растений. Описание новых гормонов удобно выводить по механизму действия, что есть специфическое рецепторы, которые запускают каскады.

"Стимулирующие" фитогормоны

Ауксины – первая группа гормонов. Рис. 2. "Ауксо" – "расти". Открыты в 30-ых годах прошлого века Вент и Холодной. Уникальная группа гормонов, сильно отличается от остальных. Главный ауксин – индолилуксусная кислота. Очень простая структура, есть индольная и гидроскильная группы. Фитогормоны всегда и по синтезу, и по структуре похожи на нормальные биохимические вещества. Обязательно есть особенность, которая отличает их от других первичных метаболитов. Отличие от индола: расстояние

между четвертым атомом углерода индолиновой структуры и карбоксильной группой. Оказался важен размер между четвертым атомом углерода индола и карбоксильной группой - около 0.5 нанометров. Между ними есть дельта плюс и дельта минус. Это принципиально важно для работы. Существует главный ауксин - индолилуксусная кислота. Кроме нее есть исключения: индолилмасляная кислота. Она - либо ауксин, либо один из продуктов его метаболизма, действует гораздо слабее. Другие ауксины тоже слабее работают, не у всех распространены: хлориндолилуксусная кислота (сначала предполагали, что она – результат выделения), фенилуксусная кислота еще менее активна, распространены не очень широко. Есть много синтетических ауксинов. Дихлорфенолуксусная кислота - мощный гербицид. В малых концентрациях - синтетический аналог ауксина. В больших - яд. Нафтилуксусная кислота – тоже синтетическое соединение. Для них всех дельта плюс и дельта минус двух зарядов - на уровне 0,5 нанометров. Неширокий набор. Ауксин локализован в хлоропластах. Основной вариант синтеза ауксинов - из триптофана. Триптофан чаще всего образуется в пластидах. Как это все работает? Важно, что в принципе, любая клетка может синтезировать гормоны и очень важна активная концентрация в каждой клетке активной формы фитогормона.

Активная концентрация фитогормона складывается из:

1. синтеза (не характерно, что гормон работает там, где синтезируется, но не исключается);
2. транспорта (как приток, так и отток): важный момент образования активной концентрации активного гормона - скорость поступления в клетку и выхода из нее;
3. перехода в неактивную (конъюгированную) форму, из активного гормона может образоваться неактивный пул. Чаще всего это - гликозилирование, может быть связь с аминокислотами, ацилирование. Это тоже обратимый процесс.
4. Катаболизма. Клетка может полностью развалить пул гормона. Чаще всего - окислением.

Это – тонкий момент для регулирования и изучения гормонов. Итак, активная форма гормона зависит от многих процессов: синтез, приток-отток, переход в конъюгированную форму, развал. Для устойчивости важно мультифункциональность и дублирование. Это позволяет клетке регулировать активную форму любого гормона разными вариантами. Регулирование активной формы гормона у ауксинов.

1) Синтез. Существуют разные варианты. В разных клетках, в разное время, в разных растениях может идти разными путями, в том числе параллельно. Это - система очень тонкой настройки формирования гормонов. Характерно для любого гормона. Считается, что исходная форма для синтеза индолилуксусной кислоты - триптофан. Это не так. Первый вариант - триптофан-независимый путь синтеза индолилуксусной кислоты. Животные не могут синтезировать ароматику. Поэтому фенилаланин, тирозин

– незаменимые аминокислоты. Растения могут - шикиматный путь. Индолилуксусная кислота образуется как ответвление синтеза триптофана шикиматным путем. Ароматическое кольцо - харизматы – шикимовая кислота – антронилат – вилка и не доходя до триптофана образуется индолилуксусная кислота. Основные варианты образования - из триптофана, минимум четыре. Через индолацетонитил (IAN-путь), через триптамин (TAM-путь, две ветки), через пиридиноградную кислоту (IPA-путь). Еще один - (IAM-путь) очень короткий, два фермента, нехарактерен для растений, найден бактериями. Он часто используется в трансгенных системах. Так много путей - от того, где, в какое время, в каком растении, иногда может быть дублирован для тонкого регулирования. Конъюгаты - образование неактивных форм. Чаще всего это - гликозилирование. На карбоксил могут садиться сахара, инозид. При необходимости их отщепляет специфичная гликозилаза. Катаболизм. Без карбоксилирования - обратим, с декарбоксилированием - однозначно работают оксидазы и происходит уход без возврата. Как правило, низкомолекулярные конъюгаты. Недавно оказалось, что могут быть высокомолекулярные конъюгаты. На карбоксил могут садиться до пятидесяти молекул глюкозы. Зачем - неизвестно.

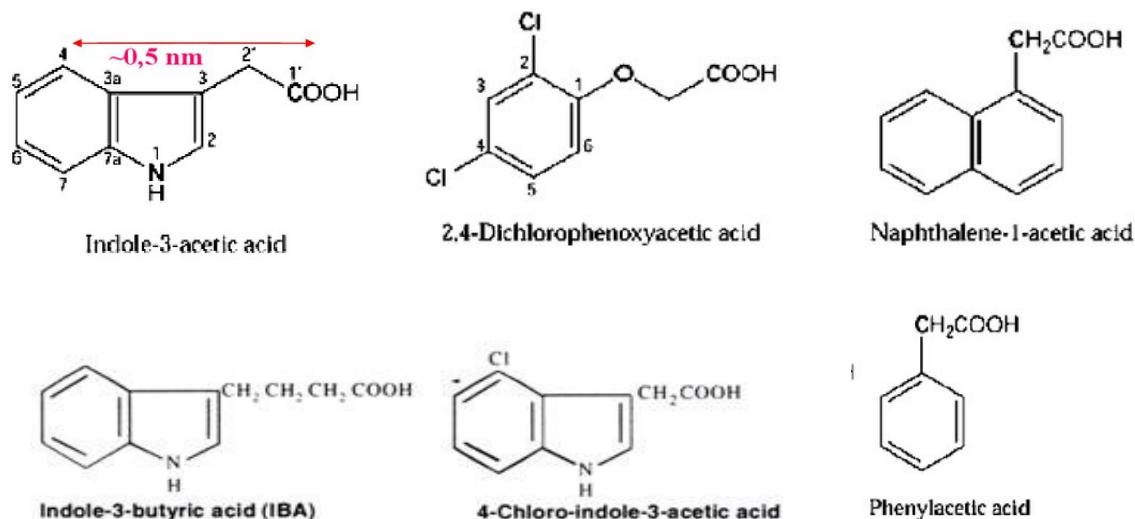


Рис. 2. Ауксины

Транспорт - самое важное. Ауксины очень специфичны. Они, возможно, единственные гормоны, для которых основной вид транспорта - от клетки к клетке. По флюэму - побочный вид транспорта, видимо, характерен только для камбия. Вопрос - каким образом они выходят из клетки и каким поступают. Поступление в клетку. Обычно синтезируются в апексе стебля и транспортируются сверху вниз. Относительно медленно, потому что через клетки. Для растения чрезвычайно важна полярность. Другой гормон - цитокинин - будет делать другую полярность - синтезироваться в апексе корня и транспортироваться вверх. Полярность

гормона от апекса к апексу - чрезвычайно важное состояние гормонального баланса всего растения для процессов, связанных с ростом и вещами, связанными с полярностью. Полярность на уровне клетки, органа, ткани, основная вещь для растения. Растение - прикрепленный организм и ему чрезвычайно важно знать свое положение в пространстве.

Альтернативные варианты поступления.

Самое простое - пассивное поступление: химическая игра на поступление. В клеточной стенке pH - кислый. На плазмалемме работает АТФаза. Индолилуксусная кислота может быть в протонированной форме и карбоксильной (COO^-). Это зависит от pH. В периплазматическом пространстве индолилуксусная кислота будет в протонированной форме. Для мембраны более проницаема протонированная форма. В кислой среде протонированный ауксин не очень активно, но нормально проникает в мембрану. В цитозоле (там - нейтрально-щелочная среда) превращается COO^- и тут же ловится. Кроме пассивного поступления есть активное. Есть транспортер AUX1, очень похож на бактериальный переносчик аминокислот. Может регулировать поступление ауксина в клетку путем симпорта с протоном.

Более тонкое регулирование работает на выходе из клетки. Работают специальные транспортеры. Чаще всего распределены на базальной стороне клетки и выбрасывают из нее индолилуксусную кислоту. Основную работу обеспечивает система переносчиков, которая называется PIN (название - от мутанта арабидопсиса по переносчику ауксинов с булавовидным соцветием). Таких переносчиков много, около десятка, они приурочены к разной ориентации в клетке. Pin-1, как правило, расположен в базальной стороне клетки, Pin-3 часто расположен в латеральной. В зависимости от того, как нужно транспортировать ауксин так они распределяются. Pin-7 в эмбриональных клетках. Распределяются по онтогенезу, по органам. Распределяя транспортеры, клетка четко регулируют потоки ауксинов.

Есть еще переносчики: PGP-белки. Большая группа белков, суперсемейство, анионные транспортеры, их 17-20. Три из них - транспортеры ауксинов. Есть флоэмный транспорт ауксинов. В апексе корня - фонтанирующий перенос. Могут поступать во флоэму из апекса и листьев. Флоэмный транспорт - не основной, но очень важен, когда нужно работать камбию.

Ингибиторы транспорта ауксинов. Синтетические: нафтилфталамовая кислота. Используется в исследованиях. Природные. Флаваноиды, изофлаваноиды – вторичные метаболиты. Растение имеет настолько много возможностей регулировать концентрацию нужного гормона в нужном месте, что даже убийственное воздействие может нивелировать. Эксперимент: два гена синтеза ауксина из агробактерий поставили под мощнейший 35S -промотор. Трансген был, посмотрели экспрессию. Концентрация ауксина оказалась чуть-чуть выше в месте синтеза и в листьях.

Как работает: на уровне клеток ауксины - один из гормонов, которые стимулируют деление. Для того, чтобы вывести клетку из G0-фазы (с 90% вероятности), достаточно добавить два гормона: ауксин и цитокинин. Есть циклин-зависимые киназы, два компонента: киназа и циклин. У растений их - десяток. ЦДК3 стимулируется ауксином. Ее циклин стимулируется другим гормоном. Первое - образование циклин-зависимых киназ, которые запускают деление.

Удлинение клеток. (Тест – после обработки ауксином растягивается колеоптиль за полчаса). Способствует росту стенок клеток колеоптилуса, ингибирует рост корней. Оптимальная концентрация 10^{-6} , 10^{-5} – стебель. Для корня сначала предположили, что ауксин индуцирует этилен. Получили мутант по ауксину, выяснили, что для ингибирования та же концентрация. Стимуляция роста корня бывает при меньшей концентрации. Разная чувствительность разных клеток. Гипотеза кислого роста. Считается, что ауксин стимулирует Н-АТРазу плазмалеммы. Она через 10 минут подкисляет клеточную стенку, начинают работать экспансины, метилэтилэстеразы. Из-за этого – удлинение. Просто подкисление тоже вызывает удлинение клеток, но по-другому, с другими концентрациями.

На уровне растения: фототропизм, гравитропизм. Изгиб к солнцу, изгиб к центру тяжести. Механизм – чаще всего, перераспределение PIN-ов.

Глобальный ответ ауксинов: апикальное доминирование. У растения на определенном расстоянии никогда не будет закладываться боковых веток. Чаще всего - Аттрагирующее действие: ауксин притягивает к себе питательные вещества.

Развитие флоральных почек и филлотаксис. Увеличение закладки боковых и адвентивных корней. Широко используется в укоренении. Дифференциация проводящих систем Участие в опадении листьев концентрация ауксина будет разная в зависимости от возраста листьев. Развитие плодов. Любой блок онтогенеза связан с ауксином. Дарвин – один из первых физиологов растений. Изучал фототропизм. Оказалось, что он определяется концентрацией ауксинов. Транспортеры перераспределяются в зависимости от того, откуда светит свет. Скорость деления с боков стебля будет неодинаковой. Гравитропизм все тоже самое с точностью дооборот. В зависимости от распределения статолитов – крахмальных зернышек – распределяются PINы. В нижнем боковине корня концентрация ауксина будет больше (10^{-6}), чем в верхней (10^{-9}), деления заингибируются, корень загнется вниз. Что запомнить: клеточные деления, СДК, переход из G0 в G1-фазу. Кислый рост, активацию АТФазы, аттрагирующее действие, грави- и фототропизм, корнеобразование, образование ксилемы и флоэмы – важно, взаимодействие с другими фитогормонами, стимуляция образования этилена. Жизнеспособность пыльцы.

ЦИТОКИНИНЫ.

Сейчас читается феноменология гормонов, общий взгляд. То, что можно найти в учебниках. Рецепция, трансдукция сигналов активация генов – действие гормонов. Дайце, Зайгер учебник (Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) Plant Physiology. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland). Цитокинины (Рис.3) открыты в 55 году, в лаборатории Скуга. Добавление ауксинов не помогало, добавляли все, что могли: кокосовое молоко, третий картофель, клетки росли, действующее вещество не находилось. Добавили ДНК в среды, автоклавировали, клетки стали расти. По кулуарной информации – ДНК было испорчено, его добавили в среду, все заработало. Стали искать, что действует – нашли кинетин (фурфуриламинопурин). Это - продукт деструкции.

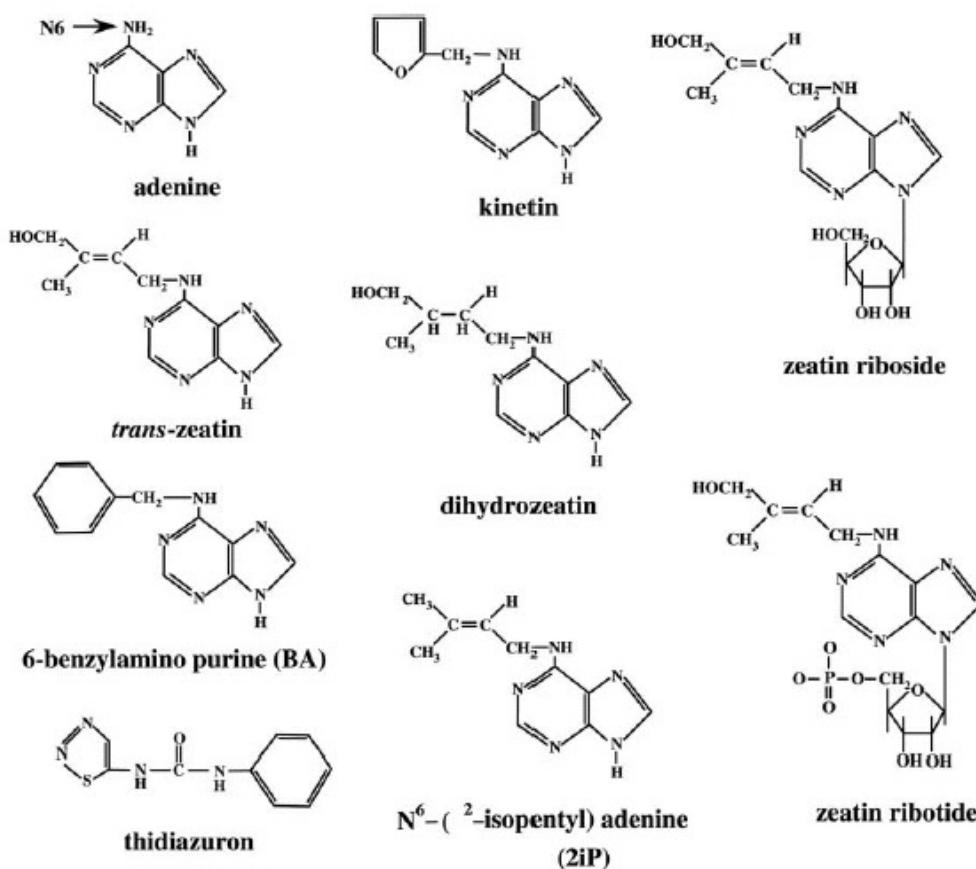


Рис. 3. Цитокинины

Настоящий цитокинин – зеатин – выделили позже. В отличие от ауксинов, нет главного цитокинина, их несколько. Структура - сочетаются - пуриновое основание и изопентенил – основа всех изопреноидов, 40000 соединений синтезируются из изопентенилдифосфата. Если присоединить к пурину изопентенил, получается фитогормон. Их несколько, есть зеатин – изопентениладенин с гидроксилом, есть просто изопентенииладенин, дегидроzeатин (писать через е, там нет двойной связи), у которого нет двойной связи.

Как минимум, цитокининов три: изопентиладенин, зеатин, дегидроzeатин. Ключевой момент в синтезе (как у ауксинов, когда укорачивается цепочка с карбоксилом) - когда к аденину присоединяется изопентинил. Это делается на уровне рибозидов, когда есть сахар, может быть, риботидов, когда еще есть фосфат. Дальше происходит отщепление фосфата, образуется рибозид. Все эти соединения обладают активностью, но меньшей. Меньше всего активность – когда просто нуклеотид, больше – когда рибозид, максимум активности – изопентиниладенин и его варианты. Не просто ответить, что это – цепочка синтеза, или это – определенная система веществ с разной активностью. Самое главное – здесь тоже, почти как для ауксинов есть сеть, везде есть ферменты. Биосинтез цитокининов – сеть процессов, которая может быть регулирована. Это может происходить в разных компартментах. Чаще всего – в корне. Все синтезируется, потом в определенном месте будет уходить фосфат, потом сахар. В конце концов фермент Lonely Guy образует активные формы, минимум четыре, у одной есть цис-транс-изомерия. Сеть синтеза регулируется очень тонко: концентрации, гормоны, внешние факторы, все как у ауксинов. Самое любопытное – цитокинины найдены в транспортной РНК. Рядом с антикодоном есть аденин, к нему присоединяется изопентинил. Как синтезируется: ключевой момент – когда образуется связь основания с изопентинилом, работают изопентинилтрансферазы. Их – целое дерево, которое разделяется на три группы. Источником энергии может быть АТФ и АДФ, АМФ. Главная группа использует АТФ, их много. Вторая группа цепляет изопентинил к транспортной РНК, непонятно зачем и зачем так много. Самое предсказуемое – третья часть – полный аналог синтеза ауксина. Группа изопентилтрансфераз, которые используют АМФ, их нет в растениях, есть в агробактериях. Это система говорит, что коэволюция – очень мощная вещь. Зачем так много? Нормальные изопентилтрансферазы много, около десятка. Что-то в энтордерме, что-то – в кончике корня, во флоэме и молодых сосудах. Фактически – по всему растению, еще есть онтогенез. Ключевой момент образования цитокининов регулируется серьезно и большим набором генов.

Коньюгаты и развал. Цитокинины огромные возможности для образования коньюгатов.

Есть азоты. Гликозилирование может быть разным: О- N- S- C-. Для N-гликозидов 2 хороших места, в пятичленном кольце 7N и 9N. Есть есть гидроксил (зеатины), надо прицепить сахар. В изопентиладенине гидроксила нет, он более устойчив к переходу в коньюгаты. Стандартно О-гликозиды цитокининов (невозможно для изопентиладенина!): разные сахара, могут быть по разным С-гидроксилам, могут быть двойные гликозиды по О- и по N-, есть набор N-гликозидов по двум атомам, могут быть коньюгаты с аминокислотами: 9-Аланилзеатин, может быть 9-аланил-дигидроzeатин или пентил.

Транспорт специфичен. Магистральное направление транспорта ауксинов сверху вниз от клетки в клетку. Цитокинины – наоборот. Основное место цитокининов – апекс корня. Ауксин – гормон благополучия стебля, цитокинин – гормон благополучия корня.

Есть система транспорта между клетками. Два основных переносчика PUP пурина пермиазы (переносят свободные цитокинины) и ENT (эквилибирирующие нуклеозидтрансферазы, переносят цитокинин-нуклеозиды, там, где сахар).

Может работать ксилемный и флоэмный транспорт. Для цитокининов не характерен транспорт от клетки к клетке. В отличие от ауксинов в основном транспортируются по сосудистым пучкам. Считалось, что транспортируется по ксилеме снизу вверх, оказалось, система более тонкая, работает оба транспорта: ксилемный и флоэмный. Переносчиков PUP есть два. Основной – PUP2. Делает обмен между проводящими системами и окружающими клетками. Первый – очень специфичная вещь. Находится в гидатодах, которые выводят воду с листьев, но из нее надо убирать регуляторы и минеральные соли, PUP1 ответственен за возврат цитокининов из капель. В основном работает PUP2. Для ENT показано, что располагаются вокруг сосудистых пучков. Транспорт: в корне происходит их синтез, к АТФ, АДФ цепляется изопентениил, образуется рибозид.

Никаких дальнейших превращений не происходит, работают ENT-транспортеры, изопентенилтрансфераза образует цитокинин-нуклеотид, ENT перетаскивает их в ксилему.

Снизу вверх идет не активный цитокинин, а его рибодид (маленькая активность). Он приходит в стебель, здесь работает АМТ – транспортер стебля. Нуклеотиды из сосудов выходят в окружающие клетки. В них работает фермент LOG (lonely guy), он отрезает сахара, образует активные цитокинины: зеатин, изопентенииладенин, дигидроzeатин, включается PUP2, который заталкивает их во флоэму, с флоэмным током они расходятся по растению, адресно.

Клеточки памяти для цитокининов. Циклины: ауксины переводят из G0 в G1, активируют циклин-зависимую киназу. Цитокинины активируют циклины. Чтобы получить культуру клеток, надо сначала добавить ауксины, потом цитокинины, либо вместе. Если сначала добавить цитокинины, потом ауксины, ничего не получится. Сначала киназа должна быть активирована циклинами. Вместе ауксины и цитокинины вызывают митоз. Открывание устьиц. Как и ауксины, аттрагирующее действие. Основное первое действие цитокининов – омолаживающее. Эксперимент Кулаевой: на половину увядающего листа наносили цитокинин. Она зеленела, вторая погибала. Оказалось, что клетки с цитокинином привлекали все питательные вещества. Задержка старения. Развитие листа, развитие семядолей. Снятие апикального доминирования. Если нанести на пазушную почку цитокинин, будет формироваться побег – противоположный случай работы с ауксином. Все вышеперечисленное – аттрагирующее действие. Еще противоположное действие с ауксином: если ауксины формируют закладку корней, то цитокинины тормозят. Но они будут формировать боковые корни. Прерывание покоя семян. Развитие хлоропластов, закладывание пазушных почек.

Гиббереллины

Последний активирующий классический фитогормон - гиббереллины. Рис.4 Гриб Гибберелла вызывает болезнь бешеных проростков. При попадании его в любой злак соломина начинает расти и ломается, урожай погибает. После войны нашли гиббереллин. Ауксин – один. Цитокининов четыре - пять. Гиббереллинов больше ста. Структура. Изопреноиды – то, что построено из изопентильтных фрагментов – C5-фрагментов. Есть монотерпены – эфирные масла, C10, есть сесквитерпены, есть

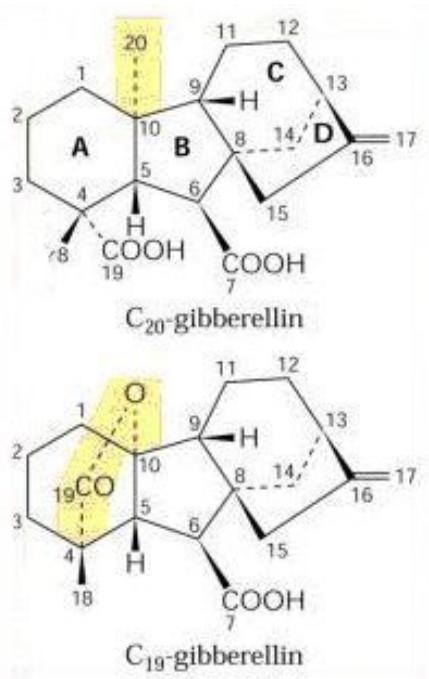


Рис. 4. Гиббереллины

дитерпены, C20, построены из четырех изопентильтных фрагментов. Структура эндо-коурэна распространена. Есть сладкие сахара, стирол-гликозиды. Должна быть особенность, которая сразу отличает фитогормон. У гиббереллинов это – пятичленное кольцо В. Стандартная структура тетратерпеноида – 6, 6, 6. Как только появляется пятичленно кольцо (C6-C5-C6), это – гиббереллин. Варианты: существуют C19 гиббереллины, пентильтная группа может быть в молекуле, может не быть. В тех гиббереллинах, где ее нет, образуется лактонное кольцо, они наиболее активны. Для активности важно: гидросксил, лактонное кольцо и каброксил. Все есть – максимум активности. Чего-то не хватает – активность меньше. Почему их много – у разных растений могут быть разные гиббереллины, они могут работать по разным механизмам, один будет регулировать цветение у короткодневных растений, другие – сильно удлинять рост, растяжение, многие будут неактивны: гиббереллины формируются, когда появляется пятичленное кольцо, то есть будут – неактивные предшественники.

Лекция 2. Неклассические фитогормоны.

Гиббереллины - продолжение

Специфика растительных гормонов: запускают программы развития, низкомолекулярны, действующая концентрация в клетке зависит от синтеза (нечастый случай), могут синтезироваться любой клеткой (в отличие от животных), как правило, синтезируется в одном месте, транспортируются, работают в другом. Реальная концентрация гормонов зависит от следующих процессов: поступление в клетку и уход, вход в неактивное состояние и возврат в активное, деградация. Ауксины и цитокинины - основные гормоны. Ауксины синтезируются в апексе стебля. Транспортируются из клетки в клетку, синтез (4-5 вариантов) и транспортеры - разнообразные, разные выходы из клетки и деградация. В основном, идут сверху вниз, могут транспортироваться и по флоэму. Цитокинины, в основном, синтезируются в апексе корня, транспортируются по ксилеме вверх в предшественнике в виде рибозида, выходят из транспортной системы в окружающие клетки, там делаются активными и распределяются по всему растению с флоэмным током. Ауксин - один. Цитокининов 3-4, рибозиды и рибодиды тоже имеют активность. Гиббереллинов более 100, под 150 (136 - данные трехлетней давности). Помним, что структура гормона часто бывает похожа на первичные метаболиты, всегда есть структурная особенность, по которой сразу понятно, что это - гормон. У цитокининов структура - аденил плюс изопентениильный фрагмент. Изопентениилов (изопентилдифосфата синтезируется 40000 соединений) и аденилов много, но вместе дают гормон. Для гиббереллинов помним, что гиббереллановый скелет - дитерпеноид. C20, составлен из четырех изопентильных фрагментов. Структура энт-каурена довольно распространена. Предшественник каких-нибудь сладких ствл-гликозидов (используются в медицине), в норме второе кольцо - шестичленное. Для гиббереллинов оно - пятичленное. Структура - обширная, могут отличаться на две большие группы. C19 - более активны. При их синтезе атом C20 уходит, C20 тоже могут быть активны. Функциональные группы, которые делают гиббереллин активными: лактонное кольцо, гидроксил по третьему положению, карбоксил по шестому. Могут быть разные вариации. Альдегидная группа по 10 положению, например. Не обязательно все активны. У предшественников меньше активность. У гиббереллинов разные структуры могут быть активны, в разных растениях, в разных процессах (один - для цветения, другой - для растяжения стебля).

Синтез (характерно для растительных гормонов) может быть разнообразен, возможны вилки. Синтез гиббереллинов распределен по нескольким компартментам. Начинается в пластидах. Предшественник всех дитерпеноидов - геронилгеронилдифосфат. В конце 20-го века выяснилось, что изопреноиды в растениях синтезируются двумя путями. Считалось, что все стерины (обязательный компонент всех мембран) синтезируются через мевалоновую кислоту. Мевалонатный путь был хорошо изучен. Стерины - тритерпеноиды, тоже синтезируются из изопентилдифосфата. Считалось, что вилок

нет. Потом Ромер, известный микробиолог, проверил синтез изопентилдифосфата у микроорганизмов и оказалось, что радиоактивная метка распределяется не так, как ожидается. Выяснилось, что изопентилдифосфат, стандартный источник всех изопреноидов, синтезируется у многих микроорганизмов по другому пути через ксилозо-5-фосфат и через МЭП - метилэрритролфосфат. Потом оказалось, что все организмы делятся на две группы: те, которые синтезируют изопентилдифосфат через классический - мевалоновый путь - и вторые - через альтернативный, или МЭП-путь. Это оказалось важным стимулом для медицины. Ингибиторы второго пути - мощные антибиотики для микробов, которые синтезируют через МЭП-путь. Растения - уникальные организмы, у которых работают оба пути синтеза изопреноидов (видимо, доказательство симбиогенного происхождения растительной клетки). В цитозоле – меланолатный (стериоиды). У цианобактерий (Синехоцистис), которые считаются предшественниками хлоропластов, - альтернативный путь синтеза). В пластидах синтез тоже идет по МЭП-пути. Предшественник гиббереллинов синтезируется в пластидах по альтернативному пути. В пластидах образуются все дитерпеноиды, в том числе вторичные метаболиты. Энт-каурен, стандартный дитерпеноид, основа всех дитерпенодных гликозидов, образуется в пластидах, потом он выходит в эндоплазматический ретикулум или оболочки пластид, и там превращается в гиббереллин. Образуется пятичленное кольцо, дальше соединение выходит в цитозоль. В нем - два варианта образования гиббереллинов. Для большинства растений работает ранний гидроксильный по С13, есть второй, где гидроксилирование не происходит. После формирования лактонного кольца гиббереллины делаются активными. По крайней мере, два варианта синтеза. Варианты конъюгирования и катаболизма: для разных растений по-разному. У кукурузы активные гиббереллины: гидроксилированы по третьему положению, бывает двойная связь между С1-С2 или С2-С3. Конъюгация и деструкция: гидроксилирование не по третьему, а по второму положению - потеря активности, дальше возможно гликозилирование. Из этих состояний возможно возвращение. Окисление или превращение лактонного кольца дают полную инактивацию.

Место синтеза и транспорт. Место синтеза может быть различно, зависит от стадии развития растения. На проростках - стебель, колеоптиль. Стадия листьев - опыт: под промотор одного из этапов синтеза гиббереллинов поставили GUS-ген, выяснилось, что синтезируются в листьях вблизи от проводящих систем. При формировании цветов синтез гиббереллинов переходит в пыльники. На стадии эмбриоидов синтез гиббереллинов тоже меняется. На стадии зародыша синтез идет практически по всему зародышу. В начале, на стадии торпеды и сердечка - нет. В семенах тоже есть. У взрослого растения, как правило, синтез - в листьях. Если ауксин - гормон благополучия надземной части, цитокинин - гормон благополучия подземной части, корня, то гиббереллин (с натяжкой) - гормон благополучия листа. Гиббереллины участвуют в разных программах существования. Пример: в самой ранней программе развития, когда идет прорастание, гиббереллин индуцирует синтез гидролаз.

Семя - зародыш плюс запасенное питание (крахмал, другие полимерные углеводы). Гиббереллины активируют гидролиз полимерных углеводов. После намокания семян активируется синтез гиббереллинов, они синтезируются в эмбриоиде, через скотеллум попадают в алероновый слой, где находится крахмал, там через транскрипцию активируют синтез гидролаз. Крахмал гидролизуется до моно- и дисахаридов и попадает в прорастающее растение и становится для него источником энергии. Клетки памяти - функции гиббереллинов: на уровне клетки - растяжение клетки на G1/S-фазе. Рост междуузлий у злаков, рост стебля. На уровне интактного растения у двудомных часто вызывают смещение пола в сторону мужского. Одно время обсуждалось, почему тополи в Москве - женские. Обрезка тополя (делают формовку) - листвьев мало гиббереллинов мало - женские растения. Это обсуждалось серьезно. Возможно, так и есть. Гиббереллины предотвращают образование семян у винограда. Опрыскивали гиббереллином, получался кишмишный виноград. Для одной группы розеточных растений обработка гиббереллином вызывает цветение. Развитие апикальной меристемы. Предотвращение роста корней (антагонизм с ауксинами). Прерывание покоя клубней и семян. Все - крупные программы развития. Ауксины, цитокинины, гиббереллины - тройка "стимулирующих" гормонов, имеют большее значение на начальных этапах онтогенеза. Следующие два классических гормона - "тормозящие", имеют большее значение на более поздних фазах развития растений.

"Тормозящие" фитогормоны

Абсцизовая кислота - АБК.

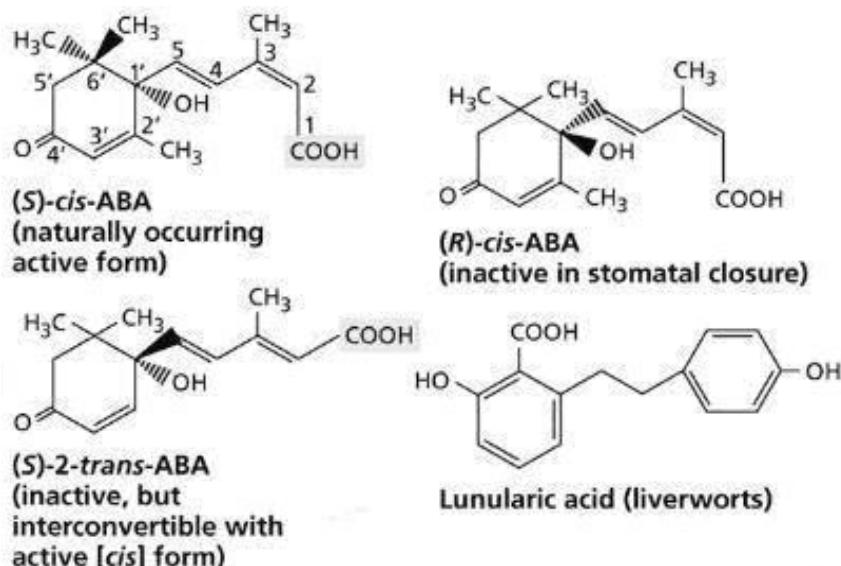


Рис. 5. Абсцизовая кислота

Особенность - считается, что сесквитерпеноид. Формально - да. Действительно, C15-соединение, три изопентенильных фрагмента. Есть особенности по строению, которые подходят для функционирования гормона: есть гидроксил и карбоксил, можно

предположить, что можно образовывать коньюгатов, есть двойные связи, подходит для окисления, то есть выхода на деструкцию. Формы – изомерия (S)-ABA, (R)-ABA (рис.5). В растениях, как правило, присутствуют S-формы, может быть цис-транс-изомерия по карбоксилу, много вариантов. Наиболее активен (S)-cis-ABA, он - один из основных. В растениях чаще присутствует S-форма. (S)-2-trans-ABA - менее активна, но может легко и даже спонтанно превращаться в S-форму. (R)-cis-ABA тоже активна, но очень специфична: для закрывания устьиц (основная работа АБК) не подходит. Для некоторых видов растений, в частности, печеночных мхов, функцию АБК выполняет стильтен - лунулариевая кислота. По структуре есть некоторое сходство (гидроксил и карбоксил), по синтезу – нет – фенольное соединение. АБК в них не искали, возможно, она там есть. Почему не сесквитерпеноид. Логично считать, что синтез идет через изопентилендифосфат, потом фарнезилендифосфат, потом ксантоксин и АБК. У растений синтезируется из тетратерпеноидов (каротиноидов). Существует предшественник, который выполняет другие функции, при необходимости один фермент делает предшественник. Из С40-соединения отщепляется фрагмент, образуется ксантоксин, модифицируется до абсцизовой кислоты. Синтез ритмичен, ночью на два порядка интенсивнее, чем днем. Классическая работа - от обработки АБК растения закрываются устьица. Синтез идет по двум компартментам. Синтез каротиноидов - по альтернативному пути, не через мелонат. Дитерпеноиды, тетратерпеноиды (фетольный хвост для хлорофилла синтезируется в хлоропластах по альтернативному пути) и каротиноиды синтезируются по альтернативному пути. Каротиноиды – первичный метаболит. Это - виолоксантиновый цикл в фотосинтезе. В нем образуются цис-каротиноиды (виолоксантин, зеаксантин) с помощью изомеризации, они – субстрат для цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы, а из них - ксантоксин. Это - предшественник гормона. Он выходит в цитозоль, там синтезируется АБК. Образование активных гормонов из предшественников - два, три, максимум четыре этапа. АБК синтезируется в цитозоле. Ключевой момент регуляции синтеза АБК происходит в пластидах. Вилка синтеза - тоже в пластидах. Метаболизм - стандартный. Есть коньюгаты. Их образование - гликозилирование по гидроксилу, либо сложный эфир по карбоксилу. Они обратимы. Окисление - вместо метила по второму атому углерода образуется гидроксил. Как правило, это невозвратно, хотя возможно вернуть назад. Еще - образование изомеров и восстановление до гидрокисла по четвертому атому углерода. Деградация - образуется фузионовая кислота (phaseic acid), затем она окисляется. Еще - можно предположить образование долгосрочных коньюгатов: окислился метил у предшественника фузионовой кислоты, к нему присоединился ацил. Клетки памяти для АБК: АБК работает на поздних стадиях онтогенеза и отвечает на стресс. Его работа - не только сам по себе работает (отслеживает эндогенное состояние организма), но и отслеживает внешние факторы - температуру, засуху, засоление. Сам по себе работает - вызывает покой семян, клеток, почек. Можно выстроить линейку: независимые гормоны (ауксины, цитокинины): не отвечают на внешнее воздействие. Есть те, которые отвечают, и те, которые координируют ответ организма на внешний фактор - фактически это система

трансдукции сигналов. Функция закрывания устьиц – самое важное. Это - один из вариантов ответа на абиотический стресс (засоление, засуха, низкая температура). Другой вариант - синтезируется большое количество стрессовых белков. Часто - антагонист "стимулирующих" гормонов – ИУК, ГК, ЦК. Замыкание устьиц влияет на транспорт ионов. Поздняя фаза развития растения: синтез запасных белков. Почему нельзя назвать "тормозящим" гормоном – запасные белки активируют синтез. Активирует вегетативное размножение. Формирование покоя (семян, клеток, почек). Если АБК нет, то можно наблюдать "живорождение", прорастание на материнском растении. Тормоз нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла – может быть осенний вариант. Прекращение активного метаболизма. Абсцизовая кислота – название. "Абсцизио" - опадение, американское название. Дормин - английское - "созревание", более правильное название, но закрепилось американское.

Этилен.

Единственный газообразный гормон растений (метилгасмонат тоже летит). Когда были газовые фонари, заметили, что быстрее плоды созревают там, где они горят. Потом оказалось, что в светильном газе был этилен. В 1901 году на это обратил внимание Нелюбов в Киеве выяснил, что, когда работают горелки в лаборатории, растения ведут себя по-другому и вроде-бы работает этилен. В 20-м году это переоткрыли. Синтез: классический цикл – метиониновый (Рис.6). S-аденозин-метионин – источник метильной группы для большинства процессов метилирования. Если сработает АСС-синтаза, на выходе из метионинового цикла получится аминоциклогексанкарбоновая кислота (АСС) – побочный продукт в цикле, практически готовый этилен. Дальше вилка: АСС-оксидаза формирует этилен, либо формируется малонил-АСС. Его можно рассматривать как коньюгат. АСС-синтаз – минимум, десять, мультигенное семейство. Гормон - один, предшественник - тоже, механизм образования один, вариантов образования много, потому что разные ферменты: по-разному регулируются, в разных органах, в разное время. Работает множественность - на уровне фермента. Окисление необратимо: этилен - окись этилена - этиленгликоль. Действие этилена - тройной ответ. Проростки, обработанные этиленом, - получаются короткие, толстые, с завитушкой. Регулирование: синтез этилена обусловлен стабильностью АСС-синтаз и их набором. Устойчивость АСС-синтазы определяется скоростью ее развала. Убиквитины - маленькие белки, 76 аминокислот, "метки смерти". Если какой-то белок должен быть разрушен, на него садятся убиквитины, цепочка, минимум три-четыре штуки, садится на белок, все отправляется в протеасому, которая разваливает его до аминокислот. Есть специальная убиквитинлигаза, которая сажает убиквитины на АСС-синтазу. Скорость развала АСС-синтаз определяется убиквитинированием. Может быть фосфорилирование по-разному. Циклин-зависимые киназы, либо МАР-киназы. Фосфорилируют по-разному разные АСС-синтазы. Одна фосфорилирует все, некоторые - только некоторые. Могут быть мутации, которые делают нечувствительными к убиквитинированию. Много вариантов для изменения стабильности этого фермента. Эффекты этилена: тройной

ответ, старение цветков, созревание плодов. Тиосульфат серебра, ингибитор действия этилена, помогает сохранять срезанные цветы свежими. Эпинастии у томатов (опускание листьев). Нельзя говорить, что “тормозящий гормон”. Стимулирует на порядок более мощное образование корневых волосков, чем у нормального растения. Клеточки памяти. Антагонист активирующих гормонов (ИУК). Чаще всего вызывает

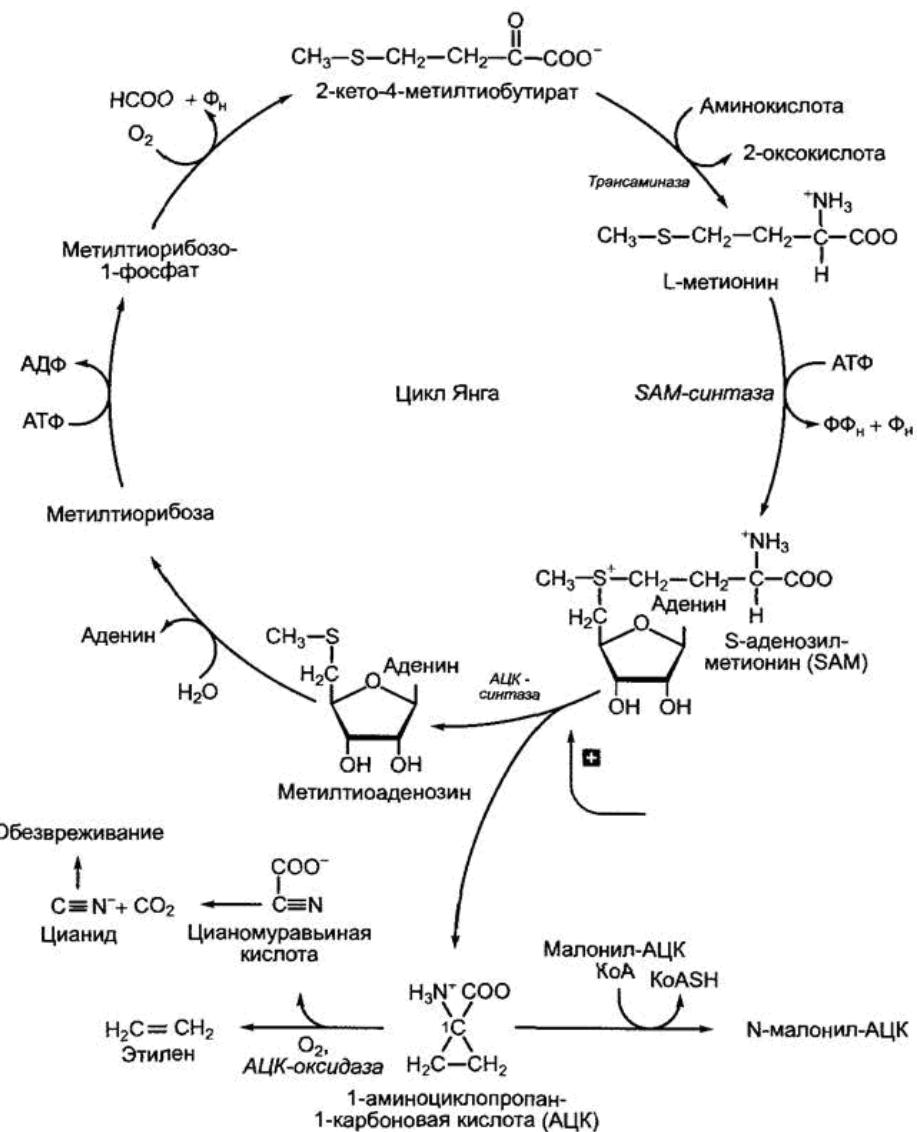


Рисунок 6. Синтез этилена

опадение листьев. Отделительный слой без ИУК образуется очень быстро. Тормоз клеточных делений. Ингибитор транспорта ИУК (один из механизмов). АБК его стимулирует. Созревание плодов. Яблоки и бананы выделяют много этилена. Формирование вторичной клеточной стенки. Прорастание семян - если проросток встречает препятствие, то это стимулирует синтез этилена. Тройственный ответ: загиб нужен для того, чтобы спрятать апекс. Утолщение - чтобы раздвинуть почвенные частички. Защита. Антистрессовый. Чаще всего против патогенов. (АБК - абиотический

стресс). Вызывает реакцию сверхчувствительности - один из мощнейших ответов на патогенез. Активацию хитиназ. Фитоликсины - вторичные метаболиты – очень мощные токсины, синтезируются в ответ на патогенез и белки, связанные с патогенезом: pathogen related proteins. Мощный ответ в основном на биотический стресс. На внешние факторы как АБК.

Неклассические фитогормоны:

Брассиностероиды.

Было удивительно, что у растений нет стероидов. Решили искать. Выбрали мужскую сферу у растений. Собрали 40 кг пыльцы рапса (*Brássica nápus*) пчелами. Из нее выделили 5 мг брассиностероидов. Оказалось, что они отвечают всем требованиям фитогормонов. Достаточно широкое действие на формирование программ развития: карликовость, влияют на образование ксилемы, если их нет, то нарушается мужская fertильность. Удлинение клеток - активация ХЕТ (ксилоглюканэндотрансферазы). Деление клеток - транскрипция циклина D3. Структура. Тriterпеноиды синтезируются в цитозоле по классическому пути. Предшественник - циклопенранттригидрофенантрен, C30-соединение, три шестичленных цикла, один пятичленный и хвост (очень важный для мембранны). Оказалось, что второй цикл брассиностероидов разорван. Получилось лактонное кольцо. Оказалось, что не очень важно для активности. Существуют брассиностероиды без лактонного кольца. Выяснилось, что очень важно карбонил по 6 положению. Два гидроксила по второму, третьему положению и гидроксилирование в боковой цепи (полигидроксилирование в нужных местах. По 22, 23 положению, по 24 тоже полезен). Тут брассиностероиды близки к гиббереллинам, потому что их вариантов много. Важно, какое кольцо - A, какое кольцо - B и какая алифатическая часть. Активность разная. Синтез - тоже изопреноид. Тriterпеноид, поэтому хлоропласти не участвуют. Мевалонатный путь синтеза, идет и у животных в цитозоле. Есть вилки. Раннее окисление по C6 и позднее по C6 - сетка синтеза. Метаболизм - стандартно. Может быть эпимеризация. Важны изомеры (эпимеры), по гидроксилам, активность сильно меняется. Может быть гидроксилирование по 26 атому, потом по нему гликозилирование, по 22 атому, ацилирование. Вариантов много. Окисление - нормальный вариант. Стериоксидаза - известная вещь. В разных местах - по-разному, но принцип один: гидроксилирование, потом окисление, либо гидроксилирование с гликозилированием и эпимеризация. Действие брассинолидов: усиливают растяжение проростков, но медленнее ауксинов (начало через 30 минут, длительность - 1,5 - 2 часа, для ауксинов - 10 мин. и 30-45 мин. Соответственно. Синергизм действия с ауксинами. Ауксины начинают, брассинолиды продолжают. Другой механизм. Если ауксины активируют H-ATFазу (кислый рост), то на молекулярной уровне эффект брассинолидов обусловлен активацией генов ксилоглюкан-эндотрансгликозилаз (КсЭТ). Они расщепляют сшивочные глюканы и перекидывают. Это разрыхляет клеточную стенку за счет ослабления связей. Если ауксины запускают процесс растяжения, то

брассиностероиды важны для его длительного поддержания. Влияние на мужскую стерильность. Частичная или полная мужская стерильность при недостатке брассиностероидов. У многих растений, мутантных по генам биосинтеза брассиностероидов, тычиночные нити не достигают нужной длины, достаточной для опыления. Рост пыльцевой трубки достаточно замедлен. Брассиностероиды взаимодействуют не только с ауксинами, но и гиббереллинами, усиливая растяжение клеток. Синергизм и с ауксинами, и с гиббереллинами. В Японии брассиностероиды считаются главными гормонами, которые регулируют остальные. Не исключают, что брассиностероиды - не только гормоны, но и фоторецепторы. Обсуждают участие брассиностероидов при передаче световых сигналов и "переговоры" путей фоторецепции и брассиностероидов.

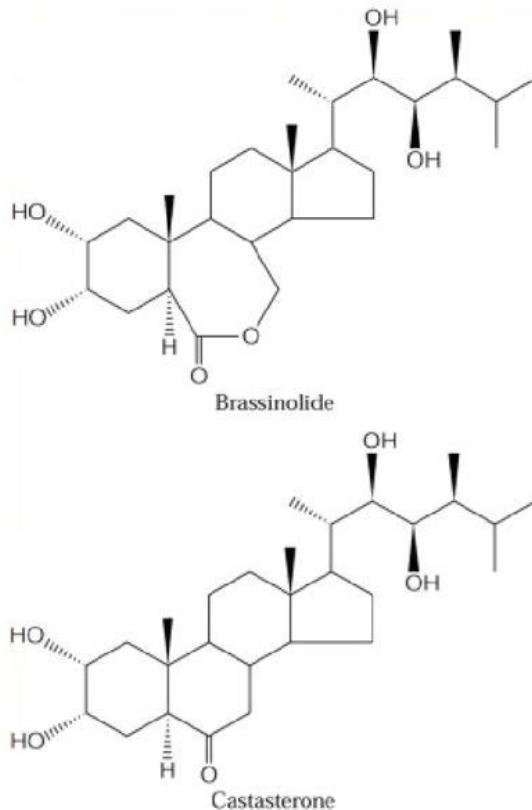


Рис. 7. Брассиностероиды.

Брассиностероиды регулируют процессы клеточной дифференцировки на более поздней стадии развития. У мутантов *bri 1* нарушено формирование столбчатого мезофилла. Уменьшено количество проводящих элементов ксилемы. Наиболее четко показано, что, когда клетка растянута, должна пройти лигнификация - окончательное образование вторичной клеточной стенки. Это делает лигнин. Брассиностероиды регулируют вторичный запуск синтеза фенилаланинамила (ФАЛ) и

гидроксилазы коричной кислоты (ГКК). Когда образуются три оксикоричных спирта, они регулируются бруссиностероидами, с дальнейшей сильной лигнификацией и программированной гибелью клеток.

Действие на корневую систему бруссиностероидов и ауксинов противоположно: если ауксины стимулируют образование боковых корней, то бруссиностероиды ингибируют их образование. Взаимодействие гормонов зависит от уровня организации и времени работы. На уровне клетки - синергизм, на уровне корневой системы - антагонизм. В больших дозах бруссиностероиды сдерживают рост и повышают устойчивость к неблагоприятным внешним факторам (перегреву, засухе, заморозкам, инфекции). Антистрессовые гормоны (и биотические, и абиотические факторы). Этилен – биотические факторы АБК – абиотические.

Клеточки памяти: Растижение и формирование лигнина в клеточной стенке. ХЕТ. Рост, растяжение. Финал развития клетки после роста, растяжения. Формирование ксилемы и дифференцировка формирования лигнина. Фертильность. Синергизм с фитогормонами. При развитии боковых корней – антагонизм с ИУК. Большое влияние на донорно-акцепторные отношения – регуляция интенсивности фотосинтеза потребностью в плодах. Повышают урожай (препарат называется бруссин, или эпин). Бруссинистероиды стоит причислить к фитогормонам.

Жасмонаты.

По-русски – жасминовая кислота. По-английски – жасмоновая. Можно отнести к фитогормонам, хотя может рассматриваться как четкая сигнальная система для защиты. Много гормональных свойств. Маленькая молекула, похожа на простагландины. Производное жирных кислот. Характерно пятичленное кольцо и два хвоста. На коротком – карбоксильная группа. Варианты: изомерия хвостов. "+", "-", жасмонаты и эпижасмонаты. Отсутствие двойной связи – дигидрожасмонаты. метилированный карбоксил – метилжасмонаты. Метилжасмонаты летучи, долго обсуждали, действуют ли на расстоянии. Сейчас считается, что летучесть – не главный вариант работы, может транспортироваться по растению. Транспорт по ксилеме, флоэме и от клетки к клетке. Вариантов строения много: эпимеризация, метилирование, уход двойной связи – активность – разная. Метаболизируется: по длинному хвосту садится гидроксил, на него гликозилирование. По короткому – образуется сложный эфир с сахарами – самый нормальный коньюгат. Есть гидроксилирование обратимое и нет. Синтез (Рис.8): сначала в пластидах. Липоксигеназы – есть несколько вариантов. Те, которые отвечают на стресс и те, которые работают эндогенно в процессе роста и развития. Сначала работает липоксигеназа, (то, что получается, может развалиться на которая разваливается на гексональ и декановую кислоту). Какой вводится перекисный участок, затем получается напряженное кольцо, потом – промежуточный продукт может пойти на защиту, в итоге сформируется пятичленное кольцо, укоротится хвост, и образуется

жасмонат. Как и для АБК и гиббереллинов, существуют предсуществующие вещества. ОДПА – 12-оксо-фитодиеновая кислота находится в хлоропластах не в свободном виде, а на 70% в мембранах, в составе липидов (одна насыщенная, другая - ненасыщенная

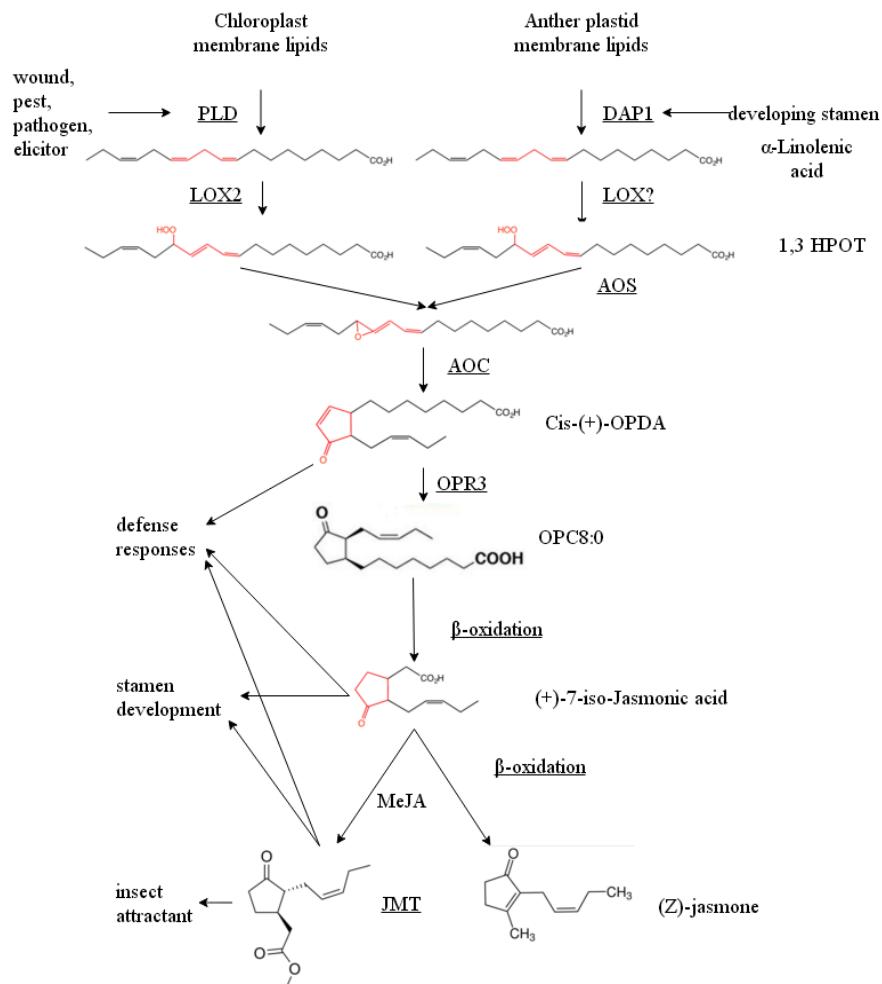


Рисунок 8. Синтез жасмонатов

кислоты плюс галактозильное производное - ОДПА) - предшественник жасмонатов. Синтез: в пластидах происходит работа липоксигеназ, окисление, формирование цис-ODPA, которая находится в мембране. Если происходит стресс, то ODPA выходит в пероксисомы (органеллы, которые скорее всего возникли как ответ на появление в атмосфере кислорода, с появлением митохондрий их функции - фотодыхание, фиксация азота, глиоксилатный цикл). В них из цис-ODPA образуется активная форма жасмоната (изожасмонат). Он может выходить в цитозоль, конъюгировать с изолейцином, тоже активная форма. Клеточки памяти – функции жасмонатов. Защита от патогенов, абиотических, биотических факторов, перекликается с брацциностероидами, образование patogen-related proteins. В биотехнологии жасмонаты используют для синтеза вторичных метаболитов. Взаимодействие с гормонами: АБК стимулирует, этилен модулирует. Физиологический ответ. Образование довольно большого набора

белков, (JIPs-белков), жасмонат-индуцируемых, которые участвуют в патогенезе и нормальных реакциях развития. Созревание плодов - аналогия с этиленом. Белки клеточной стенки: брацистероиды вызывали лигнофикацию, здесь - не лигнин, а белки клеточной стенки, экспансины и интерсилы. В культурах клеток используют для получения вторичных метаболитов. Обработка жасмонатами часто вызывает процессы старения. Известны рецепторы жасмонатов. Тоже можно отнести к гормонам.

Стриголактоны - изопреноиды, синтезируются точно так же, как АБК. На взгляд - сесквитерпеноид. Синтезируется из каротиноидов (тетратерпеноидов), как и АБК, вилка синтеза - между стриголактонами и АБК. Стриголактоны были известны как сигналы для формирования симбиоза (арбускулярной микоризы). Если флавоноиды - сигналы для ризобий, то стриголактоны - для микоризы. Более того, стриголактоны активируют прорастание семян Стриги - паразитического растения. Из рассматривали, как сигналинг, потом выяснилось, что они регулируют архитектуру корня (длина корня, боковые корни, корневые волоски), тормозят развитие побегов, удлинения гипокотиля, вторичного роста, прорастания семян. Структура разнообразна, вариантов много. Синтез: в пластидах сначала идет изменение конформации каротиноида, потом образуется карлактон - предшественник стриголактонов. Карлактон выходит из пластид в цитозоль, где формируются активные стриголактоны. Действие: влияние на мощные программы развития. Транспорт ауксина (он - антагонист ауксина), влияние на корнеобразование, формирование габитуса растений. Была получена серия мутантов арабидопсиса по синтезу стриголактонов, габитус различался. Влияние стриголактонов на структуру корня: они тормозят ауксин, взаимодействуют с другими гормонами (этиленом, ауксинами, цитокининами). Рецептор не найден. Они - кандидат в фитогормоны. Влияют на архитектуру растения и мощный регулятор. Но не найдены рецептор, система трансдукции и эндогенное действие.

Салициловая кислота.

Включает работу альтернативной оксидазы, мощно работает при патогенезе, мощный антагонист этилена, блокирует превращение АСС в этилен, регулирует термогенез у ароидных лилий, участвует (запускает?) защиту от вирусов. У ВТМ-устойчивых растений табака синтезируется по альтернативному пути, обычные не работают. Рецептора пока нет. Тоже – кандидат в фитогормоны.

Лекция 3. Фоторецепция

Рецепторы светового восприятия

В прошлый раз мы закончили рассматривать системы фитогормонов. Фитогормоны почти все часто работают через снятие ингибиции. В норме те гены, которые должны активироваться за счет гормонального сигнала, закрыты. На них, как правило, находится трансфактор, который запускает их считывание, но он заингибиран разными ингибиторами, специфическими для каждого из гормонов. Система рецепции, трансдукция сигналов приводит к тому, что ингибитор убиквитинилируется. Часто система убиквитинЕ3лигазы, которая ответственна за убиквитинилированием этих белков, является рецептором, в других случаях это связано с системой трансдукции сигнала. То есть, особенность гормональных растительных сигнальных систем - в том, что они часто работают по принципу снятия ингибиции через развал ингибитора в протеасоме. Многие гормоны являются участниками ответа растений на различные внешние факторы. АБК, этилен - часто компоненты сигналинга ответа на стресс. Сегодня продолжим разговор о влиянии внешних факторов на жизнь растений - прежде всего это свет. Условия существования растений очень сильно зависят от фактора свет. Восприятие того, какой свет, качество света, фотопериодизм для растения принципиально важно. Система рецепции световых условий - одна из важнейших систем, жизненно важных для растений. Растения на порядок более точно, четко и качественно оценивают световые условия существования, чем животные, насекомые, микроорганизмы. Система сложна. Известно как минимум три группы рецепторов, которые отвечают за световое восприятие. Рецепторы красного цвета - фитохромы. Криптохромы и фототропины - рецепторы синего цвета и ближнего ультрафиолета. Эти системы очень тесно взаимодействуют на разных уровнях, прежде всего на уровне трансдукции сигнала. Это - не отдельная работа отдельных фоторецепторов, а сеть восприятия и сигналинга световых условий, которые обеспечиваются тремя группами рецепторов. Некоторые из них (фитохромы и фототропины) - серинтреонинкиназы. Криптохромы работают по-другому.

Фитохромы.

Первые данные о том, что растения хорошо отслеживают красный свет, появились в начале прошлого века, поворотная работа была опубликована в 52 году в PNAS. Бортвик и Хендрикс работали с прорастанием семян, оказалось, что, если посветить на семена (обязательно мелкие) 660 нм, красным светом, начинается прорастание. Если потом посветить дальним красным светом, 730 нм, все останавливается. Две длины волн имеют обратимый фотоэффект. Они это повторяли чуть ли не 100 раз. Были другие работы - позеленение проростков. Много процессов, цветение имеет такую реакцию. Рецептор назвали фитохромом, в неактивной и активной формах спектры поглощения меняются (Рис.9). Pr - фитохром red, Pfr - фитохром farred. Форма, в которую фитохром превращается, когда посветили красным светом, является активной. Фитохром

чувствует: длину волны, интенсивность, фотопериод и т.д. Ответы разнообразны: прорастание семян, деэтиолляция, цветение, фотопериодизм. Много вещей определяется обратимой реакцией фитохромов. Когда посмотрели градацию по эволюционному древу, оказалось, что эта реакция характерна для многих групп

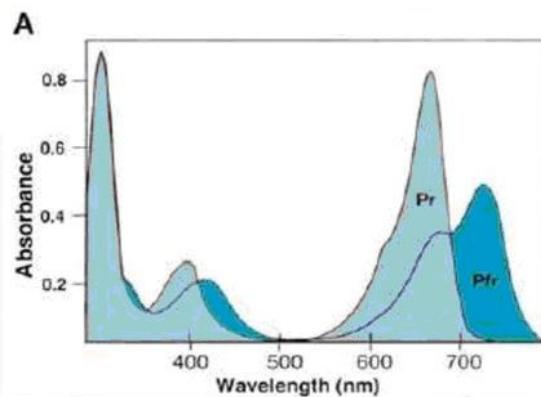
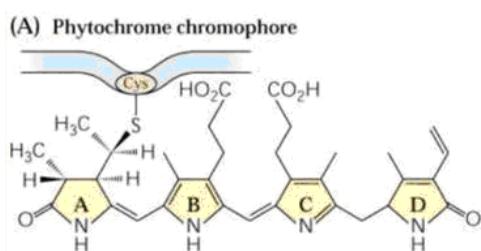


Рис. 9. Спектры поглощения фитохрома

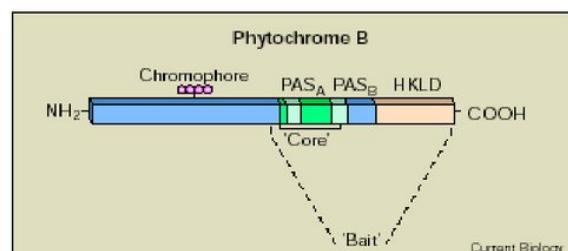
растений. Одна группа - покрытосеменные. У салата-латука с работой фитохромов связаны: стимуляция прорастания, стимуляция деэтиолляции, стимуляция формирования листовых примордииев, изгибание междуузлиев. У голосеменных - стимуляция накопления хлорофилла. Для папоротников, мхов, многих водорослей также характерна работа фитохромов. Мы можем различить интенсивность света на порядок-два. Для эффектов фитохромов существует колоссальная разница по различию интенсивности. Есть три группы реакций на интенсивность. Очень низкая - доли наномолей, пикомоли квантов на квадратный метр - реакция не обращаема. Это - реакции прорастания, этиолляция, образование фотосинтетического аппарата. Улавливание проблеска света запускает процесс формирования фотосинтетического аппарата. Реакции низкой интенсивности: 1-1000 мкм². Как правило, обратима. Реакция высокой интенсивности - до 100 мкм² - определение повреждающих, очень активных воздействий - стресс. Разница в интенсивности - на 10 порядков. Эффекты фитохромов также различается по длительности от минут до недель и возможности фотоообращения. Один фоторецептор это обеспечить не может. Оказалось, что фитохромов, как минимум, два. Работают в паре (синергично), или противоположно. В природе важно соотношение. В зависимости от условий преобладает либо красный (дневное нормальное освещение), либо дальний красный свет (сумерки под пологом леса). Соотношение света принципиально важно для работы фитохромов. Количество фитохромов - от пяти до семи в каждом растении. Главных - два: фитохром А, фитохром В. Основная часть фитохрома А необращаема. Он ответственен за реакции очень низкой интенсивности. Для фитохрома В характерна строго обратимая реакция. Фитохром А может превращаться в активную форму на дальнем красном свету. У них разный спектр поглощения.

Для фотосинтеза важны антенные комплексы. Основной реакционный центр, фотосистема 1, фотосистема 2 консервативны, антенные комплексы - очень разные,

используются для систематики. Для цианобактерий и некоторых водорослей характерны фикобилисомы. В них - открытый тетрапирол (для хлорофилла - закрытый), он образует мощные антенные комплексы (фикацианин, фикоэритрин). У высших растений открытые тетрапиролы в антенных не работает. Там - хлорофилл, A, B- каротиноиды. Но растения никогда ничего не выбрасывают. У них открытый тетрапирол - идеальный вариант для фотопротектора. Не энергетических реакций, а отслеживания и анализа света. Оба фитохрома A и B имеют один хромофор - открытый тетрапирол. Белок фитохромов в стандартном случае - белок порядка 120 кДа, димер, мономеры - по 120 кДа, N-концевой домен - фотосенсорный, там находится хромофор, C-концевой - регуляторный домен (Рис.6).



Тетрапирол



Структура фитохрома B

Рис. 6.

Для белков фитохромов характерны консервативные участки: регуляторный центральный участок (Quail-бокс, по фамилии корифея в изучении фитохромов), два участка димеризации D1 и D2, два пас-домена (характерны для многих регуляторных белков, не только для растений, очень важны) на C-концевом участке - гистидинкиназоподобный домен. Вначале считали, что фитохромы - гистидинкиназы. Потом выяснилось, что гистидинкиназной активности нет. Фитохромы состоят из хромофора (фитохромобилина) и белковой части. Все отличаются белком. В зависимости от вида их 2-7. Как работает: есть белок, к нему прицеплен хромофор, открытый тетрапирол, кольцо A зажато на белке. Последнее кольцо - D: может быть в цис- и транс-изомерии. В неактивной форме red это - цис-изомер (660 нм). Когда поглощается свет, он становится трансизомером. Изомеризация приводит к изменению спектра поглощения, максимум поглощения становится far red, 730 нм. Изменение изомерии меняет конформацию белка так, что он становится активным. Существует как минимум два фитохрома. Две формы фитохрома A (работа университетской группы Синецов) - A' и A''. A' - его доля - до 80%, ответственен за реакцию низкой интенсивности. Это - фитохром высокой чувствительности. После того, как переходит в активную форму, срабатывает, передает сигнал и распадается. Есть PEST-мотив деградации. Остается 15% A'', существует при интенсивном свете, который потом будет работать с фитохромом B. Функции фитохрома A (отличаются только белком):

прорастание на дальнем красном свету (относительно активно поглощает при 730 нм), деэтиолляция - A', при очень низкой интенсивности света, цветение при низкой интенсивности - A''. Не имеет постоянного синтеза. Синтезируется еще в прорастающих семенах. Фитохром B: синтезируется постоянно, с определенной скоростью, постоянно распадается. Время полураспада - 100 часов, 4-5 суток. В низких количествах и неактивной форме включает синтез фитохрома A. Реагирует на свет средней и высокой интенсивности. Функции: прорастание в темноте - для больших семян, (для маленьких семян характерно светозависимое прорастание, у них мало питательных веществ), деэтиолляция на красном свете (и дальнем красном свете), цветение при высоких интенсивностях света, фотопериодизм. Что представляют фитохромы функционально, если они - не гистидинкиназы? Оказалось, они являются серин-треониновыми киназами. Есть два остатка серина 7 и 598, которые при переходе в активную форму фосфорилируются. Есть еще остаток, который фосфорилируется, но эти два - маркерные. Когда фосфорилирован, похоже, фитохром деградирует, это - сигнал деградации только для фитохрома A, также может приводить к ядерной локализации, в норме в неактивной форме они - в цитозоле, при активной форме перемещаются в ядро, причем по-разному. Потом выяснилось, что для функциональной активности серин-треониновое фосфорилирование не так важно, наоборот, может быть отрицательная реакция. Все домены, о которых уже говорилось раньше - Quaill-бокс, гистидинканазо-подобный домен, пас-домен - присутствуют. Фитохромов - несколько, для двудольных - как минимум пять. Фитохром A, фитохром B - фотолабильны, фитохром D стабилен, фитохромы C, E и D - дополнительные и часто похожи либо на A, либо на B. Для однодольных характерны три фитохрома: A, B и C. Оказывается, что, когда фитохром меняет конформацию в норме, он имеет такую конформацию, что один из серинов, который фосфорилируется, закрыт. Считалось, что у фитохромов есть сигналы ядерной локализации (NLS). Оказалось, у фитохрома A сигнала ядерной локализации нет, у фитохрома B - вроде есть, но не совсем нормальный. NLS-like-домен, его недостаточно, чтобы транслоцировать фитохром B в ядро. Когда изменяется конформация, у фитохрома B открывается сигнал ядерно-подобной локализации, дальше они фосфорилируются, в фосфорилированном виде действительно транслоцируются в ядро. Если убрать фосфаты в открытом состоянии, когда он будет активирован, он тоже будет работать. Фосфаты сильно сокращают жизнь фитохромов. Фосфорилирование с одной стороны - система активирования, с другой - метка его смерти. Если D-фосфорилировать, работает специальная фосфатаза, то он будет жить долго. Что регулируют? Это работа Квэлла, одна из первых. Он проанализировал почти 8000 генов на микрочипах. Оказалось, что фитохром активирует почти 10% всех генов. На самом деле, около 15. Есть быстрый ответ и медленный ответ - через час и через сутки. Транскрипционные факторы активирует очень сильно. Фотосинтез – индуцируется 7 (быстрый ответ, через час) и 110 генов (медленный ответ, через 24 часа), клеточный метаболизм, сигналинг, транспортеры. Почему гистидинкиназолайк домен, но неработающий? Оказалось, что, видимо, фитохром пришел от цианобактерий. У

прокариот, цианобактерий, существует бактериальный фитохром. Он - нормальная гистидинкиназа, работает для сигналинга этилена или цитокинина, есть гистидины, фосфорилируется, нормальная двухкомпонентная система, которая активируется светом. У нормального фитохрома высших растений этот домен остался, перестал быть гистидинкиназой. Появились PAS-домены, чрезвычайно важные для трансдукции эукариотического сигнала, N-концевой участок, в котором появился 298-ой серин рядом с PAS-доменом. Эукариотический фитохром превратился в сеин-треониновую киназу, фосфорилирование по 298 серину определяет многие эффекты фитохрома и сокращает заодно его жизнь. Гистидинкиназа фитохрома бактерий - нормальная гистидинкиназная система за исключением того, что фосфорилирование вызывает свет. Изменение фикобилинов приводит к изменению конформации и т.д. У эукариот хромофор синтезируется в пластидах, синтезирует белок апопротеин в цитозоле, есть NLS-сигналинг только для фитохрома B (ненастоящий). Все неактивное, когда происходит активация светом, для фитохрома B изменяется конформация, открывается NLS-like домен, основная масса идет в ядро, идет долгий глобальный сигналинг, вызывающий активацию 10-15% генов. Какая-то часть фитохрома остается в цитозоле и обеспечивает быструю реакцию, которую связывают с кальциевым сигналингом. Это - общая схема работы фитохромов. Более детально: что заставляет уходить в ядро и как сопоставить сигналинг прокариотический и эукариотический? Бактериальный сигналинг – типичная гистидинкиназа. В норме - два мономера, когда попадает свет, они димеризуются, меняется конформация, фитохром становятся активной киназой и т.д. Из мономеров не обязательно оба переходят в активное состояние, может быть гетеродимер, это позволяет тонкую регуляцию. Затем – есть ресиверный домен, который делает активацию нужных генов. В эукариотах: фитохромы всегда в димере. В цитозоле к ним присоединен белок. Его долго обозначали как x, заякоривающий, есть факты что это – специфическая протеинкиназа PKS1, связан физически с димером и не дает фитохрому уходить в ядро. Когда фитохром переходит в активную форму, PKS1 становится киназой, уходит. Фосфорилируется одновременно 7, 298 серины и PKS1, он уходит от фитохрома. Фитохром активен и идет в ядро. Оставшаяся PKS1 может отвечать за цитозольные реакции быстрого ответа. Не весь фитохром уходит в ядро. PKS1 является ключевым моментом для разрешения транспорта фитохрома в ядро, и чтобы остался цитозольный сигналинг, быстрый ответ. Сигналинг фитохромов: два типа ответов – быстрый (секунды) и глобальный (минуты, часы, недели) – его делает фитохром, ушедший в ядро. Глобальный, как правило связан с регуляцией экспрессии генов, работает фитохром в ядре. быстрый – с потоками ионов через мембранны, плазмалемму, чаще всего это – кальциевый сигналинг. Будет работать PKS1 (фитохром-киназный субстрат 1). Он будет связываться с реакцией низкой интенсивности, чаще всего работает фитохром A, NDK2 – киназа, нуклеозид-дифосфат-киназа, активирует превращение GDF в GTF, с которым связаны G-белки, которые скорее всего будут участвовать в работе быстрых ответов на фитохромах. Это – киназа, в цитохоле отвечает за быструю реакцию. Есть фосфатаза PAPP5, которая будет дефосфорилировать серины 7 и 298, делая фитохром A, в

основном, стабильным. – тонкая настройка в цитозоле. Транспорт в ядро: у фитохрома А нет сигнала ядерной локализации. Транспорт осуществляются два белка – FHY1 и FHL, их работа обеспечивает ядерный сигналинг фитохрома. NLS-LIKE домен фитохрома В недостаточно просто открыть, везде есть тонкие настройки. В ядре есть набор 15 штук PIF-факторов, который могут взаимодействовать с фитохромами, могут фосфорилироваться, фосфорилирование часто ведет к убиквитинированию. PIFы сами могут быть трансфакторами первого или второго порядка. Существует набор трансфакторов, которые будут активировать гены фитохромов, но существует целая система – белки - COP (постоянный морфогенезис), DET - деэтиоляция, FUSCA (накопление антоцианов). Это - компоненты убиквитинирующего комплекса. COP1 кодирует E3-лигазу убиквитинирующего комплекса (рис.8 - схема белка PIF3-фактора, там отмечены участок петля-поворот-петля и PAS-домен, который часто

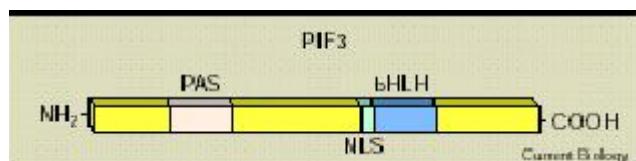


Рис. 8. Схема белка PIF3-фактора.

связан с димеризацией). Для работы фитохромов чрезвычайно важен механизм их

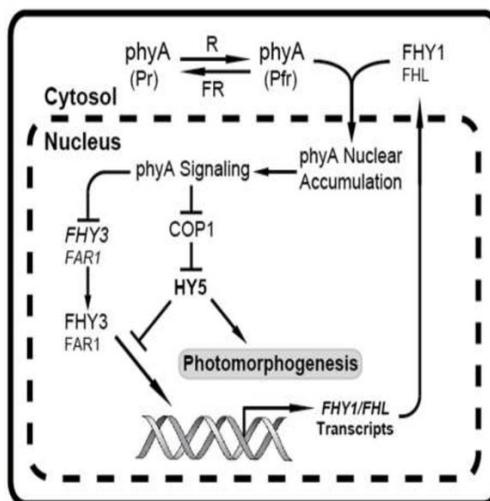
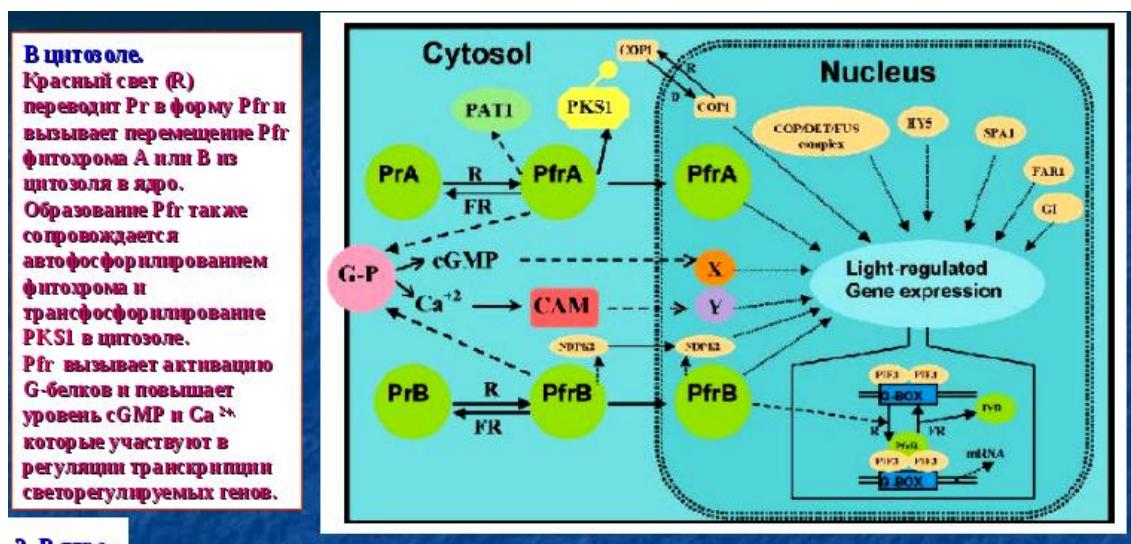


Рис. 9. Сигналинг фитохрома А

перемещения в ядро. Фитохром А (Рис. 9) не имеет сигнала ядерной локализации. Существуют белки FHY1 (белок регулирования дальним красным светом удлинения гипокотиля) и FHL (FHY-like). Они имеют участки связывания с фитохромом,



2. В ядре.

Фитохромы A или B в ядре могут регулировать активность генов непосредственно или взаимодействуя с ядерными белками типа SPA1, FAR1, GI и PIF3. Регулирование также может происходить за счет уровня COP1, регулирующих протеолиз трансфакторов типа HY5. В темноте COP1 с помощью COP/DET/FUS комплекса вызывает протеолиз HY5. Свет инактивирует COP1 белок и вызывает его перемещение из ядра в цитозоль, разрушая COP/DET/FUS протеасомный комплекс.

Фитохром B в ядре взаимодействует с трансфактором PIF3, связывающимся с G-боксом в промоторах светорегулируемых генов. PfrB-PIF3 комплекс активизирует/подавляет транскрипцию этих генов.

Дальний красный свет возвращает фитохром B в форму PrB, вызывая его отделение от PIF3 комплекса, что изменяет транскрипцию генов.

Рис. 10. схема возможных путей трансдукции сигнала от фитохромов

димеризуются по PAS-доменам, и у них есть NLS-сигнал. Связываясь с фитохромом A, именно они перемещают его в ядро. Когда фитохром перешел в ядро, включается его сигналинг, который будет связан с разными факторами (COP1 и HY5). Существует как минимум две петли систем ответа и передачи сигнала для запуска нужных генов, самое важное: убиквитин-лигазный комплекс выключит трансфактор HY5, который выключит систему синтеза белков FHI1 и FHI-like. Транспорт фитохрома останавливает его транслокацию в ядро. Трансфактор HY5 с одной стороны, выключит транспорт фитохрома, с другой - будет запускать нужные гены. Сигналинг фитохрома B: у него есть NLS-подобный сигнал, он попадает в ядро и связывается с PIF-трансфакторами, которые без него не работают. Фактически - активатор трансфактора PIF3 который запускает трансфакторы с MYB-участками, которые запускают нужные гены. Как работает убиквитинирующая система, чаще всего с фитохромом A. В норме COP1 – убиквитинЕ3лигаза, работает в паре с Spa1, в темноте они убиквитинируют факторы транскрипции HY5 и еще несколько и отправляют их в протеасому. На свету COP1 будет медленно уходить из ядра, механизм, возможно, связан с активацией фитохромом, транскрипция пойдет, уходя, COP1 убиквитинирует фитохром A и он тоже развалится. Упрощенная схема работы фитохромов: есть цитохром A, цитохром B. Центральная роль – у комплекса COP1/ Spa1, который убиквитинирует трансфакторы, они разваливаются, не работает. Появление фитохрома выключает COP1/ Spa1, все начинает работать.

Фитохром В напрямую связывается с PIFами, они активируют трансфакторы. На рисунке – схема возможных путей трансдукции сигнала т фитохромов. Вот непростая система работы дальнего красного света.

Рецепторы синего света

Исходно их открыл Дарвин. Он выяснил, что фототропизм (изгиб, который определяет ауксин) возникает в ответ на свет. Поставил фильтры, отсекающие синий свет, оказалось, что фототропизма нет. Оказалось, что реакции синего света отвечают за очень многое: фототропизм, движение хлоропластов, циркадные ритмы, открывание-закрывание листьев, "сонные" движения листьев при переходе день-ночь. Деэтиоляция у проростков, торможение роста побега растяжением, раскрытие семядолей, формирование листьев, синтез хлорофилла, каротиноидов, светособирающих комплексов, flavonoidов, антоцианов. Априори фоторецептор синего света был назван криптохромом. Скорее всего, его назвали так, потому что характерен для криптогамов (тайнобрачных). Фитохром характерен для широкого спектра организмов от водорослей до высших растений. Реакция синего света и рецепторы также характерны для широкого спектра организмов на эволюционной лестнице - похоже, что более важна для водорослей и организмов, стоящих на ее низших ступеньках. Видимо, эволюция шла так, что для высших растений становились более важны фитохромы, то есть, дальний красный свет, а роль синего и ультрафиолетового света потихоньку уходила. Возможно, связано с тем, что многие из эволюционно простых организмов живут в толще воды. От названия тайнобрачных криптогамов, пошло хромофор. Долго шла дискуссия, 20 лет, даже о том, что такое криптохром и хромофор. Спектр поглощения синего и ультрафиолетового света оказался очень похож для двух групп пигментов - каротиноидов и flavinов (ФАД), еще вплелись птерины (старые молекулы, у которых два кольца). Мутанты по ФАДу получить нельзя. По каротиноидам можно, оказалось, что не каротиноиды. Получили мутант, у которого был сдвинут спектр поглощения ФАДа. Оказалось, что спектр работы фоторецептора тоже сдвинулся. Сделали вывод, что фоторецептор - ФАД. В 91 году вышел обзор, который назывался Криптохром (криптотайна) - 50 лет безуспешных поисков. Через 2 года вышла статья, в которой Кешмур опубликовал полную структуру криптохрома (Рис.11). Нашли арабидопсис, который на синем свету формировал нормальный гипокотиль, но не отвечал на реакцию синего света. Активно работали российские исследователи. Было получено в 80-м году два мутанта. В 90-м году проанализировали 700 мутантов. Группа Кешмур сделали библиотеки ДНК, метод вычитания библиотек, нашли локусы, в которых была разница у мутантов и дикого типа, и потом - белок. До этого ничего не публиковали, чтобы сделать эффект взорвавшейся бомбы. В 93-м году. Белок криптохром: с одной стороны, у него два фоторецептора - птерин (специфичный, есть птериновое ядро и тетрафолат) и ФАД N-концевой фрагмент на 80% оказался гомологичен ДНК-фотолиазе (фотолиаза - система, которая регулирует спивки), но этот фрагмент ничего не репарировал и не имел ДНК-связывающего мотива.

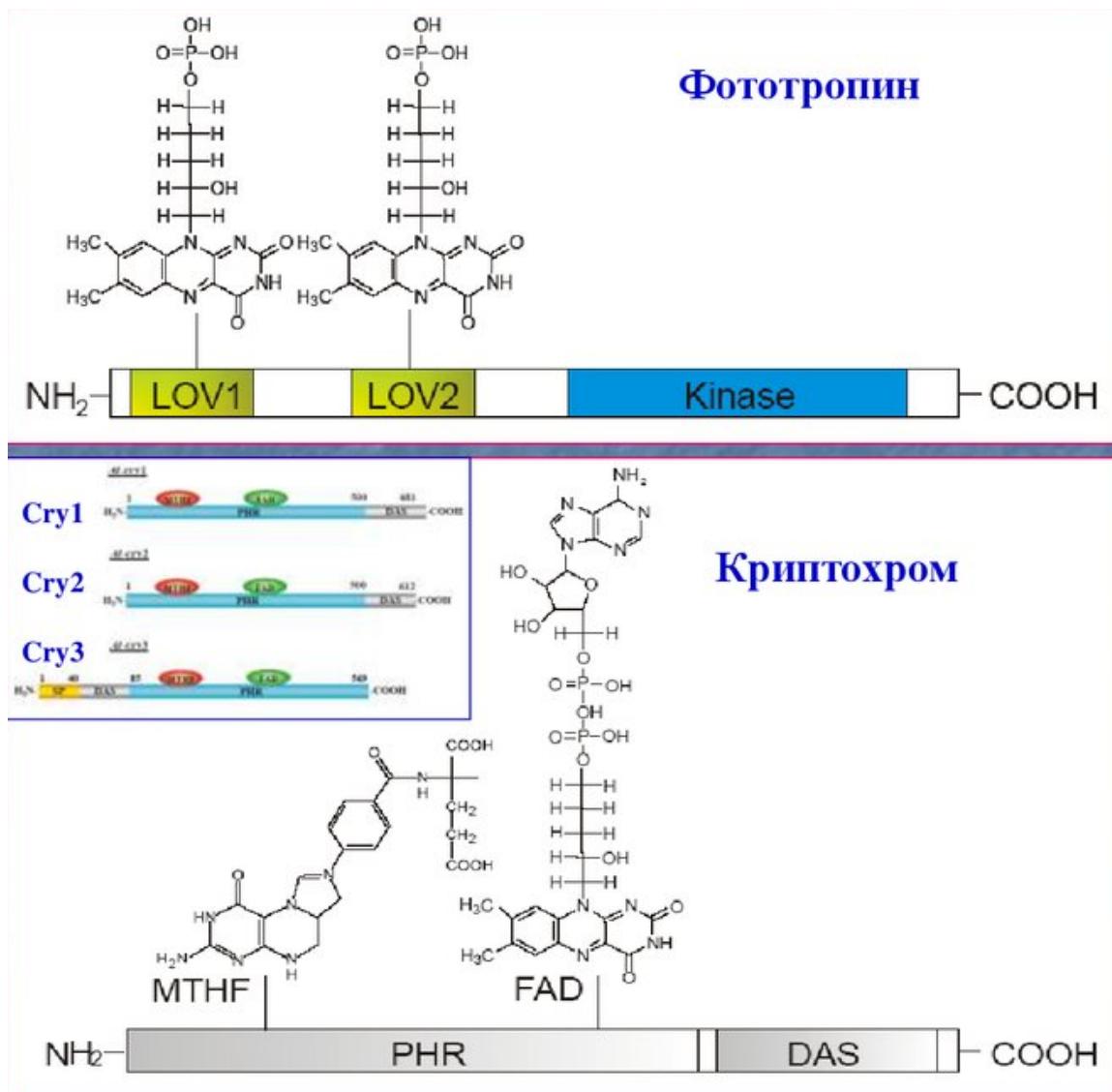


Рис. 11. Структура фототропина и криптохрома

Второй (DAS-участок) гомологичен тропоизомеразе, но ничего не двигал. DAS-участок обеспечивает активность. Как - до сих пор непонятно. Это - не киназа, фототропин - киназа. У него активно два FMN - flavиновых акцептора. Есть Lov-домены - характерные участки для сенсорных киназ (Light oxygen voltage). Оказалось, что очень важно оценивать в клетке эти параметры: световые для фототропина, Red-ox - состояние и мембранный потенциал. Эти домены очень часто работают в таких сенсорных киназах. Раньше считалось, что фоторецепторы должны быть зажорены на мембране, как пигменты хлорофиллы. Было удивительно, что фитохромы - не мембранные белки. Криптохромы - тоже. Фототропин оказался единственным сенсором, связанным с мембраной. Он - серинтреониновая киназа, 120 Кда. После восприятия света может уйти

в цитозоль, находится на плазмалемме. Фототропинов - как минимум два (еще раз: фототропин - мембранный-связанная киназа, которая ответственна за синий свет и ультрафиолет). Криптохромов тоже как минимум два, у арабидопсиса - до пяти. По аналогии с фитохромами, работают почти синхронно, немного разный белок. 190 и 120 аминокислот. Могут работать вместе, а могут в какой-то степени противоположно. Криптохром 2, как и фитохром А после перехода в активную форму часто разваливается. Криптохром 1 более стабилен. В темноте он находится в ядре, на свету может попадать в цитоплазму. Криптохром 2 - постоянно в ядре. Похоже на фитохромный сигналинг. У криптохрома 3 - особое строение. ДАС - домен часто обеспечивает димеризацию. Фитохром-3 - гибридный фоторецептор у некоторых папоротников. У него есть фитохромный участок и фототропин. Слитый рецептор, который реагирует и на красный свет, и на ультрафиолет (рис. 12). Функции фототропинов: изгибание колеоптиля, движение хлоропластов, открывание устьиц, часто работают совместно с ауксинами - crosstalk и между рецепторами, и между гормонами. Одна из мишней фототропинов - ARF7, трансфактор ответа на ауксин. Мутанты по этому гену нарушают фототропизм, а также гравитропический ответ,

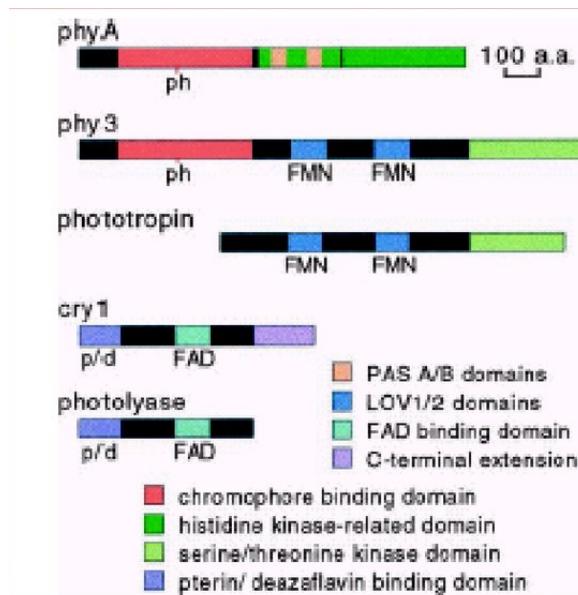


Рисунок 12. Схема строения фоторецепторов и их взаимодействие.

который характерен для работы ауксин-регулируемых генов. Как и для криптохромов, у арабидопсиса работают минимум два фототропина с разной чувствительностью - фототропин первый (высокочувствительный) и фототропин второй (низкочувствительный). Что из себя представляют: фотосенсорный домен и серинпротеинкиназа. В норме lov1 и lov2-домены - разные. Каждый нековалентно связывает хромофор - flavinmononukleotid, и обеспечивает белок-белковое взаимодействие. Скорее всего lov1 - димеризация, lov2 - восприятие света. В норме два

lov-домена закрывают киназный домен, при восприятии света второй изменяет конформацию, открывается киназная активность. Локализация. В норме почти все сидит по клеточным стенкам, при освещении синим светом выходит в цитозоль, запускает каскад реакций. Как работают: скорее всего, когда посветили, открылся киназный домен, он начинает autofосфорилировать, будет способствовать 14-3-3 - белки, которые известны, когда говорили про нитратредуктазу. В темноте будет постепенное дефосфорилирование, будет работать протеинфосфатаза PP2A - здесь тоже происходит остановка. Работает возможно через кальциевые каналы. С криптохромами сложнее. Там два разных фотосенсора - птерин и ФАД. Птерин, скорее всего, поглощающий, передает возбужденное состояние резонансным переносом на FAD. FAD может быть в нескольких состояниях окисления. Есть полностью окисленное, полностью восстановленное, скорее всего, происходит внутримолекулярная окислительно-восстановительная реакция и образование FAD-H-радикала, скорее всего, стабилизируется белком и именно он является физиологически активной формой криптохрома. Кроме красного, синего света и ультрафиолета хорошо известно влияние зеленого света. Он работает, тормозит прорастание, какой рецептор - не ясно. Обсуждали, что это может быть зеаксантин, фитохром, приходят к выводу, что зеленый свет взаимодействует с активным FAD-H-радикалом, приводит к восстановлению до FAD-H-, то есть выключает систему. Возможно, основная роль –dezактивация криптохрома. Сигналинг: исходно можно предполагать, что образование активного FAD-H-радикала может вызывать фосфорилирование в серин-богатом участке DAS. Это - autofосфорилирование. Считается, что активный ФАД забирает фосфат у АТФ и фосфорилирует петлю собственного белка. Это - не киназа. Происходит фосфорилирование некоторых серин-обогащенных участков DAS. В результате С-концевой участок может взаимодействовать с другими компонентами передачи сигнала, либо фосфорилируется другими киназами. Сначала все поглощается птерином, потом - активируется ФАД, потом фосфорилируется DAS-домен. Скорее всего, фосфорилирование DAS-домена приводит к тому, что криптохром может ассоциироваться с разными белками. Активация работы происходит через белок-белковое взаимодействие. Какое - когда говорили про сигналинг фитохрома, говорили, что работает HY5-фактор, COP1, убиквитин-Е3-лигаза. Оказывается, криптохромы тоже могут работать через влияние убиквитинирования. Криптохромы 1 и 2 взаимодействуют с COP1, что заставляет ее выходить из ядра и прекращать работу. Есть перекрест работы фитохромов и криптохромов. Фитохром А работает через COP1-Е3-лигазу. Криптохром 1 и криптохром 2 - разные, по-разному устойчивы. Криптохром 2 быстро убиквитинируется, криптохром 1 - нет. По-разному будут работать. Скорее всего, существуют две ветви сигналинга криптохромов, как и фитохромов. Через активацию трансфакторов CIBs, (5 штук), которые могут активировать разные гены, работает только криптохром 2 (неактивен - активация/фосфорилирование - взаимодействие с белками). Второй путь - система убиквитинирования: убиквитин-Е3-лигаза COP1, которая работает с фитохромами, работает в паре со SpAI. Белков SpAI - пять или шесть штук. Когда стало ясно, что фитохромы работают через убиквитинирование,

это казалось нонсенсом, потому что никак не влияют на COP. Выяснилось, что связываются со SpAI, но с разными участками. Если криптохром 1 ингибит комплекс COP1/SpAI, то криптохром 2, наоборот, активирует эту активность. Не исключено, что она его убивает. Это - вторая ветвь работы. Первая активирует транскрипцию нужных генов (Cry1), вторая (Cry1 и Cry2) через убиквитинирование выключает работу (не мешает) лигазному комплексу. Cry1 активирует, Cry2 выключает активность. Система похожа на работу фитохромов, тоже пара, тоже по-разному работает, не одна система работы.

Биологические часы.

Очень многие процессы у растений связаны с циркадными ритмами. Экспрессия многих генов, система светособирающих комплексов, нитрат-редуктаза, хлорофилл-связывающие белки. Цитозольный кальций - одна из основных сигнальных систем - кальциевый сигналинг - тоже четко зависит от циркадных ритмов. Фосфорилирование многих белков: в C4-фотосинтезе очень важен белок ФЭП-карбоксилаза, еще есть к-метаболизм, от которого день-ночь зависит. Циркадные ритмы ее активируют и фосфорилируют. Движение хлоропластов, открывание устьиц, удлиннение гипокотиля, движение семядолей и листьев, раскрытие цветков, синхронизация развития целиком: флауэринг, зацветание многих растений будут связаны с ним. Мутации генов, которые связаны с работой циркадных ритмов сильно изменяли фотопериодизм и нарушили цветение. Каким образом работают циркадные ритмы: похоже на работу телевизора: строчная/кадровая развертка - должен быть какой-то внутренний осциллятор/генератор, который вырабатывает "пилу". Для биологических ритмов это может быть концентрация белка. При этом обязательна система обратной связи. Если распадается белок, то существует порог. Концентрация опустилась ниже порога - включается синтез собственной РНК. Концентрация поднялась выше порога - синтез выключается. Такая система обратной связи обеспечивает осцилляцию (в нашем случае) с околосуточными ритмами. Назовем внутренним осциллятором, который за счет обратной связи обеспечивает систему осцилляции какого-то белка. Дальше должна быть система настройки. Для телевизора - поступление синхроимпульсов от телестудии, для растения - синхронизация "восход-заход" Солнца. Это событие настраивает частоту колебания точно под внешний фактор. На молекулярном уровне эта система характерна почти для всех организмов. В систему осцилляции входят гены часов. Очень важны плюсовый и минусовый элементы - система обратной связи. Самая простая схема: позитивный элемент (как правило, работает в паре) запускает гены негативного элемента, которые выключает работу позитивного элемента. Более точная схема - модель работы нейроспоры (Рис.13). Есть белок frequency, белки whitecolor1, whitecolor2 - гетеродимер, который активирует экспрессию гена часов frequency. У его белка две функции: с одной стороны, он тормозит работу WC, с другой стороны он - плюсовый элемент, активирует работу WC1. WC1, WC 2 экспрессируются с

определенной скоростью, запускает синтез белков frequency, которые тормозят собственную работу и регулируют один из белков whitecolor.

Упрощенная модель циркадного регулятора у арабидопсиса: все похоже. Центральный

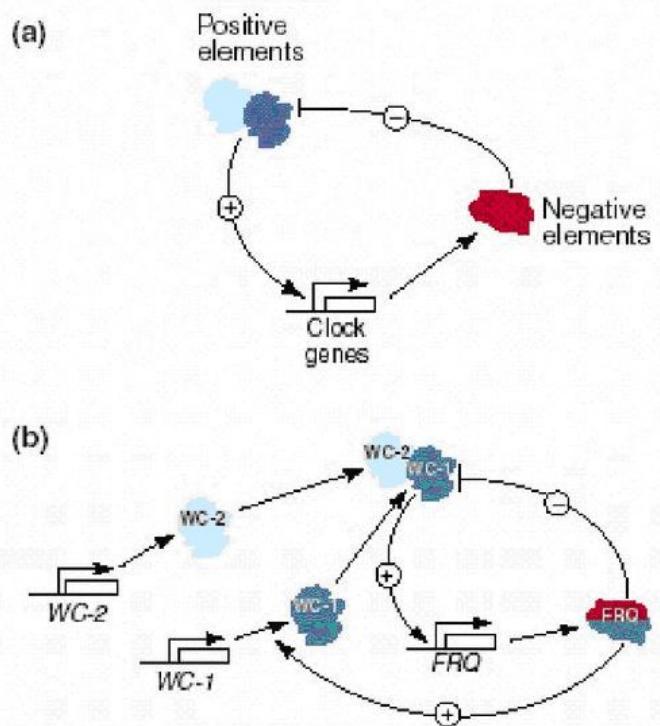
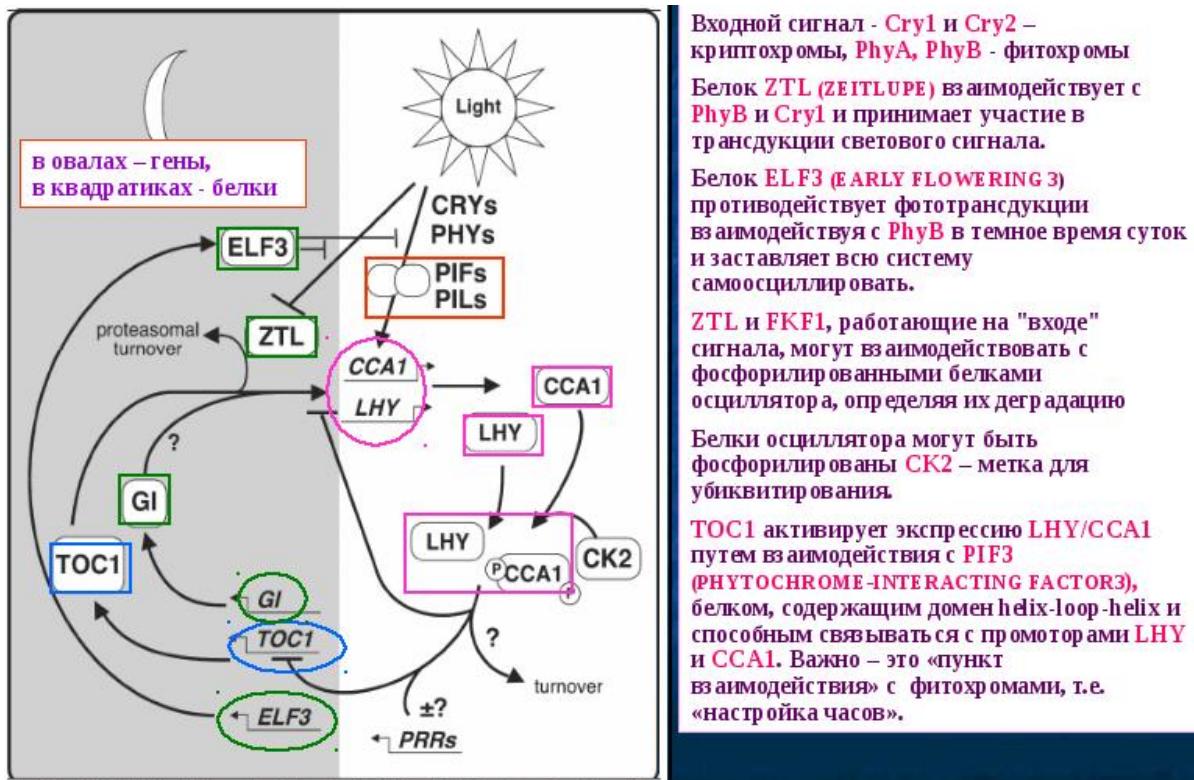


Рис. 13 Циркадный осциллятор нейроспоры.

осциллятор состоит из двух генов LHI - late elongated hypocotil и CCA-белков circadian clock association. Toc1 - позитивный регулятор генов Lhi и CCA1, их белки тормозят Toc1 и могут выходить на другие гены (светособирающий комплекс B, например). Lhi и CCA1 – образуют гетеродимер это транскрипционный фактор, который подавляет активность белка Toc. Он - фактически активатор Lhi и CCA1. Когда начинается световой день, он тормозит Toc1 и активирует Lhi и CCA1. Система настройки: На схеме (Рис.14) - модель современной циркадной системы арабидопсиса. В овалах - гены, в квадратах - белки. Виден центральный осциллятор, Toc1 активирует Lhi и CCA1, их белки димеризуются и тормозят центральный осциллятор. Дополнительные системы, кроме Toc – белок гигантея (GI). Самое важное - система настройки. В ней - фитохромы, криптохромы, PIFs - факторы, которые параллельно с центральным осциллятором активируют работу генов Lhi и CCA1. Еще - гены elf (тормозят настройку часов) ZTL - настраивают работу центрального осциллятора очень точно. Главные настройщики - фитохромы, криптохромы, их трансфакторы - PIFs, и FILs. Кроме центрального осциллятора есть киназы. Входной сигнал - фитохром А, Б, криптохром. PIFs, FILs - их трансфакторы, подключается гигантея (GI). Самое интересное - помимо центрального

осциллятора существует много систем, задействованных в его настройке. Многие из них - цитокининовый сигналлинг. Петля отрицательной обратной связи, в настройку системы циркадного ритма входят еще и фитогормоны. Целый набор систем, который входит в систему циркадного ритма, регулируется через убиквитин-Е3лигазу, которая позволяет регулировку через перекрест и сеть. И более точная настройка. В следующий раз начнем выяснять, как фитогормоны, фоторецепторы и циркадные ритмы регулируют развитие растений.



Лекция 4. Развитие растений, устойчивость растений к стрессу.

Морфогенез цветка

Гете разработал флоральную теорию морфогенеза цветка, он предположил, что все органы цветка - видоизмененные листья, цветок - видоизмененный побег. Мы разбирали схему цветения - этап развития, разделенный на подпрограммы: индукция цветения, эвокация цветения, флоральный морфогенез. Каждый этап контролируется многими факторами, внутренними и внешними. Для цветения важны внешние факторы. Мы разобрали, что существуют разные системы индукции и эвокации цветения (Рис. 15) существует фотопериодический путь, когда растения четко отслеживают соотношение день-ночь, здесь задействованы циркадные часы, в качестве настройки часов - фитохромы, криптохромы, фоторецепторы. Существует система передачи сигнала и основным регулятором

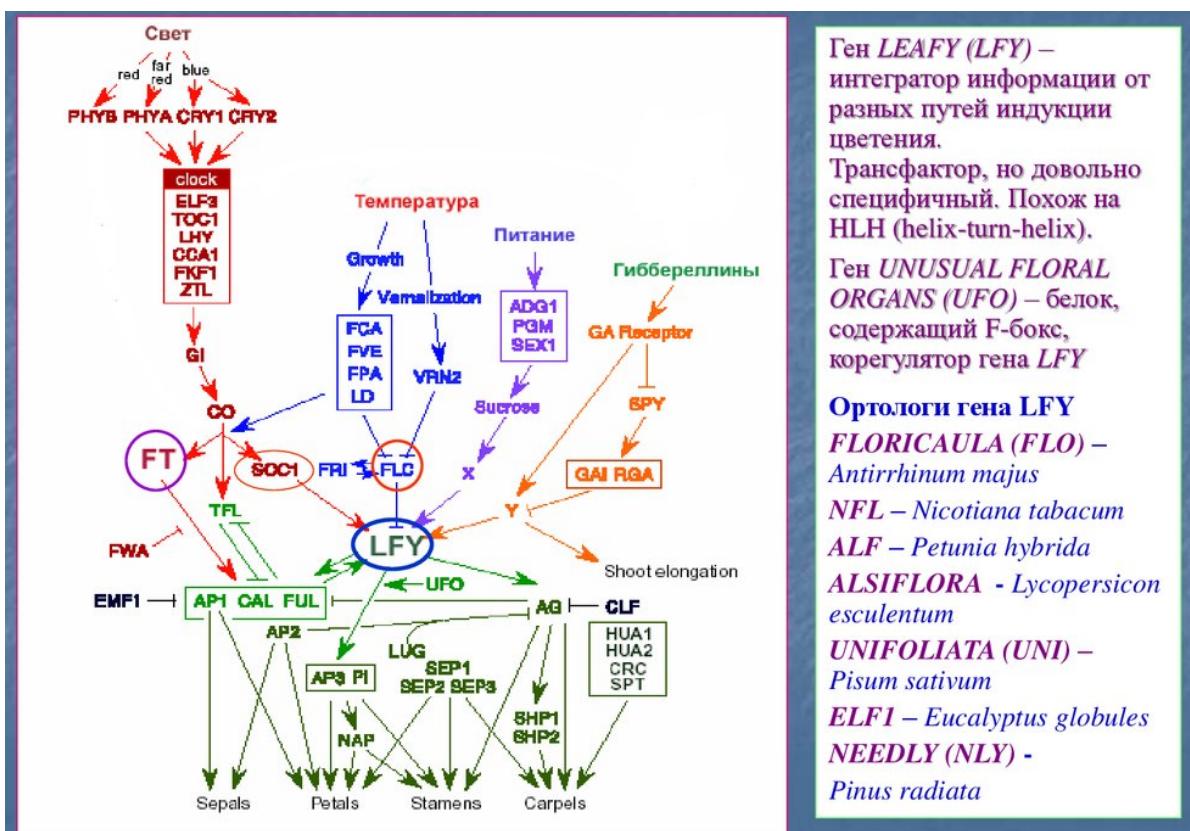


Рис. 15 Общая схема индукции и эвокации цветения

является трансфактор CO (constant), который регулируется белком с непонятной функцией гиганта, все происходит в листьях, дальнейший флоральный стимул передается флоригенам, открытие которых предсказало Челокяному, крупнейшим советским физиологом растений. FT - небольшой белок, выполняет функцию флоригена, транслоцируется в меристему и дальше вегетативная меристема превращается во флоральную. Помимо фотопериодического пути существует зависимость от температуры, питания, гиббереллинов. У каждого фактора есть система сигналинга, вторая по важности - ингибиторная система, где существует FLC (flower locus C) - ингибитор цветения, также - температурный путь, путь вернеризации (запуск низкими температурами) - независимый от фотопериодизма путь, автономный, (снимает влияние FLC), в норме FLC ингибирует центральный трансфактор, если правильная температура или автономный путь, а внутренние факторы работают, то растения снимают ингибирование. Центральным регулятором, интегрирующим информацию разных путей индукции цветения, является ген LFY. Это - трансфактор - довольно специфичный, на него сходятся пути индукции цветения: фотопериодический, температурный, питание, гиббереллины (где гиббереллины - вилка: прямой путь и система дополнительной регуляции). У растений не бывает одна система регуляции, всегда есть дублирующие варианты, индукция цветения может работать от constant через FT, который из листа транслоцируется, в меристеме работает SOC1, который напрямую с constant тоже может работать. Необходимо у каждого растения работают все пути сигналинга. Существуют независимые от фотопериодизма виды, у них система фотопериодизма либо почти не работает, либо ее значение небольшое. Для двулетних очень важна система вернеризации. Гиббереллины работают независимо, возможно, есть виды, у которых важен гиббереллиновый путь сигнала. Как правило, не одна система сигналинга работает, это позволяет растениям четко отслеживать, когда нужно переходить к цветению. В конце концов, когда сработала сложная сеть, когда растение оценило все, происходит индукция и эвокация цветения, начинается флоральный морфогенез, будут работать катастральные гены, гены разметки, происходит активация генов, ответственных за формирование органов цветка, начнут формироваться чашелистики, лепестки, тычинки и пестики.

Это - универсальная система: ортологи гена LFY найдены практически у всех растений, где их искали. Доказательство того, что ген LFY - центральное звено индукции локации цветения: мутант по LFY не цветет, у него почти все меристемы невегетативны, если сделать трансгенное растение под очень мощным 35S-промотором и поставить под него ген LFY, экспрессия приводит к тому, что все апикальные меристемы превращаются в цветы.

Мы закончили тем, каким образом происходит формирование цветка. Разобрали теорию ABC-систем, теорию войны позиций, когда (в продолжение идей Гёте) координированная работа трех групп генов определяет судьбу той позиции, где они экспрессируются (Рис. 16). Группа генов A и группа генов C: если мутируют гены A, то

их место занимают гены группы С и экспрессируются в тех местах, где не работают гены А, и наоборот, если смутировали гены группы С, то их место занимают гены группы А. Гены группы В - либо есть, либо нет. Эта теория основана на анализе мутантов арабидопсиса. Оказалась эффективная система: мутанты (у Арабидопсиса) *apetala 2* (AP2), где не работают гены группы А и есть гены группы С, поэтому понятно, что где работают только они, будут пестики, В+С - тычинки, опять пестики и В+С - тычинки. Если не работают гены группы В, мутант *Apetala3*, другой, или *Pistelata*, тоже другой мутант: либо чашелистики, либо пестики. Ни лепестков, ни тычинок не будет, т.к. гены группы В здесь не работают. Если не работают гены группы С, это мутант *agamos*, безбрачный, место генов группы

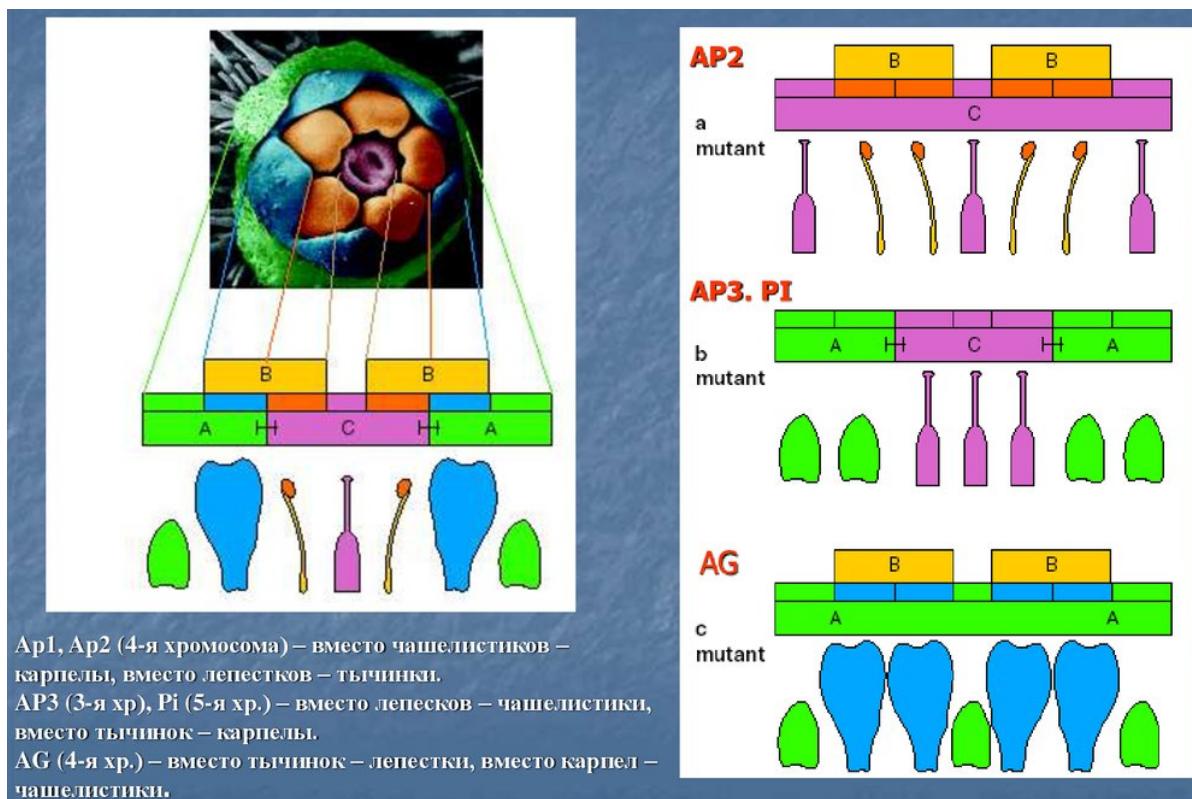


Рис. 16. Схема генетики развития цветка

С занимают А, получается чередование лепестки-чашелистики-лепестки-чашелистики-лепестки. Помимо того, что гены группы С определяют не только формирование генеративных органов, то есть пестиков и тычинок, но и терминалность, вырастает красивый махровый цветок, поскольку получается длинная спиралька. Сейчас выяснили, что гены этих групп являются трансфакторами. 80% - содержат MADS-бокс. Около 200 генов относятся к этому типу трансфакторов, они работают не только у растений, у растений это - главные трансфакторы, которые регулируют развитие формирования цветка. *Apetala 2* (AP2) не относится к MADS-боксу. Оказалось (работали две группы исследователей), что все мутации, которые есть у арабидопсиса, есть у львиного зева. И это - довольно универсальная система формирования цветка, сейчас много работ,

которые пытаются сделать эволюцию и выяснить, каким образом эволюционировали. Упрощенная схема иерархии генов флорального морфогенеза, включает 16 основных игроков - далеко не все. Чтобы превратить вегетативную почку в генеративную, работает несколько тысяч генов, в каждом участке они будут специфичны. Чтобы сделать тычинки, 1000 генов работает, для пестиков нужно 300, это грубая оценка. Регуляторы цветения - трансфакторы, которые запускают нужные гены. По крайней мере, половина из них - гены, имеющие MADS-боксы. Работают не только трансфакторы. Другой пласт систем регулирования - на уровне РНК. МикроРНК сейчас занимают очень важную роль. На схеме (Схема1) – МикроРНК, участвующие в развитии цветка, развитии листа, развитии корня. Это - мощная система, которая выключает определенные гены. Например, MiR172 - фактически *apetala2*, не имеют MADS-бокс, работают подобно, выключают трансфактор. Мутация *apetala2* по фенотипу идентична трансгенному растению, где MiR172 - под мощным промотором 35S.

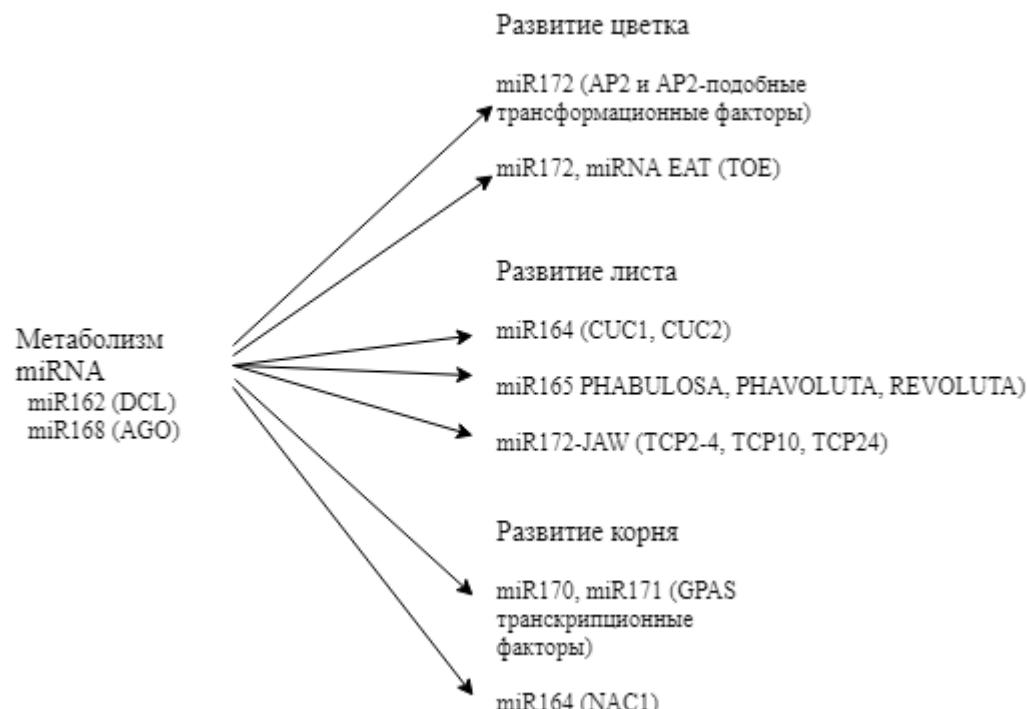


Схема. 1 MiRNAs в растениях

Как при регуляции дыхания, где даже большие блоки обходятся пентозо-фосфатным шунтом, так и здесь кроме системы регулирования, основанной на факторах транскрипции, существует параллельная система, очень серьезная, только сейчас начинающаяся разрабатываться основанная на работе микроРНК. Не все зашунтировано, но мощные факторы регулируются двояким образом. Исторически долго обсуждалось, что помимо ABC-групп генов существуют некоторые модификации, говорили о группе генов D, поскольку пестики - семязачатки, есть еще плодолистики. Считалось, что

формирование семязачатков тоже регулируется определенной группой генов, пытались выделить группу генов D, основатели системы ABC не хотели увеличивать количество букв. Выяснилось, что существуют не только гены группы D, но и группы E (Рис.17), которые работают везде, кроме чашелистиков. Поскольку их много, было необходимо сделать тройной-четверной мутант. Это сделали

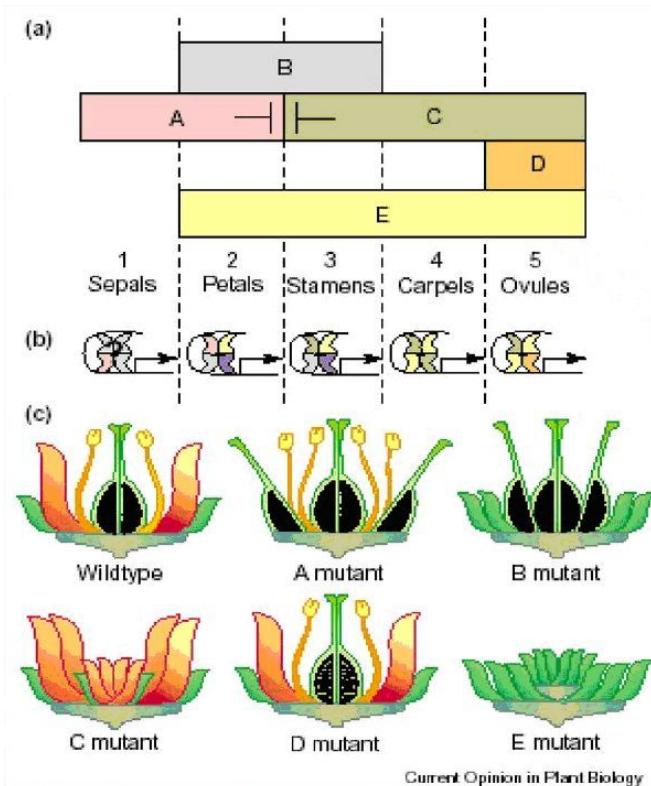


Рисунок 17. Дополненная модель генетики цветка

и оказалось, что, для того чтобы работала система ABCD, необходимо, чтобы экспрессировались гены группы E, их назвали *sepallata*, от чашелистиков. У E-мутантов есть только чашелистики. Тогда была выдвинута гипотеза, которая сейчас подтверждается, о том, как это работает. Есть много систем трансфакторов с MADS-боксом. В MADS-боксах есть участок, который взаимодействует с ДНК димерами. В начале 20 века была выдвинута гипотеза о том, что продукты этих генов функционируют в виде своеобразных гетеротетрамерных белков. Считается, что E нужно для того, чтобы два димера с MADS-боксами объединить. Продукты A+E нужны для образования чашелистиков, A+B+E - лепестки, B+C+E- тычинки, C+E- плодолистики, D+E- семяпочки, семязачатки. Каждая пара с MADS-боксом связывается с нужным участком ДНК, в которой есть последовательность CC(A/T)6GG (CARG-бокс). Квартет белков связывается с двумя участками ДНК, разными, и включает экспрессию нужных генов, которые определяют развитие тычинок, лепестков и др. Подобная система обнаружена практически во всех растениях, идентифицировано, что там происходит. Чашелистики - AP1/AP1/SEP/SEP. Лепестки - AP1/AP3/PI/SEP, тычинки - PI/AP3/AG/SEP,

плодолистики - AG/AG/SEP/SEP, семяпочки - AG/SHP/STK/SEP. Вся сложная схема - индукция цветения, начиная от фитохромов, кончая флоригеном FT-фактором, Soc1, который регулирует меристему, LFI1, в конце концов приводит к тому, что формируются квартеты, которые связываются с нужными ДНК в нужном месте и формируют флоральный морфогенез, цветки.

Эволюция. Поскольку система ABC найдена практически везде, где искали, ABCDE теперь, то интересно было посмотреть, каким образом все эволюционирует, понятно, что главное - семязачатки: тычинки и лепестки, C, D - гены. Одно время C- и D-гены не разделялись, были едиными трансфакторами еще у голосеменных, у покрытосеменных важны лепестки, чашелистики, появлялись гены A, B. Они могут взаимодействовать по-разному. Когда ген B переходит на уровень, где должны быть чашелистики, получаются безчашелистиковые цветки, венчики без лепестков, сейчас достаточно много подтверждений, каким образом это все формировалось, существуют разные схемы, у голосеменных B на уровне C работает, у самых простых энгиосперм. Есть эволюционная система, которая объясняет или предполагает, каким образом сформировался цветок и как он регулируется.

Определение пола у растений

Оказывается, даже такой важный вопрос, как определение пола, у растений очень зависит от внешних, внутренних факторов, и то, что для животных практически нереально - смена пола - для растений часто бывает жизненно необходимо, процесс детерминирования пола у растений - очень сложный, разный для разных видов растений, очень зависит от внешних и внутренних факторов существования. Фактически определение пола - формирование признаков пола (у клеток - тоже интересно) у особей происходит под воздействием генетических факторов (генетическое определение пола) и условий существования (фенотипическое определение пола). Из ботаники известно, что все цветки делят на обоеполые (гермафродитные) и однополые (тычиночные и пестичные). У однодомных растений цветки - на одних и тех же организмах, у двудомных (хмель, тополь, конопля) - на разных особях. К гермафродитным относится более 70% видов, нечасто говорят об определении пола у растений. Стратегия существования у растений - очень серьезная. Пол у них может определяться на уровне хромосом, генов, внешними и внутренними факторами (сигналами развития) - фитогормонами, элементами питания, и т.д. Хромосомное очень мало отличаются от животных, существуют аллосомы, или sex-хромосомы, которые могут отличаться по морфологии, количеству у мужских и женских особей, содержат гены, ответственные за определение пола. Это - стандарт. Большинство растений, у которых пол определяется хромосомами: существуют гомоморфные системы, когда X, Y почти невозможно отличить морфологически. Это - шпинат, аспарагус, как XX, так и XY у разных растений могут определять женскую особь. Гораздо чаще растения - гетероморфные, когда разные X и Y хромосомы, есть тоже большие вариации.

Существует стандартный вариант - XX, XY, может быть несколько Y, несколько X, пол для разных видов определяется количеством X и Y - хромосом и их соотношением. Классический пример - смоловка, у неё - XX, XY, есть женские и мужские цветки. У гетероморфных все гораздо более тонко настраивается, они могут отличаться по размеру, форме X, Y хромосом, их может быть разное количество. Растения можно разделить на две группы. Может быть 4X, или 2X2Y, У разных растений - по-разному соотношение X-хромосом и Y-хромосом. Часто важно не только соотношение X и Y хромосом, а соотношение X- хромосом с аутосомами. Чем больше X, тем больше вероятность получить женский фенотип. Это - хромосомное определение пола (там на самом деле сложнее).

Генетическое определение пола: в ряде случаев оно находится под влиянием не хромосом, а конкретных генов. Характерно как для однодомных, так и для двудомных растений, детерминация может определяться одним геном, а может быть полигенным признаком. Моногенное определение пола у "Бешеного огурца" - три аллеля, одна аллель - женское растение, другая - мужское, третья - двудомная особь с преобладанием цветков одного пола в зависимости от внешних условий. Полигенное определение пола: в зависимости от того, гены доминантные или рецессивные, будет мужская особь, женская, однодомная или двудомная. Аналогично - для дыни. Это говорит о том, что генетический вариант определения пола у растений гораздо более пластичен, адаптивен. Казалось, это - фундаментальная вещь, оказалось, не так. Для папайи (имеет серьезное практическое значение) есть моногенный вариант формирования растений, мужской, женский, гермафродит, все отличаются по виду, вкусовым качествам, считается, что самый вкусный - гермафродит, развитие товарного папаеводства зависит от того, чтобы на ранних этапах выяснить, какой пол у растения - мужское, женское, или гермафродит. Практическое направление, большие деньги, просто RAPD-маркером (это хорошо известная система) можно определить, что будет за растение, все ненужное удалить. У кукурузы - довольно непростое определение пола: есть два гена: ba и ts, baba будет нефункциональное растение, и это тоже надо проверять. Когда в прошлом семестре рассказывалось про культуру клеток растений, мы говорили, что культуру клеток хорошо использовать для клеточной селекции, можно получать самые разные регенеранты, в том числе, кукурузный трансексуал получился из культуры клеток, вместо метелки растут початки. Это - тоже вариант пластиности определения пола у растений. Кроме хромосомного, генного определения пола колossalную роль играют факторы внешней среды. В большинстве случаев фенотип, даже если генотипически он определяется как мужской или женский, растение может менять, и на это оказывают большое влияние самые разные факторы внешней среды (Рис.18). Это не так хорошо изучено. Факторы, влияющие на изменение в мужскую сторону: короткий день - женские особи, длинный - мужские. Красный свет - работа с фитохромами - мужской пол, синий - криптохромы - женский. Низкая температура - женский пол, высокая - мужской, CO₂ преобладание калия или натрия, низкая или высокая влажность. Очень существенно - гормональная регуляция. Довольно сложное взаимодействие - этилен

работает. В общих чертах: пестичные цветки, женские - цитокинины, гиббереллины - тычиночные. Проблема пуха у тополей - когда идет мощная обрезка, снижается количество листьев, листья - источник гиббереллинов, это приводит к появлению женского фенотипа.

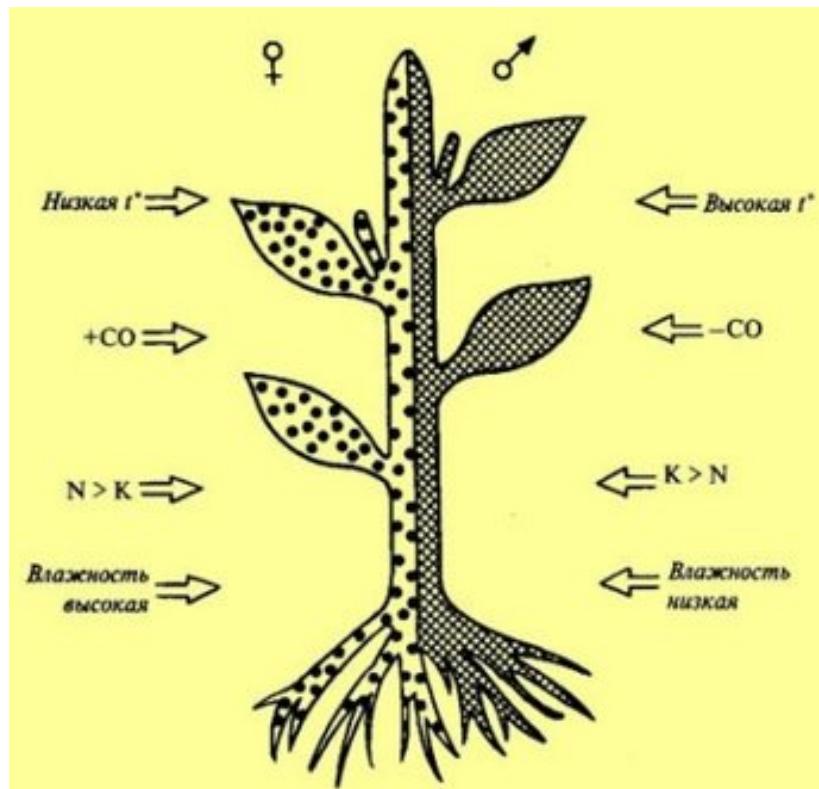


Рис. 18. Факторы, определяющие фенотипическое определение пола у растений

Устойчивость растений

Мы в общих чертах разобрали физиологию отдельных органов, клеток, тканей, самого растения, шли от дыхания и фотосинтеза к росту и развитию. Теперь в физиологии есть такое понятие, как экологическая физиология. Каким образом растения адаптируются, или существуют в определенных условиях внешней среды. Это можно сформулировать как устойчивость растения к внешним факторам среды. Более широко: устойчивость - одна из самых важных аспектов существования растений в реальной экологической ситуации. Терминология: сейчас четко различают адаптацию и акклиматацию, и то, и другое - понятия, фактически формируют процесс. Адаптация и акклиматация - процесс приспособления организма к изменившимся условиям среды. Отличается - фактически, по времени: адаптация - эволюционно, те или иные свойства, которые приобрели растения в течение длительного эволюционного развития. Акклиматация — это быстро,

когда вдруг появляется неприятный фактор, стрессор, как правило, то, что делают неприспособленные, не прошедшие длительную эволюцию именно к этому стрессовому фактору, он внезапно появился. Устойчивость - способность организма выживать и давать потомство в изменившихся условиях. Фактически - конечный результат адаптации и акклиматации. Раньше адаптацию и акклиматацию смешивали. Это - несколько разные явления. Важно, сколько организм имеет времени для этих процессов. Существуют адаптации генетические, эволюционные — это истинные адаптации, выработались в процессе эволюции за тысячи лет. Онтогенетические - правильнее - акклиматации, происходят в процессе онтогенеза организма, хотя можно назвать и адаптацией, срочные - часы. По времени - эволюционные, онтогенетические, срочные. Уровни: на уровне целого организма: переключение C_3 и CAM-метаболизма. Если все хорошо, с засухой или солью, то будет C_3 у хрустальной травки. Если будет процесс засоления, то весь организм переключается на другой тип метаболизма. Тканевой или органный - на уровне ткани и органа. Среди старателей, собирающих женьшень, ходили легенды, что он прячется от того, кто его ищет. У женьшена нет у корня механической ткани, что делает его уязвимым для патогенов. Есть контрактные элементы, которые позволяют сжиматься корешку. Женьшень не каждый год выбрасывает стрелку, если он не выбросил стрелку, чтобы уйти от почвенных неприятностей, корень сжимается и уходит на несколько сантиметров под землю. Клеточный уровень: синтез осмолитов (для солевого стресса), белков (теплового шока), образование шаперонов.

Адаптивный ответ конститутивно устойчивых растений, которые адаптированы эволюционно. У неустойчивых растений будет стресс-реакция и специализированная адаптация (акклиматация). Конститутивная устойчивость растений: все суккуленты имеют эволюционную адаптацию к недостатку влаги. Кактусы имеют мощные водосохраняющие системы, огромные кутикулы. Хрустальная травка эволюционно приспособилась к высоким солевым фонам в почве либо засухе, выводит соль на поверхность листочков, поэтому называется хрустальная травка. Срочные акклиматации, стресс-реакции имеют стандартную схему. Акклиматации разделяются. Ответ растений на внезапный стресс - две фазы: стресс-реакция и специализированная адаптация (правильно называть, акклиматация). Стресс-реакция - первый ответ организма на стресс. Она - достаточно быстрая (минуты, часы, в крайнем случае), назначение - обеспечить выживание при стрессе. Специализированная адаптация (акклиматация) - длительная, практически все, что после стресс-реакции, назначение - нормальное существование в изменившихся условиях. Стресс-реакция унифицирована независимо от того, какой будет стресс, реакция организма растения будет более-менее одинакова. В данном случае есть изменившиеся некомфортные условия и не прошла система идентификации стресса. Полезно иметь унифицированные реакции выживания при неблагоприятных внешних условиях. Назначение стресс-реакции - дать временную форму организму, чтобы определить, что за стресс, разобраться, каким образом на него реагировать и сформировать адекватный ответ на существование в этих условиях. Стресс-реакция - унифицированная, механизмы - сложная вещь, некоторые механизмы - большие блоки.

Достаточно очевидны и унифицированы. Первое - отключение процессов, не имеющих жизненно важных функций, когда стоит вопрос о жизни и смерти. Чаще всего - отключение энергоемких, идущих в запас процессов - нитратредуктаза отключается первая, причем на всех уровнях. Усвоение азота - дорогой процесс, требует колоссального количества энергии, затем - мобилизация энергетических ресурсов. Энергетика - основа решения всех проблем. Очень важно, чтобы энергетика была быстрая. Когда мы говорили про альтернативную оксидазу, когда включается цианид-резистентное дыхание, когда включаете альтернативную оксидазу, то (долго считалось, что вспышка дыхания после любого стресса - "плохая" вещь: это - влияние стресса, растение неэффективно дышит). На самом деле все не совсем так. Когда включается альтернативная оксидаза, это нормальная стресс-реакция. Она не связана с запасанием энергии, другое дело, что, когда работает альтернативная оксидаза, выключается работа P6F - комплекса и цитохром-оксидаз. Эти два блока, во-первых, медленны, во-вторых, они легко повреждаемы. В данном случае, когда включается альтернативная оксидаза, мы теряем 60% энергии. От убихинона до кислорода. Но работает NAD-H-гидрогеназа. Поэтому растение сокращает путь до окисления NAD-H, и это - быстрота, оно получает устойчивость, поскольку не работают два довольно неустойчивых блока, но при этом теряется 60% энергии. В данном случае 30% энергии, но быстро, очень часто являются выходом для выживания растений. Поэтому быстрая энергетика и устойчивая энергетика - нормальная составляющая стресс-реакции. Синтез веществ, которые могут защитить самые тонкие и уязвимые части метаболизма клетки, это - протекторные соединения - как высокомолекулярные (белки теплового шока). Так называются, потому что БТШ первыми обнаружили при тепловом шоке. Большинство из них синтезируются при любом виде стресса: солевом, осмотическом, другие стрессовые белки - осмотин-подобные, низкотемпературные - синтез высокомолекулярных защитных соединений. Еще - низкомолекулярные ди- и полиамины, пролины, бетаины. Вот три основных блока стресс-реакции. Еще раз: отключаем все ненужные процессы, делаем надежную быструю энергетику, пусть неэффективную, но быструю, наконец - образовываем достаточное количество защитных соединений, чтобы защитить наиболее уязвимые участки клеточного метаболизма. Иллюстрация - выключение необязательных при стрессе процессов. Нитратредуктаза выключается на всех уровнях: отключается транскрипция, мРНК разваливается за счет работы микроРНК, активная форма белка сначала переходит в неактивную за счет фосфорилирования и 14-3-3-белка, если стресс будет долгий, то это тоже - сигнал для развала нитратредуктазы. Довольно приличное количество белков будет таким образом разваливаться. Биологические функции БТШ. Белки теплового шока: высокомолекулярные и низкомолекулярные. Делятся условно на большие группы в зависимости от молекулярной массы. Высокомолекулярные БТШ: БТШ-90 - размером около 90 кДа. Главная функция - протекция рецепторов. При стрессе очень важно выяснить, что за сигналинг, каким образом происходит, потом будет работать целая система защиты организма, поэтому рецепторы необходимо защитить. БТШ-90 не дают им развалиться

и деградировать, чаще всего это – гормоны. БТШ-70. Распад неправильно собранных белков, система убиквитинирования, транспорт макромолекул через мембранны. Транспортный процесс – одна из основ нормального функционирования клеток и поэтому нужна защита. БТШ-60: правильная сборка макромолекул. При высокой температуре очень часто нарушается, мы говорили в ВПР неправильные S-S-связи образуются, собрать белки, (не только белки, и остальные макромолекулы) – важная функция.

Низкомолекулярные БТШ: БТШ-20. Большая группа. Обеспечивают работу макромолекул при стрессе. Некоторые входят в гранулы теплового шока (БТШ17+БТШ70). При повышении температуры, но не только, очень активируются РНКазы. Защита РНК от деградации. Это – важный момент, и мы говорили, что, например у нормальных РНК – цитозольных и пластидных – разные механизмы защиты. Убиквитины. БТШ – стресс-белки, синтезируются не только в ответ на стресс. Это не так. Их синтез резко увеличивается, то есть, в норме очень многие из них (не все) существуют, их количество существенно меньше. БТШ – убиквитины, нормальные компоненты нормально функционирующей клетки, сейчас известно, что практически все фитогормоны работают через убиквитинирование. При стрессе их количество увеличивается на порядок. Характерные черты стрессовых белков, не только БТШ. Должны синтезироваться быстро, поэтому не содержат интроны. Некогда доводить до ума, интроны – тонкая настройка, регуляция. Быстрый синтез. Через несколько минут или десятков минут уже всплеск концентрации. Мы знаем, что стресс-реакция – очень быстрая вещь. Естественно, их нужно не только включить, но и выключить, поэтому в клетках – не для всех, но для многих, существует система – индукция экспрессии генов БТШ. В частности, гены хитшок-70 (Рисунок 19). Если у нас есть ген БТШ, он экспрессируется, только если будет определенный трансфактор, который на него сидет и запустит работу. Как правило, такой трансфактор – тример, называется HSF – хитшокфактор, работает только в виде тримера, когда появляется температура, садится на хитшок – элемент в промоторе и начинается активное считывание. При этом должна сработать протеинкиназа, которая фосфорилирует хитшок-фактор, он начинает активно работать, нарабатывает хитшок-белки, они начинают выполнять свои функции, дальше хитшок-белки садятся на фосфорилированный хитшокфактор, посадка вызывает его отделение от гена, он перестает работать. Фактически их синтез вызывает торможение

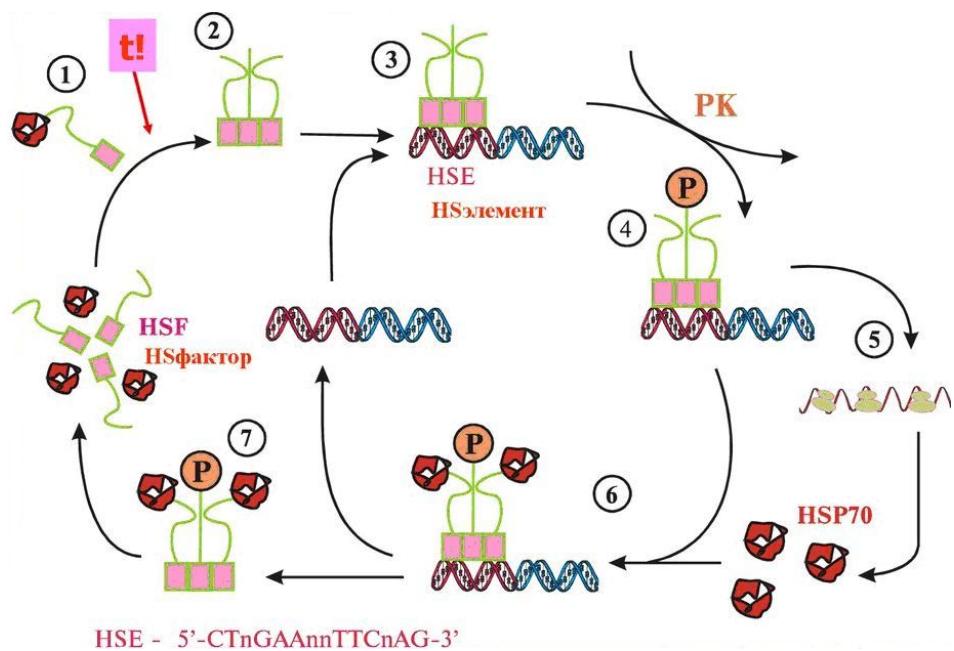


Рис. 19 Индукция экспрессии генов HSP70.

собственной транскрипции. Хит-шок фактор в соединении с белками теплового шока нестабильны, разваливаются на мономеры, в этом виде ждут, когда опять появится температура или другой стимул. Затем все повторяется. Здесь - нормальная, стандартная система обратной связи, очень быстрый запуск синтеза белков способствует тому, что они сами себя выключают и хитшок-фактор ждет. Как только стрессовое состояние, все повторяется.

Стрессовые белки - не только белки теплового шока, их довольно много. Белки низких температур, белки, которые образуются при водном дефиците. Существует достаточно много информации об этих белках. Это - больше молекулярная биология, но нам тоже интересно. Дегидрины: синоним - LEA, белки, существующие не только при стрессе, ассоциируются с поздним эмбриогенезом. Vsc - у пшеницы. Синтезируются при водном дефиците и других стрессах. Регулируются жасмонатом и АБК. Помним, что одна из функций этих гормонов - защита от стресса. Жасмонаты - часто от разных видов стресса и абиогенных факторов, АБК - закрывание устьиц. Большой диапазон молекулярных масс от 9 кДа до 200 кДа, у некоторых есть консервативные домены, которые имеют лизины и серин, которые иногда нужны для димеризации, регулируются фосфорилированием, локализация - в цитоплазме и ядре (в эухроматине). Одна из функций распространенная, не главная, - стабилизация макромолекул, в частности, ДНК. Белки низких температур. Их довольно много: COR - cold-acclimated proteins, COR - cold regulated proteins, LTI - low temperature inducible, AFP - anti-freeze proteins. Антифризинг протеин работает даже при замораживании. Специфичны, как правило, для низких температур, особенно для отрицательных. Для солевого стресса: осмотин и осмотин-

подобные белки. Мы знаем, что один из важных компонентов и повреждающих факторов при соли — это низкий водный потенциал и то, что вода выходит из клеток. Солевая засуха - гораздо более неприятно, чем водная засуха - засуха, связанная с недостатком влаги. Что приходится делать, когда вода уходит из клетки: повышать концентрацию соединений осмотических. Часто это можно делать ионами, но они - очень неприятная вещь, там заряд, клетка синтезирует маленькие белки, которые нейтральны, в отличие от ионов, их основная функция - снижение водного потенциала. Тут - двойственная вещь, защитные белки, но у них есть специфика. Осмотины будут относиться не только к стрессовой реакции, но и к специализированной адаптации, хотя понятно, что это - перетекающий процесс и они начинают синтезироваться еще при стрессе. Низкомолекулярные защитные вещества. Достаточно много. Это - достаточно мультифункциональные вещи и соединения, к ним относятся, во-первых, так называемые бетаины (Рис. 20).

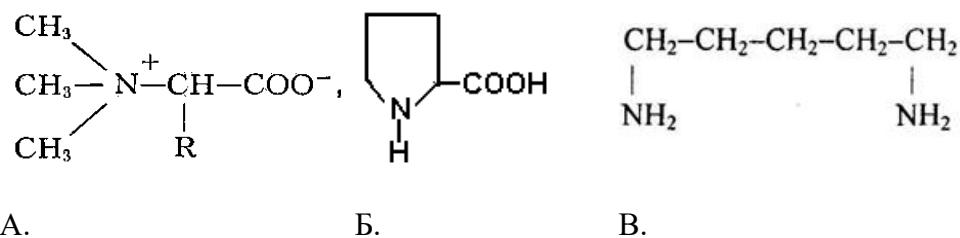


Рис. 20 A) Бетаины; Б) Пролин; В) Кадаверин

Когда говорилось о том, что аминокислоты, которые имеют плюсы и минусы - не очень здорово для протекторных реакций, бетаины - метилированные аминокислоты, когда все водороды у азотной группы метилированы. Это делает их довольно нейтральными. Оказывается, такие соединения - мультифункциональны. Они могут выступать как осмотические соединения, и выступают за счет положительного заряда у атома азота для сохранения нуклеиновых кислот, потому что там много минусов. Когда бетаины окружают — это стабилизирует. Очень много работ и это широко обсуждается - роль пролина. Это - аминокислота, но структура - цикл. Она довольно стабильна, обсуждается целый набор ее функций — это и осморегулятор, и контроль экспрессии генов, и источник углерода, то есть в какой-то степени, когда нужен дефицит и энергию нужно давать, это и как pH-татный компонент, компонент антистрессовых белков. Пролин - довольно унифицированная защитная молекула, которая может участвовать в очень разных механизмах протекторной стресс-реакции. Сейчас активно обсуждается работа кадаверина — это может быть и сигнальная молекула, и оказывается, серьезная работа при солевом и осмотическом стрессе. Очень часто при стресс-реакции работают активные формы кислорода, как плюс, и как минус. Кадаверин - субстрат для образования перекиси водорода, он стимулирует экспрессию супероксиддисмутазы, он -

защита ДНК так же, как и бетаины, то есть это - мультифункциональная молекула. Во время стрессовой реакции очень большую роль играют окислительный метаболизм и оксидантные ферменты. Практически все виды стресса: засуха, солевой, высокая, низкая температура, будут вызывать синтез низкомолекулярных веществ и продуцировать активные формы кислорода. Мы уже говорили, когда речь шла про дыхание, что исходно это было плохо, потому что кислород, когда появился процесс оксигенного фотосинтеза, был очень сильный яд. Потом растения смогли превратить его в субстрат для дыхания, получился баланс, который поддерживается, но при этом многие процессы связаны с формированием активных форм кислорода. Это - перекись водорода, супероксидион, супероксид радикал, и т.д. и т.п. Это плохо, потому что сильно токсично. Оказалось, что эти токсичные вещества в ряде случаев, чаще всего это связано с патогенными процессами, с биогенными стрессами, и во многих случаях тоже можно превратить во благо, во всяком случае перекись водорода - сигнальная молекула. Но это все должно находиться под очень жестким контролем. В любом организме, будь то растительная клетка, организация активных форм кислорода, их концентрация, формирование и развал - находится под очень жесткой системой контроля, надо пройти по лезвию бритвы. При таких стрессах индуцируется приличное количество активных форм кислорода. Чрезвычайно важны системы регулирования: супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза, эти вещи тоже являются обязательными компонентами стресс-реакции. То есть, формирование неактивных форм кислорода как результата стресса, но и тут же появляется система их четкого регулирования, при необходимости при патогенезе, наоборот, будет окислительный взрыв, о котором поговорим попозже. Это - те общие реакции, которые являются стресс-реакцией - минуты, часы,

LEA-белки — это все связано с водным дефицитом. Связывают ионы, шапероны, убиквитин и протеазы. Дальше начинается специализированная адаптация. Она специфична для каждого вида стресса. Если будет водный стресс, то это LEA-белки. Они являются элементами стресс-реакции, но плавно перетекают к адаптации. Некоторые функции у них будут там, а основные проявляются на специализированной адаптации. Делают: повышают водоудерживающую способность у цитозоля. Поскольку содержат довольно большое количество заряженных аминокислот, то это будет одна из основных их функций уже при специализированной адаптации. Шапероны предохраняют белки от повреждения при деградации клетки — это перетекающее из стресс-реакции, но в данном случае и при специализированной адаптации тоже работает. Они имеют гидрофобную область, будут связывать ионы в цитозоле. Насколько это нужно - для разных вариантов - важно, еще функция - замещать воду в примембранный области и поддерживать структуру мембран. Мембранны - очень важно. Еще очень важно - аквапарин. Если во время стресс-реакции растение выясняет, что это - водный дефицит, то тогда будет активация аквапаринов, как плазмалеммных, так и тоноплатных, они будут правильным образом перераспределяться, или наоборот, будет выключаться их синтез, в общем, регулирование аквапаринов. Помимо специализированной адаптации будет синтез самых разных осмотиков, поскольку понижение водного потенциала - один

из существенных моментов. Это - на уровне клетки. На уровне организма тоже может быть самое разное. изменение, тут важно, что специализированная реакция - уже системный ответ на уровне клетки, ткани, органа. Один из вариантов водного дефицита - устойчивость к засолению. Соль - сама по себе. Самое сложное по реакции и по механизмам - устойчивость к соли. Сейчас это сильно распространяется, поскольку это - солончаки, засоление почв, если к водному дефициту на уровне клетки, то к засолению системы устойчивости распространены по всей организации растений. Здесь будет и организменная система. Например, вы видели, как будет организовано выведение соли, как вот здесь. Соль буквально лежит на листе. Галофит из соленого озера Эльтон здесь работают и организменные уровни. Здесь работает и клеточный уровень. В данном случае, на клеточном уровне самое главное - выведение солей. Разные стратегии: может быть стратегия избегания и, наоборот, решения проблем. Это - тоже самое и на уровне клетки. Мы можем не пускать соль внутрь клетки, а можем активно выбрасывать. В данном случае при стрессовой адаптации появляется целый набор транспортеров, ионно-транспортные белки. Засоление это натрий не будем говорить про соли, которые используют антигололедные компании, появляются транспортеры, они клонированы многие из них, которые могут быть униporterами, натриевые АТФазы, обычно в растениях нет, для галофитов они есть. Натрий выводится из клетки самыми разными способами есть клонированные для разных организмов и это - одна из основных клеточных на уровне клетки стрессовых адаптаций (акклиматаций), которые позволяют бороться с засолением. Устойчивость к соли - пожалуй одна из наиболее сложных систем, которые работают на всех уровнях от клетки до организма. Один из самых серьезных вариантов - система устойчивости к низким температурам. Молекулярные механизмы и генетическая инженерия холодаустойчивости. Когда растение выяснило, что это - низкие температуры, положительные или отрицательные, то необходимо: нельзя допустить образование льда. Предохранить мембранны. Обеспечить нормальное функционирование (транскрипцию и трансляцию). Мембрана в оптимальной температуре - полутекущее состояние. При низких температурах - жесткие. Клетка обречена на гибель, если нетекущие мембранны. В них сидят очень много белков, других компонентов, они должны быть подвижны. Высокая температура - становится слишком жидкой. Чем это решается - фазовые переходы - гель-жидкокристаллическая фаза. Очень важно количество ненасыщенных жирных кислот в мембране. Количество двойных связей регулируют десатуразы жирных кислот. Двойные связи могут вводиться специфично. Они абсолютно специфичны как к месту десатуразы дельта 9,12, 18 омегатри. По отношению к длине жирной кислоты - абсолютно специфичные ферменты. Что делает: убирает атомы кислорода и получает двойная связь. Чаще по 9, 9 и 12, 9, 12 и 18 четыре двойные связи по 9, 12 и 18, и 6 положениям бывают гораздо реже. Это приводит к тому, что заворачивается хвостик кислоты, и чем больше заворачивается, тем более жидккая мембрана получается. Работу начинали с цианобактерий, известны все десатуразы, они называются дельта 9 - desC, дельта 12 -desA, дельта 15 - desB, дельта 6 - desD. Низкотемпературная индукция генов десатурации: если 34 градусов цельсия, то

desA, B, D отсутствуют. Когда 22 градуса - присутствуют. Показано Нозерном и Вестерном. Оказывается, считалось, что если снижается температура для высших растений, то десатурация происходит в местах синтеза жирных кислот, а там пластиды. А потом транспортируются и встраиваются. Оказалось, что количество десатураза повышается только в мембране. Показано и на антителах, меченых золотом, что чаще всего на плазмалеммной мембране происходит десатурация *in-situ* и восстанавливается жидккая структура при низких температурах. Показана роль мутаций по генам десатураз у синехоцистиса. Мутанты по desA/ desA не растут при низких температурах. Опыт: ввели ген десатуразы синехоцистиса в синехококкус. У него в мембране 18:1. В мембране появились кислоты 18:2, стал расти при низких температурах. Это – корректное доказательство того, что устойчивость к низким температурам определяется одним геном. Оказывается, сайт восприятия сигнала об изменении температуры - мембрана. Видимо, в ней работает транспортер ионов, который при жесткости сигналом является отсутствие транспорта ионов. Специализированная адаптация клеток к низким температурам: снижение температуры, уменьшение текучести мембран, восприятие сигнала сенсором, передача сигнала, индукция генов десатураз, синтез десатураза заново, десатурация липидов мембран, восстановление текучести, восстановление физиологической активности клетки. Это все необходимо выяснить во время стресс-реакции и запустить. Генная инженерия может доказать, что для акклиматации высших растений важна текучесть мембран и десатурация. Десатурация жирных кислот у растений: Есть десатурация по C16 (до двух двойных связей), C18 (обычно, до трех). У растений существует несколько вариантов десатурации жирных кислот и синтез, есть с ацилпринеющим белком, растворимая, мембранные, для растений характерно два варианта десатурации жирных кислот - пластидный и цитозольный. Если взять дельта 9 десатуразу из цианобактерии, сделать конструкцию и ввести ее в растение, то в два-три раза возрастает количество жирных кислот с двойными связями. Это приводит к тому, что растение в разы меньше повреждается при низких температурах по сравнению с контролем. Семена прорастают лучше, индекс повреждения меньше. С картофелем сделали аналогично. Не только делата 9, но и дельта 12. Листья при 9 градусов цельсия практически не повреждаются. Уровень супероксидазы и H₂O₂ практически не меняется. То же самое - с активностью СОД и образование радикальных форм кислорода. Механизм изменения текучести мембран приводит к широкому варианту и влияет не только на мембранные, но и на окислительный стресс. В результате десатуразы- трансгены предотвращают повышенную генерацию активных форм кислорода и каскадное развитие окислительного стресса. Защищает сами мембранные от действия повреждающих агентов, снижая интенсивность ПОЛ и степень деструкции важнейших полимеров. Так происходит специализированная адаптация.

Лекция 5. Сигнальные системы растений

Факторы регулирования судьбы клетки

В прошлый раз мы разобрали фитогормоны. Существует пять классических гормонов: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота, этилен, несколько кандидатов, и скорее всего, брацисиостероиды и жасмонаты - полноправные члены фитогормонального семейства, салицилаты и стриголактоны - под сомнением. Мы разобрали феноменологические вещи, их структуру, самое главное - концентрация активного фитогормона в данном месте, где он работает, в данной клетке, в данной области, она складывается из синтеза, для всех фитогормонов возможны альтернативные варианты синтеза, которые зависят от того, в каком месте это происходит, в какой ткани, в какое время онтогенеза и в каком виде растений. Альтернативность вариантов синтеза - один из характерных черт гормонов. Транспорт гормонов разнообразен, для разных гормонов по-разному, важно не только, как гормон поступает в клетку, но с какой скоростью и какими путями он уходит. Очень важно образование неактивных форм гормонов - конъюгатов. И деградация. Для фитогормонов характерно то, что они запускают целые программы, блоки развития растений и их работа зависит от того, где работает гормон, в какое время и с какими гормонами.

Взаимодействие гормонов в клетках

Очень важен crosstalk, переговоры гормонов. Примеры взаимодействия гормонов: в первый раз его показал Фольке Скуг, (первооткрыватель цитокининов). Показал, как выглядят культуры клеток в зависимости от того, какие гормоны находятся в среде. Если нет ауксинов и цитокининов, каллус не развивается. Если ауксины и цитокинины - в одинаковой пропорции, то наблюдается четкое деление клеток (мы говорили, что ауксины и цитокинины вместе выводят клетку из фазы G0 и начинается индукция деления). Если мало цитокининов и достаточно много ауксинов, то начинается ризогенез, образование корней, мало ауксинов и достаточно много цитокининов - начинается гемогенез - формирование побегов. Дальше стало больше исследований. Важно - не только одновременная работа гормонов. В процессе развития культуры клеток можно разными гормонами четко изменять судьбу и направление развития клеток. Есть дифференцированная клетка листа, стебля, любая живая. Если добавить сначала ауксины, потом - цитокинины (можно вместе), происходит процесс дедифференцировки и индукция деления. Это работает через специальную систему циклин-зависимых протеинкиназ, и происходит дедифференцировка и индукция деления. Затем можно регулировать рост клеток ауксином, но можно снять деления этиленом. Это приведет к увеличению размеров клетки. Затем можно гиббереллинами вызвать процесс растяжения, его можно заингибировать абсцизовой кислотой. Когда клетки находятся в цикле пролиферации, соотношением ауксинов и цитокининов можно вызывать разную дифференцировку клеток. Как ризогенез, так и гемогенез. Если действовать "тормозящими гормонами" - АБК, или этилен, то можно вызвать старение

клеток, лигнификацию, и этот процесс можно снять ауксинами и цитокининами. Фактически, разными комбинациями гормонов в процессе онтогенеза во время культивирования клетки можно управлять ее развитием. Это - показательный пример, каким образом гормоны на уровне клетки могут регулировать ее судьбу. Так же можно взаимодействовать не по времени, а одновременно. На уровне интактного растения можно делать, если есть один ауксин и плюс разные комбинации гормонов: только индолилуксусная кислота - как правило, ризогенез. Если добавить еще и гиббереллин, будет удлинение стебля. Цитокинин - рост боковых почек. Этилен - рост боковых корней. Это - феноменологическое взаимодействие гормонов. Сейчас в журналах любят рисовать схемы о том, что будет и каким образом взаимодействие гормонов может привести к разным вариантам развития проростков. Можно использовать генно-инженерные подходы, чтобы визуализировать взаимодействие гормонов. Есть искусственный элемент, чувствительный к ауксину - DR5. Если к нему добавить слитый зеленый белок GFP, то можно смотреть, что получается. Можно увидеть, что ауксин после добавления этилена очень сильно перераспределяется в стебле. Если одновременно будет взаимодействовать этилен, эпибрассиностероид и ауксин, то проростки будут сильно реагировать: самые разные изгибы. На основании таких экспериментов рисуют эти схемы, но они не очень информативны, потому что результат будет зависеть от того, где, когда и с чем взаимодействие происходило. Классический пример взаимодействия гормонов - мы говорили в прошлом году о регуляции клеточного цикла. Важно, что работают циклин-зависимые киназы, они могут активироваться разными циклинами, при регуляции клеточного цикла работают и ауксины (на циклин-зависимых киназах), и цитокинины (на циклинах), и брассиностероиды, прямое влияние жасмонатов, АБК. То есть, клеточный цикл регулируется не только ауксинами и цитокининами, все зависит от того, где происходит регуляция, когда, какие клетки, какой вид. Последнее, чтобы закончить феноменологию: обидно, что среди фитогормонов нет белков. Причина - клеточная стенка сильно ограничивает размеры сигнальных молекул, которые должны попадать внутрь клетки, она - довольно мощное препятствие. Когда искали, нашли, что пептиды тоже работают.

Белковые факторы – кандидаты в фитогормоны

Возможно, это - кандидаты в фитогормоны, возможно, система трансдукции, но белковые факторы активно работают в растительных клетках. Системины (название - от "системная устойчивость"): очень маленькие пептидики, 18 аминокислот, плюс-минус один, играют центральную роль в системе устойчивости растений против патогенов и неблагоприятных факторов. Образуются из просистемина - большой белок, 200 аминокислот, при необходимости работает специальная система, очень похожая на гормональную, когда из предшественника образуется активная молекула 18 аминокислот, они разные, сложно увидеть последовательность, скорее всего, играют роль физико-химические свойства, у табачных системинов можно найти похожие участки (содержат гидроскиптолин и гликозилированы). RALF - быстро

подщелачивающий фактор, 49 аминокислот, запускает МАР-киназный каскад - одну из сигнальных систем растения. Фитосульфокинны. Из названия понятно, что должна быть сульфогруппа. Пропептид из порядка 90 аминокислот, есть лидер, который направляет в нужные места, из него выделяются маленькие пептидики, 4-5 аминокислот, важно, что в них - сульфогруппы. Мощно регулируют пролиферацию (деление клетки). Белковые факторы CLAVATA3 - целая система, которая будет регулировать размер апикальной меристемы. Белковых факторов регулирования роста и развития растений достаточно много, насколько это гормоны - вопрос, пока это кандидаты, будем считать, что это - фактор регулирования.

Сопоставление гормонов животных и растений

Часто в публикациях пытаются сопоставить гормоны животных и растений. Аналогию можно провести - стероидные гормоны. С ауксином можно сопоставить мелатонин. Мелатонин работает и у животных, и у высших растений. Абсцизовая кислота похожа с ретиноловой, но функции совершенно разные. Жасмонаты и простагландины синтезируются одинаково. Для гиббереллинов, этилена и цитокининов соответствующей молекулы не найдено. Растения во многом похожи на животных, чаще всего сильно непохожи, сопоставлять не стоит. Это - феноменология гормонов.

Система восприятия и трансдукции сигналов в растениях

Общая схема

Как работает: растения - уникальный организм (автотрофность и прикрепленный образ существования). Есть много внешних факторов. Надземные: для фотосинтеза - углекислота, механические повреждения - ветер, патогены, животные, которые едят это растения, температура, подземные факторы - количество минеральных солей, аэрация в почве и т.д. Факторы меняются, на все (внешние и внутренние) надо реагировать. Складывается система, что реакция растений похожа на интегральную логическую схему. Есть входные сигналы, существуют исполнительные механизмы, это как-то логически обрабатывается, чтобы получить выход. Каким образом действует свет, салициловая кислота, жасмонаты, этилен, можно представить в виде схемы, в которой за каждым элементом будут стоять факторы транскрипции или какие-то белки. Результатом будет ответ на стрессы: образование патоген-ассоциированных белков, защитных соединений, образование структурных белков. Биохимики и генетики работают с одним белком, физиологи должны выявлять общую картину. Система восприятия и трансдукции сигналов в исполнении Бидструпа (Рис. 21): босс устраивает разнос подчиненному, подчиненный - помощнику, помощник - машинистке, та - помощнице, та - шоферу, шофер пинает собаку, собакакусает босса, когда он выходит на улицу. Эту систему можно взять как вариант биологической. Есть сигнал - "босс", подчиненный (должен воспринять сигнал) - рецептор, дальше важна система передачи и усиления сигнала - "вторичные мессенджеры", исполнительный механизм - ответ на сигнал -

"сердитая собачка". Правильно было бы, если бы заместитель устроил разнос не одному подчиненному, а десяти, каждый подчиненный устроил разнос десяти машинисткам. Важно не просто передача сигнала, но и усиление. Для биологических систем это - система вторичных мессенджеров, главное, что каждый из мессенджеров должен устраивать передачу сигнала не одному, а десяти двадцати следующим и «собак» должна быть не одна, а сотни три, пять. Система: сигнал, рецептор, чаще всего, фермент, система вторичных мессенджеров, ответ.



Рис. 21 Система восприятия и трансдукции сигналов в исполнении Бидструпа

Рецепторы клетки животных и растений

Повторим рецепторы, вторичные мессенджеры, отличия у животных и растений. Для животной клетки характерно три группы рецепторов. Это: G-белки (рецепторы, связанные с G-белками). Есть рецептор, на него садится сигнал, G-белки - тримеры, состоят из альфа, бета, гамма - субъединиц (для растений характерны мономеры) садятся на рецептор, на это садится GTF (сигнал так изменяет конформацию рецептора, что все это связывается), происходит гидролиз, отделение от тримера альфа-субъединицы с GTF, которая связывается с первым вторичным мессенджером. Чаще всего это - фермент, в таком виде становится активным, чаще всего это - фосфорилирование,

но не только, чаще всего это - киназа и фосфорилирует вторичные мессенджеры. Очень часто рецепторы - сами ферменты. Чаще всего - протеинкиназы, в данном случае без сигнала это - мономеры, которые не имеют активности, как только появляется сигнал (гормон, другой сигнал), образуется димер, фермент становится активным, киназой, фосфорилирует (может быть автофосфорилирование) связанные с ним вторичные мессенджеры. Третий вариант - рецептор - канал. Без сигнала канал не работает, с сигналом - открывается. Для растений третий вариант не очень характерен. Рецепторы растений (Рис. 22): похоже, но не совсем. Рецепторы с G-белками, скорее всего, есть, для цитокининов и АБК может быть. Не всегда для одного гормона есть один рецептор, чаще всего их несколько, скорее всего, G-белки - не тримеры, а мономеры, для их работы нужны еще белки. В общем, есть, но не главные. Киназы: для растений характерны. Есть разные. Серин-треониновые, в животных очень активно работают, для растений их - пара. Это - для брацциностероидов и возможно некоторых коротких пептидов. Для двух фитогормонов это - гистидинависимые киназы, для животных не характерны, есть у бактерий. У растений появились от цианобактерий, у них распространены.

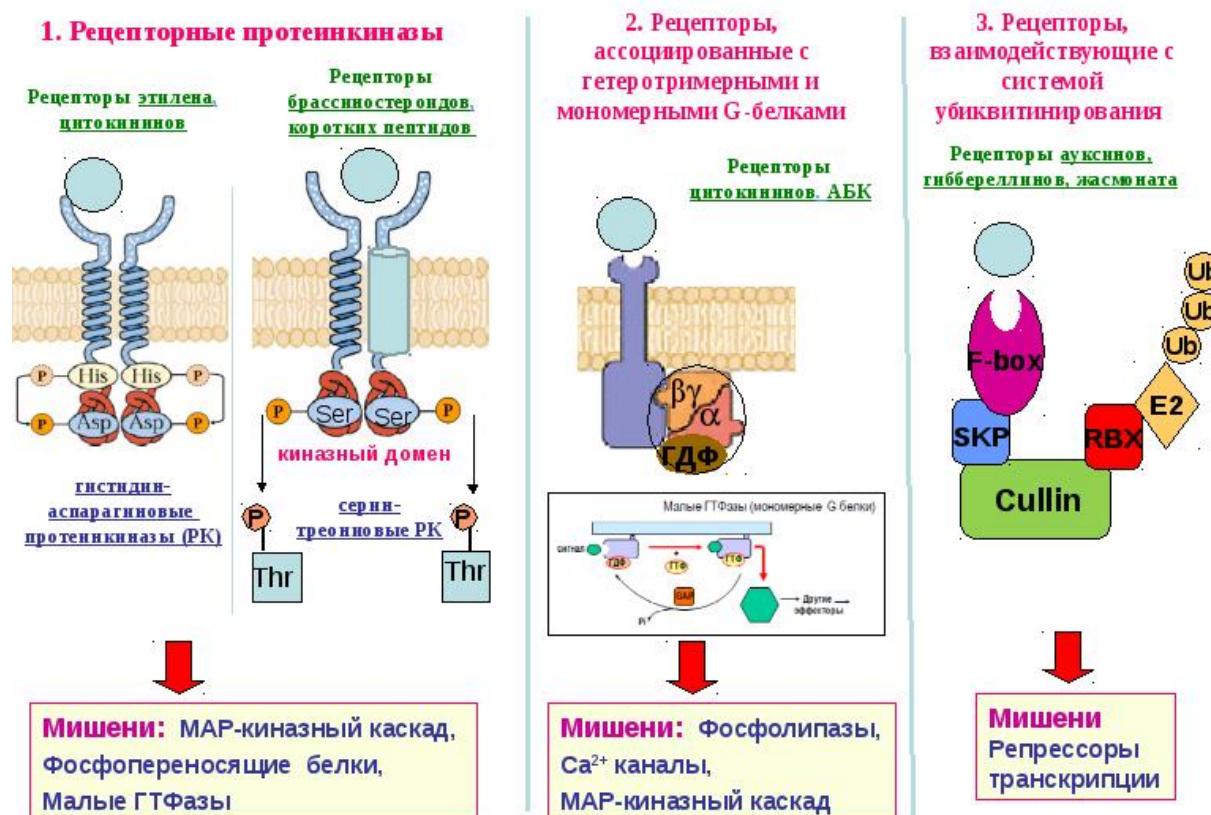


Рис. 22 Основные типы рецепторов растений

Уникальные для растений: как минимум три гормона имеют такой тип рецепторов - рецепторы, которые связаны с системой распада белков, ингибиторов. Фактически - рецептор является компонентом убиквитинЕ3лигазы. УбиквитинЕ3лигаза - фермент, который заставляет белки отправляться в протеасому. Убиквитины - метки смерти, которые навешиваются на белки, которые должны распасться до аминокислот в протеасоме. Рецепторы многих гормонов - компоненты убиквитинирующей системы. Это для животных не найдено, по крайней мере, для гормонов.

Вторичные мессенджеры сигналинга растительной клетки

Вторичные мессенджеры сигналинга растительной клетки (Рис.23). Передают сигнал от рецептора и его усиливают. Должны от рецептора получить сигнал, синтезироваться, их должно быть относительно много на один рецептор 10-20 и обычно появляются из хорошо известных предшественников, но есть нюанс. Циклическая АМФ. (сАМФ): АДФ, АТФ, АМФ хорошо известны, но тут они будут циклические. Цикличность делает их элементом системы передачи сигнала. Аналогично циклическая GMF (разные основания – разные системы передачи), циклическая ADF-ribose. То же самое основание, что АДФ,

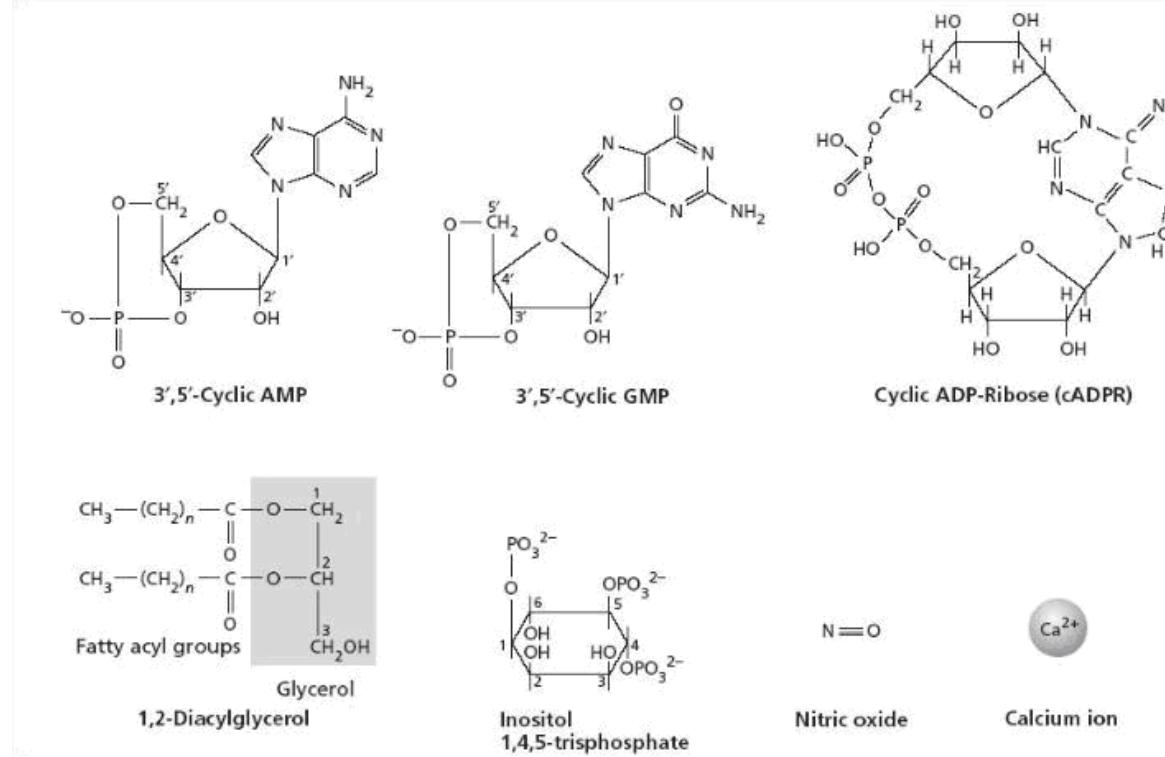


Рис. 23 Вторичные мессенджеры сигналинга растительной клетки

но к через фосфат к АМФ прикрепляется рибоза и замыкает конечный фосфат на аденин. Колossalный источник вторичных мессенджеров - липиды (мембрана). Часто рецептор сидит на мембране. Из диацилглицеридов, как от жирных кислот, так и от полярной

части, получаются вторичные мессенджеры. Инозитолтрифосфат, диацилглицерин их делает одна из фосфолипаз. Кальций, он известен как вторичный мессенджер и хорошо работает, с окисью азота - вопрос.

Примеры.

Аденилатциклазная сигнальная система

Аденилатциклазная сигнальная система хорошо известна для животных клеток. Есть рецептор. Если сработал сигнал, то G-белок отгидролизовался и связался с аденилатциклазой. Аденилатциклаза - фермент, который из АТФ делает сАМФ. сАМФ является сигналом для следующего этапа системы трансдукции сигнала. Это - протеинкиназа А. Она должна фосфорилировать, в норме неактивна, на ней сидит репрессор, как только садится сАМФ, репрессор уходит, киназа становится активна, фосфорилирует белки на ДНК, здесь сидят ингибиторы либо непосредственно трансфакторы, которые запускают транскрипцию, РНК либо ингибиторы. Важно, что фосфорилирование запускает или останавливает процесс транскрипции, фактически, генний ответ. Два этапа: сАМФ, протеинкиназа и факторы транскрипции, которые активируют считывание. Все просто, для растений такая классическая система, характерная для животных, долго была под вопросом, работает ли. Сейчас показано, что работает, но это - не первоочередная сигнальная система для растений. Источник первого вторичного мессенджера - аденилатциклаза и сАМФ.

Вторичные мессенджеры из диацилглицеридов

Но для растений очень характерно и распространено, когда получаются вторичные мессенджеры из диацилглицеридов - компонентов мембран. Это - глицерин, у которого два гидроксила ацилировано. Один, как правило, насыщенной жирной кислотой, другой - ненасыщенной в среднем положении, а третий - какой-то полярной группой, например, холин. Могут работать как минимум три фосфолипазы, которые могут отщеплять насыщенную жирную кислоту. Это фосфолипаза 1, ненасыщенную жирную кислоту - фосфолипаза А2, фосфолипаза С щепит таким образом, что от полярной группы остается гидроксил, а фосфат остается присоединенным к полярной части. Фосфолипаза Д, наоборот, оставляет фосфат оставляет при глицерине, отщепляя чистый полярный участок. Если работает фосфолипаза А насыщенная жирная кислота не всегда интересна, ненасыщенная - да. Более важна фосфолипаза А2. При ее работе получается лизофосфолипид и ненасыщенные жирные кислоты. Отсюда, если будет работать липоксигеназа, будет формироваться жасмонат. Лизофосфолипид и ненасыщенные жирные кислоты - тоже сигнальные молекулы, но после определенных модификаций. Если работает фосфолипаза С, образуется, например, фосфохолин, если будет инозид, то это будет фосфоинозитол, чаще будет инозитолтрифосфат и диацилглицерин. Если работает фосфолипаза Д, это будет фосфатидная кислота, очень мощный мессенджер и

нефосфорилированный холин, который тоже может быть мессенджером. Каждый из этих продуктов работы фосфолипаз может быть вторичным мессенджером.

Фосфоинозитольная сигнальная система

Работа фосфоинозитольной сигнальной системы: фосфолипаза С. Если полярной группой будет не холин, а инозитол, то в результате работы фосфолипазы С будет образовываться инозитолтрифосфат. Если это все фосфорилировано, то это будет фитин, который является запасом фосфора. Часто полезно запасать фосфор в таком виде. Если это будет инозитол, который фосфорилирован в трех правильных местах, (1,4,5-инозитолтрифосфат) то это будет мощнейший мессенджер. Фосфолипаза С может развалить не одну, а много молекул, инозитолтрифосфата будет много, инозитолтрифосфат работает с кальциевым каналом. Почему трифосфат: когда его нет, молекулы канала сдвинуты, на канале - положительно заряжены, садится инозитолтрифосфат, у него три отрицательных заряда на фосфатах, молекулы канала раздвигаются. Канал начинает работать. Фосфоинозитольная система - два мессенджера. Один - инозитолтрифосфат, другой - кальций. Кальций вываливается в цитозоль, в норме в цитозоле кальция минимум, 10^{-7} , 10^{-8} . В вакуоли, в клеточной стенке концентрация на 3, 4 порядка больше. Если вы открываете кальциевый канал, кальций валом проходит в цитозоль, дальше работает со специальным белком: кальмадулин, кальдесмон, которые могут работать с трансфакторами, запускать систему транскрипции. Если сАМФ-система для растений не превалирует, то кальциевая является основной. Почему - достаточно большое количество депо кальция. Вакуоль, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, везде миллимолярная концентрация в отличие от цитозоля. И клеточная стенка. Большое количество депо позволяет очень точно настраивать и работать. Важно не только, чтобы кальций попал в цитозоль, важно, когда он сработал, чтоб он и ушел из цитозоля. Насосы для растительной клетки Н-АТФаза - энергетика и кальциевая -АТФаза это - сигналинг. Когда открыли каналы, кальций попал в цитозоль, надо быстро убрать его потом, тут начинают работать кальциевые АТФазы. Более того, очень важно не только, сколько кальция попало в клетку, важно, где он попал и какая динамика попадания и увода кальция из клетки. Это позволяет очень точно настраивать сигналинг. Помимо того, если сработал инозитол в цитозоле, это кальциевая система сигналинга, диацилглицерин, который остался в мембране после того, как оттуда ушел инозитол — это тоже сигнал. Отщепив инозитолтрифосфат, вы, с одной стороны, запускаете одну кальциевую систему, цитозольную, растворимую, в мембране тоже работает сигнал. Диацилглицерин запускает диацилкиназу С, которая тоже может фосфорилировать несколько последующих киназ. Вторая часть после развала - тоже сигналинг. Если работает фосфолипаза Д, остается фосфатидная кислота, которая является мощным вторичным мессенджером. Она работает с абсцизовой кислотой, жасмонатами. Это - еще одна сигнальная система. Фосфолипаза А2 фактически дает ненасыщенные жирные кислоты. Лизофосфолипид тоже может быть связан с протеинкиназами это под вопросом. То, что ненасыщенные

жирные кислоты - предшественник жасмоната, мы уже знаем. Возможно, по этой причине ОДПА это может быть не только после того, как сработала липоксигеназа, ОДПА может уже сидеть, быть готовым в мембранах хлоропластов. Возможно, поэтому жасмонат - то ли гормон, то ли вторичный мессенджер. Очевидно, вторичный мессенджер, после того, как сработала фосфолипаза А2.

MAP-киназы

Одна из самых древних сигнальных систем - MAP-киназы. Название - от животных - mitogen-activated protein kinase. Рецептор - сам по себе – киназа (необязательно), активирует киназу верхнего уровня - MAP-киназы киназы. Это значит, что ее субстрат - не рабочий белок, а киназа второго уровня. MAP-Киназу-киназу второго уровня активирует киназу первого уровня, MAP-киназу, и только эта киназа фосфорилирует трансфакторы, активирует белки. Это - самая простая система усиления сигнала (MAP-киназа может активировать не одну киназу, а допустим десяток киназ второго уровня) Это - мощная система усиления, просто киназы разного уровня. Для арабидопсиса известно: 60 MAP-киназ верхнего уровня, 10 - второго, 23 - третьего. Получается сигнальная воронка. Мало того, что это - усиление, регулирование, тонкая настройка, возможен croostalk. Если есть одна киназная система, то может быть сигнал - сама киназа, но киназная система может запускаться для животных по крайней мере и рецептором, который связан с открытием-закрытием каналов. Эти MAP-киназы могут фосфорилировать не только свои киназы, но в определенных случаях киназы другого каскада. Возможно, это - те перекрестья сигналов, которые мы обсуждали. Вот это - MAP-киназная система — это одна из самых древних сигнальных систем.

Классификация сигнальных систем клетки

Что мы имеем в результате. Если это клетка, то какие сигнальные системы (рис. 24): Аденилат- циклазная. В нее входит: сАМФ, протеинкиназа, ФРТ - фактор регуляции транскрипции. MAP-киназная система. Три уровня киназы только что обсуждали. Фосфолипаза D: фосфатидная кислота (например, участвует в регуляции АБК), протеинкиназа, ФРТ. Фосфолипаза С, которая дает два каскада, вилку - инозитотрифосфатно-кальциевая система (ИФ3, Ca^{2+} протеинкиназа, ФРТ) и диацилглицерин, ПК, ФРТ. Эти четыре системы считаются наиболее древними, потому что в них нигде нет кислорода. Затем - фосфолипаза А2. Это - лизофосфолипиды (ПК, ФРТ), и жирные кислоты насыщенные, липоксигеназа, жасмонат, фосфатидные кислоты, (ПК, ФРТ). Здесь уже работает кислород. Очень распространена для растений, работает жасмонат.

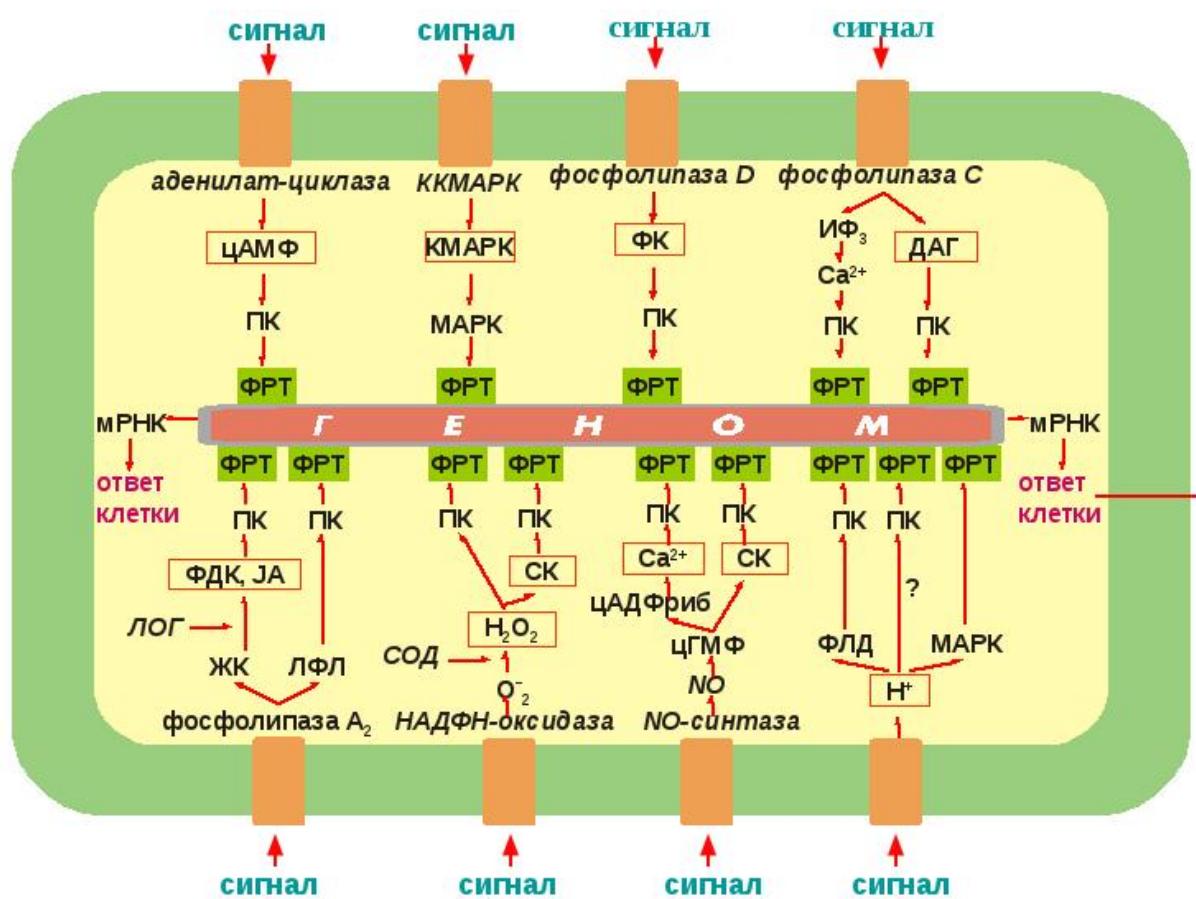


Рис. 24 сигнальные системы в клетках растений

NAFDH-оксидаза

Затем NADH-оксидаза. Казалось бы, нонсенс: NADF должен использоваться для энергии, восстановительных синтезов, тут просто NADH-H окисляется NADH-оксидазой. Зачем синтезировать NADH, чтобы потом его окислить? Оказывается, это связано с тем, что при этой работе NADH-оксидаза формирует сначала супероксид-анион, работает СОД, образуется перекись и активные формы кислорода - это очень важный момент метаболизма растительной клетки. С одной стороны, это плохо. Активные формы кислорода - опасно, вызывает многие деструктивные процессы. Растительная клетка превращает минусы в плюсы. Часто перекись водорода и активная форма кислорода участвуют в защите клетки от патогенов и от всего остального. Активная форма кислорода может еще выполнять сигнальные функции. Перекись водорода, что логично, часто появляется при стрессовых состояниях, патогенезе, при атаках. Перекись водорода является тоже сигнальным вторичным мессенджером. Исходным будет NADH-оксидаза, которая работает через супероксиданион, известно, что работает через салицилат. Здесь - система, похожая на фосфолипазу A2, если жасмонат мы считаем

фитогормоном. Показано, что салицилат активируется перекисью водорода, и сама перекись водорода может активировать некоторые гены. Это чаще всего работает, когда идет стресс (либо патогенез). Так что либо жасмонат можно относить ко вторичным мессенджерам, либо подумать о том, чтобы салицилат отнести к гормонам.

NO-синтаза и NO

Самая проблемная сигнальная система: NO-синтаза и NO. У физиологов животных - одна из самых мощных регуляторных молекул, широко обсуждается. У растений показано, что NO есть. Показано, что работает через C-ADF-рибозу, через D-GMF, через кальций, салицилат. Самое большое, но - до сих пор присутствие NO-синтазы у растений не доказано. Это ставит большой вопрос. У животных - работает. У растений NO есть. Бурно обсуждается: то ли NO образуется в результате азотного метаболизма, то ли NO - побочный продукт разных ферментов, включая нитратредуктазу, нитритредуктазу и результат окисления каких-то азотсодержащих веществ. Если нет специальной системы, его производящей, как NADF-H-оксидаза, насколько можно считать, что это регуляторная молекула, а не какой-то стрессовый сигналинг. Сейчас - вроде все есть: и система трансдукции сигнала, и усиление, а откуда берется NO, сейчас обсуждается. По крайней мере, для растений не доказано, что есть NO-синтаза.

Протоны

Для симметрии есть предположение, что протоны могут участвовать в регуляции. Но - совсем под вопросом. Сигнальных систем достаточно много. В работе фитогормонов они будут задействованы и это - еще одна сложность. Это - подготовительный этап, чтобы понять, как работают сигнальные системы растений, далеко не все.

Чтобы понять, как работают фитогормоны, нам осталось рассмотреть два момента из общего образовательного курса. Как происходит деградация белков и про микроРНК - важный момент в биологии развития.

Система убиквитинирования

Убиквитины - специфичные метки "смерти". Маленькие белки 76 аминокислот. Их основная задача - если белок нужно уничтожить, на него стандартно навешиваются убиквитины - не один (вдруг это случайно), а, как правило, не меньше трех-четырех. Для этого работает специальная система. Сначала маленькие белки-убиквитины активируются специальным убиквитин-активирующим ферментом E1, который сажает на себя убиквитин. Потом навешенный на E1 перемещается на один или несколько убиквитин-связывающих ферментов (E2). Центральный момент - E3-лигаза, которая осуществляет убиквитинирование белка-смертника. В одном месте она присоединяет к себе E2 белок с убиквитином, в другом - белок-смертник, и дальше на него перебрасывает убиквитин. За несколько циклов E2 меняется, получается цепочка убиквитинов, этот белок благополучно отправляется в протеасому. Оказывается, что для

растений разрушение белков посредством убиквитинирования - один из основных механизмов регулирования всей жизнедеятельности растений. Стратегия жизнедеятельности растений - здесь идет не на активацию, даже работа гликолиза хитрая гегуляция в отличие от животных- выключение фермента. Оказывается, и ауксины, и жасмонаты, и гиббереллины - рецепторы этих фитогормонов являются компонентами убиквитинE3лигазы. Регулирование направлено не на синтез чего-то, а на развал ингибиторов. И другие системы - этилен (работает компонентом трансдукции сигнала, АМ3 будет разваливаться), развитие цветка, старение листьев, работа фоторецепторов - большое количество механизмов регулирования. Центральный момент - УбиквитинE3лигаза - везде SCf-факторы. По первым трем буквам. Оказывается, убиквитинE3лигаза (В ней присутствуют как минимум три белка -Cul1 (кулин), F-box, Skp1 – состав Scf-фактора) на самом деле состоит минимум из четырех белков и как минимум один из них может быть сигнальным рецептором. Это - яркое отличие фитогормонального регулирования растений от животных. Работа через "мусоросжигающую" печь в 26S протеасому.

MiRNA

Последняя преамбула - в конце прошлого века были открыт целый мир малых мРНК, через 15 лет за это получена Нобелевская премия, сейчас можно предположить, что формула Энгельса, что жизнь - форма существования белковых тел не совсем правильна. Белки - хорошая машина. "Серый кардинал" - РНК. Спирин говорит, что РНК - стартовая молекула. Одна из главных молекул, серый кардинал многих процессов. В данном случае странно было бы, если бы система регулирования не была задействована на РНК. Действительно, мРНК делятся на две группы. Малые интерферирующие РНК и микроРНК. Малые интерферирующие РНК - в основном, система защиты. РНК-интерференция - процесс подавления экспрессии генов на стадии транскрипции, трансляции, дезаденилирования или деградации мРНК при помощи малых молекул РНК. Малые интерферирующие РНК способны осуществлять направленную деградацию или блокировать трансляцию РНК определенной последовательности и участвовать, таким образом, в защите клетки от вирусов, репрессии трансгенов и подавлении экспрессии мобильных генетических элементов. Связываются либо с нормальными матричными РНК, либо в процессе транскрипции РНК, если на какой-то участок села miRNA, это либо не транслируется, часто является сигналом для раз渲а, работа нуклеаз, иногда это будет работать на уровне трансляции. Это - довольно мощный ингибитор глобального биосинтеза белка. Здесь miRNA не очень интересна, потому что в данном случае это - очень мощный фактор иммунитета. Их предшественники - чужеродная ДНК либо РНК, которые попадают в растения, в частности вирусы, фактически - система защиты от внешних патогенов. Нам будет интересно микро РНК. miRNA - посттранскрипционные репрессоры экспрессии генов, и они предсуществуют. Это - интегральная система регулирования и развития. Очень маленькие, 21-23 нуклеотида, формируются из первичного транскрипта порядка 70 нуклеотидов. У арабидопсиса около сотни локусов

пред-микро-РНК. Любопытно, что у растений похоже, но отличается от животных. Как происходит у растений: есть пре-miRNA. У животных Dicer (шинкующий, нарезающий кубиками), у растений - не Dicer, а Dicer-like (DLPs). Он ее режет. МикроРНК садятся на матричную РНК, будут образовывать комплекс. Более подробно: исходно в геноме большие pri-RNA, порядка 1000 нуклеотидов, дальше работает комплекс, DROSHA в который входит белок PASHA и эндонуклеаза Dicer или DLPs. В конце концов пре-miRNA нарезается на 22-23 нуклеотида, это все происходит в ядре, после все переходит в цитозоль. Там находится белок AGO1 (Argonaut), их несколько, который имеет РНКазу. Если miRNA связывается с мРНК, то РНКаза белка AGO1 (есть каталитический центр RISK) будет это разваливать. Самое важное - другое. Это - эндогенно присутствующая, нормальная система регулирования развития. Около сотни, половина известных факторов транскрипции могут регулироваться через микроРНК. Они могут переключать программы развития, участвуют в эмбриогенезе, в цветении, это - еще один очень мощный, параллельный (есть сигнальные системы, которые запускают синтез, их конечная мишень - нужные гены). А это - другая параллельная система через работу на более высоком уровне - транскрипции и начала трансляции практически все программы развития, в том числе гормональные сигналы, будут работать таким образом. Пример - МИВ-факторы транскрипции - семейство белков, которые могут регулировать мРНК, разваливая их. Это - конкретные гены, эмбриогенез развития листа. Процессинг и активность miRNA регулируется сами собой. Более всего интересно, для ауксиновой сигнальной системы развития корня ARF-факторов транскрипции есть соответствующие miRNA. Существуют микроРНК, которые регулируют АБК-сигналинг. Это - еще одна мощная регуляторная система, которая взаимодействует и дополняет стандартный сигналинг.

Рецепторы фитогормонов

Критерии рецептора

Теперь можно говорить о том, чтобы говорить о механизме работы тех фитогормонов, о которых мы знаем. Рецептор: чтобы установить, что за рецептор работает, он должен отвечать набору каких-то характеристик. Должен высокоаффинно и обратимо связываться с сигналом (с гормоном). Связался прочно - не рецептор. Должен работать с низкой концентрацией. Вызывать специфические ответы. Его ингибиция или нарушение должно нарушать сигналинг. Если набор критериев выполнен, это не значит, что вы нашли рецептор.

Рецепция ауксина

Должен был быть комплекс доказательств. 10 лет назад был белок-кандидат ABP1 - ауксин-связывающий белок 1. Были плюсы и минусы: относится к семейству G-протеин-связанных рецепторов, должен быть рецептором. Относительно небольшой, 22 кДа, у кукурузы - пять генов. Дальше - странно. На N-конце сигнал транспорта в

эндоплазматический ретикулум, тогда считалось, что рецептор должен сидеть на плазматической мемbrane. На С-конце - KDEL-последовательность, которая все зякоривает в эндоплазматическом ретикулуме. С другой стороны: сайт связывания с ИУК, обратимо, высокоаффинно, существует еще гликозилирование. Было удивительно: 90% белка сидит в эндоплазматическом ретикулуме. Вроде рецептор, но зачем он там? Активно обсуждалось, что рецептор может быть непосредственно транспортер. Считалось, что процесс входа и выхода ауксинов может быть сигналом. Поскольку транспортер, то неясно, что с системой вторичных мессенджеров. Затем нашли 60 кДа АБП-связывающий белок. Оказалось, что это - гликозидаза цитокининовых конъюгатов. Получается, через него может быть осуществлен crosstalk гормонов. Переговоры - хорошо, но не было понятно, где специфичное действие ауксинов. Обсуждали глютатион-5-трансферазу, ауксин-связывающий белок 27 кДа, маленький белок, который участвует в окислительно-восстановительных реакциях. Не совсем так, контролирует уровень глютатиона, влияет на уровень жасмонатов, перекиси водорода. Опять krosstalk, но нужна специфика. Тогда обсуждалось, что рецептора как такового одного нет, очень много рецепторов и на каждое действие есть свой рецептор. Вот уровень десятилетней давности. До тех пор, пока не нашли то самое относительно развала в 26S-протеасому. Что послужило и как получилось, что все это работает - система рецепции ауксинов. Помимо поиска рецепторов искали ранние ответы на ауксины. Оказалось, что очень быстрые и ауксин-зависимые вещи - семейство белков, они называются AUX/IAA. Они - очень короткоживущие, возможно, работают в ответ на ауксин и ядерно локализованные. Затем было установлено, что существует так называемый ARF - auxin-respons-factor (ауксиновые факторы транскрипции), которые могут активировать работу генов, которые ответственны за реакцию ауксина, их более двадцати. Когда посмотрели их структуру, оказалось, что у них есть обязательная система димеризации они могут димеризоваться между собой и ARF. Что ARF-очень мощный трансфактор ауксинов. Если он один сидит на ARE (auxin response element, в регуляторном участке генов - как раз тот элемент, который связан с трансфактором, а ARF - трансфактор, то очень активно активируется транскрипция генов, которые являются продуктом ауксинового сигналинга. В норме, когда нет фитогормона, ARF сидит, на нем сверху сидит белок AUX/IAA мощный ингибитор транскрипции. В норме получается, что все гены ответа на ауксин заингибираны. Там сидит ARF-фактор транскрипции, на нем - белок AUX/IAA. Получается следующее: что есть убиквитин e лигаза SF-фактор. В ней есть белки: кулин, ASK, RBX1 но есть еще белок TIR-1 (transport inhibitor response). Оказывается, в этом виде без ауксина лигаза неактивна. Тир 1 имеет очень высокое сродство к ауксину, обратимое. Фактически он является рецептором. Было удивительно. Как только появляется ауксин, он связывается аффинно с TIR-1-фактором и тогда этот лигандный комплекс становится активным. Он начнет работать, но его мишенью является белок AUX/IAA, который является ингибитором транскрипции ауксиновых генов, и он навешивает на ингибитор убиквитин, отправляя их в протеасому. Рецептор стал понятным - рецепторы фитогормонов являются

компонентами убиквитин-лигазного комплекса. В норме есть гены ответа на ауксин, на них сидит ARF-фактор, но он заингибиран белком AUX/IAA. Существует SF-TIR-1 - убиквитинлигазный комплекс, но он не активен без ауксина. Как только на него садится ауксин, он становится активным. Его мишенью являются AUX/IAA белки. Они убиквитинируются и отправляются в протеасому. Все ингибиторы развалились, ARF освобождается, если их двое, то еще лучше, и начинается транскрипция. Это - случай, когда рецептор снимает ингибирирование. Оказалось, основная идея, что рецептор не один - правильная. АБП-1 – скорее всего, тоже рецептор. Существует быстрый и глобальный ответы. АБП-1 - система быстрого ответа. Понятно, почему их много 90% и в ЭПР и 10%- на плазмалемме. Один из очень важных ответов на ауксин - кислый рост (очень активная работа Н-ATFase плазмалеммы) оказывается, что глобальный ответ: ауксин попадает в цитозоль, в ядро, в ядре работает убиквитин-лигазный комплекс, идет на деградацию ингибитор, и начинается транскрипция. Транскрипция - самых разных глобальных генов ответа на ауксин, в том числе Н-ATFаз. Дальше все нормально. Транскрипция, Н-ATFаза, она идет в плазмалемму и там начинает работать. Но это - медленно. А быстро - существует довольно много Н-ATFазы, которая сидит в эндоплазматическом ретикулуме. Она может быть и в плазмалемме, довольно много, но нужно повысить ее активность. Что получается с одной стороны: АБП-белок, когда с ним связывается ауксин (глобальный ответ), активирует транспорт предсуществующей АТФазы в плазмалемму и тем самым повышает ее активность, второе - стабилизирует те самые Н-ATFазы, которые уже сидят в плазмалемме. Получается параллельная работа. Быстрая через предсуществующую Н-ATFазу. Так же работают многие другие гены ответа на ауксин. Поэтому быстрый ответ - стабилизация Н-ATF-аз в плазмалемме, через АБП - (ауксин биндинг протеин), активация выхода из ЭПР в плазмалемму и наконец, глобальный ответ через другой рецептор, в том числе синтеза ауксина. Помимо того, видимо АБП, который находится и в плазмалемме, и в ЭПР,.... запускает через G-белки фосфолипазу А2, то есть, получается веер. Еще один вариант сигналинга через G-белки. Через АТФазу напрямую, а через фосфолипазу А2 - опять же веерная работа, что очень характерно для для фитогормонов. Это - то, что известно про рецепцию ауксина.

Рецепция Гиббереллинов

Оказалось, что легко рассмотреть систему гиббереллинового сигнала. Оказалось, похоже с точностью до компонента. Гиббереллиновый сигналинг работает точно так же. Гиббереллин и системы, которые выключают работу убиквитинов, были одни из мощнейших механизмов зеленой революции. Было важно получать низкорослые сорта злаков. Самая большая проблема для злаков – полегание. Когда ветры - невозможно убирать. Селекционеры использовали ингибиторы высокорослости, Della -белки (по пяти аминокислотам однобуквенного кода). Оказалось, что они характерны для многих низкорослых очень продуктивных сортов и являются очень мощными ингибиторами ответа гиббереллинов. Работают точно так же, как с ауксинами. Для тех генов, которые отвечают за гиббереллин, есть трансфактор гиббереллинов. В генах-мишениях

гиббереллинового сигнала существует либо гиббереллин-ответственный элемент (Рис. 25), либо комплекс элементов.

В генах-мишениях: в промоторной области (-289)
- GARE или GARC
• **GARE:** часто
UTAACAUANTCYGG (N
- A/G, Y - C/T)
• **GARC:** три участка:
пиrimидиновый (-171),
ТААСААА- и ТАТССАС
(-115)

Рис. 25 Гиббереллин-ответственные элементы в генах-мишениях

Известна их последовательность, иногда бывает три участка. Факторы активации транскрипции хорошо известны, активирующие ответ на гиббереллиновый сигнал. Они садятся на эти участки. Оказывается, что Della-белки – мощные ингибиторы гиббереллинового сигнала - не что иное, как, ингибиторы, которые садятся на трансфакторы и запрещают работу гиббереллинов. Дальше все с точностью до молекулы. В норме, когда нет гиббереллинов, все гены ответа заингибираны этими Della-белками. Как только появляется гиббереллин, опять же убиквитинЕ3лигаза, она будет иметь название Sf-gik. gik-2-второй компонент лигазного комплекса (есть еще gik-1, присоединяется ко второму, который не работает без гиббереллинов). Как только появляется гиббереллин, убиквитинЕ3лигаза становится активной, убиквитинирует Della-белки, которые отправляются в протеасому и работа гиббереллиновых генов активируется трансфакторами. Вот уже два гормона, которые регулируются убиквитинированием ингибиторов. Есть третий, про который точно доказано, жасмонаты, но о них чуть позже. Дальше - тоже похоже. Сигнальная система гиббереллинов, как и ауксинов, не единична. Существует несколько рецепторов. Плазмалеммный рецептор неизвестен, предполагается. Известно, что есть два параллельных пути трансдукции сигнала. То, что мы разбирали, прямое действие гиббереллинов. Рецепторы ядерной локализации, которые мы только что смотрели. УбиквитинЕ3лигазный комплекс, который взаимодействует с гиббереллином, снимает убиквитинированием ингибитор, дальше начинается транскрипция генов гиббереллинового ответа. Транскрибируются не сразу рабочие гены, а чаще всего этим комплексом начинается синтез трансфакторов первого уровня. Для гиббереллинов очень

важна работа так называемых GAMIV-генов (в прошлом году говорили о факторах и особенностях ядерного генома у растений). Для гиббереллинов очень характерна система через МВ-систему трансфакторов (GA - gibberelline activated), сначала активируются трансфакторы, потом они активируют второго уровня - рабочие гены, получается двухуровневая система: убиквитин лигаза активирует трансфактор гиббереллинового ответа, трансфактор активирует рабочие гены. Это - одна ветка. Что интересно - скорее всего это напрямую - активация убиквитин-лигазного комплекса, прямая ядерная рецепция гиббереллина. Но там еще есть f-бокс, скорее всего, плазмалеммный рецептор быстрого ответа гиббереллина работает через G-белки. То ли через тримерные, то ли через мономерные, здесь получается вилка. Получается сеть. Это - прямая ядерная рецепция гиббереллинов. Но когда сработал плазмалеммный рецептор, с одной стороны F-белок, который входит в комплекс, убиквитин-лигазы, здесь получается двойное активирование. Вторая часть - кальций-зависимая система, которая будет, минуя глобальную ядерную систему (быстрый ответ) напрямую будет работать в том варианте, который про гидролазы, когда нужно быстро активировать прорастание. Надо конкретно активировать гидролиз крахмала. Это скорее всего будет работать через плазмалеммный рецептор быстрого ответа. Это будет активно способствовать образованию амилазы и потом гидролизу крахмала. Здесь - та же закономерность. Как минимум два рецептора - для гиббереллинов и для ауксинов. Работа в параллель. Система быстрого ответа и система глобального ответа. Очень часто они будут дублировать друг друга, и система быстрого ответа будет миновать транскрипционные факторы. Вот - две необычных системы рецепции для ауксинов гиббереллинов и (забегая вперед) жасмонатов. С ауксинами было сложно, потому что нет мутантов по ауксину. Они нежизнеспособны. Исходно первым рецептором этилена был найден - мутант по этилену. Etr1, проросток не давал тройной ответ.

Лекция 6. Рецепция фитогормонов

Рецепторы – убиквитинЕ3лигазы

Рецепция ауксинов и гиббереллинов коротко

В прошлый раз начали разбирать систему рецепторов фитогормонов и разобрали ауксины и гиббереллины. Помним, что для растений очень специфична система рецепции и трансдукции сигнала. Рецепторы ауксинов и гиббереллинов - компоненты важной системы убиквитинирования (убиквитинЕ3лигаза, которая состоит из нескольких белков - кулин, F-белок и Ask-компонент). Это - система, которая делает развал ненужных белков в клетке. Она навешивает очень короткие белки убиквитины на белок-“смертник” и если на него навешано больше трех-четырех убиквитинов, то это - метка для отправления “смертника” в протеасому. Оказалось, что рецепторы ауксинов - белок, который входит в SF-комплекс, белок TIR1, который без ауксина делает весь комплекс неактивным, когда с ним связывается ауксин, становится активной убиквитинЕ3лигаза, ее задача - проубиквитинировать репрессоры трансфактора ARF ауксинов. В норме для растений гены-мишени, которые должны активироваться за счет работы ауксинов, зарепрессированы. На них сидит трансфактор, на него садится его ингибитор, в норме они не работают. Когда появляется ауксин, становится активна убиквитинЕ3лигаза, ее мишень - репрессоры - белки AUX/IAA 23-24 кДа, их около 24 штук, которые убиквитинируются и отправляются в протеасому. Таким образом открывается фактор транскрипции и запускаются ауксин-регулируемые гены. Сигналинг фитогормонов - очень активно разрабатываемая область физиологии растений. Скорее всего, рецептор не один и существуют рецепторы глобального ответа, которые связаны с дерепрессией de-novo синтеза нужных белков, транскрипции, и соответственно это - глобальный ответ. Но существуют рецепторы быстрого ответа. ABP1 (ауксин-связывающий белок 1), в норме его подавляющая часть находится на эндоплазматическом ретикулуме, приличная часть находится на плазмалемме. Когда ауксин связывается с рецептором быстрого ответа, то активируется транспорт НАТФазы, (стандартный ответ ауксина кислый рост), которая существует на эндоплазматическом ретикулуме, стабилизируются АТФазы, которые сидят на плазмалемме, быстрый ответ - минуты, десятки минут на ауксины - эффект кислого роста. Скорее всего, это может работать через G-белки, через фосфолипазу А2 может работать с рецептора быстрого ответа. Второе - калька с работы ауксинов - сигналинг гиббереллинов. Абсолютно аналогичная система. Хорошо известны репрессоры, есть мутанты по ним, так называемые Della-белки, которые работают точно также. Есть система ответа на гиббереллин. Хорошо известна промоторная область: гиббереллин-ответственный элемент, рибо-комплекс, три участка, на них сидят факторы транскрипции, в норме они заингибитированы Della-белками. Такая же убиквитинЕ3лигаза (SF – не TIR1, а GIK1), не работает без гиббереллинов. Когда появляется гиббереллин, она становится активна, абсолютно аналогично убиквитинирует Della-

белки-репрессоры, отправляет их в протеасому и начинается транскрипция генов, которые ответственны за сигналинг гиббереллинов. Аналогично с ауксинами, скорее всего, для гиббереллинов тоже существует не один рецептор, сейчас описан рецептор глобального ответа. Видимо, существует не одна система с убиквитинЕ3лигазой, параллельно может быть рецептор (еще не охарактеризован) который связан с G-белками, есть данные, что эта же система глобального ответа параллельно активируется и F-белком, это другой компонент убиквитинЕ3лигазного комплекса, который активируется другим рецептором. Есть рецептор быстрого ответа, который не задействован через глобальный ответ, а напрямую связан с активацией амилаз (гиббереллин регулирует процесс прорастания семян). Еще тонкость – глобальный ответ запускает не сразу рабочие гены, а сначала трансфакторы (для гиббереллина характерна система М1В-трансфакторов, сначала запускаются трансфакторы, они могут запускать рабочие гены гиббереллинов.

Рецепция жасмонатов

Третий гормон, который работает точно так же – жасмонат (гормон или не гормон), образуется через систему липоксигеназ, из предсуществующих в хлоропластах мембранных триацилглицеридов. В норме гены, которые должны активироваться под воздействием жасмоната, на них сидят факторы транскрипции М1С, и они тоже занизированы комплексом ингибиторов. Главные ингибиторы – JAZ-белки (JA-ZIM domain containing proteins) содержат цинковые пальцы. Цинковые пальцы могут связываться с факторами транскрипции и прекращать их работу. NINJA – Novel interactor of JAZ – новые взаимодействующие с JAZ, TPL – TOPLESS (Groucho/Tup1 type corepressor). Это – комплекс ингибиторов, могут работать как в комплексе, так и порознь, в норме полностью закрывают гены, которые ответственны за работу жасмонатов. Генов JAS достаточно много, есть JAS-участки и цинковые пальцы, ингибируют разные гены, ответственные за индукцию жасмонатов. Аналогично, есть специфическая убиквитинЕ3лигаза, как для ауксинов и гиббереллинов, будет COI1 название по мутанту *coronatin insensitive 1*. Коронатин-нечувствительный мутант. Коронатин – мощный токсин, его продуцируют бактерии, открывает устьица, которые в норме при патогенезе закрыты. Это – еще вариант, когда патогены используют нормальную систему гормонально сигналинга растений в качестве оружия. Оказалось, что мутант по нему нечувствителен к жасмонатом. УбиквитинЕ3лигаза COI1, гомологичная с ним, делает тоже самое. Если нет жасмоната – ничего не происходит. Появляется жасмонат – за счет активации убиквитинЕ3лигазного комплекса ингибиторы отправляются в протеасому, начинают работать жасмонат-индуцированные гены. Стали пробовать разные жасмонаты, оказалось, что с убиквитинЕ3лигазным комплексом связываются не свободные молекулы, а жасмонат, конъюгированный с аминокислотой, изолейцином. Обсуждается, что есть – другие рецепторы жасмонатов, или, чтобы жасмонат был активен, он должен связаться с аминокислотой, изолейцином. Структура коронатина

стерически близка к жасмонат-изолейцину. Не исключено, что патогены используют молекулярную мимикрию, чтобы воздействовать на растение.

Есть около десятка фитогормонов, три работают по совершенно аналогичному механизму, сильно отличающемуся от нормального сигнала у животных клеток (Рис.26). Запуск ответа на фитогормонах: снятие репрессора. В норме гены ответа, целевые, зарепрессированы специальными белками, там сидит трансфактор, зарепрессирован, и receptor фитогормона активирует убиквитинлигазную систему, E3лигазу, которая специфично (для гиббереллина одна E3лигаза, для ауксина вторая,

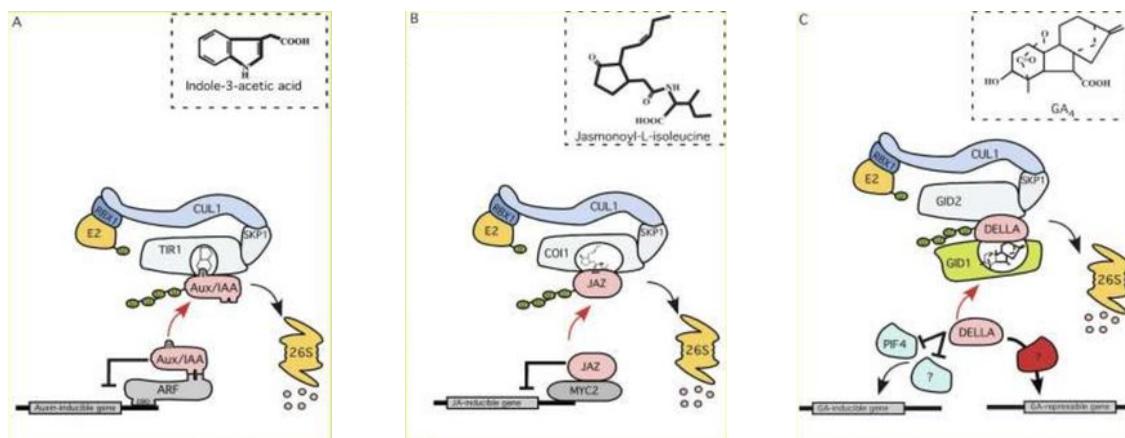


Рисунок 26. Receptory, работающие на основе убиквитин-Е3лигазы

для жасмоната третья), навешивает на ингибиторы убиквитины, отправляет их в протеасому и тем самым активируются целевые гены ответа на фитогормоны. Это - относительно специфичная система. Три фитогормона работают так. Рецепторы - протеинкиназы

Рецепторы изучать сложно. Идеально, если есть методы прямой, обратной генетики, протеомика. С этиленом повезло, *etr1* – etilen resistanse мутант арабидопсиса послужил открытию первого рецептора фитогормонов по этилену. Оказалось, что система логична, но имеет свою специфику. Хорошо известно, что одни из мощнейших систем регулирования активности белков – фосфорилирование. Есть специальные ферменты, которые называются протеинкиназы, которые в ответ на какой-то сигналинг фосфорилируют нужные белки. Рецепторами могут быть белки, которые уже являются ферментами. В норме, когда нет сигнала, фермент, чаще всего протеинкиназа, неактивен, когда приходит сигнал, после связывания с сигналом таким образом меняется конформация, что он становится активным. Существует несколько вариантов киназ: серин-треониновые распространены у животных, есть гистидинкиназы (Рис. 27), которые – самая простая система рецепции трансдукции сигнала (Рис. 28). Они характерны для микробов, для животных гистидинкиназа не обнаружена, система – простая. Существует receptor – гистидинкиназа, нет сигнала – неактивен. Садится сигнал – в данном случае – фитогормон, изменяется гистидинкиназа (забегая вперед,

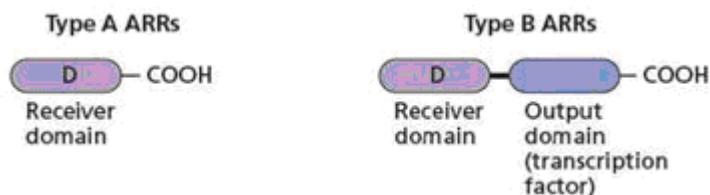


Рисунок 27. Гистидинкиназы. ARRs – регуляторы ответа (*Arabidopsis response regulator*)

происходит димеризация). В димерном виде они становятся активны, киназой, фосфорилируется гистидин. После того, как киназа стала активной, она фосфорилирует второй компонент трансдукции сигнала. Фактически – белок ответа, *respons regulator*, который без фосфата неактивен, с фосфатом активен. После этого фосфорилируется трансфактор. Трансфактор или садится на ДНК, или становится активен. Обычно (для микробов) рецептор сидит на мембране, входной домен торчит

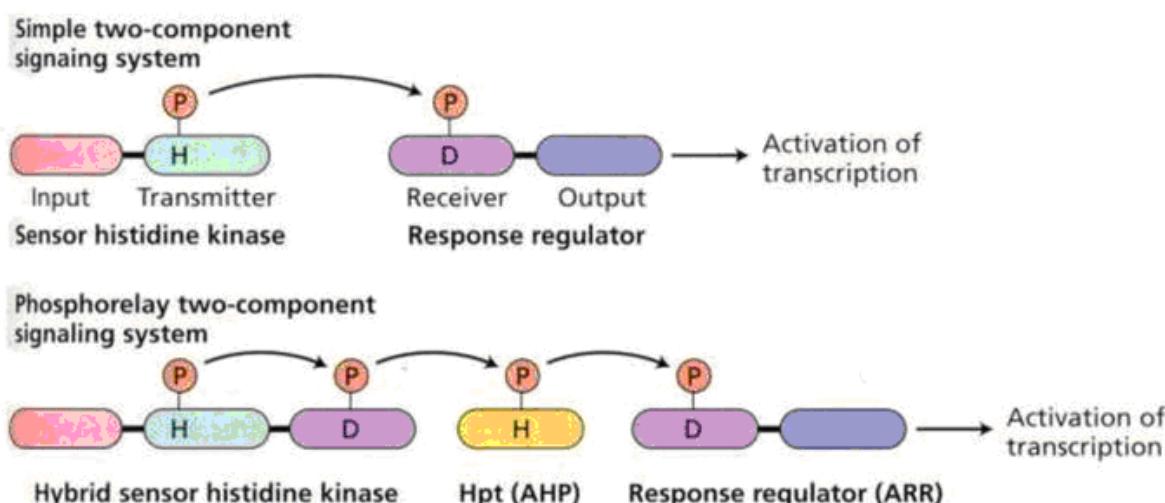


Рисунок 28 Трансдукция сигнала в двухкомпонентных системах. *Hpt* – гистидин-фосфотрансферный белок, для арабидопсиса – *AHP*. *H* – гистидин, *D* – аспартат

из клетки, все несколько раз пересекает мембрану, фосфорилирующая часть находится в клетке. Когда receptor взаимодействует с сигналом, респонс-регулятор подходит к активной киназе, фосфорилируется, идет на ДНК и запускает ответ. Для эукариот – сложнее. Клетка на порядок больше, компартментализована, быстро от мембраны до ядра не доберешься. Эту систему растения получили от цианобактерий, она трансформировалась. Двухкомпонентная система превратилась в трехкомпонентную. Рецепторный участок оказался слит с ресиверным доменом. Получилась более сложная система. Когда после взаимодействия (чаще всего на плазмалемме) с сигналом фосфорилируется гистидин, тот же самый фосфат переходит на ресиверный участок, чаще всего на аспарагин, это становится киназой. Появляется промежуточный участок, дополнительный переносчик, фосфотрансферный белок, он переносит фосфат к ядру, ресиверный белок взаимодействует с ДНК в ядре. Система усовершенствована для

эукариотической клетки, но принцип тот же самый. Добавился только промежуточный фосфотранспортный белок. Регуляторы ответа ARR – регуляторы цитокининов, их много – более 20 штук и два типа. У одного ресиверный домен, у другого – ресиверный домен и участок связывания с ДНК (это может быть трансфактор). Это – принцип работы гистидинкиназ, которых нет у животных, но они есть у растений и прокариот. Оказывается, у двух гормонов – цитокинина и этилена рецепторы – гистидинкиназы (Рис. 29). Они хорошо изучены, для цитокининов он побольше – 1000 аминокислот,

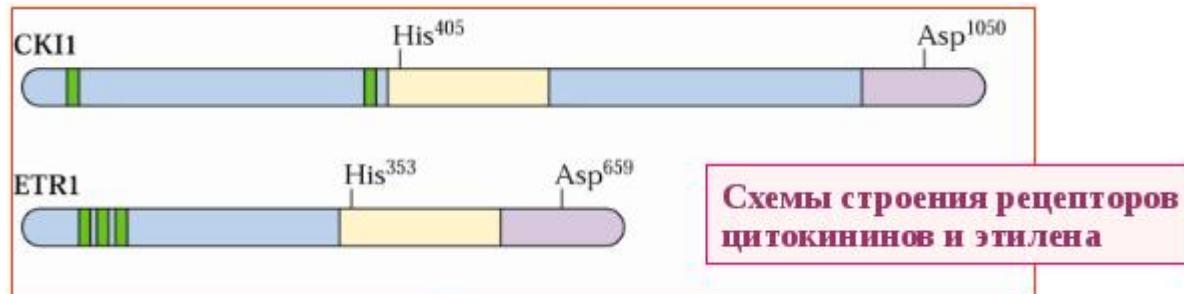


Рисунок 29. Схемы строения рецепторов цитокининов и этилена

зеленое – то, где он пересекает мембранны. Две главных аминокислоты – гистидин и аспарагин, на который переносится фосфат. Когда просеквенировали геном арабидопсиса, оказалось, что в нем гистидинкиназ не так много. 16 штук. 3 – рецепторы цитокининов, 5 – этилена, по крайней мере, три потеряли гистидинкиназную активность, еще 5 штук – фитохромы, рецепция светового сигнала, тоже бывшие гистидинкиназы.

Рецепция цитокининов

Рецептор цитокинина – белок CRE1, который существует скорее всего как мономер, когда нет цитокининов, либо исходно существует как димер, но неактивен и скорее всего происходит димеризация, либо изменяется конформация, когда связывается цитокинин. Долго считалось, что это – единственный канонический рецептор с гистидинкиназой, который работает у растений. Считалось, что он сидит на плазмалемме, появляются данные, убедительные, но странные, что довольно много рецепторов цитокинина сидит на эндоплазматическом ретикулуме. Для этилена все правильно. Это газ, он проходит. Для цитокинина странно. Если участок, который связывается с цитокинином, находится в цитозоле, то киназа находится в просвете эндоплазматического ретикулума. Если киназа – в цитозоле, то непонятно, как цитокинин попадает в ЭПР. Идут споры. Показано, что рецептор сидит на ЭПР. Дальше: это – единственный сигналинг, происходящий по животному типу, по ускорению. Когда связывается цитокинин (с SHASE-доменом), происходит каскад фосфорилирования, сначала гистидин, потом аспарагиновая кислота, потом фосфорилируется фосфотранспортный белок, который попадает в ядро, дальше работают два регулятора ответа: ARR первого типа и ARR второго. ARR типа В может напрямую связываться с генами, которые – гены-мишени для цитокининов и запускают их транскрипцию. Может наоборот, сесть и зарепрессировать. На цитокинин реагируют

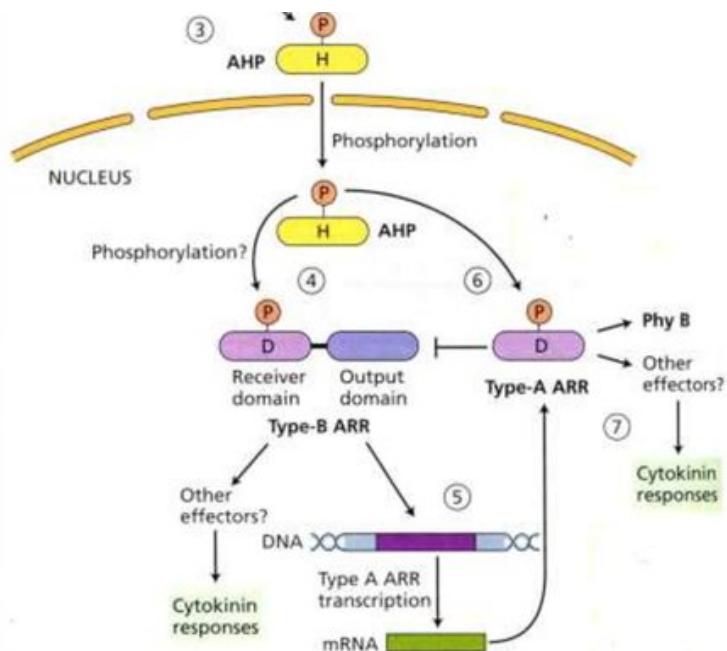


Рисунок 30. Ответ на цитокинин в ядре

более 15% всех рабочих генов. Это очень характерно для гормонального сигналинга, что активируется очень много генов. Активируются или репрессируются. Они изменяются в процессе по времени. Будем рассматривать чуть позже, когда будет рассматривать рост и развитие. Поскольку фосфорилируются ARR типа А и В (Рис.30), оказывается, респонс-регулятор типа А может участвовать в других системах, в частности, работает с цитохромом В, но он же выключает работу респонс-регулятора В. Респонс-регулятор В – плюсовая система ответа, респонс-регулятор А – тормозная. Если слить фосфотранспортный белок с GFP, то видно, что, когда нет зеатина, он распространяется по клетке гомогенно, через полчаса после появления зеатина весь этот белок появляется в ядре. Через полтора часа опять диффузно распределен по клетке. Четко показано, что именно так работает система цитокининов. Пожалуй, это – единственная система, которая работает как у животных.

Рецепция этилена

Когда стали изучать рецепторы этилена, столкнулись с серьезными проблемами. Рецепторов пять штук. У трех отсутствует главный гистидин, который должен фосфорилироваться. Оказалось, что работают, наоборот. Когда этилен присутствует, его ответа нет. Сигнал не работает. И наоборот. Показано на мутантах: если есть хотя бы один сделать мутант, система регулирования работает обратно. Оказывается, это гистидинкиназа, но как гистидинкиназа для работы рецептора не нужна. Этилен – маленький, есть дополнительный белок с кофактором, который содержит медь. Он связывается с этиленом, а потом – с рецептором. В норме, когда этилена нет, с этими

рецепторами (5 штук, могут быть испорченными гистидинкиназами, могут быть нормальными) связана киназа (CTR1, constitutive triple response 1) она тормозит работу позитивного регулятора ответа этилена EIN2. В отсутствие этилена receptor заингибиран белком CTR1. Это – MAP-киназа, но MAP-киназа наоборот. Когда связывается этилен, CTR1 уходит, видимо, разваливается в протеасоме, перестает ингибировать белок EIN2. Неясно, как работает EIN2, он перестает ингибироваться STR1 и запускает систему ответа на этилен. Не убиквиинирование, но физический уход от рецептора. Принцип тот же самый. Дальше начинает работать активатор и факторы транскрипции. Также, как для гиббереллинов: сначала факторы транскрипции более высокого уровня, FIN3/EIL1, запускают синтез факторов транскрипции ERF1, они запускают считывание рабочих белков. Это – генеральная линия работы сигналинга этилена, существует еще одна система, связанная с этиленом, ответственная за регулирование ответа. Система EIN5 тоже связана с убиквиинированием работает параллельно, получается регуляторная сеть ответа на этилен. CRT1 – главный ингибитор, серин-треониновая киназа, негативный регулятор ответа этилена, фактически, MAP-киназа. Похоже на MAPKKK, но работает, наоборот. Антипод обычных киназ. Если нормальные MAPKKK-киназы активируют нижний уровень, то эта тормозит. Возможен еще путь торможения этой киназой не через EIN2. Фосфатидные кислоты ее не стимулируют, а выключают. В отсутствие этилена она связана с его рецептором, активна, ответа на этилен нет. Когда этилен есть, она уходит из комплекса, скорее всего, деградирует с убиквиинированием. EIN2 – позитивный элемент этиленового сигналинга, как работает, неясно. Только один ген, существует трансмембранный домен, чем-то схожа с металлотранспортерами Nramp, но ничего не транспортирует. С-концевой цитоплазматический домен важен для ее функции, но непонятно как. Когда EIN2 запускаются EIN3, EIL1, EIL2 – этилен-зависимые факторы транскрипции. Коротко живут, этилен не активирует эту систему, а, скорее всего, регулирует ее стабильность. Сейчас обсуждается вопрос, что, если EIN2 не работает, то EIN3, EIL1, EIL2 убиквиинируется и уходит в протеасому. EIN2 каким-то образом повышают их стабильность. Когда их много, они активируют ERF1-фактор транскрипции, который запускает рабочие гены ответа на стресс. EIN5/XRN4 – рибонуклеаза, которая регулирует уровень транскриптов компонентов убиквииниглазного комплекса, если она их выключает, то они не будут работать. Это – обходной путь регулирования EIN3. Взаимодействие сигнальных систем цитокинина и этилена. Возможно, происходит кроссфосфорилирование гистидинкиназ ответа этилена и цитокининов, именно здесь задействовано кросstalk переговоры.

Мы разобрали еще две системы сигналинга этилена и цитокининов, они работают совершенно по другому принципу. Это - гистидинкиназы, это - тройной ответ, видимо, пришли от микробов, рецепторов достаточно много, у цитокинина – 4, у этилена – 5. Зачем – похоже, что рецепторы имеют разное сродство к разным цитокининам. В зависимости от того, на каком этапе идет их синтез: рибозид или риботид. Транспорт в виде риботидов идет вверх до стеблей, там за счет ферментов гормон превращается в активный.

Показано, что разное средство к разным формам цитокининов обусловлено довольно большим набором рецепторов. То же самое – для этилена. Этилен – особая вещь, не все рецепторы – гистидинкиназы, но для связи с CTR1 это не важно. Вот – система трансдукции сигнала еще двух фитогормонов, мы уже знаем пять.

Рецепция брацциностероидов

Мы разобрали систему рецепторов пяти фитогормонов. Шестой – брацциностероиды. Здесь receptor более-менее типичен. Известна большая группа LRR-белков, это –

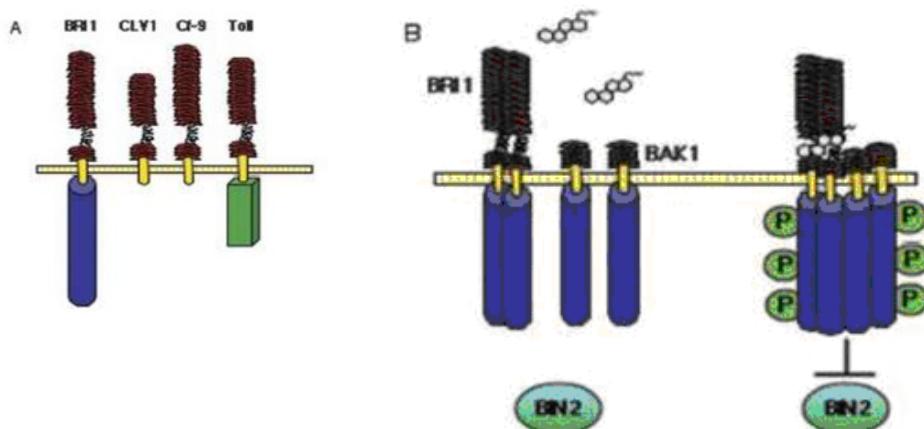


Рисунок 31, A. LRR/RLK – белки. B. BRI1 – receptor брацциностероидов

белки у которых аббревиатура LRR (Leucin rich repeat). У них - довольно большое количество участков повторов, где довольно много лейцинов, повторы, стандартно стабильны, 24 аминокислоты, среди белков, у которых есть LRR, есть подгруппа, где они – рецепторы LRR/RLK (Leucin rich repeat receptor like kinase, Рис.31, А). Таких рецепторов довольно много у арабидопсиса – более 170 генов, на N-конце – лейциновая «молния». Как правило, они – серин-треониновые киназы, обычно они есть не только у растений, есть у насекомых. BRI1 – receptor брацциностероидов. (Рис. 31, В) Есть не совсем фитогормоны, белки CLAVATA, которые регулируют размер меристемы у арабидопсиса, существуют рецепторы, которые не фитогормональные, а рецепторы ответа на патоген – Cf9 все - белки с лейцин – обогащенными участками, они широко используются для самых разных систем регулирования сигналов, не только фитогормонов. Похожий лейцин-обогащенный receptor Toll известен для дрозофилы. Связан с разметкой эмбриона и врожденным иммунитетом. Обычно структура таких белков стандартна: лейцин-обогащенные повторы, трансмембранный участок и участок, который будет фосфорилировать. Часто будет не димеризация, а полимеризация. Могут быть как гомо- так и гетеродимеры, это дает возможность разным вариациям ответа. Receptor брацциностероидов LRR/RLK точно сидит не плазмалемме, на внешнем экстрацеллюлярном домене 25 повторов, между 21 и 22 повторами будет «островок» из 70 аминокислот, где будут связываться брацциностероиды, не в чистом виде, а

связанный с белком, на С-конце, который в цитозоле, серин-треониновая киназа, в норме она неактивна, когда появляется брацциностероид, делается активна, стандартная система гистидинкиназ. Механизм работы – снятие ингибиции. В норме киназа LRR/RLK неактивна, без брацциностероидов работают два промежуточных участка – BIN2 – киназа, она будет фосфорилировать факторы транскрипции, в фосфорилированном виде они – мишень убиквитинирования и развала в протеасоме. Когда появляется брацциностероид, он связывается с мембранным доменом, образуется гетеродимер BRI1-BAK1, (BAK1 не связан с брацциностероидом) ингибируется BIN2, это приводит к накоплению дефосфорилированных факторов транскрипции BES1 и BZR1, они становятся стабильными и активируют или ингибируют рабочие гены, которые должны отвечать на брацциностероиды. Чуть-чуть другой механизм. Новое: серин-треониновая киназа, гетеродимер, по сути – все то же самое. Когда нет брацциностероидов, идет фосфорилирование факторов транскрипции и они разваливаются в протеасоме, когда есть – он выключает фосфорилирование, что приводит к стабилизации факторов транскрипции. Есть несколько дополнительных систем регуляции: фосфатазы могут снимать фосфорилирование. Есть белок BL, связывается с брацциностероидом, дальше начинает работать островок. Эта система не только активирует, но может быть тормоз транскрипции. Целая ветвь выключает гены, ответственные за синтез брацциностероидов – система обратной регуляции синтеза брацциностероидов. Оказывается, рецептор дрозофилы Toll1 – рецептор двух сигналов. Он может быть либо регулятором развития эмбриона, либо формировать в зависимости от того, с чем работал, иммунитет. У дрозофилы протеаза расщепляет пропептид. Образуется полипептид Spatzle, который затем связывается с Toll-рецептором. Выбор между регулированием развития эмбриона и врожденным иммунитетом определяется регулируемым стадией развития расщеплением пре-Spatzle. Один и тот же рецептор – либо стандартная система развития, либо ответ на иммунитет. Это зависит от стадии развития. Когда прошла определенная стадия эмбрионального развития, это уже не будет рецептором, выбрасывать жалко. Если это – нормальная взрослая особь, он будет работать как рецептор стрессового состояния, иммунного ответа. Похоже, что BRI1 арабидопсиса – тоже двойственный, он может быть либо рецептором брацциностероидов, и тогда работает «островок», BRI1 будет взаимодействовать с BAC1, может быть гексамер, причем они – гетеро, это – влияние стандартное брацциностероидов. Оказывается, с ним же может связываться системин. 18 аминокислот пептид, синтезируется из просистемина, 200 аминокислот, регулятор системного ответа на патогенез. BRI1 в другом месте связывается с системином. После этого другой компонент димеризации или олигомеризации приводит к тому, что будет другой ответ на патоген. Здесь рецептор брацциностероида – одновременно рецептор системина. Две независимые системы регулирования.

Рецепция АБК

Мы охарактеризовали шесть из семи гормонов, которые можно отнести к гормонам. Остался последний классический гормон – АБК. Очень сложно работать с ауксинами, с цитокининами, поскольку мутанты по ауксину нежизнеспособны. Этилен хорошо изучен, поскольку получить мутанты по этилену возможно. Вроде по АБК тоже можно получить мутанты, но до сих пор не ясно, каков сигналинг АБК. АБК сейчас - пожалуй, самый обсуждаемый фитогормон. Казалось бы, хорошо изученная система. Есть очень много рецепторов, практически везде. Есть рецепторы ядерной локализации, глобальный ответ обсуждалось снятие репрессора с убиквитинированием. Обсуждалось, что в хлоропластах есть рецептор АБК. Есть классический рецептор на плазмалемме и есть растворимый в цитозоле. Четыре рецептора в разных компартментах, существуют перекресты, фосфолипаза D, которая связана с фосфатазами. Фосфатаза 2C - очень известная вещь для регулирования. Перекрест по факторам транскрипции - ABI3-ABI5. Известно, что до 15% всех генов регулируются АБК. Нормальное количество, для цитокининов это показано. 10% всех регулируемых генов для фитогормона — это нормально. Это подтверждает, что это - целая программа развития. Оказывается, что первый рецептор, который был открыт для АБК (в 2006 году) — это система ядерной локализации и считалось, что одно из действий АБК - это репрессия цветения. Оказалось, что вроде простая красивая система, которая связана со снятием ингибирования. Есть FCA-белок (flower time control protein A). РНК-связывающий ядерный белок, запускает цветение. Существует мощный ингибитор цветения FLC (flowering locus C). Оказывается, что этот FCA1 выключает ингибитор цветения и растение зацветает. Он взаимодействует со вторым белком - FY (flowering locus Y), FY – фактор полиаденилирования РНК. Без АБК FY обрезает вместе с FCA1 комплекс процессинга мРНК, который предотвращает образование мРНК ингибитора FLC. Растение цветет. Группа Розема (Rasem) в 2006 году показала, что FCA-белок очень хорошо, аффинно, обратимо связывается с абсцизовой кислотой. После связывания его димер с FY распадается, не контролирует FLC и выключает цветение. В данном случае АБК ингибирует развал ингибитора. В 2008 году появились данные, что Rasem не очень корректно проводил работы. Он признал, что, скорее всего, ошибся. Сейчас появились данные в защиту данных Rasem. Не исключено, что это работает, но — это очень локальное действие АБК - только на цветение. В 2006 году группа Shen нашел еще один рецептор АБК. Он показал, что есть Mg-протопорферин-хелатаза. Это - четырехбелковый комплекс, который в протопорфирина-IX вставляет магний. Это - ключевая вилка синтеза порфиринов, когда что-то идет на магний, что-то - на железо. Оказалось, одна из субединиц, субединица H имеет АБК-связывающий домен, есть гомолог ABAR - абсцизовой кислоты рецептор, стали обсуждать если у убиквитинлигазы белок может быть рецептором гормона, почему бы у хелатазы не быть. Это все в хлоропластах. Вполне возможно, что гены хлоропластных белков могут быть связаны с АБК-генами. Оказалось, что, когда взяли ячмени, там очень

похожая хелатаза, никакого эффекта. У арабидопсиса работает, потом показали, что в работе была некоторая ошибка, у ячменя не работает, хотя структура хелатазы очень похожа. Либо это локально для одного растения, либо это - ошибка, и это не работает, а работает гомолог. К 2009-2010 году это стало забываться. Если это есть, то это - не главный момент и под большим сомнением. В 2007 году нашли плазмалеммный рецептор АБК, GCR2, который взаимодействует с G-белками. Дальше стандартно: связался АБК, образовался GTF- α -субъединица, посфолипаза D, фосфатидные кислоты и т.д. Когда стали разбираться подробнее, оказалось, что у GCR2 и GCR-подобных белков трансмембранные белки - под вопросом. Скорее всего, они не так уж и мембранны. Тройные мутанты по ним не отличаются от дикого типа. В 2009 году появились новые кандидаты GTG1 и GTG2 – белки, у которых другая система. Не семь, а 9 трансмембранных доменов, связываются не с тримерными, а с мономерными G-белками, и для них эфыфекторы пока не очень понятны. Сейчас это не опровергли. Есть надежда, что это - мономеры. Вроде мутанты по ним с АБК нормальны это не опровергли. Это – плазмалеммный кандидат в рецепторы АБК, но не стандартный, а мономерный. После 2009 года очень активно обсуждаются цитозольные рецепторы АБК и здесь ключевую роль играют фосфорилированные вещи. Протеинфосфатаза. Все очень похоже на наши стандартные системы. Есть рецептор, белок из большого семейства START, который будет работать с фосфорилированием. Существует фосфатаза, которая будет дефосфорилировать в норме, когда нет АБК. Это - очень большая группа фосфатаз, PP2C: PP - фосфатаза, 2C - определенная группа. Существует регулятор SnRK2, серин-треониновая протеинкиназа, которая в нефосфорилиированном виде неактивна. Если она неактивна, то ABF, фактор ответа на АБК, трансфактор семейства bZIP в дефосфорилиированном виде не работает и не работает ауксин-регулируемый элемент. Протеинфосфатаза снимает фосфорилирование у протеинкиназы. Протеинкиназа - стандартная серин-треониновая, если не активна, не фосфорилирует факторы транскрипции, и они не работают. Когда появляется АБК, связывается с рецепторным белком RCAR. Он, похоже, физически связывается с протеинфосфатазой PP2C и она не работает. Начинает работать протеинкиназа SnRK2, она фосфорилирует фактор транскрипции ABF, который в фосфорилиированном виде запускает гены ответа на АБК. Классическая система глобального ответа, работает на транскрипции генов, их довольно много, 14 %. Стандартная схема снятия ингибирования, ингибитор - фосфатаза. Сейчас это - одна из серьезно обсуждаемых систем цитозольного рецептора АБК. В сумме получается, что возможна множественность рецепторов, возможно, флауэр локус С может работать, но локально, на цветение. Заметим, сколько может быть разных факторов транскрипции, которые активируются АБК: МВ-факторы, bZIP-система – может быть несколько вариантов активации транскрипции. Abi3, Abi5 – АБК-нечувствительные факторы транскрипции, их может быть около десятка. Практически для всех систем убиквитинирование и развал – часто встречающаяся вещь. Здесь – то же самое. Для определенных систем (в данном случае созревание и развитие эмбриоидов) то же самое будет работать без АБК, скорее всего, ABI3 будет заставлять фактор bZIP

убиквитинироваться, они идут в противоположную сторону и идет развал этих трансфакторов. Для АБК и любого фитогормона в том или ином месте работает система разрыва. Просматривается сеть регулирования. На засуху, на осмотический стресс - на внешние факторы, еще есть на внутреннюю систему. Получается, что все гормоны в той или иной мере могут отвечать в каких-то запрограммированных системах оценки состояния растения и отслеживают, и регулируют процесс роста и развития по фазам. И должны быть абсолютно независимы. Это - эндогенные системные регуляторы. С другой стороны, они же участвуют в ответе на внешние факторы. Мы будем говорить про рост и развитие, это - очень важный момент, что растение развивается стадиями во времени, в пространстве - блоками. Чтобы оценить, сколько нужно блоков, какие стадии проходить, нужно отслеживать внутреннее состояние. Нельзя перейти к цветению, если недостаточно вегетативной массы, если не прошел какой-то этап ювенильного развития. С другой стороны, если недостаточно внешних факторов, мощные заморозки, засуха, к цветению переходить нецелесообразно. Система анализа внешних и внутренних факторов таким образом взаимодействовать? Можно пойти так: что-то отвечает за внутренние факторы, что-то - за внешние. У растений получилась непрерывная убывающая система зависимости гормонального сигналинга от внешних факторов. Ауксины практически не отвечают на внешние факторы. Это четко эндогенное отслеживание. Даже транспорт, то, что они идут сверху вниз, говорит о том, что это - градиентная система, аналогично цитокининам - снизу вверх. Это независимые гормоны, направлены на эндогенную систему регулирования развития. Дальше - по убыванию. На гиббереллины имеют определенное влияние внешние факторы. АБК - тоже. Жасмонаты могут осуществлять трансдукцию сигнала. Стress часто вызывает активацию липоскидазной системы, она дает синтез жасмонатов. Это - разумная система градиентности ответа на внешний фактор. Почему жасмонаты и АБК, больше всего отвечают на внешние факторы, а не ауксины и цитокинины? Потому что это - привязка к стадии онтогенеза. Если мы будем говорить о развитии семени, при формировании зародыша пики гормонов располагаются так: вначале будет пик ауксинов, потом уменьшаться, потом пик цитокининов, потом - гиббереллины, и последними будут АБК и этилен, которые остановят развитие зародыша и будут упаковывать его в семя. Есть по времени работа разных гормонов и те, которые раньше, на ювенильных стадиях более важные, они менее зависимы от окружающей среды. Потому что развитие эмбриоида должно быть стандартно, стабильно. Те гормоны, которые играют более важную роль на более поздних стадиях, должны больше отвечать на внешние факторы. Это линейка целесообразна не только по степени влияния внешних факторов на гормональный сигналинг, но и по времени. Поэтому салицилат и стринголактоны работают как ответ на внешний фактор. Может быть, это - крайний вариант гормонов. Факт, что растение должно отслеживать внутренние и внешние условия и что гормоны играют в этом роль - однозначно. Часть работы АБК - созревание эмбриоидов и часть - как антистрессовый гормон. Возможно, с этим связана множественность рецепторов, Flover locus C. На 2015 год по поводу сигналинга АБК хлоропласти были под вопросом, фосфатаза 2C, Flover locus C - под

вопросом, пожалуй, самая обсуждаемая и разработанная вещь — это цитозольный сигналинг глобального ответа и обсуждаемые GTG1 и GTG2 - мономерные G-связанные белки. В целом, тут все нормально, цитозольные ядерные рецепторы и т.д. Еще что хорошо для АБК - существует дубли. Обходные пути сигналинга. Здесь хорошо изучены для закрытия устьиц. И сигналинг АБК плазмалеммный - скорее всего, мономерный G-белок, здесь он работает через фосфолипазу D, у него система трансдукции сигнала - активная форма кислорода. Есть другая система. Чуть раньше показано, что есть NO-сигналинг, но сейчас этот сигналинг уже под вопросом, потому что не нашли той самой NO-оксидазы, которая есть у животных. Параллельно работает инозитолтрифосфатная система. Один и тот же сигнал регулируется минимум двумя почти независимыми системами трансдукции сигнала. Дублирование позволяет точно настроить и повышает точность сигналинга.

Лекция 7. Эмбриогенез растений

Различия стратегии развития растений и животных

Логика курса - начинали от молекулярно-биологических вещей: фотосинтез, дыхание, потом перешли к минеральному питанию, потом клетка, потом система регулирования фитогормонального, фоторецепторного, сейчас подошли к целому организму. Это - оптимальный вариант изучения физиологии растений, потому что с этим багажом можно приступить к разбору физиологии интактного растения как целостного организма. Потом будет популяционно - экологическая часть, но к концу курса. Начиная этот блок информации, можно сказать, что стратегия развития растений и животных различны существенно. У них совершенно разная форма существования - прикрепленный образ жизни, автотрофность и отсюда вытекают многие вещи. Разница по стратегии развития - для животных: сеть преобразований, в которых очень быстро дедифференцированные клетки становятся дифференцированными, у каждой клетки делается своя функция. Организм жестко контролирует каждую клетку. Когда организм сформировался, дедифференцироваться клетки не могут за некоторыми исключениями. Нарушение этого принципа приходит к онкологии. Для растений принцип дифференцировки - не строго. Клетки растений истинно титопотентны. Почти любая клетка растений может дедифференцироваться, вернуться в клеточный цикл и сформировать целое растение. На этом основана культура клеток высших растений, биотехнология. Для растений это очень важно. В отличие от животных, меристема работает, делится в течение всей жизни, формирует новые органы. Поэтому в пространстве и времени не можем предсказать, какое будет растение. Репродуктивные органы у животных закладываются на эмбриональной стадии развития, у растений - после долгого вегетативного существования, не во всех случаях. Главное в стратегии растений - стадийность. Стадии принципиально важны. На основании анализа внутренних и внешних факторов растение решает, нужно переходить, или нет. Многие растения не зацветают. Переход к генеративному состоянию – серьезный рубикон. Стадийность процесса развития сформировал Лысенко. Считалось, что теория не очень профессиональна и глубока, но именно этой теории было посвящена большая конференция в Америке в те годы, Лысенко был в организаторах. Важная идея. Еще особенность роста и развития растений, о которой уже говорилось - принцип расселения - животные расселяются во взрослом состоянии, растение вынуждено расселяться на стадии семени или плода - следствие прикрепленного существования. Первый этап развития растений – от зиготы до семени.

Этапы развития растений:

Развитие от зиготы до семени

После оплодотворения от зиготы растение развивается до семени. Происходит процесс эмбриогенеза. Классический объект – арабидопсис (Рис.32). Сначала происходит

асимметричное деление зиготы - устанавливается ось корень- побег, образуется супензор и зародышевая клетка, ее деление приводит к формированию корневой и

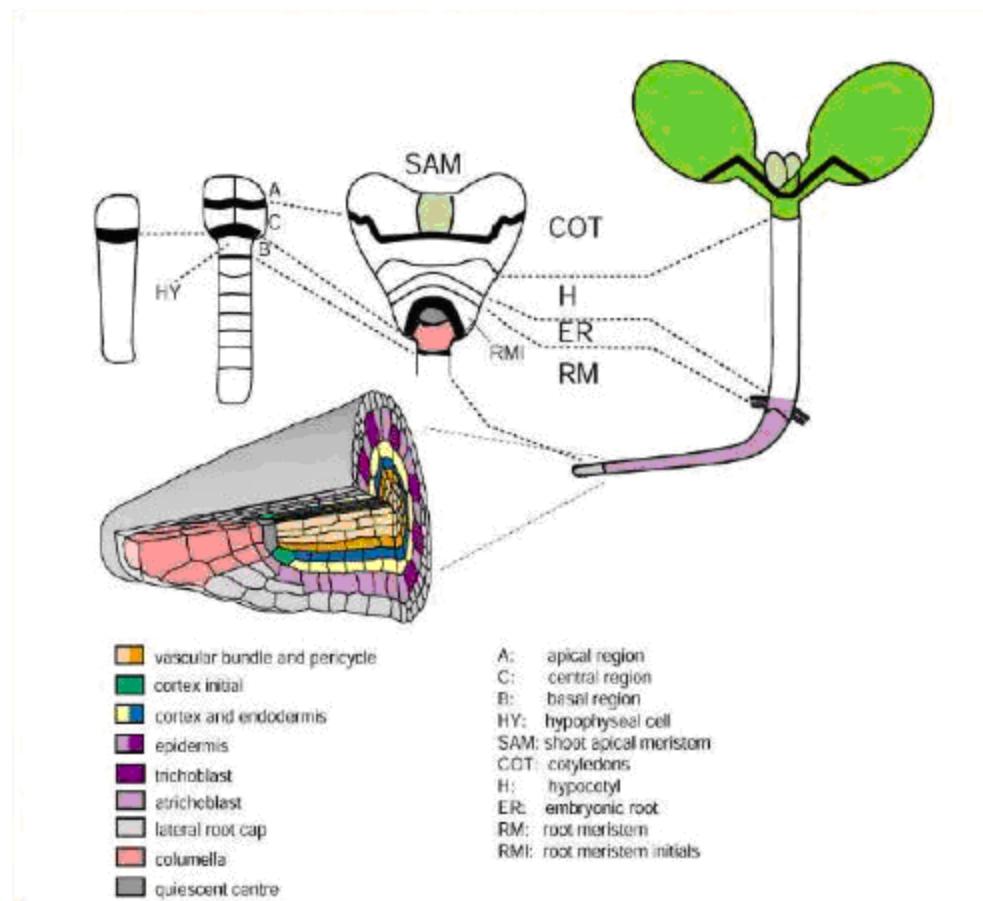


Рисунок 32. Эмбриогенез у арабидопсиса

стеблевой меристем – очагов деления. Они разделяются, формируют между собой сосудистый камбий – связь меристем, формируются зародышевые листья – семядоли, все упаковывается в семя. Стадии эмбриогенеза: стадия глобулы, сердечка, торпеды и мальнького растения, которое упаковывается в семя. Механизм этапов эмбриогенеза. Отличие от животных: формирование зародыша у растений никогда не происходит за счет перемещения клеток. Только за счет скорости и направления деления. Основные факторы при эмбриогенезе: скорость деления, асимметричность деления, полярность клетки (определяется очень рано) – чрезвычайно важна для формирования эмбриоидов, т.к. гравитропизм – Солнце и сила тяжести – принципиальная вещь, которая определяет существование растений. После деления клетки, когда она дедифференцирована, должны произойти две вещи: дифференцировка и морфогенез (формирование) структур. Дифференцировка ткани происходит раньше, что логично, и независимо от морфогенеза. До начала дифференцировки судьба клетки не определена. Еще разрабатывается идея: экспрессия генов, которые работают в эмбриогенезе, как правило, пространственно-специфична. Эти гены работают в разных частях зародыша, как правило, мутации,

которые затрагивают одну часть зародыши, не приявляются в другой его части. Мутанты по эмбриогенезу (Рис. 33) дали много информации о том, как происходит эмбриогенез у растений. Что из себя представляют - мутант *gk*(GURK): отсутствует апикальная меристема и семядоли. Кодирует ацетил-СоA карбоксилазу. *Fk*(Факел) - отсутствует гипокотиль. Кодирует стерин-C14-редуктазу. *Mp*(Monopteros) - отсутствуют гипокотиль и корни, кодирует трансфактор ауксинового ответа *ARF*. *Gn* (GNOM) - редуцирована меристема и побеговая, и корневая. Кодирует фактор гуанинового обмена нуклеотидов, который важен для распределения транспортера ауксина *PIN*. *Kn* (knotted) – описание потом. Разные гены экспрессируются в разное время, в разных участках. Есть гены, которые начинают работать в раннем эмбриогенезе, на уровне зиготы, потом - очень локально или вообще исчезают. Есть гены, которые на ранних этапах эмбриогенеза не работают, а появляются позже. В эмбриогенезе есть гены, связанные с обменом ауксинов. Много фактов, что одну из

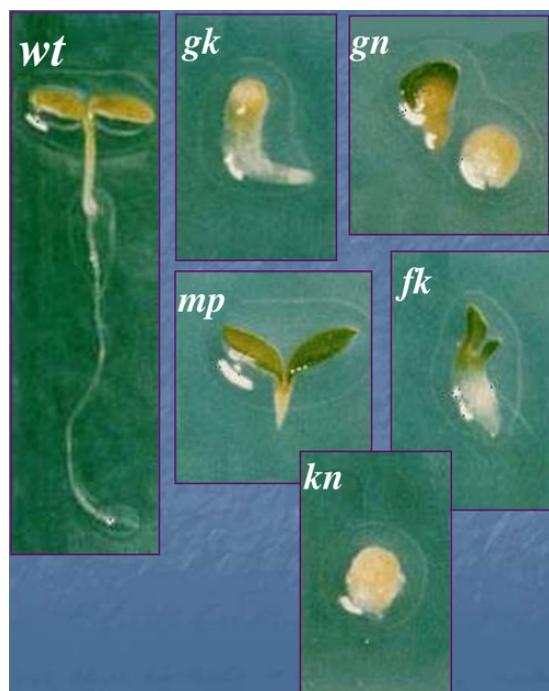


Рисунок 33. Мутанты по эмбриогенезу арабидопсиса. Слева направо: *wt*, *gk*, *gn*, *mp*, *fk*, *kn*.

главных ролей в регуляции эмбриогенеза играет ауксин. На двухклеточной стадии максимум ауксина есть в зародышевой клетке, поток ауксина идет в нее из супензора. На глобулярной стадии максимум ауксина - в нижней части глобулы, поток идет сверху вниз. Раннее сердечко - нормальный поток ауксина, характерный для интактного растения, максимум ауксина находится в нижней части. Формируется идея, что наиболее ранними регуляторами эмбриогенеза являются гены, участвующие в обмене ауксина, прежде всего - гены *PIN*. Транспортеры, обеспечивающие транспорт ауксинов, выведение их из клеток. Мы говорили, что пинов довольно много. Одни распределяются

в базальной части клетки, определяют транспорт ауксина сверху вниз, некоторые определяют латеральный транспорт. На стадии двух клеток первый работающий - PIN7, определяет транспорт ауксина из суспензора в апикальную клетку, на уровне 8-клеточного зародыша появляется PIN1, PIN7 продолжает работать как транспорт ауксина в зародыши. На стадии глобулы работает большое количество ПИНов. Полярный транспорт ауксинов чрезвычайно важен для формирования зародыша. Анализ всех этих генов позволяет выяснить, что они кодируют. Выяснено, по каким белкам самые первые мутанты в эмбриогенезе. GNOM - активатор ГТФаз - перераспределение пинов правильно. Knolle - синтаксин - трансмембранный белок, который определяет систему SNARE-комплекс, (есть SNARE-домен), который делает экзоцитоз, вывод белков в периплазматическое пространство или мембранны. По фенотипу похож на GNOM. Keule - мутант по другому белку SNARE-комплекса. Hinkel-мутант по кинезину, кинезины - довольно большое суперсемейство белков, связанное с движением микротрубочек и определяет везикулярный транспорт. Это - набор мутантов, нарушающих везикулярный транспорт, отсюда можно сделать вывод, что он - один из важнейших механизмов, который определяет формирование ранней стадии эмбриогенеза. Таким образом - прежде всего, локализация пинов. Сначала при развитии эмбриоидов активируется система везикулярного транспорта. Везикулярный транспорт ответственен за локализацию PIN-белков, ответственных за транспорт ауксинов, делается правильный градиент ауксинов, ауксины - те фитогормоны, которые участвуют в цитокинезе. Помимо везикулярного транспорта это формирование мембран. Таким образом работает одна из систем регулирования в эмбриогенезе цитокинеза (скорости и направления делений). Есть еще мутанты, которые нарушают ранний процесс эмбриогенеза, связанные с пектинмилтрансферазой и эндо-1,4-бета-D-глюканазой - они формируют клеточные стенки. Пектинмилтрансфераза отщепляет метильные группы, делает активной пектины, эндо-1,4-бета-D-глюканаза позволяет правильно формировать сшивочные гликаны. Вот два основных механизма, которые определяют раннее правильное развитие эмбриоида. Это - везикулярный транспорт, локализация ауксинов и мембранны, и формирование клеточной стенки. Почему GNOM, якобы активатор ГТФаз, связан с ауксинами? Сейчас изучено, каким образом происходит везикулярный транспорт пинов. Пины исходно находятся в эндосомальных везикулах, для транспорта их в плазмалемму (в плазмалемме важно, где находятся PINы) работает система GNOM/GEF, guanosine exchange factor, которая необходима для направленного движения везикул, мутация одного из ее компонентов нарушает правильный транспорт везикул в плазмалемму, соответственно, нарушает правильное распределение ауксинов. Поэтому мутация по активатору ГТФаз нарушает эмбриогенез. Так работает мутация GNOM и похожий набор мутантов. Факел (FK), нарушает центральный домен зародыша. Странно - и он, и набор других мутантов нарушает синтез стеринов. Для растений нехарактерно присутствие холестерина, он есть в минимальных количествах. Для растений характерны фитостерины - фито-, стигма-, кампостерин (есть изофукостерол, но редко) чтобы образовать их, есть набор ферментов. Они синтезируются путем

перемещения двойной связи. У предшественников она в четвертом кольце, у нормальных стеринов - в пятом. Как правило, все такие мутанты нарушают формирование двойной связи и перемещение ее в нужную позицию. При нарушении правильной структуры стеринов нарушается формирование мембран, меняется ориентация пин-белков, нарушаются формирование клеточной стенки, мембранны и клеточная стенка близко контактируют, фитогормоны брассиностероиды - тоже синтез стеринов. Набор важных функций - структура мембран, клеточной стенки, ориентация PINов, и брассиностероиды важны на растяжение клеток. Центральная зона (домен) зародыша оказывается нарушена. Почему только она - никто не может сказать. Сейчас пытаются из множества мутантов по зародышевому развитию, которые давно известны, выстроить, что они кодируют и каким образом. Как изучается целый процесс эмбриогенеза. Он происходит в локальном участке, когда происходит оплодотворение, развитие, изучать механизмы сложно, очень маленький размер. Хорошо, что растительные клеткиtotипотенты и есть культуры клеток высших растений, можно изучать эмбриогенез в виде соматического эмбриогенеза.

Соматический эмбриогенез

Из дедифференцированных клеток, представляющих собой культуру клеток высших растений, можно вызвать массовый эмбриогенез. В системе *in vitro*, манипулируя

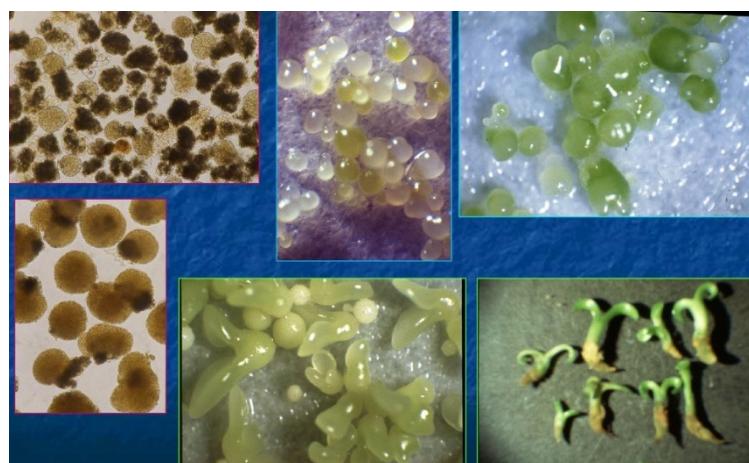


Рисунок 34. Соматический эмбриогенез у цитрусовых. Слева направо: стимул, стадия глобулы, стадия торпеды, проэмбриогенная масса, стадия сердечка, проросток.

разными факторами. Это будут соматические эмбриоиды (Рис. 34). Можно изучить, что важнодля каждой стадии. Оказалось, легко эмбриогенез вызвать в культуре клеток моркови. Достаточно из среды культивирования убрать фитогормон 24D. Идет массовый эмбриогенез, считалось, что это - замечательная модель. У цитрусовых все сложнее. Появляются непонятные структуры, не все дают проэмбриогенные массы. После стимула появляется проэмбриогенная масса, клетки из диффузно распределенных сближаются в комки, в них появляются темноокрашенные участки, на стадии глобулы

разные по окраске, и т.д. Оказалось, что этот процесс не обязательно автономен. У моркови автономен, если убрать 24D, все формируется, идет на автомате, сложно остановить. На цитрусовых оказалось, что чтобы формировались проэмбриогенные массы важно, чтобы не было супензии. Нужна сила тяжести. На каждом этапе необходима корректировка условий. Для образования глобул из проэмбриогенной массы важно подобрать осмотики, среды. Главное – сила тяжести. Не все глобулы переходят в сердце, важен их размер, для перехода к стадии торпеды оказалось важно добавить сахар. Эмбриогенез вызывают ауксины. У кукурузы сложно получать его, попробовали воткнуть два электрода - один в каллус, второй - в среду. Очень слабый ток вызывает правильную поляризацию клеток, позволяет на несколько порядков увеличить процент эмбриогенеза. Направление тока имеет значение. Перераспределяются переносчики, это – ионные каналы, правильная ориентация вызывает поток ионов, поляризацию и запускают эмбриогенез. В культуре удобно изучать биохимические аспекты. Актин может быть полимерный и мономерный. Процесс эмбриогенеза меняет соотношение полимерного и мономерного актина. Когда есть много эмбриоидов, можно все померить. Когда получаете растение, важно все это затормозить. Затем – сформировать семя и плод, упаковать в прочную оболочку, снабдить питательными веществами и растение готово для расселения. Смотрели гормоны, количество в процессе эмбриогенеза, оказалось, что на первом этапе работают ауксины, потом цитокинины, гиббереллины, АБК и этилен. Мутанты по АБК приводят к живорождению. Часто фенольные соединения – тормоз развития. Для разных видов – по-разному. Здесь важна химическая регуляция. На этом заканчивается первый этап – сформировалось семя.

Покой семян

Покой семян – промежуток, который позволяет растению расселиться. Покой вызывается АБК, этиленом и фенольными соединениями. В состоянии покоя семена могут выдерживать разные стрессовые факторы: температуру жидкого азота. В природе этого нет. В МГУ один из грантов РНФ - "Ноев ковчег" – грант на сохранение генетических ресурсов. Банки семян содержат миллионы образцов. В ВИРе семена хранятся в состоянии покоя, через 3-4 года обязательно нужно проверять всхожесть. Оказалось, самый лучший, вариант хранения семян – жидкий азот. Оказалось, что ортодоксальные семена можно бросить в него и забыть, 99,9% надежности, не теряется всхожесть. Существует минимум 2 вида покоя семян (есть подвиды). Вынужденный – внешние факторы не позволяет прорастать. Нет влаги, кислорода. Могут храниться несколько тысяч лет, семена, найденные в пирамидах, прорастают. Это преодолевается скарификацией. Иногда связано с плотными оболочками. Физиологический покой – внутренние факторы не позволяют семенам прорастать. Работают фитогормоны. Преодоление – стратификация, по-разному. Есть понятие – яровизация. Когда Лысенко стал главным академиком СССР, яровизация была переведена в политическую плоскость. Для двулетников чтобы семена могла прорастать, надо пройти период низкой

температуры. Сказали, что, если проводить яровизацию, урожай повышается в два раза. Были сделаны штаты яровизаторов, начались приписки, урожай не поднимался. Важен свет: для маленьких семян, с небольшими запасами питательных веществ. Если будут прорастать в темноте, будет катастрофично. Интересный пример: есть каперсы. Было трудно прорастать в семена. Аспирантка смоделировала прохождение семян через желудок птиц: изменение pH, поболтала в воде, увеличилась всходость на 90%.

Прорастание.

Главное для прорастания - вода, потом активируются гидролазы. Гиббереллины активируют гидролиз крахмала. ИУК активирует H^+ -помпу. Начинается прорастание. Первым появляется корешок. Для разных растений по-разному. Важно защитить апикальную меристему. Бывает крючочек, чтобы защищить ее, колеоптиль, появляется проросток, очень важны гравитропизм и фототропизм. Чувствительность ауксинов наземной части и корня разная. Механизм одинаков, но реакция различается. Активно делятся клетки там, где можно. На изгиб чаще всего работает фототропин, криптохром, фитохром тоже участвуют. Это приводит к тому, что поймали свет, перераспределяются пинны, идет латеральный транспорт ауксина, его делается больше, клеточные деления, заворот в сторону света. При гравитропизме - наоборот. Где ауксина больше, там торможение. 10^{-7} в стебле активирует, в корне – тормозит, активирует 10^{-12} .

Формирование тканей корня и побега

Формирование тканей корня

Каким образом, когда работает меристема, формируются ткани корня и побега? Что важно для формирования тканей формирующегося растения. Структура апекса корня (Рис.35). Есть покоящийся центр, существует 4 типа инициальных клеток, колумелла формирует чехлик, инициали формируют эпидермальные клетки, инициали, которые формируют стелу – перицикл и проводящую систему, инициали, которые формируют кору эндодерму и клетки коры. Поскольку инициали четко локализуются, считалось, что история, из чего формируются эти ткани, наиболее важна. Оказалось, главное – не история, а позиция. «Убийство» отдельных инициальных клеток, и анализ мутантов показали, что история, откуда происходит линия, менее важна, чем позиция.

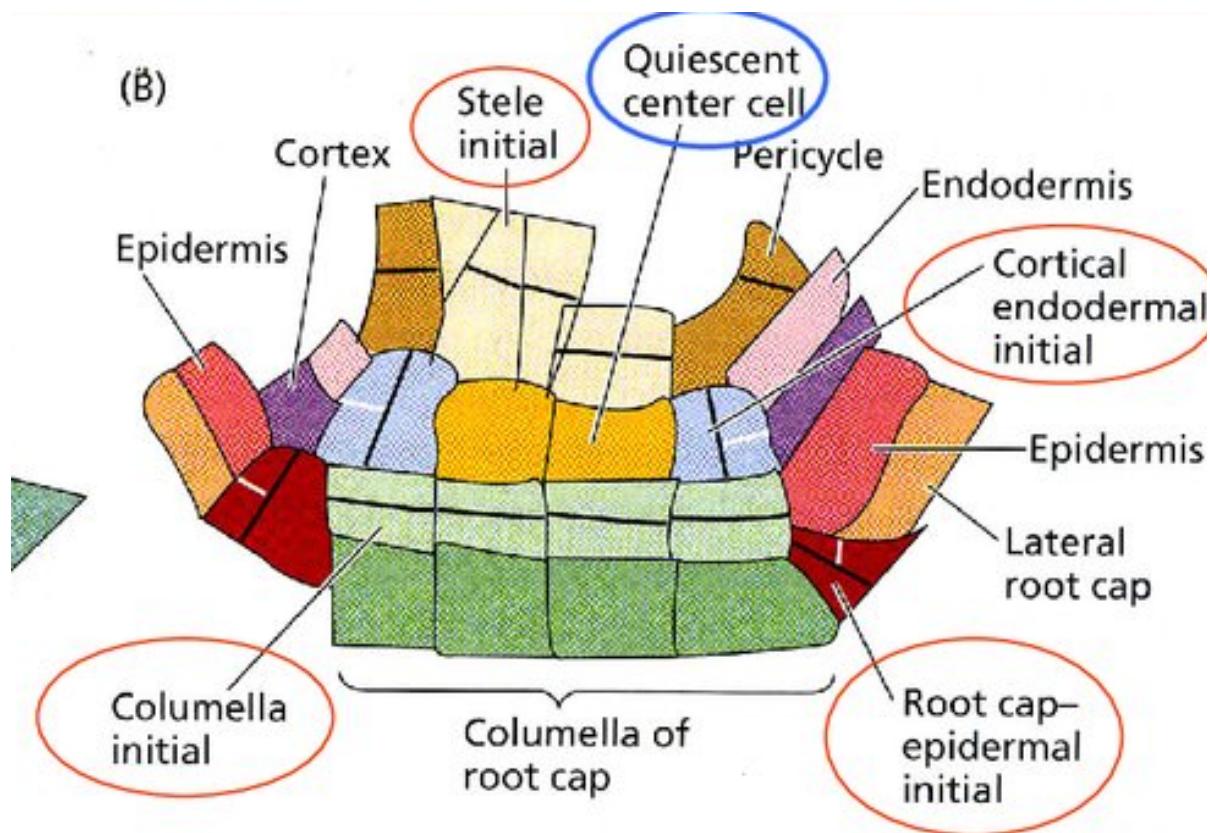


Рисунок 35. Структура апекса корня

Стволовые клетки животных - активно разрабатываемая система в науке, есть пробы использования их для лечения заболеваний, сомнительные. Немногие страны разрешают их использовать. Редко делятся, есть счетчик. Воплощение принципа, что для животных - дифференцировка сразу. Но всегда нужны новые клетки. Они возникают из стволовых. Есть эмбриональные стволовые клетки, тканевые. Для них самое главное – счетчик, конечное количество делений, еще одна защита. Чем меньше дедифференцированных клеток в организме животного, тем спокойнее с точки зрения онкологии. Дифференцируются в нужную ткань. Убийство стволовых клеток животных никогда не приводит к их замещению. Только поэтому можно считать, что покоящийся центр в апексе корня – не стволовые клетки. Убийство покоящегося центра лазером приводит к тому, что он быстро замещается, из окружающих клеток. Нет счетчика делений. Нет главных функций стволовых клеток, но есть некоторое сходство. Стволовыми клетками можно называть, но нужно помнить, что у растений все – по-другому. В развитии ткани корня чрезвычайно важна позиция. Покоящийся центр – третье отличие от стволовых клеток - медленно делится, инициали – вокруг него, видимо, основная функция покоящегося центра – сигналинг о дедифференцировке. К клеткам, которые находятся близко к покоящемуся центру, поступает сигнал, что

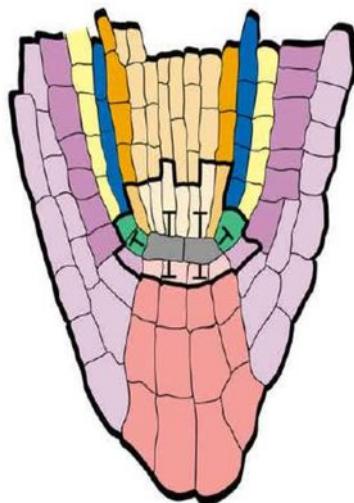


Рисунок 36. Строение корня по линиям.

дифференцироваться не надо, они должны делиться. Клетки, которые уходят от центрального участка апекса корня, уже дифференцированы, дают сигнал о дифференцировке в том направлении откуда идет сигнал. Клетки коры дают сигнал в кору, эпидермиса - в эпидермис. Происходит постоянная борьба. Чем ближе к покоящемуся центру, тем мощнее сигналы о дедифференцировке и делениях. Чем дальше будут уходить от покоящегося центра, тем мощнее сигналы о правильной дифференцировке в ту ткань, которая ближе к клетке, градиент сигналов о дедифференцировке и правильной дифференцировке определяет судьбу клеток. Система регулирования апикального развития корня. Это строение корня по линиям (Рис. 36), важна именно позиция. Много информации о изменении радиального строения корня. Существует два варианта взаимодействия. Два гена – SHR (shortroot) короткий корень и SCR (scarecrow) пугало. SHR - фактор транскрипции, активирует клеточные деления, передвигается от проводящих систем в эндодерму и по радиусу взаимодействует с SCR – тоже фактор транскрипции. Эктопическая экспрессия SHR – активация клеточных делений и аномальная специализация клеток в корневой меристеме. SCR - фактор транскрипции, необходим, чтобы поддержать клеточные деления, но не дифференциацию. Необходим для работы покоящегося центра, окружающих его клеток, асимметричных делений при формировании радиальной структуры корня. Это важно для формирования камбимальных участков, гравитропизма, ориентации побегов, гены, с которыми он связывается, целый набор. Имеет обратное влияние: ограничивает работу SHR.

Для работы меристемы корня и формирования ткани важен набор пептидных регуляторов клеток апикальной меристемы корня. CLE-белки, очень небольшие, 25 штук. У С-конца есть CLE-домен, 14 аминокислот, экспрессируются в каждой ткани формирующегося корня и вызывают ее дифференцировку в нужном направлении. У нематод, которые паразитируют на некоторых растениях, тоже нашли белки с CLE-

доменом. У разных агробактерий, тумефациенс, ризогенанс есть система синтеза фитогормонов. Не исключено, что здесь та же самая система, мимикрия некоторых CLE-белков, сейчас регуляторные белки укладываются в систему CLE-белков с CLE-доменом. Одна из них - Clavata3, участвует в регуляции не только корня, но и стебля. Вот что известно о регулировании корневой меристемы. Важна позиция и борьба сигналов дедифференцировки и дифференцировки.

Формирование тканей побега

Апикальная меристема побега. Все похоже, разные зоны побега: существует центральная зона, которая медленно делится, ее часто сопоставляют с меристемой ожидания. Есть RIB-зона – стержневая или колончатая меристема, стволовой центр, который регулирует, периферические зоны, где все делится очень быстро. По морфологии – как правило, три слоя, L1, L2, L3 – дочерние центральной зоны. Из них формируются похоже, как и в корне, линии клеток. L1+ L2 – туника, L3 – корпус, Принцип очень похож. Есть обсуждаемые стволовые клетки, клетки, которые медленно делятся. И тоже - что важно – позиция или история. Из центральной зоны идут четко оформленные три линии. Роль играют мутанты в формировании апикальной меристемы, взаимосвязь генетики с физиологией растений – известны мутанты по апикальной меристеме. Две группы: мутанты, где большая меристема (clv1-3), их несколько, это - наборы взаимодействующих белков и мутанты с недоразвитой меристемой (wus - вушель, stm – шут меристем блесс, zll – цвиттел, рогатка), это тоже набор мутантов, известно, что кодируют, что происходит. Факторы, играющие роль для формирования апикальной меристемы побега: ауксин – один из ключевых. Есть мутанты. Наиболее яркие – чашевидные семядоли, CUC1, 2, 3, кодируют близкие трансфакторы, ингибиторы транспорта ауксинов. Если дикий тип, то эти гены – трансфакторы, экспрессируются, запрещают транспорт ауксина в нужном направлении, образуются нормальные семядоли. Если это мутант и трансфактор не работает, ауксин идет в любом направлении и образуются чашевидные семядоли. Как развивается побег и работает апикальная меристема. Мутанты, которые имеют увеличенную апикальную меристему – игроки, которые регулируют размер апикальной меристемы. Известно, что кодируют. Тот же принцип, который мы говорили про корневую апикальную меристему. Многие – трансфакторы, хотя есть исключения. Stm – шут меристем блесс поддерживает «стволовые» клетки апикальной меристемы в недифференцированном состоянии; wus - вушель - поддерживает клеточные деления. Clavata1 тормоз делений, формирование органов. Когда говорили про брацциностероиды, говорили про семейство LRR-белков. Рецептор брацциностероидов и системина – LRR-белок. Это – белки, у которых имеется LRR-участок из нескольких десятков повторяющихся лейцин-обогащенных фрагментов из 24 аминокислот, которые служат для белок-белкового взаимодействия. Clavata 1, 2 относятся к тем же самым белкам zll – цвиттел, рогатка – организация, формирование меристемы. Это – главные участники формирования размера и функционирования меристемы. CLV1 и STM – антагонисты. Опять война взаимодействий. Баланс между

недифференцированным состоянием и тормозом делений/формирования органов регулирует соотношение дифференцированных и недифференцированных клеток в ответ на разные факторы. WUS (Вушель) регулируется и CLV1 и STM – посредник. В апикальной меристеме — Вушель - трансфактор, который имеет гомеодомен-бокс. Он активирует деления клеток в апексе клеток. Увеличение числа клеток увеличивает транскрипцию *clavata 3*. Вушель может напрямую ингибировать экспрессию RLR-белков, это – цитокининовый сигналинг. Клаваты – функционально связанные LRR-белки. Вушель активирует деление клеток апекса стебля, их становится много, увеличивается транскрипция CLV3, 11 кДа, водорастворим, диффундирует в зону, где клетки дедифференцированы. Попадая в этот участок, он является сигналом, попадает в центральную зону с медленно делящимися клетками, там есть его рецептор, который представляет собой CLV1, CLV2. Когда CLV3 взаимодействует с рецепторами они димеризуются, приобретают киназную активность, непростая система, есть фосфатазы и могут быть другие белки, но результат сигналинга – в активном состоянии киназы тормозят вушель. Простая система обратной связи. Вушель активирует CLV3, увеличивается размер меристемы, CLV3 – активатор его выключения, рост прекращается, когда Вушеля стало мало, CLV3 тоже стало мало, есть LRR белок-белковое взаимодействие. Через какой-то момент эта система инактивируется. Важны фосфатазы. Если она инактивируется, начинает работать Вушель. Меристемы растут пульсами. Вушеля много, увеличилась апикальная меристема. Сработала система петля обратной связи, вушель заингибировался, рост прекратился. Ингибирование прекратилось за счет фосфатаз, вушель начал работать – следующий пульс. Пульсирующая точно настраиваемая система позволяет определять размер меристемы, который есть. Нарушения и мутации по вушелю и клавате делают либо очень маленькую, либо большую апикальную меристему. С детальным механизмом можно увидеть, что важно не история, а позиция. Позиция – определяющая. Вот регулирование размера побега апикальной меристемы по принципу отрицательной обратной связи. Это – этап прорастания, семя проросло, наступает этап ювенильного развития, самоускорения ростовых процессов.

Ювенильное развитие растений

В результате получился проросток, наступает период интенсивного роста и формирование взрослого растения. Это изучено давно. Когда появляется апекс корня, апекс побега, появляется сосудистый камбий. Начинается активное ювенильное развитие растений, оно регулируется полярным транспортом ауксинов и цитокининов. Эти два фитогормона – основные эндогенно регулируемые, поскольку именно они определяют независимое от внешних факторов ускорение ростовых процессов. Это – плюсовой контур, 15 лет назад рассматривалось как компьютерная модель (Рис.37). Если будем рассматривать растение как поток концентрации ауксинов и цитокининов,

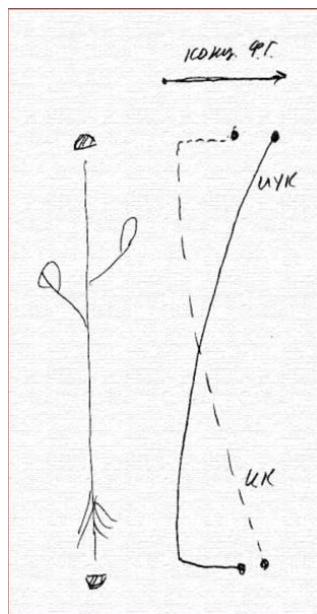


Рисунок 37. Компьютерная модель растения.

можно сказать, что основное место синтеза ауксинов – апекс стебля. Синтезируются, их много, дальше транспортируются снизу вверх. Их активная концентрация снижается. Когда дошли до корня, мы знаем, что они фонтанируют, но недалеко. Укоряя будет локальное увеличение концентрации. Аналогично цитокинины. Они транспортируются снизу вверх, доходя до апекса побега, по мере транспорта могут превращаться в активные формы и выходить во флоэму. Можно предположить, что доходят до апекса побега, там накапливаются. Получается, что в апексах побега и корня – локально высокие концентрации ауксинов и цитокининов, мы знаем, что ауксины, цитокинины – два основных гормона, которые активируют пролиферацию клеток. Чем больше будет меристем, тем интенсивнее деления. Такая компьютерная модель работала хорошо. Основная идея работает. Важно для самоускорения ростовых процессов – плюсовый контур. Существует апекс побега. Синтез ИУК, транспорт ИУК сверху вниз, основная функция ИУК – активация корнеобразования. Если будет много корней, будет увеличиваться синтез цитокининов, они транспортируются снизу вверх, из основной функции – активация роста побега. Будут активироваться побеги, синтез ИУК и т.д. Красивая идея положительной обратной связи. Это важно, чтобы пройти ювенильный этап развития. Логического нарушения нет, эти два фитогормона – основные регуляторы самоускорения ростовых процессов. Это – глобальный взгляд. Помимо мощных программ существуют подпрограммы развития. Развитие растения – это блоки. Формирование блоков. Мы не можем сказать, сколько блоков, блок – это побег. Побег – лист, пазушная почка и междуузлие. Каждый из этих блоков имеет свою схему, свой этап и программу развития.

Общая глобальная схема формирования листа.

Закладка и развитие листа. Основные события в развитии листа. 1. Закладка листового примордия – надо определить, в каком месте и в какое время будет формироваться лист. 2. Затем – какой он будет. Определение симметрии листа. 3. Формы – какой он будет – цельный, рассеченно-сложный. Закладка листового примордия – активно изучаемая вещь. Главные игроки – ауксины и цитокинины. Каким образом это происходит. Очень старая работа – по стеблю содрали участок и проанализировали концентрации ауксинов. Обнаружили, что она уменьшается, но там будут пульсы. Там, где будет пульс индолилуксусной кислоты, будет закладываться листовой примордий. Посмотрели детально. Ауксин определяется за счет перераспределения PIN-3. Схема формирования листового примордия: за счет перераспределения PINов появляются локальные импульсы ауксинов. Если будет импульс ауксинов, будет закладываться прокамбий, будет формироваться проводящая система, будет поступать цитокинин, формироваться маргинальная интеркалярная миристема. Здесь заложится примордий, будет формироваться листовая пластинка, синтез гиббереллиновой кислоты, и рост до нормального размера. Доказать – культура клеток. Если взять каллусы, положить просто ИУК, то будет формироваться проводящая система. Если будет много сахара с ИУК, то будет формироваться флоэма. Мало сахара – будет формироваться ксилема. Выделены гены, которые под действием ауксинов будут регулировать формирование сосудистых пучков, в ряде случаях связанных с цитокинонами. Еще фитохром, криптохром.

Лекция 8. Защита растений от патогенов

Абиотический стресс – кратко

В прошлую лекцию мы начали изучать проблему устойчивости растений к окружающей среде, вообще, существование растения в реальной экологической ситуации. Самое важное - насколько растение может адаптироваться к изменяющимся разным факторам окружающей среды. Среда меняется по-разному. Крупная градация – абиотические и биотические факторы стресса. В прошлый раз говорили об абиотических факторах, выяснили, что реакция на внешние неблагоприятные факторы достаточно унифицирована у растения. Сначала идет стресс-реакция, которая занимает минуты, часы, редко – несколько дней, назначение этих реакций – обеспечить выживание при стрессе. Растение не определило, что за стресс, стресс-реакция – унифицированная, мы разобрали, какие механизмы, в общих понятиях: отключение ненужных процессов, быстрая энергетика, с участием альтернативной оксидазы, синтез протекторных соединений, которые обеспечивают функционирование клеток при стрессе высокомолекулярных и низкомолекулярных. За это время растение должно определить, что за стресс – биотический, абиотический, температура, соль и перейти к специализированной адаптации – нормальному функционированию в изменившихся условиях. Мы разобрали стресс-реакцию и специализированную адаптацию, она бывает разная. При снижении температуры – важно состояние мембран (работают десатуразы) и изменение метаболизма, нужно, чтобы в цитозоле было много сахаров. Это важно, если температура отрицательная, чтобы не было образования льда. Когда засуха, важно синтезировать низкомолекулярные осмотики, которые могут снижать водный потенциал. Есть приспособительные реакции, в одних случаях унифицированные, в других – специализированные.

Биотический стресс

Сегодня мы поговорим о биотических стрессах. Растения – первичные продуценты, патогенов, организмов, которые существуют за счет них, много. Они могут относиться к разным таксонам. Растения скорее устойчивы, чем неустойчивы. Около 10000 видов грибов, которые поражают растения. К 9950 конкретное растение устойчиво, только несколько десятков может его поражать. Разные виды, разные схемы патогенеза.

Понятия и термины

Устойчивость к биотическим факторам, патогенам изучает фитоиммунология (первичные реакции на патогенез) и фитопатология (отдаленные последствия заражения растения). Оба предмета – серьезные курсы, которые читают на низших растениях, мы кратко пройдемся по этой проблеме.

Растительный патоген – гриб, вирус, бактерия – те организмы, которые осуществляют жизненный цикл внутри растения и вызывают у него болезнь.

Патогены:

1. Некротрофы питаются убитыми растениями их называют «паразиты теплого трупа», органическими веществами предварительно убитых клеток. Малоспецифичны по отношению к растению-хозяину. Это не очень эффективно, потому что каждый раз убив растение, надо искать новое. 2. Биотрофы – монофаги, специализированы к конкретным растениям. Существуют с живыми клетками растения, питаются органическими веществами живых клеток растений. Появляются в результате коэволюции, сопряженной эволюции растения и микроорганизма, узкоспециализированы. Коэволюция представляет собой огромный интерес.

Свойства: вирулентность - свойство биотрофных патогенов поражать конкретный вид организмов, организмов, зависит от свойств патогена и чувствительности хозяина.

Патогенность - видовое свойство возбудителя, характеризует его способность размножаться и вызывать патологические изменения в организме хозяина.

Агрессивность - степень поражаемости растений, количественная мера патогенности. Иммунитет - степень устойчивости: полная невосприимчивость;

устойчивость - слабая восприимчивость, основывается на реакциях, ответственных за иммунный ответ;

толерантность - высокая восприимчивость при слабом снижении продуктивности. Причины широкого распространения растительных патогенов и их агрессивности.

- 1) Существенна коэволюция растения и патогена. Бывают разные типы патогенеза.
- 2) Эффективна и быстра репродукция патогенов, он часто размножается в период наибольшей скорости роста растений.
- 3) Патогены вырабатывают высокоэффективные механизмы распространения: вода, ветер, водные потоки, векторные организмы (насекомые).
- 4) Наличие специальных структур (спор, цист и др.), позволяющих долго выживать (десятки лет). Формируются к концу вегетативного периода растений.
- 5) Быстро образуются новые формы патогенов. Многие патогены гаплоидны. В гаплоидную фазу наибольшая скорость репродукции, что позволяет мутациям и последующему половому процессу создать огромное количество рекомбинантных генотипов что дает преимущество в отборе. Быстрая эволюция. Эпифитотии, вспышки заболеваний появляются в связи с возникновением новых форм патогена.
- 6) Монокультуры - одинаковые, близкие сорта. Это позволяет патогену быстро к ним адаптироваться.

Типы патогенов

Грибные инфекции. Считается, что микробные в основном поражают животных, грибные - растения. Отчасти правильно.

Грибные инфекции наиболее неприятны для растений. Серая грибная плесень – *Botritis cinerea* – некротроф, поражает растения разных семейств. Фитофтора (*Phytophthora infestans*) - полубиотроф. Поражает растения семейства пасленовые. Кладоспориум (*Cladosporium fuvulum*) - чистый биотроф. Поражает несколько видов ликоперсика (*Lycopersicon*).

Микробные инфекции. Считается, что не очень распространены для растений. *Xantomonas campestris* размножается внутри полисахаридов, экскретируемыми клетками, вызывает гниль листьев капусты. Некоторые патогены (грам - отрицательные палочки родов *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*), и для растений, и для животных одинаково патогенны. Это - активно развивающиеся системы. Известны гены, которые необходимы для инфекции и растений и мышей. *PlcS* - фосфолипаза. *ToxA* – экзотоксин, *gac1* – регулятор транскрипции генов *hgr*. Идентифицированы три, на самом деле больше. Биотрофы - наиболее изощренная система. *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* - высокоспециализированные биотрофы. Каким образом происходит патогенез: поврежденные - клетки синтезируют ацетосеренгон, маленькая молекула, он является сигналом к тому, что активизируются гены вирулентности (*vir*), расположенные в *Ti*-плазмиде, *vir*-гены вовлечены в хемотаксис в направлении растения и прикреплении бактерии к клеткам. Ее связывание с растительной клеточной стенкой инициирует синтез ДНК. ДНК (участок *Ti*-плазмиды) переносится в растения, транспортируется в ядро и интегрируется в растительный геном. Система инфекции сначала использует в свое благо систему защиты, потом ее уничтожает, такая война - взаимодействие растений и биотрофа (патогена) - война за выживание. В результате участок *Ti*-плазмиды встраивается в геном растения. Начинается его экспрессия, при этом начинается синтез фитогормонов (очень короткий цикл, всего два фермента), что вызывает опухоль. Другое соотношение гормонов у *Agrobacterium rhizogenes*: в любом месте, где прошла инфекция, будет щетка корней, там будут размножаться бактерии, потом будут синтезироваться опины, коньюгаты аминокислоты с карбокислотой, которыми бактерии питаются, есть фермент, его расщепляющий. У растения его нет. Это – пример тонкой подгонки патогена и растения. Система *Ti*-плазмиды используются в генной инженерии.

Вирусы: не так часты, но 30% урожая картофеля пропадает из-за них. Вирус табачной мозаики изучен. Вирус капусты, из него взят 35s-промотор.

Нематоды - проблема картофелеводства.

Растительноядные насекомые. Очень много патогенов.

Взаимодействие патоген-растение.

Супрессоры защитных реакций растений

У патогена есть орудия нападения, которыми он проникает в растение, или убивает, или изменяет метаболизм. Растение должно отследить атаку патогена и ответить на нее. Оружие патогенов - чаще всего патоген должен выключить или убрать все защитные реакции растений. Супрессоры защитных реакций (Схема 2) могут быть неспецифичные и

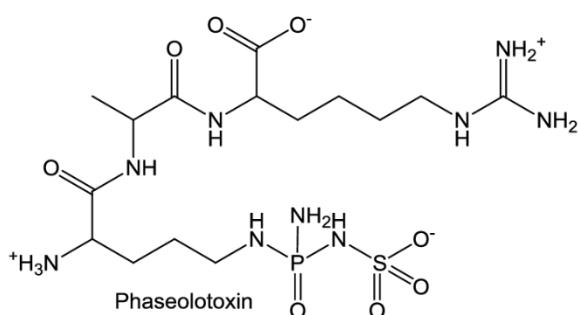


Схема 2. Супрессоры защитных реакций растений

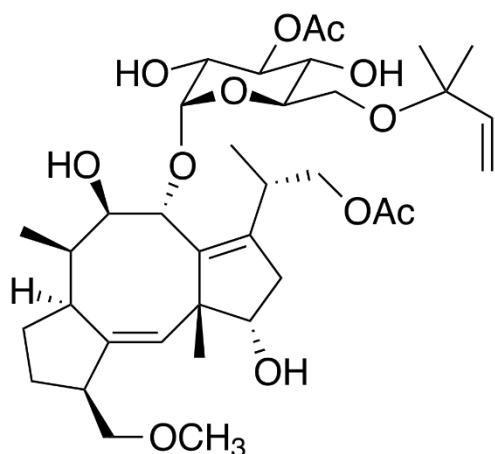
специфичные. Неспецифичные чаще всего характерны для некротрофов. Специфичные - для биотрофов. Гриб может вырабатывать низкомолекулярные и высокомолекулярные супрессоры. Чаще всего высокомолекулярные - ферменты. Деполимеразы. Низкомолекулярные - вивотоксины, фитогормоны. Чаще используются биотрофами. Специфичные - нетоксичные, токсичные. Нетоксичные - импедины, разные метаболиты, которые встраиваются в обмен растений, могут быть ферменты, деградирующие различные продукты. Токсичные - токсины.

Высокомолекулярные неспецифические супрессоры. Чаще всего - ферменты, которые разрушают покровы растений: кутикулы, воска, ферменты, которые разрушают клеточные стенки. Пептиназы, пентилметилэстеразы, отщепляют метильные группы метоксильные, открывается карбоксил, туда садится кальций, клеточная стенка меняет свойства набухает и легко проницаема. Могут быть полигалактороназы, которые разрушают пектины, пектатлиазы. Разрушив пектины - разрушим клеточную стенку, она становится рыхлой, туда проникает патоген. Чаще всего для некротрофов это - в больших количествах. Когда клеточная стенка разрушается, клетка лопается. Для биотрофов - тоже характерно, но локально. Они делают ослабление клеточной стенки, чтобы можно было проникнуть внутрь.

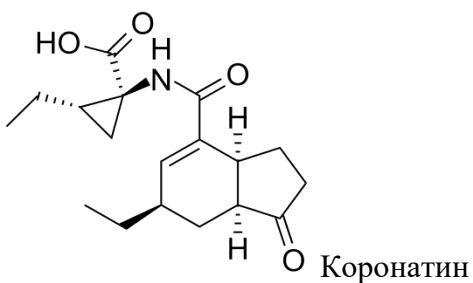
Низкомолекулярные неспецифические супрессоры: их довольно много, вивотоксины, мощное оружие некротрофов. Важны концентрационные вещи: ферменты для биотрофов тоже характерны, но в более низких концентрациях. Вивотоксины



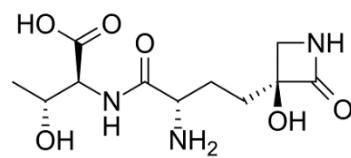
Фазеолотоксин *Pseudomonas savactanoi*



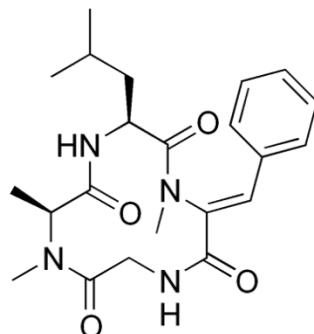
Фузикокцин *Fusicoccum amygdali*



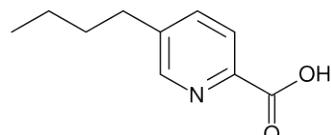
Pseudomonas syringae



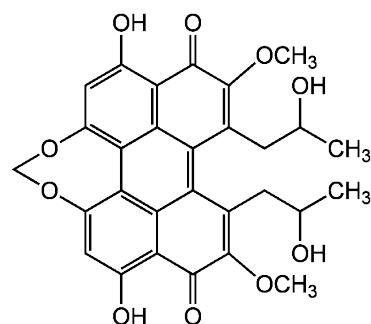
Табтоксин *Pseudomonas syringae*



Тентоксин *Alternaria alternata*



Фузариевая кислота *Fusarium oxysporum*



Церкоспорол *Cercospora beticola*

Рисунок 38 Некоторые вивотоксины грибов и бактерий

выделяются патогеном в зараженном растении и либо его убивают, либо нарушают его метаболизм. Их - 4 группы: 1) ингибиторы ферментов растений. Табтоксин. У

pseudomonas - ингибитор глутаматсинтазы. Фазеолотоксин, то же самое, Тентоксин. Обычно довольно жесткие, чтобы уничтожить.

2) Хорошо работать с мембраной. Если клеточная стенка вызывает лизис мембранны, то можно воздействовать и на мембранны напрямую, нарушив обмен (работу насосов), проницаемость мембранны, можно вызвать гибель клетки. Фузариевая кислота у грибов *fusarium*. Коронатин, сирингомицеты у бактерий *Clavibacter*, *Pseudomonas*. Основная функция – либо нарушение работы транспортеров на мембранных, либо мембранны.

3) Часто токсины – генераторы активных форм кислорода. Пренилированные хиноны грибов. Фотосенсибилизаторы на интенсивном свете. Активные формы кислорода могут быть как защита, так и мощная форма нападения.

4) ингибиторы синтеза белков – трихотециновые у фузариевых. Фузариоз – с одной стороны, болезнь монокультур, но токсичны для человека.

Примеры вивотоксинов у грибов и бактерий (рис. 38): очень разные структуры. И липидные вещи, и фенольные соединения, и необычные аминокислоты, и изопеноиды.

Пример фузикокцина – практически неодолимая система токсина. АТФаза Р-типа на мембране, делает энергизованную мембрану, она очень хорошо регулируется, есть фосфат, на него садится 14-3-3-белок, фузикокцин садится на аспартиловый конец АТФазы и делает ее постоянную активность, имитирует 14-3-3 – белок. Если НАТФаза работает постоянно, это приводит к истощению и гибели растения.

Защита растений

Первый круг обороны

Растение выстраивает оборону эшелонами. Существуют круги обороны, которые в зависимости от опасности и специализации патоген может пройти или не пройти. Первый круг – должна быть граница. Система конститутивных защитных соединений, которые 1) постоянно присутствуют. 2) Как правило, не специфичные (широкого спектра действия), отсекают случайные патогены, 3) не очень активны, не очень токсичны. Идеальный вариант – летучие соединения, отстрел на дальних подступах. Одному растению это сложно делать, энергетически невыгодно. Иногда растения кооперативно работают, совместные выделения эффективны. В хвойных лесах дышится по-другому, выделяются эфирные масла, как правило, моносесквитерпеноиды (Рис.39), они обладают довольно широким спектром действия: α -, β -пинены – монопирены – инсектициды. Также – мирцен, камfen, пиретрин-1. Аллелопатическое действие: лимонен, цинеол, карвон, камфора, репелленты: ментол, непаталактон, α -пинен, против травоядных 1,8-цинеол. Линалоол – привлечение опылителей. Структура очень разная. Это трудно доказать. Если в хвойном лесу много эфирных масел, не значит, что они специально выделяются. Действительно, в хвойном лесу в воздухе почти нет микробов. При механическом повреждении в смоле пихты изменяется содержание компонентов эфирных масел: пинена, каурена, мирцена. У устойчивых к абиотическому стрессу

растений (загрязнение атмосферы) много камфена и лимонена, но мало β -пинена, и наоборот. После стресса (обработка SO_2) в 5-10 раз повышается содержание камфена α - и β -пиненов. Коррелятивные вещи есть. Многие

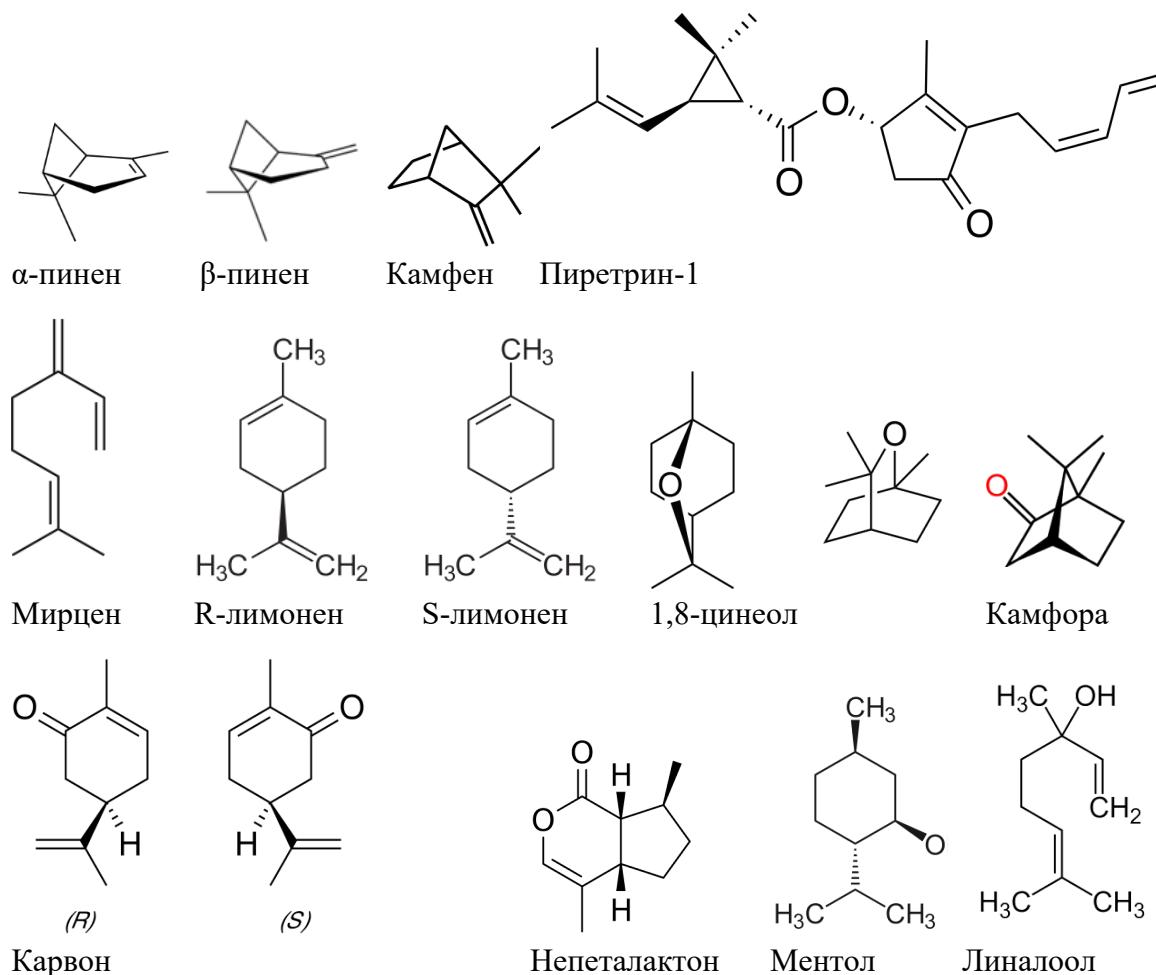


Рисунок 39. Защитные соединения первого круга обороны: изопреноиды

эфирные вещества, которые выделяются не только хвойными – и роза, и лаванда, обладают инсектицидными свойствами и могут рассматриваться как вещества первого круга обороны. Мало примеров, когда строго доказано, что вещество – защита против многих случайных патогенов. Априори можно предполагать, что они должны быть на поверхности растения. Часто накапливаются в коре, в корке, в эпидермальных клетках. Пример – гликоалкалоиды картофеля. Картофель – причина картофельных бунтов. Когда Петр Первый привез картофель, крестьяне ели ягоды, травились. В наземной части гликоалкалоидов много, токсичны. То, что токсичны – не доказательство.

Доказательство – есть похожий изопреноид, тритерпеновый гликозид Авенацин A1 (по синтезу изопреноид, по форме – гликоалкалоид). Присутствует в корнях овса, его нет у пшеницы, ячменя. Гриб *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* поражает ячмень и

пшеницу, но не овес. Авенацин A1 (Рис.40) расположен по периметру корня. Появился вариант гриба, у которого есть фермент авециназа, отщепляющий 2 сахара у Авенацина

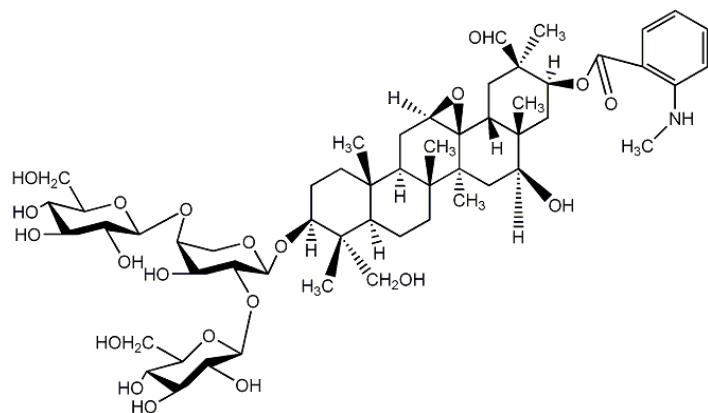


Рисунок 40. Авенацин A1.

A1. Получающееся соединение нетоксично, гриб паразитирует на этом овсе. С одной стороны – доказательство коэволюции, какой-то гриб нашел, как избавиться от этого соединения, с другой это - плюсы и минусы первого круга обороны: вещество постоянно присутствует, это хорошо, но позволяет патогену найти обходные пути. Еще пример: нормальные гликоалкалоиды – против многих грибов. Колорадский жук – очень серьезная вещь. Вавилов говорил, что надо искать гены устойчивости в месте

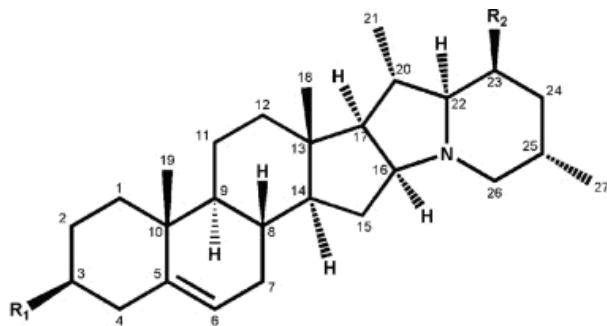
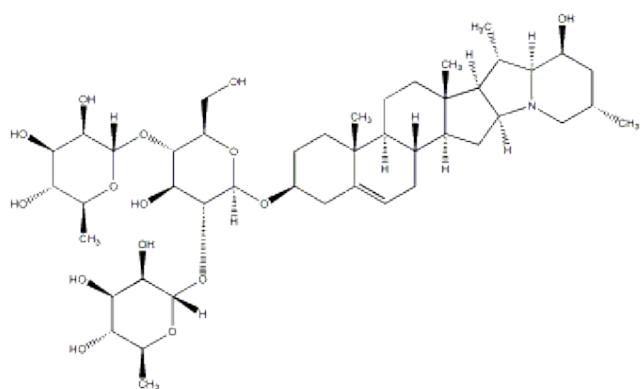
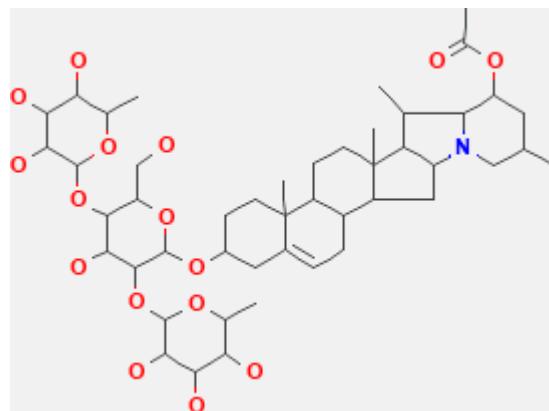


Рисунок 41. Гликоалкалоиды картофеля

происхождения и длительной коэволюции патогена и растения. Есть *Solanum chacoense*, его никогда не ест колорадский жук. Оказалось, что у него есть варианты гликоалкалоидов, где по 23-му положению есть гидроксил (Рис.41). Если его ацилировать, получаются лептины (рис. 42) – варианты гликоалкалоидов, которые делают этот вид картофеля устойчивым к колорадскому жуку. Это – вариант коэволюции, всего 2 фермента: специфичная гидроксилаза и метилацилтрансфераза могут сделать устойчивым культурный картофель. К тому, что делают с помощью генноинженерных подходов, жук приспосабливается за 8-10 генераций. Возражения против трансгенов - очень далекие гены. Здесь можно попробовать сделать скрещивания. Это делали, но терялась продуктивность. Гликоалкалоиды будут в



А - Лептинин I



Б - Лептин I

Рисунок 42 Гликоалколоиды *Solanum chacoense*: Лептинин I и Лептин I

надземной части. Кроме токсических соединений, растения используют анатомические и морфологические факторы: механические барьеры - корка (пробка) с суберином (полимер оксимоно- и дикарбоновых кислот) и лигнином (гетерополимер фенилпроновых производных кумаринового, кониферолового и синанового спиртов); кутикула, где воска (смесь сложных эфиров длинноцепочечных спиртов и жирных кислот, углеводородов и др; перидерма (разновидность механического барьера, естественная либо раневая).

Всякие механические препятствия для проникновения патогена: опущенность листьев – хорошо известно, что сорта малины с опущенными листьями меньше поражаются фитопатогенными грибами. Даже строение и расположение устьиц: мандарин больше устойчив к раку *Xanthomonas citri*, чем грейпфрут, потому что на устьицах есть выступы, которые предотвращают попадание возбудителя.

Морфолого-химические факторы: волоски крапивы со жгучими растительными аминами. Чешуйки лука и чеснока с аллиинами и алицинами серосодержащими. Смоляные ходы хвойных деревьев с токсичным изопреноидом. Шипы, колючки.

Растение в силу с невозможности передвигаться должно все переводит на биохимический уровень (яды, токсичные белки) либо на морфологический.

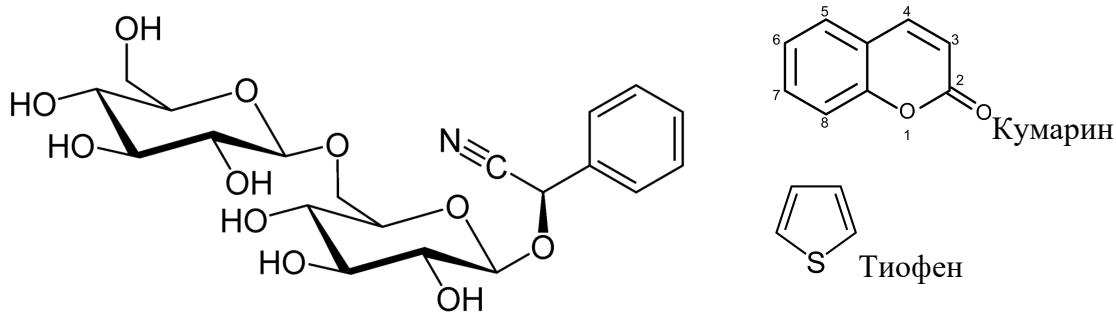
Еще пример 1 круга обороны: в коре тиса есть очень сложные дитерпеноиды с флаваноидами, за счет этого он очень токсичен. Есть байка, что Иван Грозный поил тех, кого хотел отравить, из тисового кубка. Выпившие из кубка умирали. Еще вариант использования защитных соединений первого круга обороны - в тисе есть дитерпеноид, таксол (см. ниже), самое дорогое на сегодняшний день противоопухолевое лекарство. 1 кг стоит около трех миллионов долларов. На лечение одного пациента надо спилить пять деревьев. Еще пример комплексного действия систем первого круга обороны - сосна. Лес защищается от короедов-тиографов, деревья переживают атаку жуков, т. к. выделяют много смолы. В смоле - дитерпеноиды и эфирные масла, токсичные. Короеды погибли, вытекшая смола их удалила, после испарения эфирных масел, монотерпенов и

воздействия воздуха дитерпеновые смоляные кислоты затвердеваются и формируют пробку, которая запечатывает рану.

Минусы первого круга обороны – к веществам этого круга можно приспособиться, это довольно затратно. Нужно синтезировать очень много этих соединений. Еще минус веществ первого круга обороны – их токсичность для самого растения. Накапливаются в корке, в мертвых клетках, идиобластах, в эпидермальных клетках. В больших количествах накапливаться не могут.

Второй круг обороны

Это полуиндуцибельные или полуконститутивные защитные соединения (Рис.43). Синтезируются для более серьезных патогенов, которые прошли первый круг. Синтезируется не активное вещество, а неактивный, нетоксичный предшественник. Плюсы: можно накопить много соединений, получающийся продукт будет более токсичен, чем исходный продукт. Минусы: нужно время на превращение и система сигналинга. Примеры: цианогенные гликозиды у южных розоцветных. Нельзя варить варенье с косточками, можно отравиться (миндаль), в миндале есть амигдалин.



Амигдалин

Рис. 43 Вещества второго круга обороны

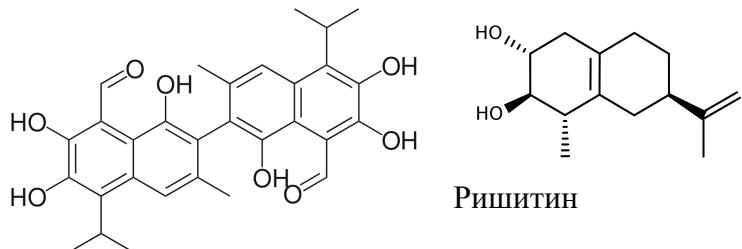
Общая формула: есть сахар, два радикала, разные - алифатические, фенольные, любые и CN-группа). Все хранится в вакуоли (чаще), в периплазматическом пространстве, в таком виде нетоксичны. Если вакуоль нарушается, то в цитозоле находится фермент, который отщепляет сахар, образуется ацетонитрил, он нестабилен. Быстро формируется вариант ацетона и синильная кислота, она токсична. Одноферментной реакцией делается из предшественников мощное вещество. Гликозиды горчичных масел: Агликон-S-НН-O-C₆H₁₁O₅. Тут то же самое, в них входит глюкозинолаты, глюкоза и NOSO₃, находятся в вакуоли. Если работает фермент, который образует сахар, образуется нестабильный агликон, который дает тиоцианат, изонитрил или изотианат, все вредно и неприятно, жгуче. При резке редиса, хрена образуются. В цианогенном гликозиде - кислород, в гликозидах горчичных масел – сера. О-гликозиды могут щепиться любыми гликозилазами, S-гликозид – только мирозиназой. У крестоцветных - более надежно. Часто есть пары активных соединений - кумарины из оксикиоричных кислот. Чаще всего

гликозиды, могут быть тиофены. Пара токсичное вещество и нетоксичный предшественник, которые очень быстро превращаются друг в друга, фермент и исходный предшественник часто распределены в разные компартменты (внутриклеточно и по растению), быстрое превращение в токсичное соединение - свойства веществ второго круга обороны.

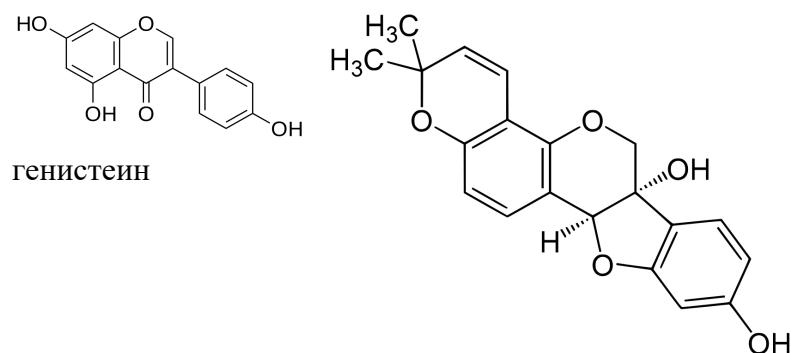
Третий круг обороны.

Самая серьезная система взаимодействия патогена и растения - когда речь идет об очень специализированных патогенах, которые нацелены именно на данный вид. Тонкая настройка. Существует реакция, которая называется реакция сверхчувствительности: большой фрагмент растения погибает, когда гриб еще на дальних подступах. Это – стратегия гибели части во имя выживания целого. Есть специализированный гриб, который намеревается атаковать растение. Никто из нас не может существовать, не выделяя в окружающую среду чего-то. Это могут быть слущивающиеся клеточные стенки, вивотоксины, олигосахарины, полисахариды, ферменты на клеточной стенке, фрагменты клеточной стенки, продукты нападения гриба - экзометаболиты постоянно присутствуют у любого организма, в том числе у патогенного гриба. Те из них, на которые у растений сформировался рецептор, называются элиситорами. Перевод – провокатор. Это - соединения, которые гриб не специально выделяет, они выдают гриб растению. Очень часто один из вариантов ухода от взаимодействия – гриб статается закрыться, покрывает себя оболочками. Если гриб далеко, но элиситер сработал и связался с рецептором, то запускается реакция сверхчувствительности. Активируется довольно много ферментов, часто – ферменты, которые продуцируют активные формы кислорода. Наступает окислительный взрыв. Образуются супероксид-анион, пероксид. Если их накопить в клетке достаточно много, они будут токсичны для гриба. Главное - часто запускается процесс апоптоза – запрограммированной клеточной гибели и погибает довольно большой участок растения. Следующий этап – у погибших клеток начинается развал клеточных стенок. Он таким образом разваливается, что образуются фрагменты (у многих двудольных есть фукоза, один из фрагментов фукоксилоглюканов) фукоза, а также фрагменты некоторых пектинов становятся сигналами. В отличие от олигосахаридов они называются олигосахаринами. Они формируются в мертвых клетках, для живых клеток, которые находятся вокруг очага поражения, являются сигналами синтеза защитных веществ: вторичных метаболитов, которые будут очень токсичными. Называются фитоалексинами (Рис 44), «аликс – защита», убивают все). Очаг сверхчувствительности выполняет вторую функцию: сюда эти соединения поступают из здоровых клеток, причем олигосахарины запускают синтез *de novo*, считывание генов. Не только фитоалексины: могут считываться глюканы, которые будут разваливать гриб, PRP – pathogen related proteins, дальше – игра на скорость. Если очаг сверхчувствительности достаточно большой, если сработало довольно быстро (минус системы – время на то, чтобы понять сигнал, убить клетки, срабатывание

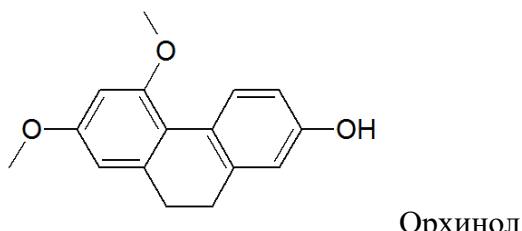
Сесквитерпеноиды



Изовлаваноиды



Дегидрофенантрены



Полиацетилены



Стильбены

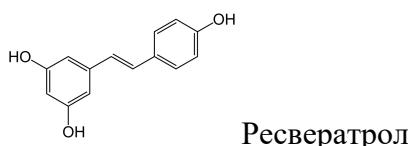


Рисунок 44 Фитоалексины

олигосахаринов, синтез *de novo*, возвращение синтезированных веществ в очаг сверхчувствительности), если гриб достаточно далеко, достаточно медленно идет, все может сработать, то к моменту его прихода все готово к его встрече, гриб погибает. Если гриб успеет проскочить очаг сверхчувствительности, он будет поражать растение. Даже маленькие вещи, чуть-чуть более толстая кутикула может играть роль.

Фитоалексины: группа Метлицкого, известный фитопатолог, его ученица Мережковская до сих пор здравствует. Ришитин и любимин – по названию сортов картофеля Ришелье и Любимец. Госсипол в хлопке, интересный димерный сесквитерпеноид, изофлаваноиды у бобовых генистейн, глицеоллин I, дегидрофенантрены орхинол,

полиацетилены сафинол сложноцветные, похож на цикутотоксин. Стильбены ресвератрол. Очень разная структура.

Фитоалексины: 1) очень токсичны, 2) почти никогда не бывают в здоровом растении и 3) синтезируются только в ответ на патогенез. Допустим, гриб не смог заразить растение, растение становится устойчиво, получило ген резистентности R. Гриб может выработать какое-то вещество, экзометаболит, которое закроет этот рецептор так, что он не сработает. Гриб подходит, рецептор закрыт, ничего не срабатывает, сверхчувствительность не включается, гриб поражает растение, у него появился ген вирулентности V. Растение делает рецептор, который связывает вещество V более эффективно, чем первый, перехватывает его, первый рецептор открывается, все срабатывает, то есть, растение получает ген устойчивости R1. Гриб вырабатывает еще одно соединение, которое закрывает R1, оно связывается растением, у гриба появляется ген вирулентности V2 и т.д. Происходит постоянная коэволюция, система называется «ген на ген». На самом деле все сложнее, читается в нормальном курсе фитопатологии, сейчас рассказан принцип. Было резистентное растение, у гриба появился ген вирулентности, растение адаптировалось, у него появился ген резистентности R1, гриб адаптировался, научился связывать продукт этого гена, у него появился ген вирулентности V2, у растения получается R2 и т.д. Если у растения есть ген устойчивости, оно абсолютно, или почти абсолютно устойчиво. Если у гриба есть ген вирулентности, растение абсолютно неустойчиво. R и V1. Если появляется ген резистентности R1, оно абсолютно устойчиво, вирулентности V2 - неустойчиво. Это – система вертикальной устойчивости, или «ген на ген». Система горизонтальной устойчивости – растения могут быть относительно устойчивы, но не на 100%. За «ген на ген» отвечает система третьего круга обороны, первого и второго - за систему горизонтальной устойчивости. В сельском хозяйстве раньше считалось, что нужно иметь абсолютную устойчивость (получается, что это неэффективно), сейчас – что относительную. При горизонтальной устойчивости 20-30% урожая теряется, зато устойчивость – против очень многих патогенов. И есть методы ее повышения.

Примеры защитных соединений

Фитоалексины – вторичные метаболиты - далеко не единственная система вертикальной устойчивости. Кроме них есть – ферменты, хитиназы, целый набор других низкомолекулярных защитных соединений, чаще всего это PR – белки (pathogenesis related proteins). Хорошо изучены для табака, их несколько групп. Направлены на разные аспекты метаболизма патогенов.

PR1 - у однодольных и двудольных, ингибируют прорастание спор, накапливаются в некрозах, имеют гидрофобный участок N-терминальный, чтобы пройти через мембрану.

PR2 – β -1,3-глюканазы, разрушают клеточные стенки грибов, выщепляют (возможно) элиситеры или супрессоры.

PR3 – эндохитиназы, разрушают клеточные стенки грибов.

PR4 - Хитин-связывающие белки, обладают антигрибной активностью.

PR5 - обладают антигрибной активностью, предполагается, что являются ингибиторами пищеварительных ферментов у насекомых.

PR – белки могут быть и горизонтальной и вертикальной устойчивости. Разрушают клеточные стенки грибов. Многие вещи связаны с особенностями клеточной стенки грибов. Чаще всего – лептины, на N-ацетил-глюкозоамин (хитин). Поэтому гриб закрывается чехлом. Растения вырабатывают хитиназы, эндохитиназы – безвредны для них.

Антивирусные белки: бывают конститутивные EAVP (endogenous antiviral proteins), первый круг обороны чаще всего и индуцибельные IAVP (induced antiviral proteins) – третий круг обороны.

Механизмы защитного действия EAVP:

Агрегация с вирусом, ингибирование стационарной фазы развития вирусной инфекции, индукция системной устойчивости к вирусу (третий круг обороны), ингибирование репликации вируса путем блокирования белкового синтеза.

Механизмы защитного действия IAVP: ингибирование репликации на поздних стадиях развития вирусной инфекции,

выполняют функцию сигнальных молекул при развитии системной приобретенной устойчивости к вирусной инфекции.

Сигналинг - общая схема ответа клетки растения на атаку патогена при работе третьего круга обороны.

Во-первых, сигнал (Рис.45): сейчас считается, что одна из основных сигнальных систем – NADFH-оксидаза. Долго считалось, что их две - NO-синтаза, NO – интересная молекула, в высших растениях она есть, все очень похоже на животные, до сих пор NO-синтазу в растениях никто не нашел. NO есть, фермента, который его синтезирует, не нашли, считается, что NO работает, но как сигнал от самых разных систем, когда работает что-то с нитратредуктазой, с обменом азота, нитрилы, ацетонитрилы, очень много источников NO. Сейчас формируется парадигма, что NO – интегральный сигнал, который синтезируется из разных мест, не очень специфичен, но общий показатель стресса. После того, как сработали эти системы, работает пероксид водорода, происходит окислительный взрыв, пероксид является еще одной сигнальной системой, дальше работают салицилаты – системная устойчивость (пока говорим о локальной),

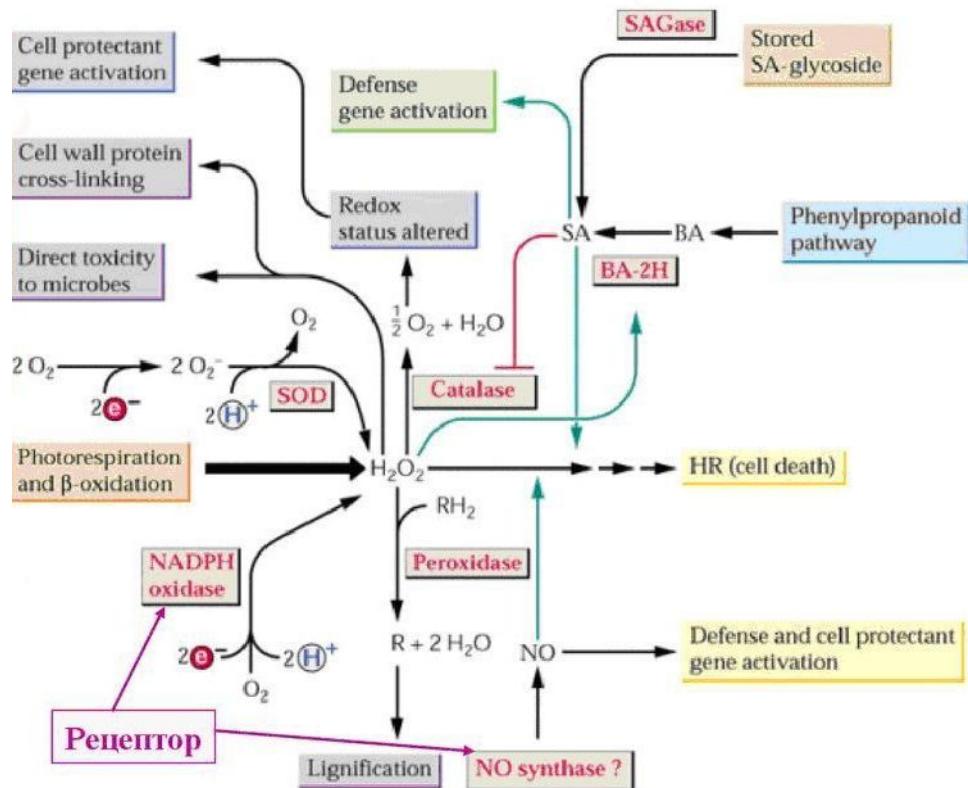


Рисунок 45 Общая схема ответа растения на атаку патогена

супероксиддисмутазы, и активные формы кислорода с перекисью водорода, которые будут действовать на клеточные стенки. Сшивочная пероксидаза, которая образует лигнины делает нерегулярную сшивку оксикоричных спиртов: активация активных форм кислорода будет способствовать укреплению клеточной стенки. Также пойдет реакция сверхчувствительности. Очень жесткая система сигналинга и разноплановый ответ на патогенез, в котором ключевой момент – активные формы кислорода. В растениях всегда есть дублирование, однозначно работает NADFH-оксидаза, вторичные мессенджеры – O_2 , H_2O_2 , будет укрепляться клеточная стенка. NO-синтаза – под вопросом, в любом случае NO тоже будет работать. NADFH-оксидаза работает в плазмалемме, NO работает в цитозоле, дальше переход к реакции сверхчувствительности и системной устойчивости. Для систем трансдукции сигнала сейчас обсуждаются разные киназы. Для многих растений нашли гомологии систем трансдукции сигнала: циклин-зависимые киназы, мембранные, МАР-киназные каскады, большинство из них приводит к реакциям сверхчувствительности, возможен перекрест этих сигналов, Вертикальная устойчивость – реакция сверхчувствительности, при переносе сигнала есть и кальциевый сигналинг, и потоки ионов, циклин-зависимые киназы, кальмадуллин, активные формы кислорода, фосфолипиды, МАР-киназный каскад, салицилат и жасмонат работают не только на локальной устойчивости в очаге сверхчувствительности, но и системной устойчивости. Если неспецифичный элиситер, системы трансдукции сигнала не будет, в лучшем случае (горизонтальная устойчивость)

индуктор превращения предшественников в активные соединения, часто это – не столько сигналинг, сколько физические нарушения: плазмалемма нарушается, или тонопласт.

В результате гриб нападает токсинами или ферментами, которые разваливают клеточную стенку, главное – будут элиситеры. Они сработают, образуется очаг сверхчувствительности, через олигосахариды запустится синтез многих веществ – фитоалексинов (образуются за счет запуска терпеноидного метаболизма, фенольного метаболизма), если индуциальный синтез фитоалексинов – третий круг обороны, первый-второй – конститутивно работающие метаболиты. Апоптоз – через цистеиновые протеиназы вызывание очага сверхчувствительности, гибель клетки. Пероксидазы – укрепление клеточной стенки, очень много систем, которые укрепляют клеточную стенку (каллозосинтазы), ингибиторы глюканаз, протеиназ, которые будут убивать гриб, и дефензины – интересные белки, которые очень токсичны (некоторые PR-белки).

Системный ответ

Если попадает гриб локально, надо, чтобы все растение ответило.

Этапы ответа растения на вторжение патогена:

1. Непосредственный ответ. Попал патоген, сработал сигналинг: активные формы кислорода, NO-синтаза, NADPH-синтаза, затем ионные каналы – участники кальциевого сигналинга, дальше белки фосфорилируют-дефосфорилируют – система трансдукции сигнала, изменяется цитоскелет, все приводит к реакции сверхчувствительности и индукции генов ответа. Это – отдельные клетки, в самом худшем случае – реакция сверхчувствительности.
2. Затем – локальный ответ. Возникает локальный участок активации генов. Будет активироваться вторичный метаболизм, изменяется клеточное деление, будут синтезироваться PR-белки, будут накапливаться салициловая и бензойная кислоты как токсичное соединение и сигналинг – самое важное для дальнейшей трансдукции – этилен и жасмонат. Дальше – укрепление клеточной стенки. Следующее – системный ответ всего растения.

Сигналинг при поедании насекомыми

Про него чуть позже, сигналинг при поедании насекомыми: про патогенез грибной активно разрабатывают, про микробов известно похоже, но меньше. Про насекомых, теплокровных было известно мало, появляются работы, в которых говорится, что там интересный сигналинг и все похоже на грибные инфекции.

Сигналинг грибов – элиситеры, провокаторы, гриб подходит медленно, насекомые прилетели, погрызли, улетели. В растениях жирные кислоты специфичны: Дельта 9, 12, омега-3. Линолевая, или линоленовая кислота – незаменима для животных. У насекомых ее нет, есть много аминокислот. Когда насекомое что-то съело, в слюну попадает

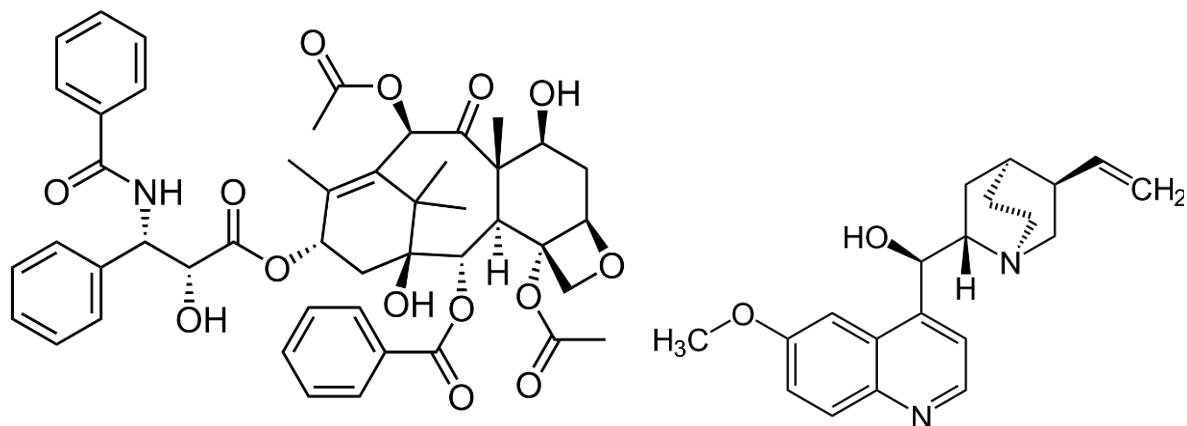
ненасыщенная жирная кислота, еще лучше – гидроскилированное производное, еще лучше – несколько гидроксилов, реагирует с аминокислотой, чаще с глутамином, образуются нестандартные гидроксилированные производные амидов жирных кислот. Они – элиситеры атаки насекомых. Являются сигналом для запуска синтеза липоксигеназной системы (реакция сверхчувствительности для насекомых неэффективна), образуется жасмонат, который потом запустит систему устойчивости. Если насекомое случайно погрызло и улетело, ничего не происходит. К следующему разу образуются защитные вещества. Все срабатывает не сразу, а, как минимум, при повторной атаке. Если насекомое-индуктор или гриб попадают в растение, то работают две органеллы – хлоропласти и пероксисомы, в результате запускается синтез жасмоната через липоксигеназу. Он запускает конечные продукты защиты от поедания насекомыми. Работают: ингибиторы α -амилазы, характерно для бобовых, они прекращают гидролиз крахмала насекомыми. Синтез лектина, который связывает эпидермальные клетки в желудочно-кишечном тракте насекомых, нарушают пищеварение, ингибиторы протеиназ, тормозят переваривание белков.

3. Возникновение системной устойчивости растений - как все растение реагирует на патогенез. Показано для пасленовых: либо погрызло насекомое, либо очаг сверхчувствительности для грибов, происходит следующее - в месте поедания в клетках флоэмы синтезируется просистемин, 200 аминокислот, из него образуется системин, 18 аминокислот. Из этого места локального повреждения системин выделяется в периплазматическое пространство, взаимодействует с рецепторами на большом участке растения. Это – рецептор брацциностериоида BRI1, у которого есть LRR-белок. Для брацциностериоида BRI1 место - на первых семи участках LRR, для системина – на 24-ом. Как только системин связался с LRR-белком и BRI1, BRI1 – киназа, начинается его ферментная (киназная) активность, он делает фосфолипазу A2, которая высвобождает линолевую кислоту из мембран и запускает синтез жастомнатов. Жасмонаты активируют местную устойчивость вокруг повреждения, транспортируются по флоэме и индуцируют системную устойчивость по всему растению. Всегда есть перекрестья. Основной – сигналинги по системину, существуют локальные, где работают олигосахарины, хитозан, другие, все интегрируются на жасмонаты. Сейчас считается, что системная устойчивость и сигналинг идут слегка по-разному для механических повреждений и патогенов. Похоже, но для вирусов, грибов, бактерий, частично насекомых работает салицилат, для большинства насекомых и механических повреждений - жасмонат. Обсуждалось, что летучие метилсалицилат и метилжасмонат – летучие, сигналинг по всему растительному сообществу, в параллель с жасмонатом работает этиленовый сигналинг, доказательств нет, нематоды активируют и салицилат, и жасмонат. Системная устойчивость: два мессенджера - салицилат, и жасмонат. Похожа, но для разных сигналов. Иммунный ответ растений – очень непростая вещь, возможно, не проще иммунной системы животных, очень хорошо адаптирована, очень много дублей сигналинга и ответов, от локальной до системной, в ней еще долго разбираться.

Лекция 9. Вторичные метаболиты

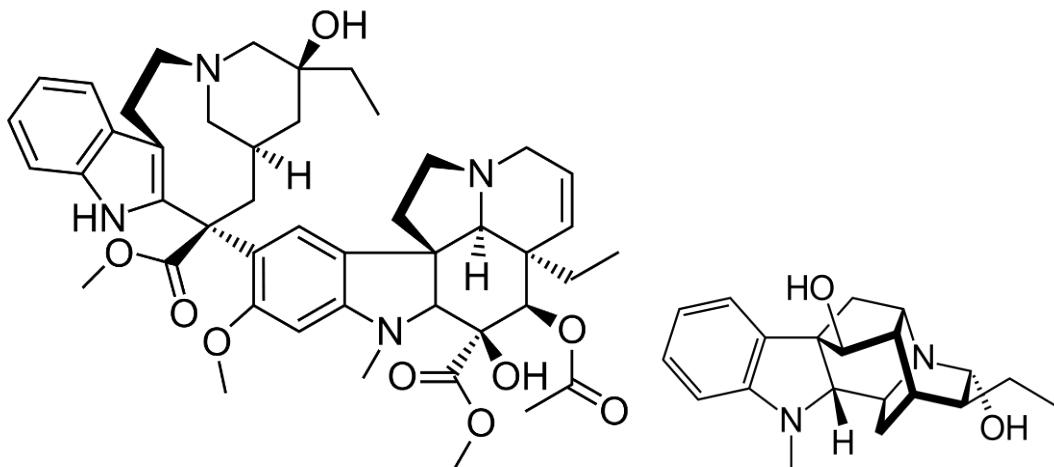
Практическое применение вторичных метаболитов

Есть три круга обороны растения от внешних патогенов, мощным инструментом которых являются специфичные соединения, которые называются вторичными метаболитами. Для растений эти соединения очень характерны. Сегодня поговорим о них и практическом применении физиологии растений. Сейчас большая проблема - лекарственное сырье. 40% лекарственных препаратов имеют растительное происхождение (Рис. 46). В Китае используется до 10000 видов лекарственных растений.



Таксол

Хинин



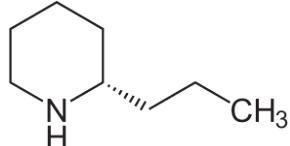
Винblastин

Аймалин

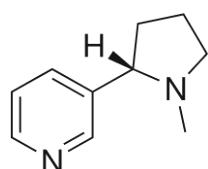
Рисунок 46 Некоторые из наиболее хорошо известных «растительных» лекарств.

Необходимы сотни тысяч тонн сбора растений. В Непале это - основной доход для полумиллиона семей, колоссальный урон для биосфера. Что за растения - почему лекарственные. В Европе 2000 видов, у нас больше, в Индии - 7500 видов. Из 250 тысяч видов растений, которые известны, почему только эти. Некоторые вещества

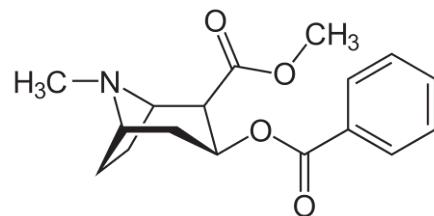
растительного происхождения уникальны: таксол - дитерпеноид из коры тиса - килограмм стоит 2-3 миллиона долларов, противоопухолевое вещество. Самое известное соединение растительного происхождения - хинин: спас много жизней, сейчас почти не работает, плазмодий к нему приспособился. Винбластин - очень сложное соединение из барвинка - димерный алкалоид, тоже химиотерапевтический препарат. Аймалин - антиаритмическое вещество. Помимо того, что растения использовались как лекарства, их использовали в качестве ядов (Рис.47). Казнь Сократа - выпил чашу с ядом. До сих пор спорят, чем был отравлен. Считается, что это - цикута, но описание смерти не похоже на то, что характерно для цикуты. Симптомы смерти Сократа характерны для болиголова. Алкалоид болиголова - конин. Другой алкалоид - никотин. Латинское название растения *Nicotiana tabacum* - по имени Жака Нико, который пропагандировал табак как лекарство от болезней легких и от названия наркотического зелья, которое жевали индейцы. Кокаин - любимый алкалоид Шерлока Холмса. Морфин, кодеин - выделены из мака. Маленькие изменения могут



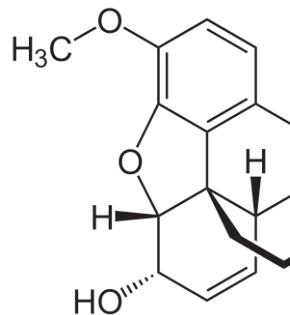
Кониин



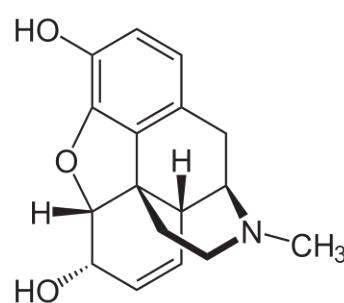
Никотин



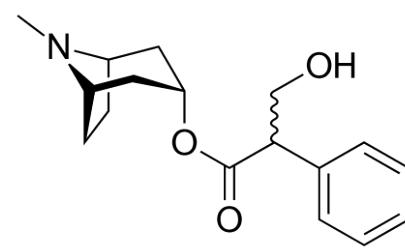
Кокакин



Кодеин



Морфин



Атропин

Рисунок 47. Алкалоиды – азотсодержащие растительные яды

приводить к изменению активности у морфина по 3 положению гидроксил, у кодеина - метаксил. Морфин - мощнейшее снотворное, наркотик, кодеин до последнего времени можно было применять в таблетках от кашля. Тропановые алкалоиды выделены из белены, дурмана.

Что такое вторичные метаболиты

История изучения вторичных метаболитов - парадокс. В медицинских институтах курс фармакогнозии - два семестра, где подробно описывают, какие вещества используются,

какое действие. Физиологи растений лет тридцать назад обратили на них внимание. В какой-то степени был "виноват" лауреат Нобелевской премии 1910 года Альберт Коссиль 125 лет назад, в 1891 году, прочел лекцию о химическом составе клеток, где предложил разделить соединения клетки на две группы: те, которые обязательно присутствуют в растительной клетке и те, которые случайно там появляются. Они не являются неотъемлемой составляющей каждой клетки, и он назвал их вторичными, а те, которые обязательно присутствуют - первичными. Логично, но название вторичные привело к идею о том, что они - ненужные, и вторичные вещества были в забвении до 60-70-х годов прошлого века, когда сделали хромато-масс-спектрометр. Разделение и идентификацию можно было соединить в одном приборе, на это можно было тратить дни, а не года, и оказалось, что ненужных соединений очень много. Академик Мокроносов (известный физиолог растений, фотосинтетик), сказал, что растения отличают от других организмов два принципиально важных важных процесса: фотосинтез и вторичный метаболизм. Оказалось, что их очень много. Сейчас насчитывается около 100000 структур.

Очень трудно вывести определение, что такое вторичные метаболиты. Можно дать признаки: относительно низкомолекулярные соединения, редко 2-3 тысячи дальтон. Необязательно присутствуют в каждом растении, как правило, являются биологически активными соединениями. Это - признаки потому, что каждый необязателен. Есть высокомолекулярные вторичные метаболиты: каучук, гутте. Есть соединения, которые находили везде, где искали: оксикоричные кислоты. Для многих вторичных метаболитов, подходящим по остальным признакам, не нашли биологическую активность. Возможно, не там искали. В сумме первые три признака дают хорошо очерченный набор свойств. Можно сформулировать так: относительно низкомолекулярные соединения, каждое из которых не обязательно присутствует в каждом растении. Практически в любых растениях, где их искали, какие-то вторичные метаболиты обязательно находили. Синтезируются они из очень немногих первичных метаболитов.

Классификация вторичных метаболитов

Что из себя представляют: три большие группы - изопреноиды ~40000 структур, алкалоиды ~15000 структур, фенольные соединения ~10000 структур. Минорные группы 15-20 групп. Может быть 5-6 соединений, например, теофены. В целом, их довольно много. Фитохимия - то, какие соединения содержатся и где.

Изопреноиды

Изопреноиды - соединения, построенные из изопентенильного фрагмента, 5 атомов углерода, классифицируются по длине цепочки, которая построена из монотерпеновой единицы. Монотерпены - C10, дитерпены - C20, исторически сложилось так, что терпены

определяли по десятку. С15, из трех единиц построены - сесквитерпены, С30 - тритерпены, С40 – тетратерпены и т.д. классификация очень проста.

Монотерпены

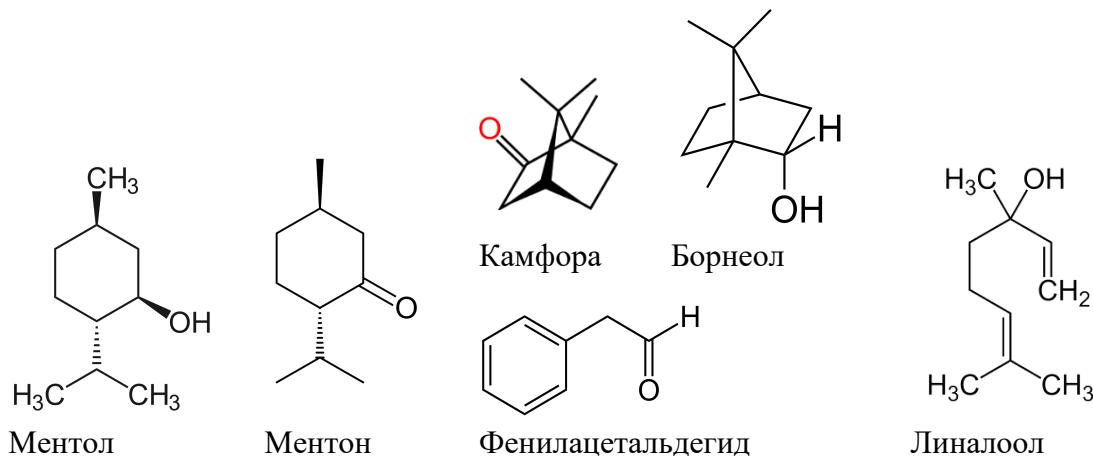


Рисунок 48. Монотерпены

Монотерпены (Рис.48) - С10-соединения, порядка трех-четырех тысяч, чаще всего - компоненты эфирных масел. Бывают нециклические, моноциклические, бициклические, трициклические. Пример, насколько маленькие изменения приводят к изменению активности: ментол. Запах - свежесть мяты. Если по первому положению будет не карбоксил, а карбонил, это - ментон, абсолютно балластное вещество. Селекция идет на то, чтобы было много ментола. Камфора - соединение с сердечной активностью, камфорный лавр его производит, если будет гидроксил по второму положению, будет вещество борнеол, у него нет никакой активности, кетон по второму положению у камфоры дает активность. Они - сильно ароматические, вкусовые, чаще всего – запах, но линалоол - терпеноид, фенилацетальдегид - ароматика, бензоид, по свойствам - конвергенция. Синтез совершенно разный, по свойствам близки. Это - функциональная вещь, на нее надо обращать внимание. Смесь эфирных масел - терпеноиды, бензоиды. Функции похожи, синтез разный. Определяют запах и вкус многих вкусных вещей.

Сесквитерпеноиды

Сесквитерпеноиды, С15 (Рис. 49): гораздо больше вариантов, могут быть нециклические, моноциклические, бициклические, трициклические. Синтез: из одной базовой структуры - гибкая цепочка, удобно, что торчат метильные группы, можно много чего навешивать, можно образовать много структур. Еще пример - ромашка (Хамазулен, от названия *Matricaria chamomilla*). Хамазулен - действующее вещество, которое определяет лекарственные свойства ромашки. В интактном растении его нет, есть предшественник, который превращается в активное соединение в результате сушки. Ледол - трициклические сесквитерпеноид - серезный яд. Найден у багульника, вызывает

головную боль. Если его ввести не через дыхательную систему, а в кровь - яд. Поражается нервная система, паралич наступает. Структура - близкая. Еще пример - функциональные вещи - система перекисная часто делает сильные модификации

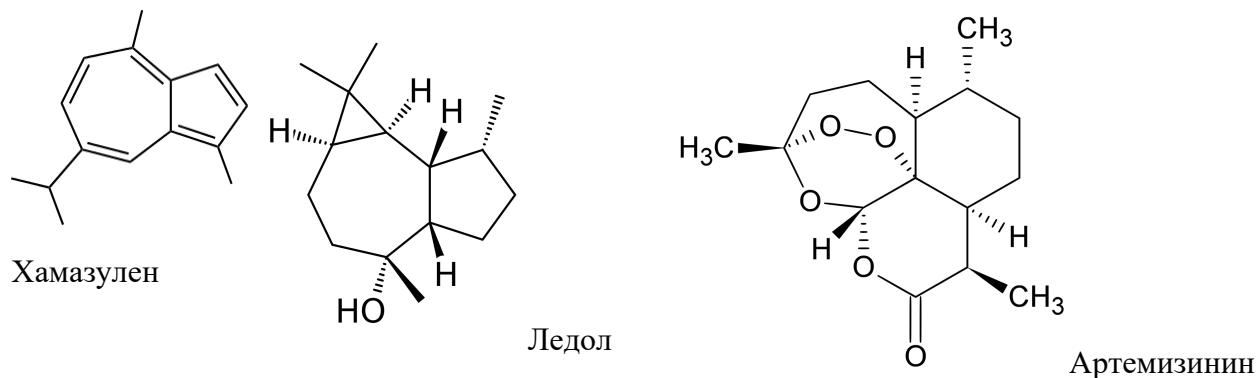
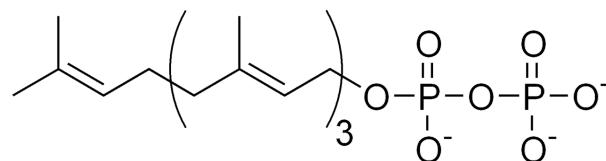
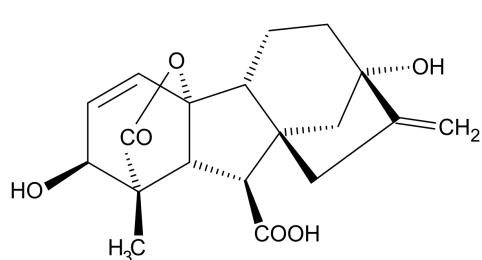


Рисунок 49. Сесквитерпеноиды и сесквитерпеновые лактоны

биологической активности. Сесквитерпеновые лактоны – это очень мощная биологическая активность. Выделены из листьев и соцветий, некоторые под действием водяного пара дают азуленкарбоновые кислоты, которые потом превращаются в азулены. Хамазулен образуется из матрицина через хамазуленкарбоновую кислоту. Ледол входит в состав эфирного масла багульника, которое есть везде, кроме корней. Кроме него, туда входит другие спирты азуленового ряда: палюстирол, мирицен, II-цимол. Хинин уже на плазмодий не действует. Малярия - колоссальная проблема. По последним данным, до 2-3 миллионов случаев малярии случаются на земном шаре. Нашли мощное новое средство из полыни *Artemesia annua* - артемизинин. Выяснилось, что оно известно более двух тысяч лет, его используют в Китае уже давно. Сейчас доходит вплоть до генно-инженерных подходов, чтобы синтезировать артемизинин.

Дитерпеноиды

Дитерпеноиды (Рис 50). Исходное C20-соединение - геранил-геранилдифосфат. Можно сделать замыкание, получается трициклическая структура. Чаще всего это - компоненты смол у хвойных, могут быть моноциклические, бициклические, даже тетрациклические - гиббереллановый скелет. На его основании синтезируются не только гиббереллины, но и довольно большое количество биологически активных соединений. Смоляные кислоты (Рис. 51). Важно, что по 6 положению карбоксил. Если

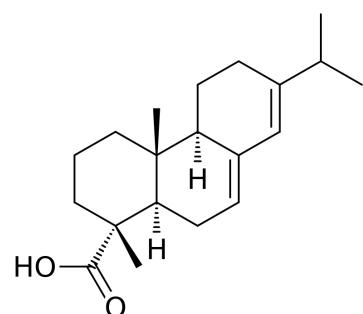


Геранил-геранилдифосфат

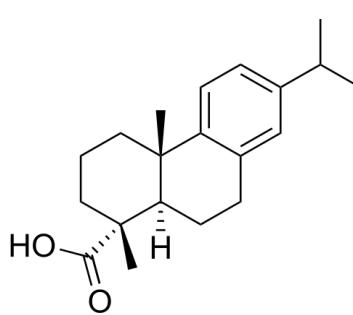
Гиббереллановый скелет

Рисунок 50. Дитерпеноиды

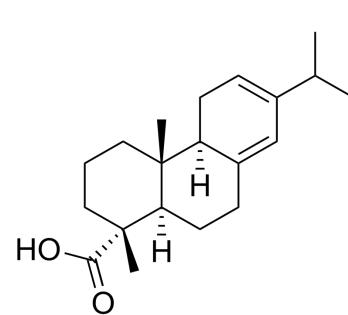
многие кислоты встречаются во всех сосновых, то ламбертиановая кислота - только в



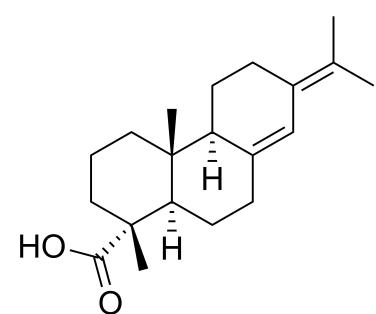
Абиетиновая



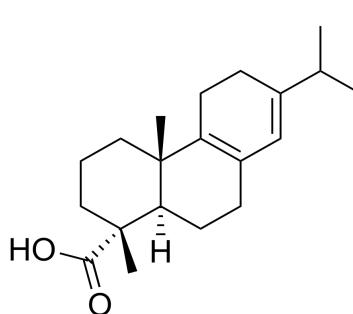
Дегидроабиетиновая



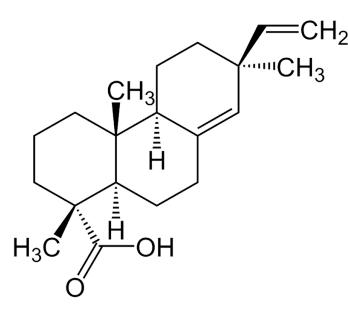
Левопимаровая



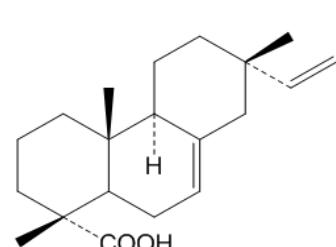
Неоабиетиновая



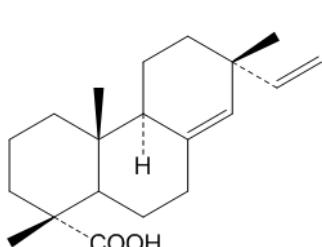
Палюстровая



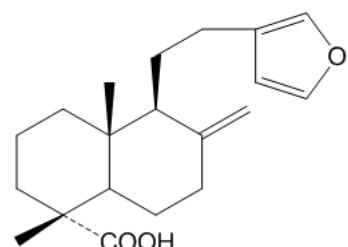
Пимаровая



Изопимаровая



Сандаракопимаровая



Ламбертиановая

Рисунок 51 Дитерпеноиды. Смоляные кислоты.

сибирском кедре. Тетрациклические дитерпеновые гликозиды Стевии (*Stevia rebaudiana*) (Рис.52, А) отличаются от гиббереллинов, гибберелланов тем, что нет пятичленного колечка. Это - типичный вторичный метаболит, хотя первичные и вторичные метаболиты не так легко отличить. Любопытно два момента: во-первых, это гликозиды. R1, R2 - сахара. Иногда гликозиды выделяют в отдельную группу вторичных метаболитов. Это не стоит делать. Гликозиды могут отщепляться и присоединяться, гликозилирование часто модифицирует активности. Гликозиды бывают самыми разными: изопреноиды, фенольные соединения. Это - не класс вторичных метаболитов, это - их модификация.

Гликозилирование часто меняет свойства, растворимость, часто это - предшественники каких-то. Некоторые такие соединения в 300 раз сладче сахара. Нужно для диабета. Сейчас подсластители - очень неприятно. Этот - не метаболизируется, не оставляет послевкусия, есть заменители, которые в 3-4 тысячи раз сладче сахара, но потом целый день во рту сладкий привкус. Со стевией не все хорошо: поскольку есть смесь, то только один стевиол-гликозид сладче сахара, другие могут обладать другими активностями.

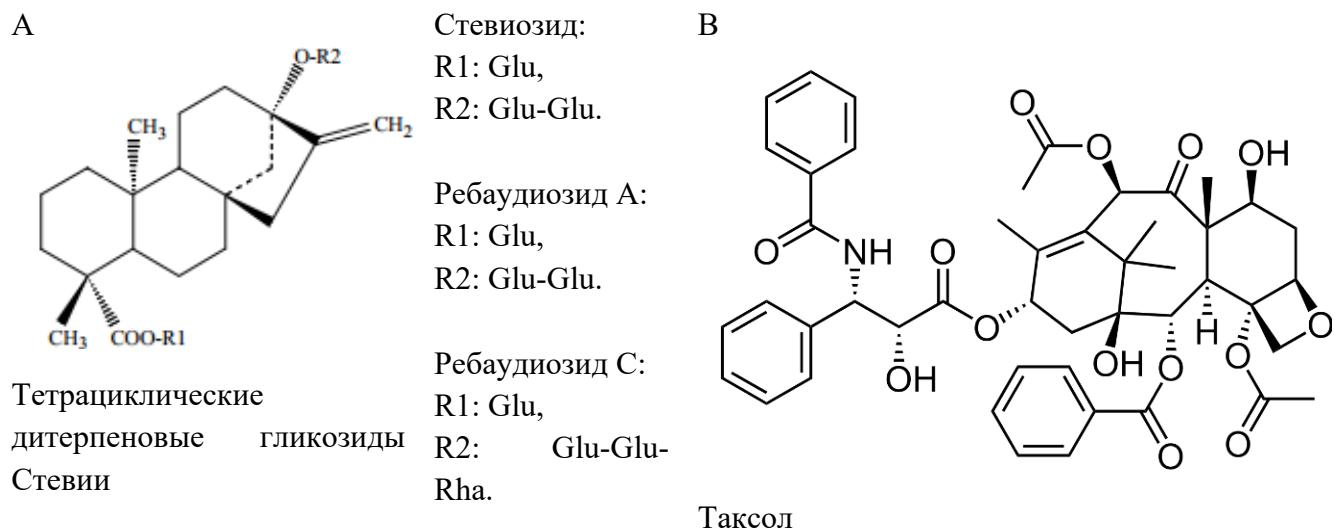


Рисунок 52 Дитерпеноиды.

Надо все проверять, но сейчас можно купить в аптеке. Таксол (Рис. 52, В). Еще один дитерпеноид, о нем уже говорилось, находится в коре тиса, очень токсичен, противоопухолевые вещества часто токсичны, для химиотерапии должны избирательно работать с опухолевыми клетками. Чтобы вылечить одного пациента, надо спилить 5-8 таких деревьев. Ядовитые свойства тиса известны давно, Иван Грозный использовал, чтобы травить заклятых друзей. У Ивана Грозного был кубок из сосны, у его оппонентов - из тиса, результат - через 3-4 дня они умирали. Возможно, это - анекдот. Таксол, действительно, очень токсичное соединение, но в небольших количествах при правильном применении это - один из самых дорогих химиотерапевтических препаратов.

Тriterпеноиды

Сквален.

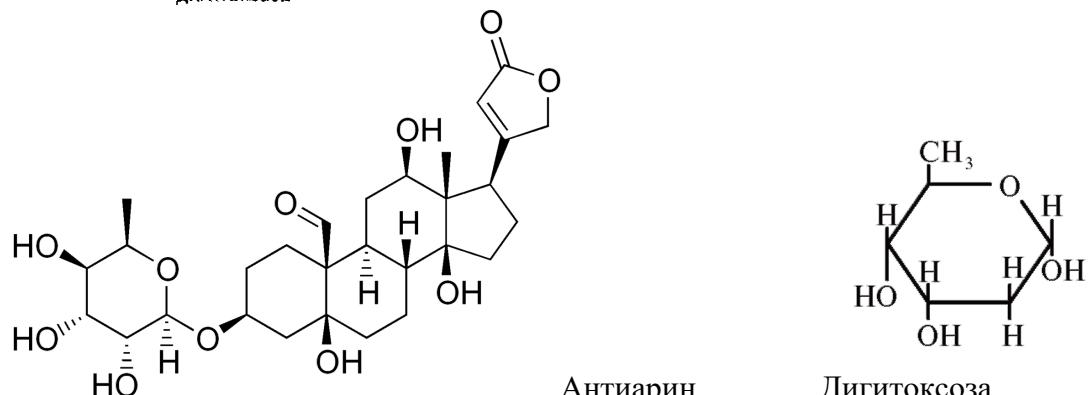
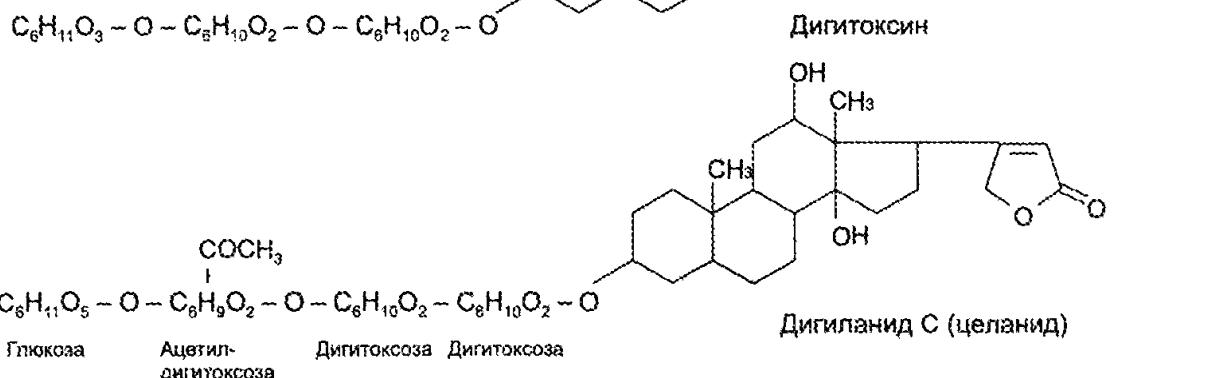
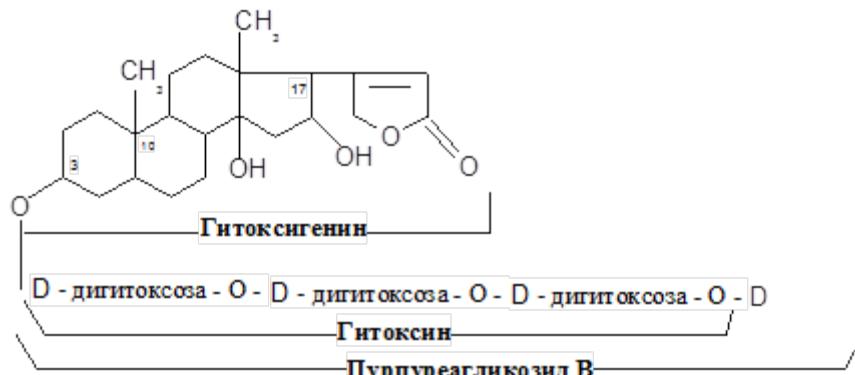
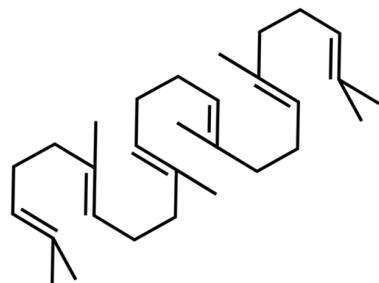
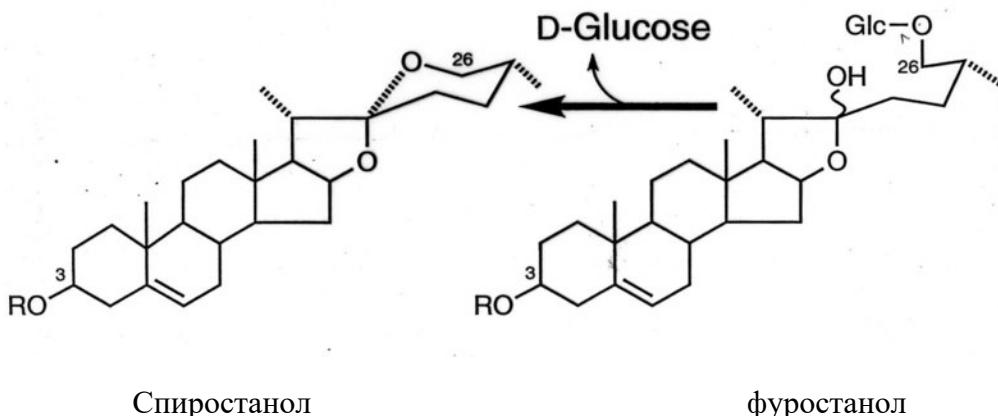


Рисунок 53. Тriterпеноиды, сердечные гликозиды

Тriterпеноиды (Рис.53): предшественник - сквален C30 - соединение. Почему трудно различать первичные и вторичные метаболиты: стерины – компоненты мембран – формируются таким же образом. Получается скелет фитостеринов. Сложно сказать, первый метаболит, или второй. Скелет есть, отличаются гидроксилами. Различаются функционально - тем, что они делают. Чаще всего тритерпены -

тетрациклические или пентациклические. Примеры - сердечные гликозиды: ландыш, наперстянка, морозник. Вся игра в том, что к ним присоединен небольшой дополнительный гетероцикл и есть гликозилирование. Гликозилирование - тоже вторичные метаболиты - сахара. Не надо думать, что сахара должны присутствовать в каждой клетке. Пример - дигитаксоза. У нее - метил. Метилированные сахара, их довольно много. До сих пор эти сердечные гликозиды нельзя заменить синтетическими. Они - разные по силе, действию, по модулю в больших дозах это - яд. Самое страшное отравление в Париже в 1863 году было сделано именно дигиталином. У Пушкина Анчар - дерево смерти, анчары существуют, действительно, токсичны, но не настолько, как у Пушкина. В нем сердечный гликозид антиарин. Когда приехал туда, где растут Анчары, врач, он три года ничего не делал, решил, что нужно отчитываться, аборигены смачивали гликозидами анчара стрелы, не ядовитее наперстянки. Другие стероидные гликозиды: предшественники должны быть нетоксичны, финальные соединения токсичны. Тriterпеновые соединения (Рис.54). Есть фуростаноловые и спиростаноловые. Отличие - в том, что, когда все замыкается, остается дополнительная



Спиростанол

фуростанол

Рисунок 54. Тriterпеновые гликозиды

алифатическая часть, у этих соединений она сворачивается в гетероцикл, два гидроксила, и алифатическую цепочку с гидроксилом. Она гликозилирована. Это соединение абсолютно нетоксично, более того, водорастворимо, транспортная форма, не лизирует мембранны, иммуностимулятор, антиоксидант. Если отщепить сахар, образуются два гидроксила, которые спонтанно замыкаются в дополнительное шестое кольцо. Получаются спиростаноловые соединения. Свойства альтернативны: Сапонины - от слова "мыло". Спиростаноловые - действительно сапонины, они поверхностно активны, водонерастворимы, лизируют мембранны, цитотоксичны, иммуносупрессоры. Очень многие вторичные метаболиты - мылкие на ощупь. Одна реакция, отщепили сахар, работает специфическая гликозидада и тут же очень "положительное" соединение становится "отрицательным". Типичный пример перехода защитных соединений второго круга обороны из предшественников в токсичные соединения. Очень похоже для женьшения. Соединения - тритерпеновые гликозиды

даммаранового ряда (Рис.55), впервые были обнаружены в смоле Даммара. Ситуация похожа. Их около пятидесяти, основных - семь. Все они - гликозиды всего лишь двух агликонов. Агликоны - (агликон - "не сахар") отличаются друг от друга одним гидроксилом. У протопанаксодиола гидроксила по 6 положению нет, у протопанаксотриола - есть. Если гидроксила нет, то сахар цепляется по третьему положению. Если есть, то по шестому. Гликозилирование по другому положению очень сильно изменяет свойства молекулы и они как и стероидные гликозиды тоже имеют противоположный эффект. Панаксотриолы называются Rg-группа, панаксодиолы - Rb. Одновременно на дальнем

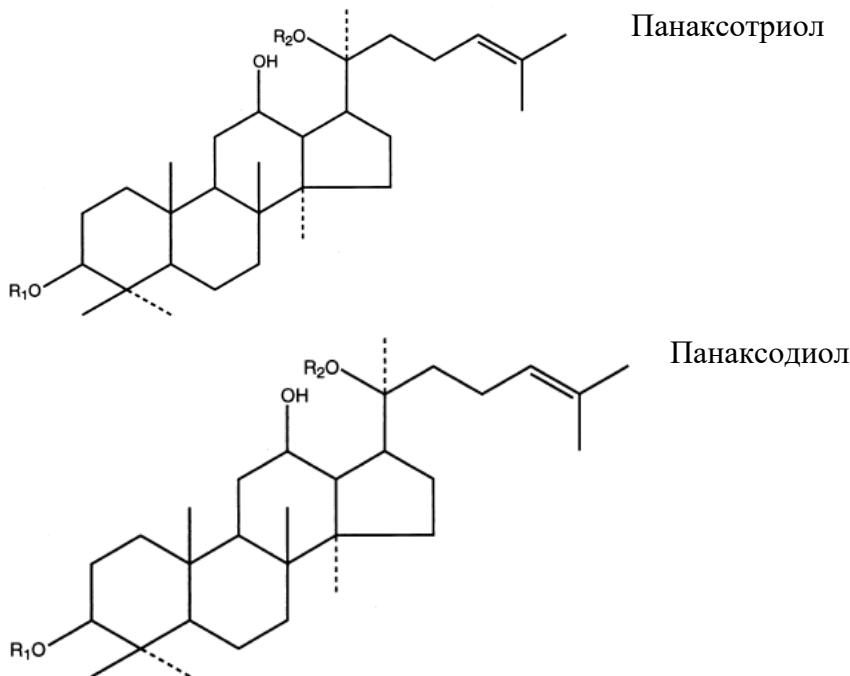


Рисунок 55. Тriterпеновые гликозиды даммаранового ряда

востоке работали группа академика Еликова и группа Шибату в Японии. Наши исследователь называли эти вещества панаксазидами, от названия женьшена *Panax ginseng*, японские - гинзеназидами. Оказалось, что одно и то же соединение имеет два названия. Приходилось составлять таблицы соответствия. Наши ученые были более правы, потому что эти соединения характерны для рода женьшней. Японцы публиковались на английском языке, поэтому эти вещества сейчас называют гинзеназидами. Они тоже имеют один и тот же агликон с небольшими изменениями, Rg-группы имеют гипертензивный эффект, активируют ЦНС и моторику, Rb - гипотензивный эффект, седативное действие, антиковулсанты. Свойства женьшня зависят не столько от того, сколько он содержит этих соединений, а каков баланс Rg- и Rb-групп. Это - тоже тритерпеновые соединения.

Тетратерпеноиды

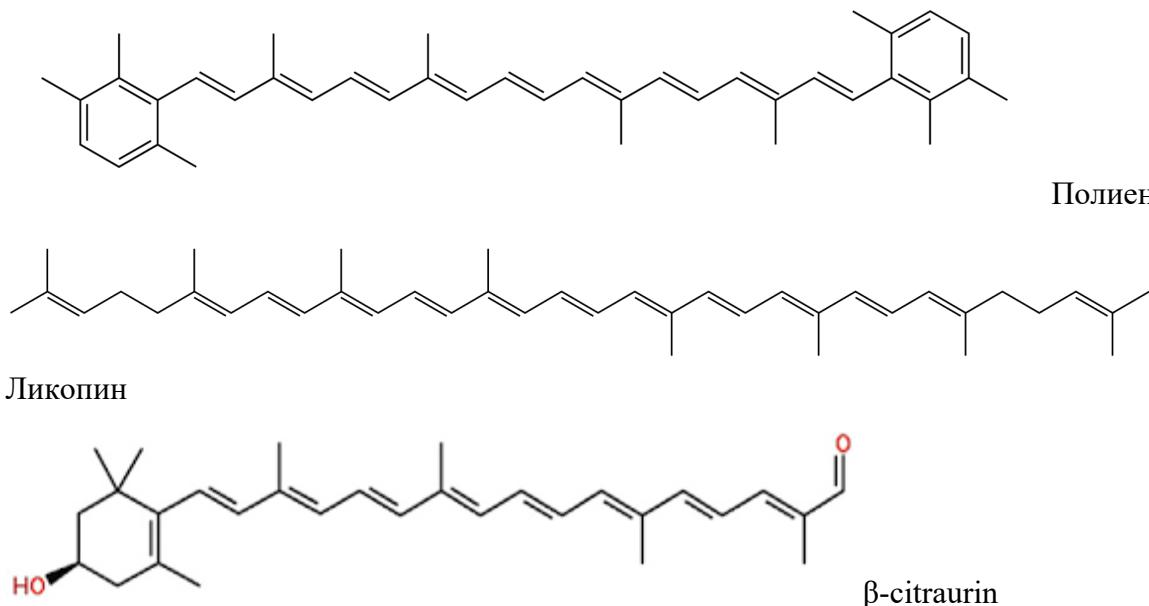


Рисунок 56 Тетратерпеноиды - каротиноиды

Каротиноиды (Рис.56). Хорошо известны, помним их функцию, прежде всего, защитную, фотосинтез, оказывается, по фотосинтезу участвует от силы десяток каротиноидов, на самом деле их около 700. Их основная функция - либо окраску делать, ликопин (красный цвет помидоров) - очень полезная вещь, предотвращает возникновение раковых опухолей, особенно у мужчин. У перца

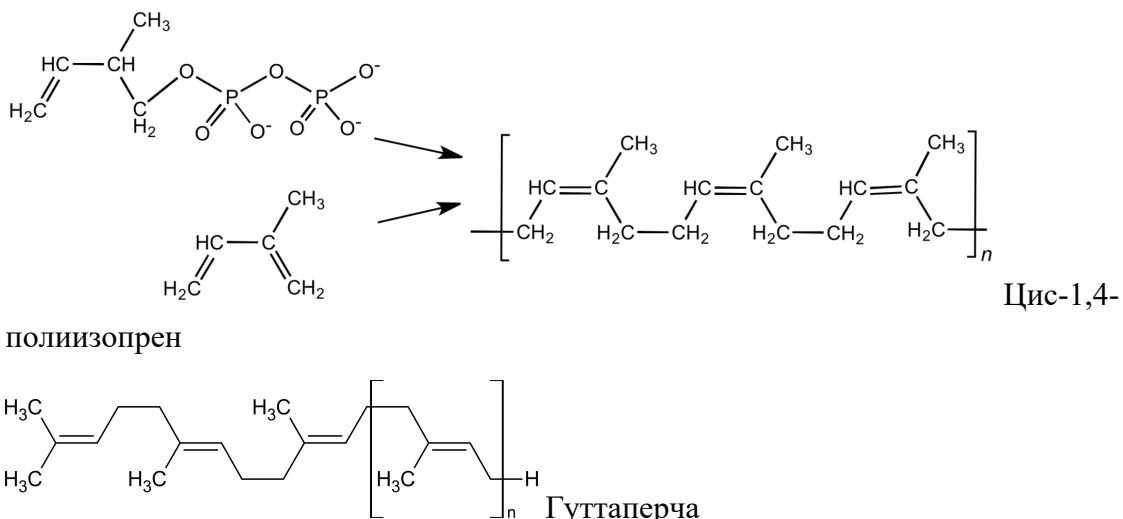


Рисунок 57. Полиизопреноиды.

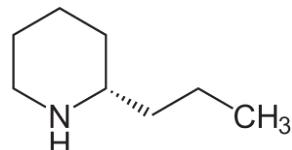
окраска, могут быть апокаротиноиды (beta-citourin) они - короче, окраска цитрусовых - желтая, 700 каротиноидов - явно не первичные соединения, отличить не просто.

Полиизопреноиды

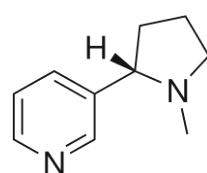
Исключения – полиизопреноиды (Рис. 57): несколько тысяч изопреновых единиц - каучук, гутта- отличаются цис-транс-изомерией и количеством остатков. До сих пор натуральный каучук невозможно заменить искусственным. Предлагают каучук получать из культуры клеток. Натуральный каучук оценивается по 50-ти параметрам: изгиб, холодостойкость, устойчивость к растяжению, эластичность, то ни один из синтетических не способен заменить и воспроизвести более 4-5 свойств. Почему - во-первых, регулярность, во-вторых, сейчас обсуждается, что здесь есть маленькие вставочки, нарушения, нерегулярность, которые определяют очень много. То ли это фермент делает, полипренилтрансфераза, то ли ошибается, то ли дополнительные свойства. Полиизопреноидные каучуки не так просто получить. Обычно синтетика - полистирольные.

Алкалоиды

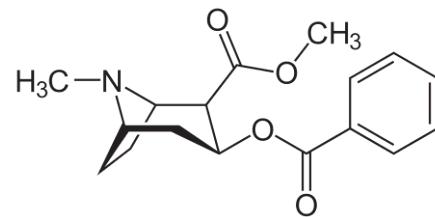
Алкалоиды - азотсодержащие растительные яды (Рис.58). Нормальная химическая



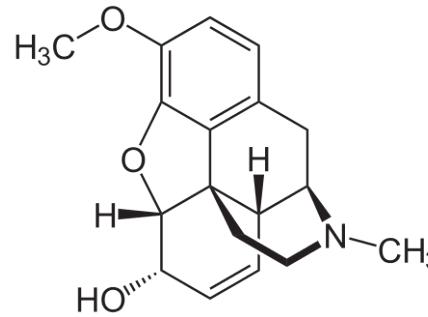
конинин



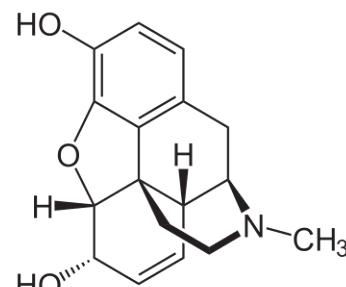
Никотин



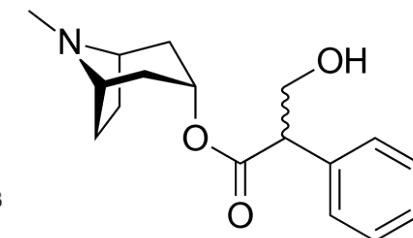
кокакин



Кодеин



морфин

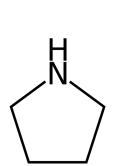


атропин

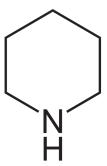
Рисунок 58 Алкалоиды – азотсодержащие растительные яды

классификация совпала с тривиальной. Алкалоиды - щелочноподобные, щелочность определяется атомом азота. Химическая классификация - то, что содержит азот. Есть протоалкалоиды, у которых нет в гетероцикле, есть истинные алкалоиды, у которых азот есть, классификация идет по тому, что за гетероцикл является основным для алкалоида (Рис.59). Книга Орехова (Орехов А. П. Химия алкалоидов. — М.: ОНТИ, Глав. ред. хим.

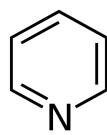
лит-ры, 1938. — 623 с. и Орехов А. П. Химия алкалоидов. — 2-е изд., испр. и доп. д-ром хим. наук Р. А. Коноваловой и канд. хим. наук А. А. Коноваловой. — М.: Изд-во Акад. наук



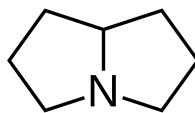
Пирролидин



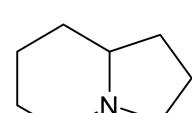
Пиперидин



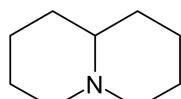
Пиридин



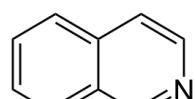
Пирролизидин



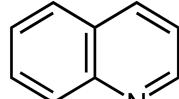
Индоизидин



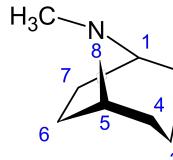
Хинолизидин



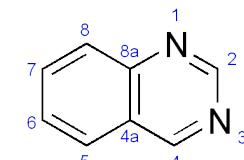
Изохинолин



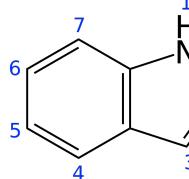
Хинолин



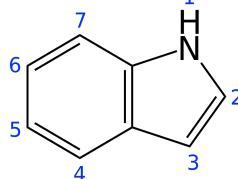
Тропан



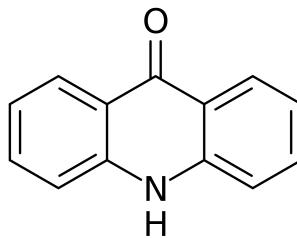
Хиназолин



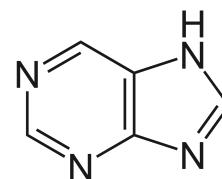
Индол



Имидазол



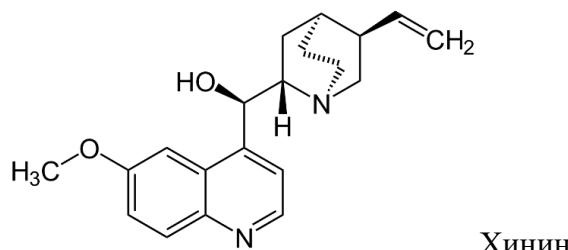
Акридон



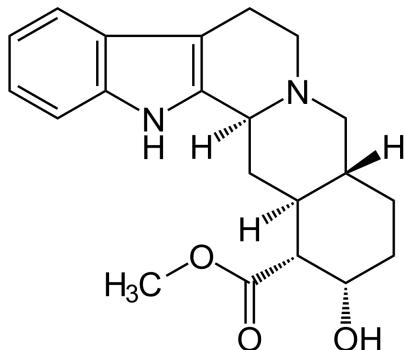
Пурин

Рисунок 59 Гетероциклы – основы алкалоидов.

СССР, 1955. — 860 с.) посвящена алкалоидам, у нас нет времени, но вот несколько примеров: хинин (Рис 60). Название происходит от *Cinchona officinalis*. Цинхона - имя



Хинин



Йохимбин

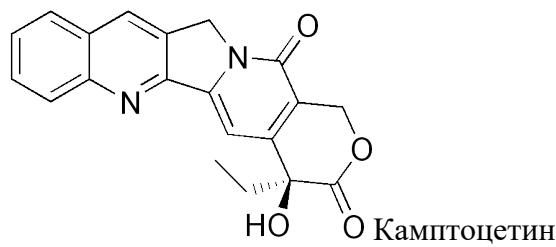
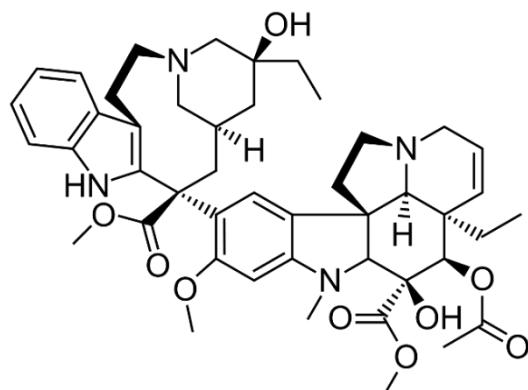
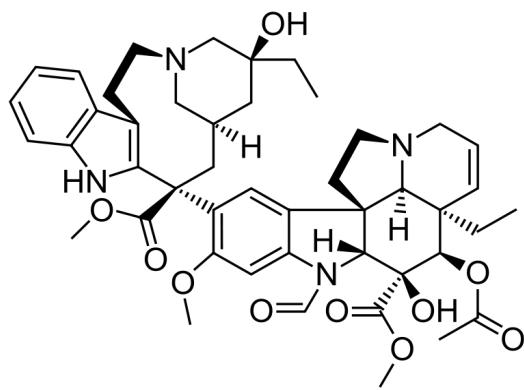


Рисунок 60. Хинолиновые алкалоиды

жены вице-короля Перу, ее звали Анна дель Чинчон, ее вылечили от малярии аборигены, она привезла кору хинного дерева в Европу, ей не хотели лечиться гугеноты. Другое название *Cinchona langeriana* - по имени купца, который украл хинное дерево. Новый хинолиновый алкалоид - камптоцетин, противоопухолевое соединение, наиболее востребован после таксола, получают из эндемика Китая, *Camptotheca acuminata*, его синтезировать почти невозможно. Индолевые алкалоиды - индолевое кольцо, есть хинолизидиновое, сделали иерархию какой цикл важнее - индолевый цикл важнее, чем хиноризиновый. Йохимбин - почти единственный подтвержденный афродизиак, кроме того, галлюциноген. Его получают из йохимбе, африканского дерева.



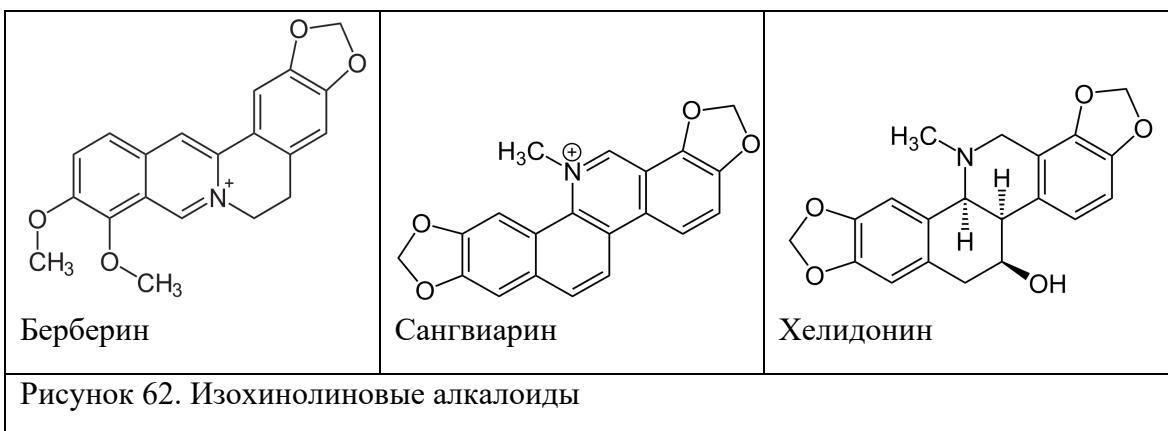
Винblastин



Винкристин

Рисунок 61 Димерные индолевые алкалоиды: винblastин и винкристин.

Димерные индолевые алкалоиды: винblastин, винкристин (Рис. 61). Так дороги потому, что в барвинке около 80 алкалоидов, 26 димерных и только одна сотая процента -



винblastин. Поэтому очистка и выделение - очень непростая вещь, химически его воспроизвести просто невозможно, в лучшем случае - сделать полусинтез. Что интересно - обе части алкалоидов синтезируются в разных частях растения и где-то должны встретиться. Винblastин и винкристин - противоопухолевые вещества для разных видов

рака. Отличаются очень мало. И то, и то ядовито. Изохинолиновые алкалоиды - изохинолиновое ядро (Рис.62). Самый известный - берберин, из барбариса, Сангвиарин - из чистотела, редкий случай, когда алкалоид бывает окрашенный, желтый сок чистотела - из-за него, берберин обладает мощной биологической активностью, успокаивающий, кровоостанавливающий, желчегонный, сангвиарин и хелидонин



Рисунок 63. Маковые алкалоиды

обладают бактерицидным и желчегонным действием. Самые известные - маковые алкалоиды (Рис.63). Морфин, кодеид, тебаин (отличается от морфина тем, что по 6 положению O-CH₃), не обладает наркотическим действием. Плантации мака запрещены. Пытались делать культуры клеток. Стереохимия морфина в культурах клеток почти не синтезируется.

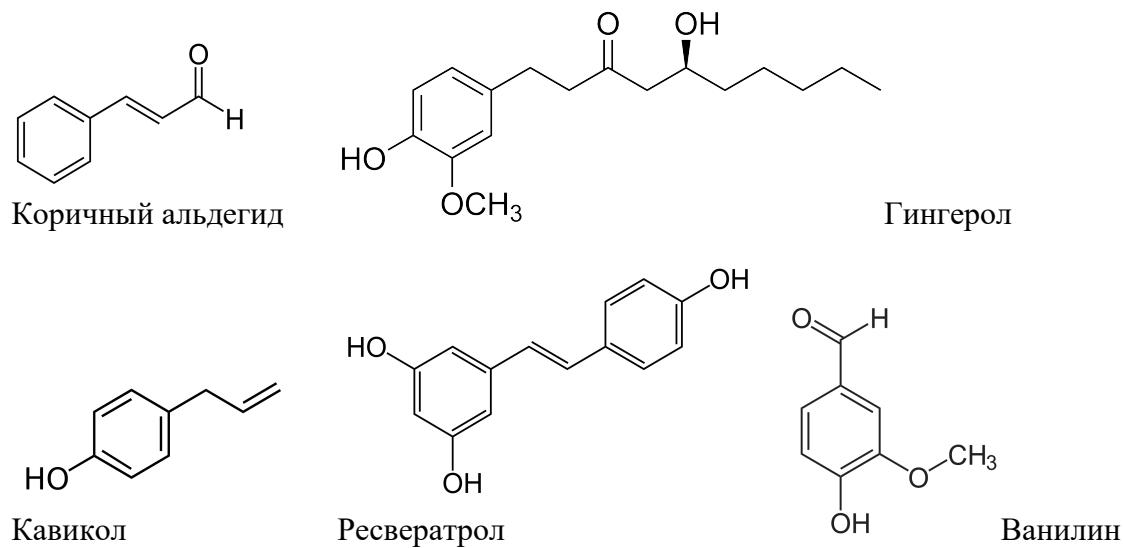


Рисунок 64. Фенольные соединения

Фенольные соединения

Фенольные соединения (Рис.64): определяют вкус, цвет, запах многих вещей: корица, коричный альдегид, имбирь, гингерол - очень полезная вещь. Ваниль - ванилин, у гвоздики - кавикол. Ресвератрол (стильбен) - Ресвератрол очень интересная вещь.

Модное соединение, присутствует в красном вине и красном винограде. Не лечит онкологические заболевания, он их предотвращает. Сейчас его пытаются сделать синтетически, есть некоторые проблемы. Фенольные соединения (Схема 5, рис. 65, Табл.1) классифицируются по количеству бензольных колец и дополнительных алифатических атомов. Самые простые - просто C₆, может быть много дополнительных функциональных групп, C₆-C₁ оксибензойные кислоты. C₆-C₂ - оксибензойные спирты, самая большая группа с одним кольцом - C₆-C₃ — это оксикоричные кислоты,

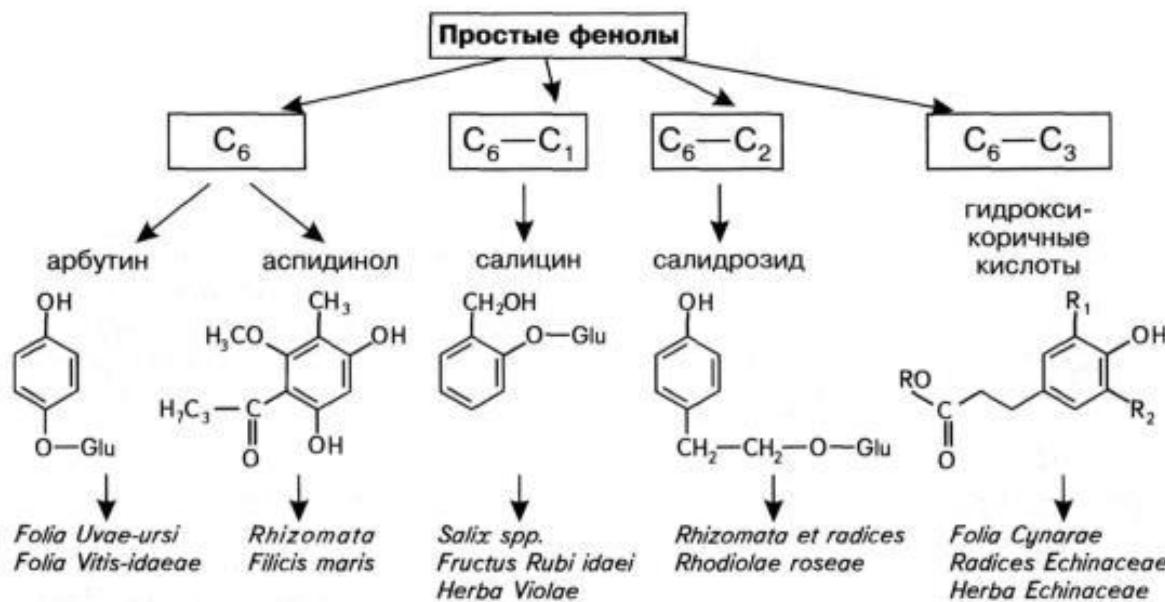
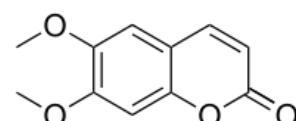
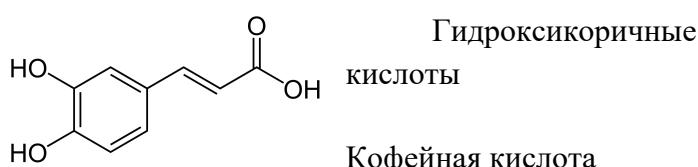


Схема 5 Простые фенольные соединения

кумарины, очень токсичные вещества, которые также образуются из оксибензойных



Кумарины



Кофеиновая кислота

6,7-Диметоксикумарин

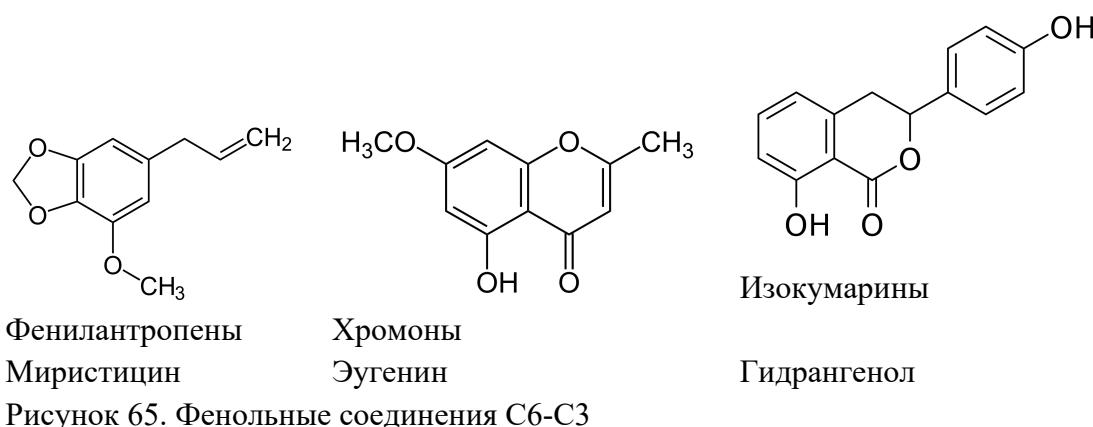


Рисунок 65. Фенольные соединения C6-C3

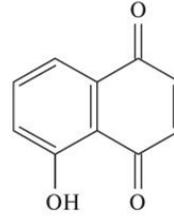
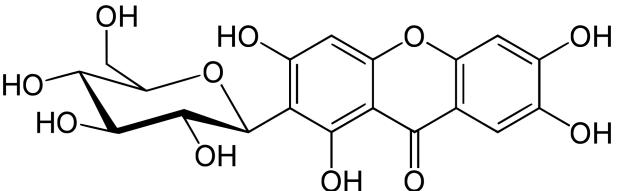
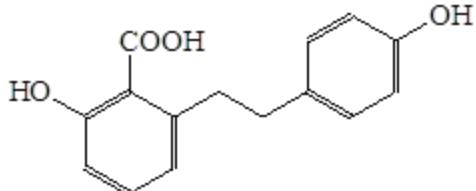
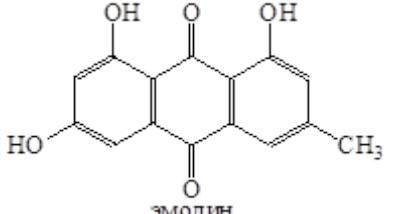
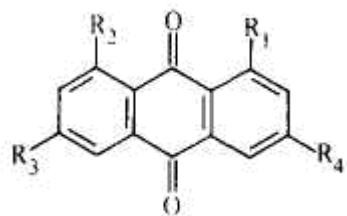
C6-C4	Нафтохионы	Юглон	 <p>юглон</p>
C6-C1-C6	Ксантоны	Мангиферин	
C6-C2-C6	Стильбены	Лунуларовая кислота	
	Антрахионы	Эмодин	

Таблица 1 Сложные фенольные соединения

кислот. Если будет C6-C3-C3-C6 и сахар, глюкоза, то после отщепления сахара

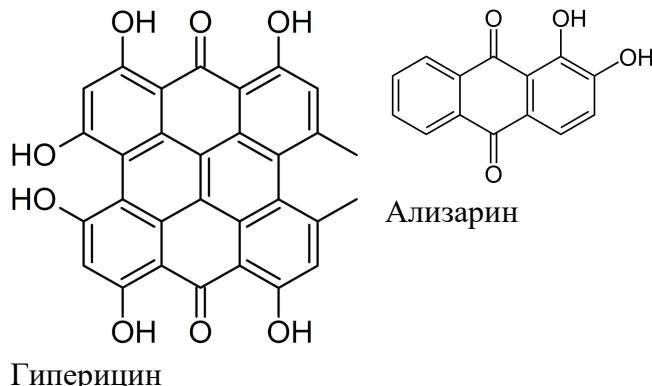


R₁=R₂=OH, R₃=H, R₄=COOH - реин

R₁=R₂=OH, R₃-R₄=H – хризацин

R₁=R₂= R₃=OH, R₄=CH₃ – реум-эмодин

R₁=R₂=OH, R₃=H, R₄=CH₃ – хризофанол



Гиперицин

Рисунок 66 Антрахиноны

формируется дополнительное лактонное кольцо, очень токсичная вещь, гибель скота от свежескошенного сена чаще всего происходит из-за этого. C6-C4 - нафтохиноны из грецкого ореха, практически все с одним кольцом, их довольно много. С двумя кольцами: C6-C1-C6, то есть, два кольца, а между ними один атом углерода, кислород не считается, это мангиферин из манго, желтый цвет и вкус определяется им. Интересно, что он - С-гликозид. C6-C2-C6 - стильбены, ресвератрол, могут быть антрахиноны. Антрахиноны C6-C2-C1(Рис.66) – чуть поподробней. Если последовательно атомы углерода - стильбены, параллельно - антрахиноны. Из-за антрахинона группы эмодина была война. В Древней Греции сабур, лекарство на основе сока Алоэ было одним из самых распространенных. Когда его весь вывели,

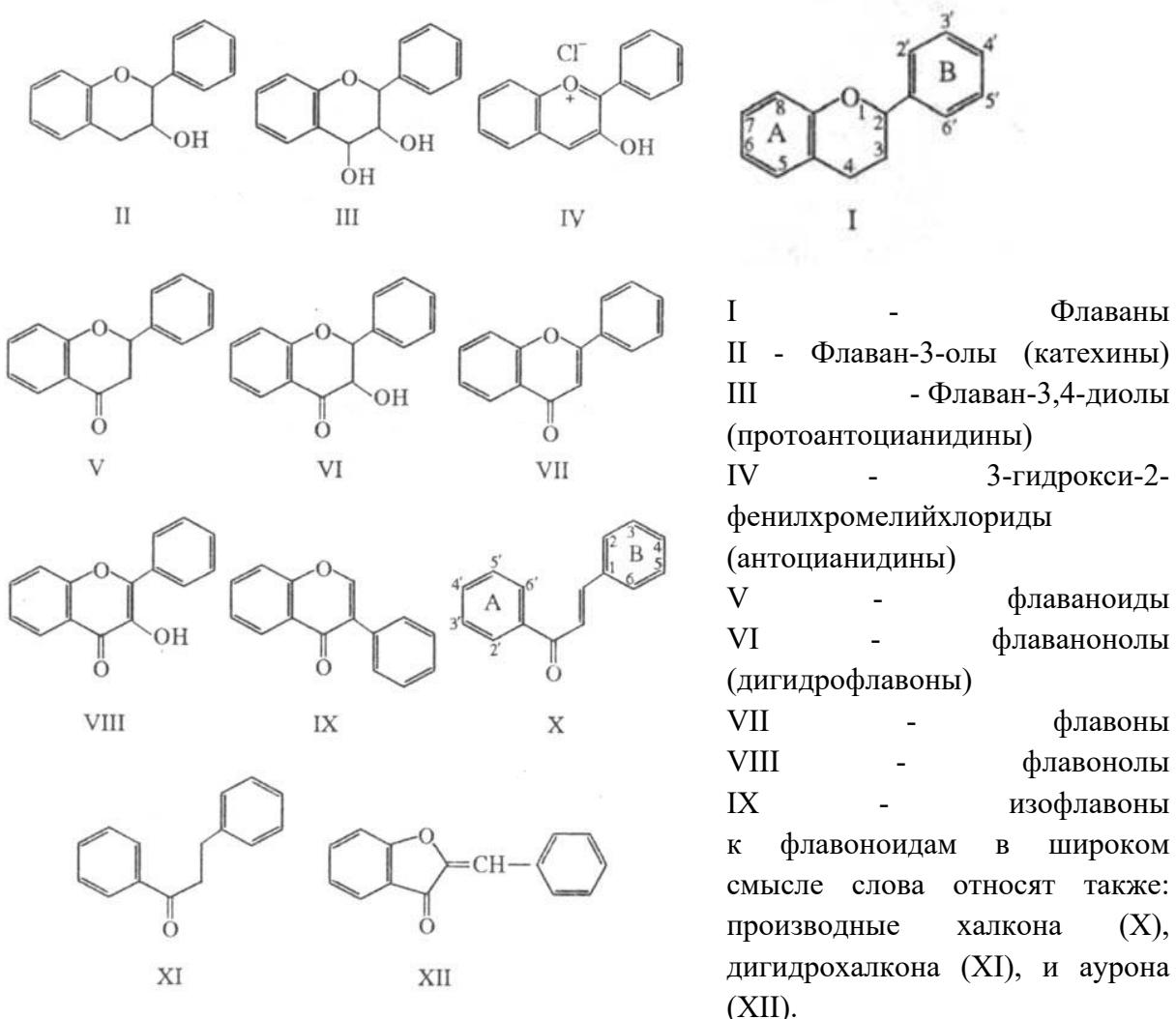


Рисунок 67. Флаваноиды

Аристотель предложил Александру Македонскому завоевать остров Сокотра, потому что там много алоэ. Александр завоевал. Гиперицин из зверобоя, Ализарин красавая структура. Самая большая группа фенольных соединений - C6-C3-C6 – flavаноиды (Рис.67). Их очень много, они классифицируются по модификациям. Вторичные соединения это - те инструменты, которыми растения решают свои проблемы. Самая большая проблема — это защита. Но нужны взаимоотношения, экологические сигналы. Окраска цветков - очень большая вещь. Агликоны окраски цветка: в кольце B - один, два или три гидроксила (Рис. 68). Дальшеантоксицидины, бывают изофлаваноиды,

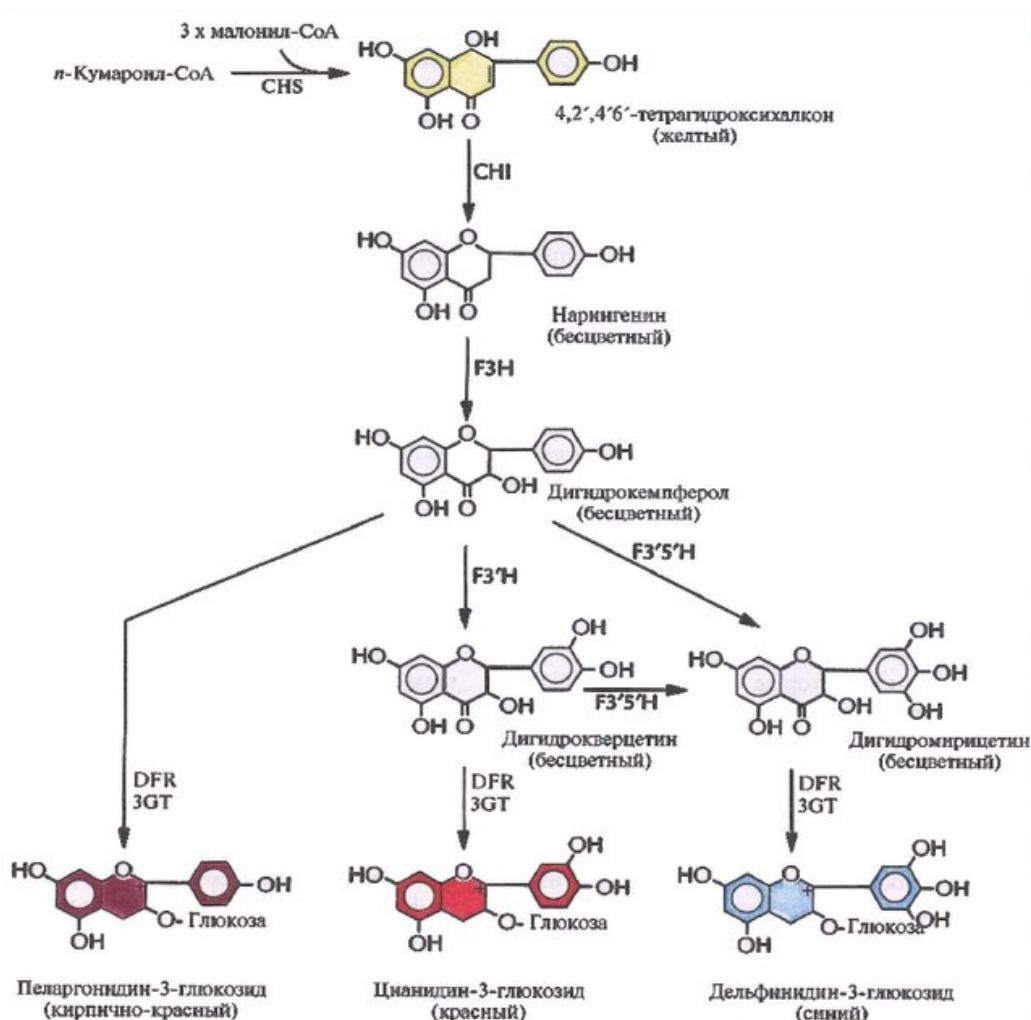


Рисунок 68 Агликоны окраски цветка

порядка 4-5 тысяч соединений. Вся радуга окраски цветков – не защита – обусловлена гликозидами трех основных агликонов, но идут модификации. Раньше считалось, что окраска от pH сильно зависит. Но они в вакуоли, там pH – постоянная. Поэтому – комплексообразование с степени окисленности гетороциклического кольца. Катехины, проантоцианидины, металлами (очень сложно получить голубой окрас). Гликозилирование: антоцианидин, по 3 или 5 положению (Рис.69) с гликозидом и навешенными кислотами (малоновой или оксикоричной) – тонкая настройка под

Ацилированные антоцианы

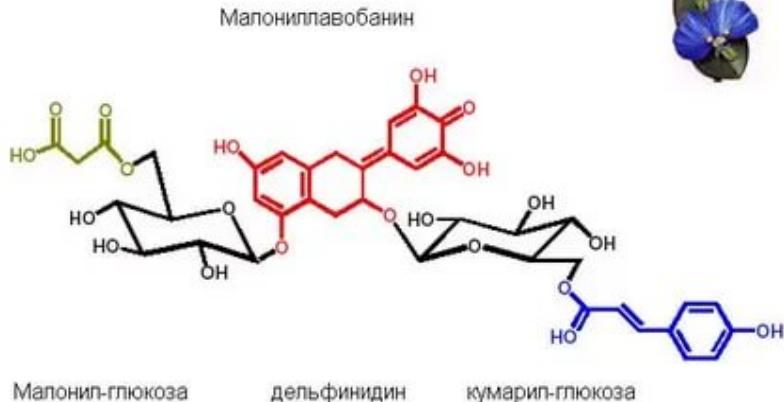
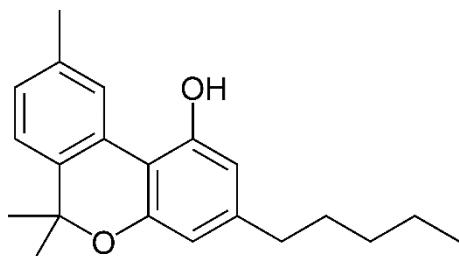
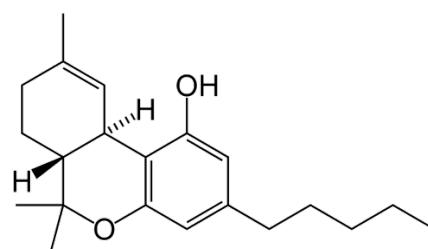


Рисунок 69 Антоцианы

окраску. Конопля - очень ценное растение. Оно описано в Китае почти за 3000 лет до нашей эры. Мореходство - канаты, конопля. Мощная биологическая активность: лечение альцгеймера, паркинсона, глаукомы. Из-за того, что некоторые каннабиноиды являются наркотиками, это закрывает вариант использования конопли. На фонтане "Дружба народов" важное место занимает конопля. Каннабиноиды (Рис. 70) - очень интересная вещь, когда происходит микс: соединяются фенольное соединение и изопреноид. Для вторичных метаболитов очень характерно: соединение разных вариантов синтеза. Канабинол - изопреноид плюс флаваноид.



Канабинол



Тетрагидроканабинол

Рисунок 70 Каннабиноиды

Минорные группы вторичных метаболитов

Если про фенольные соединения, алкалоиды, изопреноиды можно посмотреть в учебниках, то минорные группы разбросаны по литературе. Это: небелковые аминокислоты, растительные амины, цианогенные гликозиды, гликозиды горчичных масел, беталаины, необычные жирные кислоты, ацетиленовые производные, цианолипиды, ацетогенины, ацетофероны, аллицины, тиофены. В каждой из этих групп может быть единиц (тиофены насчитывают около десятка структур) от десятка соединений до тысячи. Редко превышают эту тысячу.

Небелковые аминокислоты

Более 700 структур (Рис 71). Для мимозы нет аналога нормальной аминокислоты. Для подавляющего большинства это - мимикрия похожести на белковые аминокислоты. Типичный пример - селен-содержащие аминокислоты, где вместо серы - селен: селеноцистеин и селенметионин. Для астрагалов характерны. Селен и сера очень похожи. Но селен-селен-связи - очень слабые. У Астрагала это - яд. Первый круг обороны опасен тем, что эти соединения могут быть ядовиты для самого растения. Для организма, который им защищается, он должен быть неопасен, для того, кто его потребляет - наоборот. Это - идеальный яд. Своя белок-синтезирующая система, аминоацил-тРНК-сингтаза разделяет селен-содержащие аминокислоты от серосодержащих аминокислот, в белок встраивает только серосодержащие аминокислоты. Селен-содержащие могут до трех-четырех процентов находиться в семенах. Для патогена, который это съел, это неразличимо, он встраивает селен-содержащие аминокислоты в свои белки, они становятся нефункциональны. Но есть насекомые, которые научились различать селен-содержащие от серосодержащих аминокислот, не только могут есть астрагал, они его специально выбирают и едят, чтобы защищаться от птиц.

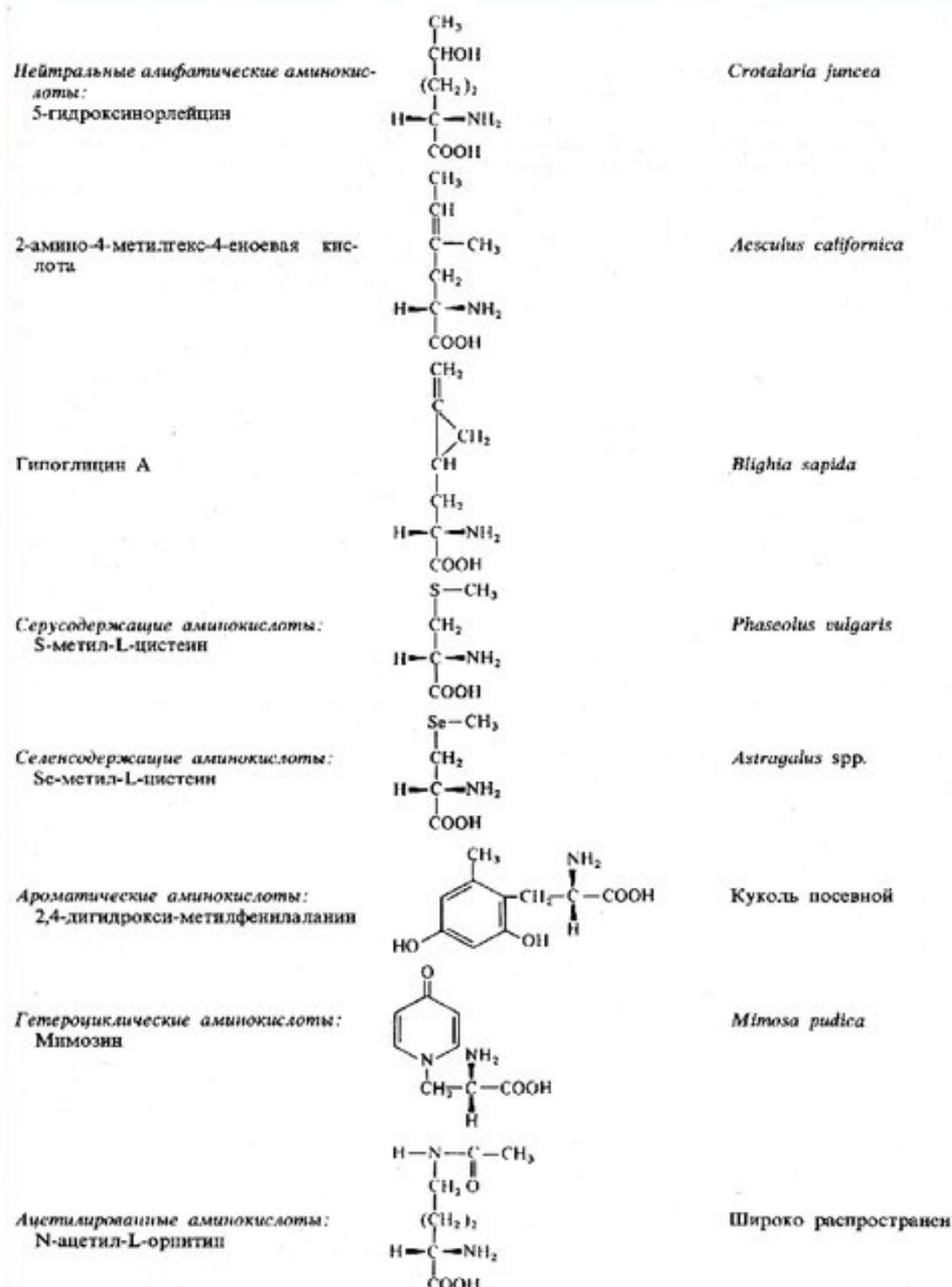


Рисунок 71. Небелковые аминокислоты

Цианогенные гликозиды

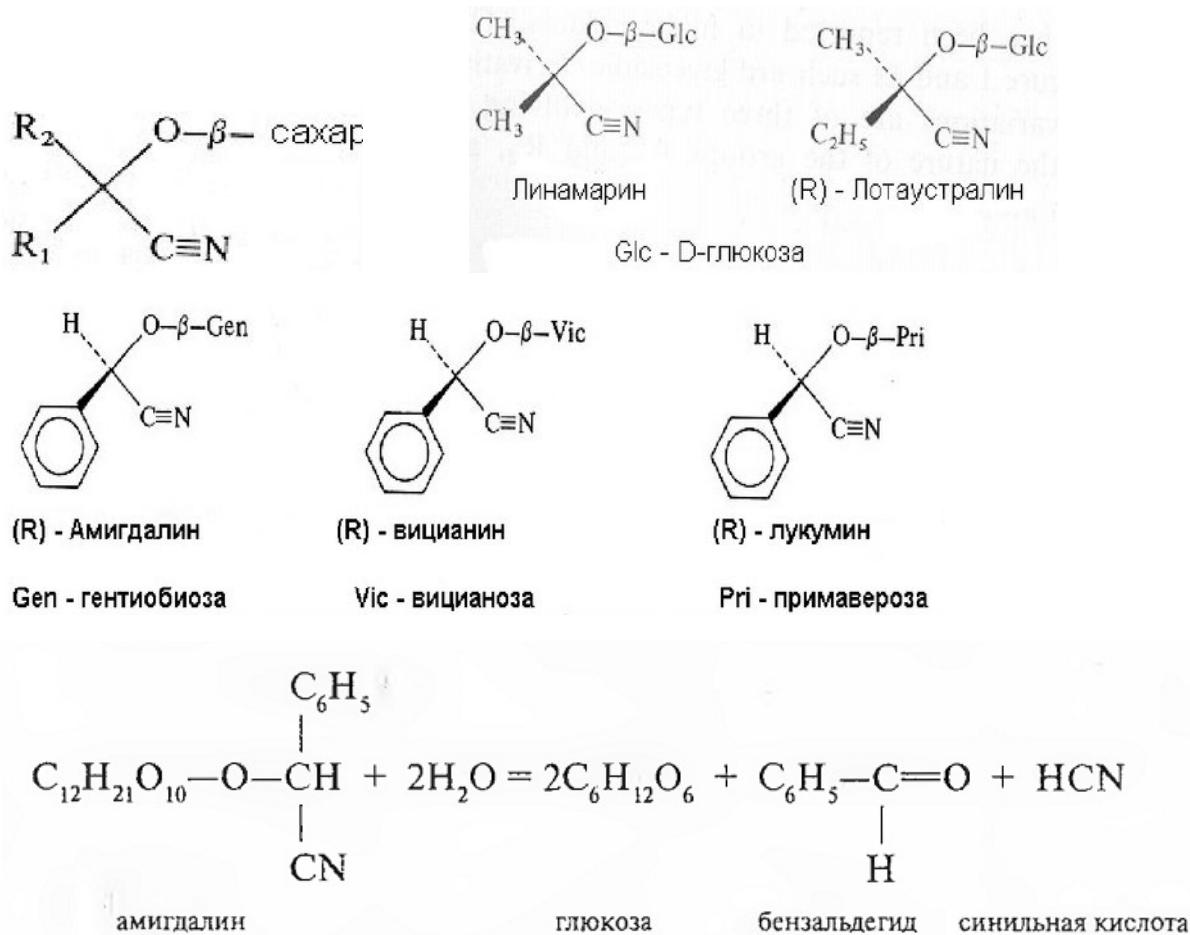
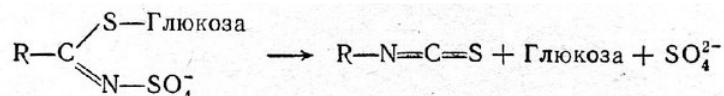


Рисунок 72 Цианогенные гликозиды

Мы уже разбирали (Рис. 72). Известно более 30 структур, более 2500 видов, 100 семейств. Первый был открыт Амигдалин - в миндале, дисахарид, если отщепить глюкозу, образуется HCN. Это характерно для розоцветных, как правило, цианогенные гликозиды находятся в вакуоли, ферменты, которые их разрушают, - в цитозоле. Аналогичная система для крестоцветных. Это - глюкозинолаты, которые образуют обычно нитрилы, ацетонитрилы, неприятные вещи, жгучесть создают у хрена, редьки. Радикалы могут быть самые разные, тут должен быть специальный фермент мирозиназа, (О-гликозид может расщепить любая гликозидала) S-гликозид - только специальный фермент. Есть тли, которые могут это есть, некоторые из них - камикадзе. В основном, нелетающие. Они тоже накапливают глюкозинолаты (Рис.72), но мирозиназу держат в других тканях, в мускулах. Когда птица съедает - тоже защита популяции.



Глюкозинолат	Горчичное масло	R
Синигрин	Аллильное горчичное масло	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$
Глюконапин	3-бутенильное горчичное масло	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Глюкобрассика-напин	4-пентенильное горчичное масло	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Глюкоибервирин	ω -Метилтиопропильное горчичное масло	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Синальбин	<i>n</i> -Оксибензильное горчичное масло	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$
Глюкотропеолин	Бензильное горчичное масло	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$
Глюконастурцин	Фенилэтильное горчичное масло	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

Рисунок. 73 Глюкозинолаты и образующиеся из них горчичные масла

Беталайны

Беталайны (батацианины) - пигменты, азотантоцианы (Рис.73). Около 50 структур. Ботанико-филогенетическая проблема. Окраска столовой свеклы определяется беталайнами. В растительном царстве эти два пигмента никогда не встречаются вместе. Беталайны есть в порядке гвоздичных почти во всех семействах, кроме гвоздичных. Есть в кактусах, свекле, по спектру поглощения антоцианы и батацианины похожи. Это антимикробные соединения широкого действия. Все - гликозиды только двух агликонов: бетанидина и изобетанидина. Разница агликонов в стереоизомерии. Могут быть с необычным сахаром (софороза) и дисахарида. Разница агликонов в стереоизомерии. Известны ацилгликозиды (кислоты - малоновая, лимонная, п-кумаровая, феруловая, кофейная). Самое простое соединение - бетанин (Рис. сахар и бетацианин), может быть дисазарид, бетацианины - красные, бетаксантини - желтые или оранжевые. Долго спорили, что это: похожи на алкалоиды, но алкалоиды не бывают кислыми. Пытались приписать к фенольным соединениям, в итоге выделили в отдельную группу.

Бетаины

Есть бетаины (Рис.75) - антистрессовые соединения, работают в первом стрессе, когда неспецифичный ответ, метилированные аминокислоты, все Н заменены на CH_3 -группы: стахинидрин, бетаницин, глицинбетаин (самое известное, выраженная биологическая

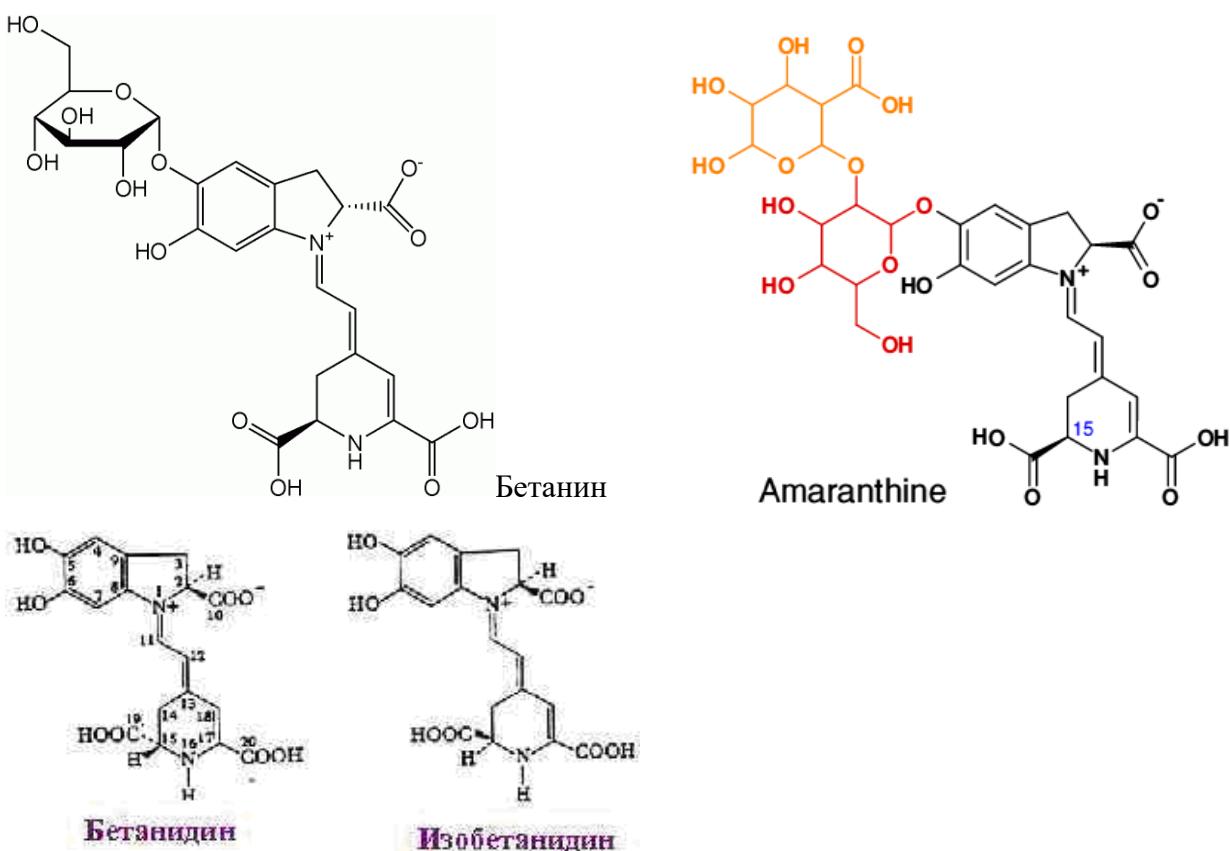


Рисунок 74. Беталаины

активность, используется в программах для похудания, гепатопротектор), универсальное защитное соединение, сохраняет ДНК.

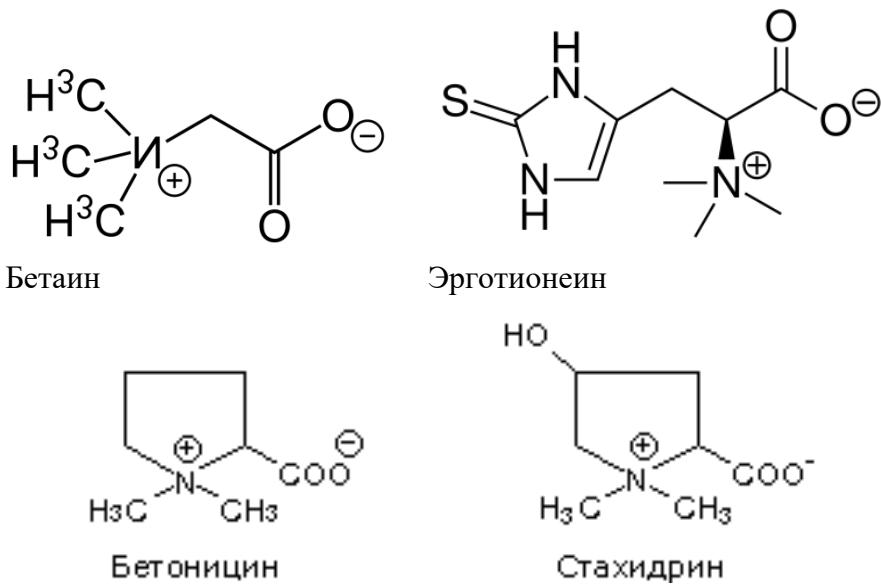


Рисунок 75 Бетаины

Аллицины и аллины

Серосодержащие вторичные метаболиты: аллицины и аллины (Рис. 76). Часто - лук, чеснок. Своеобразный метаболизм. Образуются из аминокислот из цистеина и серосодержащих

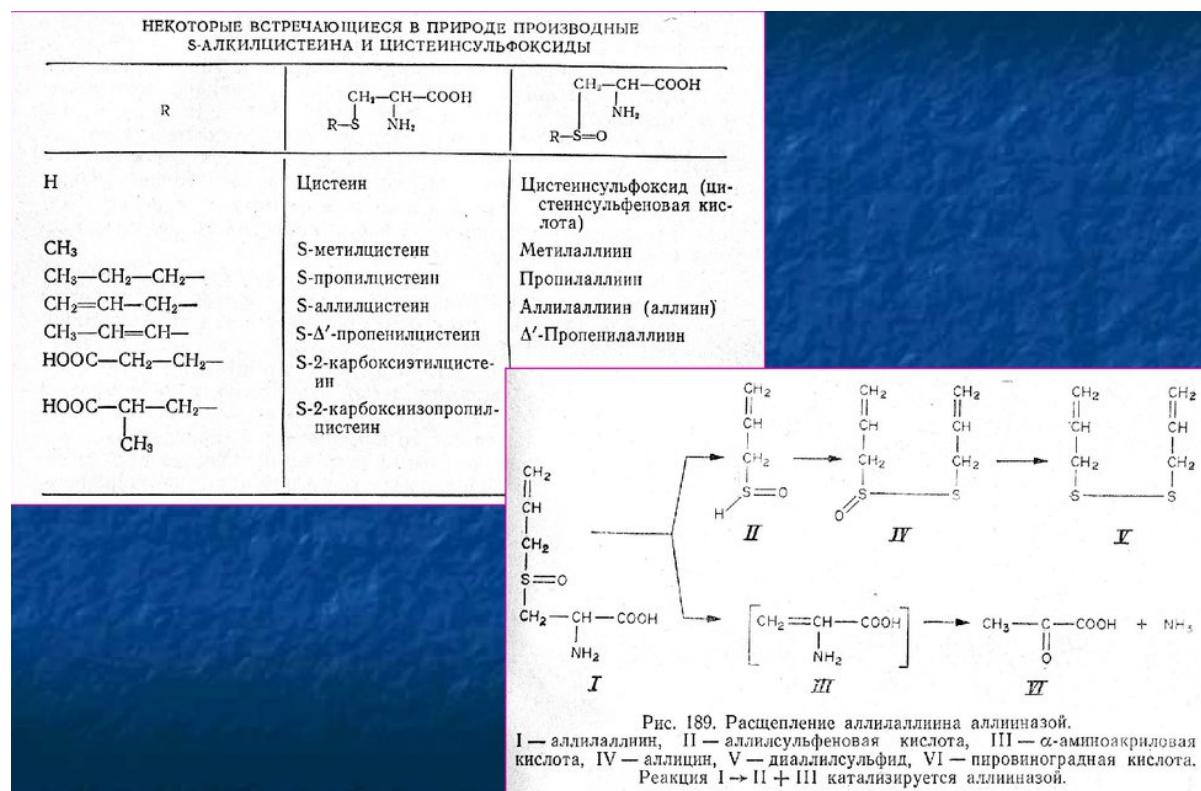


Рисунок 76.

небелковых аминокислот через цистеинсульфоксид, в виде цистеинсульфоксида хранятся, когда лук, чеснок режется, отщепляются радикалы и образуется димер $\text{R}-\text{SO}-\text{S}-\text{R}$. Мощнейшее средство. Противоопухолевое, слезоточивое. Для использования в медицине нужна адресная доставка. действует очень быстро.

Необычные жирные кислоты

Обычных десяток - C16, C18. Могут быть и гетероциклы, и кетоны, и гидроксины (Рис. 77). Их несколько сотен, также токсичны, могут включаться вместо нормальных.

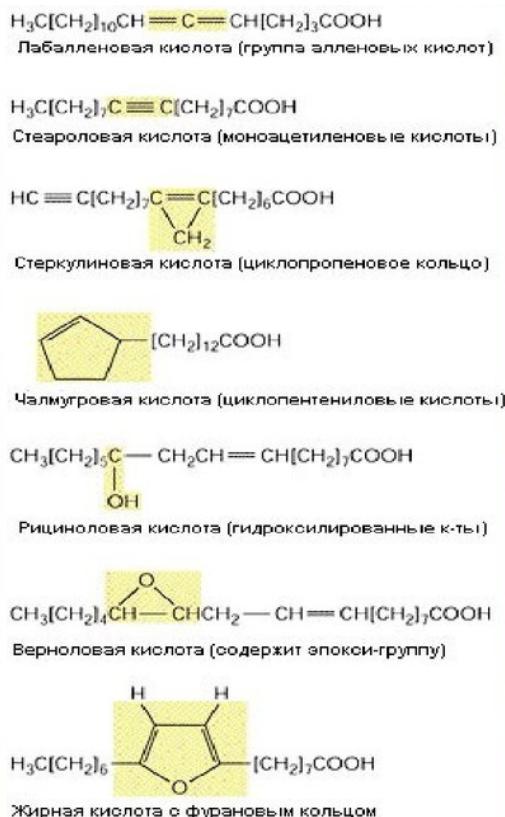


Table 2. Some characteristic fatty acids prevalent only in certain plant species

No. of carbons	Structural formula	Systematic name	Common name	Present mainly in seed fats of
A. Saturated				
10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	n-decanoic	capric	Ulmaceae, Lauraceae, Lythraceae
24	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	n-tetracosanoic	lignoceric	Leguminosae, Sapindaceae
B. Unsaturated				
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	cis-6-octadecenoic	petroselenic	Umbelliferae, Araliaceae
22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	cis-13-docosenoic	erucic	Cruciferac, Tropaeolaceae
C. Unsaturated (conjugated)				
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2[\text{CH}=\text{CH}](\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis, trans, trans, cis-9,11,13,15-octadecatetraenoic	parinaric	Rosaceae Balsaminaceae
D. Acetylenic				
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	octadec-6-ynoic	taric	Simarubaceae
18	$\text{CH}_3=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	octadec-17-en-9,11-dienoic	isanic	Olacaceae
E. Cyclic				
18		13-cyclopent-2-enyl-n-tridecanoic	chalamoogric	Flacourtiaceae
19	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	8-(2-n-octylenyl)octanoic	sterculic	Sterculiaceac
F. Hydroxy				
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12-hydroxyoctadecanoic	ricinoleic	Euphorbiaceae

Рисунок 77.

Цианолипиды

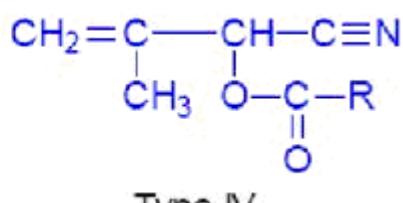
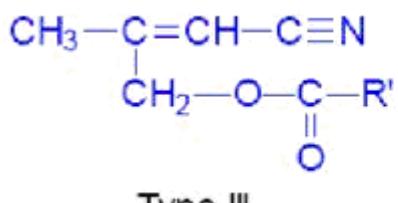
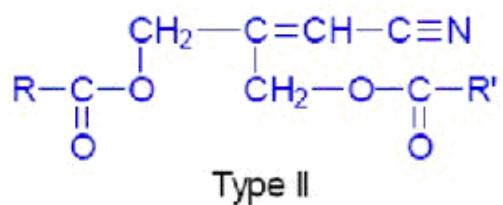
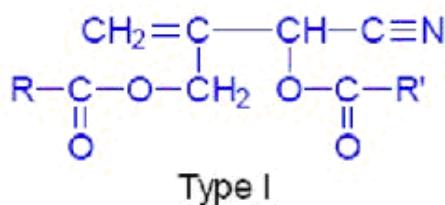


Рисунок 78. Цианолипиды

Тоже конвергенция (Рис.78). Работает синильная киолота, когда распадается липид (Рис.79). Одно семейство 4-5 растений (Рамбутан, Мыльное дерево и т.д.).

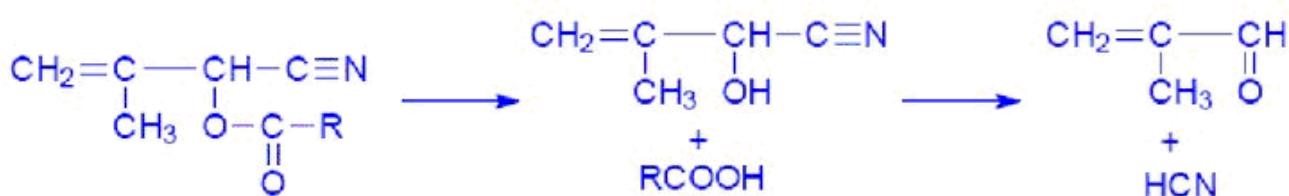
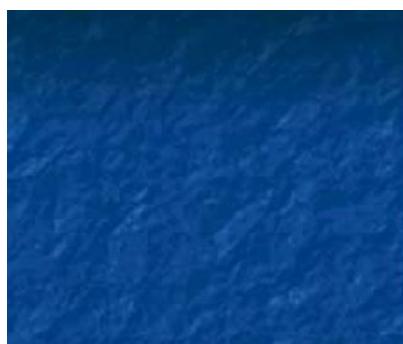


Рисунок 79 Образование синильной кислоты при распаде цианолиптида

Ацетиленовые производные



ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В ПРИРОДЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЦЕТИЛЕНА		
Название	Структура	Распространение
Диатрен	<chem>HOOC-CH=CH-(C#C)5-CH2OH</chem>	Культуры грибов
Артемизиевый кетон	<chem>H3C-(C#C)3-CH=CH-CH2-CH2CO-CH3-CH3</chem>	Anthemideae
Фалькаринон	<chem>H3C-(CH2)4-CH=CH-CH2-(C#C)2-CO-CH3-CH3</chem>	Araliaceae, Annonaceae
Матрикариевый лактон	<chem>H3C-CH=CH-C=C-CH=7c1ccccc1</chem>	Matricariaeae
Артемизиевый лактон	<chem>H3C-C≡C-C=7c1ccccc1</chem>	Asteraceae
Карлина окись	<chem>Phenyl-CH2-C≡C-C=7c1ccccc1</chem>	<i>Carlina acaulis</i>
Лауренсия	<chem>Br-C1=CC=C1-CH2-CH=C(O)-C(=O)C</chem>	<i>Laurencia glandulifera</i> (водоросль)

Table 6. Typical acetylenic compounds of higher plants (SORENSEN, 1963)

Compound	Genus	
<chem>CH3[C#C]2CH=CH-CH=CH(CH2)3CH=C=CH2</chem>	<i>Chrysanthemum</i> (Compositae)	
<chem>CH3[C#C]2CH=CH-CH=CH-CH2-CH2-O-C(=O)CH3</chem>	<i>Chrysanthemum</i> (Compositae)	
<chem>CH3(CH2)6CH=CH-CH(OH)[C#C]2C(=O)CH=CH2</chem>	<i>Carum, Oenanthe, Siuum</i> (Umbelliferae)	
<chem>CH3[C#C]4CH=CH-CH(Cl)-CH2</chem>	<i>Centaurea</i> (Compositae)	
<chem>CH2=C1COCC1-CH2[C#C]2CH=CH-CH=CH2</chem>	<i>Carlina</i> (Compositae)	
<chem>CH2=C1COCC1-CH=CH-C≡C-C2=S</chem>	<i>Santolina</i> (Compositae)	

Цикутотоксин
HO(CH2)3-C≡C-C≡C-(CH=CH)3-CH(OH)-(CH2)2-CH3

Энантотоксин
HOCH2-CH=CH-C≡C-C≡C-(CH=CH)2-(CH2)2-CH(OH)-(CH2)2-CH3

Рисунок 80. Ацетиленовые производные

Ацетилен – очень активное соединение, очень сильный яд (Рис.80). У Веха болотного цикутотоксин две тройных связи дает быстрое отравление.

Ацетогенины

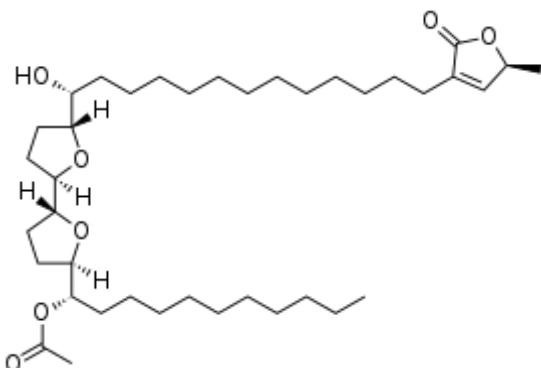


Рисунок 81. Уварицин

Уварицин открыт 30 лет назад (Рис. 81) Около 300 структур, очень мощное противоопухоловое действие, очень своеобразная схема, обязательно присутствие лактонного цикла, часто - гамма-лактоны. Двойная связь обычно в лактонном цикле, всегда имеются гидроксильные группы и почти всегда - фрагменты циклического эфира, размер от C17 до C37. Найден только в растениях семейства Аноневых, сильная цитотоксическая активность против насекомых, грибов, паразитов. Ингибиторы NADH-дегидрогеназы митохондрий.

Синтез

вторичных

метаболитов

Мы посмотрели фитохимию вторичных метаболитов, увидели, что это - огромное количество самых разнообразных структур, которые вряд ли можно считать ненужными. Есть разумная логика синтеза.

Логика синтеза вторичных метаболитов

1. Предшественниками синтеза служит очень немного первичных метаболитов. Все фенольные соединения синтезируются из двух аминокислот - тирозина и фенилаланина. Все изопреноиды синтезируются из изопентилдифосфата (есть некоторая тонкость). Алкалоиды - максимум из десятка аминокислот. 100000 соединений - из десятка предшественников.

2. Биохимия вторичного метаболизма разделяется на два этапа: цепочки синтезов и как это происходит, какие ферменты. Цепочки более-менее известны, синтез сейчас изучается. Синтез четко спланирован, обслуживается обширным набором специальных ферментов. Некоторые - очень специфичны, используют в качестве субстрата только одно соединение. Некоторые - нет, используют десяток соединений со сходными функциональными группами.

3. Для многих групп вторичных соединений существуют альтернативные пути синтеза. Одно и то же или близкие соединения могут образовываться разными путями. Часто

дублируются в разных компартментах (пластиды и цитозоль - стандартный вариант). Когда отсеквенировали геномы, оказалось, что на синтез "ненужных" соединений задействовано от 15 до 25% всех работающих генов. Получается, что вторичный метаболизм играет в растениях очень важную роль.

Этапы синтеза вторичных метаболитов

Сначала формируется "базовая" структура, базовых структур немного, веерный синтез. На основе базовой структуры затем формируются разные варианты. Принципы формирования базовой структуры - разные для разных групп. У изопреноидов это - гибкие цепочки. 5, 10, 15, 20, 30, 40 атомов углерода. Полезно, что торчат метильные группы, цепочки потом можно свернуть в циклы. Для алкалоидов - часто конденсация аминоальдегидов и/или аминокетонов, часто - одних и тех же, они образуют базовую структуру, которая потом будет формировать скелет.

Второй этап - скелет. Для изопреноидов работают циклазы (на первом этапе работали пренилтрансферазы, вплоть до полипренилтрансфераз). Для алкалоидов из базовой структуры формируются гетероциклы. Для сложных индольных алкалоидов добавляется еще C10-соединение, получается, что идет алкалоидный синтез из аминокислот и из изопреноидов секаллогенин, потом формируются скелеты.

Третий этап - декорирование. Базовая структура - их немного, скелет - их сотни, декорирование: метилирование, ацилирование, десатурация, гидроксилрование, гликозилирование. Декорирование - самое интересное, поскольку меняет биологическую активность, часто на противоположную. Декорирующих ферментов больше всего. Найдено 300 различных изоформ цитохрома P450 в геноме арабидопсиса. Трансгенных растения арабидопсиса и табака синтезировали цианогенные гликозиды с промоторами цитохромов. Там же около сотни дезоксигеназ. Разные для вторичных метаболитов и гиббереллинов. Для некоторых широкая субстратная специфичность, для некоторых более узкая. Ацилтрансферазы, которые переносят ацильные группы: более 50 генов (структурно близки и похожи на ацилтрансферазы первичного метаболизма). Метилтрансферазы, которые переносят метильные группы на O-, C-, N-, S-. C-, N-, S-метилтрансферазы эволюционно по-разному находятся по геномам, O-метилтрансферазы - одна группа с консервативным SAM-связывающим мотивом, метилируют флаваноиды, изопреноиды, алкалоиды, полиамины, поликетиды. Гликозилтрансферазы: есть O-, C-, N-, S-гликозиды. Все - сотни, если не тысячи ферментов, которые делают декорирование скелетов.

Синтез основных групп вторичных метаболитов

Фарнезилдифосфат – предшественник C15 и C20 – дитерпеноидов и сесквитерпеноидов. Могут быть димерные соединения, гассипол, есть в хлопке, димер сесквитерпеноидов. Дитерпеноиды: касбен из кастровых бобов - очень мощное токсичное вещество,

фитоалексин. Таксановый скелет, таксоиды - тоже очень токсичное соединение. Смоляные кислоты. Это - скелет и базовые структуры. Алкалоиды: трептамин - фактически, вторичный метаболит, растительный амин, из получается триптофана и секаллагенин, монотерпеноид. Когда они соединяются получается исходная базовая структура, из которой формируются разные скелеты. Тоже самое - для изохинолиновых алкалоидов, фенольное соединение аминокислота тирозин, которая может быть декарбоксилирована или дезаминирована. Получится либо амин, либо кетокислота, дальше формируется одна структура или другая. Будет образовываться набор скелетов. Есть другие алкалоиды, ретикулин, когда образовалась структура, из нее формируется набор изохинолиновых алкалоидов, в том числе и морфиновые. Индольные алкалоиды: из триптофана и секаллогинина, базовая структура. Модификаций много.

Фенольные соединения синтезируются аналогично: исходная аминокислота, затем образуются оксикоричные кислоты, дальше они соединяются, добавляются, разбирать не будем. Известны хорошо ферменты, синтез четко спланирован, построен, веерная структура (базовая структура, скелеты, декорирование - модификации), которая позволяет формировать 10000 соединений всего лишь из десятка исходных. Это - биохимия.

Физиология вторичного метаболизма

Теперь вторичный метаболизм - очень важная вещь. Физиология вторичного метаболизма изучает, как это все локализовано в пространстве и во времени - первый вопрос. Второй вопрос - зачем все это нужно.

Локализация вторичного метаболизма в пространстве и во времени.

Ко второму подходим, про первый - ясно, что это не только очень сложно образованная биохимическая иерархия, но и реально в пространстве и времени - четко спланированная, сработанная система, которая веерно развивается по организму. Часто место синтеза и накопления вторичных метаболитов разделено, причем на уровне клетки, ткани, органа, целого растения, разворачивание по времени четко спланировано. Морфиновые алкалоиды никогда не синтезируются на ранних этапах, в маке, как правило, алкалоидов, нет, можно есть булочки с маком, в проростках никогда не бывает морфинов, там есть сангинарин, протопин. Только когда сформировалась коробочка, млечники, там начинают формироваться морфиновые алкалоиды. По пространству: в клетках диаскорей стероидные гликозиды флуоресцируют по периплазматическому пространству, по клеточной стенке. Как правило, синтез ведут метаболически активные компартменты клетки: цитозоль, эндоплазматический ретикулум, пластиды, накопление - метаболически неактивные, чаще всего - вакуоль и периплазматическое пространство. Пластиды и вакуоли - место хранения очень многих веществ, в том числе и вторичных метаболитов. Пластиды - место синтеза очень многих неприятных вещей, часто "фабрика горячих производств", там синтезируются вторичные метаболиты в том числе. На уровне

тканей - есть желёзки, трихомки, часто - место синтеза или накопления, или синтеза и накопления. У тимьяна моно - и сесквитерпеноиды синтезируются в пельтатных железках. Часто там накапливаются. Железистый волосок мяты: есть базальная клетка, головка, которая состоит из многих клеток. Показано, что синтез и накопление происходят в головке. Моно - и сесквотерпеноиды хранятся в секреторной полости лимона, лимонен чаще всего, это - своеобразные ходы так же, как смоляные ходы и млечники. Млечники - предельная вакуолярная система как у чистотела, смоляные ходы - вариант периплазматического пространства, которое может образовываться и лизогенно, и слизогенно. Синтез моно-, сескви- и дитерпеноидов идет в клетках, выстилающих смоляной ход, они секретируются в этот ход, там накапливается смола, она может защищать от жуков-кошедов. Стевия - стевиол-гликозиды. Там - разные трихомки, показано, что стевиолгликозиды синтезируются и накапливаются в круглых железках. Система синтеза тропановых алкалоидов (дурман, белена): была сделана окраска на ферменты, начальные этапы синтеза локализованы в эндодерме, конечные могут формироваться в перицикле. По тканям распределен синтез. Цепочка синтеза - осуществляется группа этапов, даже в разных тканях. То же самое - индолевые алкалоиды, начальные этапы синтеза могут идти в эпидермальных клетках, когда работает стриктозидинсинтаза, финальное, конечное - млечники листа. Другой вариант - кончик корня. Один и тот же синтез может быть по-разному компартментализован. Может быть дублирован синтез вторичных метаболитов в разных компартментах. Например, хорошо известно, что шикиматный путь, образование ароматики, идет параллельно в пластидах и в цитозоле с разными конечными продуктами. Чаще всего в цитозоле идет ароматика, которая нужна для первичного метаболита - это грубо, как тенденция, а пластиды часто направлены на синтез, например, флавоноидов. Биохимическая сенсация конца 20 века: считалось (Ромер сделал), что все изопреноиды синтезируются из изопентенилдифосфата, который образуется из мевалоновой кислоты. Многие вторичные метаболиты имеют байпасы, обходные пути, шунты, изопреноиды - нет, до тех пор, пока не померили изотопную метку и оказалось, что она для микробов включается совершенно по-другому. Изопентенилдифосфат получается с другой меткой. Начало - одно и тоже. Когда стали раскручивать, получили потрясающий пример биологической конвергенции: одно и то же соединение у разных организмов формируется совершенно по-разному эволюционно. МЭП-путь - изопентенилдифосфат формируется через дезоксиксилозу 5-фосфат, через метилеритритол-4-фосфат, он характерен для многих микроорганизмов, в том числе, для цианобактерий, которые скорее всего являются предшественниками пластид. Мевалоновый путь - для млекопитающих, животных. Все живые организмы разделились на две группы по синтезу. У растений и некоторых простейших существует два пути синтеза изопентилдифосфата. Один - в пластидах, почти доказано, что от симбиогенного происхождения пластид, а второй вариант - цитозольный. Фактически, это - новый взлет поиска синтеза антибиотиков. У очень многих патогенов - МЭП-путь. Можно сделать антибиотик нового поколения. Есть ингибиторы этого пути - например, фосфидомицин,

абсолютно безвреден для животных. Вопрос: обменивается ли изопентенилдифосфат цитозоля и пластид - скорей всего, да. Если ингибиовать пластидный путь синтеза, то будет плохо, если цитозольный, то пластиды будут снабжать цитозоль. Локализация стероидных гликозидов. Синтез идет в мезофилле листа, водорастворимой (фуростаноловой формы). Затем разносится по всему растению, откладывается в идеобластах, клетках-накопителях в листе и покровных тканях стебля, в фуростаноловой форме, то есть, в них это - полуиндуциальное соединение. Основной ток идет в корневище или подземную часть (для диаскорей это - клубни), там работает фермент, который превращает гликозид в активную (спиростаноловую) форму. В клубнях они могут накапливаться до 8 процентов, в отличие от картофеля клубни хранятся лет десять. Идея мультифункциональности вторичного метаболизма. На один маленький агликон приходится четыре-пять сахаров (414 единиц углерода). Агликоны - порядка 10-15%. Дальше все транспортируется в клубни и хранится в таком виде. Первая функция - защитная, это очень токсично. С другой стороны, это - хранение сахара. Теряем 10-15% эффективности хранения за счет этого агликона, приобретаем свойства надежного хранения. Двойная функция - транспорт и хранение. Так же работают хинолизиновые, хинолиновые алкалоиды, синтезируются в хлоропластах, разносятся по растению, накапливаются везде, когда появляются плоды, отовсюду исчезают, накаливаются в плодах (Горький люпин).

Назначение вторичного метаболизма

Главный вопрос: зачем вторичный метаболизм растению? Первая идея Косселя - совсем не нужен, отходы производства. Доказывалась так: метаболизм у растений избычен, в основном, из-за фотосинтеза. Изопрен часто выделяется листьями. Синтез вторичных метаболитов - сброс избыточного метаболизма. Критика этой гипотезы: зачем 100000 соединений? Обсуждалось, что это - запасные соединения. Многие вторичные метаболиты могут быть запасными соединениями. Алкалоиды, фенольные соединения при дефиците азота могут быть метаболизированы. Снова возникает вопрос: зачем их так много и эффективность запаса не очень высока. Для сахара с гликозидами да, для алкалоидов один азот на большую молекулу - нет. Пришли к тому, что это - защитные соединения. Первый круг, второй круг (постоянно присутствующие и полуиндуциальные, и, наконец, третий круг - фитоалексины). Сейчас формируется мнение, что защитные соединения - одна из функций. Это - необходимость организма, который ведет прикрепленное существование. Все свои экологические проблемы растение должно решать либо морфологически, либо на уровне биохимии. Поэтому вторичные метаболиты присутствуют необязательно каждый в каждом растении. Экологические ситуации и задачи разные, специфика должна существовать. Это сложно доказать. Практическое использование: Раиса Георгиевна Бутенко, академик Васхнил, Член-корр. большой академии, была в числе первых пяти исследователей, которые начали работать с культурой клеток высших растений. Есть каллусные, супензионные культуры клеток. Культура клеток - уникальная биологическая система, которая

отличается как от микробных популяций, так и от интактных растений. Это - популяция не половых клеток, а соматических. Это - гетерогенная система, обязателен отбор клеток по пролиферации. Как будет идти вторичный метаболизм в культуре клеток растений? Исходно культуру клеток позиционировали как модель. Это - не модель. Если правильна идея о том, что вторичный метаболизм - экологическая задача целого растения, не клеточная (идет от Косселя), и мы имеем клетки, которые отбираются по интенсивности пролиферации, которые ушли из-под контроля организма, то вторичный метаболизм там идти не должен. Это не совсем так. Стероидные глиозиды синтезируются в культуре клеток диаскореи дельтавидной, их довольно много, но только фурастаноловые (протодиосцин характерен для листьев, дельтозид - для корней. появляются 26-S-изомеры, не характерные для интактного растения, содержание гликозидов стабильно и почти на порядок выше, чем в интактном растении). Культура клеток - система, альтернативная интактному растению. Часто изучать какой-то процесс в альтернативной системе более эффективно, чем в исходной. Если в культуре клеток идет отбор на пролиферацию, то все, что способствует пролиферации, будет отбираться автоматически, стероидные гликозиды стимулируют пролиферацию клеток, это с одной стороны доказывает, что культура клеток - популяция, с другой стороны это - полуиндуциальное соединение и именно S-изомер дельтозида будет накапливаться в культуре клеток. Специфичный фермент, который его расщепляет, в культуре присутствует, правда, не везде. То же самое с гинзенозидами, поменяв среду, взяв вместо 24D ауксины, можно на третий цикл выращивания почти с нуля увеличить содержание гинзенозидов до 5 процентов. Часто появляются те соединения, которые для интактного растения не очень характерны, а в культуре клеток их довольно много. Можно получить культуру клеток, которая будет продуцировать вторичные метаболиты, в том числе, стероидные гликозиды. Выращивание происходит в биореакторах. Бывает полупроточное выращивание в них. Уже есть некоторые препараты, полученные таким образом. Преимущества использования культур клеток высших растений: абсолютно экологически чистые, без гербицидов, пестицидов. Круглогодично, очень быстро, женшень на плантации растет 1 грамм в год, в культуре - 1 грамм с литра за сутки. Есть минусы. Культура клеток может быть нестабильна, но недостатки можно преодолевать. В Корее есть завод по производству женшеня. Для женшеня важно, чтобы были корни, а не биомасса. Взяли пять миллионов долларов кредит, построили завод. Получают аддитивные корни и продукцию из них. Завод обслуживает пять человек. Вторичный метаболизм может иметь практическое применение. Сопоставляя синтез в культуре клеток, аддитивных и интактных растениях, можно корректно доказывать функцию вторичных метаболитов, много работ говорит, что это - экологические инструменты, с помощью которых растение решает свои проблемы.

Лекция 10. Завершение роста и развития растений.

Вегетативное развитие растений

Ювенильная стадия развития растений

В прошлый раз мы разобрали развитие и механизмы работы апикальных меристем (Рис.82). Там важна (у животных - история развития клеток и тканей), позиция. Противостояние: покоящийся центр меристемы вырабатывает сигналы (известно, какие), чтобы клетки

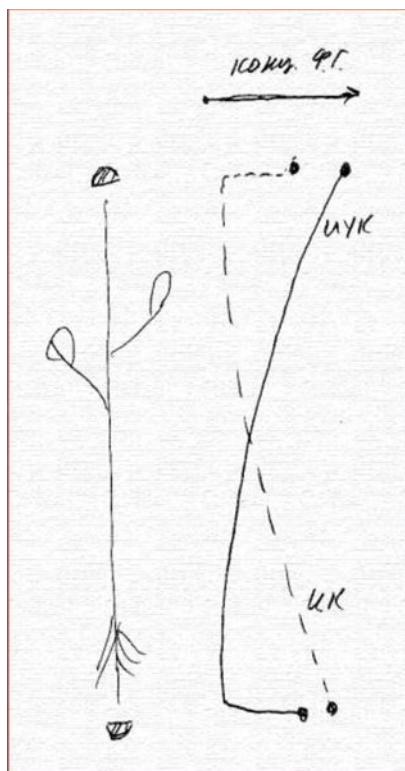


Рисунок 82. Концентрации ауксинов и цитокининов на ювенильной стадии развития растений.

и таким образом они друг друга ускоряют.

Развитие побега

Кроме градиентов ауксина и цитокинина есть подпрограммы развития элементов побега: листа, пазушной почки и междуузлия.

Развитие

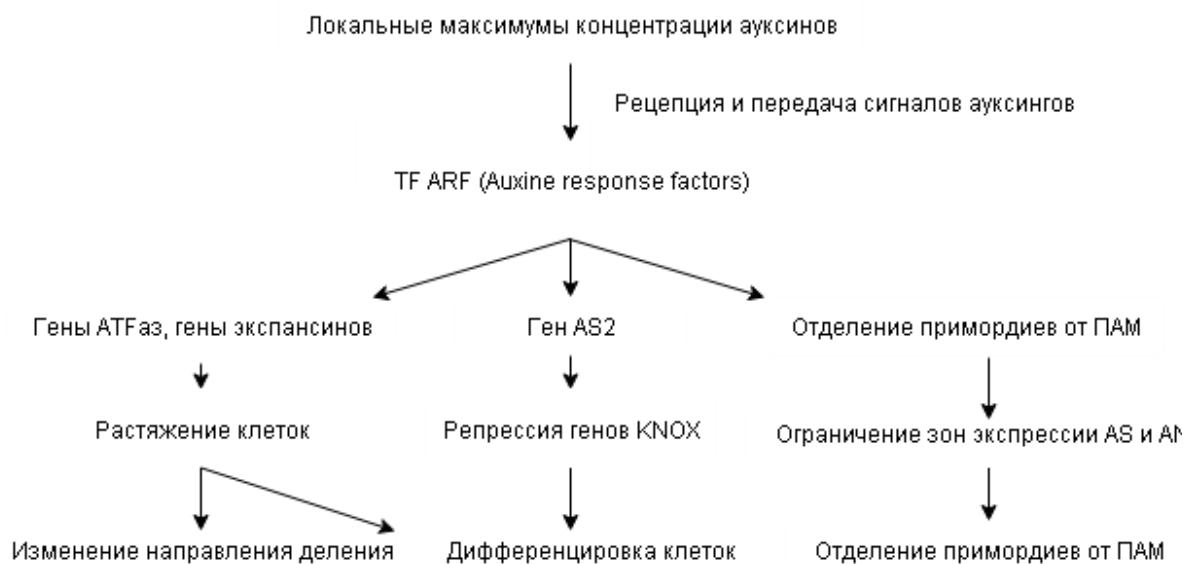
Этапы развития листа: закладка листового примордия, определение симметрии (где

листа

будет дорзальная и вентральная поверхности - верхняя и нижняя), формы листа (простой, сложный, рассеченный). В каждом этапе будут играть важную роль ауксины и цитокинины.

Закладка развития листа. Даже в старых работах показано, что градиент ауксина - не ровный. Наблюдались пульсовые, локальные повышения концентрации по длине стебля. Пульс нашли примитивно: собрали кору и померяли концентрацию. Сейчас более тонкими методами было показано, что перераспределяются транспортеры ауксины пины (в частности, Pin3). На локальных изменениях концентрации закладываются листовые примордии.

Схема событий (Схема 3): пульс ИУК, ауксины активируют формирование камбиальных тканей, образуется прокамбий, будет формироваться примордий. Здесь же ауксины формируют проводящие системы, аттрагирующее действие, сюда будет проходить флоэма и ксилема. Что будет формироваться - флоэма или ксилема, зависит от количества сахаров, не только от ауксина. На культурах клеток показано: если положить на дедифференцированные клетки блок агара с ИУК, то там, где <2% сахарозы, будет формироваться ксилема, где >4% - флоэма. Будет формироваться



проводящая система. По ней будут поступать цитокинины. Ауксины и цитокинины дают активацию меристемы. Тут будут маргинальная и интеркалярная меристемы, что вызовет рост листовой пластинки. Если в процессе развития растений центр синтеза гиббереллинов будет перемещаться в лист, то при достаточно сформированной листовой пластинке начнется синтез гиббереллинов и начнется рост листа до нормального размера. Вот логика регуляции формирования листа. Это - почти автономная система, на нее будут накладываться внешние факторы, которые будут определяться рецепторами света - фитохромами и криптохромами. Есть гены, которые регулируют этот процесс: и

цитокинины, и как минимум два гена ауксинов в этом участвуют ARF-MP и NPH4. С помощью генно-инженерных подходов выяснено, что в процессе формирования листа очень мозаично активируются очаги делений на разных стадиях развития листа. Было получено трансгенное растение с cyclin1At:GUS-репортерным геном (циклин 1-маркер перехода G2 в митоз - маркер клеточного деления; ауксины активируют киназу, цитокинины – циклин). Анализ мутантов показывает не только логику развития листа, но и закономерности. Что выяснили: инициация листа (пульс и закладка) и формирование генетически контролируются независимо. Координированная в пространстве и времени, но независимая работа этих двух групп генов определяет и время появления листа и что за тип. Образование листа начинается с изменения ориентации и скорости делений в L1, L2 и L3 – слоях. Скорость делений и направление тоже детерминированы независимо.

Что за гены и как работают: в начале — белки *pin*, (*pin3*), что приводит к локальной концентрации ауксинов, закладываются примордии, дальше работает ауксиновый сигналинг, скорее всего, несколько направлений. Во-первых: гены Н-АТФаз и гены экспансинов - то, что меняет прочность клеточной стенки, растяжение клеток, Гены Н-АТФаз, активируют транспорт ионов и другие процессы, коррелирующие с процессами деления. Растворение клеток связано с изменением направления деления, и частично дифференцировкой клеток. Во-вторых, гомеозисные гены, в частности, *AS2*, который будет выключать гены *KNOX*, которые определяют форму и размер листьев – дифференцировка клеток. Противостояние: гены *AS2* связаны с репрессией другой группы генов. Третье – несколько генов *AS* и *ANT* будут определять отделение примордии от побеговой апикальной меристемы и формирование нормального листа. Сигналинг неизвестен.

Таким образом, ауксин запускает веер реакций, которые связаны с делением, растяжением дифференцировкой клеток и каким-то морфологическим процессом. Первый вариант - группа генов, которые связаны с АТФазой. Одно из основных действий ауксинов - работа помпы, которая запускает многие процессы в делении клетки и работа ионных насосов. Экспансины разрыхляют водородные связи и клеточной стенки - предопределение роста и растяжения. Это позволяет закладывать примордии, клетки быстро дают бугорок. Таким образом (филлотаксис очень важен) закладываются листья. Важно не только для работы листа: огромную роль играют гомеозисные гены, которые связаны напрямую с процессами роста и дифференцировки растений (и животных) обычно кодируют факторы транскрипции, которая формирует программу развития органов и тканей. Если они будут муттировать, то одна ткань будет превращаться в другую, один орган в другой, для животных - одна часть тела в другую. Это - очень широкая группа генов. У высших растений важны две группы гомеозисных генов: гомеобокс-содержащие гены и гены с МАДС-боксом. Группы генов часто работают парами, не как антагонисты. Если одни вызывают дифференцировку, то другие - деление. Их взаимодействие часто формирует противостояние, но то, которое делает развитие и

дифференцировку. Гены, содержащие гомеобокс, участок 180 п. н., кодирующий гомеодомен, обеспечивает связь с ДНК (делает трансфакторами у растений). Первый такой ген, найденный у растений, был knotted. Мутация - в уже сформировавшемся листе появляются узелки (knots). Расположение сосудисто - пучковое, вдоль сосудов. Фактически, делящиеся клетки. Потом выделили большое количество генов, подобных KN1. Их стали называть Knoх (похожие на KN1) с гомеобоксом, они почти все участвуют в развитии листа. Есть те, которые регулируют апикальные меристемы побегов (и развития листьев) Kn1 и Rs1 у кукурузы, KNAT1, KNAT2 и stm у арабидопсиса. Их работа - поддержание деления. Гены, содержащие MADS-бокс, тоже найдены довольно давно, не только у растений. Название - от четырех мутаций у разных организмов: митотический фактор у дрожжей, AGAMOS у арабидопсиса и Defisient у львиного зева, Serum factor у млекопитающих. В этих генах есть последовательность около 58 аминокислот, которая чаще всего связана с димеризацией. Гены с MADS-боксом - трансфакторы. Чаще всего их продукты работают в паре. У животных и насекомых этих генов не так много, у растений генов с ними порядка сотни. Если гомеозисные гены чаще связаны с вегетативным ростом (формирование листа, меристемы, хотя работают все время), то гены с MADS-боксом важны для цветения. Можно выяснить, как происходит формирование листа, по эктопической (смещенной экспрессии) что за что отвечает. Есть катастральные гены, которые определяют разметку. Список (неполный) гомеодомен-содержащих трансфакторов: WUS, CUC1, CUC-2-гены - дают чашечковидные соцветия, CLV3 STM, KNAT1 - определяют меристемы. AS1, FUL1, YABBY, VTN1, PHB, PHNI - гены, которые работают при примордии и формируют листья. У мутантов арабидопсиса по KNOX-генам - самые разнообразные формы листьев, растение с трансгеном 35S:KNAT1 похоже на мутант as2-2 se – еще один инструмент для изучения. Каким образом получается разная форма листьев? Для развития сложного листа необходимо возникновение локальных максимумов концентрации ауксинов в краевых доменах. Работает ауксин (главное), перераспределение PIN-ов, работа АТФазы, активация экспансионов, активация роста и растяжения. Мутант по PIN 1 – нарушение полярного транспорта ауксинов - лопасть не формируется. Самое важное - направление и скорость деления контролируются разными пространственно-специфичными генами, работают независимо. Гены, ответственные за закладку примордия, форму и размер листа также контролируют разные, независимые процессы.

Развитие почки

Закладка пазушных почек всегда происходит только после образования листа. Сначала формируется хотя бы примордий и растет до определенного размера, потом закладывается почка. У разных видов немного по-разному. Существует явление апикального доминирования, почка закладывается, но в первом-четвертом листе не развивается в побег, становится спящей почкой. Если есть центральный побег, сразу ветвление нецелесообразно. Это - до 4-6 (иногда) листа. Если почему-то повреждается центральный побег, то снимается апикальное доминирование и быстро активируются

пазушные почки. Это - рациональная страховка на случай повреждения основного побега. Происходят те же вещи, что и при закладке листа. Формируется почечный апекс, ауксинов достаточно, это гормональная регуляция, формируется прокамбий, проводящий пучок, но после того, как сформировалась почка, изменяется баланс гормонов, активирующие, все, которые работают при закладке листа - ауксины, гиббереллины, цитокинины, снижаются, АБК резко повышается. Она вызывает тормоз развития почки, почка превращается в спящую. Программа развития растения – сложная, многоуровневая, четко регулируемая внутренними и внешними факторами. Программа развития почки до момента торможения - почти эндогенная вещь. Но если сработать фитохромом (не для всех видов), можно прервать покой почки, и она будет развиваться в побег. То есть, отслеживание светового режима позволяет выключать апикальное доминирование. Если изолировать почку, стерильно поместить на чашку Петри, то начнет развиваться побег. Более того, во что разовьется почка, зависит от стадии развития и ее и листового примордия. Если листовой примордий, который должен сформировать лист, изолировать на очень ранней стадии развития, то он разовьется в побег, если на более поздней, то в лист. Исходно закладка - широкая программа развития, т. к. нет изолированности на интактном растении, то вначале будет развиваться лист. Лист будет регулировать развитие почки.

Ветвление

Никогда нельзя предугадать, какой будет габитус интактного растения. Ветвление - важный момент адаптации к внешним факторам. Если будут хорошие условия, то ветвление будет интенсивным. Ветвление - снятие апикального доминирования, когда идет интенсивный рост побега и листья с пазушной почкой далеко уходят от апекса, пазушные почки могут выходить из состояния покоя и формировать побеги следующего порядка. Механизм пока не понятен. Три гипотезы обсуждаются. Возможно, работает несколько механизмов одновременно: 1. Торможение высокими концентрациями ИУК. Они играют тормозящую роль, чем ближе к апексу, тем более высокие концентрации, скорее всего, они запрещают почке развиваться. 2. Трофические факторы: другое действие ауксинов. Аттрагирующее действие - апекс побега притягивает на себя все питательные вещества, почкам не хватает, они голодают. 3. Конкуренция за цитокинин. Цитокинины идут в апекс и проходят транзитом мимо. Если на почку довести экзогенно цитокинин, она проснется и будет расти локально. Если не стимулировать, то остановится в росте. Может работать комплекс причин. Возможно, для разных видов есть вариации.

Рост междуузлия

После формирования листа и почки в лист переходит центр образования гиббереллинов. В нем они активно синтезируются, будут транспортироваться в междуузлие. Одно из основных действий гиббереллинов - болезнь бешеных проростков - растяжение

междоузлий. Лист активирует развитие междоузлия, помимо гиббереллинов - еще индолилуксусная кислота, которая идет из апекса побега будет активировать интеркалярную меристему стебля. Это - совместное действие. Этилен определяет утолщение междоузлия. Главное – сформировать лист и почку, междоузлие – отработанный придаток.

Цветение

Процесс зацветания

Одна из важнейших стадий развития растений - переход от вегетативной стадии развития к генеративной. Очень серьезное к этому внимание было привлечено в 30-ых годах прошлого века, когда в Америке появился мутант табака, который назвали Мерлинский Мамонт (Merlin Mamont), огромного размера, не цветет в обычных условиях, зацветал в условиях теплицы. Оказалась чрезвычайно важна длина дня (короткая). Процесс зацветания можно разделить на 3 блока: индукция цветения (что вызывает главный переход в жизни растения), эвокация цветения (закладка преобразования вегетативной меристемы в генеративную), формирование цветка.

Индукция

цветения

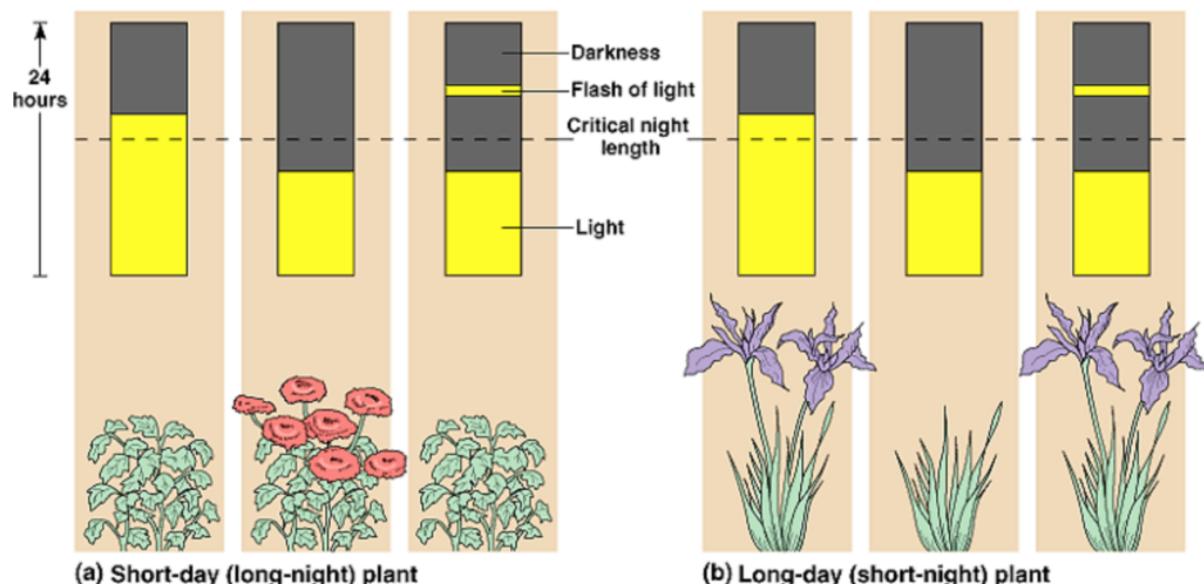
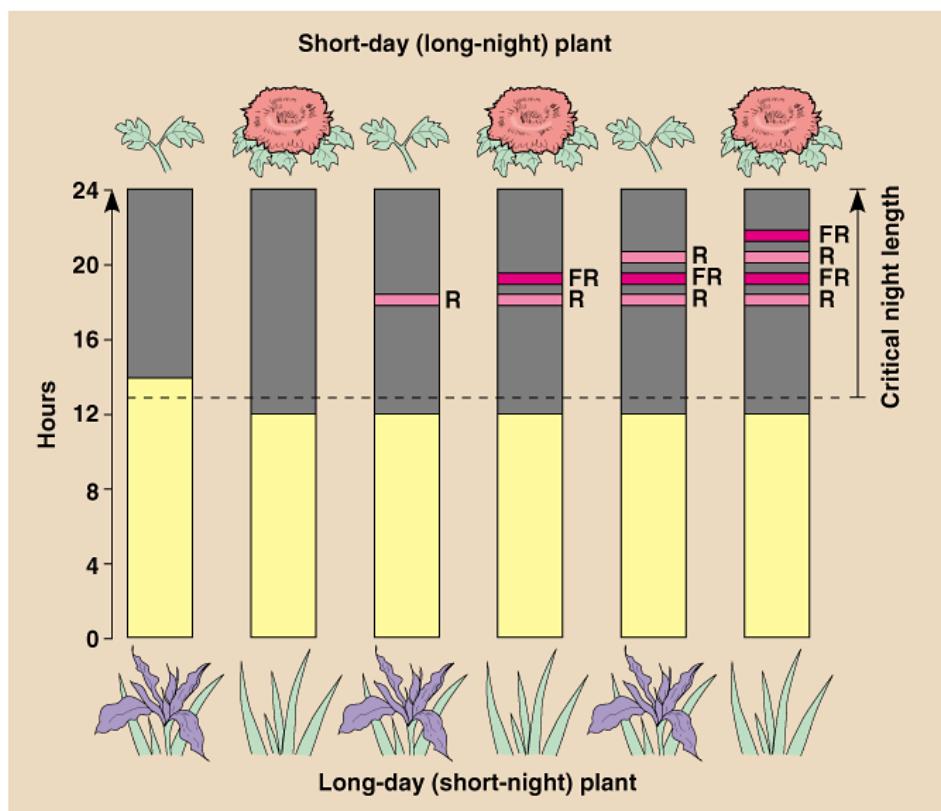


Рисунок 83. Индукция цветения при разной длине дня

Для большого количества растений чрезвычайно важна длина дня (Рис. 83). Так было начато изучение фотопериодизма. Фотопериодизм - влияние соотношения длин



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Рисунок 84. Индукция цветения при разной длине ночи

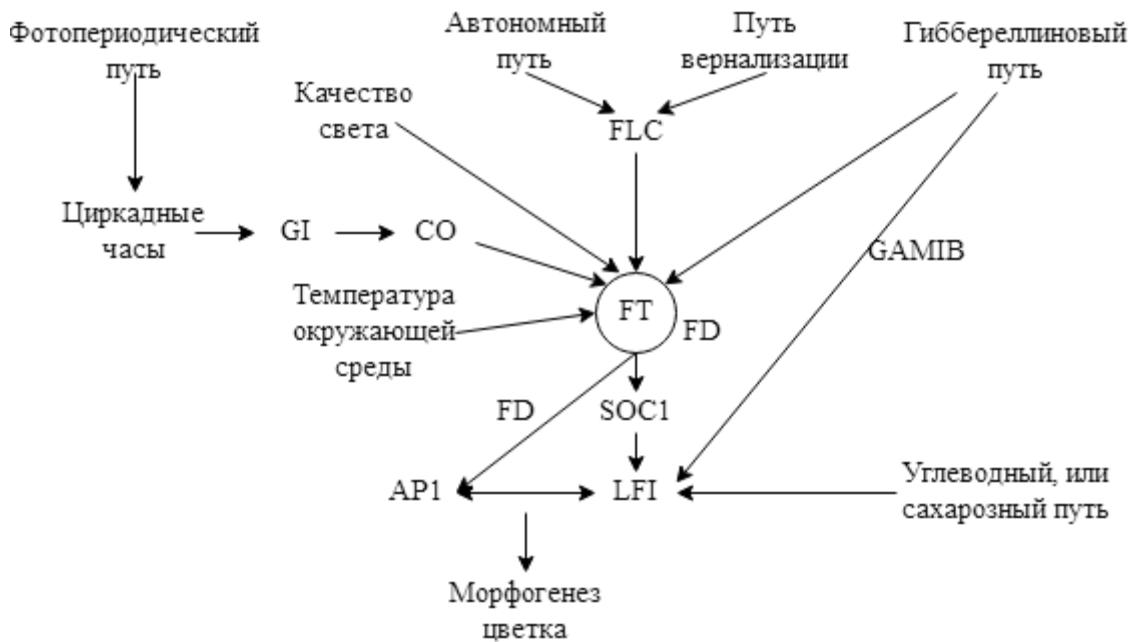
ночь/день на разные процессы развития растений. Не только цветение, но для цветения – одно из главных. Оказалось, что растения можно разделить на группы: короткодневные растения (зацветают на коротким дне, как Мерлинский Мамонт), длиннодневные растения (зацветают на длинном дне), нейтральные (могут цвети и на длинном, и на коротким дне). Потом градацию сделали более детальной, выделили 2 группы растений: коротко- и длиннодневные. Когда стали изучать, выяснилось, что важна длина ночи (Рис. 84). Если в короткий день для длиннодневного растения прервать ночь короткой вспышкой посередине, оно зацветет. Если прервать ночь вспышкой для короткодневного растения, то оно цвети не будет. Важен темновой период. Регуляция разная - полигенная и моногенная. Для разных растений длина дня разная. Для кого-то день 7 часов индукционный, для кого-то длинный. Если взять сутки экспериментально не 24 часа, а больше, важно, сколько длится ночь. Если сократить, то же самое. Было много экспериментов. Самое существенное – вспышка, которой можно переместить, отменить индукционный период: очень важно, каким светом это делается. Если красным, то работает. Если после красного дальний красный, индукционный период меняется если опять сделать красный, все возвращается. Это говорит о том, что кроме часов (циркадных ритмов) задействован фитохром. Два биолога прошлого века, которых читит весь мир и знают почти все биологи - Михаил Христофорович Чайлахян (физиолог растений) и Тахтаджан (ботаник). Колossalная роль в теории и гипотезы цветения

принадлежит Чайлахяну. Его флоральную теорию цветения до сих пор признают в мире. Он работал при Лысенко в институте физиологии растений. Прекрасный экспериментатор, не имел оборудования.

Гипотеза Чайлахяна о флоральном стимуле

Доказал, что для таких систем формируется флоральный стимул, который должен быть где-то в листе, химический стимул, передвигается по растению. Он его назвал Флоригеном. Сформулировал, что все растения - короткодневные и длиннодневные отличаются тем, что стимул как минимум двухкомпонентен и один из компонентов – гиббереллин, второй он назвал антезин. Антезин сначала никто не нашел, Чайлахяну не хватило чуть-чуть жизни. В конце концов сотрудники его лаборатории нашли этот белок, с его смертью все заглохло, сейчас признают, что FT-белок – тот самый флориген. Он работал с короткодневными растениями, считал, что у длиннодневных растений нет гиббереллинов, но есть антезины. Обработка гиббереллином длиннодневных растений приводит к тому, что они зацветают. У короткодневных растений наоборот гиббереллины есть, но нет антезинов. Поскольку антезины не были определены, он делал прививки. Закрывал один побег мешочком, ставил горшок так, чтобы у одного побега был длинный день, у другого – короткий. Оказалось: если один из побегов помещать на индукционный период, а другой – на неиндукционный, то зацветало все растение. Отрывал листочки на побеге. Если оставить 1/10 от листовых поверхностей у побега, находящегося на индукционном периоде, то все будет цвести. Если оторвать все тогда же, то индукции цветения не будет. Сделал вывод, что стимул получается в листьях и транспортируется по всему растению. Доказывал, что антезины делал прививки, даже не одного и того же вида, близких. Показал, что идет из листьев, переходит даже через область прививки. Оказалось, что регуляция индукции цветения – сложная система. Для чего существует длинный и короткий день – растения живут в разных широтах экологическая ситуациях. В наших и полярных областях: осень, весна, зима холодные. Логично цвести летом, на длинном дне. Весна, осень зима – теплые, лето – жаркое сухое (субтропики). Логично цвести весной и осенью – короткодневные растения. Все растения по сигналингу перехода к цветению разделяются на фотопериодические, для которых важна длина дня. Есть растения, для которых обязательен процесс яровизации (вернализации): необходимо пройти через низкие температуры, например, когда нужно зацвести ранней весной. Гиббереллиновый путь, о котором говорил Челокян. Автономный путь – растения цветут независимо или почти независимо от внешних факторов. Углеводный либо сахарозный путь (много сахара во флоэмном экссудате, можно зацветать). Это – не растения, это – разделение сигналинга. Растения тоже можно делить, но не так строго. Для решения, цвести или нет, растение собирает несколько сигналов (Схема 4) Может быть фотопериодический путь, но недостаточно углеводов или сахарозы, тогда растение не цветет). Есть регулирование фотопериодизма: должны работать циркадные ритмы (часы). В центральном осцилляторе фактор гигантэа кодирует большой белок,

локализован в ядре (функция не ясна) - выход из циркадных ритмов. Это первичный сигнал о часах. Задействован на *constant*, *constant* – трансфактор, имеет цинковые пальцы. Он – главный регулятор выхода из фотопериодической системы индукции цветения. На него будут оказывать влияние не только циркадные ритмы, но и качество света (работают фитохром, криптохром). Это – собиратель информации о фотопериодическом пути. Если его много, с фотопериодизмом все нормально, циркадные ритмы сработали, качество света нормально, это – фотопериодизм. Дальше – автономный путь и путь весенний. Они работают через



GI – *gigantea*, CO – *constant*, FLC – *flowering locus C*, FT – *flowering locus T*, FD – трансфактор с Bzip, SOC1 – *suppressor of overexpression CO1*

Схема 4 Регуляция индукции цветения – генетическая модель.

трансфактор FLC (Flower locus C) с MADS-боксом, это – трансфакторы, которые чрезвычайно важны для цветения. FLC-мощный ингибитор цветения. Все завязывается на FT – небольшой белок 23 кДа, он может транспортироваться по флоэме и скорее всего – тот самый флориген. 7 лет назад была статья, вошла в учебники, что РНК этого белка является флоригеном. Проверили, была ошибка, не так сделали реалтайм-ПЦР. По уточненным данным, это – белок, предсказанный Челокяном, его сейчас часто называют флоригеном. Это – центральное звено цветения, *Constant* его активирует, FLC – ингибирует. Автономный путь, когда все хорошо, растение набирает достаточно биомассы, возраст снимает этот ингибитор. Вernalизация и низкие температуры тоже выключают ингибитор, в норме, если их нет, ингибитор тормозит FT, FT – центральный фактор индукции цветения. Он переходит из листа в меристему, взаимодействует с другим трансфактором, FD. Запускает MADS-box-содержащий фактор SOC1 – супрессор оверэкспрессии CO1, который запускает непосредственно гены следующего этапа,

эвокации цветения. Обходной путь: гиббереллин работает непосредственно с SOC1 в меристеме. То же самое - углеводно-сахарозный путь тоже работает на более позднем этапе, на ген LFY. Гиббереллин может работать либо через систему сигналинга, либо через другие трансфакторы GAM1B. Вот система индукции цветения, несколько сигналов, механизмов для разных растений по-разному. Фотопериодический, автономный путь и вернализации сходятся на флоригене. Через CONSTANT-активация, через FLC - ингибирирование. На FLC работало АБК, не очень подтверждается. Еще два пути обходят флориген и работают на более низких этапах. Оказывается, фоторецепторы влияют на индукцию цветения - COP1, который мы подробно разбирали, убиквитинлигаза, в темноте, находится в ядре, убиквитинирует 8 трансфакторов, работает с Constant, который здесь есть. Качество света через фитохром и криптохром - COP1 работает. Фактически, она убиквитинирует CONSTANT и ничего не происходит. Если на свету она уходит, то CONSTANT начинает работать и запускает FT-фактор. Универсальная система через убиквитинЕ3лигазу. Таким образом работает длинный и короткий день, фотопериодизм и флориген. CONSTANT - белок, который, который регулирует фотопериодизм.

Работают часы, длиннодневные растения, CONSTANT мРНК нормально активируется на свету, перестает убиквитинироваться и накапливается. Разваливается в темноте, белок не успевает синтезироваться. Поэтому FT почти нет. Если длинный день, то мРНК есть, белка много, он успевает активировать FT-фактор, он срабатывает, транспортируется в апикальную меристему. Короткий день: если на длинном дне CONSTANT - активатор, показано на его гомологе, что у короткодневных растений гомолог CONSTANT - HD1 (Heading-dat1) - ингибитор. На длинном дне его мРНК и белок накапливаются, он выключает HD3A – аналог флоригена, гомолог FT-фактора. На длинном дне ингибитор накопился, стоит блок цветения. На коротком дне все наоборот. Когда наступает ночь, мРНК разваливается, белка нет, нет ингибитора, успевает накопиться HD3A, который является флоригеном для короткодневного растения. Флориген транспортируется в меристему, в ней начинается следующий этап: эвокация цветения.

Эвокация цветения

SOC1 - центральное звено, работает в меристеме. FD с FT взаимодействуют вместе, это - трансфактор, активирует работу SOC1, который запускает гены: LF1, и другие (FLC в меристеме работает как ингибитор SOC1). Биохимическая модель индукции: цитокинин, сахароза, соотношение азот/минеральное питание будут влиять на события в меристеме, где будут FT, FD и SOC1.

Четыре пути регулирования цветения растений.

Фотопериодический путь. Начинается в листьях, участвуют фитохромы и криптохромы. В длиннодневных растениях на длинном дне взаимодействие фоторецепторов с

циркадными часами инициирует экспрессию CONSTANT в клетках-спутниках флоэмы листа. CO - трансфактор (цинковые пальцы) активирует FT-ген, продукт которого (Флориген!!) транспортируется по флоэме в апикальную меристему и инициирует цветение. При этом FT - белок взаимодействует с трансфактором FD (bzip), FT/FD-комплекс активирует ряд генов: SOC1, AP1, LFY, которые запускают гомеозисные гены формирования флоральной меристемы. В короткодневных растениях все наоборот: трансфактор не активирует, а тормозит. Это - гомолог CO - Heading-dat, который работает как ингибитор цветения. В течение индуктивного короткого дня HD1 не синтезируется. Его отсутствие стимулирует экспрессию Hd3a-гена в клетках-спутниках (гомолог FT-белка DDP, который транслоцируется в апикальную меристему и запускает цветение).

При автономном пути и вернализации цветение запускается на внутренний сигнал - наличие определенного количества листьев (автономный путь), или низкой температуры (вернализация). У арабидопсиса все гены автономного пути работают в меристеме. У некоторых растений могут работать в листьях. При автономном пути происходит выключение экспрессии ингибитора цветения - FLC (Flowering locus C), который ингибирует экспрессию SOC1 (MADS-бокс-содержащий трансфактор). Но возможны различные механизмы (например, эпигенетический выключатель).

Углеводный, или сахарозный путь. Отслеживает метаболический статус растения. Сахароза стимулирует цветение арабидопсиса за счет увеличения экспрессии LFY. Механизм пока не ясен.

Гиббереллиновый путь. Необходим для раннего зацветания или для зацветания при неиндукционном периоде на коротком дне. В гиббереллиновый путь вовлечены в качестве промежуточных GAMYB-трансфакторы, которые запускают экспрессию LFY. GAMIB также может взаимодействовать с SOC1 независимым путем. Гиббереллиновый путь для раннего зацветания, или зацветания при неиндукционном коротком дне, скорее всего там работает трансфактор GAMIB, который тоже работает с LFY, и гиббереллины взаимодействуют с SOC. Это - обходной путь, пайпасс работы гиббереллинов.

Формирование цветка

Гете – ему принадлежит флоральная теория морфогенеза цветка. Написал эссе "Опыт объяснения метаморфоза растений". В конце 18 века нашел довольно много мутантов, показал, что каждый орган цветка (лепесток, тычинка, чашелистик) может быть при определенных нарушениях аналогом листьев. Сформулировал, что все органы цветка -

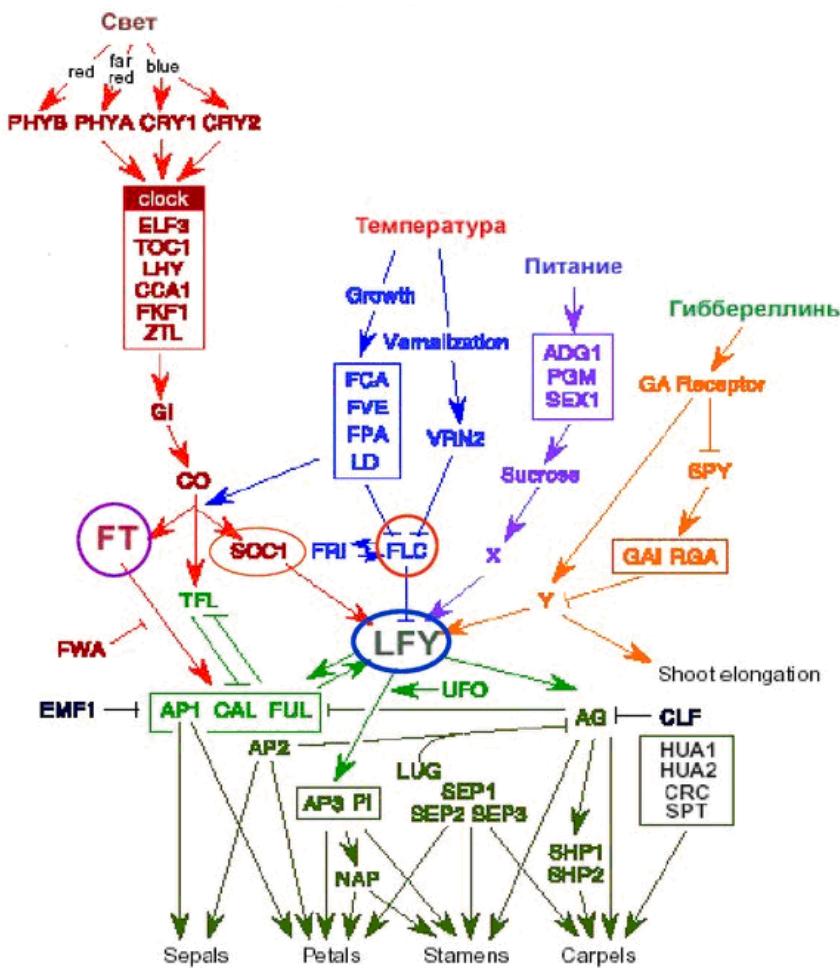


Рисунок. 85. Общая схема индукции и эвокации цветения

вилоизмененный побег. Органы цветка - видоизмененные листья. Когда стимул пришел в меристему, сработала система флоригена, активировался SOB, дальше вегетативная меристема должна превращаться в генеративную. Анализ мутантов по форме цветка позволил сформулировать, как все происходит. Общая схема индукции и эвокации цветения (Рис. 84): FT – ген – фотопериодическая индукция цветения. Работают все фоторецепторы, циркадные часы, GIGANTEA, CONSTANT, помимо этого температура, вернализация, питание, гиббереллины. Оказывается, FLC важен в меристеме, когда будут закладываться органы цветка, центральная роль переместиться к LFY. FT – листовая индукция, SOC1 – меристема, FLC – ингибитор, действует на SOC1 и LFY. LFY - центральная роль при формировании цветка. Он – интегратор информации от разных путей индукции цветения. Специфический трансфактор: петля-поворот-петля. У растений всегда есть пара, FD работает с FT, SOC1 – тоже не один, с LFY работает YFO – белок, содержащий F-бокс, корегулятор LFY. Оказалось, у LFY есть ортологи у всех изученных растений. Гиббереллины больше задействованы на LFY, чем на SOC1, питательный сахарозный путь тоже - интегратор - LFY. Мутация LFY у арабидопсиса, получается много флоральных цветков. Получено трансгенное подтверждение роли

LEAFY в формировании флоральной меристемы – тот же фенотип. Когда LFY сработал и запустил программу формирования цветка – помогла генетика. Работали две группы исследователей одна на арабидопсисе, вторая – на львином зеве, оказалось, что много мутантов, которые нарушают строение цветка, *Apetula* – нет лепестков, *agamos* – безбрачный, ни тычинок, ни пестиков. Оказалось, что все эти мутанты, анализ мутантов привел к гипотезе "теория войны позиций", потом назвали системой ABC, которая красиво определяет генетику и формирование цветка, сейчас под генетической теорией есть физиологическое воплощение. Суть – метаморфозы листьев, обусловлены группами генов ABC, они работает специфично в нужных местах, тут еще важны катаstralные гены, гены разметки, в зависимости от того, где какой набор генов работает, формируются органы цветения. Они располагаются так, что гены A работают в зоне, где должны формироваться лепестки и чашелистики, гены C – тычинки и пестики. Гены группы B – где тычинки и лепестки. Почему теория войны позиций – если не работают гены группы A, то гены C занимают их место. Если не работают C, их место занимают гены, гены группы B либо работают, либо нет. Если смутировали гены группы B – *Apetula3* или *Pistelata* – чашелистики, пестики, чашелистики сли работают только гены группы A, формируются чашелистики, если A и B – лепестки, если B и C – тычинки, только C – пестики. Это – нормальный цветок. *Apetula2* – мутант по A. Смутировали гены по A – пестики тычинки пестики тычинки пестики. *Agamos* – не работают гены группы C. Есть чашелистики и лепестки, цветок – большой, махровый, не терминальный. Это – чисто генетическая модель, подтверждается не только на арабидопсисе, но и львином зеве. Какие гены определяют эти функции: большинство из них – гены с MADs-боксом. Все гены – трансфакторы. MADs-бокс делает то, что белок должен работать в паре. Трансфакторы с ним – тетramerы. Регуляторные гены ABC запускают тысяч генов. На участки тычинок, чтобы преобразовать нормальную меристему во флоральную включается 1000 генов. Плодолистики – около 300 генов. Регуляторы – гены с MADS-боксом – ключевые для флорального морфогенеза.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ